



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

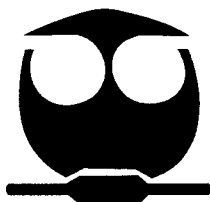
FACULTAD DE QUIMICA

ANALIZAR LA PARTICIPACION DE LOS POLIMORFISMOS
SER167ASN Y VA1380 LEU DEL GEN DE LA PARKINA
EN PACIENTES MEXICANOS CON ENFERMEDAD DE PARKINSON

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
ROXANA GUADALUPE GUTIERREZ VIDAL



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA



MEXICO,D.F. A 30 DE ENERO DEL 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Marisol López López.
Vocal	Homero Hernández Montes.
Secretario	Petra Yescas Gómez.
1er. Suplente	Felipe Cruz García.
2º. Suplente	Antonio Ulises López Gutiérrez.

ELABORADA EN:


Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

ASESOR:



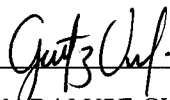
M en C. PETRA YESCAS GÓMEZ.

SUPERVISOR TÉCNICO:



Dr. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

SUSTENTANTE:



ROXANA GUADALUPE GUTIÉRREZ VIDAL.

AGRADECIMIENTOS

*A mi asesora de tesis Dra. Petra Yescas Gómez
por guiarme en el desarrollo de mi tesis y su valiosa amistad que me brindó*

*A la Dra. Maria Elisa Alonso Vilatela
por haberme permitido trabajar en el departamento de Genética y su apoyo brindado*

*Al Dr. Samuel Canizales Quinteros
por haberme asesorado*

*A mis padres
que siempre me han dado su cariño, comprensión y apoyo en mi vida*

*A mi novio Luis
su apoyo, comprensión, amor y amistad que me ha dado*

*A mis compañeros Minerva, José Luis, Agustín, Roberto y Julio
su compañerismo y amistad que me brindaron*

*A mis sinodales
por haber dedicado parte de su tiempo en la revisión de mi trabajo*

INDICE

Índice de figuras

Índice de gráficas

Índice de tablas

RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
1.1. Células dopaminérgicas	3
1.2. Características generales de la enfermedad de Parkinson	5
1.3. Historia de la enfermedad de Parkinson	7
1.4. Características clínicas	9
1.4.1 Síntomas motores	9
1.4.2 Síntomas no motores	12
1.5. Incidencia	15
1.6. Patología	16
1.7. Etiología	20
1.7.1 Edad	21
1.7.2 Factores ambientales	21
1.8 Factores genéticos	24
1.8.1 <i>PARK1</i> o α -sinucleína	27
1.8.2 <i>PARK8</i> o <i>LRRK-2</i>	30
1.9. Gen de la parkina o <i>PARK 2</i>	32
1.9.1. Características del gen de la parkina	34
1.9.2. Proteína parkina	35
1.9.3. Polimorfismos	37
1.10. Modelos animales	42
1.10.1. Las características deseables de un modelo para la enfermedad de Parkinson	42

1.10.2. Modelos animales para Parkinson que existen en la actualidad	42
1.10.2.1 Modelo con MPTP	42
1.10.2.2 6-hidroxidopamina	43
1.10.2.3 Rotenona	43
1.10.2.4 <i>Drosophila</i> y α -sinucleína como modelo de Parkinson	44
1.10.2.5 <i>Drosophila</i> y parkina como modelo de Parkinson	44
1.10.2.6 Ratón y parkina como modelo de Parkinson	45
1.11 Tratamiento	46
1.12 Planteamiento del problema	47
1.13 Objetivos	48
1.13.1 Objetivo general	
1.13.2 Objetivos particulares	
1.14 Hipótesis de trabajo	49
II. MÉTODO Y MATERIALES	50
2.1 Individuos estudiados	51
2.2 Toma de muestra	52
2.3 Extracción del DNA genómico	52
2.4 Determinación de los polimorfismos Ser167Asn y Val380Leu en el gen de la parkina por la técnica de PCR en tiempo real	52
2.5 Secuenciación directa	54
III. RESULTADOS.	57
3.1 Características de los pacientes y controles	58
3.2 Gráficas de PCR en tiempo real	59
3.3 Genotipificación	63

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS	67
V. CONCLUSIONES	71
VI. BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXO	81

INDICE DE FIGURAS.

	Página
Figura 1. Representación de vía dopaminérgica en el cerebro humano.	3
Figura 2. Distribución de la sustancia negra	17
Figura 3. Cuerpos de Lewy	19
Figura 4. Segregación de la mutación Ala53Thr (G209A) en una familia italiana.	28
Figura 5. Dardarina y mutaciones encontradas en los diferentes dominios que la conforman.	32
Figura 6. Gen de parkina y la distribución de las mutaciones reportadas.	35
Figura 7. La parkina y la enfermedad de Parkinson	36
Figura 8. Genotipos del SNP Ser167Asn en la parkina	39
Figura 9. Genotipificación para el polimorfismo Val380Leu	63

INDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. SNP Ser167Asn homocigoto para Ser (G)	59
Gráfica 2. SNP Ser167Asn heterocigoto para Ser/Asn (G/A)	60
Gráfica 3. SNP Ser167Asn homocigoto para Asn (A)	60
Gráfica 4. SNP Val380Leu homocigoto para Val (G)	61
Gráfica 5. SNP Val380Leu heterocigoto para Val/Leu (G/C)	61
Gráfica 6. SNP Val380Leu homocigoto para Leu (C)	62

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Factores de riesgo que se han asociado a la EP	23
Tabla 2. Genes asociados a la enfermedad de Parkinson	26
Tabla 3. Reacción para la PCR en tiempo real	53
Tabla 4. Programa para la PCR en tiempo real	53
Tabla 5. Resumen del ensayo para PCR tiempo real	54
Tabla 6. Reacción para la PCR	55
Tabla 7. Programa de PCR	55
Tabla 8. Relación de pacientes con EP y controles sanos	58
Tabla 9. Relación entre los grupos de pacientes con EP	59
Tabla 10. Frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo Ser167Asn	65
Tabla 11. Frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo Val380Leu	66

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817, desde entonces se ha convertido en un problema creciente a nivel internacional. Cuando la enfermedad se presenta la mayoría de las personas son mayores de 50 años, sin embargo puede presentarse también en pacientes jóvenes. Ocupa el segundo lugar dentro de las enfermedades neurodegenerativas. Es una enfermedad crónica y progresiva del sistema extrapiramidal, que se manifiesta como temblor en reposo, bradicinesia, inestabilidad postural y rigidez. Su patología se caracteriza por la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas y puede cursar con cuerpos de inclusión, llamados cuerpos de Lewy, en varias regiones del cerebro. Su etiología no está bien definida, sin embargo participan tanto factores ambientales como factores genéticos.

En el presente trabajo se analizó la participación de los polimorfismos Ser167Asn y Val380Leu en el gen de la parkina (*PARK2*) en 196 pacientes con enfermedad de Parkinson y en 213 controles sanos mexicanos.

Se determinaron frecuencias alélicas y genotípicas en ambos polimorfismos y ninguno de ellos mostró asociación. Por lo que estos resultados sugieren que las variantes Ser167Asn y Val380Leu del gen de la parkina no participan en la susceptibilidad genética para la EP en la población estudiada.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1. CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS

Las neuronas dopaminérgicas constituyen la mayor fuente de dopamina en el sistema nervioso central de mamíferos. Las neuronas dopaminérgicas son anatómicamente y funcionalmente un grupo heterogéneo de células localizadas en el dicencéfalo, mesencéfalo y el bulbo olfatorio. El grupo más prominente de neuronas dopaminérgicas reside en la parte ventral del mesencéfalo, la cual contiene aproximadamente el 90% del número total de células dopaminérgicas. El sistema mesencéfalo dopaminérgico ha sido subdividido en diferentes sistemas (Figura 1). Probablemente, el mejor conocido es el sistema nigroestriado, el cual se origina en la zona compacta de la sustancia negra y extiende sus fibras del putamen hacia el caudado. La vía del nigroestriado juega un papel esencial en el control del movimiento voluntario. Los diferentes grupos de neuronas dopaminérgicas en el sistema central nervioso, tienen diferentes posiciones anatómicas y proyecciones, y desempeñan papeles cruciales en las diferentes funciones celulares.

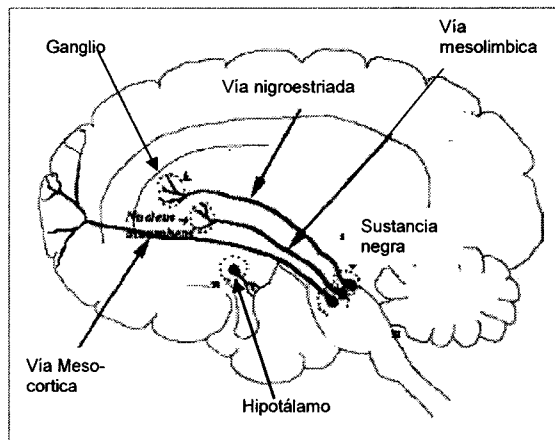


Figura 1. Representación de vía dopaminérgica en el cerebro humano. (Tomada y modificada de Shankar y Anderson, 2005).

A pesar de que las neuronas dopaminérgicas corresponden a menos del 1% del número total de neuronas, juegan un papel importante en la

regulación de diferentes aspectos de las funciones del cerebro. Son necesarias para diferentes tareas específicas en regiones del cerebro que inervan las funciones motoras, la motivación y la memoria.

Se cree que las neuronas dopaminérgicas son particularmente propensas al estrés oxidativo debido a su elevado metabolismo de oxígeno, bajos niveles de antioxidantes y su alto contenido de hierro (Shankar y Anderson, 2005).

1.2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

La enfermedad de Parkinson se define como una enfermedad neurodegenerativa (Farrer, 2006), caracterizada por ser una enfermedad crónica y progresiva (Martin, 1999), la cual es una causa importante de morbilidad y mortalidad en edad adulta (Dekker y cols, 2003). Esta enfermedad ocupa el tercer lugar en frecuencia dentro de las enfermedades neurológicas (www.innn.com.mx, 2001). Presenta una edad de inicio promedio de 50 a 60 años, y a partir de ese momento se produce una progresión lenta de los síntomas durante los 10-12 años siguientes (Luquin y Moya, 2003).

La enfermedad de Parkinson se presenta de manera indistinta con base al género, raza, nacionalidad o clase social (Factor y Weiner, 2002).

Aproximadamente entre el 5-10% de los pacientes mencionan que poseen una historia familiar positiva para la enfermedad de Parkinson (Mizuno y cols, 2001). Las formas familiares presentan tanto herencia dominante como recesiva. A la fecha se han encontrado 9 genes causales para las diferentes formas de Parkinson familiar, *PARK1*, *PARK3*, *Ubiquitina C-terminal hidrolasa L1*, *LRRK-2*, *PARK10* Y *PARK11* para las formas autosómicas dominantes y *PARK2*, *PINK-1*, *DJ-1* para las formas autosómicas recesivas de inicio temprano.

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por un problema clínico mayor, causado por la disminución de dopamina en el estriado, como resultado de una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra. La disminución de la dopamina es el resultado de dicha degeneración de las vías dopaminérgicas nigroestriales, que normalmente inhiben la actividad de una subpoblación de neuronas estriales. Mientras que las consecuencias psicológicas y neuroquímicas de la disminución de la dopamina se ha documentado en forma extensa, muy poco se conoce acerca de la causa de

la muerte de las células dopaminérgicas, o del mecanismo por el cual se degeneran las mismas (León, 1996).

La enfermedad de Parkinson se divide en dos grupos generales:

- ⊙ E. Parkinson familiar
- ⊙ E. Parkinson esporádico

La enfermedad de Parkinson familiar y la esporádica generalmente presentan características clínicas y patológicas similares. Sin embargo, existen diferencias entre estas dos entidades, frecuentemente las formas familiares de esta enfermedad son de edad de inicio más temprano que las formas esporádicas, poseen un curso más agresivo y adicionalmente tienen características clínicas o patológicas poco usuales (Cookson y cols., 2005).

Existen más hombres afectados que mujeres (en una proporción de 1.5:1.0) (Farrer, 2006).

Ambas formas presentan al menos dos de los cuatro síntomas cardinales de la enfermedad de Parkinson y son: temblor en reposo, inestabilidad postural, bradicinesia y rigidez.

1.3. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Existen breves descripciones en la antigüedad de personas que presentaban trastornos del movimiento. Así, Hipócrates, Celsius y Galeno habían descrito pacientes con temblor y en papiros egipcios se había dejado constancia de la aparición de síntomas parkinsonianos en personas de edad avanzada.

Sin embargo, no fue hasta la segunda década del siglo XIX, cuando un médico inglés, aficionado a la geología, la paleontología, y con inquietudes sociales, llamado James Parkinson publicó en 1817 el trabajo "Essay on the Shaking Palsy" en el que se describen seis pacientes con una enfermedad caracterizada por temblor de extremidades en reposo, postura encorvada y marcha progresivamente acelerada. James Parkinson llamó a esta enfermedad "parálisis agitante" y creyó que su causa estaba en una alteración a nivel de la médula cervical (Muñoz, 2001).

Para el siglo XIX, Jean Martin Charcot escribió que "*La parálisis agitante es indiscutiblemente una enfermedad poco conocida*". En 1861 Charcot se enfocó en la descripción de la enfermedad de Parkinson y en sus aspectos clínicos. Fue entonces Charcot el primero que sugirió que a la parálisis agitante se le llamara como "Enfermedad de Parkinson". Él fue el que estableció los puntos cardinales de la parálisis agitante (temblor, rigidez y anormalidades en la marcha y postura, e incluso mencionó una lentitud en los movimientos de los pacientes); también separó el desorden de otras entidades clínicas, lo cual fue una de sus mayores contribuciones (Factor y Weiner, 2002).

Posteriormente, en el siglo XX, Wilson insistió en la importancia de la disminución del movimiento en los pacientes parkinsonianos e introdujo el término de acinesia, quedando así constituida la tríada clásica de la

enfermedad; es decir, temblor, rigidez y acinesia. En la tercera década del siglo XX, Tretiakoff descubrió que la lesión básica de los pacientes parkinsonianos se localizaba en el mesencéfalo y concretamente en la sustancia negra. Años más tarde, en 1960 Ehringer y Hornykiewicz, descubrieron que en el núcleo caudado de los pacientes parkinsonianos había una disminución importante de dopamina en comparación con los controles. Este hallazgo fue crucial en la búsqueda de tratamientos efectivos para la enfermedad. Así, a finales de los años 60, George C. Cotzias inició la era moderna de la terapia antiparkinsoniana al demostrar que la levodopa, un precursor de la dopamina que se transforma en ésta cuando llega al cerebro, mejoraba espectacularmente los síntomas de los pacientes. Desde entonces, la levodopa constituyó y sigue constituyendo la base del tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Muñoz, 2001).

