

---

# Heterogeneidad Genética del Trastorno del Espectro Autista: análisis de variaciones en los genes *CNTNAP2* y *BDNF*

---

Katherine Paola Peña González<sup>1</sup>

**Director:** Maria Claudia Lattig<sup>1</sup>  
**Asesores:** Liga Colombiana de Autismo

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética Humana. Universidad de los Andes.

## Resumen del proyecto

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) es un grupo de desórdenes del desarrollo que comprometen 3 áreas específicas: la comunicación social, la interacción social y además el comportamiento caracterizado por la presencia de intereses restringidos o repetitivos (Lord & Jones, 2012). Aunque su etiología no se conoce, existen evidencias que sugieren que el TEA posee un alto componente genético; aproximadamente, en un 10-20% de los casos de TEA, se ha podido identificar una causa genética. Dentro de estas, se han encontrado mutaciones en diferentes genes (heterogeneidad genética) o también se han identificado diferentes mutaciones en un mismo gen (heterogeneidad alélica) (Abrahams & Geschwind, 2008). Cada causa genética encontrada solo explica hasta un 1% de los casos de TEA. Sin embargo, existen asociaciones o reportes replicados por más de un estudio, este es el caso del gen *Contactin Associated Protein-Like 2 (CNTNAP2)* [MIM: 604569], de la familia de las Neurexinas y, al parecer, cumple varias funciones en el Sistema Nervioso Central. Por otro lado, el *Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)* [MIM: 610269], gen que pertenece a la familia de Factores de Crecimiento Nervioso, también ha sido asociado con TEA y tiene un papel muy importante durante el desarrollo neuronal. Además, presenta una variación que ha mostrado una alta asociación con desórdenes afectivos, esta es la *Val66Met*. Si la etiología del TEA puede explicarse por medio de la hipótesis de la heterogeneidad genética y el modelo “Multi-Hit”, puede suponerse una combinación de alelos comunes o de baja frecuencia, como el alelo *Met*, que en conjunto con otras variaciones en el *CNTNAP2* pueden contribuir al desarrollo del TEA. Entonces, en este estudio se buscaron variaciones (no sinónimas, de baja frecuencia, raras o privadas<sup>1</sup>) en el gen *CNTNAP2* en individuos con TEA que pudieran tener un efecto negativo en el funcionamiento del gen, y adicionalmente, se evaluó si existía una asociación entre el alelo *Met* (alelo común) y el TEA. En el estudio se identificaron un total de 25 variaciones en el gen *CNTNAP2*, pero sólo la variación *rs61232377* del intrón 22 puede sugerir un efecto nocivo en la función de la proteína debido a que se encuentra en una región de *splicing*. Adicionalmente, se observó en 4 individuos dos

variaciones altamente deletéreas que parecen sugerir la presencia de un pseudogen o un *CNV*, que debe ser confirmado, sin embargo no es posible determinar si este *CNV*/pseudogen puede tener un papel importante en el desarrollo del TEA. Por otra parte, no se pudo establecer una asociación entre el alelo *Met* del gen *BDNF* y el TEA por la frecuencia del alelo *Met* en la población.

**Palabras clave:** Trastorno del Espectro Autista (TEA), *Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)*, *Contactin Associated Protein-Like 2 (CNTNAP2)*, heterogeneidad genética, modelo “*Multi Hit*”, Colombia.

## 1. Introducción.

El Trastorno del Espectro Autista (TEA), también conocido como Trastorno Generalizado del Desarrollo, es un grupo de desórdenes del desarrollo que compromete 3 áreas específicas: la comunicación social, la interacción social y además el comportamiento caracterizado por la presencia de intereses restringidos o repetitivos (Lord & Jones, 2012). A pesar de que ha existido una controversia acerca de los desórdenes que deberían hacer parte de este trastorno, un comunicado de la *American Psychiatric Association* (APA) en el 2012 determinó que son 4 los desórdenes que hacen parte del TEA: Autismo Clásico, Síndrome de Asperger, Desorden Desintegrativo Infantil y Desorden Generalizado del Desarrollo no Especificado (APA, 2012).

Un reporte de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en EE.UU. sugiere que el TEA es

más frecuente de lo que se consideraba y que su prevalencia ha ido incrementando en todo el mundo. Esta investigación, publicada en el 2012, mostró que la prevalencia del TEA ha incrementado de 1/150 a 1/88 en EE.UU. desde el año 2000 hasta el 2008. De igual forma, el estudio menciona que en Europa y Asia se han reportado cifras similares, y, en algunos casos, mayores (Centers for Disease Control and Prevention, 2012). Por el contrario, en Colombia no existen datos epidemiológicos del trastorno, aunque existen cifras del DANE (2010) en cuanto a otras discapacidades: el 0.2% de la población colombiana presenta dificultades para “relacionarse con las demás personas y el entorno” y el 0.3%, dificultades para “hablar y comunicarse”.

Finalmente, no es claro si el aumento de la prevalencia del TEA en el mundo es resultado del incremento del

número de casos o de la optimización de las herramientas para diagnosticar esta condición (Kaneshir & Zieve, 2010).

## **Etiología**

La importancia de estudiar la etiología del TEA radica en la posibilidad de identificar sus factores de riesgo, y, por otro lado, de avanzar en el entendimiento de este trastorno. En cuanto a los factores de riesgo, la identificación de estos permitiría una intervención temprana de las personas con riesgo de desarrollar un TEA, entre los 1.5 - 5 años, como la Academia Nacional de las Ciencias de EE.UU. (2001) sugiere. Esta intervención temprana permitiría que estas personas logren adaptarse con más facilidad a las dinámicas sociales.

Existen evidencias que sugieren que el TEA posee un alto componente genético. Se sabe que existe una concordancia entre gemelos monocigóticos del 88%, mientras que esta concordancia disminuye a 31% en gemelos dicigóticos (Rosenberg et al., 2009). De la misma forma, los parientes en primer grado de personas con TEA

tienen una probabilidad mayor de presentar rasgos del comportamiento o cognitivos (*e.g.* dificultades sociales o del lenguaje) asociados con este trastorno, en comparación con la población general (Bishop et al., 2004; Losh, Childress, Lam, & Piven, 2008)

La literatura afirma que aproximadamente en un 10-20% de los casos de TEA se ha podido identificar una causa genética: mutaciones puntuales, comorbilidad con otros síndromes genéticos o presencia de variaciones en el número de copias (*Copy Number Variants - CNV*).

Las mutaciones identificadas sólo explican hasta un 1% de los casos de TEA, aproximadamente, como es el caso de las mutaciones encontradas en el gen *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3 (SHANK3)* [MIM: 606230] y en el *Contactin Associated Protein-Like 2 (CNTNAP2)* [MIM: 604569]. Es importante aclarar que las mutaciones identificadas han sido encontradas en diferentes genes (heterogeneidad genética) o también se han identificado diferentes mutaciones en un mismo gen (heterogeneidad alélica) (Abrahams &

Geschwind, 2008; Eapen, 2011; Schanen, 2006).

A pesar de la alta heterogeneidad genética del TEA, existen algunos genes cuya asociación o reportes han sido replicados por más de un estudio. Este es el caso del gen *CNTNAP2* [MIM: 604569]. La proteína que codifica este gen (*CNTNAP2*) hace parte de la familia de las Neurexinas y, al parecer, cumple varias funciones en el Sistema Nervioso Central: mediar la interacción entre las neuronas y la glía (Stephan, 2008), modular de la reorganización estructural de las sinapsis (Falivelli *et al.*, 2012) y localizar canales de potasio en los axones en proceso de diferenciación (Stephan, 2008). Además, este gen se expresa en varias regiones del cerebro, incluida la corteza frontal, región relacionada con el procesamiento del lenguaje (Alarcón *et al.*, 2008).

Como se mencionó, varias investigaciones han asociado el gen *CNTNAP2* con TEA. Un estudio que analizó variaciones en el cromosoma 7, donde se encuentra este gen, encontró que el gen *CNTNAP2* se relaciona con el retraso en el desarrollo del lenguaje en

familias de individuos con autismo (Alarcón *et al.*, 2008). Así mismo, un Estudio de Asociación de Genoma Completo (*Genome Wide Association Study- GWAS*) indicó que parece existir una asociación entre el *CNTNAP2* y el TEA (Arking *et al.*, 2008). No sólo se han reportado asociaciones, sino también re-arreglos cromosómicos que involucran exones del gen *CNTNAP2* en personas con rasgos de TEA y discapacidad intelectual (Bakkaloglu *et al.*, 2008; Poot *et al.*, 2010). Finalmente, una investigación reciente que secuenció el exoma de 30 niños diagnosticados con TEA, encontró una mutación en el gen *CNTNAP2* que podría explicar el desarrollo de este trastorno en uno de los individuos (O’Roak *et al.*, 2011).

En cuanto al efecto que pueden tener las variaciones en este gen, se ha reportado que dos SNPs ubicados en regiones intrónicas se asocian con cambios en la activación cerebral: individuos sanos que portaban los alelos de riesgo mostraron una asimetría funcional del cerebro durante pruebas que evaluaban el procesamiento del lenguaje (Whalley *et al.*, 2011). Adicionalmente, en el 2011, se reportó el primer ratón

*knock out* para este gen, en el cual se encontró una anomalía en la migración y activación neuronal, así como un número reducido de interneuronas (Peñagarikano *et al.*, 2011). El efecto que tienen las variaciones en el gen *CNTNAP2* se debe en gran parte a la tarea que cumple esta proteína en las neuronas. Por lo tanto, debido a la importancia que tiene este gen en el desarrollo y funcionamiento cerebral, se seleccionó para ser secuenciado.

Existe otro gen, que además de estar asociado con TEA, cumple una función biológica relevante en el contexto de este trastorno. Éste es el *Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)* [MIM: 610269], gen que pertenece a la familia de Factores de Crecimiento Nervioso. Este gen tiene un papel muy importante durante el desarrollo neuronal, pues regula la supervivencia y diferenciación de neuronas, el crecimiento de axones y el crecimiento y morfología de las dendritas. Además, también tiene un rol importante en la etapa adulta, pues interviene en la transmisión sináptica, la plasticidad neuronal y las respuestas neuronales adaptativas (UniProt, 2012).

Recientemente se ha reportado que este gen regula la expresión de microRNAs (miRNAs) desregulados en individuos con TEA, como el miR-132, y también, regula la expresión del gen *Methyl CpG binding protein 2 (MECP2)* [MIM: 312750], responsable del Síndrome de Rett, síndrome que presenta una alta comorbilidad con TEA (Mellios & Sur, 2012).

Adicionalmente, la proteína BDNF parece presentar niveles bajos en neonatos diagnosticados con TEA, en comparación con controles no afectados (Abdallah *et al.*, 2012). En contraste, durante el crecimiento, especialmente durante la niñez y la adolescencia, parece estar en altos niveles en individuos con TEA, en comparación con controles (Correia *et al.*, 2010).

