



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Reporte de Servicio Social

Nombre del proyecto:

**Identificación de variantes genéticas en el gen
CHCHD10 en pacientes mexicanos con Esclerosis
Lateral Amiotrófica**

Proyecto Genérico:

Evaluación de productos relacionados con la salud.

Etapa:

Desarrollo de reactivos analíticos y de diagnóstico.

Alumno: David López Casas

Matrícula: 2133076518

DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ (INNNMVS)Asesora Externa
**DR. ALBERTO ORTEGA VÁZQUEZ (UAM-XOCHIMILCO, Laboratorio 103-
UIDIS)Asesor Interno**

Fecha de inicio: 29/01/2018

Fecha de término: 30/07/2018

ÍNDICE

1	DATOS GENERALES	2
2	LUGAR Y PERIODO DE REALIZACIÓN	2
3	UNIDAD, DIVISIÓN Y LICENCIATURA.....	2
4	NOMBRE DE PLAN, PROGRAMA O PROYECTO EN QUE SE PARTICIPA	2
5	ASESORES:.....	2
6	INTRODUCCIÓN	3
6.1	ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.....	3
6.2	SÍNTOMAS	4
6.3	TIPOS DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA	5
6.4	GENES RESPONSABLES DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA	5
6.5	<i>GEN CHCHD10</i>	7
7	JUSTIFICACIÓN.	8
8	OBJETIVOS.....	9
8.1	Objetivo GENERAL:.....	9
8.2	Objetivos ESPECÍFICOS:.....	9
9	METODOLOGÍA.....	11
9.1	SUJETOS.....	11
9.2	EXTRACCIÓN DE DNA.....	11
9.3	ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE DNA.....	12
9.4	AMPLIFICACIÓN DE LOS 4 EXONES DE <i>CHCHD10</i>	13
9.5	PURIFICACIÓN DE PCR.....	15
9.6	SECUENCIACIÓN TIPO SANGER.....	15
10	ACTIVIDADES REALIZADAS	17
11	METAS Y OBJETIVOS ALCANZADOS	17
12	RESULTADOS	18
13	DISCUSIÓN.	25
14	CONCLUSIÓN.....	29
15	BIBLIOGRAFÍA.....	29

1 Datos generales

Nombre: López Casas David

Matrícula: 2133076518

Dirección: 1ª CDA José González Varela #12 Col. San Miguel Ajusco, Tlalpan, Ciudad de México, C.P. 14700

Correo: davidhaseck@gmail.com

Tel. casa: 58461761 Tel. cel.: 5554535030

2 LUGAR Y PERIODO DE REALIZACIÓN

Laboratorio de Neurogenética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velazco Suarez (INNNMVS) y el Laboratorio de Genética molecular (N-103), Departamento de Sistemas Biológicos. UAM-X.
Del 29/enero/2018 al 30/julio/2018

3 UNIDAD, DIVISIÓN Y LICENCIATURA

Unidad: Xochimilco División: Ciencias Biológicas y de la Salud Departamento: Sistemas Biológicos Licenciatura: Química Farmacéutica Biológica.

4 NOMBRE DE PLAN, PROGRAMA O PROYECTO EN QUE SE PARTICIPA

Identificación de variantes genéticas en el gen *CHCHD10* en pacientes mexicanos con Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Estudio farmacogenómico en población normal y pacientes con enfermedades neurológicas

5 Asesores:

Interno: Dr. Alberto Ortega Vázquez (35583)

Externo: Dra. Petra Yescas Gómez (INNNMVS)

6 Introducción

6.1 ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta selectivamente a neuronas motoras del sistema nervioso central, estas son las neuronas motoras superiores (NMS) las que transmiten el mensaje a las células nerviosas del cerebro, y las neuronas motoras inferiores (NMI), las células nerviosas que están en el tallo cerebral y la médula espinal, estas neuronas participan en el inicio y proporcionan los enlaces de comunicación vitales entre el cerebro y los músculos voluntarios, en la enfermedad estas neuronas se degeneran o mueren deteniendo la transmisión del mensaje a los músculos voluntarios (Kinsley & Siddique, 2001). La ELA es considerada un síndrome multisistémico y multifactorial complejo, estas operan a través de vías moleculares interrelacionadas que incluyen el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, el daño en el transporte axonal por la acumulación de neurofilamentos en agregados intracelulares, la activación microglial por la secreción de citocinas provocando mayor toxicidad y la agregación de proteínas citoplasmáticas, se sabe que por última instancia la degeneración de las neuronas se produce por la activación de vías enzimáticas que dependen del calcio. Los pacientes experimentan signos y síntomas en los músculos ya que estos dejan de funcionar y se debilitan tanto que comienzan a contraerse esto es mejor conocido como fasciculaciones y se llegan a atrofiar, principalmente ocurre con los músculos voluntarios, los pacientes con ELA tienen una gran debilidad, fatiga y problemas para deglutir, con el tiempo, el cerebro pierde su habilidad de iniciar y contraer los movimientos voluntarios lo que conlleva a la insuficiencia respiratoria fatal dentro de los 3-5 años de iniciada la enfermedad. Sin embargo, se ha reportado que cerca del 10 por ciento de los pacientes con ELA pueden sobrevivir más de 10 años (Stroke, 2019) (Chiò, y otros 2013) (Martínez, y otros , 2017) (Ling Li, y otros., 2016) (Association, 2019)

En el 2018 en los Centros para el control y la prevención de Enfermedades (CDC) se calculó que 21,655 personas en Estados Unidos padecen de ELA, considerando como una enfermedad que afecta a todas las poblaciones y grupos étnicos sin excepción alguna, algunos estudios fundados en la población europea es bastante uniforme cerca de 2.8 por 100 000 personas al año y otro estudio señala que la incidencia en América del norte es de 1.8 por 100 000 personas al año la mayor incidencia de la enfermedad es presentada en hombres que en mujeres, pero con una menor diferencia (Mehta, 2023)(Kiernan, y otros , 2011) (Stroke, 2019) (Leblond, Kaneb, Dion, & Rouleau, 2014)

6.2 Síntomas

Los síntomas y signos surgen cuando el axón se retrae y se produce la denervación de las neuronas motoras superiores e inferiores. La retracción es compensada por brotación y reinervación colateral de axones de neuronas que parecen ser más resistentes al proceso degenerativo, pero a medida que la enfermedad progresa, este mecanismo falla debido a la participación de las neuronas más resistentes. Posterior a esta etapa inicial de disfunción y retracción axonal que el cuerpo celular neuronal se vuelve visiblemente anormal y muere (Robberecht & Philips, 2013) (Leblond, Kaneb, Dion, & Rouleau, 2014)

Al inicio, la ELA llega a ser tan leve que sus síntomas se pasan por alto o son confundidos con otros padecimientos, pero al progresar se convierte en una atrofia más obvia lo que hace que el paciente acuda al médico, estos síntomas tempranos son:

- Fasciculaciones en el brazo, pierna, hombro o lengua.
- Calambres musculares.
- Músculos tensos o rígidos
- Debilidad muscular que afecta un brazo, una pierna, el cuello o el diafragma.
- Lenguaje difuso o nasal.
- Dificultad para masticar o tragar.

Los primeros síntomas varían en las personas, puesto que algunas inician en la mano o el brazo y en otras puede inician en las piernas o al hablar o tragar, esta última se conoce como ELA de inicio bulbar. (Stroke, 2019)

6.3 Tipos de ELA

- a) ELA esporádica: La mayoría de los casos de ELA son considerados esporádicos (ELAs), presentando la enfermedad, sin factores de riesgo asociados, ni una historia familiar de la enfermedad. (Meijboom & Brown, 2022)
- b) ELA familiar: aproximadamente un 10% de los casos se heredan con un patrón de herencia autosómico dominante, generalmente en el adulto, mientras que en algunos casos de ELA juvenil se asocia comúnmente con la herencia autosómica recesiva, considerando estas formas de presentación de tipo familiar (ELAf), ambas son clínicamente muy similares. Reciente mente se ha vinculado a esta enfermedad la Demencia Frontotemporal (DFT), esta es la forma más común de demencia de inicio temprano, la cual se produce por la degeneración de las neuronas en la corteza prefrontal y temporal, produciendo una disfunción ejecutiva frontal en muchos pacientes con alteraciones en el juicio, lenguaje y la conducta. Este espectro ELA/DFT relaciona dos entidades completamente diferentes, los pacientes con ELA pueden llegar a mostrar un deterioro cognitivo que puede progresar y ser compatible con la DFT o bien en la familia se reportan casos con ELA o DFT. Ambas enfermedades, son cruelmente incapacitantes y fatales, pero ELA avanza más rápidamente, esto implica un solapamiento clínico, patológico y genético entre los dos trastornos o que el paciente fallezca antes de desarrollar una demencia (Meijboom & Brown, 2022)(Orsini, y otros, 2015) (Robberecht & Philips, 2013) (Leblond, Kaneb, Dion, & Rouleau, 2014) (Sreedharan & Brown, 2013) (Ingre, Roos, Piehl, Kame, & Fang, 2015). (Mehdi Ghasemi and Robert H. Brown, Jr, 2018)

6.4 Genes responsables de ELA

A la fecha, se ha logrado obtener más avances para la comprensión de la patogénesis de la ELA, la cual están involucrados una variedad de genes (Ref), así como un desequilibrio de la homeostasis proteica de las neuronas, alteraciones del metabolismo del ARN, disfunción mitocondrial y acumulación de agregados proteicos en el citoplasma de las neuronas provocando una ganancia de función toxica (Ref). Los genes que se han

descubiertos causantes de la ELA tienen una alta penetrancia para los casos familiares, los cuales cubren hasta el 60% y un 10-13% de los casos de ELA esporádicos (ref). Los principales son superóxido dismutasa 1 (*SOD1*), que muestra en sus variantes un patrón de herencia autosómico dominante, causando un 15 y el 30% % de casos de ELAf y menos del 2% de ELA esporádica, de igual manera la proteína de unión a ADN TAR (*TARDBP*), que codifica La proteína TDP-43 ha sido identificados en casos de ELAf con un 3.3 % y 0.5% de ELA esporádico, el marco de lectura abierto 72 del cromosoma 9 (*C9orf72*) es la causa genética más común en los casos de ELA familiar en Europa con más del 30%, y con un 7 % de casos de ELA esporádica, otros genes involucrados son *FUS* *VAPB*, *EPHA4*, *UNC13A*, *NEK1*, *HNRNPA1*, *ANXA11*, *UBQLN2*. la mayoría de las variantes encontradas en estos genes son también variantes encontradas en DFT, lo cual nos indica que es posible que exista una fuerte superposición genética entre las dos enfermedades, se han identificado variantes tanto en pacientes con DFT como con ELA. Los genes superpuestos entre ambos espectros incluyen *C9ORF72*, *ANG*, *FUS*, *TBK1*, *TARDBP*, *FUS*, *VCP*, *OPTN*, *CHCHD10*, *SQSTM1*, *TIA1*, *CCNF* y *CYLD*, *C9ORF72*, en la figura 1, se muestran los genes involucrados don ELA, con DFT y con que se superponen con ambos espectros, estos aumentan la susceptibilidad de la ELA o modifica su fenotipo (figura 1) (Meijboom & Brown, 2022)(Marangi & Traynor, 2015) (Abdelhak, y otros, 2015) (Chiò, y otros, 2012) (De March, y otros, 2023) (Riva, 2024)