1.4. CARACTERISTICAS CLINICAS

1.4.1. SÍNTOMAS MOTORES

□ Temblor

El temblor característico suele ser un temblor distal de reposo a 3-6 Hz, pero en algunos pacientes puede iniciarse bien con un temblor de actitud, o con ambos tipos, y la forma de presentación del temblor puede cambiar a lo largo de la evolución de la enfermedad. Habitualmente, las extremidades superiores son las que se ven afectadas en primer lugar; pero en algunos casos la enfermedad puede manifestarse con temblor en una extremidad inferior, en la cabeza o incluso, en labios y lengua. Cuando afecta a la extremidad superior adopta la forma de "contar píldoras" en la que el dedo pulgar se desliza sobre el resto de los dedos de la mano.

La proporción de pacientes con enfermedad de Parkinson que tienen temblor a lo largo de la evolución de la enfermedad oscila, según las series clínicas publicadas, entre el 79 y el 90%. El temblor de reposo disminuye, e incluso desaparece, cuando el sujeto realiza un movimiento voluntario con la extremidad afectada (como abrir o cerrar la mano) y se intensifica al realizar movimientos repetitivos con la extremidad contralateral.

El temblor postural o de acción suele ser de grado leve o moderado y se observa habitualmente en los estadios más avanzados de la enfermedad. En general, es un temblor de una frecuencia superior (6-8 Hz) al del temblor de reposo y su amplitud aumenta al finalizar el movimiento. Se cree que la asociación de este temblor de actitud y rigidez da lugar a la sensación de rueda dentada que aparece en la exploración de estos pacientes.

Aunque es muy indicativa, la existencia de un temblor de reposo no siempre indica que el paciente tenga enfermedad de Parkinson, ya que puede aparecer en otro grupo de entidades que cursan con parkinsonismo (por ejemplo la atrofia multisistémica) (Luquin y Moya, 2003).

□ **Bradicinesia**

La bradicinesia, o lentitud en la realización de movimientos voluntarios simples y complejos, comprende tres elementos (acinesia, bradicinesia e hipocinesia) y es el síntoma que crea más incapacidad funcional a los pacientes con enfermedad de Parkinson. Está presente, dependiendo de las series publicadas, en el 78 o 98 % de los pacientes. Sin embargo, aunque es un signo presente en prácticamente todos los pacientes, puede aparecer también en pacientes sin trastorno neurológico y en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Característicamente, los movimientos que más se afectan en la enfermedad de Parkinson son los automáticos como el parpadeo, que causan una menor expresividad facial. Otros signos bradicinéticos típicos en estos pacientes son la disminución en el tono de la voz (hipotonía), el habla monótona, la disminución de la velocidad, calidad y tamaño de la escritura (micrografía) y la falta o reducción del braceo al caminar. El paciente presenta además una lentitud en la iniciación y realización de todo tipo de movimientos voluntarios. Generalmente, los pacientes refieren dificultad para realizar movimientos finos o precisos con las manos. La bradicinesia es la manifestación clínica más incapacitante de la enfermedad de Parkinson, síntoma que suele limitar la realización de las actividades de la vida diaria (Luquin y Moya, 2003).

❑ Rigidez

Clínicamente, la rigidez se caracteriza por la resistencia al desplazamiento pasivo de una articulación y afecta a los músculos flexores y extensores. Típicamente, la rigidez se detecta a lo largo de todo el movimiento, a diferencia de lo que ocurre en la espasticidad. La rigidez suele encontrarse en el momento del diagnóstico de la enfermedad y los músculos axiales suelen encontrarse afectados más tempranamente y con mayor intensidad que los distales. La rigidez es un hallazgo muy frecuente en diferentes entidades que afectan a los ganglios basales (Luquin y Moya, 2003).

❑ Inestabilidad postural

La inestabilidad postural es el síntoma motor que más tardíamente aparece en la evolución de la enfermedad de Parkinson. Se trata del síntoma más incapacitante desde el punto de vista funcional y en el que menos responde al tratamiento farmacológico. Es la manifestación clínica que define el estadio III de la escala de Hoehn y Yahr (escala que hace una clasificación clínica de la enfermedad) y aproximadamente el 37% de los pacientes alcanzan este estadio 5 años después de haberse iniciado la sintomatología.

Las alteraciones posturales y de la marcha tienen un origen multifactorial y se han relacionado con alteración de los reflejos de enderezamiento, rigidez, bradicinesia, etc. La pérdida de los reflejos de enderezamiento a menudo se produce en estadios tempranos de la enfermedad e incluso pueden transcurrir varios años hasta que provocan alteraciones funcionales en los pacientes; pero una vez que éstos han perdido la capacidad para hacer correcciones rápidas del equilibrio, las caídas son

muy frecuentes, lo cual limita enormemente la autonomía de los pacientes.

Los trastornos de la marcha ocurren en los estadios avanzados de la enfermedad de Parkinson. Cuando la enfermedad progresa el paciente tiene dificultad para iniciar la marcha, los pasos son muy cortos y aparece la festinación, que consiste en una marcha a pasos cortos y rápidos de forma incontrolada que le impide detenerse hasta que no encuentra un obstáculo en su camino. La congelación de la marcha no es exclusiva de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo estas alteraciones de la marcha aparecen en el 80% de los pacientes con enfermedad de Parkinson de más de 10-15 años de evolución (Luquin y Moya, 2003).

1.4.2. SÍNTOMAS NO MOTORES

Los síntomas no motores de la enfermedad han sido los menos estudiados y, consecuentemente, son menos conocidos que los síntomas motores. Sin embargo, en algunos casos pueden ser igual de incapacitantes o más que los síntomas motores. Los síntomas no motores se enlistan a continuación.

□ Alteraciones cognitivas y psiquiátricas

Los trastornos cognitivos están presentes en mayor o menor frecuencia en todos los pacientes con enfermedad de Parkinson. Las alteraciones cognitivas presentes en los pacientes con enfermedad de Parkinson oscilan entre déficit cognitivo muy sutil, demostrable únicamente con tests neuropsicológicos, hasta una franca demencia. Las alteraciones cognitivas observadas con más frecuencia en pacientes con enfermedad

de Parkinson afectan a las funciones ejecutivas (procesos mentales requeridos para elaborar y planificar una respuesta ante situaciones ambientales nuevas), al procesamiento visuoespacial y a la memoria de trabajo. Su frecuencia en la enfermedad de Parkinson oscila entre el 15-25%, pudiendo afectar hasta a un 70% de pacientes con enfermedad de Parkinson de edad mayor a 80 años. El origen patológico de la demencia no se conoce, pero algunos estudios histopatológicos indican que este puede ser debido al depósito de α -sinucleína y a la presencia de cuerpos de Lewy corticales; lo que sugiere la posibilidad de que los pacientes con enfermedad de Parkinson y demencia tengan en realidad una enfermedad de los cuerpos de Lewy difusa.

La depresión es el trastorno afectivo más frecuente en la enfermedad de Parkinson. Se estima que afecta entre el 20 y el 40% de los casos y es indicativo de un peor pronóstico de la enfermedad. Otras manifestaciones psiquiátricas son los trastornos de ansiedad, que adoptan la forma de crisis de angustia (Luquin y Moya, 2003).

□ Alteraciones del sueño

Las alteraciones del sueño son frecuentes en la enfermedad de Parkinson y afectan al 74-98% de los pacientes. Su etiopatogenia probablemente es multifactorial y en ella intervendrían, por un lado, una disfunción primaria de los mecanismos reguladores del sueño, asociada a la propia enfermedad y, por otro, múltiples factores que en estos pacientes pueden interferir en la calidad del sueño (por ejemplo envejecimiento, progresión de la enfermedad, y efecto de los fármacos antiparkinsonianos) (Luquin y Moya, 2003).

❑ Alteraciones oculomotoras

Las alteraciones de la motilidad ocular están presentes prácticamente en la totalidad de los pacientes con enfermedad de Parkinson, pero son siempre de carácter leve. Éstas se caracterizan por sacadas voluntarias hipométricas, fenómeno de rueda dentada en los movimientos de persecución ocular, reflejo optocinético por debajo del rango normal y dificultad para la convergencia y la mirada vertical hacia arriba (Luquin y Moya, 2003).

❑ Alteraciones autonómicas

Las alteraciones autonómicas son muy frecuentes en los pacientes con enfermedad de Parkinson, pero habitualmente son de carácter leve. La alteración autonómica más frecuente e importante de los pacientes con enfermedad de Parkinson es el estreñimiento que, en algunos casos, puede provocar cuadros de pseudoobstrucción intestinal. Las alteraciones urinarias también son muy frecuentes y consisten en nicturia y polaquiuria (Luquin y Moya, 2003).

❑ Alteraciones sensitivas

Aproximadamente el 40% de los pacientes con enfermedad de Parkinson refieren síntomas sensitivos en forma de hormigueos o entumecimiento de las extremidades (Luquin y Moya, 2003).

1.5. INCIDENCIA

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en el adulto (Bertram y Tanzi, 2005).

Europa y Norteamérica poseen la incidencia más alta, mientras que Asia y África poseen la más baja (Li y cols, 1985; Schoenberg y cols, 1988). La mayoría de los estudios han demostrado una mayor incidencia en hombres que en mujeres (Muños, 2001), aunque en dos estudios poblacionales europeos se ha encontrado una incidencia similar para ambos sexos (Morgante y cols., 1992; de Rijk y cols., 1995).

La frecuencia de la enfermedad de Parkinson en general es del 1 % en población mayor de 65 años de edad (Dawson y cols, 2003; Gasser, 2005), pero puede incrementar a 4-5% a la edad de 85 años (Dawson y cols, 2003).

De acuerdo con un reporte del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez en el año 2001 se informó que la frecuencia de la enfermedad de Parkinson en la población mexicana es de 50 por cada 100.000 habitantes, mientras que en otras partes del mundo la misma se presenta en 150 a 200 individuos por cada 100.000 habitantes por año. (www.innn.com.mx, 2001).

1.6. PATOLOGÍA

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza patológicamente por: 1) la pérdida de neuronas del núcleo pigmentado (Figura 2), particularmente afectando la porción compacta de la sustancia negra, y 2) frecuentemente presenta inclusiones citoplasmáticas conocidos como cuerpos de Lewy (Factor y Weiner, 2002). Sin embargo no todas las neuronas dopaminérgicas son susceptibles de la misma manera, y se desconoce el motivo. Sin embargo Lang y Lozano (1998) ofrecen dos posibles explicaciones: 1) La capacidad de dichas neuronas de tomar toxinas endógenas como toxinas extrínsecas a través de mecanismos selectivos de transporte, así como por el transportador de dopamina; 2) el elevado estrés metabólico, la alta actividad fisiológica de oxidación de proteínas, la generación selectiva de toxinas potenciales o la falla en la destoxificación o la combinación de ambos, y los requerimientos específicos dados por los factores neurotróficos.

Microscópicamente se observa despigmentación de la sustancia negra y del *locus coeruleus*, debido a la pérdida neuronal en la sustancia negra con un patrón característico; existe mayor degeneración de las células de la región ventrolateral, con menor afectación de las células de la región dorsal. La pérdida neuronal se acompaña de pigmento libre o en el interior de macrófagos y de una intensa astrocitosis (Figura 2) (Luquin y Moya, 2003). También se aprecian a los astrocitos alargados en las áreas afectadas mientras que los núcleos microgliales se observan incrementados. Otra característica histológica es la presencia de gránulos de melanina, los cuales se encuentran extracelularmente en los neutrófilos o dentro de los macrófagos. La microglia es activada y expresa antígenos MHC tipo II. El potencial de estas células para la actividad citotóxica es muy notable y puede contribuir a la pérdida de neuronas, en el subnúcleo compacto, se ha estimado que el intervalo va de 50-85%. (Factor y Weiner, 2002).

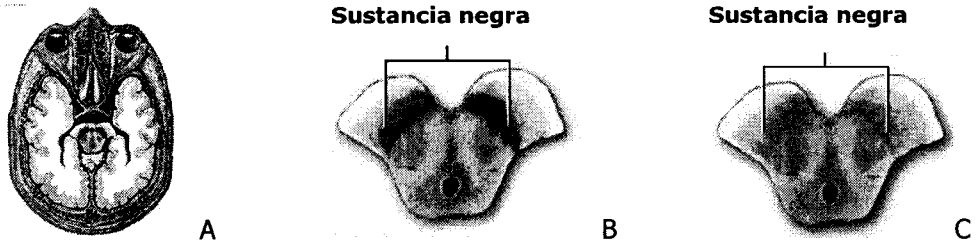


Figura 2. La sustancia negra en la enfermedad de Parkinson

A) Ilustra el sitio donde se localiza la sustancia negra. **B)** Demuestra como se observa la pigmentación de la sustancia negra en un control sano y **C)** se observa su despigmentación por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en pacientes con EP. (Tomada y modificada de www.nlm.nih.gov)

La degeneración neuronal en la sustancia negra produce una disrupción de las proyecciones dopaminérgicas nigroestriales que a su vez causa una depleción masiva de dopamina en el estriado, con mayor afectación del putamen que del caudado (Luquin y Moya, 2003).

Los signos clínicos de la EP sólo aparecen cuando se pierde alrededor del 80% de las neuronas dopaminérgicas del estriado y aproximadamente el 50% de las nigricas. En consecuencia hay una fase presintomática o subclínica de la EP en la cual existe una pérdida neuronal activa sin signos físicos perceptibles. Se han encontrado cuerpos de Lewy aislados post mortem en algunos pacientes que fallecen sin parkinsonismo, demencia u otra enfermedad del sistema nervioso central. La frecuencia de estos casos se incrementa conforme avanza la edad, de modo que hay un 4% en la quinta década y hasta un 15% de los casos en la novena y la décima décadas de la vida (Martin, 1999).

Como anteriormente se mencionó existe otra característica patológica importante en la EP que son los cuerpos de Lewy (Lang y Lozano, 1998). Los

cuerpos de Lewy se han encontrado en un número considerable de cerebros con la EP (Eriksen y cols, 2005). Si bien el cuerpo de Lewy es una inclusión intraneuronal hialina cuya presencia es esencial para la confirmación anatomopatológica de la EP, desafortunadamente no es del todo específico de esta enfermedad y aparece en cierto número de otras enfermedades neuropatológicas, incluyendo a la enfermedad de Hallervorden-Spatz, la ataxia-telangiectasia y la panencefalitis esclerosante subaguda. Además los cuerpos de Lewy pueden coexistir con otras patologías del sistema nervioso central tales como la enfermedad de Alzheimer y las inclusiones citoplasmáticas gliales (Micheli, 1998; Lang y Lozano, 1998). Desde el punto de vista morfológico, los cuerpos de Lewy tienen una estructura eosinofílica central rodeada de un halo claro. Su tamaño es variable y pueden ser incluso mayores que el núcleo de la célula. En ocasiones se encuentran formando estructuras concéntricas de densidad creciente hacia el centro del cuerpo, pero otras veces son inclusiones hialinas sin límites precisos. Se encuentran en las neuronas de la sustancia negra, en el *locus coeruleus*, en los núcleos dorsal del vago, serotoninérgicos del rafe y basal de Meynert, en el hipotálamo, en los núcleos pedunculopontino y de Edinger-Westphal, en la columna intermediolateral de la médula espinal, en la corteza cerebral, en los plexos mientéricos de Auerbach y Meissner y en los ganglios autonómicos.