Un estudio de asociación y ligamiento encontró que la región 11p12–p13, en la que se encuentra el gen *BDNF*, estaba asociada con TEA (Szatmari *et al.*, 2007), sin embargo, lo más interesante de este gen es su alta asociación con desórdenes afectivos (*i.e.* depresión, ansiedad). En el *BDNF* se encuentra la variación *Val66Met*, que ha sido una de las pocas variaciones asociadas altamente

con desórdenes afectivos; el alelo *Met* está asociado con el desarrollo de rasgos depresivos (Jiang et al., 2005) y desórdenes de ansiedad (Chen et al., 2006). En Colombia, nuestro grupo de investigación confirmó el riesgo que representa el alelo *Met* a desarrollar desórdenes afectivos en población sana (Perea, Paternina, Gomez, & Lattig, 2012). Es interesante que estudios pioneros en familias de individuos con TEA relacionaron inicialmente este trastorno con desórdenes afectivos. Estos estudios encontraron que la prevalencia de ansiedad o depresión en familias de personas con TEA era mayor que en familias de personas con otro tipo de discapacidad intelectual (Smalley, McCracken, & Tanguay, 1995). Por consiguiente, variaciones asociadas con estos desórdenes podrían jugar un papel importante en el desarrollo del TEA.

Ha surgido la idea de que el TEA es una condición que no depende únicamente de variaciones en sólo un gen sino que puede ser el resultado de la combinación de diferentes variaciones en uno o más genes, modelo conocido como “*Multi-Hit*” (Geschwind, 2011).

Así que, a partir de la hipótesis de la heterogeneidad genética del TEA y del modelo “*Multi-Hit*”, pueden definirse 3 hipótesis. La primera, supone un modelo en el que el individuo con TEA hereda un conjunto de variaciones genéticas, Comunes ( $MAF^1 \geq 5\%$ ) o de Baja Frecuencia ( $MAF = 0.5-5\%$ ) en la población, que en conjunto desencadenan el desorden; la segunda hipótesis plantea el mismo modelo, pero, además, supone la aparición de una variación *de-novo* en el individuo afectado, que es la que finalmente desencadena el desorden; y, por último, la tercera hipótesis plantea que el TEA puede desarrollarse gracias a la aparición de una variación *de-novo* en el individuo afectado, que tiene una alta penetrancia y por sí sola desencadena el trastorno (Geschwind, 2011).

Si suponemos que la etiología del TEA puede explicarse por medio de las hipótesis que adjudican al desarrollo del TEA la presencia de alelos comunes o de baja frecuencia, se podría pensar que el

---

<sup>1</sup> *Minor Allele Frequency* (MAF): se refiere a la frecuencia de un alelo en la población, específicamente del alelo menos común de una variación. Existen 4 categorías: Común, presente en un 5% de la población; Baja Frecuencia, entre 0.5–5% de la población; Raras, entre 0.05–0.5% de la población; y, Privadas, menos de 0.05% de la población (Altshuler et al., 2010).

alelo *Met* puede ser uno de estos alelos de riesgo, que en conjunto con otras variaciones en el *CNTNAP2* pueden contribuir al desarrollo del TEA. Entonces, en este estudio se buscaron variaciones (no sinónimas, de baja frecuencia, raras o privadas<sup>1</sup>) en el gen *CNTNAP2* en individuos con TEA que pudieran tener un efecto negativo en el funcionamiento del gen, y adicionalmente, se evaluó si existía una asociación entre el alelo *Met* (alelo común) y el TEA.

## 2. Objetivos generales:

- Identificar variaciones potencialmente nocivas (no sinónimas, de baja frecuencia, raras o privadas) en individuos con TEA mediante secuenciación de la región codificante del gen *CNTNAP2*.
- Determinar si existe una asociación entre el alelo *Met* del gen *BDNF* y el TEA mediante un análisis de TDT.

### 2.1. Objetivos específicos:

- Seleccionar variaciones en los exones, y en intrones con  $MAF \leq 5\%$ .
- Seleccionar variaciones no sinónimas en los exones y en los intrones en

lugares muy conservados entre especies.

- Analizar *in silico* el efecto potencial de las variaciones seleccionadas en la función del gen *CNTNAP2*.
- Aplicar un análisis de *Transmission Disequilibrium Test (TDT)* para determinar si el alelo *Met*, de la variación *Val66Met*, se hereda con más frecuencia de lo esperado por azar a individuos con TEA.

## 3. Materiales y Métodos.

### *Muestra poblacional*

La muestra estuvo conformada por 10 tríos familiares, en los que existía un caso de TEA. Ellos fueron remitidos por la Liga Colombiana de Autismo e invitados a una reunión en donde se les explicó el proyecto. Las familias interesadas en participar, aprobaron y firmaron el documento de consentimiento/ asentimiento informado, de conformidad con lo establecido en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud “Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud”. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la

Universidad de los Andes.

*Criterios de inclusión:* tríos familiares completos, en donde el hijo/a tuviera diagnóstico de TEA idiopático, sin importar sexo, edad, origen étnico o estrato socioeconómico.

*Criterios de exclusión:* diagnóstico de otro trastorno del desarrollo como: Síndrome de Frágil-X, Síndrome de Rett, Síndrome de Down, Síndrome de Angelman, Síndrome de Williams, entre otros.

A los participantes se les asignó un código de identificación. Las 10 familias fueron numeradas desde el número 1 hasta el 10, y cada participante se identificó con una letra: padre: P, madre: M y caso: C.

#### *Evaluación psicológica y de historia familiar*

La evaluación psicológica y de historia familiar fue realizada por el grupo de trabajo de la Liga Colombiana de Autismo. Inicialmente, se le envió a los padres el *Cuestionario Inicial para Padres y/o Cuidadores*, en donde se les

preguntaba acerca de la historia familiar (antecedentes familiares de TEA, problemas del lenguaje, neurológicos o desórdenes psiquiátricos) e historia clínica del niño/joven con TEA.

Después de esto, las familias fueron citadas a la Liga Colombiana de Autismo en donde se aplicaron tres instrumentos para confirmar el diagnóstico de TEA: *Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R), *Childhood Autism Rating Scale 2* (CARS2) y *Autism Diagnostic Observation Schedule* (ADOS). Para este estudio, sólo se tuvo en cuenta que los individuos fueran diagnosticados con TEA; no se determinaron endofenotipos en los individuos.

#### *Toma de muestra*

Posterior a la firma del consentimiento informado y a la evaluación psicológica, se recolectó una muestra de sangre periférica o de células bucales del trío familiar.

#### *Extracción de ADN*

La extracción de ADN se realizó a



partir de leucocitos o células bucales, dependiendo del caso. Las células bucales fueron tomadas usando un cepillo citológico, guardadas en seco y transportadas al Laboratorio de Genética Humana. La extracción de ADN se realizó con el kit *FlexiGene DNA* de Qiagen®.

#### *Secuenciación de los exones del gen CNTNAP2*

Las parejas de primers de los 24 exones del gen *CNTNAP2* se diseñaron en regiones intrónicas de forma que flanquearan cada exón (Tabla 1), con base en la secuencia del cromosoma 7 humano (NC\_000007.13 de NCBI, ensamblaje de referencia GRCh37.1). La mayoría de estos primers se diseñaron manualmente, dada la complejidad de algunas regiones intrónicas: regiones ricas en repeticiones. Las parejas de primers fueron analizadas con la herramienta *Primer Blast* de NCBI, contra la base de datos por defecto (*non-redundant*) de Humanos, para verificar su especificidad.

Los exones del gen *CNTNAP2* fueron amplificados siguiendo un protocolo de PCR estándar: 35 ciclos y temperatura de anillamiento promedio de 63°C. Los productos de PCR fueron secuenciados por la técnica de Sanger sólo en dirección *forward*. Las variaciones encontradas se confirmaron usando el primer *reverse*. Inicialmente, sólo se secuenciaron los exones de los 10 individuos diagnosticados con TEA, y para confirmar si algunas de las variaciones encontradas habían sido heredadas, se secuenciaron estas regiones en los padres.

#### *Genotipificación de la variación Val66Met*

La genotipificación de la variación *Val66Met* se realizó usando el kit comercial *TaqMan® SNP Genotyping Assay* (Assay ID C\_11592758\_10) de Applied Biosystems® siguiendo las recomendaciones del fabricante.

**Tabla 1.** Parejas de primers usadas para amplificar los exones del gen *CNTNAP2*.

Exón <sup>a</sup>	Primer Forward (5' - 3')	Primer Reverse (5' - 3')	Tamaño del amplicón (pb)
1	CTTCAAGAACCCTACGGAGAGT	TGCCAAACATCAATGCCGCA	234
2	GACTGAGGTGAAGTCCTTTGGAGT	AGGAGTGATTTCTGGTGTCTGC	479
3	AGAGCACTGCCAAGACCAAT	GGTTTGCCTTTCATCTACGTGC	557
4	CGGTGTAAGAAATCACAAGCCC	GACATGTCAGTCTCTGTACGTG	495
5	GACACCTGTTGGAAGTGGAT	GTTCTTGCTGTAGGCCAAAGA	507
6	CTTACAGAGTTGGCCATAGCA	GTAGGAGAGTGACACAATTGC	303
7	GCCTTTGGGGCAGTAAAATTGC	ACCACCTACTTCAAGCTAGTCC	613
8	TCAGTGGTCTGACATGGATG	AATCCTGAGCGTGTAAACCAG	434
9	GGAAATTGTGTTTCAGCTGGG	GATCTACTGAGTCAGTTGAGTC	319
10	CAGTAGTTGGATGTGATGGCTG	GGTCTCACAAACAGAAACACAGG	345
11	ACAGCTTGAATTTGGCCACTC	CAGGTTGCTGAGCTTCAAAGCA	265
12	GAACGCTCTTCCAGGAAGAAC	GGTGGAAGTACTTATTCGTGAC	315
13	ACACTGTTCTACACCAGCTCAG	CCACACCTGTTGGATTCTTTAGGC	401
14	GGGTGTAAGTGTGGCAGTCTAA	CAGTTGGGTTAGTCCAGACCT	365
15	GCAATGTGCTATGAGACCACCT	AGCTACAGGAGAGCAAGTCTGA	411
16	GTGAGGATTTGGTCCAATGTTG	TCCTGCTCCTGGAACAAAGGAA	446
17	TCGACCTTTGTAGGACGTGACA	AATCAACAGAGGGAAGCCATGG	390
18	CAGTGTCATCTCCTACCACAGT	CTGCACCATACACAGAGCTTCT	545
19	AGGTCATTGTAGGGTATCGGCA	TGCTAGAACATTCTGTCTGCCC	365
20	AGAGCAGGAATTGAGGGGATGT	TGGCCAAGCATTATAGGGACAG	285
21	CCAGGGTTCAAAGAGTGATGTC	ACCGAGAACAACCACGTAAC	343
22	GACAGGTATGTTGTACAGCTGG	TGAGAACTCCGTACTCACAACG	459
23	CGGGTCCATCTGAAATGGAGAT	CACTGTGCCCGGCTATATTTAC	392
24	TCTGACGGAGCTGTAGTGAA	GTGCTCAAGAGTATGAAGCAGG	378

<sup>a</sup> De acuerdo a la secuencia de NCBI NC\_000007.13 (ensamblaje de referencia GRCh37.1).