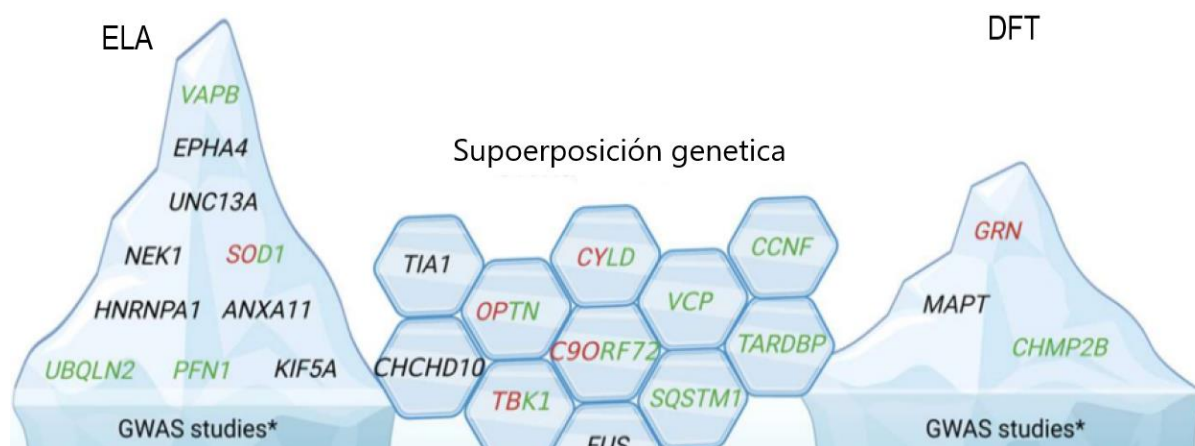


Figura 1: Imagen tomada y editada de De March, y colaboradores,, 2023, la cual nos muestra los vínculos directos e indirectos entre ELA y DFT o ambos. Los genes directamente implicados en funciones inmunitarias están resaltados en rojo, mientras que los vinculados a la autofagia están resaltados en verde; los implicados tanto en la autofagia e inmunitaria están en rojo/verde. (De March, y otros, 2023)

6.5 Gen *CHCHD10*

La mitocondria es un orgánulo esencial que convierte los nutrientes que entran en la célula en energía química mediante reacciones como la fosforilación oxidativa, esta sirve para poder proporcionar ATP la principal molécula que proporciona una fuente de energía para la mayoría de las funciones celulares. La mitocondria desempeña diferentes funciones multidisciplinarias que como son el estrés celular, metabolismo de iones metálicos, apoptosis almacenamiento de calcio y degradación de proteínas citosólicas. (Bannwarth, et al., 2014)

Las mitocondrias tienen su propio genoma el cual codifica para 13 proteínas relacionadas con el sistema de fosforilación oxidativa, 2 ARN ribosomales y 22 ARNt. Además, aproximadamente 1500 proteínas mitocondriales codificadas en el genoma nuclear se producen en los ribosomas citosólicos como proteínas precursoras y se importan a las mitocondrias a través de la maquinaria de importación mitocondrial. (Devall, y otros., 2023)

El gen *CHCHD10* (figura 2) pertenece a una familia de proteínas gemelas con motivo CX9C, la mayoría de las cuales se localizan en el espacio intermembranal de la mitocondria, estas adoptan una conformación de dominio en espiral-espiral-hélice-espiral-espiral-hélice que contiene el gen 10 (*CHCHD10*), el llamado dominio CHCH que se estabiliza por puentes disulfuro. El *CHCHD10* es un gen nuclear que codifica una proteína de 142 aminoácidos que se ubica en el espacio intermembrana de las mitocondrias donde se encuentra probablemente involucrada la estabilidad del genoma mitocondrial, integridad de las crestas, y fusión mitocondrial, este gen se ha propuesto como nuevo candidato para ELA posteriormente que se descubriera que sus variantes que afectan a su dominio espiral-espiral-hélice-espiral-espiral-hélice que contiene el gen 10 (*CHCHD10*), causan múltiples deleciones del ADNmt la variante p.R15L se asocia con la ELA, desestabiliza la proteína *CHCHD10* en fibroblastos derivados del portador, ocasionando una respiración celular deteriorada y a un aumento del nivel en estado estacionario de su proteína paróloga *CHCHD2*, y la variante p. Ser59Leu en *CHCHD10*, ocasionando esta variante un fenotipo complejo y muy variable que incluye un deterioro

cognitivo progresivo que se asemeja al espectro ELA/DFT, además puede incluir ataxia cerebelosa, miopatía, sordera neurosensorial. (Bin , y otros, 2016), (Keith y otros, 2020) (Bannwarth, y otros, 2014) (Shammas, 2023)

El gen *CHCHD10* se ubica en el cromosoma 22q.11.23 (figura 3) y codifica para una proteína enriquecida en las uniones de las crestas de las mitocondrias. Las variantes de este gen están involucradas en trastornos mitocondriales, ocasionados por defectos en el ADN nuclear cuyo producto proteico resultante es de 14kDa, de función desconocida pero se sabe que participa en el mantenimiento de la dinámica mitocondrial y la bioenergía celular, principalmente en la integridad de las crestas y la fusión mitocondrial, la mitocondria de un paciente con la variante se observa fragmentada y las crestas alteradas, estos efectos son similares a las anomalías en las dinámicas mitocondriales inducidas por variantes en *TDP43* mostrando que *CHCHD10* también interactúa con *TDP43* promoviendo a retención en el núcleo pero en presencia de la variante provoca una acumulación de *TDP43* en el citoplasma y el daño sináptico. Las variantes en este gen se han asociado como causa del espectro ELA/DFT, resultado de estudios del exoma completo. La presencia de la variante S59L se ha relacionado con pacientes de ascendencia española dentro de este (Bin , y otros, 2016) (Bannwarth, y otros, 2014) (Chia, Chiò, & Traynor, 2018) (Imai, Meng, Fukushima, & Nobutaka , 2019) (Cavallaro, 2010) (Anderson, y otros, 2019)

7 Justificación.

A la fecha no se tiene un mecanismo que por completo explique qué es lo que causa la ELA, en las últimas décadas se ha obtenido un caudal de información científica respecto a esta enfermedad. La identificación de genes ha revelado mecanismos moleculares clave en el desarrollo de la ELA, estos incluyen proteostasis, autofagia, procesamiento del RNA, dinámica del citoesqueleto, disfunción mitocondrial y respuesta al daño del DNA. La mayoría de los pacientes con ELA presentan la enfermedad en la edad adulta alrededor de 60 a 79 años, teniendo una incidencia global es de 1.60 por 100,000 personal al año, variando por región y por sexo. (Feldman, 2022) (Bhattacharya, Harvey, Abraham, Rosen, & Mehta, 2019) (Association, 2019) (Fundación Española para el

Fomento de la Investigación de la Esclerosis Lateral Amiotrófica., 2018) (Martínez H. R., y otros, 2017)

Se estima que aproximadamente un 50% de las personas con ELA presentarían un deterioro cognitivo con la evolución de la enfermedad, estos cambios conductuales en pacientes con ELA son similares a los descritos en DFT o presentan una historia familiar positiva en otros miembros de la familia esto se observa en alrededor de 15% de los pacientes con ELA y en 10-27% de pacientes con DFT, La presencia de un defecto genético en miembros de una misma familia con ELA y DFT apoya la idea de un continuo entre ambas enfermedades (Iridoy, 2018) (Lillo, y otros, 2014)

Además, integrar la participación de nuevos genes como es el gen *CHCHD10* responsables de Síndrome de ruptura del DNA mitocondrial y asociados al espectro DFT-ELA resulta necesario abordar las diferentes vías que participan en este nuevo espectro DFT/ELA, considerando que la frecuencia de variante de *CHCHD10* es relativamente baja y hay pocos estudios al respecto, por lo que resulta por demás interesante como la disfunción de esta proteína gemela subyace a la patogénesis no solo de la ELA si no en otras enfermedades neurodegenerativas (Bannwarth, y otros, 2014)

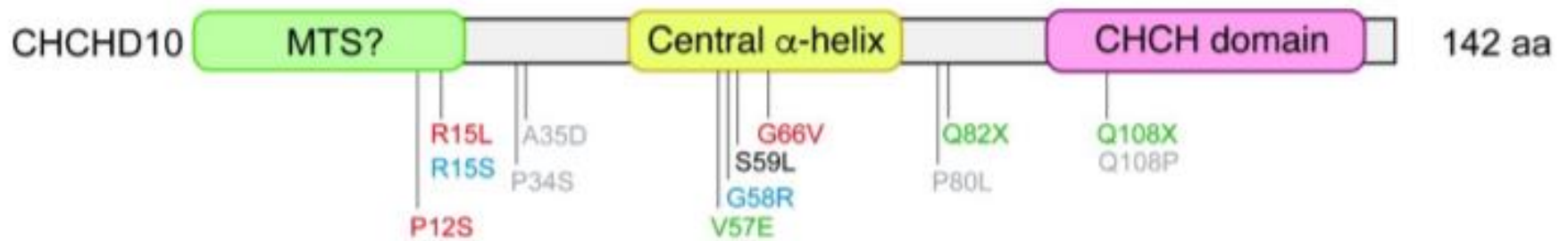
8 Objetivos

8.1 GENERAL:

- Identificar las variantes genéticas en el gen *CHCHD10* en pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

8.2 ESPECÍFICOS:

- Establecer la correlación genotipo-fenotipo ante la presencia de una variante génicas
- Conocer la distribución y frecuencia de las variantes génicas identificadas



Chromosome: 22q.11.23

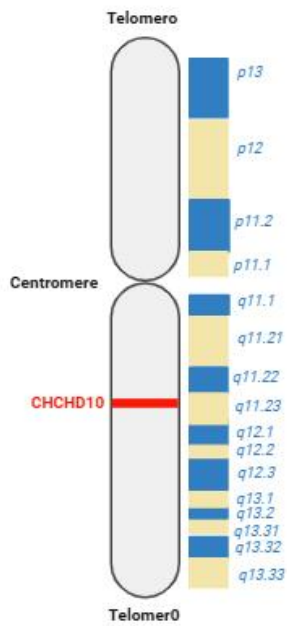


Figura 2 figura del gen CHCHD10 mostrando el dominio CHCH y las principales variantes descubiertas, variantes en color verde se han localizado en pacientes con DFT, las variantes en color rojo se han encontrado en pacientes con ELA, en color negro la variante se ha localizado en pacientes con ELA y enfermedad de Motoneurona, y en pacientes con miopatía mitocondrial en azul. Las posibles variantes de riesgo encontradas en pacientes con ELA, DFT, DFT con patología de Enfermedad de Parkinson, y ELA-DFT están en gris. La imagen fue tomada de (Imai, Meng, Fukushima, & Nobutaka, 2019)

Figura 3 Cromosoma 22 marcado con color rojo la posición del gen CHCHD10, figura obtenida en GENELIBS, 2019 y modificada en <https://BioRender.com>

9 Metodología

9.1 Sujetos

Siguiendo todas las consideraciones éticas se seleccionaron un grupo de 100 pacientes que cumplieron con criterios clínicos de probable ELA del banco de DNA del Departamento de Neurogenética y de los nuevos casos provenientes de la consulta de Neurología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNMVS). Protocolo "CARACTERIZACIÓN DEL ESPECTRO CLÍNICO, BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA", CONACYT:262111

9.2 Extracción de DNA

En los casos nuevos se realizó la extracción de DNA genómico a partir de una muestra de 10 mL de sangre periférica en tubos Vacutainer con anticoagulante ACD o EDTA, previa firma de consentimiento informado, esta extracción se realizó utilizando la técnica de sales de Miller modificada, la cual se realizó a partir de:

- (1) Lisis celular de glóbulos rojos con el buffer o amortiguador RBGL (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM y Na₂EDTA 2 mM, a pH 8.2), este provoca la lisis de la membrana celular, este proceso se repite hasta obtener un botón de células blancas.
- (2) El botón resultante se les añadió 570 µL de cloruro de sodio (NaCl) 5mM para homogeneizar durante 2 minutos con el vortex, posteriormente se añadió 0,2 mL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, este es un detergente aniónico que actúa rompiendo enlaces no covalentes en las proteínas, desnaturalizándolas, perdiendo su conformación nativa, una vez completada la digestión, se añadió 1 ml de cloruro de sodio (NaCl) saturado (aproximadamente 7 M) a cada tubo y se mezcló vigorosamente durante 10 minutos posteriormente se centrifugo a 11500 rpm durante 20 minutos para la precipitación de las proteínas, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN. El sobre nadante se transfirió a un tubo nuevo y posteriormente se adiciono disolventes orgánicos que fueron cloroformo y alcohol isoamílico relación 3:1 para realizar la extracción de proteínas y los lípidos, las fases fueron separadas por centrifugación 14000 rpm

durante 20 minutos, lo que permite aislar al ADN, contenido en la fase acuosa que se transfirió a un tubo nuevo.