Los cuerpos de Lewy están formados principalmente por filamentos del citoesqueleto que pertenecen a neurofilamentos que han sufrido una serie de alteraciones como fosforilación, ubiquitinización y proteólisis. Se tiñen con anticuerpos frente a neurofilamentos fosforilados y ubiquitina y son débilmente reactivos cuando se utilizan anticuerpos anti-tau y anti-tubulina. Las proteínas fibrilares que constituyen los cuerpos de Lewy se tiñen con tinciones de plata y al microscopio electrónico muestran perfiles rectilíneos de 10 a 20 nm de diámetro. Parece que la α -sinucleína es el principal

componente de los cuerpos de Lewy, hallazgo que resulta muy interesante si se tiene en cuenta que las mutaciones del gen de la α -sinucleína están asociadas al desarrollo de enfermedad de Parkinson familiar autosómico dominante. Se desconoce cuál es el mecanismo por el que se forman los cuerpos. Parece que se forman en varias etapas que incluyen una agregación de material proteico, fosforilación, proteólisis y ubiquitinación.

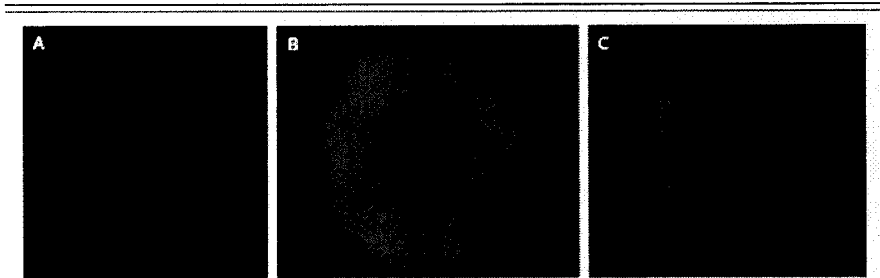


Figura 3. Patrón de tinción que presentan los cuerpos de Lewy. A) Tinción con anticuerpos contra ubiquitina, B) Tinción con anticuerpos contra la α -sinucleína y C) Tinción con los dos anticuerpos anteriores.

La enfermedad de Parkinson causada por mutaciones del gen de la parkina es la excepción. Los pacientes afectados por esta enfermedad tienen pérdida de neuronas dopaminérgicas en la porción compacta de la sustancia negra y del *locus coeruleus*, pero no existen cuerpos de Lewy (Luquin y Moya, 2003), sin embargo se ha demostrado una reacción inmunopositiva por la parkina en cuerpos de Lewy en cerebros de pacientes con Parkinson (Imai y Takahashi, 2004).

1.7. ETIOLOGÍA

Aunque la etiología de la enfermedad de Parkinson (EP) se desconoce, durante los últimos años los estudios histológicos de los cerebros de pacientes y en los modelos animales de esta enfermedad han contribuido de forma sustancial al conocimiento de los mecanismos moleculares relacionados con la degeneración de las células dopaminérgicas de la sustancia negra (Luquin y Moya, 2003). Además de los estudios genéticos y los reportes epidemiológicos, las investigaciones neuropatológicas están aportando nuevas e importantes visiones en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (Dawson y Dawson, 2003).

Entre las hipótesis patogénicas destacan: incremento del estrés oxidativo, la exposición a factores ambientales (toxinas como rotenona y 1-metil-4-fenil-2,3,6-tetrahidropiridina [MPTP], excitotoxicidad, inflamación, apoptosis y mutaciones génicas (Luquin y Moya, 2003).

Existe un gran debate por el hecho de que sean solo causas genéticas o solo causas ambientales, las que ocasionen la EP, estas propuestas son probablemente una hipótesis muy simple (Luquin y Moya, 2003). Incluso durante el siglo pasado, las teorías sobre las causas de la EP regularmente se hacían en base a factores genéticos y ambientales. Recientemente, se han propuesto teorías multifactoriales las cuales consisten en una interacción entre factores genéticos y ambientales. Sin embargo la teoría predominante, de acuerdo a observaciones epidemiológicas, se basa en la distribución de la EP en las poblaciones y en la asociación de factores de riesgo identificados en estos grupos. Hasta la fecha se han descrito solo algunas formas de parkinsonismo. Las causas en la mayoría de los casos son aún inexplicables. (Factor y Weiner, 2002).

Por ello debemos considerar a la enfermedad de Parkinson como un desorden complejo, resultado de la interacción tanto de factores genéticos

como de factores ambientales (Luquin y Moya, 2003), y la interacción entre estos factores ocasiona la mayoría de los casos de Parkinson esporádico (McNaught y Olanow, 2003). Sin embargo avances recientes en genética molecular han revelado una importante influencia genética sobre el desarrollo de dicho desorden (Feany, 2004), a pesar de que los factores ambientales hayan recibido un mayor interés (Eriksen y cols, 2005).

1.7.1 EDAD

De acuerdo con Micheli (1998) la EP es más frecuente en los ancianos que en los jóvenes. La evaluación del papel del envejecimiento ha sido esencial y todavía es discutible si la edad por sí misma es un factor de riesgo para su desarrollo. Los signos de parkinsonismo tales como bradicinesia y rigidez, además de los problemas posturales y de la marcha, aumentan claramente con la edad; en cambio la prevalencia del temblor de reposo, probablemente el signo más confiable de la enfermedad, permanece inalterada en las últimas décadas de la vida.

Sin embargo Lang y cols. (1998) y Dekker y cols. (2003) mencionan que la edad es un único factor de riesgo y el más consistente, conforme aumenta la edad en la población, se eleva la prevalencia de la EP.

1.7.2 FACTORES AMBIENTALES.

En ausencia de alguna causa genética para la mayoría de los casos de Parkinson esporádicos, los factores ambientales se ha pensado que juegan un papel importante en este desorden. Varios estudios epidemiológicos se han llevado a cabo para determinar cuales factores pueden ser importantes.

La vida rural se ha identificado en varios estudios como un factor relativo de riesgo que incrementa el desarrollo de la EP, sin embargo estas

observaciones no han sido consistentes. La vida rural frecuentemente esta asociada con la agricultura, y el trabajo en este ambiente también se ha asociado como un factor de riesgo que incrementa el desarrollo de la EP. Estas observaciones han surgido por el uso de pesticidas y herbicidas, que pueden contribuir en el aumento de riesgo para padecer la EP (Warner y cols, 2003).

También el contacto con aguas residuales y el consumo de agua de pozo se han asociado con la EP, pero de igual forma no todos los estudios coinciden en los mismos factores de riesgo (Muñoz, 2001).

La aparición de cuadros de parkinsonismo secundarios a la intoxicación con *1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)* reforzó la hipótesis de la etiología tóxico-ambiental en la EP. Los primeros casos de parkinsonismo en intoxicados por MPTP fueron descrito en adictos a narcóticos por vía parenteral. A excepción del rápido inicio de los síntomas, los pacientes presentaban un cuadro clínico similar al descrito en la enfermedad de Parkinson, con respuesta a levodopa y aparición de discinesias secundarias al tratamiento. El MPTP atraviesa la barrera hematoencefálica fácilmente debido a su gran liposolubilidad y en las células gliales es oxidado y convertido, a través de la monoamino-oxidasa B, en 1-metil-4-fenil-piridinio (MPP^+), que es la neurotoxina activa, siendo posteriormente recaptado por las neuronas nigroestriatales. El MPP^+ se concentra en la mitocondria e inhibe al complejo I de la cadena respiratoria interfiriendo en la síntesis de ATP con el consiguiente fallo energético celular que conduce de forma inexorable a la muerte neuronal (Muñoz, 2001).

Warner y cols, (2003) reportaron que la infusión sistémica de rotenona en ratas indujo la muerte celular dopaminérgica selectiva, inclusiones proteicas y deficiencias motoras).

En contraste, existen factores protectores que se han observado, como el fumar cigarros, la ingesta de alcohol y de cafeína, pero aun no está bien definido como estos agentes pueden influenciar en el riesgo de la EP (Farrer, 2006).

En la tabla 1 se resumen los factores de riesgo que se han asociado con mayor frecuencia a la EP en diversos estudio epidemiológicos (Muñoz, 2001).

Tabla 1. Factores de riesgo que se han asociado a la EP

Envejecimiento
Historia familiar de EP
Vivir en ambiente rural
Consumo de agua de pozo
Contacto con pesticidas
No fumar

1.8 FACTORES GENÉTICOS.

Desde que Gowers señalara que aproximadamente un 15% de los pacientes con enfermedad de Parkinson tenían un familiar afectado, se ha considerado que la enfermedad podría tener un origen genético (Huang y cols, 2004; Eriksen y cols, 2005). Sin embargo, hasta hace muy poco tiempo no se había podido demostrar que las anomalías de determinados genes podrían originar ciertas formas de parkinsonismo familiar (Luquin y Moya, 2003).

La mayoría de los casos son esporádicos y, en éstos la etiología de la enfermedad podría ser multifactorial y en ella desempeñaría un papel crucial la interacción de factores genéticos y ambientales (Huang y cols, 2004; Dekker y cols, 2003).

Un gran número de estudios en gemelos sugieren que existe una fuerte evidencia de que la herencia participa en la EP e influye en la edad de inicio antes de los 50 años de edad (Dekker y cols, 2003).

En los casos aislados, la posibilidad de que exista un factor genético determinante de la enfermedad está directamente relacionado con la edad de presentación de los síntomas, de tal modo que, cuanto más pronto aparezcan, mayor es la probabilidad de que la enfermedad tenga un origen genético. Se ha calculado que en 1 de cada 2 sujetos con una edad de presentación de la enfermedad de 35 y 45 años existe una alteración genética, mientras que solamente el 1 de cada 72 casos en los que los síntomas se manifiestan después de los 65 años se demuestra un origen genético (Luquin y Moya, 2003).

Existen estudios donde se observaron que la mayoría de los casos de Parkinson no pueden ser explicados por modelos genéticos simples. Un estudio en gemelos suizos, demostró una baja concordancia en gemelos, y

en un análisis de tres grupos de casos en Canadá no fue compatible con factores ambientales (Gasser, 2005).

Hasta la fecha existen genes o *loci* descritos en formas familiares monogénicas asociados a la enfermedad de Parkinson en diferentes poblaciones. Sin embargo estas familias presentan una segregación mendeliana ambigua. Desde 1997, se han reportado 11 genes o loci por ligamiento genético. Seis de estos, están implicados en la EP con patrón de herencia autosómico dominante y cuatro son de herencia autosómica recesiva y uno con edad de inicio tardío, que es semejante al Parkinson esporádico (Dekker y cols., 2003). Ver tabla 2.

El resultado de los estudios epidemiológicos pueden ser compatibles con que la enfermedad es causada por alguna mutación con un baja penetrancia y con una edad de inicio variable (Gasser, 2005).

TABLA 2. GENES ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

LOCUS/ GEN	HERENCIA	EDAD DE INICIO (años)	PATOLOGÍA	LOCALIZACION	PROTEINA/ GEN
<i>PARK1</i>	Dominante	40	Degeneración de SN c/ cpo LW	4q21	α -sinucleína tripleplicacion de α -sinucleína
<i>PARK2</i>	Recesiva	20-40	Degeneración de SN c/ cpo LW	6q25	Parkin
<i>PARK3</i>	Dominante	60	Degeneración de SN c/ cpo LW, en algunos casos con placas y marañas	2p13	Desconocido
<i>PARK5</i>	Dominante	Al 50	No hay reporte patológico	4p14	Ubiquitina C- terminal hidrolasa L1
<i>PARK6</i>	Recesiva	30-40	No hay reporte patológico	1p35-37	PINK-1
<i>PARK7</i>	Recesiva	30-40	No hay reporte patológico	1p38	DJ-1
<i>PARK8</i>	Dominante	Al 60	α -sinucleína y tau patologia variable	12cen	LRRK2
<i>PARK10</i>	Dominante	50-60	No hay reporte patológico	1p32	Desconocido
<i>PARK11</i>	Dominante	Tarde	No hay reporte patológico	2q34	Desconocido

SN= Sistema Nervioso

Cpo Lw= Cuerpos de Lewy

1.8.1 PARK1 O α -SINUCLEÍNA

DISTRIBUCION DE LA α -SINUCLEÍNA EN EL CEREBRO.

La α -sinucleína fue localizada por un estudio de expresión en una librería de cDNA del órgano electromotor del *Torpedo californica* por Maroteaux y cols en 1988, mediante anticuerpos contra vesículas sinápticas purificadas. El órgano electromotor del *Torpedo* está constituido por un amplio grupo de neuronas motoras colinérgicas que inervan a las células del órgano eléctrico, el cual es rico en alta densidad de sinapsis. Por lo que constituye un excelente material de estudio de proteínas que regulan las transmisiones sinápticas.

El mRNA de α -sinucleína se encuentra ampliamente expresado en la corteza cerebral, en la corteza frontal (capas II, III, V, y VI), el caudado y putamen. La distribución de la expresión de la proteína de la α -sinucleína es esencialmente similar a la del mRNA (Mizuno y cols., 2005).

GEN DE LA α -SINUCLEÍNA

La α -sinucleína o PARK1 fue el primer gen identificado relacionado con la enfermedad de Parkinson (Gasser, 2005). Identificado en una gran familia italiana con herencia autosómica dominante y edad de inicio temprano. El cual fue mapeado en el cromosoma 4q21-q22.

La mutación Ala53Thr (G157A) (fig.4) fue encontrada en una familia americano-italiana y también en 3 familias no relacionadas de descendientes griegos (Polymeropoulos y cols, 1997). Se ha estudiado la región del gen de la α -sinucleína con diversos marcadores, y se observa que existe un haplotipo común en las familias, lo que sugiere un efecto fundador debido a la edad histórica entre las dos regiones de origen italiano (Dekker y cols, 2003). Posteriormente esta mutación fue identificada en otras familias de origen griego (Dekker y cols, 2003; Spira, Halliday y cols, 2001).

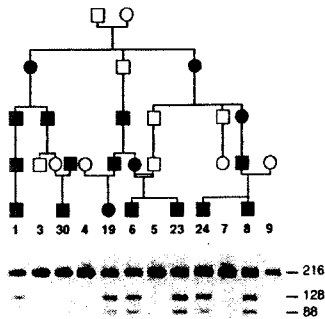


Figura 4. Segregación de la mutación Ala53Thr (G209A) en una familia italiana. Los símbolos rellenos indican individuos afectados. Se demuestra que la mutación tiene una segregación completa con el fenotipo (EP), con excepción del individuo No. 30 (Polymeropoulos y cols, 1997).

La mutación Ala53Thr en el gen de la α -sinucleína es rara pero se ha encontrado en varios descendientes griegos (Dawson, 2003; Gasser, 2001).

Una segunda mutación, Ala30Pro (G88C), fue encontrada en una familia alemana, lo cual dio mayor relevancia a la α -sinucleína en la etiología y patogénesis en al menos algunos casos de EP familiar (Goedert, 2001). En el 2004, se reportó una tercera mutación (Glu46Lys) en una familia española.

