



**Universidad Autónoma Metropolitana**

**Unidad Xochimilco**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica**

**Reporte de Servicio Social**

**Nombre del proyecto:**

*Análisis de la frecuencia de variantes génicas en el gen SOD1 en pacientes mexicanos con esclerosis lateral amiotrófica.*

**Proyecto genérico:**

Evaluación de productos relacionados con la salud

**Presenta:**

Xaviera Juárez Dávalos

2133076107

**Asesores:**

Dra. Petra Yescas Gómez

Dr. Alberto Ortega Vázquez

**Periodo de realización:**

Enero 2018 - Julio 2018

# Índice

<b>Datos generales</b> .....	<b>4</b>
<b>Lugar y periodo de realización</b> .....	<b>4</b>
<b>Unidad, división y licenciatura</b> .....	<b>4</b>
<b>Nombre de plan, programa o proyecto en que se participa</b> .....	<b>4</b>
<b>Asesores</b> .....	<b>4</b>
<b>1 Introducción</b> .....	<b>5</b>
1.1 Epidemiología .....	6
1.2 Clasificación de la esclerosis lateral amiotrófica. ....	6
1.3 Estructura y actividad de la proteína SOD1 .....	7
1.4 El gen <i>SOD1</i> .....	10
1.5 Disfunción mitocondrial .....	12
1.6 Excitotoxicidad del glutamato .....	13
1.7 Estrés oxidativo .....	14
1.8 Terapia Farmacológica .....	15
<b>2 Justificación</b> .....	<b>16</b>
<b>3 Objetivos</b> .....	<b>16</b>
3.1 Objetivo General .....	16
3.1.1 Objetivos Específicos .....	16
<b>4 Metodología</b> .....	<b>17</b>
4.1 Muestra .....	18
4.2 Extracción de DNA genómico .....	18
4.3 Electroforesis en gel de agarosa para el análisis cualitativo de DNA. ....	18
4.4 Análisis de las muestras de DNA .....	19
4.5 Análisis de los exones del gen <i>SOD1</i> por PCR. ....	20
4.6 Secuenciación de las muestras. ....	21
<b>5 Actividades realizadas.</b> .....	<b>22</b>
5.1 Análisis cuantitativo de las muestras .....	22
5.2 Preparación de geles de agarosa. ....	22
5.3 Análisis de integridad .....	22
5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	22
5.5 Condiciones de PCR .....	23
5.6 Análisis y purificación de los productos de PCR. ....	24

5.7	Secuenciación.....	25
5.8	Purificación de productos de secuenciación .....	26
5.9	Análisis de los resultados .....	26
<b>6</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>26</b>
6.1	Cuantificación .....	26
6.2	Integridad.....	27
6.2.1	DNA.....	27
6.2.2	PCR.....	27
6.3	Secuenciación de las muestras.....	28
6.4	Exón 1 .....	28
6.5	Exón 2 .....	30
6.6	Exón 4 .....	33
6.7	Exón 5 .....	33
<b>7</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>34</b>
7.1	Exón 1 .....	34
7.2	Exón 2 .....	36
7.3	Exón 4 .....	41
7.4	Exón 5 .....	41
<b>8</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>44</b>
<b>10</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>45</b>

## **Datos generales**

Nombre: Juárez Dávalos Xaviera

Matricula: 2133076107

Dirección: Retorno Pelicano Edificio: 3 Departamento: 301 C.P. 55119, Valle de Ecatepec, Ecatepec de Morelos, Estado de México

Correo: xavierajuarez12@gmail.com

Teléfono fijo: 15-62-00-99

Teléfono móvil: 77-14-17-05-06

## **Lugar y periodo de realización**

Laboratorio N-103 Genética Molecular Departamento de Sistemas Biológicos/Departamento de Neurogenética "Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez"

Del 29 de enero de 2018 al 30 de julio del 2018.

## **Unidad, división y licenciatura.**

Unidad: Xochimilco

División: Ciencias Biológicas y de la Salud.

Departamento: Sistemas Biológicos.

Licenciatura: Química Farmacéutica Biológica.

## **Nombre de plan, programa o proyecto en que se participa.**

Análisis de la frecuencia de variantes génicas en el gen *SOD1* en pacientes mexicanos con esclerosis lateral amiotrófica.

## **Asesores**

Externo: Dra. Petra Yescas Gómez (Cédula 5913885)

Interno: Dr. Alberto Ortega Vázquez (No. Económico 35583)

# 1 Introducción

El desarrollo neuronal y la supervivencia dependen estrechamente de un equilibrio y apoyo regulado por factores intrínsecos como extrínsecos. Estos factores son capaces de regular varios procesos fisiológicos importantes, tales como: la diferenciación neuronal, mantenimiento de la sinapsis neuronal, supervivencia a través de la inhibición de la apoptosis, neurogénesis y crecimiento axonal. Además, proporcionan un medio ambiente adecuado para la supervivencia neuronal siendo esencial para las neuronas en la medula espinal y también para las diferentes fuentes celulares, incluyendo astrocitos, microglía, neuronas y células endoteliales (Dorado, Vargas, & Selva, 2003).

Las neuronas funcionan como bloques de construcción celular del sistema nervioso. Las neuronas motoras transmiten señales desde el cerebro hasta la medula espinal y está a los músculos, los cuales dirigen el movimiento muscular. Las neuronas motoras se encuentran entre las neuronas más largas del cuerpo humano y sus axones pueden llegar a medir hasta 1 metro de longitud. Las neuronas motoras superiores conectan el cerebro con la médula espinal, y las neuronas motoras inferiores conectan la médula espinal con el músculo (Bonafede, 2017).

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), junto a sus variantes (esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva y parálisis bulbar progresiva), son las enfermedades de neurona motora más frecuente del adulto. Se trata de una enfermedad debilitante, progresiva, de carácter neurodegenerativo, secundaria a la afectación de las neuronas motoras superiores (localizadas en la corteza motora precentral) e inferiores (localizadas en los núcleos motores del tronco y la asta de la médula). La etiología de esta enfermedad es desconocida, se considera que alrededor del 5% al 10% de los casos son familiares (Camacho, Esteban, & Paradas, 2018). La ELA en su mayoría esporádica cuenta con el 90% de los casos ocurridos sin antecedentes familiares de la enfermedad, siendo que la edad pico de inicio es de 58 a 63 años para este tipo de casos. Presenta una supervivencia media de 3 a 5 años después de la aparición de los síntomas (Martínez, González-Garza, & et al, 2009).

Aunque se ha documentado el papel de las alteraciones epigenéticas en la patogenia de la ELA, es necesario aclarar como estas alteraciones epigenéticas se involucran y podrían estar relacionadas con factores ambientales. En particular, algunos pacientes con ELA presentan capacidad física al momento de realizar una actividad y presentan por igual un índice de masa corporal más bajo en comparación con los controles sanos (Armon, 2003) (Turner, 2013). Además, de los factores de riesgo ambiental al combinarlos con las condiciones de trabajo

(trabajadores de la construcción, carpinteros, trabajadores agrícolas, técnicos de laboratorio y atletas) podrían potencialmente aumentar el riesgo de ELA debido a la exposición a metales pesados, solventes, pesticidas y sustancias químicas que pueden contribuir a desencadenar mecanismos patogénicos del ELA (Ingre, Roos, Pielh, Kamel, & Fang, 2015). Se han descrito variantes genéticas que están presentes tanto en caso de ELA familiar como en casos de ELA esporádica. (Henden, Twine, Szul, & et.al, 2020)

## 1.1 Epidemiología

La incidencia estimada de ELA en Europa es de 2 a 16 por cada 100 000 personas al año (Talbot, Malek, & Lacomis, 2016). En 2014 se realizó una estimación del número de casos con ELA en México, resultando una prevalencia de 5,000 a 7,000 pacientes y esta va en aumento; además se concluyó que la edad promedio de presentación de esta enfermedad es de 47 años, menor a la descrita en estudios estadounidenses y europeos (60-80 años) (Martínez H. , Parada-Garza, Meza, & et al, 2014). Hasta el momento, su tratamiento se basa en medidas paliativas de rehabilitación y en el manejo sintomático de las diferentes complicaciones (Camacho, Esteban, & Paradas, 2018).

Los rasgos clínicos se atribuyen a la combinación de signos y síntomas neurológicos por disfunción de las neuronas motoras superiores (NMS) y de las neuronas motoras inferiores (NMI), con base a los criterios establecidos por la Federación Mundial de Neurología empleando la Escala de Valoración Funcional para ELA Revisada (ALSFRS-R) y los Criterios de “El Escorial” para realizar el diagnóstico de la ELA con propósitos de investigación y para ensayos clínicos (Martínez, Parada-Garza, & Meza, 2014).

## 1.2 Clasificación de la esclerosis lateral amiotrófica.

La ELA de acuerdo con los criterios clínicos se subdivide en ELA posible, probable y definida. De acuerdo con los criterios del El Escorial los diferentes tipos de presentación incluyen a las formas de ELA esporádica, ELA familiar, ELA juvenil y ELA del pacífico occidental, esta última presenta una incidencia 50 a 150 veces más alta que en otras áreas del mundo. La ELA que se presenta en personas del Pacífico Occidental (población de Chamorro de las Islas Guam, Rota y Tiñam, población japonesa de la península de Kii de la Isla Honshu y la población de Nueva Guinea occidental de Indonesia), es diferente a la ELA típica o clásica, debido al punto de vista anatomopatológico se manifiesta con “ovillos

neurofibrilares" y clínicamente se asocia al complejo demencia-parkinsonismo. Los factores genéticos no juegan un papel patogénico en dicha forma de la enfermedad; se ha observado que posibles factores causales extrínsecos estén asociados a esta forma, como es el consumo de las semillas de cicada y su posible asociación con la excitotoxicidad, así como a la presencia de minerales en el agua existentes en la zona (Guam, 2020). Para el diagnóstico clínico de esta enfermedad neurodegenerativa, se requiere contar con evidencia de manifestaciones clínicas de disfunción de la NMS y NMI, además de la progresión y propagación de los signos de lesión al sistema motor (Tovar, Tapia, & Lazo, 2014).

Las manifestaciones clínicas incluyen debilidad progresiva, atrofia, fasciculación, hiperreflexia, disartria, disfagia y al progresar se produce parálisis de la función respiratoria. Las características patológicas incluyen el reemplazo de las neuronas motoras con astrocitos fibrosos y la atrofia de las raíces nerviosas espinales y las vías corticoespinales (Adams & et al, 2018).

Las formas de ELA familiar están vinculadas a variantes genéticas en genes específicos. Las mutaciones en 20 *loci* diferentes se han asociado a los casos de ELA Familiar. Actualmente, cuatro genes *SOD1*, *TDP43*, *FUS* y *C9orf72*, que se presentan con un patrón de herencia autosómica dominante y se puede incluir tanto en casos esporádicos como en familiares.

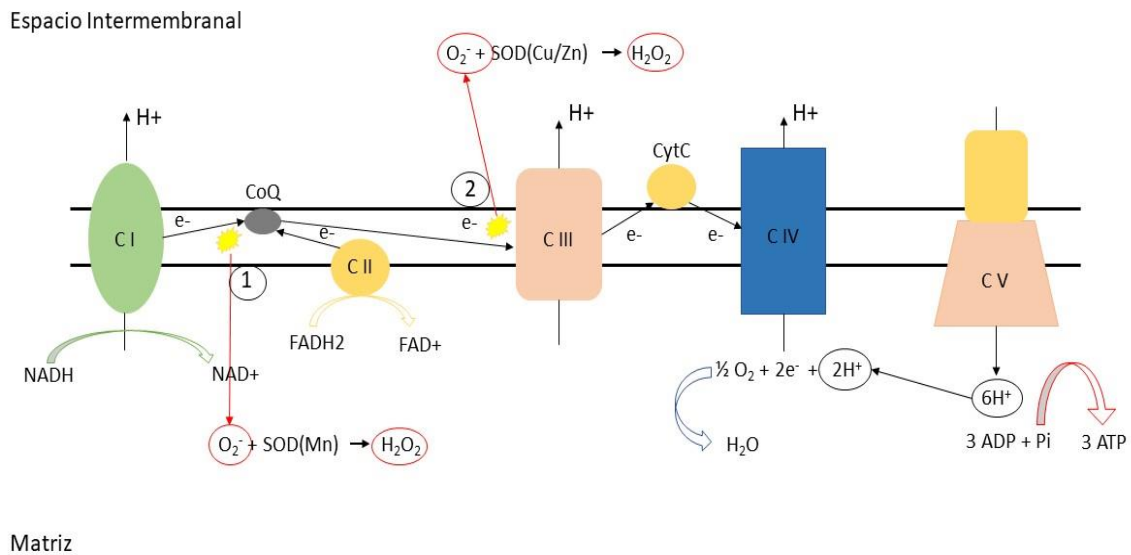
Las variantes genéticas relacionadas con la ELA incluyen aquellos genes que cuando están mutados causan la enfermedad y otros presentan variantes de susceptibilidad genética, que aumentan el riesgo de tener ELA. Las mutaciones en el gen *SOD1* o gen del superóxido dismutasa de Cu/Zn causan aproximadamente el 20% de todos los casos de ELA familiar y más o menos el 3% de la ELA esporádica. (Takalo, Salminen, & et al, 2013) (Adams & et al, 2018) (Siddique & Siddique, 2019).

### 1.3 Estructura y actividad de la proteína SOD1

Los radicales libres de oxígeno, que incluyen el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $-OH$ ), y otras especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y el óxido nítrico (NO), se generan en varias reacciones metabólicas de la célula. La defensa más importante contra la producción de exceso de radicales libres es la acción combinada de tres enzimas: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa, y catalasa (Baynes & Dominizack, 2019).

La SOD cataliza la conversión de superóxido a  $H_2O_2$ . El glutatión peroxidasa y la catalasa convierten el  $H_2O_2$  en agua. En presencia de NO, el anión superóxido

puede formar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que pueden reaccionar para dar lugar a radicales hidroxilos (Fig. 1).



**Fig. 1.** Cadena de transporte de electrones ubicada en la membrana mitocondrial interna (MMI). (1) y (2) representan las principales fuentes de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), una especie de oxígeno reactivo convertido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una reacción de dismutasa catalizada por SOD (Cu / Zn; SOD1) y SOD (Mn; SOD2) en el espacio mitocondrial intermembrana (EMI) y la matriz, respectivamente. CI: complejo I NADH deshidrogenasa, CII: succinato del complejo II deshidrogenasa, CIII: complejo III de ubiquinol citocromo C oxidorreductasa, CIV: complejo IV citocromo C oxidasa y CV: complejo V ATP sintasa. (Wang, Johnson, & et. al, 2008)

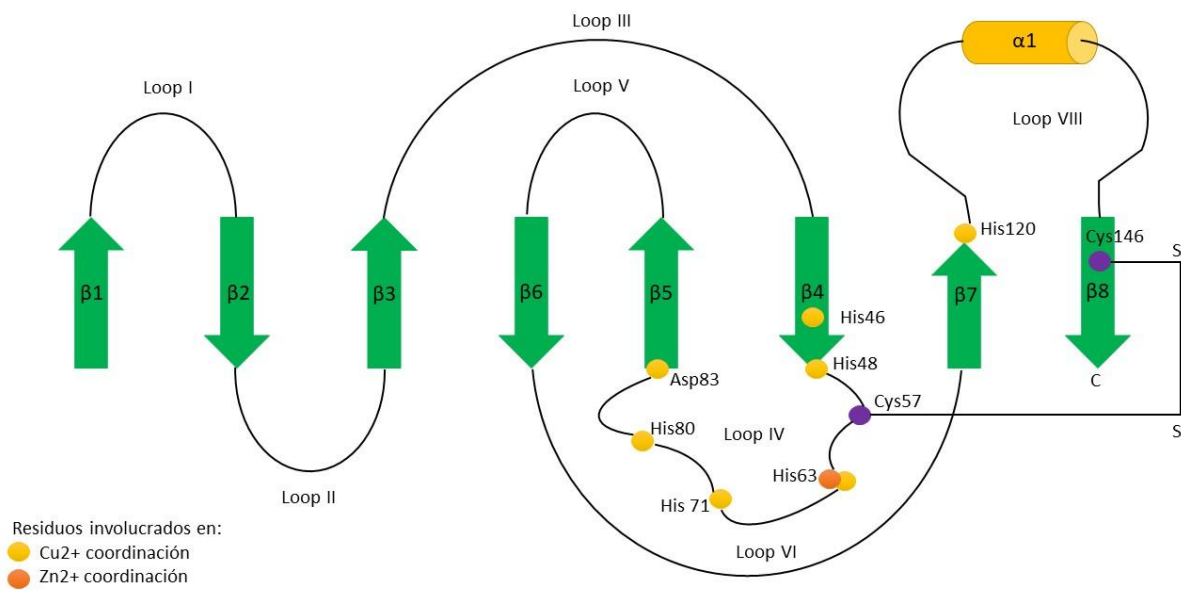
Se han identificado tres formas de SOD: la citosólica dependiente de cobre-zinc/CuZn-SOD (SOD1), la mitocondrial dependiente de manganeso Mn-SOD (SOD2), y la extracelular dependiente también de cobre-zinc (EC-SOD o SOD3). Cabe mencionar que el ion Cu es un catalizador para la actividad antioxidante, mientras que el ion Zn coordinado actúa para estabilizar su estructura molecular (Baynes & Dominizack, 2019).