- (3) La precipitación del DNA se realizó con la adición de Etanol Absoluto. Posteriormente se centrifugo a 14000rpm durante 20 min, se desechó el sobrenadante y se realizó un lavado con etanol al 70% centrifugándolo 14,000 rpm durante 15 min, se eliminó el excedente de etanol con vacío, la muestra de DNA se rehidrato con agua estéril. (Miller, Dykes, & Polesky, 1988)

9.3 Análisis cualitativo y cuantitativo de DNA

Para realizar el análisis cualitativo y evaluar la pureza de DNA se determinó la concentración de la muestra mediante espectrofotometría, realizada en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific TM), de espectro UV-Vis completo que se utilizó realiza mediciones para cuantificar DNA, RNA, proteínas para cuantificar y evaluar la pureza del ADN, ARN, proteínas. Se midieron las absorbancias a longitudes de onda de 260 y 280 nm (y se estableció la relación 260/280, respectivamente) en las muestras de DNA extraído, proporcionándonos la concentración.

El cociente de absorbancia (DO_{260/280}) proporciona un estimado de la pureza del DNA. Un valor entre el rango de 1.8 a 2 es 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. Una segunda valoración de la pureza de los ácidos nucleicos en la proporción 260/230 y los valores aceptados están en el rango 2.0 a 2.2, si es menor existe la presencia de contaminante como carbohidratos o fenol.

Para saber la integridad del DNA se utilizó la electroforesis en gel de agarosa al 1%, la cual, está basada en el hecho de que el DNA está cargado negativamente y se moverá en respuesta a un campo eléctrico, si el ADN está integro, se debe observar una banda de alto peso molecular. Si está degradado, se observará un barrido o bandas en la parte inferior (*Figura 1*) (Sedivy Haley, Tamber, & Hancock, 2004) (Ghatak, Muthukamaram, & Nachimuthu, 2013)

9.4 Amplificación de los 4 Exones de *CHCHD10*

Por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una tecnología molecular que permite amplificar secuencias específicas de DNA, esta técnica se empleó para analizar los 4 Exones que constituyen al gen de interés. Su nombre deriva de uno de sus componentes claves, la DNA polimerasa, la cual se utiliza para amplificar una región de DNA *in vitro* por medio de dicha enzima (Saeed & Ahmad, 2013 (Bolivar, Rojas, & Garcia Lugo, 2014)

La amplificación de los Exones se realizó utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 2 y la mezcla de reacción que contenía los siguientes reactivos descritos en la tabla 1.

Tabla 1 Reactivos utilizados para la amplificación de los exones, y las cantidades utilizadas.

Amplificación de Exones del gen <i>CHCHD10</i>	
Reactivos	Cantidad
HotStarTaq DNA Polimerasa 10X	11.5 µL
Oligonucleótido Forward	1.0 µL
Oligonucleótido Reverse	1.0 µL
DNA (100 ng/µL.)	2.0 µL
Vol. Final	20

*Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los exones del gen *CHCHD10*, y el tamaño de producto esperados.*

Oligonucleótidos Utilizados para cada exón del gen <i>CHCHD10</i>			
Exón	Secuencia del Oligonucleótido Forward	Secuencia de Oligonucleótido Reverse	Tamaño de producto
1	3' TTT TTG CGC CGG CTG TG '5	3' AGC AGG CAA GGT CAC TCT '5	225pb
2	3' TGG GGT CTG GCC AGG ATT AAC '5	3' GCA ATG GTG AAT ACA CGC GG '5	367pb
3 y 4	3' GAA ACA TGC TGT CTG TAG CCG '5	3' CTG TGG GGT GAG AAA CCT CC '5	564pb

Esta mezcla se sometió al programa de ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis del ADN figura 4 para exón 1, 3 y 4 y figura 5 para el exón 2.

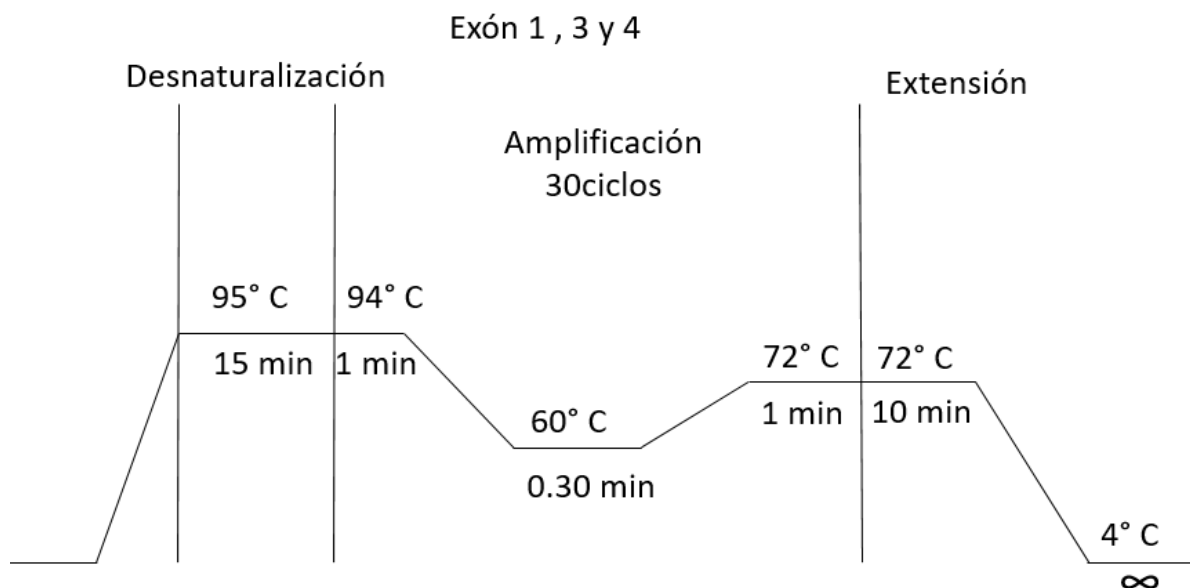


Figura 4: Programa de PCR para la amplificación de los Exones 1, 3 y 4 del gen CHCHD10, mostrando las temperaturas de desnaturalización alineamiento y extensión, esta reacción tiene 30 ciclos para poder terminar su proceso.

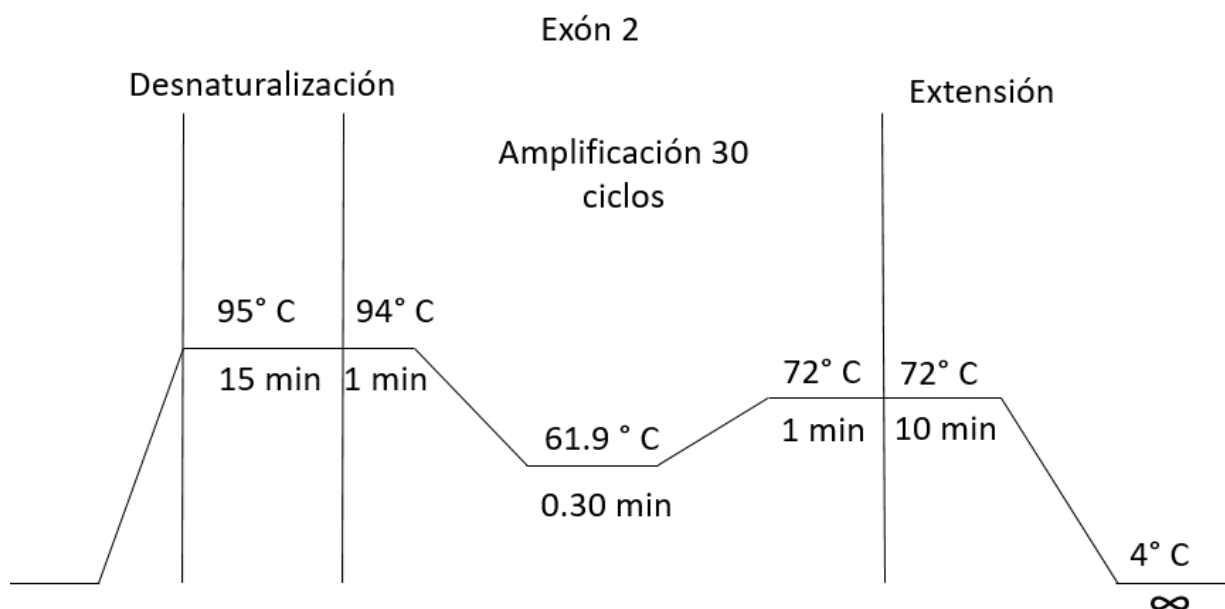


Figura 5: Programa de PCR para la amplificación del exón 2 del gen CHCHD10, mostrando las temperaturas de desnaturalización alineamiento y extensión, esta reacción tiene 30 ciclos para poder terminar su proceso., a diferencia del programa mostrado en la figura 1, la temperatura de alineamiento varía de 60°C a 61.9°C.

Se obtendrán fragmentos de diferente tamaño de acuerdo con cada exón como se muestra en la tabla 1, la mezcla de reacción se llevará a cabo en el termociclador Axygen, y los fragmentos amplificados serán resueltos con geles de agarosa al 2 % como se ha descrito anteriormente mediante una electroforesis.

9.5 Purificación de PCR

Los productos amplificados se purificaron de acuerdo a las condiciones establecidas por el proveedor, mediante el kit de purificación de PCR QIAquick el cual consiste en adicionar 5 volúmenes de buffer Pb por un volumen de reacción de PCR (ejemplo $30\ \mu\text{L} \times 5 = 150\ \mu\text{L}$) previamente se verifico el color de la solución del buffer PB que fuera de color amarillo, en caso de que el color sea naranja violeta se adiciono $10\ \mu\text{L}$. de acetato de sodio 3 M y se mezcló para tener un pH 7.5 se centrifugo a 13000 rpm durante 2 min, se desechó el sobrenadante del tubo colector y la columna se colocó nuevamente sobre el tubo colector en un tubo colector. Se añadió $750\ \mu\text{L}$. de buffer PE a la columna, durante el primer paso de la adición del buffer PB aquellas impurezas no deseadas, como sales, enzimas, aceites y detergentes no se adhieren a la columna. Las sales son lavadas por el etanol que posee el Buffer PE. Cualquier residuo de este buffer que pueda interferir con otras reacciones enzimáticas, es removido en el paso de centrifugación que fue de 1 min. a 13,000 rpm, retiramos el desecho de la centrifugación y se realizó nuevamente otro centrifugado, desechamos y cambiamos de a un tubo colector de 1.5 mL. Se adiciono H_2O libre de nucleasas, se centrifugo nuevamente a 13000 rpm durante 1 min y el producto de PCR eludido de la columna se colecta en un microtubo, posteriormente se realizó una electroforesis para analizar el producto de PCR purificado.