Las mutaciones en el gen de la α -sinucleína son una causa rara de la EP y han sido excluidas en un gran número de pacientes con EP familiar y esporádico (Gasser, 2001). Sin embargo otros autores como Eriksen opinan que las mutaciones son probablemente patogénicas, no como Gasser que opina que son una causa. Lo que es cierto es que aún no es claro como estas mutaciones conducen a una proteína alterada o potencializan la agregación de la α -sinucleína citoplasmática, lo cual lleve a la EP (Eriksen, 2005). Esto se ha supuesto por el hecho de que la α -sinucleína es uno de los componentes mayoritarios en los cuerpos de Lewy (Cookson, 2005).

Con los modelos animales en *Drosophila* (α -sinucleína transgénica) y en ratón, se ha demostrado que estas exhiben disfunción progresiva locomotora y pérdida de neuronas dopaminérgicas mimetizando el fenotipo de la EP (Feany y Bender, 2000; Masliah y cols, 2000).

TRIPLICACIÓN DEL GEN DE LA α -SINUCLÉINA.

El importante descubrimiento de Singleton y cols.(2003) fue encontrar la triplicación del tipo silvestre del gen de la α -sinucleína en un familia grande con diferentes orígenes (escoceses, holandeses, irlandeses y americanos) que causa parkinsonismo con o sin demencia, y fue confirmado en otras familias. Estos hallazgos son importantes porque producen un incremento en los niveles de la α -sinucleína, que pueden ser medidos en sangre, en estos casos la triplicación puede ser tóxico para las neuronas, esto muestra que la dosis de la α -sinucleína son una causa rara de EP dominante y es muy rara en EP esporádico (Gasser, 2005).

LA PROTEÍNA α -SINUCLÉINA.

La α -sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos, es soluble, se desconoce su función (Huang, 2004) y se encuentra altamente conservada (Jarman y Word, 1999). Es una proteína nervio terminal presináptica, fue originalmente identificada como proteína precursora de la no β -amiloide como componente de las placas amiloides en la enfermedad de Alzheimer (Polymeropoulos y cols, 1997). Se ha observado que la α -sinucleína se une a un gran número de proteínas y también a lípidos de membrana (Dawson, 2003). Se localiza principalmente en la fracción citosólica y varias fracciones membranales y vesiculares, de acuerdo con fraccionamiento subcelular, sugiere que la proteína se encuentra asociada con estructuras de las membranas incluyendo vesículas sinápticas (Mizuno y cols, 2005).

El significado fisiológico de estas interacciones se desconoce. Se ha sugerido que la α -sinucleína puede jugar algún papel en la modulación de las vesículas sinápticas y plasticidad sináptica (Dawson, 2003).

Un incremento en la proteína soluble α -sinucleína causa la enfermedad de Parkinson familiar con herencia autosómica dominante. Lo relevante en este caso es que existe un metabolismo aberrante y el incremento de la α -sinucleína silvestre es probablemente la causa de la pérdida de neuronas dopaminérgicas.

Las características clínicas de estos sujetos afectados provenientes de estas familias son compatibles con los que Parkinson esporádico, pero la edad de inicio es menor (promedio de 45 años), y la progresión es mas rápida que en los Parkinson esporádico (Gasser, 2001). En autopsias de pacientes se han encontrado varios cuerpos de Lewy corticales, y el diagnóstico patológico sugiere una enfermedad de cuerpos de Lewy difusos (Mizuno y cols, 2005).

1.8.2 *PARK8* O *LRRK-2*

En el 2002 por análisis de ligamiento en el cromosoma 12p11.2-q13.1 fue descrito el *locus PARK8* en una familia japonesa con parkinsonismo autosómico dominante por Funayama y cols. Las características clínicas de la familia fueron muy parecidas a la EP típica, con buena respuesta a la levodopa. La edad promedio fue de 51 años de edad. Los resultados neuropatológicos en los cuatro casos con parkinsonismo *PARK8* mostraron degeneración pura de la sustancia negra y sin la presencia de cuerpos de Lewy.

Este descubrimiento posteriormente fue confirmado por ligamiento en varias familias, y por secuenciación del gen mostraron varias substituciones patogénicas de aminoácidos (Farrer, 2006).

El gen *LRRK-2* consiste en 51 exones, con una longitud de 144 Kb (Biskup y cols, 2005). Codifica para una proteína grande, la dardarina, con 286 KDa, y que pertenece a la familia de proteínas Roco (Ross y Farrer, 2005) de la cual se desconoce su función. La presencia de un dominio de cinasa sugiere su participación en una o varias vías de señalización intracelular, y reforzando lo anterior con el hecho que también posee un dominio de GTPasa, características propias de las proteínas Roco. Existen otros dos dominios W40 en los que se supone que interactúan con otras proteínas (Cookson y cols., 2005).

Paisán-Ruíz y cols. (2004), observaron que el gen *LRRK-2* se expresa en el cerebro adulto. También se expresa con niveles altos en otros tejidos, lo cual no es usual en genes que causan enfermedades neurodegenerativas. También reportaron la mutación R1441G en familias Vascas, representando al 8% de sus pacientes. Zabetian y cols. (2005), reportó una nueva mutación R1441H en donde encontró junto con otra mutación reportada que produce otro cambio (R1441C, ver figura 5, mutación No. 4). Encontraron familias que tenían estas mutaciones e individuos dentro de estas familias que eran portadores de las dos mutaciones pero que no presentaban los síntomas de la enfermedad, por lo que sugiere que estas mutaciones presentan penetrancia incompleta.

Existen otras mutaciones reportadas en el gen *LRRK-2*. Como es el caso en donde se reportó el cambio de aminoácido I2020T, en la familia original donde se encontró el *locus PARK8*. Esta mutación se localiza en el dominio de cinasa, el cual se encuentra altamente conservado en varias especies, sugiriendo que esta mutación causa cambios funcionales en el producto del gen, a pesar de que su función precisa se desconoce (Funayama y cols., 2005). Esta mutación fue también encontrada en otra familia por Zimprich y cols (2004).

Otra mutación reportada es la G2019S (figura 5, corresponde a la No. 10), la cual se estima que es responsable del 1% de los casos esporádicos típicos y el 5% de los casos con historia familiar. Las poblaciones que han sido estudiadas y en las cuales se ha encontrado la mutación G2019S son: estadounidenses (Farrer y cols., 2005), familias con ascendentes Europeos (Zabetian y cols., 2005), caucásicos y portugueses (Bras y cols., 2005), africanos del norte y franceses (Lesage y cols., 2005). Existen reportes en los que se encuentran portadores de la mutación G2019S y que no presentan los síntomas de la enfermedad a una edad adulta mayor. Por ello la mutación G2019S también presenta penetrancia incompleta (Cookson y cols. 2005). A continuación se muestra una figura de la proteína dardarina con las mutaciones encontradas.

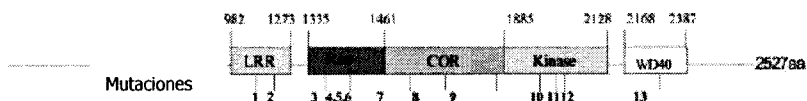


Figura 5. Dardarina y mutaciones encontradas en los diferentes dominios que la conforman. (Tomada y modificada del Li C y cols., 2005).

1.9 GEN DE LA PARKINA O *PARK 2*.

Las mutaciones en el gen de la parkina fueron descritas por primera vez en familias japonesas consanguíneas con EP juvenil autosómico recesivo (AR-JP, por sus siglas en inglés: *Autosomal recessive juvenile Parkinson*), por Yamamura en 1973 (Gasser, 2005; Mizuno y cols., 2001). Son las más comunes dentro de las 3 formas familiares recesivas. Existe una débil correlación entre las manifestaciones clínicas y el tipo de mutación (Gasser, 2005). Los análisis de ligamiento y de mutaciones hechos a la fecha han sugerido varios efectos fundadores con las mutaciones en este gen y se

encuentran ampliamente distribuidos en el mundo (Matsumin y cols., 2001). De hecho se estima que por arriba del 50 % de los casos de parkinsonismo hereditario se deben a las mutaciones en el gen de la parkina (Kahle y Haass, 2004; Giasson y Lee, 2003).

Clínicamente, existe gran similitud con EP idiopático, pero la edad de inicio es más temprana y con progresión lenta (Toft y Farrer, 2005). La edad de inicio está por debajo de los 40 años, aunque es frecuente por debajo de los 30 años, y comúnmente se presentan características de distonia (Mizuno y cols., 2001). Se ha observado la ausencia de cuerpos de Lewy, pero se han reportado excepciones (Giasson y Lee, 2003).

Klein y cols. (2000) reportaron delecciones en la parkina en una familia italiana con 31 miembros, con edad de inicio tardío, con parkinsonismo dominante con temblor. Cuatro hermanos afectados presentaban delecciones heterocigotas en la parkina (una larga y otra truncada). Las características clínicas que se identificaron fueron las de EP idiopático. La edad de inicio se presentó en el rango de 31-75 años, pero 8 de los 11 pacientes iniciaron después de los 50 años. Ninguno de ellos mostró alguna de las características clínicas reportadas anteriormente para las mutaciones en el gen de la parkina. Por lo que sugieren que el gen de la parkina puede ser importante en la etiología en los pacientes con EP de edad avanzada que son los más comunes (Mizuno, 2001).

En estudios neuropatológicos en un número pequeño de pacientes se observó degeneración selectiva del tracto nigroestriado, con ausencia de cuerpos de Lewy (Dekker, 2003).

La asociación entre el parkinsonismo y el sistema ubiquitina-proteasoma se puede deducir por el hecho de que el producto del gen de la parkina tiene actividad de ubiquitina ligasa (Kahle y Haass, 2004; Giasson y Lee, 2003).

1.9.1 CARACTERÍSTICAS DEL GEN DE LA PARKINA.

Por análisis de ligamiento en 13 familias con AR-JP se localizó el gen *AR-JP* encontrándose en el cromosoma 6q25.2-27. Este gen que causa AR-JP fue nombrado como **parkina** (Dawson & Dawson, 2003). Contiene aproximadamente 1.3 Mb y 12 exones, en el cual se han encontrado más de 70 mutaciones entre las que se incluyen deleciones, triplicaciones y polimorfismos (Toft y Farrer, 2005). El cDNA tiene una longitud de 2860 pb con un marco abierto de lectura de 1395 pb (Matsumine y cols., 2001).

En la mayoría de los casos, el parkinsonismo ligado a la parkina se asocia a la pérdida de la función de ambos alelos. Sin embargo, en un grupo pequeño de pacientes, se realizó la secuenciación de toda la región codificante, del promotor, uniones intrón/exón y con el análisis de deleciones exónicas o duplicaciones se ha revelado alteración genética en solo un alelo. Por ello, es posible que la haploinsuficiencia del gen de la parkina pueda provocar la enfermedad.

El tipo de mutaciones encontradas son: 1) mutaciones puntuales, ya sea sin sentido o de sentido equivocado; 2) deleción de uno o varios exones que provoque la terminación prematura en la traducción o deleciones que conservan el marco de lectura; 3) duplicaciones o triplicaciones de exones que resulte en terminación prematura en la traducción; 4) inserciones o deleciones de uno, dos o cinco pares de bases, ocasionando mutaciones con cambio del marco de lectura; y 5) mutaciones en las conexiones intrón/exón que afecten el sitio donador en el proceso de *splicing* (Giasson y Lee, 2003).

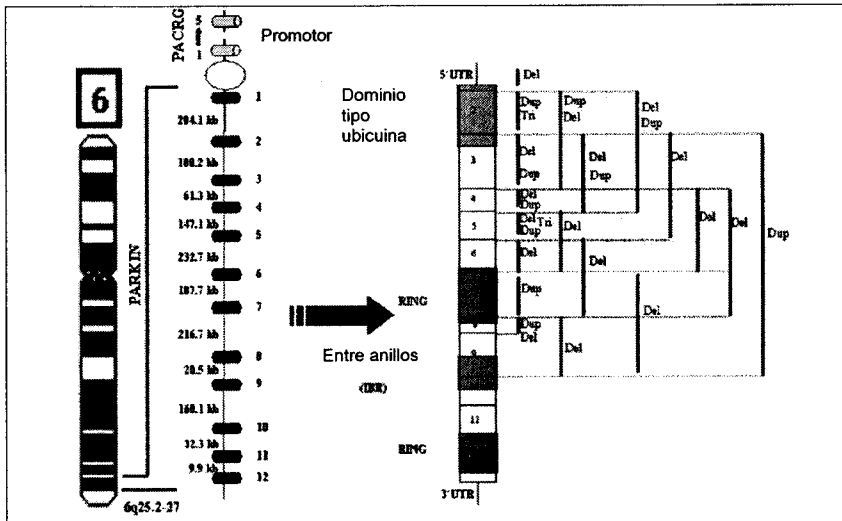


Figura 6. Gen de parkina y la distribución de las mutaciones reportadas. (Tomada y modificada de Mata I y cols, 2004).

1.9.2 PROTEINA PARKINA

Características de la proteína parkina

Es una proteína de 465 aminoácidos con una peso molecular de 51,652 D (Mizuno y cols., 2001). La parkina tiene un dominio similar de ubiquitina en su extremo amino terminal y dos motivos de dedos RING (*really interesting new gene*) que flanquean un dominio de dedos, ricos en cisteína, conocidos como la región entre **anillos IBR** (*in-between RING*) (Giasson y Lee, 2003; Imai y Takahashi, 2004). Varios estudios han revelado que numerosas proteínas con esos motivos de dedos RING, presentan actividad de proteína ubiquitina ligasa, con funciones propias o formando complejos con otros componentes (Imai y Takahashi, 2004).

Está bien establecido la **función de la parkina** en la vía de degradación celular por ubiquitinación como **ubiquitina ligasa**, pero se desconoce cómo

está pérdida de función lleva a la neurodegeneración como una proteína tóxica putativa (Gasser, 2005; Giassen y Lee, 2003).

La hipótesis que se hace acerca de la parkina es que los defectos en dicha proteína pueden ocasionar acumulación de sus sustratos (α -sinucleína glicosilada, sinfilina 1, PaelR y CDCrel-2) y que las proteínas acumuladas sean tóxicas para las neuronas (Jiang y Beaudet, 2004).

Se han identificado nuevas funciones de la parkina, posiblemente sea de igual o de mayor relevancia en la patogénesis de la EP que las mencionadas anteriormente. Por ejemplo, se ha demostrado que la parkina no sólo media la ubiquitinación vía lisina 48, para la degradación vía proteasoma, también lo hace vía lisina 63, la cual puede tener el papel en procesos de señalización intracelular y también en la formación de cuerpos de Lewy (Gasser, 2005).

El sistema ubiquitina proteasoma es el principal mecanismo responsable de:

- La eliminación de proteínas intracelulares con mutaciones, dañadas o con un mal plegamiento;
- La regulación de los niveles de proteínas de vida corta que median actividades como la transcripción de genes y la neurotransmisión.