El anión superóxido se produce durante el metabolismo normal y es muy tóxico, pudiendo interrumpir la actividad celular mediante el ataque a membranas lipídicas, proteínas y DNA (Andrés, De la Lastra, Plou, & Lebaña, 2021). La SOD1 se expresa de manera constitutiva en todas las células eucariotas. Es una proteína abundante que comprenden aproximadamente el 1% de la proteína citosólica total (Adams & et al, 2018).

La cadena polipeptídica se pliega en un cilindro aplanado de ocho bandas antiparalelas de estructura beta que se dividen en dos conexiones clave que cierran para dar lugar a la formación de un barril beta, como se muestra en la Fig. 2. Desde ambos extremos, superior e inferior, del barril beta, se sobresalen dos

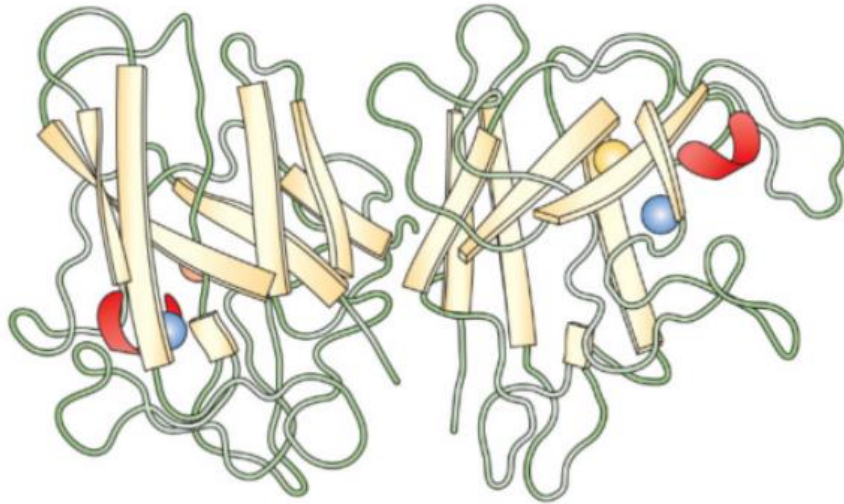


grandes bucles no helicoidales. Uno contiene la mayoría de los residuos requeridos para la direccionalidad electrostática de  $O^{2-}$ , mientras el segundo contribuye a la dimerización. El sitio activo se localiza en el final del barril beta, con una de las caras abiertas al exterior y en el extremo opuesto de la otra subunidad, posicionando los sitios activos en lados apuestos de la enzima. El dímero SOD1 es extremadamente estable debido a fuertes interacciones hidrofóbicas, y la dimerización dobla la actividad dismutasa (Baynes & Dominizack, 2019).



**Fig 2.** Esquema que representa los determinantes de la estructura terciaria del ser humano. La SOD1, que incluye láminas  $\beta$  (flechas verdes), hélice  $\alpha$  (cilindro amarillo) y bucles. Los puntos amarillos representan residuos coordinados de  $Cu^{2+}$  en los residuos (His46, His48, His63, His120). Los puntos naranjas representan residuos de coordinación de  $Zn^{2+}$  en los residuos (His63, His71, His80, Asp83). Los puntos violetas representan residuos implicados en la formación de puentes disulfuro (Cys57, Cys146). (Wang, Johnson, & et. al, 2008)

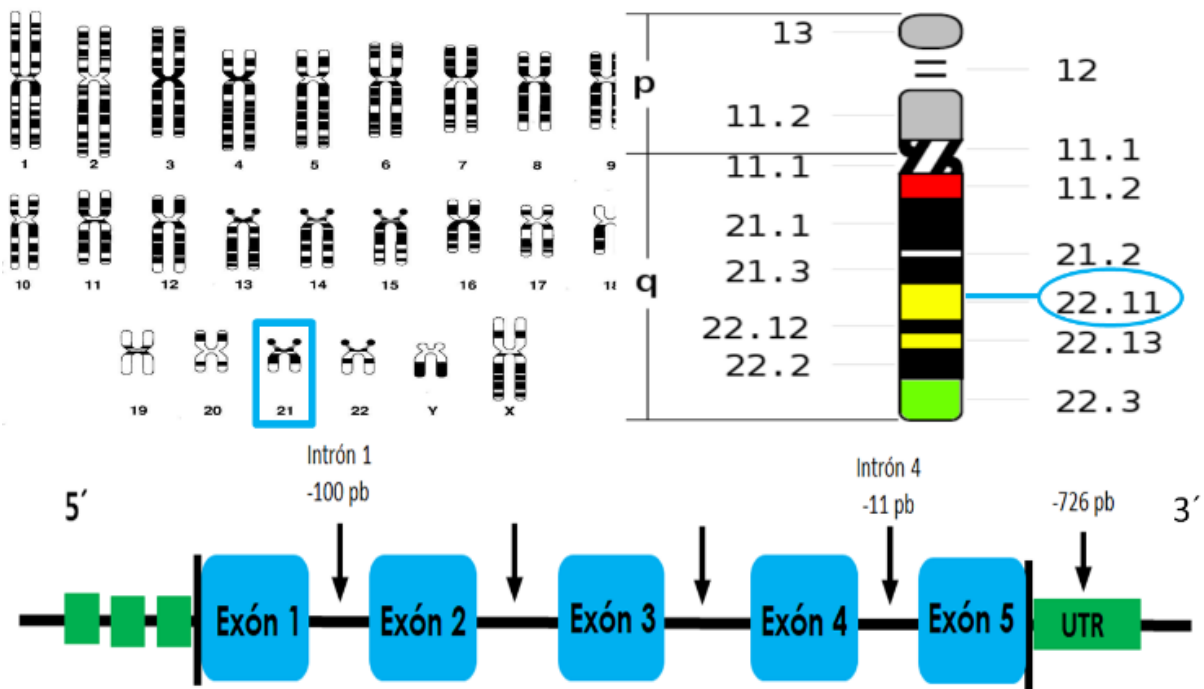
El anión superóxido es conducido al sitio activo del enzima que contiene el ion  $Cu^{2+}$  atravesando un canal cargado positivamente. El  $Zn^{2+}$  está implicado en el mantenimiento de la estabilidad del pH de la reacción de dismutación y en la rápida disociación del  $H_2O_2$  producido, que puede inactivar lentamente a la SOD1. El acceso al sitio activo se limita por el tamaño y la carga, favoreciendo al ion  $O^{2-}$  y excluyendo grandes moléculas. SOD1 puede funcionar como peroxidasa, catalizando reacciones oxidativas de substratos mediante el peróxido de hidrógeno. (Fig. 3) (Adams & et al, 2018)



**Fig 3. Estructura tridimensional de una proteína dimérica.** Estructura cuaternaria del superóxido dismutasa Cu-Zn. La superóxido dismutasa Cu-Zn tiene una estructura dimérica, como monómero tiene una masa molecular de 16.000 Da. Cada subunidad consta de ocho hojas beta antiparalelas denominadas estructura en barril beta. El arco rojo representa una alfa hélice corta. La esfera de color amarillo representa a él ion Zn y la de color azul el ion Cu. (Baynes & Dominizack, 2019)

#### 1.4 El gen *SOD1*

El gen de la superóxido dismutasa (*SOD1*), se encuentra localizado en el locus 21q22.11. Es un gen pequeño que consiste de 5 exones y 4 intrones (Figura 4), que codifica para la enzima superóxido dismutasa homodimérica soluble (153 aminoácidos, peso molecular 16 kDa). Las variantes de *SOD1* se pueden localizar en la cadena beta, determinando la inestabilidad de la proteína estructural, o en los sitios de unión al metal, determinando la falta de Cu y/o Zn, la disfunción conformacional y la alteración de las interacciones de la proteína. En ambos casos, la desestabilización de la estructura puede llevar a la formación de agregados. (Rosen, Siddique, & et al, 1993) (Diamanti, Gagliardi, Cereda, & Ceroni, 2019).



**Fig 4. Estructura y localización en SOD1.** Cromosoma 21 homo sapiens (recuadro azul), localización del cromosoma 21 ubicación del gen SOD1 en 21q22.11 (círculo azul) (National Center for Biotechnology Information, 2018) (modificada). Conformación del gene SOD1 por 5 exones y 4 intrones. (Diamanti, Gagliardi, Cereda, & Ceroni, 2019)

Más de 20 genes y proteínas causantes se han identificado por análisis genético y patológico de las neuronas de pacientes con ELA, las mutaciones en SOD1 se identificaron por primera vez como la proteína causal de esta enfermedad (Ghadge, Lee, & et al., 1997) (Brasil, Magalhaes, & et al, 2018).

Aproximadamente 185 mutaciones en SOD1 se han asociado con ELA y todas ellas se heredan con un patrón de herencia autosómico dominante. Estas mutaciones causan ELA mediante un mecanismo de ganancia de función tóxica (Moller & et al, 2017) (Rodrigues, Abraham, & Freire, 2021).

Se han propuesto varios mecanismos tóxicos que incluyen, entre otros, excitotoxicidad, neuroinflamación, pérdida de homeostasis proteica, disfunción mitocondrial y transporte axonal defectuoso. La proteína SOD1 se une a iones de cobre y zinc; también es una de las dos isoenzimas responsables de destruir los radicales libres producto del superóxido ( $O_2^-$ ), en el organismo (National Center for Biotechnology Information, 2018). La SOD1 en los casos de ELA, es inestable y forma agregados en el citoplasma de la neurona motora, el axoplasma y la mitocondria (Colltel, 2005). Aunque SOD1 normalmente funciona como una enzima antioxidante al desintoxicar el superóxido ( $O_2^-$ ), el daño oxidativo por SOD1 mutada se atribuye predominantemente a una ganancia de toxicidad a través de la regulación positiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) en lugar de a la pérdida de la función enzimática (Moller & et al, 2017).

## 1.5 Disfunción mitocondrial

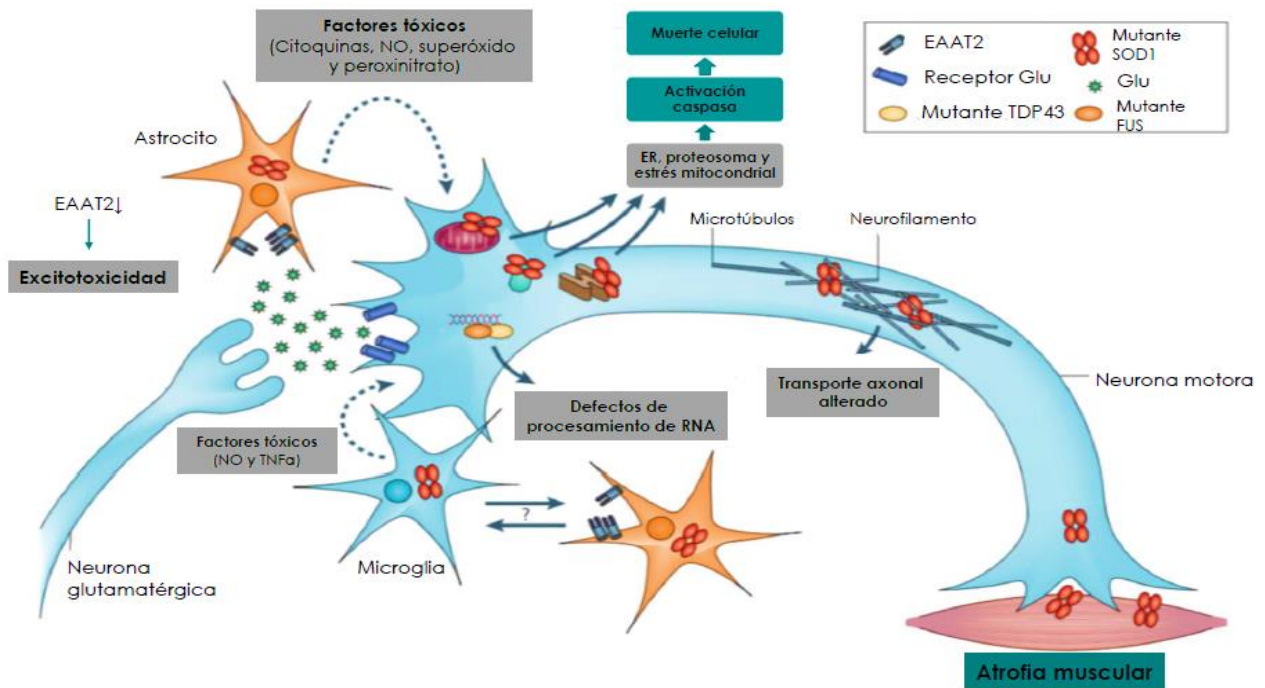
El daño mitocondrial es una de las características más comunes de muchas de las enfermedades neurodegenerativas. Las mitocondrias son los orgánulos más importantes para la producción de energía, la respiración celular y la homeostasis del calcio. Además, producen un alto nivel de ROS y desempeñan un papel clave en la apoptosis, abriendo el poro de transición de la permeabilidad y permitiendo la liberación del citocromo C, lo que conduce a la activación de las caspasas. Por estas razones, las alteraciones estructurales y bioquímicas de las mitocondrias se pueden vincular a muchos aspectos de la patogénesis de la ELA. Las alteraciones morfológicas en las mitocondrias, tales como orgánulos vascularizados y dilatados con cristales y membranas desorganizadas son ejemplos de ello (Boillée, Vande Velde, & Cleveland, 2006) (Sasaki & Iwata,, 2007).

Aunque las mitocondrias tienen una proteína SOD propia (*SOD2*), la proteína SOD citoplasmática (*SOD1*), también está presente, en niveles bajos, en el espacio intermembrana mitocondrial y en su matriz (Bergemalm, Jonsson, Graffmo, & Andersen, 2006). La *SOD1* mutada puede interferir con la función antiapoptótica de Bcl-2 (medida por la apoptosis mitocondrial), afecta la importación mitocondrial al interferir con la maquinaria de translocación de la membrana externa e interna (TOM, siglas en inglés de *Translocase of the Outer Membrane* /TIM, siglas en inglés de *Translocase of the Inner Membrane*) y generar radicales libres tóxicos ROS (National Center for Biotechnology Information, 2018). Las especies reactivas de oxígeno, producidos dentro de las mitocondrias, inhiben la función del transportador EAAT2 (siglas en inglés *Excitatory Amino Acid Transporter 2*), la principal proteína transportadora de glutamato glial, responsable de la mayor parte de la recaptación de glutamato liberado sinápticamente (Zeni & Marrote, 2013).

Además, se requieren mitocondrias en áreas con alta demanda de ATP y homeostasis del calcio, como los terminales sinápticos. Por lo tanto, el transporte de mitocondrias a estas áreas es de primordial importancia y los defectos en el transporte mitocondrial conducen a alteraciones metabólicas en las neuronas. Dado que la mayoría de las proteínas necesarias para las funciones de este organelo se sintetizan en el citoplasma y se importan a las mitocondrias, la *SOD1* mutada asociada a la superficie mitocondrial podría prevenir la importación de proteínas (Bernard-Marissal & et al, 2012) (Mattason, 2013).

## 1.6 Excitotoxicidad del glutamato

El glutamato, el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central (SNC), se sintetiza en las terminales presinápticas y se difunde a través de la hendidura sináptica, activando receptores específicos sinápticos y activando potenciales de acción. Este neurotransmisor actúa sobre diferentes receptores de las dendritas de la motoneurona postsináptica, como los receptores  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA). La despolarización de las membranas neuronales activa los canales de calcio dependientes del voltaje, permitiendo que el calcio ingrese a la célula. Después de la liberación de la neurona presináptica, el glutamato se elimina de la hendidura sináptica por varias proteínas transportadoras de células gliales y neuronales, transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT) (Sundaram, Gowtham, & Nayak, 2012). La concentración de glutamato en la hendidura sináptica está así finalmente regulada, evitando la excitotoxicidad: una activación excesiva o prolongada de los receptores de glutamato produce la degeneración y eventualmente la muerte de neuronas involucradas (Shaw & Eggett, 2000). El exceso de glutamato aumenta el calcio intracelular, lo que aumenta el estrés oxidativo y el daño mitocondrial (Dorado, Vargas, & Selva, 2003). La *SOD1* mutada también puede desencadenar reacciones oxidativas, que puede causar daño a través de la formación de radicales libres hidroxilos o por nitración de residuos de tirosina del neurofilamento, afectando el transporte axonal, como se muestra en la Figura 5.