9.6 Secuenciación tipo sanger

Se realizó la reacción de secuenciación tipo sanger siendo este el método dideoxoxi o secuenciación por terminación de la cadena, este es un método enzimático se basa en determinar la secuencia de una cadena de DNA a medida que se sintetiza su hebra complementaria, esto requiere de ADN de cadena sencilla que actúa como molde, un cebador para iniciar la síntesis de ADN, los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato

(dATP, dGTP, dCTP y dTTP), enzima ADN-polimerasa y los cuatro didesoxirribonucleótidos trifosfato (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) que son incorporados por la ADN polimerasa para sintetizar la nueva hebra pero, una vez incorporados, impiden la adición de nuevos nucleótidos, cada uno de los cuatro ddNTP están marcados con fluoróforos diferentes y estos emiten la luz con una longitud de onda característica que permite sean identificados. La reacción se realizó utilizando el kit de secuenciación BigDye® Terminator v3.1; de acuerdo con la mezcla de los siguientes reactivos como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 Reactivos utilizados para la amplificación de los exones, y las cantidades utilizadas.

Reactivos para La secuenciación	
Reactivos	Cantidades.
BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	4 µL
Oligonucleótido Forward	2 µL
Producto PCR	2 µL
H ₂ O Libre de libre de nucleasas	12 µL
Vol. Total	20 µL

Esta mezcla se sometió al programa de ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento (Figura 6), una vez terminado el proceso de la PCR de secuenciación, esta será purificada por una columna con sephadex G-50 que es una resina de filtración en gel que permite eliminar contaminantes y desala, esta purificación se realizó mediante una centrifugación a 3000rpm durante 3 minutos, esto permite la separación grupal de biomoléculas que están por encima del límite de exclusión del medio de contaminantes como sales, colorantes y marcas radiactivas o nucleótidos no incorporados. La reacción de secuenciación se realiza mediante electroforesis capilar en el secuenciador, ABI3130, (Applied Biosystem). Los fragmentos de distintos tamaños llegan al final del capilar, donde son excitados con un láser y se detecta la fluorescencia emitida por el ddNTP terminal. El color de esta fluorescencia determina de qué nucleótido se trata. El gráfico resultante se denomina electroferograma, en el que se observan picos de diversos colores. Cada color indica qué nucleótido ocupa cada posición en la molécula de ADN o,

lo que es lo mismo, su secuencia. Los electroferogramas que resulten se analizarán empleando el software *Sequencing analysing V5.3* y *Sequencher*.

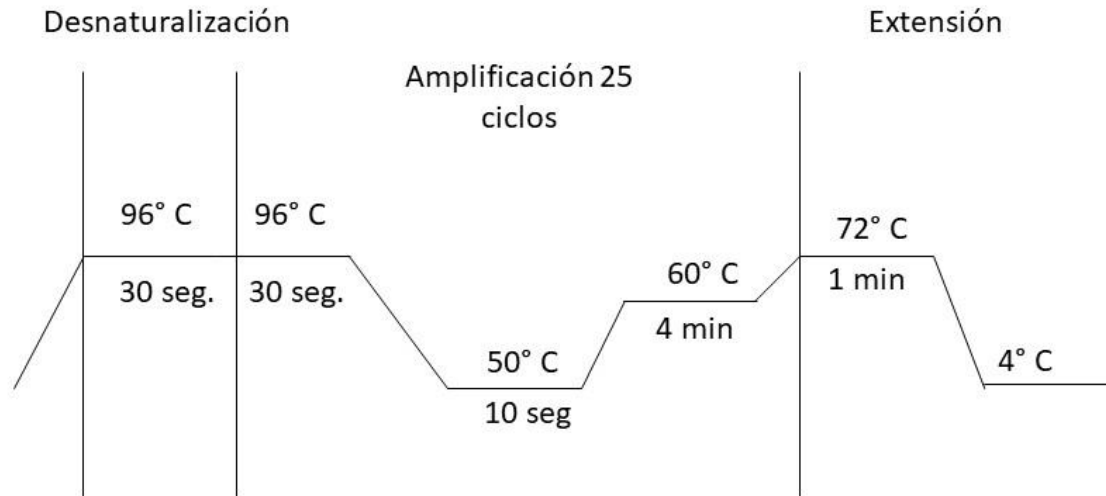


Figura 6: Programa de PCR para secuenciación de los Exones del gen *CHCHD10*, mostrando las temperaturas de desnaturalización alineamiento y extensión, esta reacción tiene 25 ciclos para poder terminar su proceso.

10 Actividades realizadas

Se realizó la extracción de DNA genómico de 100 muestras de pacientes con ELA. En todos los casos se llevó a cabo un análisis cualitativo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y un análisis cuantitativo mediante la cuantificación y determinación de la pureza del DNA en el espectrofotómetro UV-Vis *NanoDrop 2000 ThermoScientific®*.

Se realizó la amplificación del gen *CHCHD10* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para realizar después la secuenciación tipo Sanger de los Exones que lo conforman mediante el kit *BigDye® Terminator v3.1*. Los electroferogramas resultantes fueron analizados mediante software *Sequencing analysing V5.3* y *Sequencher*.

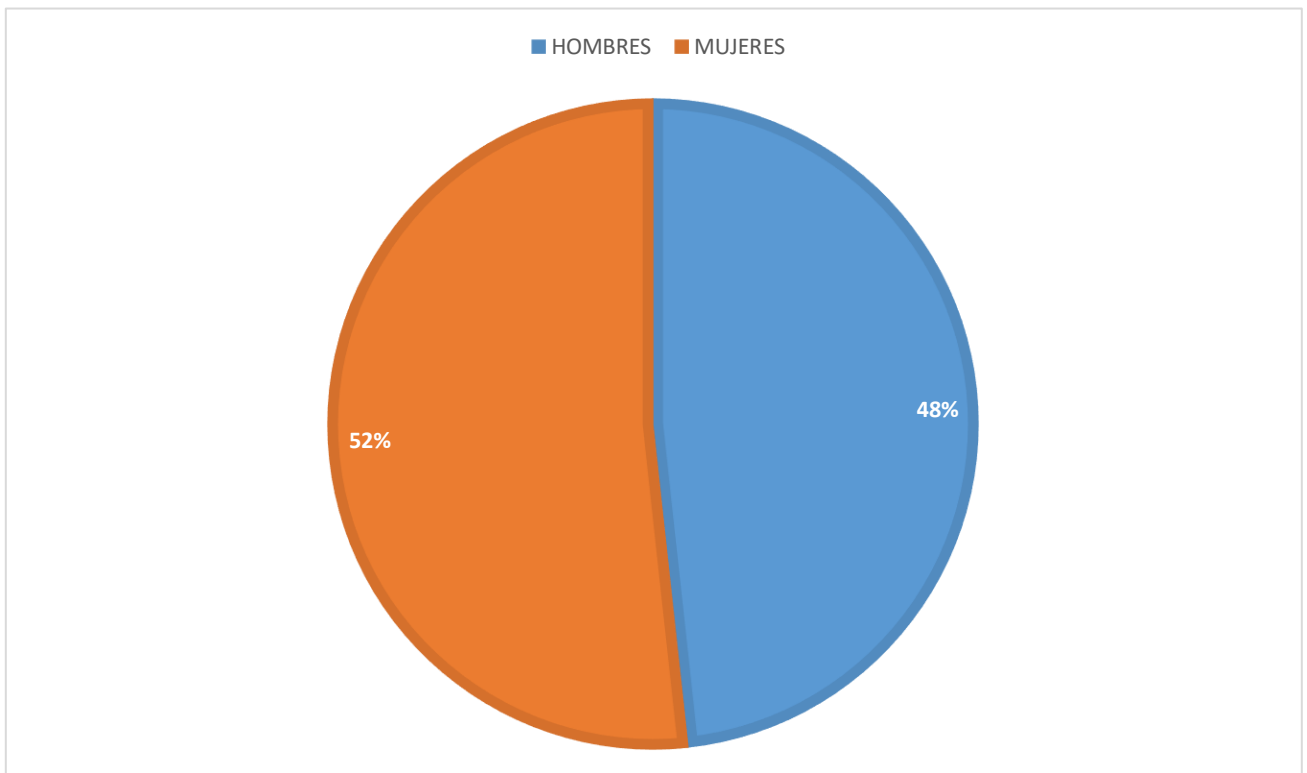
11 Metas y objetivos alcanzados

- Se seleccionaron 100 muestras de pacientes con ELA que cumplieran los criterios de pureza, concentración e integridad.
- Se amplificó los 4 exones el gen *CHCHD10*.

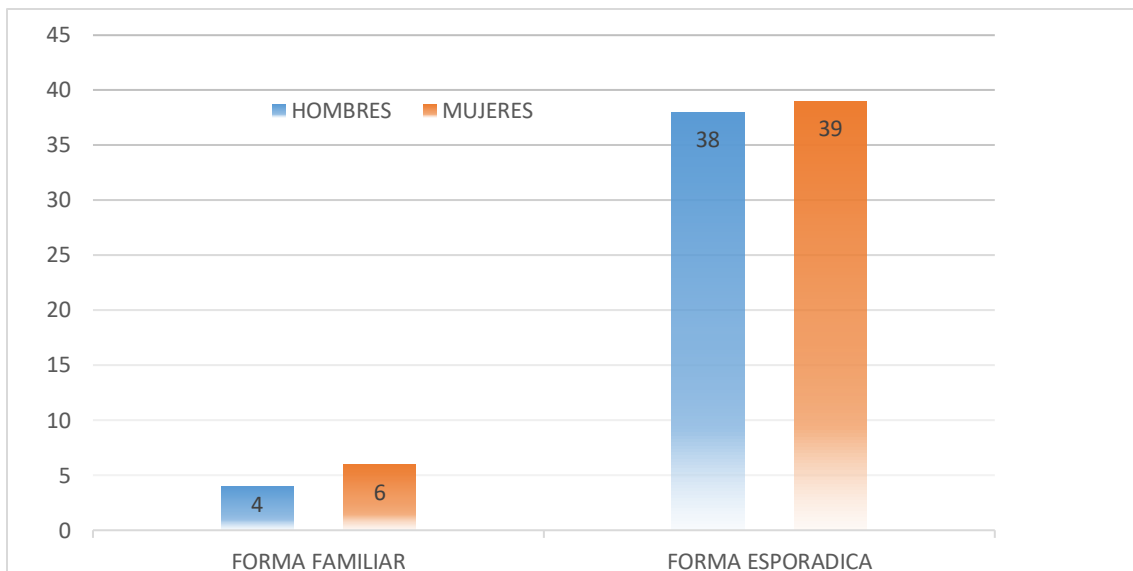
- Se realizó la secuenciación tipo Sanger a los exones del gen.
- Se identificaron las variantes del gen mediante software bioinformáticos.

12 Resultados

En el estudio participaron un total de 100 pacientes, 52 mujeres (52%) y 48 hombres (48%) (figura 7), provenientes de diferentes estados de la república mexicana, considerándose al INNNMVS uno de los principales centros dedicados al estudio de las ciencias neurológicas. El rango de edad de inicio de la enfermedad oscilo dentro de los 17 a los 79 años con una media en los 48 años para ambos grupos hombres como para mujeres, de estos pacientes estudiados, 10 de ellos presentaban ELA familiar (4 hombres y 6 mujeres) y 77 (38 hombres y 39 mujeres) presentaron ELA esporádica (figura 8).