Por ello el proceso de degradación de muchas proteínas no deseadas comienzan con su conjugación con una cadena de moléculas de ubiquitina como señal para ser reconocidas y degradadas por el proteasoma. Los monómeros de ubiquitina son activados por la enzima activadora de ubiquitina (E1), reacción dependiente de ATP. La ubiquitina activada es transferida a la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y posteriormente es unida covalentemente a la proteína que será degradada dicho paso es catalizado por la enzima ubiquitina ligasa (E3), dependiente de ATP. Estos pasos se repiten hasta formar una cadena poliubiquitinada. Para ser finalmente degradadas por el proteasoma. Como se mencionó anteriormente

la parkina funciona como ubiquitina ligasa, lo cual sugiere que las mutaciones en dicha proteína puedan estar involucradas en la falla de la degradación por el proteasoma (McNaught y Olanow, 2003).

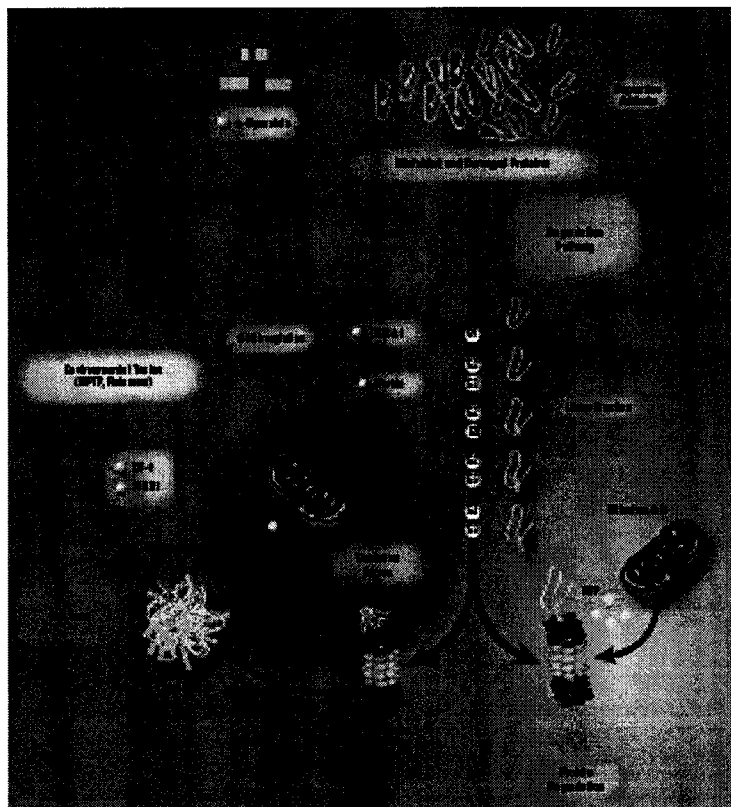


Figura 7. Mecanismo propuesto en el cual la parkina se relaciona con la enfermedad de Parkinson. (Tomada de Eriksen JL y cols, 2005).

1.9.3 POLIMORFISMOS

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) son como su nombre lo indica un cambio de un solo nucleótido en la secuencia del DNA. Son las formas más comunes de polimorfismos en el genoma humano. Han sido ampliamente usados en investigaciones como son: evolución, estudios de asociación en enfermedades complejas y estudios de farmacogenómica. La

cantidad de SNP's en las bases públicas ha incrementado dramáticamente, actualmente el número asciende a más de 10 millones de SNP's en humanos. Sólo el 50 % de los SNP's están validados, menos del 20 % de los SNP's validados cuentan con su frecuencia alélica (Xu H y cols, 2005).

Los factores de riesgo que se han identificado en tres genes son: la **parkina**, la α -sinucleína y la ubiquitina carboxilo terminal hidrolasa (UCHL1). Como se mencionó anteriormente existen mutaciones patogénicas en pacientes con parkinsonismo autosómico recesivo juvenil, pero su papel en la EP idiopático aún no está bien explorado. Existen ciertos polimorfismos en el gen de la parkina que pueden actuar como alelos de susceptibilidad para la enfermedad de Parkinson. A diferencia de las mutaciones, estos polimorfismos son comunes en la población. Los polimorfismos son variaciones genéticas presentes en individuos afectados y no afectados, pero pueden asociarse con la enfermedad si la frecuencia de los alelos o genotipos varían entre estos dos grupos de individuos. Para que un polimorfismo se considere una variación normal de la población y no una mutación su valor debe ser mayor al 1% en frecuencia en la población (Oliveria y cols, 2003).

En el polimorfismo Ser167Asn, el codón 167 está conformado por el triplete AGT, cuando existe el cambio de G→A en la posición 601(exón4) se obtiene el triplete AAT que codifica para la Asn. Para el polimorfismo Val380Leu, el codón 380 esta formado por el triplete GTG, sin embargo cuando es polimórfico puede ser el triplete CTG, por el cambio de G→C en el nucleótido 1239 en el exón 10.

Wang y cols., en 1999, reportaron 3 polimorfismos (**Ser167Asn**, Arg366Trp y **Val380Leu**) en el gen de la parkina en pacientes con EP y en controles japoneses, hallando que su frecuencia alélica y genotípica de estos SNP's no variaron entre controles y pacientes. Además de acuerdo a sus

estudios, los polimorfismos Ser167Asn y Val380Leu no tenían una influencia en la susceptibilidad para padecer Parkinson. Ellos mencionan que estos dos polimorfismos no tienen ningún efecto sobre la estructura secundaria y en la naturaleza hidrofóbica de la proteína parkina.

Satoh y Kuroda en 1999, analizaron el polimorfismo **Ser167Asn** en población japonesa, demostrando que la frecuencia de heterocigotos Ser167Asn fue estadísticamente significativa más alta en pacientes con Parkinson esporádico (62.0 %) que en controles (45.9 %), comparado con los dos genotipos estudiados. Concluyen que el polimorfismo Ser167Asn en el gen de la parkina contribuye a la susceptibilidad en la EP esporádico, siendo un factor de riesgo para la enfermedad. Mientras que Wang y cols al analizar 3 polimorfismos (**Ser167Asn**, Arg366Trp y **Val380Leu**) no encuentran diferencia entre pacientes y controles sanos. De acuerdo a sus resultados estos polimorfismos no influyen en la susceptibilidad para padecer EP.

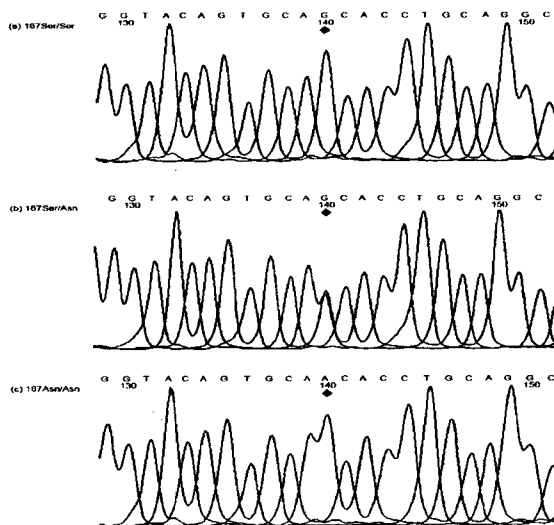


Figura 8. Genotipos del polimorfismo Ser167Asn en el gen de la parkina. (Tomada de Satoh y Kuroda, 1999)

Hu y cols. en el 2000 reportaron resultados similares, estudiaron tres polimorfismos del gen de la parkina incluyendo a **Ser167Asn** y **Val380Leu** en chinos taiwaneses, y no encontraron diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes con EP esporádico y los controles.

En el 2002, Mata y cols., investigaron cuatro polimorfismos dentro de los cuales se encontraba el polimorfismo **Ser167Asn** en población española. Concluyeron que ninguno de los polimorfismos que habían estudiado poseía frecuencias alélicas y genotípicas diferentes entre los pacientes y controles en estudio.

Peng y cols. en 2003, buscó en pacientes chinos deleciones y mutaciones puntuales en el gen *PARK2* con edad de inicio temprano y tardío por medio de secuenciación directa, no encontraron ninguna de estas deleciones o mutaciones, sin embargo encontraron un polimorfismo común el **Ser167Asn**. Encontrando una diferencia significativa en la frecuencia de los alelos y genotipos entre los pacientes y el grupo control, siendo el alelo 165Asn mas común en los casos que en los controles (46.6% vs. 35.1%; $X^2=6.54$, $p=0.011$, OR 1.61, con IC 95% 1.10-2.37). Ellos mencionan que su estudio sugiere que la variante 167Asn aumenta el riesgo para desarrollar la EP.

Oliveira y cols. en 2003, estudiaron 7 SNP's dentro de los cuales estaban **Ser167Asn** y **Val380Leu** en población estadounidense blanca. En ese estudio no se encontró diferencia en las frecuencias de los alelos y de los genotipos de los SNP's estudiados. Concluyen que ninguno de los 7 SNP's estudiados confieren un incremento de la susceptibilidad o protección para desarrollar Parkinson idiopático en pacientes blancos.

En 2003, Lücking y cols. examinaron 4 polimorfismos (**Ser167Asn**, Arg366Trp, **Val380Leu** y Asp394Asn) en individuos europeos. Donde encontraron frecuencias alélicas y genotípicas para tres de estos polimorfismos sin diferencia estadísticamente significativa entre pacientes y controles sin EP estudiados. Encontrándose en ese grupo el SNP Ser167Asn, sin embargo el SNP Val380Leu mostró que el alelo Val380 es significativamente más frecuente en toda la muestra de pacientes con Parkinson (esporádicos y familiares) y en especial el grupo de Parkinson esporádico. Concluyendo que, los homocigotos para Val380 están asociados significativamente al Parkinson esporádico, lo que sugiere que el alelo Val380 incrementa el riesgo en la enfermedad, mientras que el alelo 167Asn puede ser factor protector, aunque es muy raro.

Al tratar de comparar los resultados de los diversos estudios realizados en diferentes poblaciones, resulta difícil hacer esta comparación debido a las diferencias en frecuencias alélicas en las diferentes poblaciones, y estratificación de sujetos, las variaciones de los resultados sugieren que las interacciones ambientales son importantes para la patogénesis, y/o que los múltiples genes juegan papeles importantes (Huang, 2004).

1.10 MODELOS ANIMALES

1.10.1 Las características deseables de un modelo para la enfermedad de Parkinson

Un modelo animal ideal debe de tener las siguientes características (Flint B, 2001):

- 1) Un complemento de neuronas dopaminérgicas normales al nacimiento con una pérdida selectiva y gradual de neuronas dopaminérgica que comience en la edad adulta. La pérdida puede exceder el 50% y que sea detectable por bioquímica o neuropatología.
- 2) El modelo debe ser de fácil detección de las deficiencias motoras, incluyendo los síntomas cardinales.
- 3) El modelo debe mostrar el desarrollo de cuerpos de Lewy.
- 4) Si el modelo es genético, debe estar basado en una sola mutación para permitir la propagación de la mutación.
- 5) Debe de desarrollar la enfermedad de Parkinson en pocos meses, permitiendo un rápido y bajo costo en el monitoreo de agentes terapéuticos.

1.10.2 Modelos animales para EP que existen en la actualidad

1.10.2.1 Modelo con MPTP

Este es el modelo mejor caracterizado, el cual se produce por la utilización de la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Se observó por primera vez en drogadictos que emplearon heroína sintética y ésta se encontraba contaminada por un subproducto de MPTP producido durante su elaboración, lo que les produjo un severo parkinsonismo. Posteriormente fue usada para producir modelos de EP en ratones y primates. El MPTP es muy

liposoluble, por lo tanto fácilmente cruza la barrera hematoencefálica. Ahí es convertido a su metabolito activo, 1-metil-4-fenilpiridinio (MPT⁺) por la monoamino oxidasa B, enzima involucrada en la degradación de las catecolaminas. El MPT⁺ intracelular se acumula en la mitocondria, provocando la inhibición de la cadena respiratoria, debido a su gran afinidad por el complejo I.

El MPTP en primates replica todos los signos clínicos de la enfermedad de Parkinson, incluyendo rigidez, bradicinesia, inestabilidad postural y temblor en reposo (Fahn S y Sulzer D, 2004).

1.10.2.2 6-Hidroxidopamina

Este es el primer agente usado para producir un modelo de EP. Después de la inoculación de 6-hidroxidopamina en la sustancia negra, este compuesto se acumula selectivamente en la neuronas dopaminérgicas, y después provoca la muerte de estas neuronas debido a la toxicidad ocasionada por dicho compuesto que involucra la generación de radicales libres. 6-hidroxidopamina es una toxina efectiva para ratas, ratones, gatos y primates, los que son principalmente usados para producir lesiones unilaterales (Bové y cols. 2005).

1.10.2.3 Rotenona

La rotenona es producida por raíces de ciertas especies de plantas, que han sido usadas como insecticida en algunos jardines, y para matar peces en lagos. Se sabe que la rotenona tiene una alta afinidad y especificidad inhibitoria del complejo I, una de las cinco enzimas del complejo de la membrana interna mitocondrial que participan en la

fosforilación oxidativa. Las ratas desarrollan una progresiva degeneración de las neuronas negroestriadas con una pérdida de tirosina hidroxilasa y transportadores de dopamina. Se observan inclusiones que pueden considerarse como cuerpos de Lewy. Estas inclusiones son teñidas con anticuerpos contra ubiquitina y α -sinucleína. Las ratas muestran los síntomas propios de la enfermedad (Bové y cols. 2005).

1.10.2.4 *Drosophila* y α -sinucleína como modelo de EP

Feany y Bender produjeron un modelo por medio de la expresión de la forma mutante y normal del gen de la α -sinucleína en la *Drosophila melanogaster*. Estos autores observaron en las moscas que la sobreexpresión de la α -sinucleína tipo silvestre o mutada se obtenía una pérdida dependiente de la edad de las neuronas dorsomediales que se teñían con tirosina hidroxilasa. También pudieron apreciar la presencia de inclusiones que se asemejaban a los cuerpos de Lewy. Las moscas desarrollaban disfunciones locomotoras con la edad. También se presentó degeneración de la retina, la cual no es una característica típica del Parkinson, y que solo se presenta en la *Drosophila*. Lo que es importante es que no pudieron distinguir entre la que tenía α -sinucleína tipo silvestre y la que tenía la mutación.

1.10.2.5 *Drosophila* y parkina como modelo de EP

A pesar de la falta de un modelo animal para AR-JP, que no ha permitido llevar a cabo un estudio directo de la relevancia de los sustratos de la parkina en la pérdida de neuronas dopaminérgicas. Para explorar el papel biológico de la parkina (Greene J, Whitworth A y cols.,

2003), han realizado mutaciones semejantes para inactivar el gen de la parkina que se encuentra altamente conservado en la *Drosophila melanogaster*. Las moscas con alelos nulos de Parkina fueron viables pero presentaban una longevidad reducida, esterilidad en los machos y defectos en el vuelo y en el escalar. Estos resultados pueden llevar a la disfunción mitocondrial y apoptosis ocasionando la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la AR-JP. Más aún, estos hallazgos sugieren una conexión entre AR-JP y las formas más comunes del Parkinson idiopático (Cha G-H, Park J y cols., 2005).