**Fig 5. La SOD1 mutada causa el mal funcionamiento de muchas rutas y procesos celulares.** Esta ilustración muestra la complejidad de los mecanismos patológicos durante la progresión de la ELA. Dentro de la neurona motora, la SOD1 mutada causa estrés mitocondrial, que eventualmente puede conducir a la muerte celular. La SOD1 mutada también afecta a las neuronas motoras al alterar el transporte axonal y causar defectos en el procesamiento del ARN y atrofia muscular. La progresión de la ELA también está influenciada por la disfunción de otras células que interactúan con las neuronas motoras como los astrocitos y la microglía. (Dion, Daoud, & Rouleau, 2009)(modificada)

En previas investigaciones, se predice que estos mecanismos perturbaron la homeostasis celular, lo que finalmente desencadenara la muerte de la neurona motora (Martínez, Parada-Garza, & Meza, 2014).

## 1.7 Estrés oxidativo

Los radicales libres o ROS son productos naturales del metabolismo de oxígeno. El término estrés oxidativo se utiliza cuando la producción de ROS es mayor que la capacidad de las células para eliminarla. Esto conduce a la acumulación de ROS, que causa daños irreversibles a las estructuras celulares y a las macromoléculas, como las proteínas, el DNA y RNA (Nita & Grzybowski, 2016).

La SOD1 es la principal enzima para prevenir el daño oxidativo y reducir la fuga de superóxido de las mitocondrias (Deng, Hentati, Tainer, & et al, 1993). Las variantes en este gen pueden causar alteraciones en la actividad de las proteínas que conduce a la citotoxicidad. En estudios realizados se sugiere que la patogénesis de la ELA puede implicar no solo una disminución o pérdida en la función enzimática de SOD1, sino que también es probable que sea una

ganancia tóxica dominante de la función de la enzima. Se ha propuesto que la SOD1 mutada podría revertir su actividad antioxidante normal a la producción de superóxido tóxico; la proteína mutada podría tomar electrones de otros antioxidantes celulares y donarlos al oxígeno molecular, producir superóxido y hacer de la SOD1 la fuente de estrés oxidativo. (Beckman & et al, 2001) (Liochev & Fridovich, 2003).

## 1.8 Terapia Farmacológica

De los medicamentos aprobados por la FDA (siglas en inglés *Food and Drugs Administration*) es la administración de riluzol (2-amino-6-trifluorometoxi) para el tratamiento de ELA, también conocido como Rilutek®, actúa como inhibidor de la liberación de glutamato de los terminales presinápticos mediante el bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje, lo que limita la excitotoxicidad del glutamato. Además, el riluzol tiene otros efectos neuroprotectores y acciones farmacológicas, incluyendo la modulación de los receptores ionotrópicos NMDA (N-metil-D-aspartato), inactivación del voltaje dependiente de los canales de sodio e inhibición de la captación del inhibidor neurotransmisor  $\gamma$ -ácido aminobutírico (Gurney & et al, 1998) .

Estudios *In vitro* han demostrado que el riluzol protege las líneas celulares de la neurona motora a partir del estrés del glutamato, bloqueando el daño excitotóxico (Doble, 1997). También se ha observado neuroprotección en modelos *In vivo* con ELA, en los que se tratan con el fármaco antes de la aparición de síntomas en personas con ELA. Esta prolonga la supervivencia y retrasa la neurodegeneración, mejorando el redimiendo motor de los animales tratados (Gurney & et al, 1998). Sin embargo, el uso clínico de riluzol (100 mg/día) prolonga la vida de los pacientes entre 3 a 5 meses (Miller & et al, 2013). Aunque en los resultados obtenidos en los ensayos clínicos son a menudo controversiales, el efecto benéfico es modesto en músculos bulbares y de extremidades, pero no se encontró efecto sobre la fuerza muscular (Musaró, 2013).

En algunos estudios, se examinó el efecto neuroprotector del riluzol en combinación con otros medicamentos como la rasagilina (un antiapoptótico), medicamento que reduce el estrés oxidativo por inhibición de la monoamina oxidasa B y conserva el potencial de membrana mitocondria. El tratamiento combinado de rasagilina con riluzol, mejoró el rendimiento motor y prolonga la supervivencia en ratones, mejor que cuando en el tratamiento se administró únicamente rasagilina. Dada la modesta eficacia y el alto costo de este medicamento, persisten las dudas sobre la administración clínica de estos

fármacos y aportaciones adicionales conllevan a la misma conclusión (Waibel & et al, 2004).

## 2 Justificación

La ELA va en aumento, se estima que es responsable de dos muertes por cada cien mil habitantes al año. La expectativa de vida de un paciente con ELA en promedio es de aproximadamente dos a cinco años a partir del momento del diagnóstico. Esta enfermedad tiene una expresividad variable y los pacientes que la padecen tiene una pobre calidad de vida. En nuestro país no existen estudios acerca de las variantes génicas y sus implicaciones clínicas por lo que es necesario empezar a conocer el tipo y distribución que tienen estas variantes en nuestra población ante el número creciente de casos.

La aparición gradual de la debilidad muscular y la depresión la convierten en una carga económica, social y de gran impacto en el individuo que la padece al igual que en los miembros de la familia. El diagnóstico molecular es necesario para confirmar el diagnóstico, lo que mejorará el manejo y la oportunidad terapéutica de un paciente. Las técnicas moleculares actualmente poseen altos estándares de calidad que entregan al equipo clínico información fundamental para el cuidado de los pacientes e informan de los riesgos a la descendencia, siendo una gran herramienta para enfermedades genéticas y no genéticas.

## 3 Objetivos

### 3.1 Objetivo General

Identificar las variantes genéticas en los exones del gen *SOD1* en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica familiar y esporádica.

#### 3.1.1 Objetivos Específicos

1. Determinar el tipo de mutaciones y/o variantes polimórficas presentes en el gen *SOD1*.



2. Establecer la distribución y frecuencia de las variantes génicas identificadas.

## 4 Metodología

Las muestras de pacientes con probable ELA fueron proporcionadas por el Departamento de Genética, evaluadas clínicamente por neurólogos especializados de la consulta de Neurología, Nervio y Músculo del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (INNNMVS). En la figura 6, se muestra la metodología realizada para el análisis del gen *SOD1*.



Fig 6. Diagrama de flujo del proceso de metodología para la amplificación del gen *SOD1*.

## 4.1 Muestra

El protocolo de Investigación no. **129-14** recibió financiamiento de CONACYT "Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología", con el número de registro **026211** fue aprobado por el Comité de Ética y el Comité de Investigación. Siguiendo todas las consideraciones éticas se incluyeron en el estudio 155 pacientes; 72 de sexo femenino (46.45%), 83 de sexo masculino (53.54%), que cumplieron con criterios clínicos y aceptaron participar en el estudio con previo consentimiento informado. Por consiguiente, se les tomó una muestra de sangre periférica de 10 mL, para la obtención de DNA genómico.

## 4.2 Extracción de DNA genómico

En todos los casos se realizó la extracción de DNA genómico mediante el método de sales, la cual se realizó mediante los siguientes pasos: (1) lisis celular de glóbulos rojos y (2) eliminación de proteínas mediante extracción por disolventes orgánicos y precipitación de DNA genómico, siendo el primer paso explicado en la Fig 6. (Miller, Polesky, & Dykes, 1998).

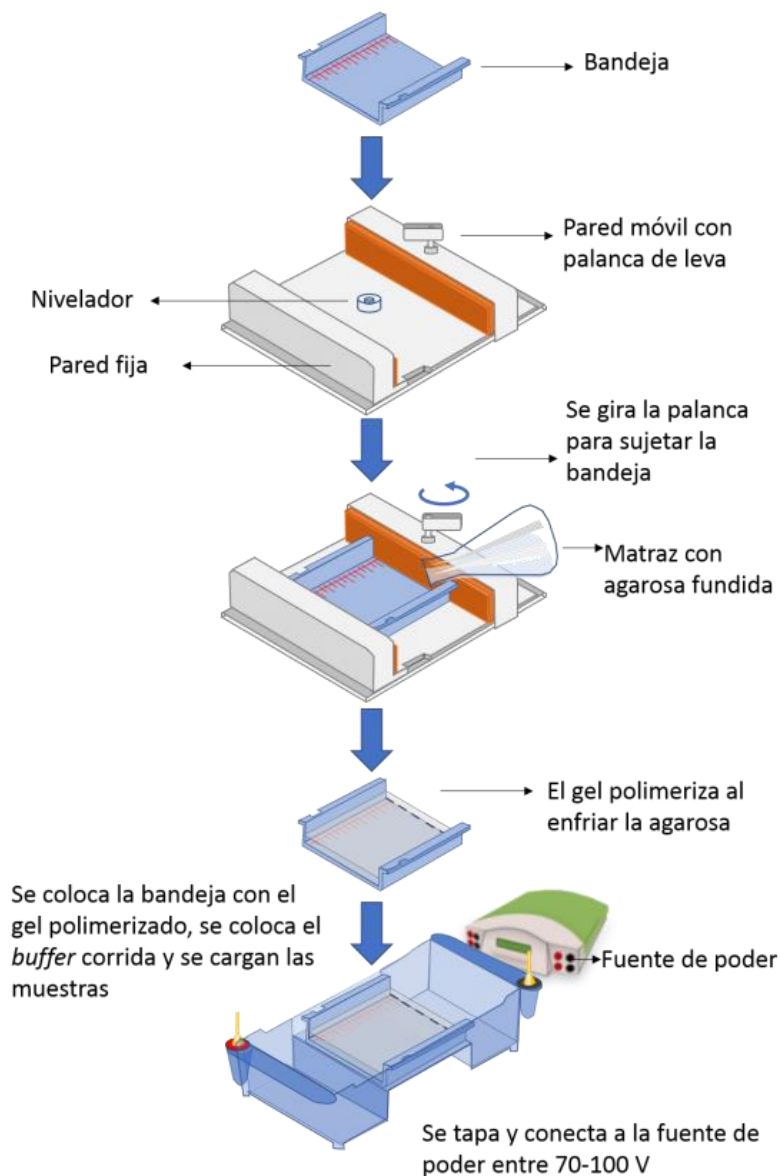
## 4.3 Electroforesis en gel de agarosa para el análisis cualitativo de DNA.

La electroforesis en gel de agarosa es la forma más efectiva de separar fragmentos de DNA de diferentes tamaños que varían de 100 pb a 25 k1. La agarosa es aislada de las algas géneros *Gelidium* y *Gracilaria*, y consiste en subunidades repetidas de agarobiosis (L y D-galactosa). Durante la gelación, los polímeros de agarosase asocian de manera no covalente y forman una red cuyos tamaños del poro determinan las propiedades de tamizado molecular de un gel.

Para separar el DNA usando electroforesis en gel de agarosa (0.5% -2% con soluciones tampones TAE (Tris-acetato 40 mM, 1 mM EDTA y TBE, Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM). El DNA se carga en pozos prefabricados en el gel y se aplica una corriente. Los grupos fosfato de la molécula de DNA están cargados negativamente, por lo tanto, cuando se colocan en un campo eléctrico, los fragmentos de DNA migrarán al ánodo cargado positivamente. Debido a que el DNA tiene una uniforme relación masa / carga, las moléculas de DNA se separan por tamaño en un gel de agarosa en un patrón tal que la distancia recorrida es inversamente proporcional al de su peso molecular (Yun Lee, Costumbrado, & et. al, 2012).

La velocidad de migración de una molécula de DNA a través de un gel está determinada por lo siguiente: 1) tamaño de molécula de DNA; 2) concentración de agarosa; 3) conformación de DNA; 4) voltaje aplicado, 5) presencia del colorante bromuro de etidio, 6) tipo de agarosa y 7) tampón de electroforesis. Después de la separación, las moléculas de DNA se pueden visualizar bajo luz ultravioleta.

Alternativamente, el gel también puede teñirse después de la electroforesis en el tampón en funcionamiento que contiene 0.5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de EtBr (bromuro de etidio) durante 15-30 min, como se muestra en la figura 7 (Ausubel, Brent, & et. al, 2003).



**Fig 7. Elaboración y electroforesis de un gel de agarosa.**

#### 4.4 Análisis de las muestras de DNA

El análisis cualitativo del DNA se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1%/SB1X (SB: 61.83 g H<sub>3</sub>BO y 10 g de NaOH en 800 mL de H<sub>2</sub>O de agua destilada) (Sedvy, Tamber, & Hancock, 2013).

El análisis cuantitativo del DNA se realizó mediante la absorbancia (A) a longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm y se establecerá la relación 260/280 nm en las muestras de DNA de esta manera se determinará la calidad, concentración y pureza de las muestras de DNA. Un valor en el rango de 1.8 a 2 se considerado como óptimo, un rango menor a 1.8 es indicador de contaminación por proteínas, mientras que una proporción mayor a 2.0 indica contaminación por RNA. Las longitudes de onda de 230/260 nm absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos, un valor óptimo es de 1.5 a 2.2, un rango menor de 1.5 indicaría presencia de contaminantes en la muestra (Ghatak, Muthukumaran, & Nachimuthu, 2013).

#### 4.5 Análisis de los exones del gen *SOD1* por PCR.

La amplificación de los 5 exones del gen *SOD1* se realizó mediante PCR, por siglas en inglés *Polimerase Chain Reaction*, esta técnica permite la amplificación específica de cada uno de los exones. A partir de una copia de DNA, se amplificará la región y de esta manera se obtienen millones de copias, lo que permitirá su detección. Dada la naturaleza de la técnica, la alta especificidad de la PCR está dada por la hibridación de los oligonucleótidos complementarios a la secuencia blanco y su elevada sensibilidad a la baja cantidad de DNA que se requirió para iniciar la amplificación (Sambrook & Rusell, 2001). Su nombre deriva de uno de los componentes claves; la DNA polimerasa, la cual es termoestable y se utilizó para amplificar una región de DNA *in vitro* por medio de esta enzima (Saeed & Ahmad, 2013). Se utilizó en la mezcla de reacción (TAQ PCR MASTER MIX KIT QIAGEN) que contiene la DNA polimerasa, dNTPs y amortiguador para la enzima taq polimerasas y la reacción se realizó empleando un termociclador *Applied Biosystems 2720*.

Se establecieron las condiciones de PCR, (desnaturalización, alineamiento y extensión) para cada uno de los exones analizados, empleando la T<sub>m</sub> (Temperatura de fusión) del par de oligonucleótidos de cada exón. La reacción incluía los 3 pasos antes mencionados e inició con una desnaturalización inicial lo que permitió la separación de la doble hélice de DNA mediante el calentamiento de la reacción de amplificación a una temperatura de 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrogeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de DNA. Una vez

separadas las cadenas de DNA, se alinearon los cebadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permitió la unión (alineamiento) de los oligonucleótidos. Finalmente, se sintetizó una nueva cadena de sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72°C, temperatura óptima a la cual la DNA polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Se repiten tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del DNA, sucesivamente en cada nuevo ciclo. Este proceso se realizó durante 35 ciclos. (Bolívar, Rojas, & García Lugo, 2014).

El análisis de los productos amplificados obtenidos en la PCR se realizará por electroforesis en gel de agarosa al 1%/SB1X y fueron teñidos con EtBr y se comparará con un marcador de peso molecular conocido (Axygen® DNA Ladder 100 pb - 3000 pb). La purificación de los productos de PCR se realizará con el kit de purificación QIAquick PCR Purification (Qiagen), de acuerdo con las condiciones del proveedor.

#### 4.6 Secuenciación de las muestras.

La secuenciación se realizará con los productos purificados de PCR de cada exón, se utilizará el kit de secuenciación *Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystem). Esta estrategia se basa en sintetizar, de forma secuencial, una hebra de DNA complementaria a una hebra molde, en presencia de DNA polimerasa, los cuatro 2'-deoxinucleótidos que componen la secuencia del DNA (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP). Estos últimos nucleótidos de parada, están diseñados porque carecen del grupo 3'-OH, que permite la adición del nucleótido consecutivo, de forma que cuando uno de ellos es incorporado por la polimerasa se interrumpe la síntesis de la nueva hebra. Resultando en fragmentos secuenciados de diferente tamaño, según dónde se incorporen los dideoxinucleótidos. Después los fragmentos fueron analizados por electroforesis capilar empleando el secuenciador ABI 3130 (Applied Biosystem) y de esta manera se pudo dilucidar la secuencia de cada exón analizado.

Los datos obtenidos por el detector se registraron en electroferogramas que fueron analizados empleando el software *Sequencher* y se realizó el análisis de variantes génicas empleando bases de datos bioinformáticos.