Grafica 1: Es una gráfica tipo pastel mostrando el porcentaje de los 85 pacientes estudiados, siendo mayoritario el número de mujeres con un 55% en este estudio.



Grafica 2: muestra el grupo de pacientes tanto en hombres como en mujeres que presentaron ELA de forma familiar y ELA de forma esporádica. Predominando los casos esporádicos.

Al realizar el análisis bioinformático de los electroferogramas provenientes de secuenciación tipo Sanger se encontraron variantes exónicas e intrónicas en 3 de los 4 Exones amplificados como se muestra en la Tabla 4, la primera variante localizada fue en la región intrónica entre el exón 1 y 2, se localizó en 3 de los 87 pacientes estudiados, se encontró en forma heterocigoto Figura 7, y como es una variante intrónica se realizó un análisis en diferentes bases de datos como *Human Splicing Finder* y *Ensembl* y se mostró que no afecta sitio de splicing (corte y empalme de Exones) y probablemente no se vea reflejado en el fenotipo, el resto de los pacientes analizados para este exón no presentaron ninguna variante en su secuencia.

Tabla 4: variantes encontradas dentro del gen CHCHD10, cambio, proteína implicada exón de la variante y el tipo de variante localizada.

VARIANTE	CAMBIO	PROTEÍNA	EXÓN	TIPO DE VARIANTE
rs62241575	c.41+46T>G	INTRONICA	1	Intrónica
rs179468	c.48A>C	p.Pro16=	2	Sinónima
rs131444	c.261+11A>G	INTRONICA	2	Intrónica
rs111677724	c.286C>A	p.Pro96Thr	3	Missense
rs9153	c.312C>T	p.Tyr104=	3	Sinónima
rs140182	G>C	INTRONICA	3	Intrónica

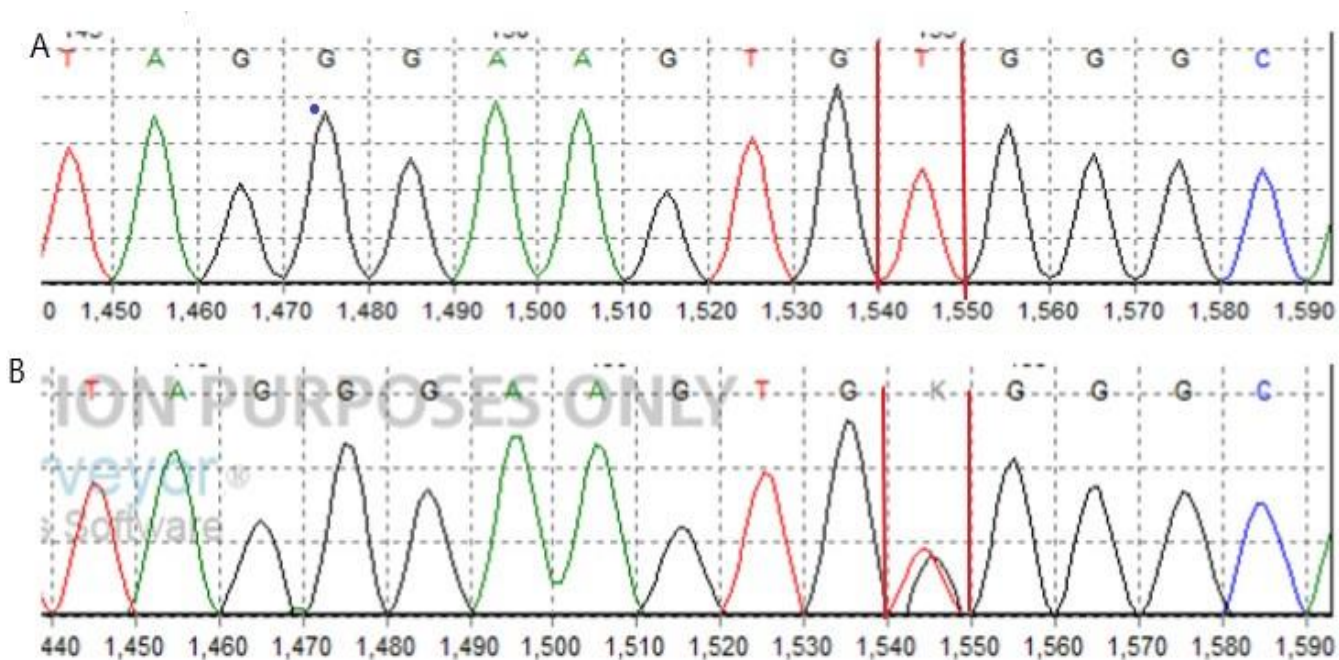


figura 7: Electroferogramas de la variante intrónica entre el exón 1 y 2 del gen CHCHD10 con rs62241575, muestra un cambio de T>G en forma heterocigoto, el electroferograma A es la secuencia original y el cambio se ve en el electroferograma B

Posteriormente identificó una variante en el exón 2 en la posición c.48A>C (figura 8), y corresponde a una variante silenciosa o sinónima ya que el cambio mostrado en el codón da lugar al mismo aminoácido, por lo que no afecta a la proteína, se identificó en 69 (79.3%) de los pacientes estudiados, el resto de los pacientes 18 (20.7%) no presento esta variante. 8 pacientes de los que presentaron la variante fue en forma heterocigoto y 61 pacientes fue de forma homocigota, se realizó análisis en diferentes bases de datos, y esta variante es considerada variación en un solo nucleótido por sus siglas en ingles (SNV) sinónima y esta no provoca un cambio en el aminoácido. Las variantes sinónimas pueden afectar la transcripción, el splicing, el transporte del mRNA, y la traducción, cualquier cambio en estos procesos pueden alterar el fenotipo.

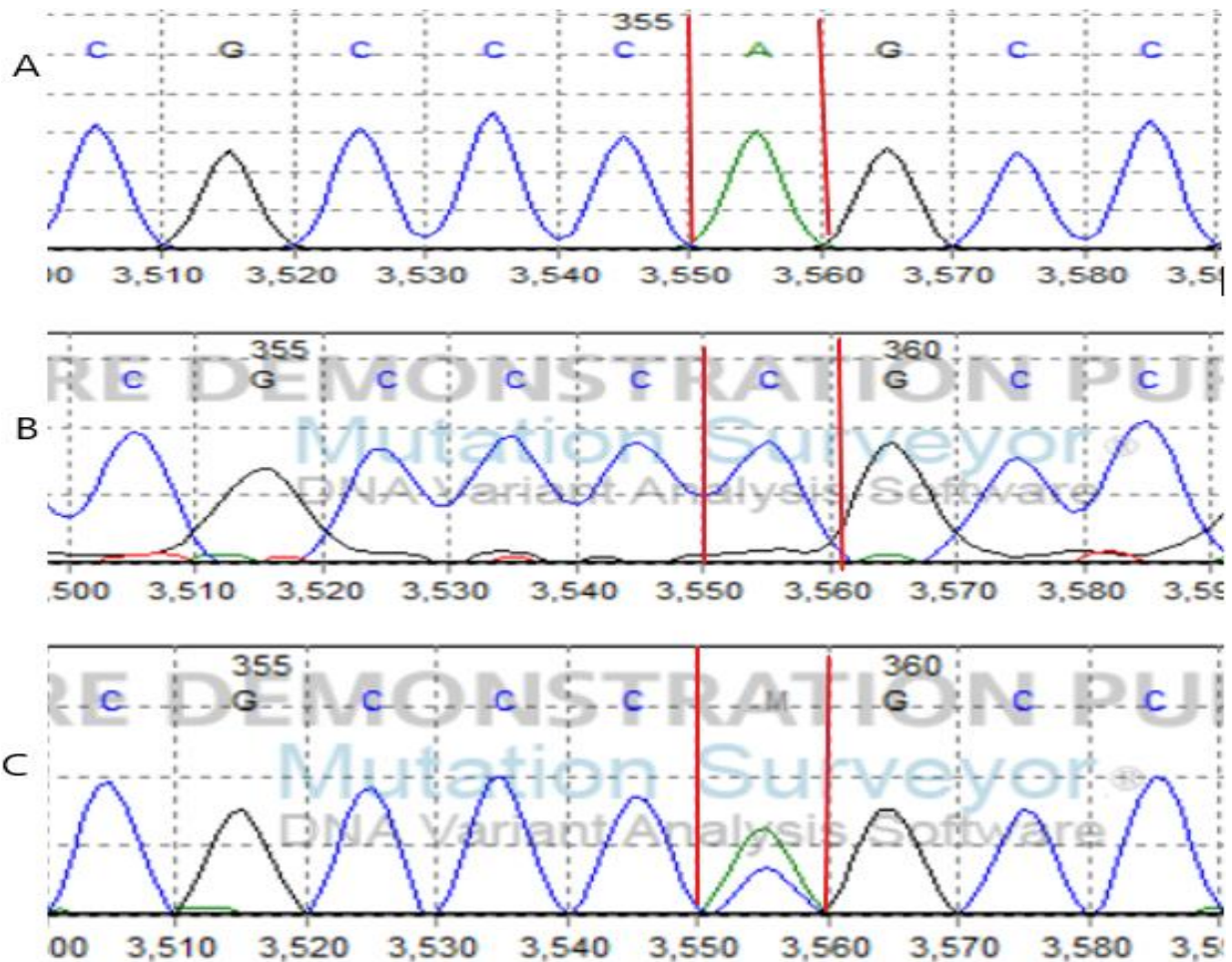


Figura 8: Electroferograma de la variante rs179468, la figura (A) nos presenta la cadena original del exón 2 del gen CHCHD10, se logra observar un cambio de un solo nucleótido en la figura (B) de forma homocigota siendo está el cambio de adenina por citosina, y en la figura (C) se muestra la misma variante, pero en forma heterocigoto.

Al término del exón 2 se localizó otra variante en la región intrónica ubicada en la posición c.261+11A>G (figura 9), el análisis de esta variante fue realizado en diversas bases de datos y muestran que no afecta al sitio de empalme del gen, por lo tanto, no tiene aparentemente implicaciones en el fenotipo estudiado, sin embargo esta variante la presentaron 72 pacientes (83.9%) de estos pacientes solo el 9.72% la presento de forma heterocigoto y el 90.28% restante fue en forma homocigota, cabe señalar que 63 pacientes que tuvieron presentaron la variante tanto de forma de forma heterocigoto como homocigoto, también portaban la variante p.Pro16= de forma heterocigoto, los restantes 9 pacientes no presentaron alteraciones en la secuencia de este exón.