### *Análisis de los datos*

Las secuencias del gen *CNTNAP2* fueron analizadas con los programas Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems<sup>®</sup>) y CLC Main Workbench 6.7.1. Para identificar posibles heterocigotos, se usó la herramienta

*Secondary Peak Calling* en CLC Main Workbench 6.7.1. Una vez revisadas y anotadas, las secuencias de cada exón fueron alineadas a la secuencias de los exones de la secuencia consenso NC\_000007.13 usando CLC Main Workbench 6.7.1.

Para confirmar si las variaciones identificadas habían sido reportadas o eran variaciones nuevas, se buscaron en la base de datos dbSNP de NCBI, usando la herramienta *GeneView* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), y en ENSEMBL, con la herramienta *Location Tab* (<http://www.ensembl.org>).

*Variaciones reportadas:* Se buscó información de todas las variaciones reportadas en NCBI y ENSEMBL referente a asociaciones con TEA u otros desórdenes y al efecto en la proteína o en el mecanismo de *splicing*.

Después, en un primer filtro, se seleccionaron las variaciones que estaban reportadas en exones, así como las variaciones reportadas en regiones intrónicas con un MAF  $\leq 5\%$ , pues se consideró inicialmente que este tipo de variaciones podrían tener un posible efecto negativo en funcionamiento del gen. Es importante mencionar que la condición de “MAF  $\leq 5\%$ ” para las variaciones intrónicas se estableció con el fin de restringir el análisis, debido a la gran cantidad de variaciones intrónicas que se esperaba encontrar. La baja

frecuencia de las variaciones podría indicar, con mayor probabilidad, un efecto negativo en la función del gen, pues se supone una presión de selección que no ha permitido la dispersión de la variación en la población. Sin embargo, no se descarta el posterior análisis de las variaciones intrónicas con un MAF  $> 5\%$ .

En un segundo filtro, se seleccionaron las variaciones exónicas no sinónimas y las variaciones intrónicas con MAF  $\leq 5\%$  conservadas entre especies. Para lo último, las secuencias intrónicas fueron comparadas con las secuencias de otras especies. Lo anterior se llevó a cabo usando los alineamientos que provee ENSEMBL, y en algunos casos, realizando alineamientos con Blast y CLC.

*Variaciones nuevas:* se analizaron realizando alineamientos entre especies con Blast y CLC.

*Análisis de asociación entre la variación Val66Met y el TEA*

Inicialmente, se pensó en aplicar la prueba estadística *Transmission Disequilibrium Test* (TDT) para

determinar si el alelo *Met* se heredaba con mayor frecuencia de lo esperado por azar a los hijos con TEA. Igualmente, se compararon las frecuencias genotípicas observadas en la muestra y en los individuos con TEA con las reportadas por Perea *et al.* (2012) en población sana colombiana. Para eso, se aplicó una prueba de  $X^2$  ( $\alpha=0,05$ ).

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Variaciones en el gen *CNTNAP2*

El análisis de las secuencias del gen *CNTNAP2* en los individuos con TEA, arrojó un total de 25 variaciones: 23 variaciones reportadas y 2 no reportadas

en las bases de datos (nuevas).

#### 4.1.1. Variaciones reportadas.

De las 23 variaciones reportadas, 4 variaciones se ubicaron en regiones codificantes (Tabla 2), y 6 de las 19 variaciones ubicadas los intrones reportaban MAF menor o igual al 5% o un MAF no determinado (Tabla 3). Con el *primer filtro* (variaciones en exones y en intrones con  $MAF \leq 5\%$ ) se seleccionaron 10 variaciones para los posteriores análisis (Tabla 2 y 3). De estas 10 variaciones seleccionadas, la mayoría ( $n=8$ ) correspondían a *Single Nucleotide Variants* (SNV) (Tabla 2 y 3).

**Tabla 2.** Variaciones reportadas en las bases de datos encontradas en los exones del gen *CNTNAP2*.

Exón	ID de la variación	Tipo de variación <sup>a</sup>	Nombre HGVS <sup>b</sup>	MAF Reportado <sup>c</sup>	MAF Observado <sup>d</sup>
Exón 10	rs34592169	SNV	<i>p.Ala553=</i>	A=0.112	A=0,15
Exón 11	rs2286128	SNV	<i>p.Ser570=</i>	A=0.031	A=0,1
Exón 15	rs10240503	SNV	<i>p.Ser760=</i>	G=0.240	G=0,150
Exón 23	rs9648691	SNV	<i>p.Ala1241=</i>	G=0.477	A=0,200

<sup>a</sup>. SNV: *Single Nucleotide Variant*.

<sup>b</sup>. De acuerdo a la secuencia de NCBI NP\_054860.1.

<sup>c</sup>. MAF reportado en las bases de datos NCBI y ENSEMBL. Alelo menos frecuente = Frecuencia.

<sup>d</sup>. MAF observado en los 10 individuos estudiados.

**Tabla 3.** Variaciones reportadas en las bases de datos encontradas en los intrones del gen *CNTNAP2*.

Intrón	ID de la variación	Tipo de variación <sup>a</sup>	Nombre HGVS <sup>b</sup>	MAF Reportado <sup>c</sup>	MAF Observado <sup>d</sup>
<b>Intrón 1</b>	rs148853070	SNV	<i>g.146471259A&gt;G</i>	G=0.004*	G=0,050
<b>Intrón 4</b>	rs202022704	Inserción	<i>g.146741304_146741305insTA</i>	NA*	INS=0,150
<b>Intrón 4</b>	rs35167289	Inserción	<i>g.146805228_146805229insG</i>	G=0.391/	INS=0,450
<b>Intrón 7</b>	rs3807570	SNV	<i>g.146826061A&gt;G</i>	G=0.484	G=0,500
<b>Intrón 11</b>	rs2286127	SNV	<i>g.147183143A&gt;G</i>	G=0.258	G=0,25
<b>Intrón 12</b>	rs2074715	SNV	<i>g.147259374A&gt;G</i>	G=0.499	G=0,350
<b>Intrón 14</b>	rs17170742	SNV	<i>g.147600913C&gt;T</i>	T=0.031*	T=0,050
<b>Intrón 14</b>	rs10240482	SNV	<i>g.147674948A&gt;T</i>	T=0.141	T=0,100
<b>Intrón 14</b>	rs2373284	SNV	<i>g.147674912T&gt;C</i>	T=0.437	T=0,300
<b>Intrón 15</b>	rs201300642	SNV	<i>g.147675117T&gt;C</i>	C=0.001*	C=0,050
<b>Intrón 14</b>	rs10253762	SNV	<i>g.147674880G&gt;A</i>	A=0.141	A=0,100
<b>Intrón 18</b>	rs2074711	SNV	<i>g.147869670T&gt;C</i>	C=0.288	C=0,400
<b>Intrón 20</b>	rs3779032	SNV	<i>g.147926888A&gt;C</i>	C=0.360	C=0,111
<b>Intrón 19</b>	rs3779031	SNV	<i>g.147926734A&gt;G</i>	G=0.227	G=0,222
<b>Intrón 20</b>	rs3801976	SNV	<i>g.147964091G&gt;A</i>	G=0.216	G=0,188
<b>Intrón 22</b>	rs77025884	SNV	<i>g.148106477C&gt;G</i>	G=0.338	G=0,200
<b>Intrón 22</b>	rs61232377	Inserción	<i>g.148106476_148106477insTTCT</i>	NA*	INS= 0,200
<b>Intrón 23</b>	rs117098826	SNV	<i>g.148106651G&gt;A</i>	A=0.024*	A= 0,25
<b>Intrón 23</b>	rs13241417	SNV	<i>g.148106654T&gt;C</i>	C=0.312	C= 0,25

<sup>a</sup> SNV: *Single Nucleotide Variant*.

<sup>b</sup> De acuerdo a la secuencia de NCBI NC\_000007.13

<sup>c</sup> MAF reportado en las bases de datos NCBI y ENSEMBL. Alelo menos frecuente= Frecuencia.

<sup>d</sup> MAF observado en los 10 individuos estudiados.

\* sombreado: variaciones con un MAF  $\leq 5\%$  o no confirmadas en las bases de datos.

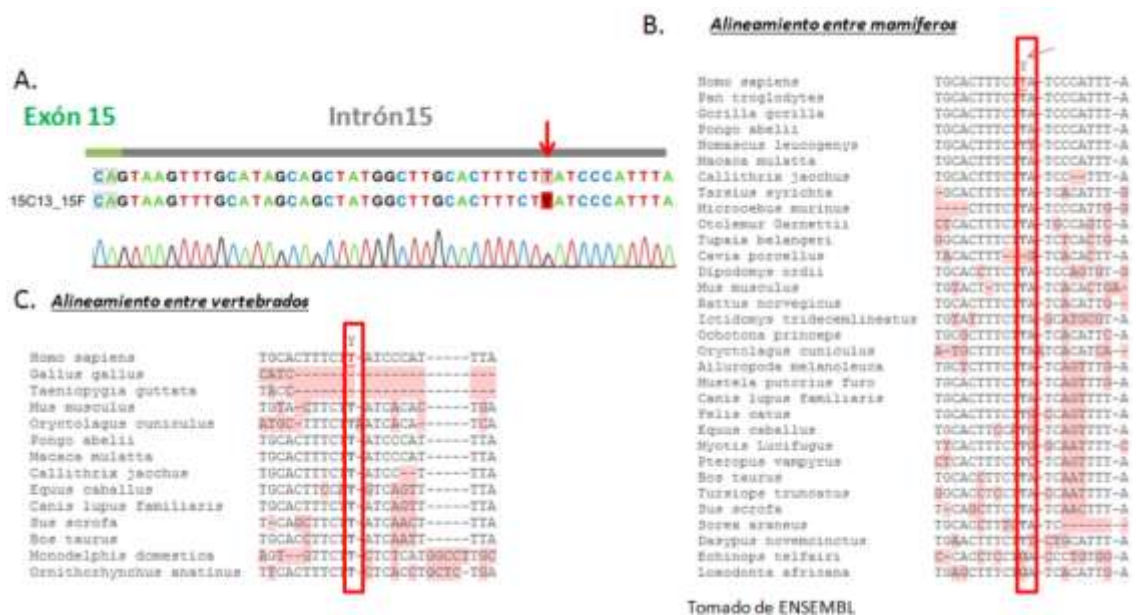
**Tabla 4.** Variaciones reportadas encontradas en el gen *CNTNAP2*, seleccionadas después del segundo filtro.