## 5 Actividades realizadas.

### Análisis de las muestras

#### 5.1 Análisis cuantitativo de las muestras

El análisis cuantitativo de las muestras se realizó en un espectrofotómetro modelo *NanoDrop2000* (*Thermo Fisher Scientific*) y consistió en la determinación de la concentración y la pureza de las muestras a través de tres valores a distintas longitudes de onda ( $\lambda$ ): 260 nm concentración, 280 nm pureza de proteínas y 230 nm pureza de disolventes orgánicos. La concentración de DNA se estableció en ng/ $\mu$ L mediante el resultado de los valores de absorbancia que se obtuvieron.

#### 5.2 Preparación de geles de agarosa.

Los geles de agarosa se realizaron mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1%/SB1X (SB: 61.83 g H<sub>3</sub>BO y 10 g de NaOH en 800 mL de H<sub>2</sub>O de agua destilada)

#### 5.3 Análisis de integridad

En todas las muestras se realizaron diluciones a 100 ng/ $\mu$ L para posteriormente realizar el análisis de integridad. De estas diluciones se tomaron 2  $\mu$ L para realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1%/SB1X. Las condiciones de corrimiento fueron a 100 Volts (V) por aproximadamente 30 min. Posteriormente, el gel fue analizado en un fotodocumentador bajo luz UV ENDURO™-GDS (*Labnet International Inc.*), y se seleccionaron las muestras con DNA genómico integro y de alto peso molecular.

#### 5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Amplificación de las muestras. Se realizó la PCR empleando los oligonucleótidos descritos y en la misma se muestran la T<sub>m</sub> y el tamaño del producto esperado para los 5 exones del gen *SOD1*.

**Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para PCR.** Tm: Temperaturas de fusión °C (Temperatura de alineamiento) pb: Pares de bases. (Vela, Galan, Valencia, & et. al, 2012) (Felbecker, Camu, Valdmanis, & et. al, 2011)

Exón	Oligonucleótido (forward)	sentido	Oligonucleótido (reverse)	sentido	Tm (°C)	Amplificación (pb)
1	5'-CCCAGTCATTCCCGGCCACTC-3'		5'-GGCGACCCGCTCCTAGCAAAG-3'		66	374
2	5'-CATCTCCCTTTGAGGACACA-3'		5'-AAGGCTAAGGTCAGCCATGAT-3'		58	475
3	5'-GATGCAGGTCAGCACITTTCTC-3'		5'-CAATTCCTTAAGCCCAGGAA-3'		56	366
4	5'-GAAGCCTTGTTGAAGAGCTG-3'		5'-TCATTTTCACCGTCCTTGTTCCA-3'		56	426
5	5'-GGGTATTGTTGGGAGGAGGT-3'		5'-TCTGTTCCACTGAAGCTGTTT-3'		60	572

Todas las muestras fueron acondicionadas de acuerdo con lo recomendado por el fabricante del reactivo *TAQ PCR MASTER MIX®* de *QIAGEN*. La cantidad de reactivo y DNA empleados en la mezcla de reacción se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Criterios para amplificación de muestras de DNA.** \*El volumen de la muestra de DNA es de 1 o 2 µL dependiendo de la concentración, por lo que el volumen de agua también es variable.

Reactivo	Concentración	Volumen 25 µL
<i>Master Mix®</i>	10X	10 µL
Oligonucleótido Forward	25mM	1 µL
Oligonucleótido Reverse	25mM	1 µL
Agua libre de DNAsas	-	11 µL
DNA	100 ng/µL	*2 µL

## 5.5 Condiciones de PCR

Las condiciones de PCR utilizadas fueron las mismas para el análisis de los 5 exones, difiriendo únicamente en la temperatura media de fusión que se utiliza para el alineamiento de los oligonucleótidos (las etapas del programa de PCR se muestran en la Figura 8).

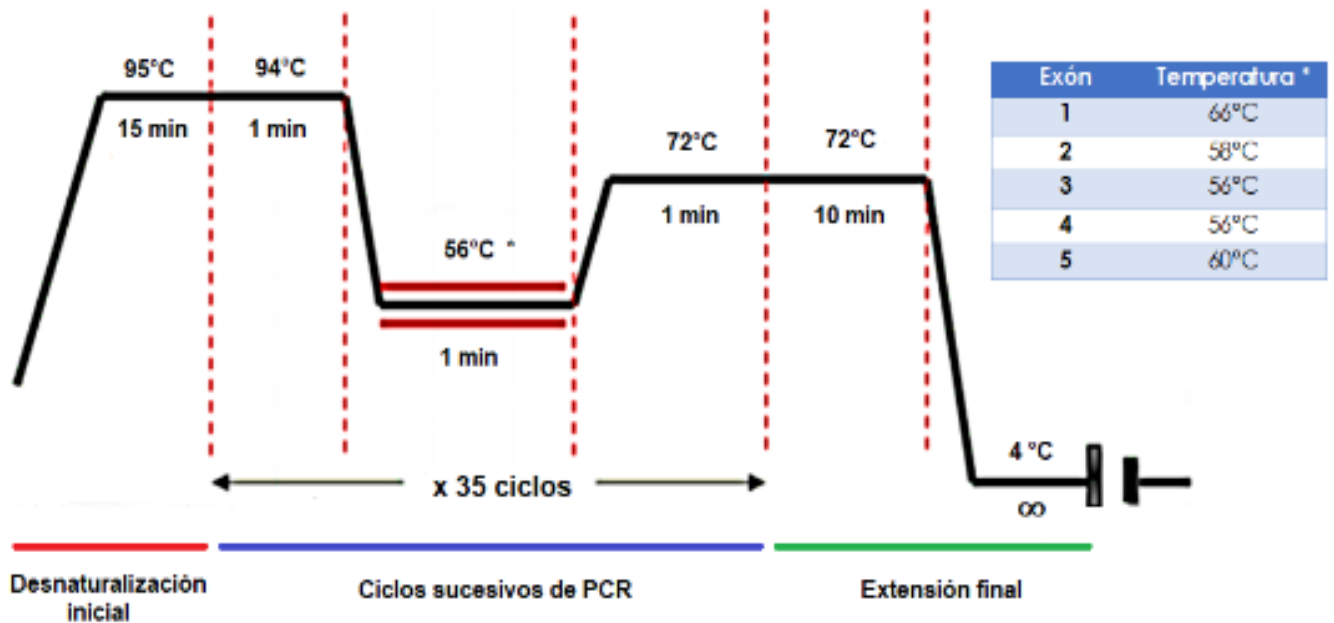


Figura 8. Condiciones de PCR. \* Temperatura de alineamiento.

## 5.6 Análisis y purificación de los productos de PCR.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%/SB1X.

Posteriormente los productos de PCR, fueron purificados con el *kit* de purificación de *QIAquick PCR Purification*, siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. A cada reacción de PCR se le adicionó la disolución PB (amortiguador de unión), en una proporción 5:1 v/v. La mezcla se adiciona a la columna de purificación colocada dentro de un tubo colector, que se centrifuga a 13,000 rpm durante 1 min. El líquido colectado es eliminado, y a la columna se le adicionan 450  $\mu$ L de buffer PE. Se centrifuga durante 1 min a 13,000 rpm, posteriormente se decanta el líquido recolectado y se vuelve a centrifugar para eliminar el exceso del amortiguador. Posteriormente la columna de purificación es trasladada a un tubo de 1 mL y a esta se le agregó 25  $\mu$ L de agua estéril, se centrifuga durante 1 min a 13,000 rpm. Y se obtiene el producto de PCR purificado.

Los productos de PCR purificados se revisaron por electroforesis en el gel de agarosa al 1%/SB1X, para estimar la cantidad necesaria de este producto para realizar la reacción de secuenciación.



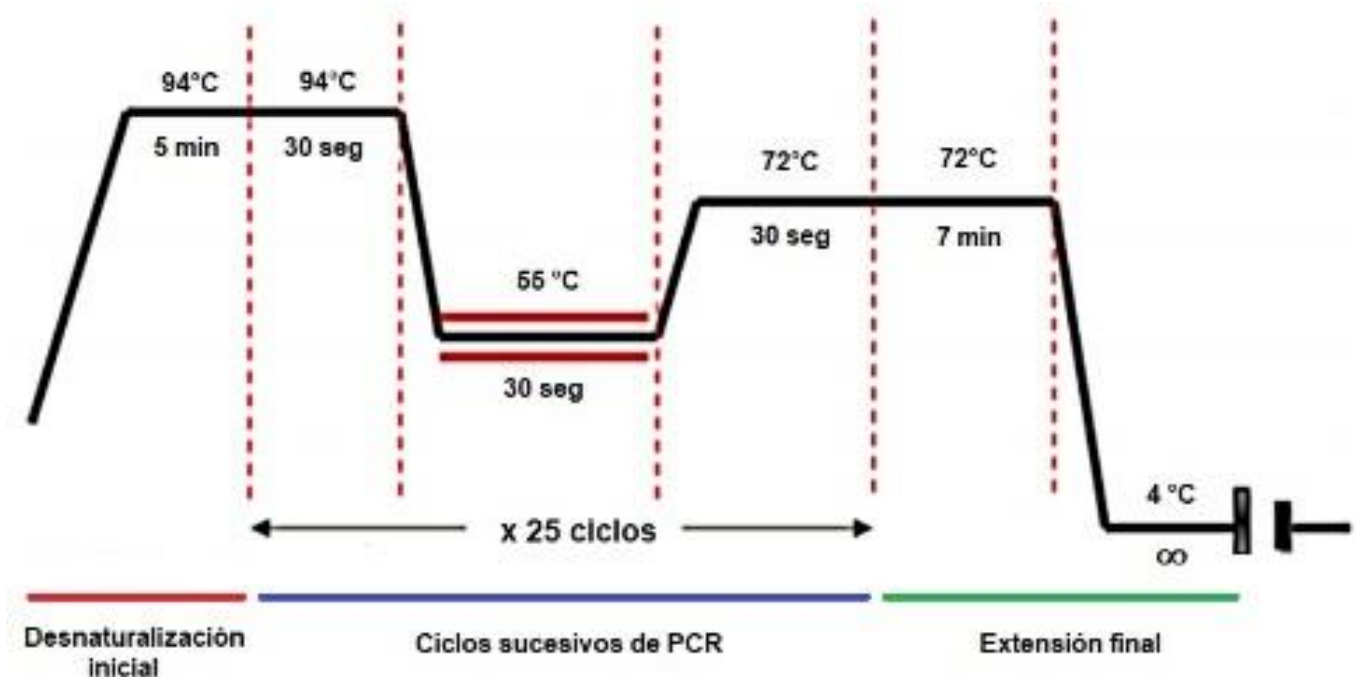
## 5.7 Secuenciación

Las muestras fueron secuenciadas empleando el kit de secuencia *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems)* y los mismos oligonucleótidos utilizados para las PCR. Se realizó una reacción de secuenciación para cada una de las cadenas. En general se usa el oligonucleótido forward, y si en esta cadena llega a presentar alguna variante génica, se confirmaría analizando la hebra complementaria empleado el oligonucleótido reverso. El programa de secuenciación; los reactivos de la reacción y el programa se muestran en las Tabla 3 y Figura 9, respectivamente.

**Tabla 3.** Se muestra la mezcla de reacción de secuenciación y la cantidad de producto purificado para realizarla de PCR.

Reactivo	Concentración	Volumen 20 $\mu\text{L}$
<b>BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix</b>	-	1 $\mu\text{L}$
<b>Sequencing Buffer</b>	5X	4 $\mu\text{L}$
<b>Oligonucleótido (Forward o Reverse)</b>	10 mM	1 $\mu\text{L}$
<b>Agua libre de DNAsas</b>	-	10 $\mu\text{L}$
<b>DNA (producto de purificación)</b>	-	*1-4 $\mu\text{L}$

\* La cantidad de producto purificado puede variar, ya que depende de la intensidad de la banda observada después de la electroforesis de los productos purificados (~50 ng de producto purificado), se ajusta la cantidad de agua libre de DNAsas, para obtener un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{L}$ .



**Figura 9. Condiciones para secuenciación.** Programa de secuenciación para el gen SOD1. **Nota:** se utilizó el mismo programa para los 5 exones de SOD1.

## 5.8 Purificación de productos de secuenciación

Se usaron las columnas de purificación DyeEx 2.0 Spin kit® (QIAGEN). Se utilizó este sistema de filtración en gel para eliminar de manera rápida y eficientemente los terminadores no incorporados de las reacciones de secuenciación. Previamente se eliminó el buffer de almacenamiento de las columnas.

Se colocó la columna en un tubo colector, para su posterior centrifugación a 3000 rpm por 3 minutos. Para eliminar el buffer de almacenamiento. Se cambió el tubo colector por un microtubo tubo de 1.5 mL. Añadiendo el producto de secuenciación a la columna.

Se centrifugó a 3000 rpm por 3 min. Posteriormente se llevó la muestra a secar en un concentrador de vacío o SpeedVac™ (sin calor), durante 40 min.

Se rehidrató el producto secuenciado con 14 µL de Formamida ultrapura (agente desnaturizante).

Las muestras fueron colocadas en una placa para secuenciador (*MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* de Applied Biosystem), cubierta con un septo, enseguida se realizó la desnaturalización de las muestras (incubación a 95° por 5 min) y posteriormente el análisis por electroforesis capilar en el secuenciador ABI 313 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

## 5.9 Análisis de los resultados

Para el análisis de los electroferogramas se utilizó el programa bioinformático *Mutation Surveyor*, que permite realizar análisis de los exones que conforman el gen *SOD1* comparándola con su secuencia de referencia (gen *SOD1* NC\_000454.4). Cada electroferograma fue analizado buscando la presencia de las variantes génicas benignas y patogénicas. Los cambios identificados se buscaron en bases de datos para determinar si correspondían a variantes nuevas o ya reportadas en otras poblaciones.

# 6 Resultados

## 6.1 Cuantificación

Los parámetros óptimos utilizados para seleccionar las muestras fueron valores entre 1.8 y 2.0 para la relación 260/280, y entre 2.0 y 2.2 para la relación 260/230, como se ha mencionado en la metodología. Si los valores de esta última relación no eran adecuados se seleccionaron solo aquellas muestras que sí cumpliera el parámetro en la relación 260/280. Las muestras seleccionadas fueron aquellas con la concentración más alta (>100 ng/μL). Se analizaron en el NanoDrop2000 un total de 278 muestras de DNA. En las cuales solo se seleccionaron las muestras que cumplieran con los parámetros óptimos de concentración y pureza para realizar la prueba de integridad, como se puede observar en la Tabla 4, al final solo se promedió las concentraciones de 157 muestras.

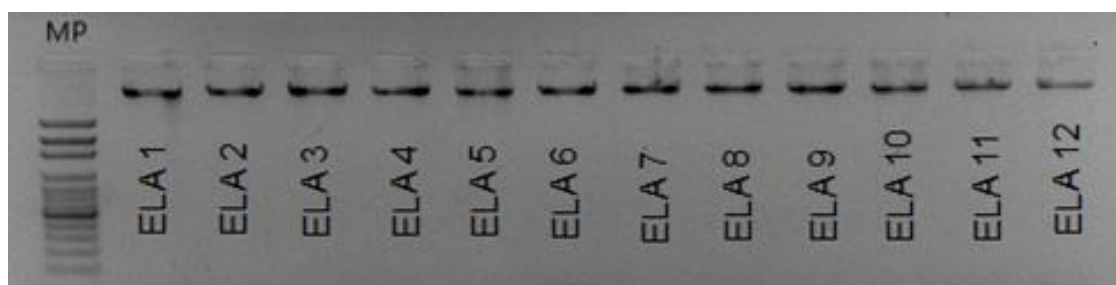
**Tabla 4.** Lectura de concentración, pureza y calidad de DNA.

157 muestras	Concentración ng/μL	Pureza 260/280	Calidad 260/230
<b>Promedio</b>	141.7	1.64	1.59

## 6.2 Integridad

### 6.2.1 DNA

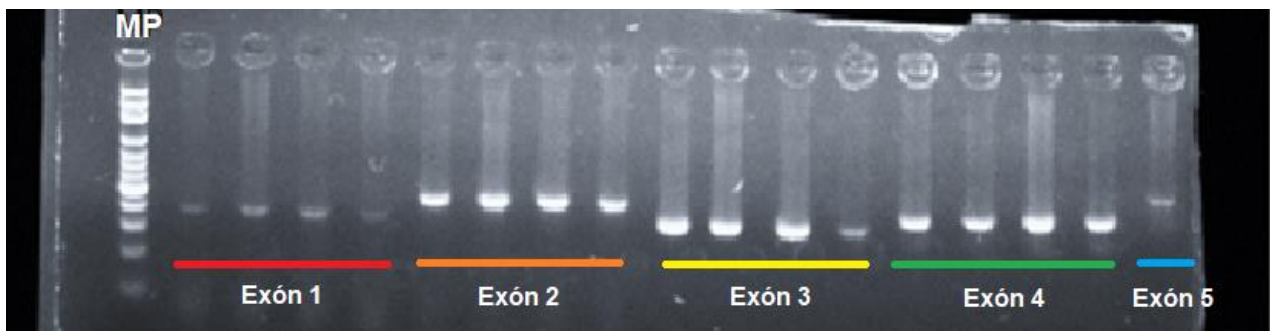
El análisis de integridad en gel de agarosa revela la calidad y condición de las muestras que fueron amplificadas por PCR y se muestran en la Fig 10.