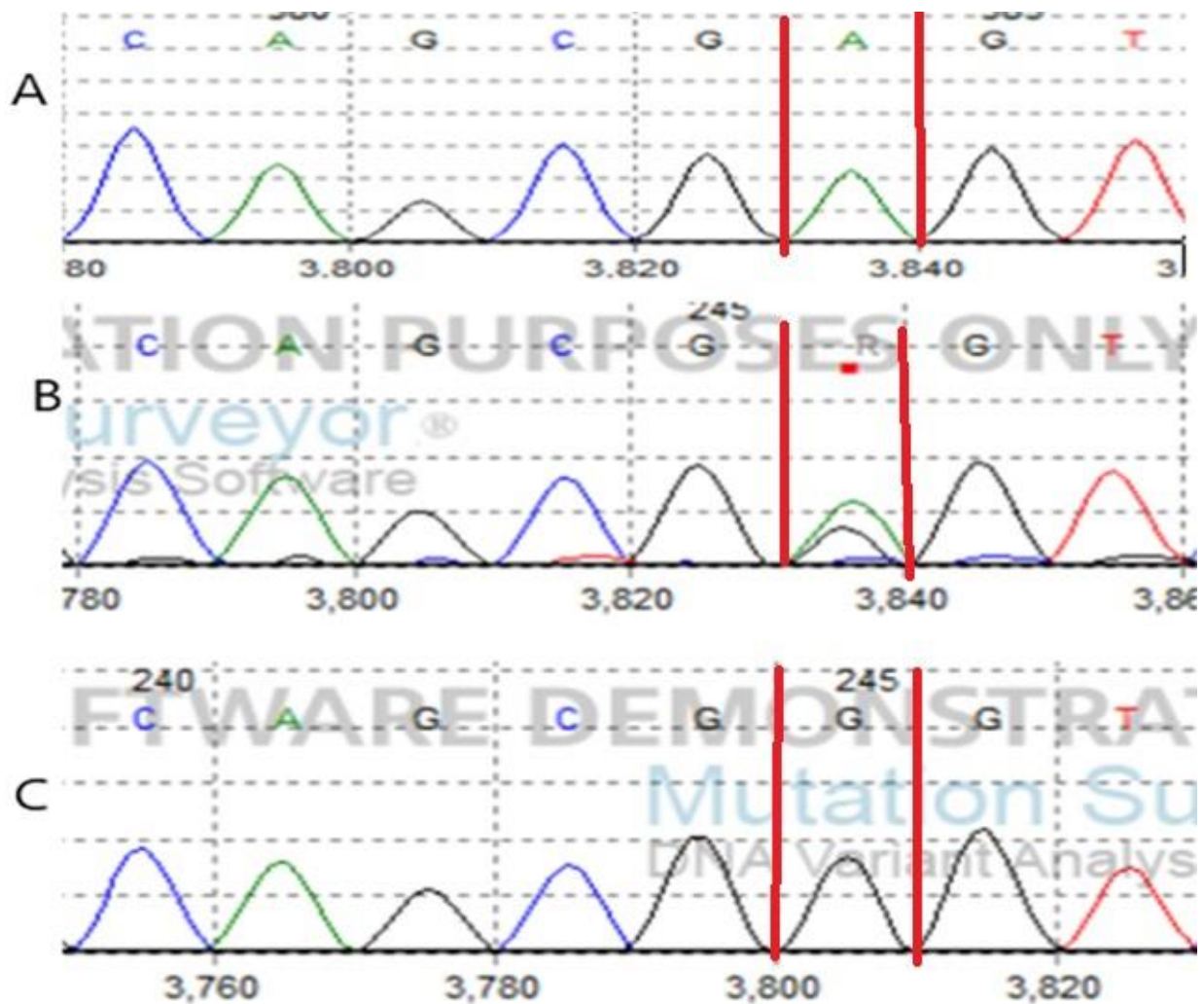


Figura 9: Electroferograma de la variante rs131444, la figura (A) nos presenta la cadena original de la región intrónica entre el exón 2 y 3 del gen CHCHD10, se logra observar un cambio de un solo nucleótido en la figura (B) de forma heterocigoto siendo está el cambio de adenina por guanina, y en la figura (C) se muestra la misma variante, pero en forma homocigoto.

El análisis del exón 3, permitió la identificación de 3 variantes, la primer variante en la posición c.286C>A p.Pro96T(figura 10), debido al cambio de una Citosina por Adenina, se trata de una variante con cambio de sentido, o de sentido erróneo (del inglés *missense mutation*), es un tipo de variante puntual no sinónima en la cual el cambio en un nucleótido, provoca la aparición de un codón que codifica para un aminoácido diferente, una prolina por una treonina, esta variante fue encontrada en solo un paciente de los 75 analizados.

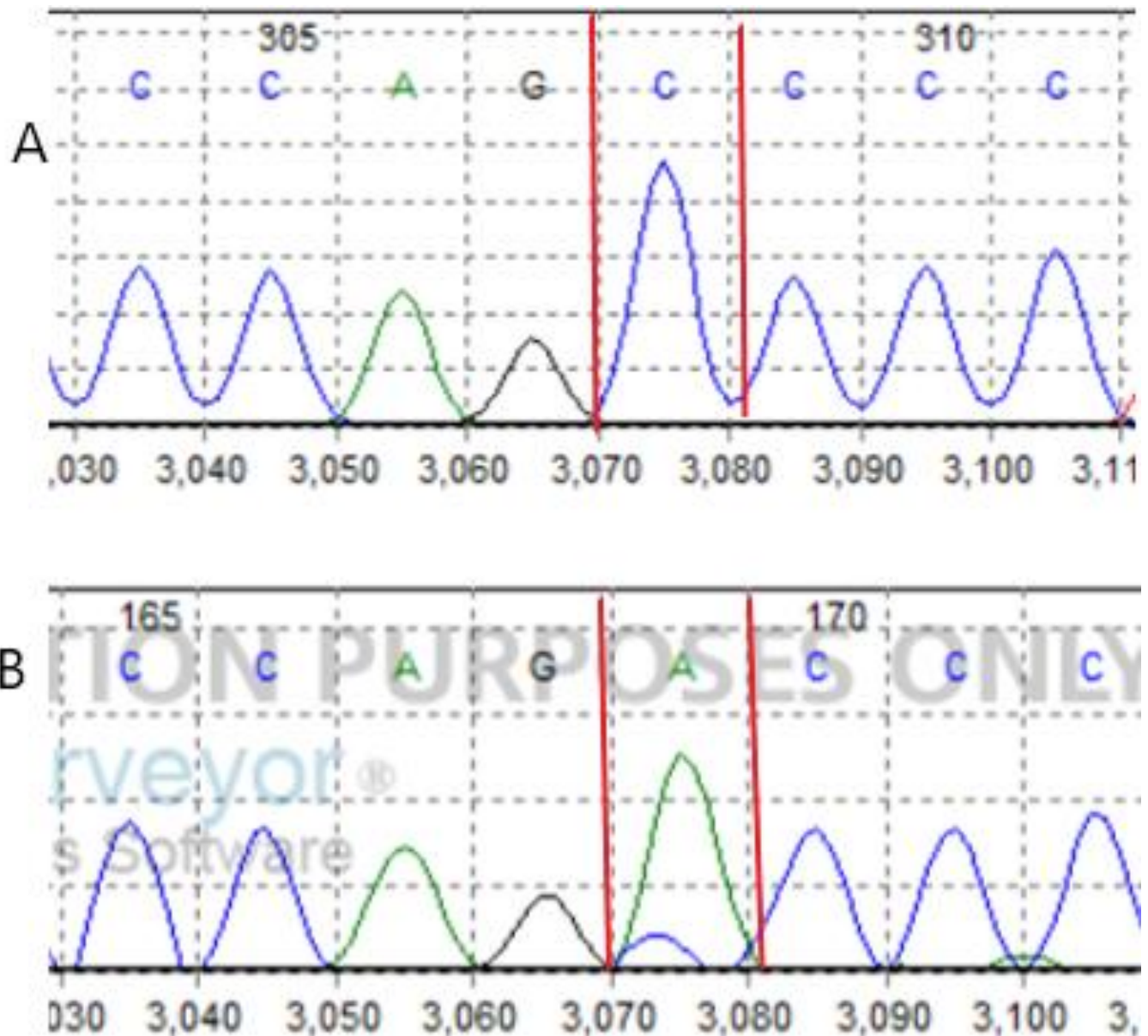


Figura 10: El electroferograma de la variante puntual con rs111677724, muestra el cambio de una citosina por una adenina dentro del exón 3 del gen CHCHD10, en la figura A se muestra el electroferograma de la cadena original del gel y la figura B se muestra la cadena con la variante reportada en forma homocigota.

Al continuar con el análisis se encontró una variante más en la posición c.312C>T (figura 11), lo reportado en las bases de datos muestran que es un posible codón de termino prematuro, esta variante fue presentada por 84 pacientes de las cuales 13 la presentaron en forma heterocigoto y 74 en forma homocigota.

La última variante localizada fue en la región intrónica del exón 3 y 4 (figura 12), el análisis de electroferogramas mostró 13 pacientes que portaban la variante en forma

heterocigoto y 74 en forma homocigota el análisis de las bases de datos arroja que no tiene implicación en el sitio de splicing, esta variante además se acompañó de la variante p.Tyr104= (rs 9513), en todos los casos de la misma forma exón y solo 3 pacientes no mostraron cambios en su secuencia en este exón analizado.

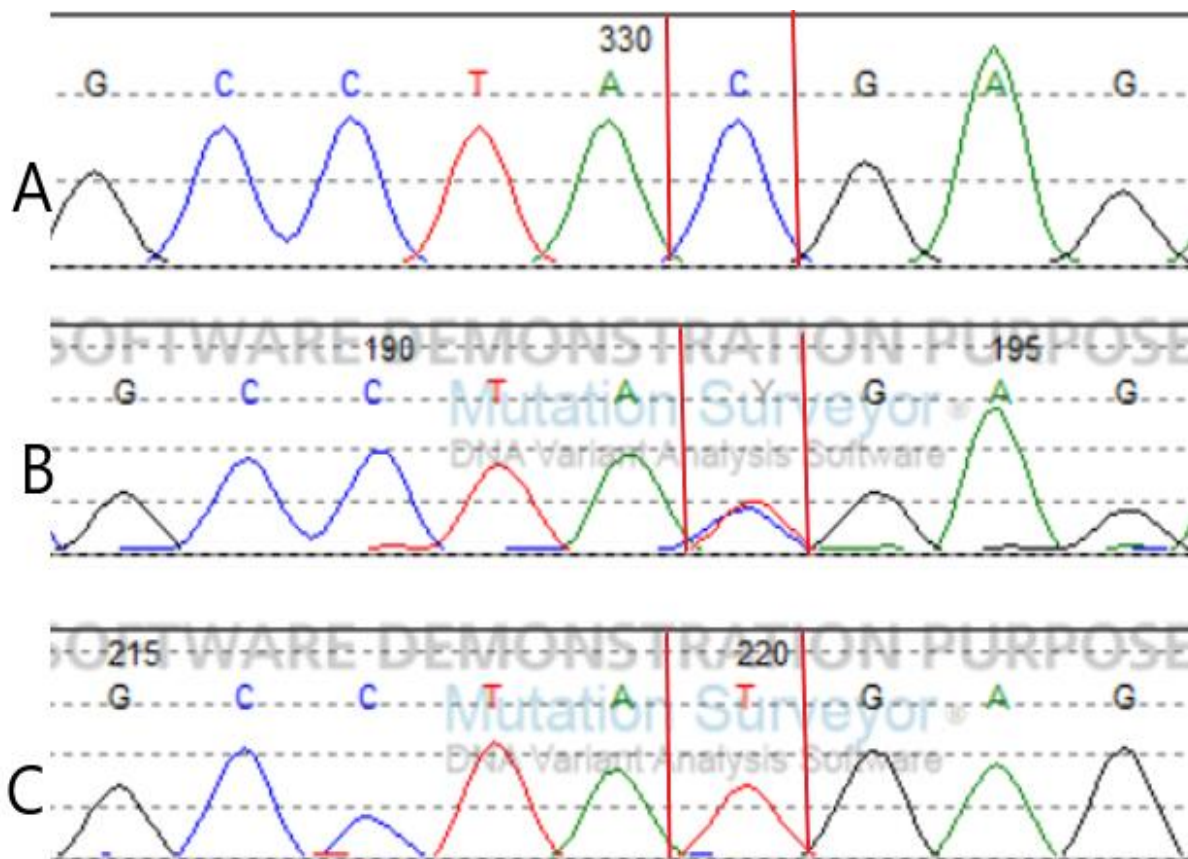


Figura 11: electroferograma de la variante con rs9153 mostrando un cambio puntual, en la figura A se muestra la cadena original de una parte del exón 3 del gen CHCHD10, la figura B muestra el cambio de citocina por timina de forma heterocigoto y la figura C muestra el mismo cambio, pero de forma homocigota.