1.10.2.6 Ratón y parkina como modelo de Parkinson

Flemming y cols, (2005) suprimieron las funciones de la parkina mediante la deleción del exón 3 y del exón 7 en el gen de la parkina. La deleción del exón 3 en el gen la parkina dio como resultado la ausencia de la proteína parkina. Presentando reducción en la excitabilidad sináptica en las neuronas del estriado medio y una progresiva pérdida sensomotora. Además estos ratones presentaban bajo peso, respiración mitocondrial reducida, baja capacidad antioxidante y un incremento en el daño oxidativo del mesencéfalo.

Mientras que la deleción del exón 7 del gen de la parkina, dió como resultado la pérdida de la función de la parkina. El ratón *knockout* de parkina con deleción del exón 7 presentó diferente fenotipo comparado con el que tenía deleción del exón 3, ya que es el único caso knockout que presenta pérdida neuronal en el *locus coeruleus*, y esta degeneración en esta área es característica de EP.

1.11 TRATAMIENTO.

La enfermedad de Parkinson como anteriormente se mencionó, es una enfermedad neurodegenerativa asociada con la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, dando como resultado síntomas motores progresivos. No existe cura para la enfermedad de Parkinson, pero existen fármacos que ayudan a su control. Es básico para el tratamiento el reemplazo de la pérdida de dopamina durante el curso de la enfermedad. El primer compuesto usado para este propósito fue el precursor de dopamina, la levodopa. Aunque existen otros medicamentos dopaminérgicos disponibles, la levodopa sigue siendo el medicamento de elección para la farmacoterapia de la enfermedad de Parkinson (Tuite P y cols, 2005).

1.12. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que el gen de la parkina se ha asociado con la enfermedad de Parkinson en diferentes poblaciones mediante la presencia de mutaciones y/o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's), estos resultados han sido contradictorios entre las poblaciones estudiadas. Por lo que resulta importante evaluar la participación de los SNP's Ser167Asn y Val380Leu del gen de la parkina en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson en pacientes mexicanos.

1.13. OBJETIVOS

1.13.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar los polimorfismos Ser167Asn y Val380Leu del gen de la parkina en pacientes con enfermedad de Parkinson y establecer su posible asociación con esta enfermedad.

1.13.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Capturar pacientes con enfermedad de Parkinson y controles sin Parkinson.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos Ser167Asn y Val380Leu del gen de la parkina en una muestra de pacientes mexicanos con enfermedad de Parkinson y un grupo de controles sin Parkinson y su posible asociación con la enfermedad de Parkinson.
- Evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg para los dos polimorfismos estudiados en los distintos grupos.

1.14 HIPOTESIS DE TRABAJO

El alelo C del polimorfismo Ser167Asn, siendo el alelo más raro, representa un factor protector para los pacientes con la enfermedad de Parkinson. Por ello se esperaría tener más alta frecuencia del alelo C en los controles que en los pacientes con enfermedad de Parkinson mexicanos estudiados.

La presencia del genotipo G/A del polimorfismo Val380Leu en pacientes con Parkinson representará un factor de riesgo para los mismos, esperado que su frecuencia sea mayor en los pacientes con Parkinson que en los controles mexicanos estudiados.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II. MÉTODOS Y MATERIALES.

2.1 INDIVIDUOS ESTUDIADOS.

La muestra de pacientes mexicanos con enfermedad de Parkinson fue de 196 individuos, provenientes de la consulta del Depto. de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNN), y la muestra de sujetos controles no relacionados e individuos sanos fue de 213.

❖ Criterios de inclusión.

Se incluyeron a:

- Los pacientes con EP que presentaban al menos dos de los síntomas motores de EP.
- Pacientes con EP esporádico o EP familiar.
- Los individuos controles sanos elegidos debieron ser mayores de 45 años de edad, sin signos neurológicos de la EP.

❖ Criterios de exclusión.

- Se excluyeron aquellos pacientes que fueron diagnosticados como EP vascular, así como aquellos pacientes con datos incompletos en antecedentes familiares, edad, etc.

2.2 TOMA DE MUESTRA

Se tomaron aproximadamente 20mL de sangre periférica de los pacientes con EP y de los individuos controles (individuos sanos), con previo consentimiento informado.

2.3 EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO.

A partir de las muestras de sangre periférica obtenida de los pacientes con Parkinson del INNN y los sujetos controles, se extrajo el ADN por medio de los métodos de extracción de precipitación con sales y extracción con fenol y con el estuche comercial Aqua Pure (Biorad). Donde básicamente las células fueron lisadas, las proteínas precipitadas, el DNA precipitado y resuspendido en agua estéril. (Ver anexo para más detalle)

2.4 DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS SER167ASN Y VAL380LEU EN EL GEN DE LA PARKINA POR LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL.

- 1) Preparación de las muestras de DNA.
- 2) Las muestras de DNA genómico extraído proveniente de los pacientes y controles, se analizaron por la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1.0%, TBE 1%, con el fin de conocer la calidad y aproximadamente su cantidad.
- 3) Se realizaron diluciones de las muestras de DNA genómico para obtener una concentración final de 10 ng/ μ L.
- 4) Las diluciones obtenidas del paso anterior se volvieron a someter a la técnica de electroforesis, para verificar su concentración, si aún no se

obtenía la concentración deseada, se agregaba con más DNA genómico o agua inyectable, según hubiese sido el caso.

- 5) Estandarización de la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real.

Una vez estandarizada la concentración de DNA con la que se trabajaría (de acuerdo a lo recomendado por la casa comercial del equipo de PCR en tiempo real ABI PRISM 7000 usado fue de 20 ng/ μ L). Debido a que el equipo de PCR tiempo real usado recomienda usar un solo un programa para la PCR, éste se acopla a todas las sondas que dicha casa comercial tiene en venta.

Tabla 3. REACCIÓN PARA LA PCR TIEMPO REAL

Sonda	0.5 μ L
Ser167Asn rs1801474	
Val380Leu rs1801582	
Taq Man [®] Universal PCRMaster Mix	2.0 μ L
H ₂ O	0.5 μ L
DNA (10ng/ μ L)	2.0 μ L
Volumen final = 5 μ L	

Tabla 4. PROGRAMA PARA LA PCR TIEMPO REAL

50.0° C	2 min	
95.0° C	10 min	
95.0° C	15 seg	} 40 ciclos
60.0° C	1 min	

En este proceso se usaron controles negativos, los cuales contenían la mezcla de reacción preparada para las muestras problema más 2 μL de agua para PCR en tiempo real. También se usaron 3 controles positivos cada vez que se metían muestras problemas a PCR tiempo real, las cuales consistían en muestras ya bien identificadas como homocigotos para el alelo 1 y 2, y heterocigotos para cada uno de los polimorfismos en estudio (Ver tabla 5). Esto se hizo con el fin de identificar alguna condición que alterara los resultados.

Tabla 5. Resumen del proceso que se lleva a cabo cada vez que se mete un ensayo de PCR en tiempo real.

	TQM Mix** (μL)	Sonda (μL)	Agua (μL)	DNA (μL)
Muestra	2.0	0.5	2.0	2.0
Control Positivo	2.0	0.5	2.5	0
Control Negativo*	2.0	0.5	2.0	2.0

* Muestras bien identificadas como homocigoto para el alelo 1, homocigoto para el alelo 2 y heterocigoto.

** TQM Mix = *Taq Man @ Universal PCRMaster Mix*

2.5 SECUENCIACIÓN DIRECTA.

La secuenciación se llevó a cabo como el estándar de oro para verificar los resultados obtenidos en la genotipificación de los polimorfismos estudiados mediante la técnica de PCR en Tiempo Real.

La reacción de secuenciación consistió en:

- 1) Amplificación de los productos de PCR del exón 4 y exón 10 del gen de la parkina, donde se encuentran ubicados los polimorfismos en

estudio. Los oligonucleótidos utilizados se encuentran descritos por Kitada y cols., 1998.

Tabla 6
REACCIÓN PARA LA PCR
PARA LOS EXONES 4 Y10

<i>Master Mix</i>	10 μ L
Oligonucleotido PK 4 o 10 (25 μ M)	1 μ L
Oligonucleotido PK 16 o 21 (25 μ M)	1 μ L
DNAg	3 μ L
H ₂ O	10 μ L
Volumen final= 25 μ L	

Tabla 7
PROGRAMA DE PCR

95° C	15 min.	} 35 ciclos
95° C	1 min.	
57° C	1 min.	
72° C	1 min.	
72° C	10 min.	
4° C	∞	

- 2)** Revisión de los productos amplificados por PCR.
- 3)** Purificación de los productos mediante el estuche Quiagen QIAquick (Quiagen).

- 4)** Reacción de secuenciación con el estuche Big Dye V3.1 (Applied Biosystems).
- 5)** Purificación de los productos de secuenciación mediante las columnas Centri-Sep (Applied Biosystems).
- 6)** Análisis de los productos de secuenciación en el equipo 3100 ABI PRISM® Genetic Analyzer.

III. RESULTADOS

RESULTADOS

3.1 CARACTERISTICAS DE LOS PACIENTES Y CONTROLES.

Se estudiaron 196 pacientes con EP de los cuales 75 son mujeres y 121 son hombres y 213 controles sanos de la población mexicana siendo 126 mujeres y 87 hombres, sus características se encuentran en la tabla 8.

Tabla 8. Relación de pacientes con EP y controles sanos.

Pacientes con Parkinson (EPF+EPE)	Controles
N=196	N=213
Mujeres n= 75 (38.3%)	Mujeres n= 126 (62.4%)
Hombres n= 121	Hombres n= 87 (40.8%)
Edad 53.7±1.75 años (83-16 años)	Edad 65.2±12.95 años (38-94 años)

EPF= Enfermedad de Parkinson familiar

EPE= Enfermedad de Parkinson esporádico

La enfermedad de Parkinson se divide en dos grupos: Parkinson esporádico y Parkinson familiar. En el presente estudio se logró recopilar 12 mujeres y 20 hombres con enfermedad de Parkinson familiar, mientras que para Parkinson esporádico fueron 63 mujeres y 101 hombres. A continuación se observan en la tabla 9 sus características.

Tabla 9. Relación entre los grupos de pacientes con EP.

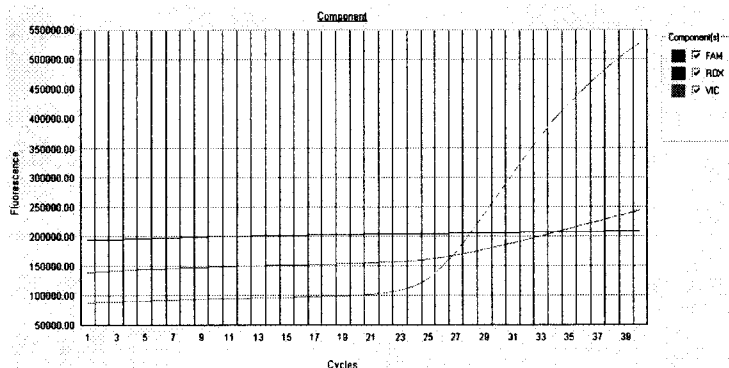
Parkinson Familiar	Parkinson esporádico
n= 32 (16.3%)	n=164 (83.7%)
Mujeres n=12 (37.5%) Edad 49.6±14.77 años (70-55 años)	Mujeres n= 63 (38.4%) Edad 56.0±13.58 años (80-25 años)
Hombres n= 20 (62.5%) Edad 45.9±11.11 años (75-30 años)	Hombres n= 101 (61.6%) Edad 54.4±11.71 años (83-16 años)

3.2 GRÁFICAS DE PCR TIEMPO REAL.

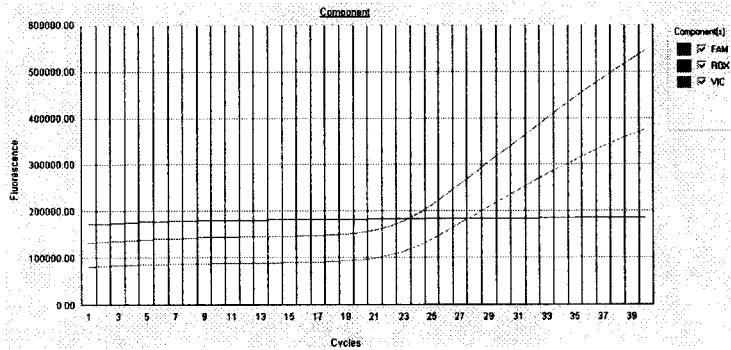
La técnica empleada para la obtención de las frecuencias alélicas y fenotípicas de los polimorfismos estudiados fue mediante PCR en tiempo real. A continuación se muestran ejemplos de las gráficas obtenidas de muestras analizadas en el presente trabajo.

SER167ASN

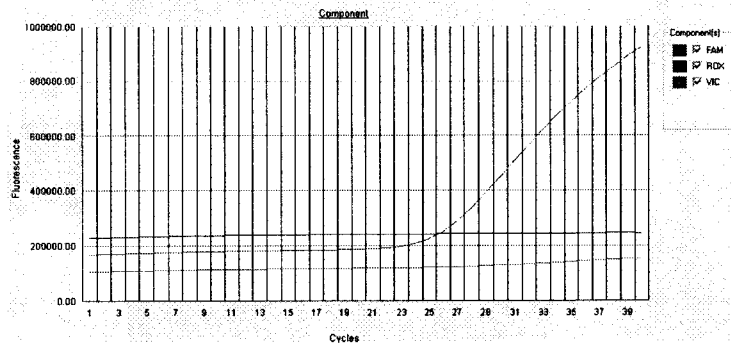
- **GRÁFICA 1.** En esta gráfica observamos como se aprecia la muestra de un paciente que es un homocigoto para el alelo G, por lo tanto posee el genotipo G/G.



- **GRÁFICA 2.** En esta gráfica se aprecia la muestra de un paciente que es un heterocigoto, por lo tanto posee el genotipo G/A.

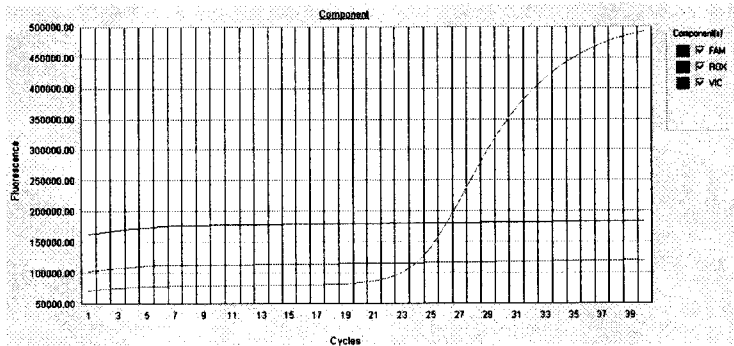


- **GRÁFICA 3.** En esta gráfica apreciamos la muestra de un paciente que homocigoto para el alelo A, por lo tanto posee el genotipo A/A.