**Fig 10.** Análisis de integridad DNA genómico (100 ng/μL) en gel de agarosa de 1%/SB1X de las muestras de los pacientes con ELA. (MP: Marcador de Peso Molecular Axygen® DNA Ladder 100 pb - 3000 pb)

### 6.2.2 PCR

Los productos de PCR y sus tamaños esperados para cada exón analizado se muestran en la Fig 11.



**Fig 11. Los tamaños de los productos de PCR obtenidos para cada exón.** La figura muestra un gel de agarosa al 1%/SB1X. En el carril se muestra el marcador de peso molecular Axygen® DNA Ladder 100 pb - 3000 pb), en el carril 2 al 5 una banda 374 pb que corresponde al exón 1, banda de 475 pb al exón 2, banda de 366 pb al exón 3, banda de 426 pb al exón 4 y una banda de 572 pb correspondiente del exón 5.

### 6.3 Secuenciación de las muestras

La secuenciación se realizó en un solo sentido de las cadenas de DNA (*Forward*) para cada uno de los 785 productos de PCR (157 pacientes por los 5 exones que se amplificaron). Por medio del programa *Mutation Surveyor*, se leyeron en comparación con la secuencia de referencia y se identifican las variantes génicas encontradas en cada uno de los exones analizados. En las siguientes tablas, se muestran las variantes identificadas en cada uno de los exones analizados.

#### 6.4 Exón 1

ID	Nº pacientes encontradas	Alelo ancestral	Variante alélica	Cambio	Ubicación	Variante génica
rs7277748	1	A	G	c.-109A>G	5'-UTR	SNP
rs1312702973	1	T	A	p. Cys7Ser variante sentido erróneo	Exón	SNP
rs780405968	1	C	G	c.72+43C>G	Intrón	SNP

**Tabla 5. Variantes génicas en el exón 1 del gen SOD1.** SNV (siglas en inglés Single Variant) Variante de un solo nucleótido.

### Variante 5'-UTR (rs7277748)

Encontrado en paciente de sexo femenino, la edad de inicio de la enfermedad fue a los 79 años. El cambio de A>G, esta reportado dentro del buscador *Ensembl* con un [rs7277748](#) de la transcripción de RefSeq NM\_000454.4, c.-109A>G, está a 161 pb antes del sitio de inicio de transcripción y se considera aparentemente benigno. En la Fig 12 se muestra el electroferograma donde se indica la variante reportada.

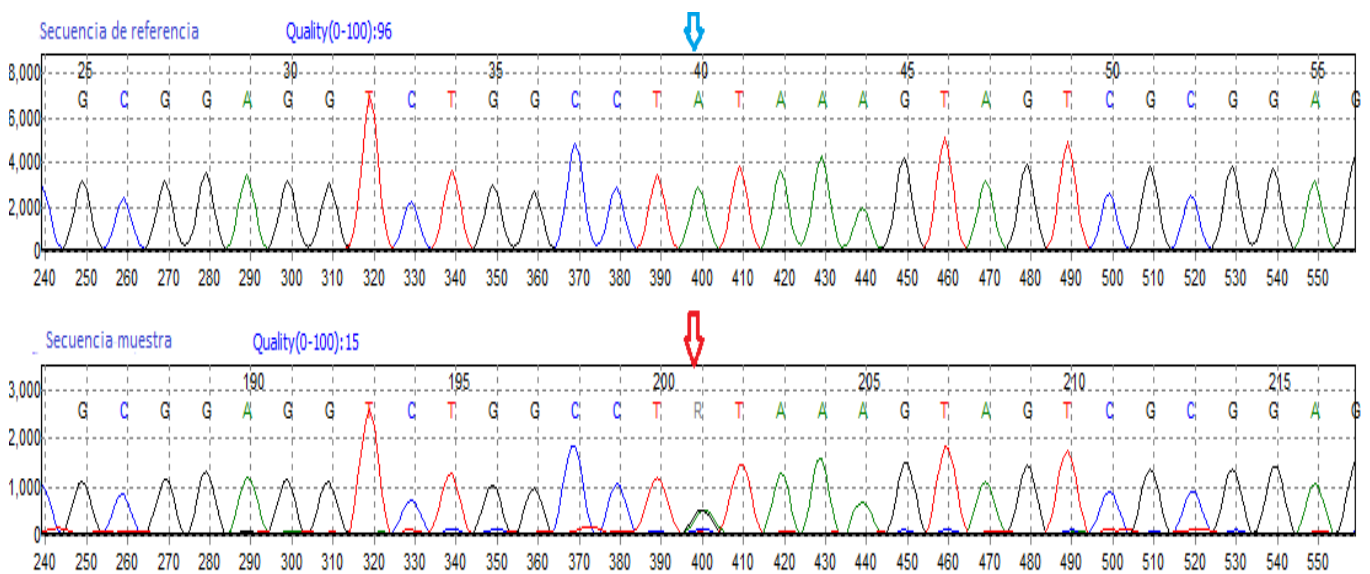


Fig 12. Electroferograma obtenido de la secuenciación del exón 1 del gen *SOD1* (rs7277748).

### Variante (rs1312702973)

Encontrado en paciente de sexo femenino con una edad de inicio de la enfermedad de 45 años. El cambio de T>A, [NM\_000454.5, c.19T>A] [rs1312702973](#) en las diferentes bases de datos (*Ensembl*, *Varsome*, *ClinVar*). Esta variante afecta la primera base del codón 7 (TgC/AgC) dando como resultado el cambio del aminoácido cisteína por serina (p. Cys7Ser), esta variante de sentido erróneo es probablemente patogénica o dañina

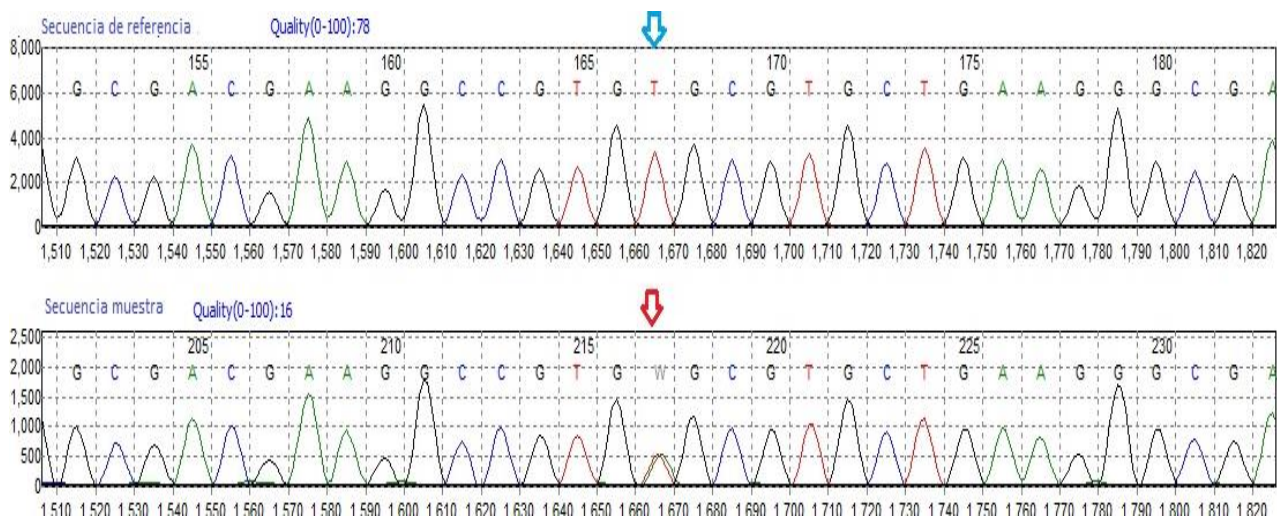


Fig 13. Electroferograma obtenido de la secuenciación del exón 1 del gen *SOD1* (rs1312702973).

### Variante intrónica (rs780405968)

Encontrado en una paciente con edad de inicio de la enfermedad de 49 años. El cambio de C>G esta reportado dentro del buscador *Ensembl* con la mutación rs780405968 de la transcripción de RefSeq NM\_000454.4, c.72+43C>G. Se localiza en la base 43 del oligonucleótido intrón y está a 384 pb antes del sitio de inicio de transcripción.

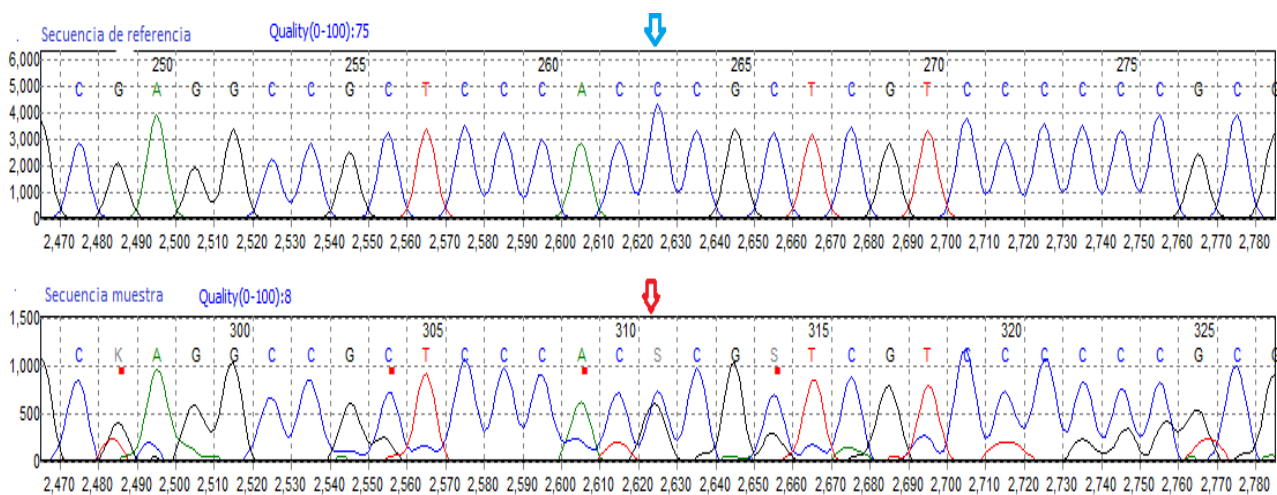


Fig 14. Electroferograma obtenido de la secuenciación del exón 1 del gen *SOD1* (rs780405968).

## 6.5 Exón 2

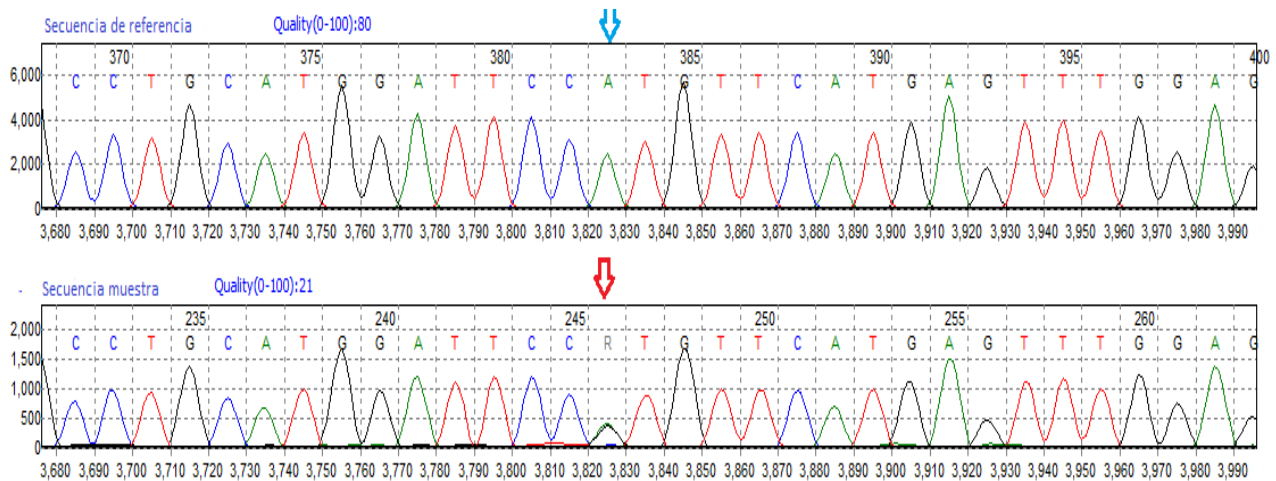
ID	Ni de variantes encontradas	Alelo ancestral	Variante alélica	Cambio	Ubicación	Variante génica
rs121912443	1	A	G	p.His47Arg	Exón	Missense

<b>rs115556621</b>	1	C	G	p.Pro29Arg	Exón	Missense
<b>No reportada</b>	1	C	G	p.Ala42=	Exón	SNP

**Tabla 6. Variantes génicas en el exón 2 del gen SOD1.** SNV (siglas en inglés *Single Nucleotide variant*) Variante de un solo nucleótido. Missense (significado en inglés: variante sin sentido o mutación sin sentido).

### Variante exónica (rs1219124439)

Encontrado en paciente masculino con edad de inicio de la enfermedad de 27 años. El cambio c.140A>G esta reportado dentro de la base de datos *Ensembl* como variante patogénica pHis47Arg [NM\_000454.5(SOD1), c.140A>G (p.His47Arg)], con [rs121912443](#). Cambiando la segunda base del codón 47 ubicado en el exón 2 del gen SOD1, lo que resulta en un cambio del aminoácido histidina por arginina correspondiente a una variante patogénica sin sentido (*missense*).



**Fig 15. Electroferograma obtenido de la secuenciación del exón 2 del gen SOD1 (rs1219124439).**

### Variante exónica (rs115556621)

Encontrado en paciente masculino con edad de inicio de enfermedad de 64 años. El cambio de C>G (flecha roja) esta reportado dentro de la base de datos *Ensembl* con la variante [rs115556621](#) de la transcripción de RefSeq NM\_000454.4, p. Pro29Arg. Afecta la 14 base de 97 del exón codificante y el 29 aminoácido de la transcripción de 155 del exón 2 del gen SOD1, un cambio de C>G.



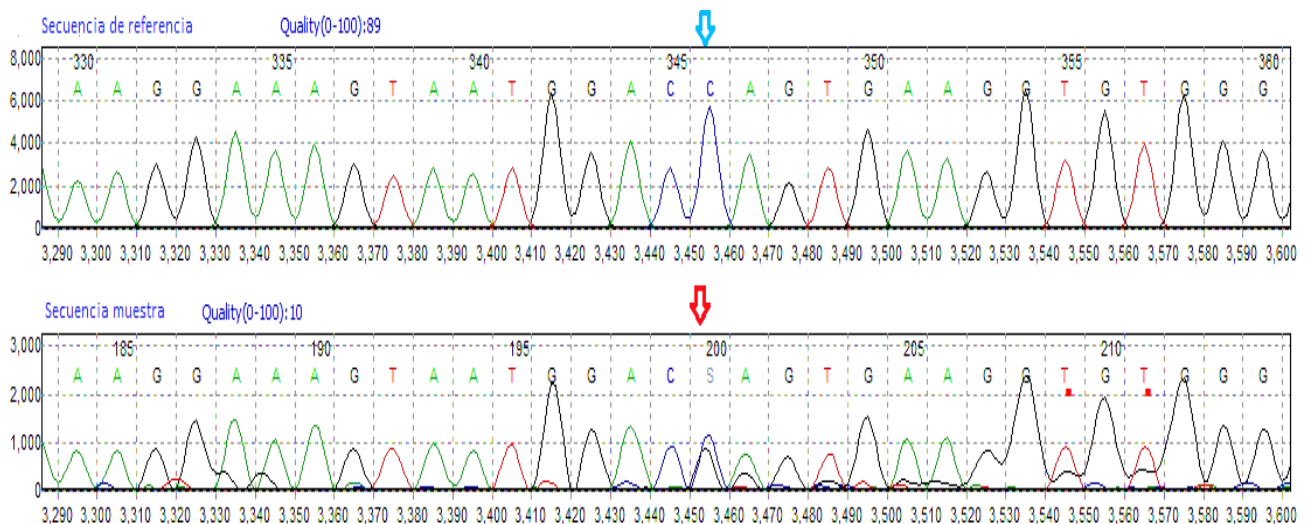


Fig 16. Electroferograma obtenido de la secuenciación del exón 2 del gen *SOD1* rs1155621.