Intrón	ID de la variación	Tipo de variación	Nombre HGVS	MAF reportado	MAF observado
Intrón 15	rs201300642	SNV	<i>g.147675117T&gt;C</i>	C=0.001	C=0,050
Intrón 22	rs61232377	Inserción	<i>g.148106476_148106477insTTCT</i>	NA	INS= 0,200

Posteriormente, se aplicó un *segundo filtro* en donde se seleccionaron aquellas variaciones que fueran no sinónimas, en el caso de las variaciones en los exones, o que fueran conservadas entre especies cercanas, en el caso de las variaciones en los intrones (Tabla 4). Con este filtro, dos variaciones continuaron en el análisis: *rs201300642*, en el intrón 15, y *rs61232377*, en el intrón 22. El análisis de estas variaciones se presenta a continuación.

- *rs201300642* del intrón 15:

Esta variación se encontró en uno de los 10 individuos (C13) de forma heterocigota. 1000 Genomas reporta un MAF de 0,1% para esta variación, lo cual indica que se trata de una variación *rara*. Además, el alineamiento entre especies de mamíferos mostró una alta conservación de esta región (Figura 1B), y lo mismo se evidenció con el alineamiento entre otras especies de vertebrados (Figura 1C).



**Figura 1.** Variación *rs201300642* del intrón 15. **A.** Cromatograma del individuo C13 con la variación *rs201300642*. **B.** Alineamiento entre especies de mamíferos. **C.** Alineamiento entre otras especies de vertebrados. La flecha roja y los rectángulos en rojo muestran la posición de la variación.

Dado que esta variación se encuentra 35 nucleótidos corriente abajo del exón 15 (Figura 1A), no es posible

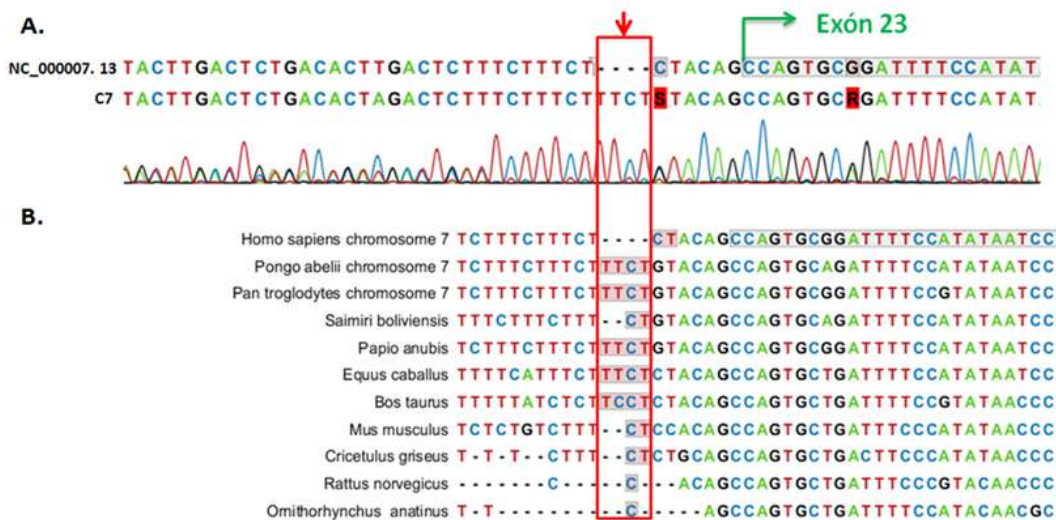
determinar si cambios en esta región pueden tener un impacto en el *splicing* del intrón 15, pues la literatura reporta que

los nucleótidos importantes para el *splicing* son los 8 primeros del extremo 5' del intrón. Por lo tanto, por ahora, no podemos inferir un posible impacto de esta variación en el funcionamiento del gen.

- *rs61232377* del intrón 22

La variación *rs61232377* del intrón 22 se encontró en 4 de los 10

individuos con TEA (individuos C7, C8, C10, C13) de manera heterocigota (Figura 2A). Esta variación aún se encuentra en proceso de confirmación en las bases de datos, pues sólo se ha reportado una vez en población Koreana. El alineamiento entre especies indica que se trata de una variación que puede ser conservada en algunas especies (Figura 2B).



**Figura 2.** *rs61232377* del intrón 22. **A.** Cromatograma de uno de los cuatro individuos (C7) que portan la variación *rs61232377* de forma heterocigota y secuencia consenso del cromosoma 7 humano (NC\_000007.13). **B.** Alineamiento entre especies de mamíferos. La flecha roja y el rectángulo rojo muestran la posición de la variación. En verde se muestra el inicio del exón 23. En la gráfica A se muestran, sombreado en rojo, otras variaciones reportadas S (*rs77025884*) y R (*rs9648691*), excluidas después del primer filtro.

Lo más importante de esta variación es que se encuentra muy cerca del exón 23, en la región conocida como Tracto Polipirimidina. Esta región es muy importante para el *splicing*, pues allí se

unen snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) (Hertel, 2008). ENSEMBL confirma que la variación *rs61232377* se encuentra en la región de *splicing*. Por lo tanto, puede que esta

variación afecte el *splicing* del intrón 22, dando lugar a la traducción de este intrón. Sin embargo, para confirmar si esta variación puede tener un efecto negativo en el *splicing*, es necesario analizar el mRNA del gen *CNTNAP2* en los individuos (C7, C8, C10, C13). Además, es importante genotipificar esta variación en la población colombiana para determinar si se trata de una variación común en nuestra población y que, por lo tanto, puede tener poca influencia en el desarrollo del TEA.

No obstante, últimamente se ha prestado atención a las variaciones en las regiones de *splicing*. Estudios similares en otros genes como el *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3 (SHANK3)* han

encontrado variaciones en las regiones de *splicing* en individuos con TEA, y han afirmado que éstas puede tener un papel importante en el desarrollo de este desorden (Boccutto et al., 2012).

#### 4.1.2. Variaciones no reportadas.

Se encontraron 2 variaciones no reportadas en el gen *CNTNAP2* (Tabla 5). La primera denominada *Trp134\** ubicada en el penúltimo nucleótido del exón 3, y la segunda denominada *g. 146536997 G>A* en el primer nucleótido del intrón 3. Estas dos variaciones se observaron siempre juntas en 4 de los 10 individuos con TEA del estudio (C5, C6, C7, C8) (Figura 3).

**Tabla 5.** Variaciones no reportadas en el gen *CNTNAP2*.

Región	Posición dentro del cromosoma <sup>a</sup>	Tipo de variación <sup>c</sup>	Nombre HGVS	MAF observado <sup>d</sup>
Exón 3	146536995	SNV	<i>p. Trp134*</i> <sup>b</sup>	A=0,2
Intrón 3	146536997	SNV	<i>g. 146536997 G&gt;A</i> <sup>a</sup>	A=0,2

<sup>a</sup>. De acuerdo a la secuencia de NCBI NC\_000007.13

<sup>b</sup>. De acuerdo a la secuencia de NCBI NP\_054860.1

<sup>c</sup>. SNV: *Single Nucleotide Variant*.

<sup>d</sup>. MAF observado en los 10 individuos estudiados.

Sin embargo, estas variaciones fueron observadas como picos más pequeños (minipicos) que los

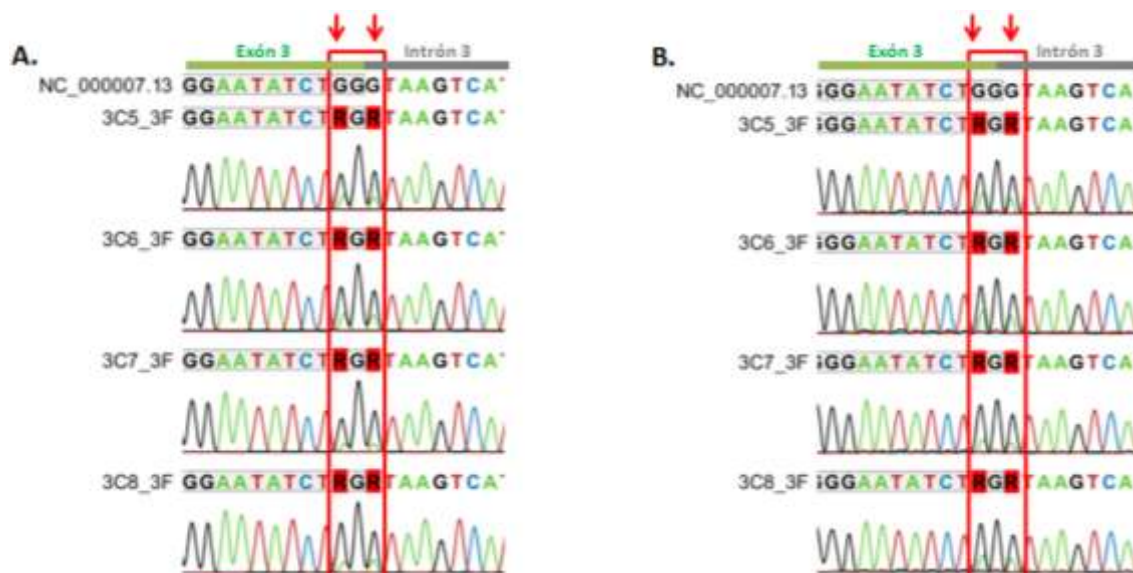
correspondientes a los nucleótidos de referencia (Figura 3A), lo que inicialmente no sugería heterocigotos.



Para descartar errores durante la secuenciación, los productos de PCR del exón 3 de estos individuos fueron re-secuenciados, y, nuevamente, se observaron los picos (Figura 3B).

Estas dos mutaciones se encontraron en 4 individuos con TEA (C5, C6, C7, C8), y en todos los casos se presentaron juntas. El efecto de cualquiera de estas dos variaciones parece ser altamente deletéreo, pues la variación en el exón 3, *Trp134\**, consiste en una

mutación *nonsense*, es decir, genera un codón de parada prematuro. Por su parte, la mutación *146536997G>A*, se encuentra en el sitio 5' de *splicing* del intrón 3. Esta última podría interferir en el *splicing* del intrón 3, causando una traducción errónea de este intrón. Esta extensión de la traducción introduciría un codón de parada prematuro 17 aminoácidos más adelante. Sin embargo, la presencia de la variación *Trp134\** justo antes podría enmascarar el efecto de la variación *146536997G>A*.