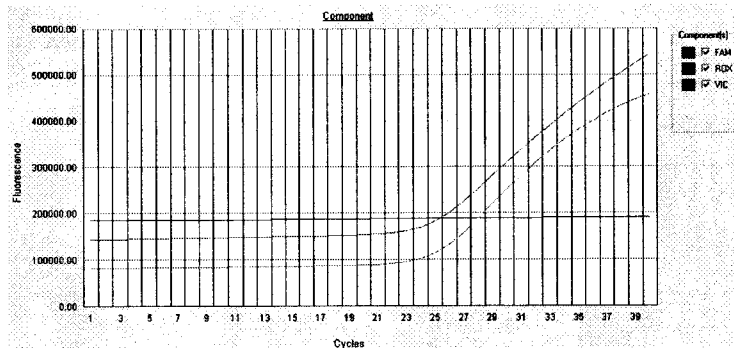


VAL380LEU

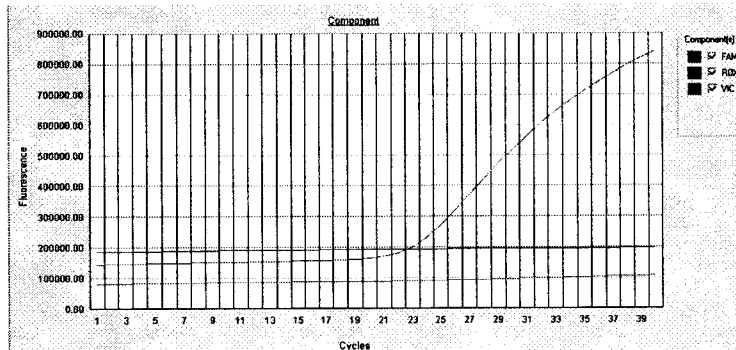
- **GRÁFICA 4.** Esta gráfica muestra la homocigocidad de un paciente que posee el genotipo G/G.



- **GRÁFICA 5.** Esta gráfica se obtuvo de una muestra de un paciente que para el SNP Val380Leu es heterocigoto.



- **GRÁFICA 6.** En esta gráfica se aprecia un homocigoto para el alelo C en el SNP Val380Leu.

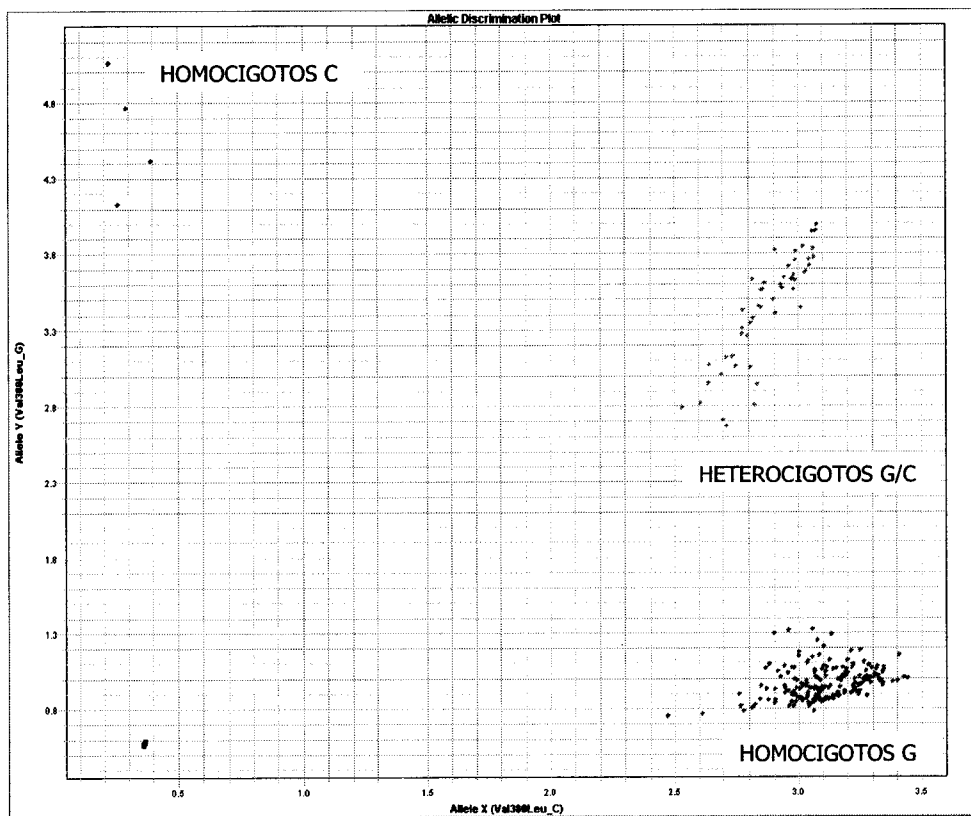


Mediante el uso del *Sequense Detection Software v1.2* se realizó la genotipificación. A continuación se muestra un ejemplo de la gráfica obtenida de las muestras analizadas en el presente trabajo para el SNP Val380Leu. En dicha gráfica se puede ver a simple vista que en un ensayo hecho para la población de pacientes con EP (EPF+EPF) y muestra del grupo de controles estudiados hay más individuos con el genotipo G/G.

La información de las frecuencias alélicas y genotípicas se encuentra detalladamente en las tablas que están mas adelante.

3.3 GENOTIPIFICACIÓN DE PCR TIEMPO REAL.

FIGURA 9. Genotipificación para el polimorfismo VAL380LEU, donde se muestra la distribución de de los homocigotos para el alelo C, el alelo G y de heterocigotos (G/C).



Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Ser167Asn las cuales se pueden apreciar en la tabla 10. En dicha tabla podemos ver que el alelo más común es G, que codifica para Ser(AGT), en la población mexicana con el 84.4 % para los pacientes con EP y con el 82.6% para el grupo control sano(CT). Mientras que el alelo A (codificaría para Asn (AAT)) es menos común en los pacientes con EP familiar (EPF) que en los pacientes con EP esporádico (EPE) y del grupo control. Se podría sugerir una ligera tendencia del alelo A a ser un factor protector contra la EPF ya que su $P=0.19$, es menor a la de EPE ($P= 0.74$). Lo cual podemos ver reflejado en los genotipos ya que 7 de los 32 pacientes con EPF fueron heterocigotos y ninguno fue homocigoto para el alelo A.

El análisis de asociación se llevo a cabo en tres formas: 1) comparando los casos de EP total (EPF+EPE) y el grupo control; 2) comparando el grupo control contra el grupo de EPF; y 3) comparando el grupo de EPE y el grupo control; debido a que se ha observado una asociación independiente.

Los resultados obtenidos al comparar el grupo EP total (EPF+EPE) contra controles sin Parkinson, no mostró diferencia significativa tanto para las frecuencias genotípicas como alélicas ($P=0.29$, $P=0.48$, respectivamente).

Al comparar al grupo de EPF vs grupo control no hay diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias alélicas y genotípicas ($P=0.21$, $P=0.19$, respectivamente). De igual forma al comparar al grupo EPE vs. el grupo control, tampoco hay diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias alélicas y genotípicas ($P=0.45$, $P=0.74$, respectivamente).

Tabla 10. Frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo Ser167Asn.

	Pacientes con EP (EPF+EPE)	Pacientes con EPF	Pacientes con EPE	Controles
Genotipos				
G/G	141 (71.9)	25 (78.1)	116 (70.7)	143 (67.1)
G/A	49 (25.0)	7 (21.9)	42 (25.6)	66 (31.0)
A/A	6 (3.1)	0 (0)	6 (3.7)	4 (1.9)
Alelos				
G	331 (84.4)	57 (89.1)	274 (83.5)	352 (82.6)
A	61 (15.6)	7 (10.1)	54 (16.5)	74(17.4)
P	0.48 0.29*	0.19 0.21*	0.74 0.45*	

Los datos entre paréntesis corresponden a los porcentajes.

P se determinó por medio de la prueba de Fisher, los valores de *P* con * corresponden a la asociación en función a las frecuencias genotípicas: GG vs GC+CC, en base a una asociación dominante del alelo G.

EP fam= Pacientes con enfermedad de Parkinson familiar.

EP esp= Pacientes con enfermedad de Parkinson esporádico.

De la misma manera se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo Val380Leu, las cuales se ilustran en la tabla 11. En este polimorfismo el alelo más frecuente fue el G (codifica para Val) con 91.1% para los pacientes con EP (EPF+EPE) y con 88.3% para la muestra de controles sanos. El alelo C es menos común en los pacientes con EPF que en los pacientes con EPE y el grupo control(CT). En dicha tabla también podemos notar que no se encontró el genotipo C/C en pacientes con EPF este dato y una $P= 0.09$ (EPF vs CT), sugiriendo una tendencia de que el alelo C sea un factor protector para la EPF. Sin embargo se debe tomar en cuenta que el grupo de pacientes con EPF estudiados es muy pequeña

(n=32), y para descartar esta posible asociación entre el alelo C y la EPF debemos de ampliar dicha muestra.

Sin embargo al comparar al grupo de pacientes con EP(EPF+EPE) contra el grupo control no hay diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias alélicas y genotípicas ($P= 0.18$, $P= 0.18$, respectivamente). O al comparar al grupo de los pacientes con EPF o al grupo con EPE contra el grupo control, tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias alélicas y genotípicas ($P=0.09$, $P=0.09$ y $P=0.21$, $P=0.19$, respectivamente).

Tabla 11. Frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo Val380Leu.

	Pacientes con EP (EPF+EPE)	Pacientes con EPF	Pacientes con EPE	Controles
Genotipos				
G/G	163 (83.2)	29 (90.6)	134 (81.7)	166 (77.9)
G/C	31 (15.8)	3 (9.4)	28 (17.1)	44 (20.7)
C/C	2 (1.0)	0 (0)	2 (11.2)	3 (1.4)
Alelos				
G	357 (91.1) 35	61 (95.3)	296 (90.2) 32	376 (88.3) 50
C	(8.9)	3 (4.7)	(9.8)	(11.7)
P	0.18 0.18*	0.09 0.09*	0.19 0.21*	

Los datos entre paréntesis corresponden a los porcentajes.

P se determinó por medio de la prueba de Fisher, los valores de P con * corresponden a la asociación en función a las frecuencias genotípicas: GG vs GC+CC, en base a una asociación dominante del alelo G.

EP fam= Pacientes con enfermedad de Parkinson familiar.

EP esp= Pacientes con enfermedad de Parkinson esporádico.

Todos los grupos para ambos polimorfismos no mostraron desviación en el Equilibrio de Hardy-Weinberg ($P>0.24\%$)

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

ANALISIS DE RESULTADOS

La alta frecuencia del alelo G(Ser) que va de un 82.6% a un 89.1% en el SNP Ser167Asn, lo coloca como el alelo más común en la población de pacientes con EP y controles estudiados. Este resultado concuerda con lo reportado en otras poblaciones (pacientes de EPF y/o EPE y controles) tales como australianos G>92.7% (Mellick y cols., 2000), españoles G>97.0 % (Mata y cols, 2002), EUA G>84.0 % (Oliveira S.A. y cols, 2003), europeos G>97.8% (Lücking C-B y cols. 2003). Existen otros tres estudios en los que el alelo G es el más común con frecuencias alélicas alrededor de 60%, estas poblaciones son dos chinas con G<67% y G<56.3% respectivamente (Satoh J-I y Kuroda Y, 1999 y Wang y cols, 1999) y dos taiwanesas G<64.9% y G<65.8% respectivamente (Peng y cols., 2003 y Hu C-J y cols., 2000), aunque son menores a los casos anteriormente mencionados que se encuentran alrededor del 90%. En este sentido, las frecuencias obtenidas en este estudio se encuentran entre las reportadas en ambos grupos mencionados. Esta diferencia de frecuencias alélicas puede deberse a la composición génica de cada uno de los individuos estudiados y el hecho de que los mexicanos son mestizos (composición indígena y española principalmente).

La no asociación encontrada para el polimorfismo Ser 167Asn con los tres grupos analizados (CT vs EP (EPF+EPE), CT vs EPF y CT vs EPE) es similar a lo reportado por Wang y cols. (1999), Hu C-J y cols. (2000), Mata y cols. (2002), y Oliveira y cols. (2003). También parece no haber dependencia de otros polimorfismos estudiados debido a que los anteriores investigadores (a excepción de Hu C-J y cols.), realizaron el estudio de otros polimorfismos (Arg366Trp, Val280Leu, Asp394Asn) en donde la mayoría tampoco encontró asociación. Sólo Wang y cols., encontraron asociación en el polimorfismo Arg366Trp, pero no en Ser167Asn. Dichos resultados son

opuestos a los encontrados por Satoh J-I y Kuroda Y, Mellick y cols. y Peng y cols.

Hay que considerar que a pesar de que el estudio de asociación fue negativo (CT vs EPF), se sugiere que existe una ligera tendencia del alelo A a ser un factor protector por la $P= 0.19$ (CT vs EPF) y que el alelo A es menos común en los pacientes con EP familiar (EPF) que en los pacientes con EP esporádico (EPE) y del grupo control. Sin embargo no se puede concretar un efecto protector como tal, debido a que la frecuencia de este alelo es baja tanto en pacientes como en controles. Tampoco se puede decir que el genotipo G/A tiene efecto protector contra EPF, a pesar de que exista un 9.1% de diferencia entre los pacientes con EPF y los controles, pero no hay diferencia estadísticamente significativa que apoyen dicho efecto. Esto se podría descartar ampliando principalmente la muestra de pacientes con EPF.

Para el polimorfismo Val380Leu, el alelo G es el más común (rango de 88.3-95.3%), resultados obtenidos concuerdan con los reportados con Wang y cols. (1999), Hu C-J y cols. (2000), Oliveira S.A. y cols. (2003), Lücking C-B y cols. (2003). Dichos autores presentan frecuencias alélicas de G>92% como las reportadas en el presente trabajo, a excepción de Lücking C-B y cols., con G<85.6%.

Tampoco se observó una asociación entre los pacientes con EP (total, y por separado: EPF y EPE) y el polimorfismo Val380Leu ($P>0.09$). Conforme a otros estudios reportados por Wang y cols. (1999), Hu C-J y cols. (2000) y Oliveira S.A. y cols. (2003). Solo Lücking C-B y cols. han reportado asociación entre el polimorfismo Val380Leu en europeos, sin embargo este dato ésta en tela de juicio porque no es una población definida.

De igual forma que en el polimorfismo anterior el alelo C es menos común en los pacientes con EPF que en los pacientes con EPE y el grupo control. A pesar de que el alelo C no fue encontrado en los pacientes con EPF estudiados y su $P=0.09$, es más grande la tendencia de que el alelo C sea un factor protector para padecer la EP que en el caso anterior, sin embargo no se puede decir que la baja frecuencia del alelo le confiera protección a los individuos de padecer EP y más aún EPF, debido a que la muestra de pacientes con EPF que se logró coleccionar fue pequeña en comparación con la EPE. Esto se debe a que la frecuencia de casos con EPF reportada a nivel mundial, la cual solo llega a representar un 15 % de los casos de Parkinson, y ese porcentaje varía entre las poblaciones. Esta ligera tendencia también se observa, al comparar los controles con los pacientes de EPE ($P=0.19$). Sin embargo parece necesario incrementar el número de casos, principalmente para confirmar la posibilidad del efecto protector sugerido.