### Variante exónica (No reportada p. Ala42=)

Encontrado en un paciente masculino con edad de inicio de enfermedad de 64 años. El cambio de C>G (flecha roja) esta reportado dentro de la base de datos *Ensembl* con la mutación con criterio de No reportada. Afecta la posición 42 de la transcripción, un cambio que altera la base situada en la tercera posición del codón, pero no causa sustitución aminoacídica p. Ala42Ala.

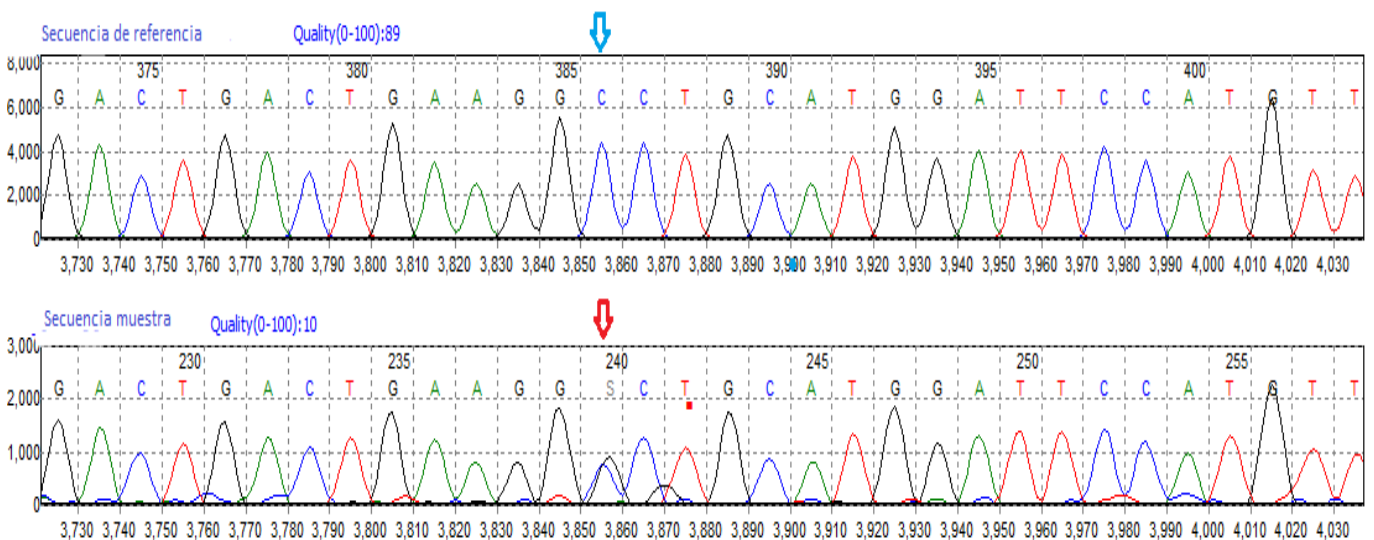


Fig 17. Electroferograma obtenido de la secuenciación del exón 2 del gen *SOD1* (No encontrada).



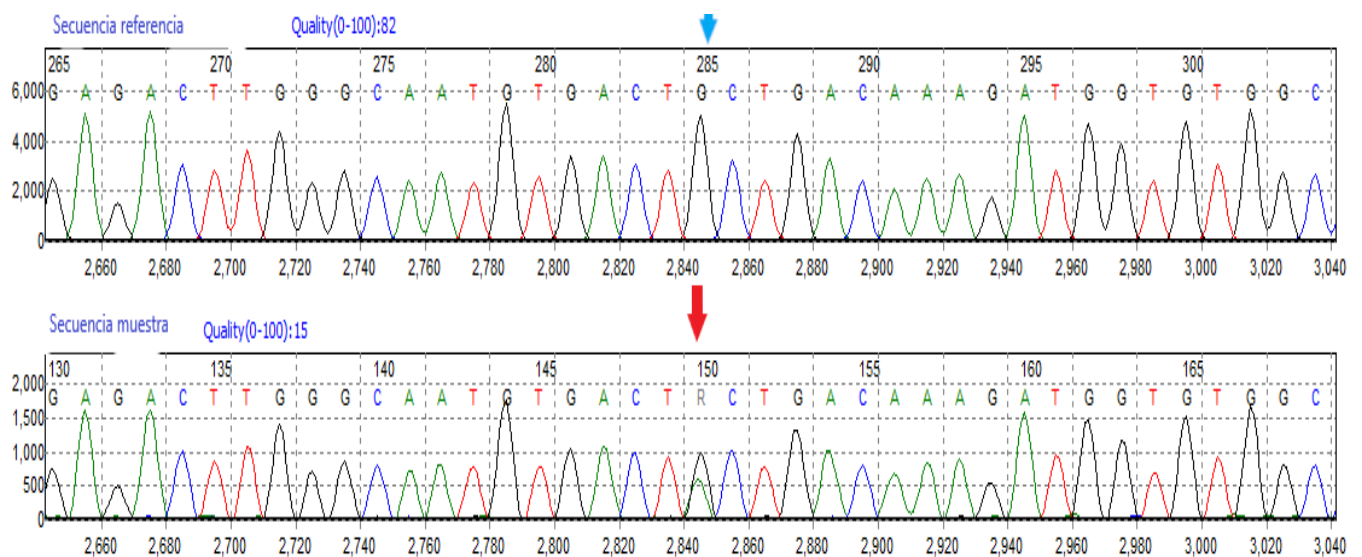
## 6.6 Exón 4

ID	N° variantes encontradas	Alelo ancestral	Variante alélica	Cambio	Ubicación	Variante génica
rs1568810660	2	G	A	p. Ala90Thr	Exón	SNV

**Tabla 7. Variantes génicas encontradas en el exón 4 del gen SOD1.** SNV (siglas en inglés *Single Nucleotide variant*) Variante de un solo nucleótido.

### Variante exónica (rs1568810660)

Encontrado en 2 pacientes masculinos con edad promedio de inicio de la enfermedad de 50.6 años. El cambio de G>A (flecha roja) esta reportada por la base de datos *Ensembl* con el ID rs1568810660, NM\_000454.5, c.268G>A, p.Ala90Thr A (Ala) > T (Thr). Variante sin sentido, de región codificante ubicada en el exón 4 del gen SOD1.



**Fig 18. Electroferograma obtenido de la secuenciación del exón 4 del gen SOD1 (rs1568810660)**

## 6.7 Exón 5

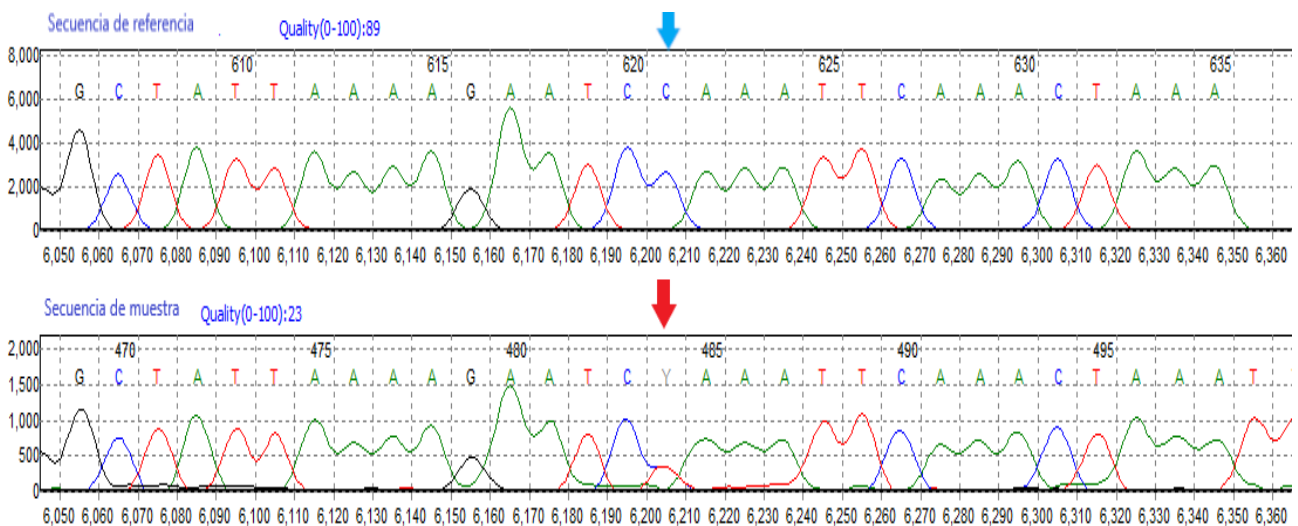
Mutación	N° pacientes encontradas	Alelo ancestral	Variante alélica	Cambio	Ubicación	Tipo de mutación
----------	--------------------------	-----------------	------------------	--------	-----------	------------------

<b>rs17880487</b>	1	C	T	c.*339C>T	3'UTR	SNV
-------------------	---	---	---	-----------	-------	-----

**Tabla 8. Mutaciones encontradas en el exón 5 del gen SOD1.** SNV (siglas en inglés *Single Nucleotide variant*) Variante de un solo nucleótido.

### Variante 3'UTR (rs17880487)

Encontrado en paciente se sexo masculino, se desconoce la edad de inicio de la enfermedad. El cambio de C>T (flecha roja), esta reportado dentro de la base de datos Ensembl con la mutación rs17880487 de la transcripción de RefSeq NM\_000454.4. c.\*339C>T, Afecta la 447 base de 461 de la región 3'UTR del exón 5 del gen SOD1.



**Fig 19. Electroferograma obtenido de la secuenciación del exón 5 del gen SOD1 (rs17880487).**

## 7 Discusión

### 7.1 Exón 1

La variante con ID rs1312702973 en exón 1 del gen SOD1, presente en una paciente con edad de inicio de enfermedad a los 45 años, presenta un cambio en el 7 aminoácido del primer nucleótido T>A, a nivel de proteína p.Cys7Gly siendo el cambio cisteína por serina. La base de datos Varsome cataloga esta mutación como probablemente patogénica.

Encontrando evidencia vinculada a esta variante en población japonesa. En este estudio se informó de un caso de ELA familiar que progresa rápidamente. La

paciente de 53 años experimentó debilidad y atrofia de la pierna derecha; 2 meses más tarde fue incapaz de caminar debido a progresiva debilidad de la parte superior derecha y extremidades inferiores izquierdas. El análisis mostró patrones neurogénicos típicos en las extremidades. Tres meses después del inicio, ella murió de insuficiencia respiratoria.

La paciente fue diagnosticada con base a las manifestaciones clínicas y resultados electrofisiológicos. Su hermana mayor mostró una progresión rápida y experimentó debilidad facial y dificultad para escribir a los 46 años. Dos semanas después, fue incapaz de levantar los brazos y tenía disfasia y disartria. Dos meses después del inicio, ella murió de insuficiencia respiratoria. El estudio patológico *postmortem* mostró pérdida severa de células de la asta anterior con gliosis, reducción de células Betz y pérdida de mielina en el tracto corticoespinal.

La paciente fue heterocigota para la transversión de T por G, mientras que su hermana mayor era homocigota para la mutación; ahí con la severidad de los síntomas. En esta variante la cisteína en el aminoácido 7 tiene un grupo tiol (-SH) considerado como polar o hidrófilo polarizado y la glicina tienen una cadena hidrófoba. La variante Cys7Gly puede alterar la estructura tridimensional de la SOD y desestabilizar el mutante homodímero y heterodímero alterando la estructura tridimensional de la SOD1 (Satoshi, Yoshitomo, Hiroaki, & et.al., 1999).

La mutación con ID [rs7277748](#) en el exón 1 del gen *SOD1*. Encontrada en paciente femenina con edad de inicio de la enfermedad a los 79 años, presenta un cambio de A>G. La base de datos Varsome la cataloga como probablemente benigna.

En el 2007 un estudio en población alemana, identificó esta transición heterocigótica de A por G. Esta variación de la secuencia en la región promotora de *SOD1*, se encuentra en un motivo conservado de la caja TATA.

Se evaluó el posible efecto funcional de esta variante introduciendo la variante de la caja TATA en un promotor *SOD1*. En presencia de la variante TATAAA→TGATAA, resulta en una disminución en la actividad (67.8%) de luciferasa; (enzima oxidativa) comparado con la actividad registrada para el alelo no mutado, mostraron una reducción moderada en la actividad transcripcional de *SOD1*. Este hallazgo está de acuerdo con estudios anteriores en donde se ha demostrado que las mutaciones dentro de la caja TATA generalmente resultan en una disminución en la expresión génica. Este defecto de la caja TATA no es una mutación causante de enfermedad o un factor de susceptibilidad a la ELA, sino un polimorfismo raro con un efecto potencial en la expresión del gen *SOD1* (Niemann, Brooom, & Brown, 2007).

Los estudios de mutagénesis mostraron que los cambios de una única base en el

elemento TATA disminuyen el inicio y la precisión de la transcripción. La pérdida de función debido a la reducción de la expresión génica ha demostrado ser el mecanismo de las mutaciones en la caja TATA en muy pocos trastornos mendelianos (Antonarakis, Irkin, Cheng, & et al, 1984).

Los resultados sugieren que la transición de A por G, ubicada en la caja TATA es altamente conservada, no es de relevancia funcional, ya que no indica que esta variante actúe como un factor de susceptibilidad en ELA (Niemann, Brooom, & Brown, 2007).

## 7.2 Exón 2

Para ID rs121912443, en exón 2 del gen *SOD1*. Encontrada en paciente masculino con edad de inicio de la enfermedad de 27 años, presenta un cambio en el aminoácido 47 A>G, siendo un cambio de histidina por arginina. La base de datos *Varsome* cataloga esta mutación como patogénica.

Estos hallazgos sugieren que la mutación p.H47R en el gen *SOD1* Cu / Zn está altamente relacionada con este subtipo único de ELA familiar (Muller & et al, 2018).

La sustitución p.His47Arg se describió por primera vez en asociación con ELA familiar en dos familias japonesas en 1993. En informes posteriores, se catalogó como un fenotipo clínico homogéneo con penetrancia completa. En cuatro generaciones sucesivas, 13 individuos fueron afectados por debilidad y atrofia muscular progresiva. La historia familiar sugiere que el rasgo genético es autosómico dominante y que tiene una penetrancia de casi el 100%.

En este análisis, un individuo se identificó con la mutación H47R que aparentemente estaba sano. Este caso no presentaba síntomas clínicos en ese momento, ya que era mucho más joven que la edad media de inicio de la familia ( $55 \pm 3$ ). En los dos casos japoneses con la mutación H47R, la herencia de ambas familias fue familiar y autosómica dominante. La edad media del inicio de la enfermedad y el primer síntoma fue casi idéntica en ambas familias. El primer síntoma de la enfermedad es la debilidad en las piernas. De hecho, los síntomas en las extremidades superiores tardaron 5 años en aparecer, y no surgieron síntomas bulbares durante más de 8 años después de los síntomas iniciales. Sugiere que la mutación H47R puede ser relativamente única en la población japonesa (Aoki, Ogasawara, Matsubara, & et al., 1994).

La enzima Cu / Zn de SOD1 actúa in vivo como un dímero de subunidades idénticas, cada una de las cuales contiene un ion Cu y un ion Zn. El ion Cu es un cofactor esencial en la catálisis, y se reduce durante encuentros sucesivos con el superóxido. La histidina (47), se caracteriza por ser uno de cuatro residuos de ligadura de Cu, en donde todos ellos se conservan en más de 15 especies que van desde la levadura hasta los humanos (Fischer, Hallewell, Roberts, & et al, 1991). Por analogía, la histidina 4 se une a la asparagina 124 que también está se une al residuo ligador de Zn del exón 2 (Tainer, Getzolf, Richardson, & et al, 1983). Por lo tanto, el papel de la histidina 47 parecería ser esencial en la actividad de la proteína. Se especula que la mutación H47R causa inestabilidad del ion Cu, que resulta en la reducción en la actividad de las enzimas. Las mutaciones identificadas en los FALS caucásicos no se encuentran en el sitio de unión de Cu o Zn, pero afecta directamente el sitio de formación del dímero o desestabiliza el plegamiento de la enzima. Por otro lado, la actividad Cu/Zn de SOD1 con la mutación H47R, que se encuentra en el sitio activo de unión a Cu, se redujo solo alrededor de 20 por ciento. Por lo tanto, se sugiere que el H47R influye predominantemente en el sitio activo de unión de Cu, pero no afecta principalmente la formación de dímero de la enzima. Se informaron algunas características clínicas de FALS, donde la edad de inicio era más temprana, supervivencia más corta y aparición de síntomas más común en las piernas, en comparación con la ELA esporádica. Los reflejos de los tobillos generalmente eran inexistentes. Sin embargo, hubo variaciones considerables en el curso clínico, los hallazgos patológicos y antecedentes genéticos entre familias. La edad en el inicio de ambas familias FALS fue relativamente más tarde y la progresión de la enfermedad fue mucho más lento que los de las otras FALS japonesas que no portaba mutación en el gen Cu / Zn en SOD1. (Muller & et al, 2018).