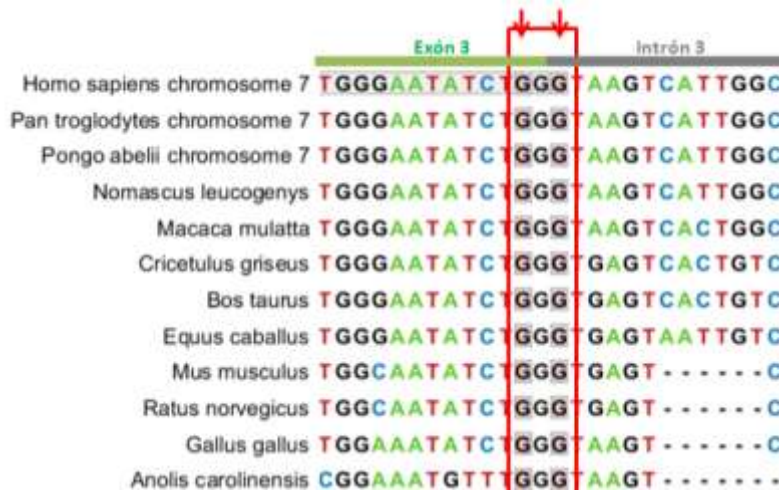
**Figura 3.** Individuos con la mutación *Trp134\** y *146536997G>A*. **A.** Primera secuenciación. **B.** Re-secuenciación. Las flechas en rojo señalan las posiciones de las variaciones.

Aún cuando el efecto nocivo de estas variaciones es evidente, se realizó un alineamiento de esta región entre diferentes especies. Este alineamiento

determinó que se trata de una región muy importante, dada su conservación (Figura 4), lo cual concuerda con la literatura, pues el sitio 5' de *splicing* es

altamente conservado en la especie humana así como en otras especies, debido a que de éste depende el *splicing*

del intrón en el que se encuentra (Burslet, Seledtsov, & Solovyev, 2000).



**Figura 4.** Alineamiento entre especies de la región correspondiente a las variaciones *Trp134\** y *146536997 G>A* del exón 3 e intrón 3. Las flechas en rojo indican las posiciones de las dos variaciones.

La presencia de estas dos variaciones juntas en todos los casos podría sugerir que las dos variaciones se encuentran en Desequilibrio de Ligamiento (DL). La herramienta Haploview que permite visualizar el nivel de Desequilibrio de Ligamiento, muestra que en esta región la frecuencia de recombinación es casi nula (datos no incluidos).

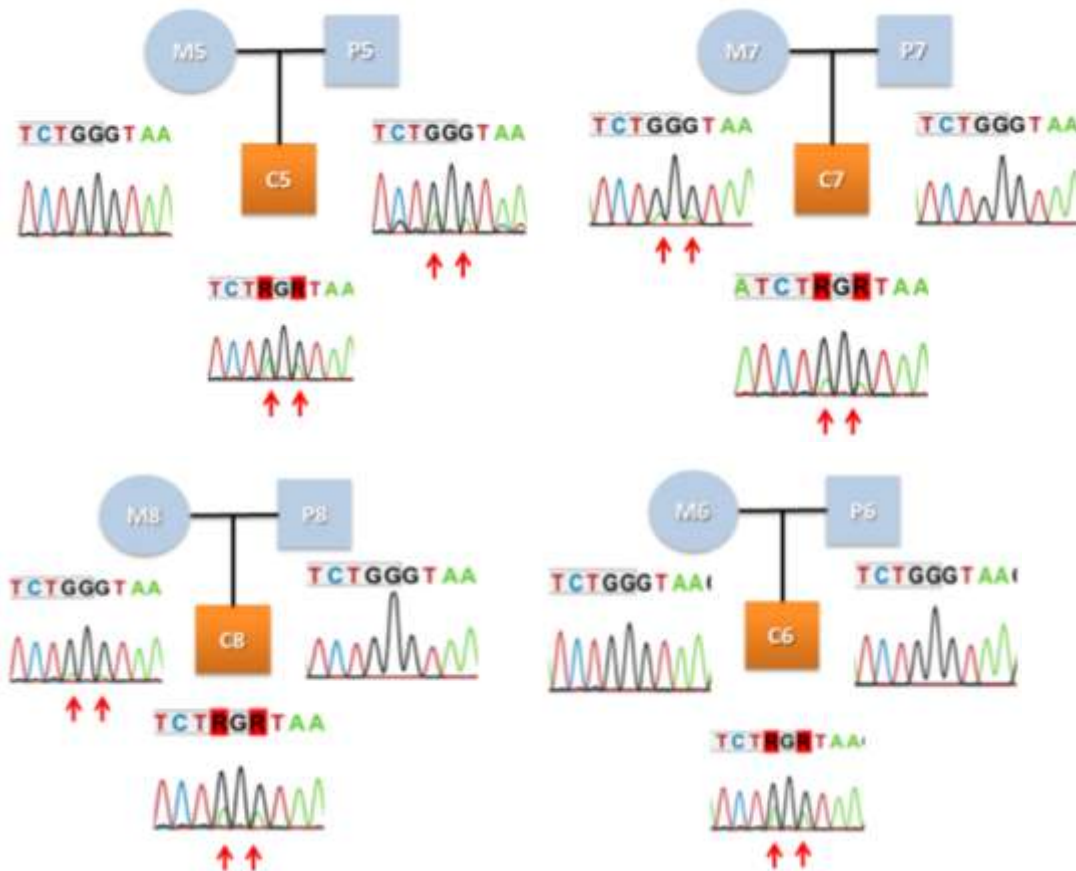
Dado el impacto potencial de estas dos variaciones en la proteína CNTNAP2, y para determinar si estas variaciones se encontraban en la misma fase, se secuenció la región del Exón 3- Intrón 3

en los padres de los 4 individuos (C5, C6, C7, C8). En 3 de los casos (C5, C7, C8) se logró establecer que se trata de una variación heredada (Figura 5). Las variaciones no pudieron ser identificadas en los padres del caso C6.

Pero, ¿a qué corresponden estos “minipicos”? La literatura sugiere que estos “minipicos” pueden indicar la presencia de una mutación somática o la presencia simultánea de dos tipos de secuencias (con una alta identidad). Las mutaciones somáticas, es decir, la presencia de dos poblaciones celulares genóticamente diferentes en un

individuo, es un fenómeno poco probable en este caso. Este evento tendría que haber ocurrido de forma independiente en la etapa temprana del desarrollo de 4 los individuos, así como en dos posiciones

del genoma. Por esta razón, se descartó esta opción. Sin embargo, la segunda opción parece ser más probable.



**Figura 5.** Secuenciación de la región del Exón 3- Intrón 3 del gen *CNTNAP2* en los padres de los individuos C5, C6, C7 y C8. Se muestran los 4 tríos familiares; en círculos, las mujeres y en cuadrados, los hombres. El individuo diagnosticado con TEA se muestra en naranja. Las flechas rojas indican la presencia de las variaciones en los cromatogramas tanto de los casos, como de sus padres.

La presencia dos tipos de secuencias (con una alta identidad) podría ser resultado de la presencia de un gen parálogo, de un *Copy Number*

*Variant* (CNV) o, incluso, de un pseudogen en estos individuos. La primera opción, referente al gen parálogo, es poco probable pues la posibilidad de

que los primers anillaran en un gen parálogo al *CNTNAP2* es baja. Durante el diseño de los primers se usó la herramienta Primer Blat contra la base de datos de Humano para evitar este tipo de anillamientos inespecíficos en otras regiones del genoma. Además, aunque se han reportado genes parálogos para el *CNTNAP2*, pertenecientes a la familia de las Neurexinas, (*CNTNAP1*, *NRXN3*, *CNTNAP5*, *NRXN2*, *CNTNAP3B2*, *LOC643792*, *CNTNAP3*, *CNTNAP4* y *NRXN12*), ninguno de estos genes presenta una identidad tan alta con la región del Exón 3-Intrón 3, como para que los primers anillaran también en estas regiones, según Primer Blast (datos no incluidos). Además, si los primers hubieran anillado en genes parálogos, en los cromatogramas de esta región se evidenciaría esta contaminación. Por otro lado, las variaciones encontradas en esta región son altamente deletéreas, así que afectarían el funcionamiento del gen que las contiene. Al encontrarlas en 4 individuos, y en 3 de los padres, se podría pensar que se trata de una variación presente en la población. Es decir, es poco probable que estas mutaciones deletéreas hubieran podido mantenerse en un gen funcional dentro de nuestra

población.

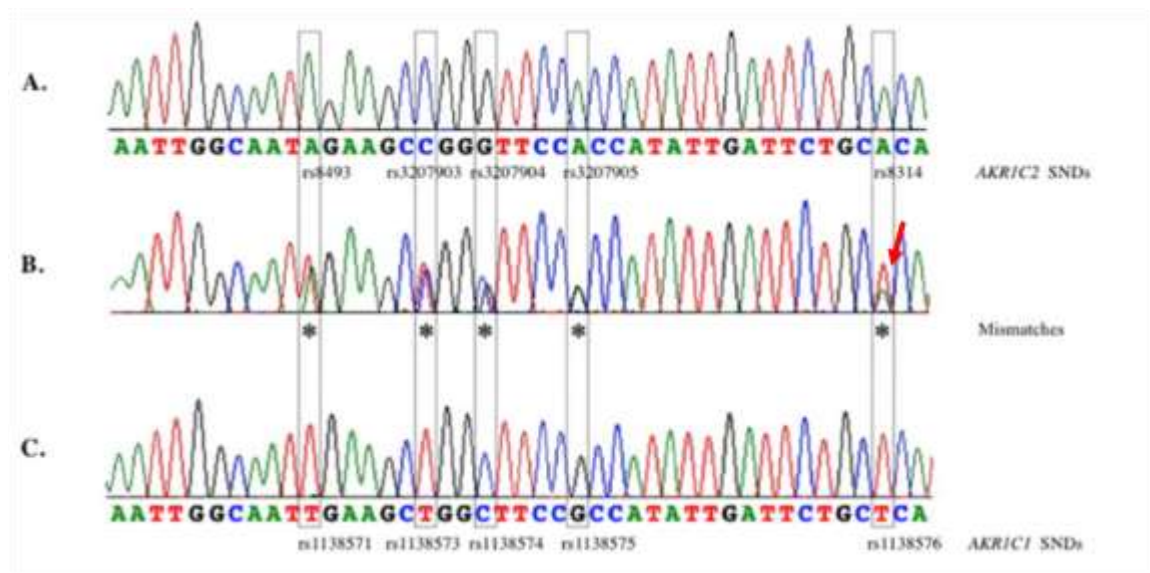
La idea anterior llevó a pensar que estas variaciones pueden haberse mantenido en la población en una región no funcional. Es así como se llegó a pensar en la posibilidad de que estas variaciones hicieran parte de un pseudogen del gen *CNTNAP2*. Los pseudogenes son regiones genómicas no funcionales, altamente similares a un gen funcional. Pueden generarse por duplicaciones de un gen, retrotransposiciones (inclusión de un cDNA en el genoma) o mutaciones *in situ* en un gen funcional que generan una pérdida de función (Pei et al., 2012). Inicialmente se pensó que podía existir tantos pseudogenes como genes en el genoma humano (Chen, Ma, & Zeng, 2011), sin embargo, recientemente se reportó que parecen existir 14.112 pseudogenes en el genoma humano (Pei et al., 2012). Aún así, la frecuencia de los pseudogenes es bastante alta.