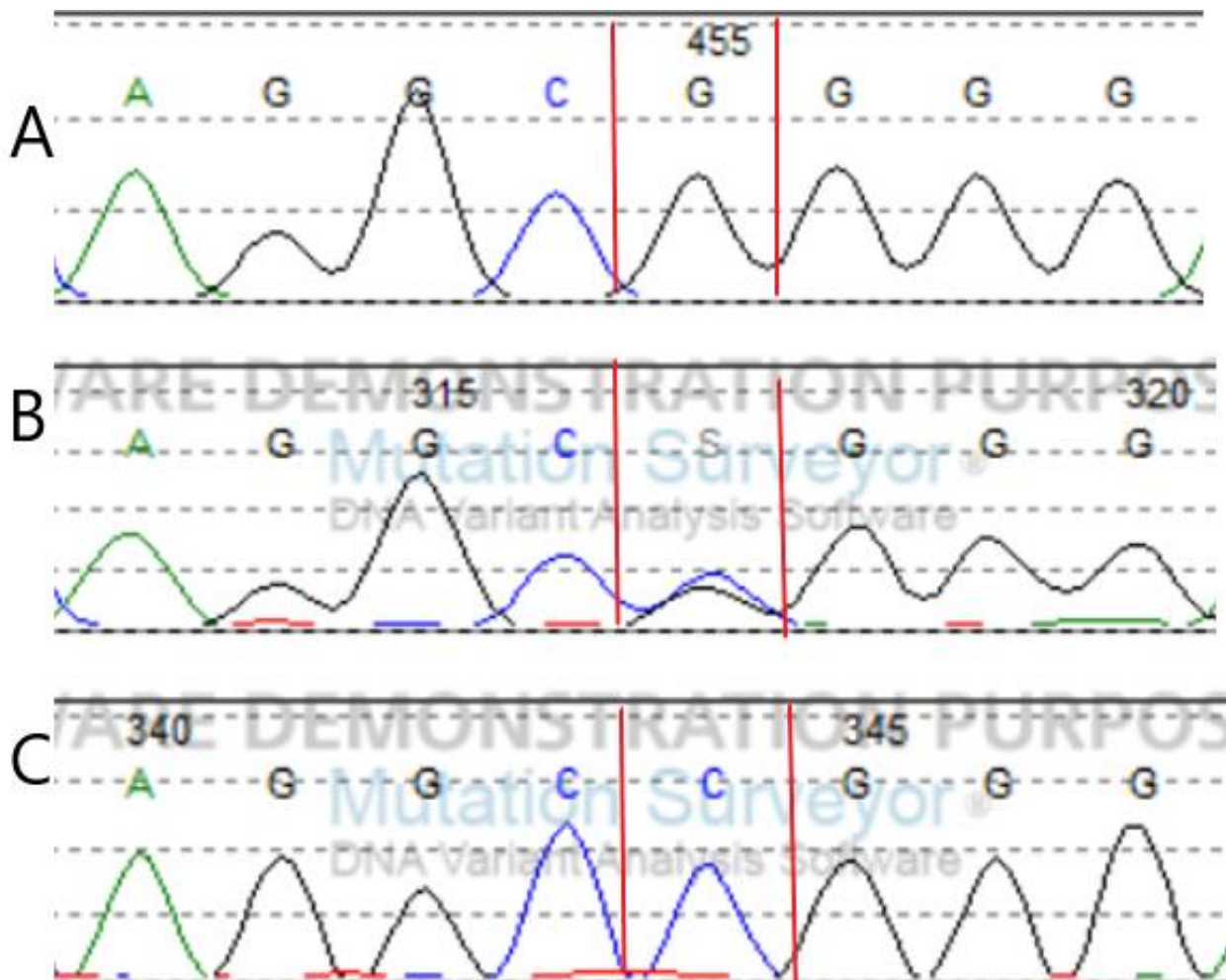


Figura 12: Electroferograma de la variante con rs140182 ubicada en el intrón 3 y 4 del gen CHCHD10 es el cambio de una guanina por una citocina, en la figura A muestra una parte de la cadena original del gen, la figura B muestra la variante de forma heterocigoto y la figura C la muestra de forma homocigota.

Para el exón 4 no se encontraron variantes y el análisis resulto negativo para todos los pacientes analizados.

13 Discusión.

El riesgo general de ELA mostrado por Matthew Kiernan y colaboradores en 2011, señalan que existe una mayor incidencia en hombres que en mujeres, mostrando que su edad de inicio es de 58 a 63 años para la enfermedad esporádica y de 47 a 52 años para la enfermedad familiar, en nuestros resultados, la edad promedio de inicio para ambas formas de presentación de ELA fue a la edad de 49 años tanto para hombres como para

las mujeres. Al realizar la selección de los pacientes MM con posible ELA para el análisis molecular de los 4 Exones del gen *CHCHD10* se observa que existe una mayor incidencia en personas de sexo femenino con un 54%, comparando con los resultados de Matthew Kiernan que señala que la mayor incidencia es con personas del sexo masculino. (Kiernan, et.al., 2011)

La mitocondria funge una función principal para los procesos biológicos al aportar la energía suficiente para la célula. Posterior a los descubrimientos en el 2014 por Bannwarth y colaboradores, en una familia encontraron las variantes sin sentido heterocigótica (c.176C>T, p.Ser59Leu) en el exón 2 de *CHCHD10* como responsables de los cambios morfológicos mitocondriales y de la alteración de mecanismos fisiológicos como la producción de energía, la activación apoptótica, la homeostasis del calcio y el transporte axonal de las mitocondrias presentes en las neuronas motoras, principales células que afectan en la ELA. (Bannwarth, y otros, 2014)

Las variantes encontradas en este estudio dentro del exón 1 solo fue encontrada una con un rs62241575 que muestra un cambio ubicado en c.46+49T>G, por ser una variante en la región intrónica se realizó un análisis bioinformático empleando el programa Human Splicing, el cual nos mostró que no tiene implicación en el sitio de empalme indicando que esta variante no altera el ADN ni la formación proteica. (Human Splicing Finder, 2019)

Posterior al análisis en el exón 2 fueron localizadas dos variantes de un solo nucleótido una con un rs179468 en la posición c.48A>C, este cambio fue encontrado por Xiaoxia Zhou y cols. en el 2018 en un estudio realizado a pacientes chinos con la enfermedad de Parkinson, ellos muestran que esta variante benigna para la enfermedad, dentro de su estudio se confirmó un papel significativo del gen *CHCHD10* para el espectro ELA-DFT, específicamente en los mecanismos patogénicos subyacentes a la ELA, como la variante p. P23 (g.877C). (Zhou, y otros, 2018). En el año 2021 un estudio de Éanna B Ryan y colaboradores, realizaron la identificación en ratones transgénicos variantes del gen *CHCHD10*, lograron introducir mediante mutagenesis dirigida las variante p.R15L y

rs179468 en la posición c.48A>C, la variante pR15L, es la variante patogénica, la cual disminuyó la esperanza de vida de los ratones transgénicos, en comparación con los ratones sanos, mientras que la variante rs179468 es un SNV sinónimo que no influye para la patogenicidad del espectro. (Ryan, 2021)

Al realizar una búsqueda en una base de datos (National Center for Biotechnology Information, 2024), se localizó esta variante, pero sin significancias clínicas, indicando que es probablemente benigna. Para las variantes de C/A dentro del exón 2, rs9153 cambio de C/T dentro del exón 3, rs179468 cambio de C/A dentro del exón 2 y rs183564385 cambio de A/G en el intrón por parte de Shen y colaboradores en el 2017 realizaron un estudio en pacientes Chinos con ELA, encontraron esas mismas variantes de un solo nucleótido concluyendo que esas variantes sean probablemente benignas, de igual manera se mostró una patogenia similar con la variante p. P23 (g.877C), (Shen, He, Tang, Zhang, & Fan, 2017). Dentro de este exón también fue localizada una variante intrónica con un rs131444 y un cambio en la posición c.261+11A>G al revisarla en la base de datos (National Center for Biotechnology Information, 2024) nos indica ser probablemente benigna, por lo tanto, parece no tener implicaciones en el fenotipo.

En el exón 3 se encontraron 3 variantes la primera es una variante missense ubicada en c.286C>A que ocasiona el cambio del aminoácido Pro en el codón 96 por Thr en la proteína (p.Pro96Thr), esta variante fue localizada en un estudio en pacientes realizado por proyecto MinE Consorcio de secuenciación de ELA, los cuales secuenciaron 4365 pacientes con ELA secuenciados en su genoma completo y 1832 controles de 7 países diferentes (Bélgica, Irlanda, Países Bajos, Reino Unido, Estados Unidos de América, España y Turquía) y examinamos todas las variantes de un solo nucleótido (SNV) no sinónimas en el gen *CHCHD10*, mostrando que es la única variante encontrada en forma homocigótica en 3 de cada 5 casos. Se mostró que dada su alta frecuencia en la población africana señalan que esta variante no sea de alta probabilidad patogénica. En otro estudio realizado a pacientes de origen Belga con el espectro ELA/DFT que fue realizado por Federica Perrone y colaboradores en el año 2017, mostraron que esta variante fue encontrada en una cohorte de 459 pacientes con DFT y en un solo paciente

con ELA de 429, esta variante también ha sido identificada en pacientes italiano por (Rubino y cols; 2018), en pacientes franceses (Teyssou y cols; 2016) y en españoles (Dols-Icardo;2015) mostrando que su patogenicidad es poco clara, ya que también fue encontrada en controles sanos analizados, por lo que no se podría considerar como un polimorfismo de riesgo, dentro de los pacientes analizados, solo se encontró esta variante en un solo paciente. Otra de las 3 variantes encontradas en este exón , fue la variante sinónima en la posición c.312C>T esta variante sinónima p.Tyr104=, de acuerdo a las bases de datos muestran también que da como resultado la presencia de un posible codón de termino prematuro, pero al ser un variante sinónima, codifica para el mismo aminoácido y es considerada benigna; la última variante con el rs140182 encontrada en la región intrónica del exón 3 y 4 es una variante sinónima y al realizar el análisis en la base de datos Human Splicing no se encontró alteraciones en el sitio de empalme, debido a que no genera cambios en el ADN, ni la secuencia de proteínas.

De e las 5 variantes 4 fueron encontradas en este estudio (rs131444, rs111677724, rs9153 y rs140182) estas fueron estas fueron reportadas previamente como variantes de un sólo nucleótido, pero en ninguna de las variantes se consideró patogénica, estas variantes fueron encontradas población china en estudios realizado por Ling Li, y colaboradores en el 2016, y Shen y colaboradores en 2017,

Cabe señalar que este estudio es el primero en reportar la heterogeneidad clínica de variantes específicas en *CHCHD10* en pacientes mexicanos con ELA y el posible nuevo “HubSpot” de variante para esta enfermedad. Estos hallazgos apoyan el papel de *CHCHD10* en el espectro de la ELA/DFT ya que las variantes en este gen siguen siendo en gran medida desconocida por su reciente asociación a ELA y a otras enfermedades a pesar de varios estudios que sugieren la importancia de incluir el estudio de las alteraciones mitocondriales en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas.