En el 2012 se realizó un estudio a una familia noruega anteriormente diagnosticada con Charcot Marie Tooth tipo 2 (CMT2), en que la enfermedad se expresaba como autosómica dominante, pero con etiología genética desconocida. Se les realizó un análisis de ligamiento y haplotipos a todos los miembros familiares, donde ubicaron una región con un intervalo de 1.9 Mb en el cromosoma 21 y posteriormente se vio que los familiares afectados portaban una sustitución en SOD1 denominada "H46R" en la literatura, pero en adelante llamado p. His47Arg según la nomenclatura de HGVS. Se considero de gran importancia este estudio debido a que no había evidencia que afirmara que esta mutación es exclusiva de la población japonesa. La edad media de inicio fue de 42.5 años, lo cual es un poco más temprano de los informado en los pacientes japoneses con la sustitución p. His47Arg.

Se ha informado que las mutaciones de *SOD1* en ELA familiar se presentan entre los 46.9 años, mientras que los casos esporádicos a los 56 años, lo que indica una falta de correlación entre la edad de inicio y gravedad de la enfermedad (Østern & et.al., 2012).

La debilidad unilateral de una extremidad inferior fue la presentación del síntoma más común de todos los casos conocidos, generalmente en forma de debilidad en un músculo de la pantorrilla (Yamashita, Kimura , & et al., 2009). Una característica adicional de la familia presentada aquí está la preservación (relativa) de los músculos extensores de los dedos y las muñecas en las ultima etapas de la enfermedad. Alguno de los miembros de la familia informó una fase inicial con calambres musculares y dolor en las extremidades inferiores. Sorprendentemente, seis pacientes experimentaron fracturas, después de un traumatismo menor.

La penetrancia de la enfermedad es alta; con un amplio rango de edad al inicio (22-65 años) es considerable. La duración de la enfermedad fue de 29 años en promedio (rango 11-51 años). Esto es más largo de los que se ha informado en los pacientes japoneses con la sustitución p. His47Arg (rango 12.1-17.3). Donde 17 pacientes fallecieron a la edad de 93 años, 51 años después de los síntomas iniciales (Østern & et.al., 2012). Hasta donde sabemos, esta es la duración más larga de la enfermedad, publicado en asociación con una mutación patogénica en *SOD1*.

Dos de los hombres presentaron la enfermedad (26 y 27 años) y murieron a una edad temprana (37 y 47 años). Se desconoce las causas de muerte en estos casos. Por lo que no se pudo documentar una relación entre la edad de inicio y la edad de muerte.

Se ha propuesto que p.His47Arg es relativamente exclusivo de la población japonesa (Ohi & et al., 2002). La frecuencia del alelo c.140A> G entre pacientes con un fenotipo de neuropatía motora hereditaria distal (dHMN) y neuropatía sensitiva y autonómica hereditaria (HSAN) puede ser subestimado. Posteriormente se identificó esta mutación en familias noruegas no relacionadas, lo que hace que p.His47Arg una sustitución patogénica común de *SOD1* y probablemente la causa genética más frecuentemente de dHMN/ HSAN en Noruega. (Østern & et.al., 2012)

Un fenotipo clásico de ELA combina signos de neuronas superiores y motoras asociados con un curso de progresión de la enfermedad más agresivo, ya que se ha encontrado que esta mutación conlleva a la muerte y esta ocurre de 1 a 3 años después del inicio de la enfermedad. (Bail, Self, & et. al, 2017)

En 2019 un estudio realizado en China reveló que casi todos los pacientes con p. His47Arg presentaban el fenotipo característico con afectación del músculo espinal, con un curso leve de la enfermedad, es decir, una progresión más lenta y mayor tiempo de supervivencia, 14 meses, a partir del diagnóstico.

Además, se observaron efectos altamente significativos dentro del género femenino estos son acerca del retraso del diagnóstico, la progresión de la enfermedad y el tiempo de supervivencia. Para este caso las mutaciones con peor pronóstico se presentan con mayor frecuencia en pacientes masculinos. Por ejemplo, el estudio menciona que 17 pacientes tuvieron un retraso diagnóstico de menos de 6 meses, 13 de los cuales eran hombres. En total, 8 pacientes portaban la mutación p.H47R. Entre estos pacientes, tres de ellos presentaron un retraso diagnóstico medio de 54.7 meses y un tiempo de supervivencia de 70 meses, mientras que estos valores en las otras 5 pacientes mujeres fueron 67.4 meses, y 120.5 meses, respectivamente.

Hasta donde menciona el estudio, la diferencia de género dentro de los pacientes con ELA relacionada con SOD1 no se ha descrito previamente. Aún no está claro por qué las pacientes femeninas presentan una ventaja de supervivencia más notable en la población esporádica. Una posible explicación de esta discrepancia es que la ELA familiar se hereda como una enfermedad mendeliana (monogénica), mientras que la ELA esporádica es probablemente una enfermedad oligogénica. Se especula que, en los casos de ELA familiar, el impacto de un gen causante es predominante; mientras que, en los casos de ELA esporádica, el efecto de cada variante en ciertos genes es menor y, por lo tanto, podría manifestarse el efecto modificador del género. Dado que el retraso diagnóstico es prolongado, se ha asociado con una supervivencia más prolongada en pacientes con ELA en varios estudios. Sin embargo, resultados contradictorios de esta variante en otras poblaciones de pacientes con ELA; sugieren una peor supervivencia en las mujeres a diferencia de lo que menciona el estudio.

Una posible explicación de las diferencias de género podría ser el papel de las hormonas gonadales, ya que se ha demostrado que estas hormonas, en particular el estrógeno, son neuroprotectoras. Se señala un informe muy reciente y característico que demostró una asociación negativa entre la ELA y el uso de anticonceptivos hormonales en las mujeres, informando un efecto dosis-respuesta. Otra posible razón para la diferencia de género es que fumar es un factor de riesgo para la ELA; los pacientes que fuman pueden tener un tiempo de supervivencia más corto, y hay un porcentaje más alto de fumadores masculinos en la ELA en China (Tang, Ma, & et.al, 2019).

En 2021 otro estudio realizado en Rio de Janeiro, Brasil, mostró mediante un algoritmo de programación el impacto de las variantes A4V, D90A, H47R e I113T; éstas son las mutaciones relacionadas con ELA más frecuentes en *SOD1*. Fueron predichas como perjudiciales por el 90 %, 50 %, 100 % y 100 % en la implementación del algoritmo en los pacientes con ELA, respectivamente. También menciona que es predijo que las variantes A4V y H47R afectarían a los aminoácidos conservados de *SOD1*. Y aunque las variantes A4V y D90A presentaron una mayor flexibilidad en sus bucles electrostáticos y de unión metálica, la variante H47R presentó una menor flexibilidad en esos bucles.

No se predijo que las variantes D90A, H47R e I113T afectaran la agregación de proteínas, ni la unión de chaperonas. Sin embargo, estudios relacionados al algoritmo de programación han demostrado que estas variantes presentan una mayor tendencia a formar agregados y fibrillas de tipo amiloide

Como pronosticó el algoritmo la sustitución de aminoácidos A4V y H47R ocurre en regiones altamente conservadas conocidas de *SOD1*.

Este estudio sugirió que los bucles funcionales adoptan conformaciones no wild-type tras las mutaciones H7R, lo que desprotege un núcleo hidrofóbico de la región del barril  $\beta$  de *SOD1* que sirve como interfaz molecular para las interacciones de proteínas no wild-type. Entre las interacciones wild-type, se formaron interacciones de enlaces de hidrógeno entre el bucle electrostático de una proteína mutante y la región del barril  $\beta$  desprotegida de una *SOD* vecina (Pereira, Vieira, & De Mesquita, 2021).

Para la mutación con ID [rs115556621](#), en el exón 2 del gen *SOD1*. Encontrada en paciente masculino, con edad de inicio de la enfermedad de 64 años, presenta un cambio C>G, en el aminoácido 29, p. Pro29Arg. La plataforma Varsome cataloga esta mutación como posiblemente dañina.

En el 2015 una investigación de neurodegeneración implicada en la caracterización de cómo la enzima superóxido dismutasa Cu/Zn, está involucrada en la ELA reveló el posible papel de *SOD1* en el crecimiento de células epidérmicas a través de la interacción con la variante [rs11556621](#). El dominio de unión Cu/Zn funciona en la unión de iones, como se ha mencionado anteriormente. La mutación también puede causar la pérdida de interacciones hidrofóbicas con otras moléculas en la superficie de la proteína. Por lo tanto, es más probable que este SNP afecte la estructura y función de la proteína (Mohamed, Taring, Omer, & et al., 2015).



### 7.3 Exón 4

Para ID [rs1568810660](#), en el exón 4 del gen *SOD1*. Encontrada en dos pacientes de sexo masculino, con edad de inicio de la enfermedad de 50.6 años, presenta un cambio de G>A. La base de datos *Varsome* cataloga esta mutación como patogénica.

En el año 2003, se llevó a cabo la detección de mutaciones en 2045 muestras de pacientes con ELA en el gen *SOD1*. Las principales características observadas en ese estudio fueron: la urgencia de micción en los homocigotos L8V, A89V y D90A, dolor articular y de espalda, así como sensaciones de calor intermitente en las piernas de un paciente con la mutación A89T.

En los casos con ELA juvenil, se presentan más temprano los síntomas; en algunos casos raros con mutaciones en *SOD1* (N86S, A89V, D90A, I104F, A89T).

La causa genética y/o ambiental del 90 por ciento restante de la ELA de inicio en adultos es desconocida, la cual no se encontró relación alguna con el inicio de ELA juvenil. También el análisis genético de líneas germinales de pacientes con FALS sin variantes en *SOD1* ha revelado heterogeneidad genética significativa con loci en los otros cromosomas (9q21, 9q34, 16q11.2, 18q20 y X) (Andersen, Sims, Xin, & et al., 2003).

### 7.4 Exón 5

Para ID [rs17880487](#), una variante de transcripción río abajo en 3' UTR, ubicada en el exón 5 del gen *SOD1*. Esta variante fue encontrada en un paciente de sexo masculino, se desconocía la edad de inicio de la enfermedad, presenta un cambio de C>G. La base de datos *Varsome* cataloga esta variante génica como benigna para ELA, pero se ha asociado con mortalidad cardiovascular.

Un estudio de cohorte en Japón con 10 años de seguimiento donde se genotipificaron alrededor de 639 SNP y la asociación de rs1041740 / rs17880487 dentro del gen *SOD1*, analizaron haplotipos con posible mortalidad cardiovascular. Identificando el haplotipo con alelo T de rs1041740 y con el alelo T de rs17880487 buscando su posible asociación con mortalidad vascular.

Se genotipificaron para alelos TT, TC y CC, se encontró que para portadores TT (rs1041740) de familias que han heredado enfermedades cardiovasculares tiene una prevalencia menor que en portadores de TC y CC del SNP rs17880487. Y no se observó muerte cardiovascular en portadores homocigóticos del alelo T de rs17880487.

Por otro lado, se buscó la relación entre ELA y enfermedades vasculares, sí es que esta es desencadenante para personas portadoras TT. La etiología de la esclerosis

lateral amiotrófica aún no está clara y hasta ahora no ha habido unificación en las hipótesis causales para la etiología de la ELA. Está puede ser una posible razón para creer que las enfermedades cardiovasculares (ECV) y condiciones relacionadas podrían desempeñar un papel en la patogénesis de la ELA. El metabolismo energético defectuoso, la hiperlipidemia y el colesterol, se han relacionado con menor riesgo en ELA (Kioumourtzoglou, Seals, Gredal, & et al., 2016). rs17880487T se ha considerado un factor protector para las enfermedades cardiovasculares Los polimorfismos del gen de SOD1 pueden afectar los perfiles de lípidos (especialmente el colesterol) de los hombres adultos de China Han, pero no tienen correlación con ninguno de los perfiles de lípidos en las mujeres

Sin embargo, otras hipótesis sugieren que la ECV son factores de riesgo que podrían aumentar el riesgo en pacientes con ELA. Por ejemplo, la neuroinflamación juega un papel importante en la neurodegeneración y los procesos inflamatorios, han sido implicados en el inicio y progresión de ELA (Perry, Nicoll, Holmes, & et al., 2010) (Glass, Saijo, Winner, & et al., 2010) (Evans, Couch, Sibson, & et al., 2013). La inflamación sistémica se cree que es un mecanismo compartido con ECV y la toxicidad del sistema nervioso central (SNC). Se ha demostrado que las citocinas circulantes exacerban la progresión sistémica de la neurodegeneración (Perry, Cunningham, Holmes, & et al., 2007).

La inflamación se ha relacionado con una disminución de la función en sujetos con enfermedades neurodegenerativas y con la presencia de apoptosis en ELA (Dahlke, Saberi, Ott, & et al., 2015) (Hensley, Floyd, Gordon, & et al, 2002).

Sin embargo, el análisis de sensibilidad sugirió que incluso sí el diagnóstico de ELA fuera avanzado por un año completo en un escenario improbable dada la rápida progresión de ELA, esto tendría poco impacto en la asociación entre ECV y ELA.

Además, dado que el peso es asociado con el mayor riesgo de ECV y reducido riesgo de ELA debido a la pérdida muscular.

(Kioumourtzoglou, Seals, Gredal, & et al., 2016) (O'Reilly, Wang, Weisskopf, & et al., 2013) (Scarmeas, Shih, Stern, & et al, 2002).

Otaki en 2012 informó que rs17880487 estaba asociado con la mortalidad cardiovascular, pero el estudio no mostró correlación entre el rs17880487 y riesgo de ELA en la población de estudio de china Han de la ciudad de Dalí (Otaki, Watanabe, Nishiyama, & et. al, 2012) (Xu, Zhu, Liang, & et.al, 2020).

El gen *SOD1* contiene una secuencia altamente conservada de 153 aminoácidos teniendo como motivo de unión a Cu-Zn, sorprendentemente, en esta proteína relativamente pequeña, se han informado más de 180 mutaciones sin sentido en pacientes con ELA familiar y con ELA esporádica. La mayoría de ellos muestran un

patrón autosómico dominante; sin embargo, solo un tercio de ellos han sido confirmados en estudios de segregación, también se ha demostrado que algunos SNP de *SOD1* están asociados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, ELA y otras enfermedades neurodegenerativas. Y su importancia radica en que la *SOD1* es una proteína antioxidante que juega un papel fundamental en la reducción de ROS al catalizar el superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno.

La evidencia de que la ELA es una enfermedad compleja, así como la presencia de variantes monogénicas y de alta penetrancia pueden presentarse en una pequeña proporción de pacientes sin antecedentes familiares. Se debe considerar los efectos de la penetrancia y la segregación dentro de la familia. Sin embargo, los factores que regulan la penetrancia de las mutaciones en *SOD1* siguen sin estar claras. (Dong, Xiao, Wen, & et. al, 2021)

## 8 Recomendaciones

Los resultados que se obtienen por el método de secuenciación son de gran confiabilidad y veracidad, por ende, para que las secuencias se puedan apreciar bandas definidas y de gran altura es indispensable tener en cuenta la calidad de la muestra de DNA. Desde la extracción del DNA por disolventes orgánicos se deben realizar en condiciones óptimas y evitar la producción de productos inespecíficos durante el proceso de amplificación, los cuales pueden interferir en la secuenciación.

Los resultados de este trabajo permitieron identificar variantes patogénicas como SNP de riesgo en el gen *SOD1*. Algunos de estos resultados son sustentados por fuentes bioinformáticas que nos dan un estimado de sus posibles repercusiones. Es necesario una mayor caracterización genética de pacientes con ELA familiar y ELA esporádica alrededor del mundo para comprender mejor la participación y los mecanismos de penetrancia de el gen *SOD1*.

La etiología de las mutaciones en algunos casos sigue siendo desconocida; sin embargo, podría estar relacionado con factores del medio ambiente o del origen de la población, con este trabajo se inició y trato de tener una estimación a nivel nacional de la participación del gen *SOD1* en pacientes mexicanos con ELA. Este trabajo se puede continuar para futuras investigaciones lo que abre la posibilidad de acercar a los pacientes a una cura o mejor tratamiento para esta enfermedad.

## 9 Conclusiones

En los últimos años, el progreso en la comprensión de la construcción e identificación de la ELA se describe como avanzada y notable. Desafortunadamente, la ELA se considera una enfermedad incurable, con una expectativa de vida esperada de 3 a 5 años después de la aparición de los síntomas (Hardiman, Van den Berg, & Fedrici, 2011). Aunque hay muchos antioxidantes y suplementos que se han propuesto como un tratamiento alternativo para la ELA, la mayoría de ellos no se han verificado en estudios de investigación o los estudios realizados carecen de validez o prueba sustancial en su metodología (Orrell, Lane, & Ross, 2008). La identificación de las vías moleculares subyacentes a la ELA proporcionará información sobre los enfoques terapéuticos. Actualmente hay varios ensayos clínicos en curso para medicamentos antiapoptóticos, antiagregantes, antioxidantes, antiexcitotóxicos, antiinflamatorios, neuroprotectores y de factor de crecimiento neurotrófico.[333] Los descubrimientos actuales del mecanismo subyacente de la ELA han ayudado a retrasar la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, los futuros tratamientos deberían apuntar a la prevención del daño neuronal, a medida que los pacientes progresan desde su aparición inicial (Zoccolella, Beghi, & et. al, 2008).