Al no tener una función aparente, los pseudogenes no se encuentran sometidos a la presión de selección, y, por lo tanto, presentan una alta tasa de mutación, incluyendo mutaciones

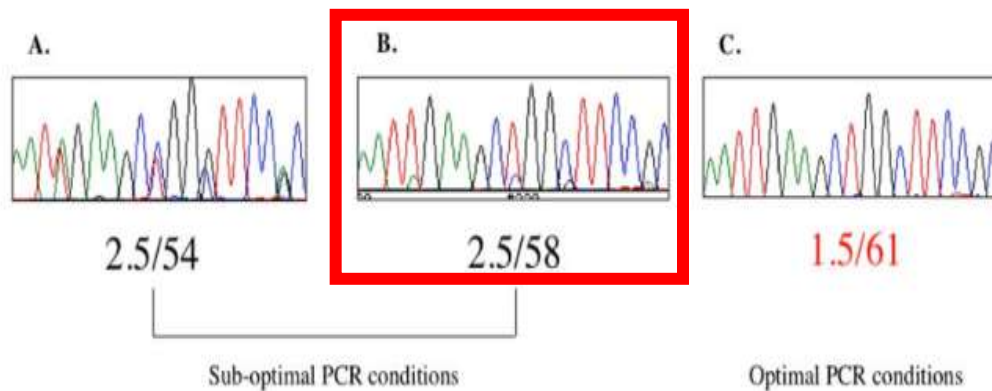
deletéreas. Como se ha afirmado, las mutaciones deletéreas sólo pueden ser mantenidas en pseudogenes a lo largo de la evolución, de hecho se ha propuesto que uno de los criterios para definir un pseudogen debería ser la presencia de codones de parada o cambios en el marco de lectura (Chen et al., 2011). Como se mencionó, las variaciones encontradas en el Exón 3-Intrón 3 parecen haberse mantenido en la población, y dado su efecto, es muy probable que se encuentren en un pseudogen.

Estos pseudogenes, u otras secuencias altamente similares, pueden

llegar a entorpecer los análisis de productos de PCR (Chen et al., 2011), incluso se ha estimado que el 8.32% los SNPs codificantes reportados en dbSNP de NCBI pueden ser artefactos ocasionados por la presencia de genes altamente similares en el genoma humano (Musumeci et al., 2010). Las variaciones genéticas en regiones altamente similares pueden llegar a verse en los cromatogramas como “minipicos”, similares a los vistos en este estudio (Figura 6). Por otro lado, se ha demostrado que condiciones astringentes de PCR pueden evitar este anillamiento inespecífico de los primers (Figura 7).



**Figura 6.** Cromatogramas del estudio de genes parálogos de Musumeci et al. (2010). En éste se muestran los cromatogramas obtenidos con primers específicos para **A.** el gen *AKRIC2* y **C.** *AKRIC1*. En la figura **B.** se muestra el cromatograma obtenido usando primers inespecíficos (anillan en los dos genes parálogos). La flecha en rojo muestra un minipico muy similar a los del presente estudio.



**Figura 7.** Cromatogramas del estudio de genes parálogos de Musumeci et al. (2010). Cambios en las condiciones de PCR. **A.** y **B.** muestran cromatogramas de productos de PCR obtenidos con condiciones poco astringentes. En **C.** se evidencia la eliminación de la secuencia inespecífica gracias a condiciones astringentes de PCR. El cuadro en rojo muestra “minipicos” similares a los obtenidos en el presente estudio.

Aunque no se ha reportado un pseudogen para el *CNTNAP2*, recientemente se reportó un pseudogen para el *CNTNAP3* (denominado *LOC643792*), gen parálogo al *CNTNAP2*. Sin embargo, la región del Exón 3 - Intrón 3 del *CNTNAP2* no presenta similitud con el pseudogen *LOC643792*.

En el contexto del TEA, recientemente se reportó la asociación entre un pseudogen y este trastorno. Aunque generalmente los pseudogenes no tienen una función establecida, algunos estudios han sugerido que pueden actuar como reguladores de la expresión del gen original a través de la generación de ARN de interferencia (*iRNA*) (Kerin et al.,

2012; Pei et al., 2012). El gen *Moesin* (*MSN*) es regulado por el transcrito antisentido de su pseudogen *Moesin pseudogene 1* (*MSNPI*). Lo interesante es que un GWAS reportó una asociación entre un SNP ubicado en la región de este pseudogen y el TEA (Kerin et al., 2012). Este estudio, abre una nueva línea de investigación en TEA relacionado con la regulación génica y el papel de los pseudogenes en este proceso.

En otro orden de ideas, la presencia de los “minipicos” también podría explicarse por medio de un *Copy Number Variant* (*CNV*). Un *CNV* es una variación estructural que no es visible en un cariotipo. Se trata de la duplicación o

delección de extensas regiones del genoma, que pueden involucrar a más de un gen. Estos *CNVs* son una fuente de variación genética en la población al igual que los SNPs, sin embargo, también pueden estar asociados con el riesgo a desarrollar algún desorden (Marshall & Scherer, 2012).

En cuanto a los *CNVs* y el TEA, es conocido que en individuos con este desorden la frecuencia de *CNVs* es mayor, y que además, los *CNVs* en estos individuos involucran genes relacionados con el sistema nervioso, incluyendo el *CNTNAP2* (Marshall & Scherer, 2012). Algunos *CNVs* pueden tener un efecto moderado o ligero en el fenotipo, por lo que, en el caso del TEA, requerirían de otros factores genéticos o ambientales para desencadenar el desorden. Estos *CNVs* de efecto moderado pueden además ser encontrados en otro tipo de desórdenes, en controles, así como en miembros familiares no afectados (Marshall & Scherer, 2012), como es el caso de este estudio, en donde encontramos las variaciones del Exón 3-Intrón 3 en padres aparentemente no afectados.

En conclusión, la presencia de estos “minipicos” en la región del Exón 3-Intrón 3 pueden sugerir la presencia de una secuencia altamente similar a la del *CNTNAP2*, que fue amplificada simultáneamente con el gen. Sin embargo, es importante determinar si esta secuencia puede tratarse de un pseudogen del *CNTNAP2* o de un *CNV* a través de técnicas como microarreglos de SNPs, para identificar *CNVs* en estos individuos; clonación, para analizar los dos tipos de secuencias individualmente; o FISH, para determinar si existe una región de alta identidad al gen *CNTNAP2* en otra posición diferente a la 7q35-36, en donde se encuentra el *CNTNAP2*. De la misma forma, es importante determinar si se trata de una variación común presente en la población colombiana.

#### **4.2. Genotipificación de la variación *Val66Met***

Los genotipos dentro de las 10 familias siguieron la distribución reportada en la población general colombiana por Perea *et al.* (2012) ( $X^2=0,052$ ,  $p>0,05$ ). Esta misma distribución también se encontró dentro de la muestra de individuos con TEA ( $X^2=0,029$ ,

$p > 0,05$ ) (Tabla 6). El genotipo *Val/Val* tuvo una frecuencia de 83%, el genotipo *Val/Met* de 17% y, finalmente, no se encontró ningún individuo *Met/Met*. Por consiguiente, el alelo *Val* se encontró en el 92% de la población de estudio y el *Met*, en el 8%. Los genotipos se encontraban en equilibrio de Hardy Weinberg ( $X^2 = 0,25, > 0,05$ ).

Dada la baja frecuencia de heterocigotos en la muestra poblacional, no fue posible aplicar la prueba estadística de *Transmission Disequilibrium Test (TDT)* que generalmente se implementa para evaluar si existe un alelo que se transmite con más frecuencia de lo esperado por azar a hijos afectados con una condición particular.

**Tabla 6.** Frecuencias genotípicas de la variación *Val66Met* en la población de estudio y en la población de Perea *et al.* (2012).

Genotipo	Frecuencia genotípica		
	Muestra poblacional (n=30)	Individuos con TEA (n=10)	Perea <i>et al.</i> (2012) (n=303)
<i>Val/Val</i>	0,83	0,80	0,738
<i>Val/Met</i>	0,17	0,20	0,24
<i>Met/Met</i>	0	0	0,017

Este estudio esperaba encontrar una frecuencia de transmisión del alelo *Met* mayor a la esperada por azar, dada la asociación de este alelo con desórdenes afectivos. Sin embargo, no fue posible realizar el análisis por la baja frecuencia de los heterocigotos en la muestra. No obstante, las frecuencias genotípicas obtenidas son similares a las reportadas en población general colombiana (Perea *et al.*, 2012), lo que sugiere que en estas familias y en los individuos con TEA este

polimorfismo se distribuye de igual forma que en la población no afectada. Con esta muestra, se concluye que la variación *Val66Met* del gen *BDNF* puede no tener una contribución significativa al desarrollo del TEA. Sin embargo, se ha afirmado que para detectar el efecto de las variaciones comunes en el contexto del TEA, cuando éste es moderado, se necesita una población de individuos mucho mayor (Anney *et al.*, 2012). Por esta razón, aún no es posible descartar



esta variación dentro del contexto del TEA, pues puede que con la muestra actual (n=30) no sea posible detectar una asociación.

Además, es importante mencionar que el gen *BDNF* forma parte de la vía de regulación de miRNAs que controlan la conectividad sináptica y la maduración neuronal, dos aspectos que se ven afectados en el TEA. Por consiguiente, a pesar de que la variación *Val66Met* no parece estar relacionada con el TEA, no se descarta que este gen tenga un papel en el desarrollo de este desorden (Mellios & Sur, 2012).

#### 4.3. Gen *CNTNAP2* y variación *Val66Met*

Con la información obtenida en este estudio no fue posible determinar si la combinación de variaciones de los dos genes estudiados podría tener una relación con el desarrollo de TEA. Sin embargo, en la Tabla 7 se muestran las variaciones importantes del estudio así como los individuos con TEA que las portaban. La mayoría de individuos portaban más de una de las cinco variaciones importantes del estudio

(Tabla7). En cuanto al *BDNF* y el *CNTNAP2*, los individuos C5 y C6, que mostraron los “minipicos” en la región del Exón 3- Intrón 3 del gen *CNTNAP2*, también portaban el alelo *Met*. Sin embargo, no es posible establecer si esto tiene una relación con el desarrollo de TEA dado que el número de muestra es bajo. Por otro lado, la mayoría de los 6 individuos portaban más de una de las 4 variaciones encontradas en el gen *CNTNAP2*, no obstante, tampoco es posible establecer el impacto que puede tener esta combinación de variaciones en el desarrollo del TEA.

**Tabla 7.** Variaciones importantes del estudio e individuos portadores.

Variación*	Individuo portador
Intrón 15 <i>rs201300642</i>	C13
Intrón 22 <i>rs61232377</i>	C7, C8, C10, C13
Exón 3- Intrón 3	C5, C6, C7, C8
<i>Met (BDNF)</i>	C5, C6

\* Todas las variaciones se observaron de forma heterocigota.