Los estudios de este gen han demostrado una gran relación con otras enfermedades neurodegenerativas como es ELA, Parkinson y miopatías entre otras. Las afectaciones en la mitocondria afectan de manera significativa a la célula, debido a que la función de

este organelo es de suma importancia tanto para el aporte de energía a la célula y poder realizar el transporte axonal de manera eficiente.

14 Conclusión

Se identificaron las variantes rs62241575, rs179468, rs131444, rs111677724, rs9153, rs140182 en el gen *CHCHD10* Siendo este el primer estudio del gen *CHCHD10* en pacientes mexicanos con ELA, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la ELA tiene un fenotipo complejo y refuerzan la idea de que las variantes en *CHCHD10* podrían causar una gama más amplia de presentaciones clínicas.

Este estudio tiene gran relevancia clínica ya que aporta resultados importantes para ampliar los estudios en los genes involucrados en el deterioro mitocondrial, para este y demás trastornos neurodegenerativos.

Es importante señalar que al tener la disponibilidad de tecnologías moleculares que desempeñan un papel importante en la patogénesis de ELA, se logre visualizar más la causa de la ELA y sus consecuencias, visualizando más a detalle los factores ambientales que desencadene para la aparición de la ELA, debido a que existe una fracción cada vez mayor de casos aparentemente de ELA esporádica. Para poder tener un mejor conocimiento y comprensión de la genética de la ELA, se podrán desarrollar terapias significativas para poder atenuar la expresión y la toxicidad de los genes afectados del espectro, enfocando la estratificación de desarrollar algunos ensayos terapéuticos basados en distinciones moleculares de los casos de ELA.

15 Bibliografía

- Abdelhak, A., Junker, A., Brettschneider, J., Kassubek, J., Ludolph, A. C., Otto, M., & Tumani, H. (2015). Brain-Specific Cytoskeletal Damage Markers in Cerebrospinal Fluid: Is There a Common Pattern between Amyotrophic Lateral Sclerosis and Primary Progressive Multiple Sclerosis? *Molecular Sciences*, 17565-17588.
- Amiotr^of^oa, F. E. (2018 de 05 de 28). *Fundacion Española para le fomento de la investigacion de la Esclerosis Lateral Amiotr^of^oica*. Obtenido de Fundacion Española para le fomento


- de la investigación de la Esclerosis Lateral Amiotrófica:
<http://www.fundela.es/ela/informacion-general/>
- Anderson, C. J., Bredvik, K., Burstein, S. R., Davis, C., Meadows, S. M., Dash, J., . . . Manfredi, G. (2019). ALS/FTD mutant CHCHD10 mice reveal a tissue-specific toxic gain-of-function and mitochondrial stress response. *Springer*, 103-121.
- Association, T. A. (05 de 06 de 2018). *The ALS Association*. Obtenido de The ALS Association: <http://www.alsa.org/>
- Bannwarth, S., Mkadem, S.-E., Chausseuot, A., Genin, E. C., Gervais, S. L., Fragaki, K., . . . Paquis-Flucklinger, V. (2014). A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain*, 2329–2345.
- Bhattacharya, R., Harvey, R. A., Abraham, K., Rosen, J., & Mehta, P. (2019). Amyotrophic lateral sclerosis among patients with a Medicare Advantage prescription drug plan; prevalence, survival and patient characteristics. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 251-259.
- Bin, J., Tingting, X., Lihua, H., Xiaohua, G., Yafang, Z., Lin, Z., . . . Lu, S. (2016). High prevalence of CHCHD10 mutation in patients with frontotemporal dementia from China. *Brain*, 1-4.
- Bolivar, A. M., Rojas, A., & Garcia Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 23-33.
- Cavallaro, G. (2010). Genome-wide analysis of eukaryotic twin CX9C proteins. *Molecular BioSystems*, 2459–2470.
- Chacon Cortes, D., & Griffiths, L. R. (2014). Methods for Extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, 1-9.
- Chia, R., Chiò, A., & Traynor, B. J. (2018). Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol*, 94-102.
- Chiò, A., Calvo, A., Mazzini, L., Cantello, R., Mora, G., Moglia, C., . . . Restagno, G. (2012). Extensive genetics of ALS A population-based study in Italy. *Neurology*, 1983-1989.
- Chiò, A., Logroscino, G., Traynor, B., Collins, J., Simeone, J., Goldstein, L., & White, L. (2013). Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review of the Published Literature. *Neuroepidemiology*, 118–130.
- De March, F., Franjkic, T., Schito, P., Russo, T., Nimac, J., Chami, A. A., . . . Munitic, I. (2023). Emerging Trends in the Field of Inflammation and Proteinopathy in ALS/FTD Spectrum Disorder. *Biomedicines*, 1599.
- Devall, M., Soanes, D. M., Smith, A. R., Dempster, E. L., Smith, R. G., Burrage, J., . . . Lunnon, K. (2023). Genome-wide characterization of mitochondrial DNA methylation in human brain. *Frontiers In Endocrinology*.
- Feldman, E. L. (2022). amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 1363-1380.
- Fundación Española para el Fomento de la Investigación de la Esclerosis Lateral Amiotrófica. (04 de 06 de 2018). Obtenido de Fundación Española para el Fomento de la Investigación de la Esclerosis Lateral Amiotrófica.: <https://www.fundela.es/>
- GENELIBS. (10 de 04 de 2019). Obtenido de GENELIBS: <https://www.genelibs.com/gen/command/search/gen/detail/HGNC:15559>

- Ghatak, S., Muthukamaran, R. B., & Nachimuthu, S. k. (2013). A Simple Method of Genomic DNA Extraction From Human Samples for PCR-RFLP Analisis. *Journal of Biomolecular Techniques*, 224-231.
- Human Splicing Finder. (02 de 06 de 2019). Obtenido de Human Splicing Finder: <http://www.umd.be/HSF/>
- Imai, Y., Meng, H., Fukushima, K. S., & Nobutaka, H. (2019). Twin CHCH Proteins, CHCHD2, and CHCHD10: Key Molecules of Parkinson's Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Frontotemporal Dementia. *International Journal of Molecular Sciences*, 1-14.
- Ingre, C., Roos, P. M., Piehl, F., Kame, F., & Fang, F. (2015). Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Epidemiology*, 181-193.
- Iridoy, M. O.-M.-I. (2018). Neuroanatomical Quantitative Proteomics Reveals Common Pathogenic Biological Routes between Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Frontotemporal Dementia (FTD). *International journal of molecular sciences*, 20-24.
- Keith, J. L. (2020). Neuropathologic description of CHCHD10 mutated amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology Genetics*, 394.
- Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., . . . Zoing, M. C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 942-955.
- Kinsley, L., & Siddique, T. (2001). Amyotrophic Lateral Sclerosis Overview. *Washington, seattle: University of Washington, Seattle*.
- Leblond, C. S., Kaneb, H. M., Dion, P. A., & Rouleau, G. A. (2014). Dissection of genetic factors associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*.
- Lillo, P., Matamala, J. M., Valenzuela, D., Verdugo, R., Castillo, J. L., Ibáñez, A., & Slachevsky, A. (2014). Manifestaciones neuropsiquiátricas y cognitivas en demencia frontotemporal y esclerosis lateral amiotrófica: dos polos de una entidad común. *Rev Med Chile*, 867-879.
- Ling Li, X., Shu, S., Guang Li, X., Liu, Q., Liu, F., Cui, B., . . . Zhang, X. (2016). CHCHD10 is not a frequent causative gene in Chinese ALS patients. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*.
- Marangi, G., & Traynor, B. J. (2015). Genetic causes of amyotrophic lateral sclerosis: new genetic analysis methodologies entailing new opportunities and challenges. *Brain Res.*, 75-93.
- Martínez, H. R., Escamilla Ocañas, C. E., Camara Lemarroy, C. R., González Garza, M. T., Tenorio Pedraza, J. M., & Hernández Torre, M. (2017). CSF concentrations of adipsin and adiponectin in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Belg.*, 879-883.
- Martínez, H., Escamilla Ocañas, C., Camara Lemarroy, C., González Garza, M., Moreno Cuevas, J., & García Sarreón, M. (2017). *Neurología*.
- Mehdi Ghasemi and Robert H. Brown, Jr. (2018). Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1-37.
- Mehta, P. R. (2023). Prevalencia de la esclerosis lateral amiotrófica en los Estados Unidos, 2018. *Taylor & Francis Group*, 702-708.
- Meijboom, K. E., & Brown, R. H. (2022). Approaches to Gene Modulation Therapy for ALS. *Neurotherapeutics*, 1159–1179.

- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*.
- National Center for Biotechnology Information. . (10 de 10 de 2024). Obtenido de ClinVar; [VCV001662819.7], : [tps://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV001662819.7](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV001662819.7)
- National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000379952.15], . (10 de 10 de 2024). Obtenido de National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000379952.15], : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000379952.15>
- Orsini, M., Bulle Oliveira, A., Nascimento, O. J., Melo Reis, C. H., Araujo Leite, M. A., Alves de Souza, J., . . . Smidt, B. (2015). Amyotrophic Lateral Sclerosis: New Perspectives and Update. *Neurol Int*, 39-47.
- Riva, N. D. (2024). Update on recent advances in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology*, 4693-4723.
- Robberecht, W., & Phillips, T. (2013). The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews*, 248-264.
- Ryan, É. B. (2021). Early death of ALS-linked CHCHD10-R15L transgenic mice with central nervous system, skeletal muscle, and cardiac pathology. *iScience* 24, 1-21.
- Saeed, K. B., & Ahmad, N. S. (2013). Real-Time Polymerase Chain Reaction: Applications in Diagnostic Microbiology. *International Journal of Medical Students*, 23-36.
- Sedivy Haley, k., Tamber, S., & Hancock, R. E. (2004). Electrophoresis and Blotting of DNA in. *NATURE ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, 1-6.
- Shammas, M. K. (2023). CHCHD10 mutations induce tissue-specific mitochondrial DNA deletions with a distinct signature. *Human molecular genetics*, 91-101.
- Shen, S., He, J., Tang, L., Zhang, N., & Fan, D. (2017). CHCHD10 mutations in patients with amyotrophic lateral sclerosis in mainland China. *Neurobiology of Aging*, 1-16.
- Sreedharan, J., & Brown, R. (2013). Amyotrophic Lateral sclerosis: Problems and prospects. *Annals of Neurology*, 309-316.
- Stroke, N. I. (15 de 07 de 2019). *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*. Obtenido de National Institute of Neurological Disorders and Stroke: <https://www.ninds.nih.gov/disorders/patient-caregiver-education/fact-sheets/amyotrophic-lateral-sclerosis-als-fact-sheet>
- Woo, J. A., Liu, T., Trotter, C., Fang, C. C., De Narvaez, E., LePochat, P., . . . Kang, D. K. (2017). Loss of Fuction CHCHD10 mutation incytoplasmatic RDP-43 acumulation and synaptic integrity and synaptic integrity. *Nature Communications*, 1-15.
- Zhou, X., Liu, Z., Jifeng , G., Qiying , S., Qian, X., Xinxiang , Y., . . . Lifang , L. (2018). Identification of CHCHD10 variants in Chinese patients with Parkinson's disease . *Parkinsonism Relat Disord.*, 96-97.

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


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


 DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ
 JEFA DE DEPARTAMENTO GENÉTICA,
 INNNMVA.
 Cédula: 5913885