Con la disponibilidad de herramientas de secuenciación y descubrimiento de variables genéticas que desempeñan un papel importante en la patogénesis de la ELA, se espera que estas lleguen a premeditar la casusa de la ELA y consecuencias a raíz de su herencia. También es cierto que los factores ambientales desencadenan acciones contraproducentes a la hora de la aparición de la ELA, y parece probable que una fracción cada vez mayor de casos aparentemente de ELA esporádica resultaran ser consecuencia de múltiples variantes genéticas que son penetrantes individualmente.

Finalmente, un mejor conocimiento de las variantes genéticas y sus vías relacionadas con la neurodegeneración mejorará nuestra capacidad para definir interacciones entre la topología genética y el medio ambiente (p. ej., toxinas ambientales o elementos dentro del microbioma). Quizás lo más importante es que, a medida que se refina la comprensión de la genética de la ELA, mejorarán las oportunidades para desarrollar terapias significativas. En parte, esto puede ser una consecuencia directa de métodos mejorados para atenuar la expresión y la toxicidad de los genes de ELA. Furtivamente, uno anticipa que será cada vez más posible estratificar y personalizar enfoques y ensayos terapéuticos basados en distinciones moleculares entre subconjuntos de casos de ELA (Ghasemi & Brown, 2018).

## 10 Bibliografía

- Pereira, G., Vieira, B., & De Mesquita, J. (2021). Comprehensive in silico analysis and molecular dynamics of the superoxide dismutase 1 (SOD1) variants related to amyotrophic lateral sclerosis. *Plos One*, 1-27.
- Adams, & et al. (2018). *Principles of Neurology*. USA: McGrawHill.
- Andersen, P., Sims, K., Xin, W., & et al. (2003). Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. *Taylor & Francis healthsciences*, 62-73.
- Andrés, C., De la Lastra, J., Plou, F., & Lebaña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.*, 22-29.
- Antonarakis, S., Irkin, S., Cheng, T., & et al. (1984). beta-Thalassemia in American blacks: novel mutations in the "TATA" box and an acceptor splice site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1154-1158.
- Aoki, M., & et al. (1994). La esclerosis lateral amiotrofica familiar (ELA) en Japón asociada con la mutación H46R en el gen del superóxido dismutasa Cu/Zn: un posible nuevo subtipo de ELA familiar. *J Neurol Sci*, 77-83.
- Aoki, M., Ogasawara, M., Matsubara, Y., & et al. (1994). Familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Japan associated with H46R mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene: a possible new subtype of familial ALS. *Elsevier*, 77-83.
- Armon, C. (2003). . An evidence-based medicine approach to the evaluation of the role of exogenous risk factors in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology*, 217-228.
- Ausubel, F., Brent, R., & et. al. (2003). *Current protocols in molecular*. USA: John Wiley & Sons Inc.
- Bail, T., Self, W., & et. al. (2017). Defining SOD1 ALS natural history to guide therapeutic clinical trial design. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 99-105.
- Baynes, J., & Dominizack, M. (2019). *Bioquímica Médica*. UK: Elseiver.
- Beckman, J., & et al. (2001). Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. *Trends Neurosci*, 15-20.
- Bergemalm, D., Jonsson, P., Graffmo, K., & Andersen, P. (2006). Overloading of stable and exclusion of unstable human superoxide dismutase-1 variants in mitochondria of murine amyotrophic lateral sclerosis models. *J. Neurosci*, 4147-4154.
- Bernard, E., Pegat, A., Svahn, J., & et. al. (2020). Clinical and Molecular Landscape of ALS Patients with SOD1 Mutations: Novel Pathogenic Variants and Novel Phenotypes. A Single ALS center study. *Molecular Sciences*, 1-11.

- Bernard-Marissal, N., & et al. (2012). Reduced calreticulin levels link endoplasmic reticulum stress and Fast-riggered cell death in motoneurons vulnerable to ALS. *J. Neurosci*, 4901-4912.
- Boillée, S., Vande Velde, C., & Cleveland, D. (2006). ALS: a disease of motor neurons and their non neuronal neighbors. *Neuron*, 39-59.
- Bolivar, A., Rojas, A., & Garcia Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR- Multiplex: critical parameters and standarization protocol). *Avances de Biomedicina*, 25-33.
- Bonafede, R. &. (2017). ALS Pathogenesis and Therapeutic Approaches : The role of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 1-16.
- Brasil, A., Magalhaes, R., & et al. (2018). Implications of fALS mutations on SOD1 function and oligomerization in cell models. *Mol. Neurobiol*, 5269-5281.
- Camacho, A., Esteban, J., & Paradas, C. (2018). Informe de la Fundación Del Cerebro sobre el impacto social de la esclerosis lateral amiotrófica y las enfermedades neuromusculares. *Elsevier*, 35-46.
- Collel, J. (2005). Esclerosis lateral amiotrofica . *Mente y cerebro*, 2-11.
- Dahlke, C., Saberi, D., Ott, B., & et al. (2015). Inflammation and neuronal death in the motor cortex of the wobbler mouse, an ALS animal model. *J Neuroinflammation*, 212-215.
- Deng, H., Hentati, A., Tainer, J., & et al. (1993). Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science*, 1047-1051.
- Deng, H., Hentati, A., Tainer, J., & et al. (1993). Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu/Zn superoxide dismutase. *Science*, 1047-1051.
- Diamanti, L., Gagliardi, S., Cereda, C., & Ceroni, M. (20 de Junio de 2019). *Genetics of ALS and Correlations Between Genotype and Phenotype in ALS — A Focus on Italian Population*. Obtenido de [www.intechopen.com: https://www.intechopen.com/books/current-advances-in-amyotrophic-lateral-sclerosis/genetics-of-als-and-correlations-between-genotype-and-phenotype-in-als-a-focus-on-italian-population](https://www.intechopen.com/books/current-advances-in-amyotrophic-lateral-sclerosis/genetics-of-als-and-correlations-between-genotype-and-phenotype-in-als-a-focus-on-italian-population)
- Dion , P., Daoud , H., & Rouleau , G. (2009). Geneética de los trastornos de las neuronas motoras; nuevos conocimientos sobre losmecanismos patógenos. *Nature*, 769-782.
- Doble, A. (1997). Effects of riluzole on glutamatergic neurotransmission in the mammalian central nervous system, and other pharmacological effects. *Rev. Contemp. Pharmacother*, 213-225.
- Dong, S., Xiao, N., Wen, B., & et. al. (2021). An exon 5 mutation (c.425G>C, p.Gly141Ala) in the SOD1 gene in a Chinese amily associated with incomplete penetrance. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotempora Degeneration*, 1-5.
- Dorado, C., Vargas, C., & Selva, A. (2003). *Estrés oxidativo y neurodegeneración*. México: UNAM.

- Evans, M., Couch, Y., Sibson, N., & et al. (2013). Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci*, 34-41.
- Felbecker, A., Camu, W., Valdmanis, P., & et. al. (2011). Four familial ALS pedigrees discordant for two SOD1 mutations: Are all SOD1 mutations pathogenic? *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 572.
- Fischer, C., Hallewell, R., Roberts, V., & et al. (1991). Probing the structural basis for enzyme-substrate recognition in Cu, Zn superoxide dismutase. *Commun*, 284-296.
- Ghadge, G., Lee, J., & et al. (1997). Mutant superoxide dismutase-1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis: Molecular mechanisms of neuronal death and protection. *J. Neurosci*, 8756-8766.
- Ghasemi, M., & Brown, R. (2018). Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 12-49.
- Ghatak, S., Muthukumaran, R., & Nachimuthu, S. (2013). A Simple Method of Genomic DNA Extraction from human samples for PCR-RFLP analysis. *Journal of Biomolecular Techniques*, 224-231.
- Glass, C., Saijo, K., Winner, B., & et al. (2010). Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*, 18-34.
- Guam, U. o. (31 de Agosto de 2020). Cycads as an ecotoxin and neurological disorders. *ScienceDaily*, págs. 1-4.
- Gurney, M., & et al. (1998). Riluzole preserves motor function in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 62-66.
- Hardiman, O., Van den Berg, L., & Fedrici, P. (2011). Pain in amyotrophic lateral sclerosis: A neglected aspect of disease. *Neurol Res*, 38-43.
- Henden, L., Twine, N., Szul, P., & et.al. (2020). Identity by descent analysis identifies founder events and links SOD1 familial and sporadic ALS cases. *Genomic Medicine*, 5-12.
- Hensley, K., Floyd, R., Gordon, B., & et al. (2002). Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 365-374.
- Ingre, C., Roos, P., Pielh, F., Kamel, F., & Fang, F. (2015). Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Epidemiol*, 181-193.
- Kioumourtoglou, M.-A., Seals, R., Gredal, O., & et al. (2016). Cardiovascular disease and diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: A population based study. *Taylor & Francis Group*, 548-554.
- Liochev, S., & Fridovich, I. (2003). Mutant Cu,Zn superoxide dismutases and familial amyotrophic lateral sclerosis: evaluation of oxidative hypotheses. *Biol. Med*, 1383-1389.
- Martínez, H., González-Garza, M., & et al. (2009). Stem cell transplantation into the frontal motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Cytotherapy*, 26-34.

- Martínez, H., Parada-Garza, J., & Meza, M. (2014). Esclerosis lateral amiotrófica. Contribución de la Neurología Mexicana de 1998-2014. *Rev Mex Neuroci*, 355-366.
- Martínez, H., Parada-Garza, J., Meza, M., & et al. (2014). Esclerosis lateral amiotrófica. Contribución de la Neurología Mexicana de 1998 a 2014. *Rev Mex Neuroci*, 355-362.
- Mattason, P. (2013). Excitation Boosts TORs motor neurons in ALS mice. *Neuron*, 1-3.
- Miller, S., Polesky, H., & Dykes, D. (1998). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 1215.
- Miller, T., & et al. (2013). An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *Lancet Neurol*, 435-442.
- Mohamed, D., Taring, M., Omer, A., & et al. (2015). Computational analysis of the single nucleotide polymorphisms that affect superoxide dismutase reveals important domain related to protein function. *American Journal of Biomedical Research*, 58-68.
- Moller, A., & et al. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant SOD1 inhibits anterograde axonal transport of mitochondrial by reducing Mirol 1 levels. *Hum Mol Genet*, 1-24.
- Mulder, D., Karland, L., Offord, K., & et al. (1988). Familial adult motor neuron disease amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 511-517.
- Muller, K., & et al. (2018). Comprehensive analysis of the mutation spectrum in 301 German ALS families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 817-827.
- Musaró, A. (2013). Understanding ALS: new therapeutic approaches. *FEBS J.*, 4315-4322.
- National Center for Biotechnology Information. (2 de Septiembre de 2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Niemann, S., Brooom, W., & Brown, R. (2007). Analysis of a genetic defect in the TATA box of the SOD1 gene in patient with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, 704-707.
- Nita, M., & Grzybowski, A. (2016). The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxid Med Cell Longev*, 26-38.
- O'Reilly, O., Wang, H., Weisskopf, M., & et al. (2013). Premorbid body mass index and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontal Degener.*, 205-211.
- Ohi, T., & et al. (2002). Clinical features and neuropathological findings of familial amyotrophic lateral sclerosis with a His46Arg mutation in Cu/Zn superoxide dismutase. *J Neurol Sci*, 73-78.



- Orrell, R., Lane, R., & Ross, M. (2008). A systematic review of antioxidant treatment for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Amyotroph Lateral Scler*, 195-211.
- Østern, R., & et.al. (2012). Hereditary motor neuron disease in a large Norwegian family with a "H46R" substitution in the superoxide dismutase 1 gene. *Elsevier*, 511-521.
- Otaki, Y., Watanabe, T., Nishiyama, S., & et. al. (2012). The Impact of Superoxide Dismutase-1 Genetic Variation on Cardiovascular and All-Cause Mortality in a Prospective Cohort Study: The Yamagata (Takahata) Study. *PLoS One*, 11-20.
- Perry, V., Cunningham, C., Holmes, C., & et al. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol*, 161-167.
- Perry, V., Nicoll, J., Holmes, C., & et al. (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, 193-201.
- Rodrigues, G., Abraham, B., & Freire, J. (2021). Análisis completo in silico y dinámica molecular de las variantes de superóxido dismutasa 1 (SOD1) relacionadas con la esclerosis lateral amiotrófica. *Plos uno*, 16-35.
- Rosen, D., Siddique, T., & et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 59-62.
- Saeed, K., & Ahmad, N. (2013). Real-Time Polymerase Chain Reaction: Applications in Diagnostic Microbiology. *Internatonal Journal Of Medical Students*, 28-36.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Harbor Laboratory Press.
- Sasaki, S., & Iwata, M. (2007). Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol*, 10-16.
- Satoshi, K., Yoshitomo, T., Hiroaki, M., & et.al. (1999). A novel mutation (Cys6Gly) in the Cu/Zn superoxide dismutase gene associated with rapidly progressive familial amyotrophic lateral sclerosis. *Elsevier*, 135-137.
- Scarmeas, N., Shih, T., Stern, Y., & et al. (2002). Premorbid weight, body mass, and varsity athletics in ALS. *Neurology*, 773-705.
- Sedvy, H., Tamber, S., & Hancock, R. (2013). Electrophoresis and Blotting of DNA. *John Willey & amp.*
- Shaw, P., & Eggett, C. (2000). Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol*, 117-127.
- Siddique, N., & Siddique, T. (2019). Amyotrophic Lateral Sclerosis Overview. *GeneReviews*.
- Sundaram, R., Gowtham, L., & Nayak, B. (2012). The role of excitatory neurotransmitter glutamate in brain physiology and pathology. *Asian J. Pharm*, 1-7.
- Tainer, J., Getzolf, J., Richardson, J., & et al. (1983). Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*, 284-287.

- Takalo, M., Salminen, A., & et al. (2013). Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *Am J Neurodegener Dis*, 1-14.
- Talbott, E., Malek, A., & Lacomis, D. (2016). The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Handb Clin Neurol*, 225-238.
- Tang, L., Ma, Y., & et al. (2019). Better survival in female SOD1-mutant patients with ALS: a study of SOD1-related natural history. *Translational Neurogeneration*, 1-10.
- Tovar, L., Tapia, R., & Lazo, U. (2014). Trophic factors as modulators of motor neuron physiology and survival: implications for ALS therapy. *Front Cell Neurosci*, 1-7.
- Turner, M. (2013). Increased premorbid physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: burn to run rather than run to death, or a seductive myth? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1222-1225.
- Vela, A., Galan, L., Valencia, C., & et al. (2012). SOD1-N196 mutation in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *Elsevier*, 11-15.
- Waibel, S., & et al. (2004). Rasagiline alone and in combination with riluzole prolongs survival in an ALS model mouse. *J. Neurol*, 1080-1084.
- Wang, Q., Johnson, J., & et al. (2008). Protein aggregation and protein instability govern familial amyotrophic lateral sclerosis patient survival. *Plos Biol*, 170.
- Xu, P., Zhu, Y., Liang, X., & et al. (2020). Genetic polymorphisms of superoxide dismutase 1 areas associated with the serum lipid profiles of Han Chinese adults in a sexually dimorphic manner. *Plos One*, 1-13.
- Yamashita, S., Kimura, E., & et al. (2009). Flexor-dominant myopathic phenotype in patients with His46Arg substitution in the Cu/Zn superoxide dismutase gene. *J Neurol Sci*, 6-10.
- Yang, X., Yang, S., Xu, H., & et al. (2021). Superoxide Dismutase Gene Polymorphism is Associated With Ischemic Stroke Risk in the China Dali Region Han Population. *Neurologist*, 27-31.
- Yun Lee, P., Costumbrado, J., & et al. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J Vis Exp*, 5-15.
- Zeni, S., & Marrote, C. (2013). Especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre la actividad de las células oseas. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 661-674.
- Zoccolella, S., Beghi, E., & et al. (2008). Analysis of survival and prognostic factors in amyotrophic lateral sclerosis: A population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 33-37.

**Vo. Bo. Del (la) o los (las) asesores (as) respecto a los contenidos académicos**



---

DR. ALBERTO ORTEGA VÁZQUEZ  
PROFESOR ASOCIADO D  
**No. Económico: 35583**



---

DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ  
INVESTIGADOR EN CIENCIAS  
MÉDICAS D  
**Cedula: 5913885**