## 5. CONCLUSIÓN

De acuerdo con lo reportado en las bases de datos, este estudio constituye la

primera vez en Colombia que se secuencian los 24 exones del gen *CNTNAP2*. Se identificaron un total de 25 variaciones en el gen *CNTNAP2*, de las cuales sólo para la variación *rs61232377* del intrón 22 se puede sugerir un efecto nocivo en la función de la proteína debido a que esta variación se encuentra en una región involucrada en el *splicing* del pre-mRNA del gen *CNTNAP2*. Sin embargo, esto se debe confirmar a través de análisis del mRNA de este gen en los individuos que portan esta variación.

Adicionalmente, se encontraron dos variaciones altamente deletéreas, que parecen sugerir la presencia de un pseudogen o un *CNV* en los 4 individuos en los que se observó. Sin embargo, es necesario confirmar esto a través de microarreglos de SNPs, clonación de los productos de PCR o FISH. Además, es importante genotipificar esta variación en la población colombiana. Por otro lado, aún no es posible determinar si este *CNV*/pseudogen puede tener un papel importante en el desarrollo del Trastorno del Espectro Autista.

Con respecto a la variación Val66Met no se pudo establecer una

asociación entre el alelo *Met* del gen *BDNF* y el TEA, pero esta variación así como el gen *BDNF* aún no pueden ser descartados dentro del grupo de variaciones que pueden tener un efecto en el desarrollo del TEA, por su función biológica así como por su relación con otros desórdenes psiquiátricos. Aunque la variación común *Val66Met* puede no jugar un papel importante por sí sola, es posible que pueda interactuar con otras variaciones para desencadenar el desorden. Es importante genotipificar esta variación en una población mayor.

Este estudio, pionero en el tema, es una primera aproximación al entendimiento de la genética del TEA en Colombia. Esta investigación abre puertas para futuros estudios a nivel funcional en el gen *CNTNAP2* con el fin de entender mejor el papel que juegan estas variaciones en el TEA.

## **6. AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue finalizado gracias a Dios y al apoyo de mi familia, amigos y Directora de Tesis.

Un agradecimiento muy especial a

la Dra. Maria Claudia Lattig, Directora de la presente tesis y Profesora Asistente del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de los Andes, por su acertada guía, paciencia, apoyo constante y valiosa dirección y enseñanzas, y a la Liga Colombiana de Autismo, por su admirable entrega e interés en el proyecto, por contactar a las familias y llevar a cabo las evaluaciones psicológicas.

A la Dra. Helena Groot, Directora del Laboratorio de Genética Humana, por apoyar la realización del proyecto y por sus valiosos comentarios. A la Dra. Maria Mercedes Torres, por su asesoría en momentos importantes del proyecto. Al laboratorio de Genética Humana de la Universidad de los Andes. Al Centro de Español de la Universidad de los Andes, por la beca que me permitió culminar la maestría. Al Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de los Andes por la financiación del proyecto a través de Proyecto Semilla. Al Dr. Edel López, por la asesoría en el diagnóstico clínico, al Dr. Roberto Mendoza y Dr. Diego Riaño por sus valiosos aportes y comentarios como jurados.

Finalmente, un agradecimiento muy especial a todas las familias que participaron en el proyecto, especialmente a los niños/jóvenes diagnosticados con Trastorno del Espectro Autista, que decidieron participar en el estudio con el objetivo de aportar información valiosa y abrir un camino de investigación en este trastorno en Colombia.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, M., Mortensen, E., Greaves-Lord, K., Larsen, N., Bonefeld-Jørgensen, E., Nørgaard-Pedersen, B., Hougaard, D., et al. (2012). Neonatal levels of neurotrophic factors and risk of autism spectrum disorders. *Acta psychiatrica Scandinavica*. doi:10.1111/acps.12020
- Abrahams, B. S., & Geschwind, D. H. (2008). Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nature reviews. Genetics*, 9(5), 341–55. doi:10.1038/nrg2346
- Alarcón, M., Abrahams, B. S., Stone, J. L., Duvall, J. A., Perederiy, J. V., Bomar, J. M., Sebat, J., et al. (2008). Linkage, Association, and Gene-Expression Analyses Identify CNTNAP2 as an Autism-Susceptibility Gene. *Journal of Human Genetics*, (January), 150–159. doi:10.1016/j.ajhg.2007.09.005
- Altshuler, D. M., Gibbs, R. a, Peltonen, L., Dermitzakis, E., Schaffner, S. F., Yu, F., Bonnen, P. E., et al. (2010). Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*, 467(7311), 52–8. doi:10.1038/nature09298
- Anney, R., Klei, L., Pinto, D., Almeida, J., Bacchelli, E., Bolton, P. F., Bourgeron, T., et al. (2012). Individual common variants exert weak effects on the risk for autism

spectrum disorderspi, 21(21), 4781–4792.  
doi:10.1093/hmg/dd301

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22456193>

- Arking, D. E., Cutler, D. J., Brune, C. W., Teslovich, T. M., West, K., Ikeda, M., Rea, A., et al. (2008). REPORT A Common Genetic Variant in the Neurexin Superfamily Member CNTNAP2 Increases Familial Risk of Autism. *Journal of Human Genetics*, 82, 160–164. doi:10.1016/j.ajhg.2007.09.015.
- Bakkaloglu, B., Roak, B. J. O., Louvi, A., Gupta, A. R., Abelson, J. F., Morgan, T. M., Chawarska, K., et al. (2008). Molecular Cytogenetic Analysis and Resequencing of Contactin Associated Protein-Like 2 in Autism Spectrum Disorders. *Journal of Human Genetics*, (January), 165–173. doi:10.1016/j.ajhg.2007.09.017.
- Bishop, D. V. M., Maybery, M., Maley, A., Wong, D., Hill, W., & Hallmayer, J. (2004). Using self-report to identify the broad phenotype in parents of children with autistic spectrum disorders: a study using the Autism-Spectrum Quotient. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 45(8), 1431–1436. doi:10.1111/j.1469-7610.2004.00325.x
- Boccutto, L., Lauri, M., Sarasua, S. M., Skinner, C. D., Buccella, D., Dwivedi, A., Orteschi, D., et al. (2012). Prevalence of SHANK3 variants in patients with different subtypes of autism spectrum disorders. *European journal of human genetics* □ : *EJHG* (July), 1–7. doi:10.1038/ejhg.2012.175
- Burset, M., Seledtsov, I. A., & Solovyev, V. V. (2000). Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(21), 4364–4375. Retrieved from <http://nar.oxfordjournals.org/content/28/21/4364.full.pdf+html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2012). Prevalence of autism spectrum disorders--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 sites, United States, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly report. Surveillance Summaries.*, 61(3), 1–19. Retrieved from
- Chen, S.-M., Ma, K.-Y., & Zeng, J. (2011). Pseudogene: lessons from PCR bias, identification and resurrection. *Molecular biology reports*, 38(6), 3709–15. doi:10.1007/s11033-010-0485-4
- Correia, C. T., Coutinho, A. M., Sequeira, A. F., Sousa, I. G., Lourenço Venda, L., Almeida, J. P., Abreu, R. L., et al. (2010). Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism. *Genes brain and behavior*, 9(7), 841–848. doi:10.1111/j.1601-183X.2010.00627.x
- Dirección de Censos y Demografía (DANE). (2010). Discapacidad: Información estadística- Total Nacional. Recuperado en noviembre del 2011, de: [http://www.dane.gov.co/index.php?option=com\\_content&view=article&id=74&Itemid=12](http://www.dane.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=74&Itemid=12)
- Eapen, V. (2011). Genetic basis of autism: is there a way forward? *Current opinion in psychiatry*, 24(3), 226–36. doi:10.1097/YCO.0b013e328345927e
- Geschwind, D. H. (2011). Genetics of autism spectrum disorders. *Trends in Cognitive Sciences*, 15(9), 409–416. doi:10.1016/j.tics.2011.07.003
- Hertel, K. J. (2008). Combinatorial control of exon recognition. *The Journal of biological chemistry*, 283(3), 1211–5. doi:10.1074/jbc.R700035200
- Jiang, X., Xu, K., Hoberman, J., Tian, F., Marko, A. J., Waheed, J. F., Harris, C. R., et al. (2005). BDNF variation and mood disorders: a novel functional promoter polymorphism and Val66Met are associated with anxiety but have opposing effects. *Neuropsychopharmacology* □ : *official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30(7), 1353–61. doi:10.1038/sj.npp.1300703
- Kerin, T., Ramanathan, A., Rivas, K., Grepo, N., Coetzee, G. A., & Campbell, D. B. (2012).

- A Noncoding RNA Antisense to Moesin at 5p14.1 in Autism. *Science Translational Medicine*, 4(128), 128ra40–128ra40. doi:10.1126/scitranslmed.3003479
- Lord, C., & Jones, R. M. (2012). Annual research review: re-thinking the classification of autism spectrum disorders. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, 53(5), 490–509. doi:10.1111/j.1469-7610.2012.02547.x
- Losh, M., Childress, D., Lam, K., & Piven, J. (2008). Defining key features of the broad autism phenotype: a comparison across parents of multiple- and single-incidence autism families. *American journal of medical genetics Part B Neuropsychiatric genetics the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 147B(4), 424–433. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2746421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Marshall, C. R., & Scherer, S. W. (2012). Genomic Structural Variants. (L. Feuk, Ed.), 838, 115–135. doi:10.1007/978-1-61779-507-7
- Mellios, N., & Sur, M. (2012). The Emerging Role of microRNAs in Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in psychiatry / Frontiers Research Foundation*, 3(April), 39. doi:10.3389/fpsy.2012.00039
- Musumeci, L., Arthur, J. W., Cheung, F. S. G., Hoque, A., Lippman, S., & Reichardt, J. K. V. (2010). Single nucleotide differences (SNDs) in the dbSNP database may lead to errors in genotyping and haplotyping studies. *Human Mutation*, 31(1), 67–73. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2797835&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- National Academy of Sciences. (2001). Early Intervention Is Key To Educating Children With Autism. Retrieved December 6, 2012, from <http://www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=10017>
- O’Roak, B. J., Deriziotis, P., Lee, C., Vives, L., Schwartz, J. J., Girirajan, S., Karakoc, E., et al. (2011). Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nature genetics*, 43(6), 585–9. doi:10.1038/ng.835
- Pei, B., Sisu, C., Frankish, A., Howald, C., Habegger, L., Mu, X. J., Harte, R., et al. (2012). The GENCODE pseudogene resource. *Genome Biology*, 13(9), R51. doi:10.1186/gb-2012-13-9-r51
- Perea, C. S., Paternina, A. C., Gomez, Y., & Lattig, M. C. (2012, February 1). Negative affectivity moderated by BDNF and stress response. *Journal of affective disorders*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165032711005696?showall=true>
- Poot, M., Beyer, V., Schwaab, I., Damatova, N., Van’t Slot, R., Prothero, J., Holder, S. E., et al. (2010). Disruption of CNTNAP2 and additional structural genome changes in a boy with speech delay and autism spectrum disorder. *Neurogenetics*, 11(1), 81–9. doi:10.1007/s10048-009-0205-1
- Rosenberg, R. E., Law, J. K., Yenokyan, G., McGready, J., Kaufmann, W. E., & Law, P. a. (2009). Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 163(10), 907–14. doi:10.1001/archpediatrics.2009.98
- Schanen, N. C. (2006). Epigenetics of autism spectrum disorders. *Human molecular genetics*, 15 Spec No(2), R138–50. doi:10.1093/hmg/ddl213
- Smalley, S. L., McCracken, J., & Tanguay, P. (1995). Autism, affective disorders, and social phobia. *American Journal of Medical Genetics*, 60(1), 19–26.
- Stephan, D. A. (2008). Unraveling Autism. *Journal of Human Genetics*, 82, 7–9. doi:10.1016/j.ajhg.2007.12.003.
- Szatmari, P., Paterson, A. D., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Brian, J., Liu, X.-Q., Vincent, S. B., et al. (2012). Genetic heterogeneity in autism spectrum conditions. *Nature Reviews Genetics*, 13(12), 757–771. doi:10.1038/nrg.2012.177

J. B., et al. (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature Genetics*, 39(3), 319–328. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17322880>

UniProt. P23560 (BDNF\_HUMAN). [internet]. 2002- [cited 2012 December 3]. Available from <http://www.uniprot.org/uniprot/P23560>

Whalley, H. C., O'Connell, G., Sussmann, J. E., Peel, A., Stanfield, A. C., Hayiou-Thomas, M. E., Johnstone, E. C., et al. (2011).

Genetic variation in CNTNAP2 alters brain function during linguistic processing in healthy individuals. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics* : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics, 156(8), 941–8. doi:10.1002/ajmg.b.31241



NIT: 860.007.386-1

SISTEMA DE BIBLIOTECAS  
IDENTIFICACIÓN TRABAJO DE  
GRADO

FECHA DE ELABORACIÓN

DD	MM	AAAA
24	01	2013

**1. IDENTIFICACIÓN AUTOR(ES) DEL TRABAJO DE GRADO**

CÓDIGO	DOCUMENTO DE IDENTIDAD		APELLIDOS	NOMBRES	CORREO ELECTRÓNICO
	TIPO	NÚMERO			
200620269	CC	1020739526	Peña González	Katherine Paola	kp.pena53@uniandes.edu.co
	CC				
	CC				
	CC				
	CC				
	CC				

PROGRAMA Maestría  
FACULTAD Facultad de Ciencias  
DEPARTAMENTO Departamento de Ciencias Biológicas

**ENTREGÓ FORMATO.**

<input checked="" type="checkbox"/>	SB-10 "Entrega trabajo de grado y autorización de uso a favor de la Universidad de los Andes".
<input type="checkbox"/>	Documento con el cual, el autor permite que su trabajo sea utilizado por la Universidad, para fines de consulta y de mención en sus catálogos bibliográficos, tanto físicos como en línea

**1.1 IDENTIFICACIÓN DE TRABAJO DE GRADO PARA DOBLE TITULACIÓN**

PROGRAMA No Aplica  
FACULTAD No Aplica  
DEPARTAMENTO No Aplica

**TESIS PARA DOBLE TITULACIÓN**

<input checked="" type="checkbox"/>	Si el trabajo de grado presentado aplica para obtener dos (2) titulaciones, por favor marque esta casilla y diligencie la información de esta sección
-------------------------------------	---

**2. INFORMACIÓN GENERAL DEL TRABAJO DE GRADO****TÍTULO DEL TRABAJO DE GRADO:**

Heterogeneidad Genética del Trastorno del Espectro Autista análisis de variaciones en los genes CNTNAP2 y BDNF

DESCRIPCIÓN FÍSICA	MATERIAL ACOMPAÑANTE (Cantidad)		FECHA DE ELABORACIÓN		
			DD	MM	AAAA
Número de páginas: 29 Ilustraciones: 7	Casetes Audio: Casetes Video: Disquetes:	Discos compactos: Diapositivas: Otros: ¿Cuáles?	24	01	2013

**\*RESUMEN DEL TRABAJO DE GRADO**

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) es un grupo de desórdenes del desarrollo que comprometen 3 áreas específicas: la comunicación social, la interacción social y además el comportamiento caracterizado por la presencia de intereses restringidos o repetitivos (Lord & Jones, 2012). Aunque su etiología no se conoce, existen evidencias que sugieren que el TEA posee un alto componente genético; aproximadamente, en un 10-20% de los casos de TEA, se ha podido identificar una causa genética. Dentro de estas, se han encontrado mutaciones en diferentes genes (heterogeneidad genética) o también se han identificado diferentes mutaciones en un mismo gen (heterogeneidad alélica) (Abrahams & Geschwind, 2008). Cada causa genética encontrada solo explica hasta un 1% de los casos de TEA. Sin embargo, existen asociaciones o reportes replicados por más de un estudio, este es el caso del gen Contactin Associated Protein-Like 2 (CNTNAP2) [MIM: 604569], de la familia de las Neurexinas y, al parecer, cumple varias funciones en el Sistema Nervioso Central. Por otro lado, el Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) [MIM: 610269], gen que pertenece a la familia de Factores de Crecimiento Nervioso, también ha sido asociado con TEA y tiene un papel muy importante durante el desarrollo neuronal. Además, presenta una variación que ha mostrado una alta asociación con desórdenes afectivos, esta es la Val66Met. Si la etiología del TEA puede explicarse por medio de la hipótesis de la heterogeneidad genética y el modelo "Multi-Hit", puede suponerse una combinación de alelos comunes o de baja frecuencia, como el alelo Met, que en conjunto con otras variaciones en el CNTNAP2 pueden contribuir al desarrollo del TEA. Entonces, en este estudio se buscaron variaciones (no sinónimas, de baja frecuencia, raras o privadas) en el gen CNTNAP2 en individuos con TEA que pudieran tener un efecto negativo en el funcionamiento del gen, y adicionalmente, se evaluó si existía una asociación entre el alelo Met (alelo común) y el TEA. En el estudio se identificaron un total de 25 variaciones en el gen CNTNAP2, pero sólo la variación rs61232377 del intrón 22 puede sugerir un efecto nocivo en la función de la proteína debido a que se encuentra en una región de splicing. Adicionalmente, se observó en 4 individuos dos variaciones altamente deletéreas que parecen sugerir la presencia de un pseudogen o un CNV, que debe ser confirmado, sin embargo no es posible determinar si este CNV/pseudogen puede tener un papel importante en el desarrollo del TEA. Por otra parte, no se pudo establecer una asociación entre el alelo Met del gen BDNF y el TEA por la frecuencia del alelo Met en la población.

#### OBJETIVOS DEL TRABAJO DE GRADO:

#### METODOLOGÍA DEL TRABAJO DE GRADO:

#### CONCLUSIONES DEL TRABAJO DE GRADO

#### \*PALABRAS CLAVES (TEMAS) DEL TRABAJO DE GRADO:

Trastorno del Espectro Autista (TEA), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Contactin Associated Protein-Like 2 (CNTNAP2), heterogeneidad genética, modelo "Multi Hit", Colombia.

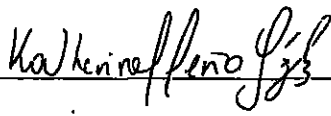
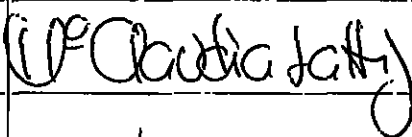

#### ACUERDOS DE CONFIDENCIALIDAD: NO TIENE ACUERDO(S) TIENE ACUERDO(S)

Si selecciona tener acuerdo de confidencialidad, por favor diligencie el siguiente cuadro:

Persona natural o jurídica	Desde			Hasta			
	DD	MM	AAAA	DD	MM	AAAA	

#### 3. FIRMAS



AUTORES (Nombre completo)	*FIRMAS
Katherine Paolo Peño González	
DIRECTORES / ASESORES (Nombre completo)	*FIRMAS
Maria Claudia Jaffy (Clarie)	
JURADO / LECTOR (Nombre completo)	*FIRMAS
 Departamento de Ciencias Biológicas SECRETARIA	
<p>Las firmas de Autor y Director/Asesor son obligatorias. Si tiene inconvenientes con el registro de la firma del Jurado/Lector, deberá tramitar ante la respectiva Facultad la autorización para registrar las firmas de pares o un sello que justifique la ausencia de la firma faltante</p>	

SB-09

[Verificar información](#) | [Imprimir](#)

**ENTREGA EJEMPLAR TRABAJO DE GRADO Y AUTORIZACIÓN DE SU USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**

Yo **Katherine Paola Peña González**, mayor de edad, vecino de Bogotá D.C., identificado con la Cédula de Ciudadanía N° **1.020.739.526** de **Bogotá**, actuando en nombre propio, en mi calidad de autor del trabajo de tesis, monografía o trabajo de grado denominado:

**Heterogeneidad Genética del Trastorno del Espectro Autista: análisis de variaciones en los genes CNTNAP2 y BDNF.**

, hago entrega del ejemplar respectivo y de sus anexos del ser el caso, en formato digital o electrónico (CD-ROM) y autorizo a LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, para que en los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia, utilice y esu en todas sus formas, los derechos patrimoniales de reproducción, comunicación pública, transformación y distribución (alquiler, préstamo público e importación) que me corresponden como creador de la obra objeto del presente documento.

PARÁGRAFO: La presente autorización se hace extensiva no sólo a las facultades y derechos de uso sobre la obra en formato o soporte material, sino también para formato virtual, electrónico, digital, óptico, usos en red, internet, extranet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

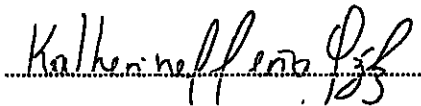
EL AUTOR - ESTUDIANTES, manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y la realizó sin violar o usurpar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es de su exclusiva autoría y tiene la titularidad sobre la misma.

PARÁGRAFO: En caso de presentarse cualquier reclamación o por acción, por parte de un tercero en cuanto a los derechos de autor sobre la obra en cuestión, EL ESTUDIANTE - AUTOR, asumirá toda la responsabilidad, y saldrá de defensa de los derechos aquí autorizados; para todos los efectos la Universidad actúa como un tercero de buena fe.

Para constancia se firma el presente documento en dos (2) ejemplares del mismo valor y tenor, en Bogotá D.C.,

a los **veinticuatro** **24** días del mes de **enero** de Dos Mil **trece**

**EL AUTOR - ESTUDIANTE.**

(Firma)   
Nombre **Katherine Paola Peña González**  
Cédula **1.020.739.526** de **Bogotá**