Como ya se mencionó anteriormente es necesario ampliar la muestra de pacientes con Parkinson en especial el grupo de EPF para poder decir si hay o no asociación entre los polimorfismos estudiados. Además no sabemos si estos polimorfismos estén condicionados por otros polimorfismos no estudiados en esta población o por alguna(s) mutación(es) del gen de la parkina o aun por otros polimorfismos o mutaciones de otros genes que se han relacionado con la enfermedad de Parkinson (ej. *LRRK-2*, *a-sinucleína*, *PINK-1*, etc.). También sería importante considerar los factores ambientales a los que estuvieron expuestos los pacientes con enfermedad de Parkinson.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los polimorfismos Ser167Asn y Val380Leu del gen de la parkina no son factores de riesgo o factores de protección de la enfermedad de Parkinson en la muestra de pacientes mexicanos estudiados.

El hecho de que en este trabajo no se haya encontrado asociación entre los polimorfismos Ser167Asn y Val380Leu con la enfermedad de Parkinson en la muestra de pacientes mexicanos estudiada, no deja de ser un resultado importante, porque nos permite entender algunas de las posibles causas y/o factores de riesgo para desarrollar EP en la población mexicana (descritos en otras poblaciones). Mientras que en algunas poblaciones estos polimorfismos de *PARK2* se comportan como factores de riesgo en nuestra muestra estudiada parece no tener el mismo significado. Por lo que es importante tener presente que la enfermedad de Parkinson es una enfermedad compleja en la que intervienen diversos factores genéticos y ambientales.

VI. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Bertram L, Tanzi RE., The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Inves* 2005; 115:1449-1457.

Biskup S, Mueller JC, Sharma M, Lichtner P, Zimprich A, y cols. Common variants of LRRK2 are not associated with sporadic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005; 58: 905-908.

Bové J, Prou D, Perier C y Przedborski, Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease. *NeuroRx* 2005; 2: 484-494.

Bras JM, Joao RG, Riberiro MR, y cols. G2019S Dardarian Substitution Is a Common Cause of Parkinson's Disease in a Portuguese Cohort. *Mov Disord* 2005; 20: 1653-1655.

Cha G-H, Kim S, Park J, y cols., Parkin negatively regulates JNK pathway in the dopaminergic neurons of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 10345-10350.

Cookson MR, Xiromerisiou G, Singleton A. How genetics research in Parkinson's disease is enhancing understanding of the common idiopathic forms of the disease. *Curr Opin Neurol* 2005; 18: 706-711.

Dawson TM, Dawson VL. Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Science* 2003; 302: 819-822.

Dekker MCJ, Bonifati V, Van Duijin CM. Parkinson's disease: piecing together a genetic jigsaw. *Brain* 2003; 126: 1722-1733.

De Rijk M, Breteler M, Graveland G y cols. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam study. *Neurology* 1995; 45: 2143-2146.

Eriksen JL, Wszolek Z, Petrucelli L. Molecular Pathogenesis of Parkinson Disease. *Arch Neurol* 2005; 62: 353-357.

Factor, SA, Weiner WJ. Parkinson's Disease: Diagnosis and Clinical Management. Cap. 13,20 y 27. New York: Demos Medical Publishing, Inc.; c2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>

Fahn S y Sulzer D. Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson's Disease. *NeuroRx* 2004; 1: 139-154.

Farrer MJ, Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nature Rev Genet.* 2006; 7: 306-318.

Farrer M, Stone J, Mata IF, y cols. LRRK2 mutations in Parkinson disease. *Neurology* 2005; 65: 738-740.

Feany MB. New Genetic Insights into Parkinson's Disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1937-1940.

Feany MB, Bender WW. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 2000; 404: 394 –398.

Fleming S, Fernagut P y Chesselet M. Genetic Mouse Models of Parkinsonism: Strengths and Limitations. *NeuroRx* 2005; 2: 495-503.

Flint MB. Experimental models of Parkinson's disease. *Nature Neurosci* 2001; 2:325-332.

Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, y cols. A new Locus for Parkinson's Disease (PARK8) Maps to Chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* 2002; 51: 296-301.

Funayama M, Hasegawa K, Ohta E, y cols. An LRRK2 Mutations as a Cause for the Parkinsonism in the Original Family. *Ann Neurol* 2005; 57; 918-921.

Gasser T. Genetics of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 2005; 18: 363-369.

Gasser T. Molecular Genetics of Parkinson's Disease en *Advances in Neurology* Vol 86 Parkinson's Disease (Ed. Calne D y Calne S), Cap.3 , Lippincott William & Wilkins, USA, 2001, pp. 23-32.

Giasson BI, Lee VMY. Are Ubiquitination Pathways Central to Parkinson Disease?. *Cell* 2003; 114:1-8.

Goedert M, Jakes R, y cols, Parkinson´s Disease, Dementia with Lewy Bodies and Multiple Atrophy as α -synucleinopathies en Parkinson´s Disease Methods and Protocols vol.62 (Ed Maral MM), Cap. 3, Humana Press, USA, 2001, pp.33-59.

Greene J, Whitworth A, Kuo I, Andrews L. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 4078-4083.

Huang Y, Cheung L, Rowe D, Hallidar G. Genetic contributions to Parkinson´s disease. Brain Res Brain Res Rev 2004; 46: 44-70.

Hu C, Sung S, Liu H. Polymorphisms of the Parkin Gene in Sporadic Parkinson´s Disease among Chinese in Taiwan. Eur Neurol 2000; 44: 90-93.

Imai Y, Takahashi R. How do Parkin mutations result in neurodegeneration?. Curr Opin Neurobiol 2004; 14: 884-889.

Jarman P, Wood N. Parkinson´s disease genetics comes of age. BMJ 1999; 318: 1641-1642.

Jiang Y, Beaudet AL. Human disorders of ubiquitination and proteasomal degradation. Curr Opin Pediatr 2004; 16: 419-126.

Kahle PJ, Haass C. How does parkin ligate ubiquitin to Parkinson´s disease? EMBO 2004; 7: 681-685.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N. y cols. Deletion mutation in a novel protein Parkin gene causes autosomal recessive juvenile parkinsonism (AR-JP). Nature 1998; 392: 605-608.

Klein C, Pramstaller P, Kis B, Page C. Parkin Delections in a Family with Adult-Onset, Tremor-Dominant Parkinsonism: Expanding the Phenotype. Ann Neurol 2000; 48: 65-71.

Lang AE, Lozano AM. Parkinson's Disease First of Two Parts. *N Engl J Med* 1998; 339: 1045-1053.

Leon FLI. Etiología de la enfermedad de Parkinson en Parkinson Enfoque al futuro (Otero-Siliceo E y del Rayo AA), Cap 3, Fondo de Cultura Económica, México, 1996, pp. 25-33.

Lesage S, Ibanez P, Lohmann E. G2019S LRRK2 Mutation in French and North African Families with Parkinson's Disease. *Ann Neurol* 2005; 58: 784-787.

Li C, Flint M y cols. Leucine-rich repeat kinase 2: A new player with a familiar theme for Parkinson's disease pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 16535-16536.

Li S, Shoenberg B, Wang C, y cols. A prevalence survey of Parkinson's disease and other movement disorders in the People's Republic China. *Arch Neurol* 1985; 42: 655-657.

Lücking CB, Chesneau V, Lohmann E y cols. Coding Polymorphisms in the Parkin Gene and Susceptibility to Parkinson Disease. *Arch Neurol* 2003; 60: 1253-1256.

Luquin PR, Moya MM. Diagnóstico en la enfermedad de Parkinson. Cap1-3. *Ars Medica*, España, 2003, pp. 1-19.

Martin JB. Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med* 1999; 340: 1970-1980.

Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I y cols. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-sinuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 2000; 287:1265-1269.

Mata IF, Alvarez V, García-Moreira V y cols. Single-nucleotide polymorphisms in the promoter region of the PARKIN gene and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2002; 329: 149-152.

Mata I, Lockhart P y Farrer M. Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2004; 13: R127-R133.

Matsumine H, Hattori N, Mizuno Y. Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism (AR-JP): Genetic Diagnosis en Parkinson's Disease Methods and Protocols Vol 86 Parkinson's Disease (Ed. Calne D y Calne S), Cap 2, Lippincott William & Wilkins, USA, 2001, pp. 13-20.

McNaught KSP, Olanow CW. Proteolytic Stress: A Unifying Concept for the Etiopathogenesis of Parkinson's Disease. *Ann Neurol* 2003; 53 (Supl 3): S73-S84.

Mellick GD, Buchanan DD, Brookes AJ, Mizuno DG y cols. The parkin gene S/N167 polymorphism in Australian Parkinson's disease patients and controls. *Parkinsonism Relat Disord* 2000; 7: 89-91.

Micheli FE. Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados. Capítulos: 1,6-9 Ed. Médica Panamericana, España, 1998, pp. 1-7, 71-103.

Mizuno Y, Hattori N, Mori H, Suzuki T, Tanaka K. Parkin and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 2001; 14: 477-482.

Mizuno Y, Mochizuki H, Hattori N. α -Synuclein, nigral degeneration and parkinsonism en *Scientific Basis for the Treatment of Parkinson's Disease* (Ed Gálvez-Jímenez N), Cap 4, Taylor and Francis, London , 2005, pp. 87-104.

Muñoz GJE, Tesis doctoral: Estudios de asociación genética y detección de mutaciones en pacientes con enfermedad de parkinson comparación genético-clínica entre los casos esporádicos y familiares. Ed. Autor, España, 2001.

Morgante L, Rocca W, Di Rosa A, y cols. Prevalence of Parkinson's disease and other types of Parkinsonism: A door-to-door survey in three Sicilian municipalities. *Neurology* 1992; 42: 1901-1907.

Oliveira SA, Scout WK, Nance MA, y cols. Association Study of Parkin Gene Polymorphisms With Idiopathic Parkinson Disease. *Arch Neurol* 2003; 60: 975-980.

Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans EW, y cols. Cloning of the Gene Containing Mutations that Cause PARK8-Linked Parkinson's Disease. *Neuron* 2004; 44: 595-600.

Peng R, Gou Y, Yuan Q y cols. Mutation Screening and Association Analysis of the Parking Gene in Parkinson's Disease Patients from South-West China. *Eur Neurol* 2003; 49: 85-89.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, y cols. Mutation in the a-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-2047.

Ross OA, Farrer MJ. Pathophysiology, pleotrophy and paradigm shifts: genetic lessons from Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 586-590.

Satoh J, Kuroda Y. Association of codon 167Ser/Asn heterozygosity in the parkin gene with sporadic Parkinson's disease. *NeuroRx* 1999; 10: 2735-2739.

Shankar JC, Andersen JK. Dopaminergic neurons. *Inter J Biochem* 2005; 37: 942-946.

Singleton AB, Farrer M, Jonson J, Singleton B y cols. Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 841.

Spira P, Halliday G, Cabanagh J y cols. Clinical and pathological features of a parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr alpha-synuclein mutation. *Ann Neurol* 2001; 49: 313-319.

Toft M y Farrer M. Genetics of Parkinson's disease en *Scientific Basis for the Treatment of Parkinson's Disease* (Ed Gálvez-Jímenez N), Cap.7, Ed Taylor & Francis, Inglaterra, 2005, pp. 121-129.

Tuite P, Riss J y Brawer LH. New treatment modalities in Parkinson's disease, en *Scientific Basis for the Treatment of Parkinson's Disease* (Ed Gálvez-Jímenez N) Cap.11, Ed Taylor & Francis, Inglaterra, 2005, pp. 169-188.

Página web del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía: www.innn.com.mx, 2001

Wang M, Hattori N, Matsumine H y cols. Polymorphism in the Parkin Gene in Sporadic Parkinson´s Disease. *Ann Neurol* 1999; 45: 655-658.

Warner TT, Schapira AHV. Genetic and Environmental Factors in the Cause of Parkinson´s Disease. *Ann Neurol* 2003; 53(suppl3): S16-S25.

Xu Hong, Gregory S, Hauser E. y cols. SNP selector: a web tool for selecting SNPs for genetic association studies. *Bioinformatics* 2005; 21: 4181-4186.

Zabetian CP, Samii A, Mosley AD y cols. A clinic-based study of the LRRK-2 gene in Parkinson disease yields new mutations. *Neurology* 2005; 65: 741-744.

Zimprich A, Biskup S, Leiter P, Lichtner P y cols. Mutations in LRRK2 Causes Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron* 2004; 44: 601-607.

ANEXO

ANEXO

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

⊙ MÉTODO PRECIPITACIÓN DE SALES Y EXTRACCIÓN CON FENOL-CLOROFORMO.

1. Se resuspendió el botón de leucocitos adicionando 886 μL de NaCl 5mM, 46 μL SDS al 10% y 308 μL NaCl 7M; y se homogenizó.
2. Se transfirió el homogenizado a un tubo de reacción de 1.5 mL previamente etiquetado.
3. Centrifugar a 11000 rpm, por 20 minutos a 4 °C.
4. Se decantó el sobrenadante a un tubo falcon de 15 mL previamente etiquetado. Se ajustó a volumen a volumen (v/v) con la mezcla de Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico. Se mezcló lentamente por inversión por 5 minutos.
5. Se centrifugó por 10 minutos a 7,000 rpm. y 4 °C.
6. Se transfirió a un tubo Falcón de 15 mL previamente etiquetado, la fase acuosa y se ajustó v/v con la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico se mezcló lentamente por inversión por 5 minutos.
7. Se centrifugó por 10 minutos a 7,000 rpm. y 4 °C.
8. Se transfirió a un tubo Falcón de 15 mL previamente etiquetado, la fase acuosa y se agregó isopropanol (2-propanol) frío lentamente hasta un volumen final de 3 mL, para precipitar el ADN.
9. Se mezcló por inversión, suavemente hasta que precipitó todo el ADN.
10. Se centrifugó por 10 minutos a 7,000 rpm. y 4 °C.
11. Se decantó todo el sobrenadante y se adicionó etanol al 70% frío hasta un volumen final de 3 mL. Se mezcló varias veces (suavemente) por inversión para lavar el ADN.
12. Se centrifugó por 10 minutos a 7,000 rpm. y 4 °C.
13. Se Repitió el paso 11 y 12

14. Se decantó todo el sobrenadante, procurando no arrastrar el botón de ADN.
15. Se colocó el tubo con el botón en el concentrador de vacío por 30 minutos a temperatura ambiente, para evaporar completamente el etanol y llevarlo a sequedad.
16. Se resuspendió el ADN genómico en agua.
17. Se almacenó el ADN genómico extraído en el congelador a -20°C.

⊙ **ESTUCHE COMERCIAL DE AQUA PURE GENOMIC DNA ISOLATION (BIORAD).**

1. Se colocaron 500µl de sangre en un tubo de reacción de 1.5 mL y se adicionó 600µl de PBS 1X. Se agitó en vortex por intervalos de 5 segundos c/u.
2. Se centrifugó a 5000 r.p.m por 3 minutos.
3. El sobrenadante se retiró cuidadosamente para no romper la capa de leucocitos formada sobre el paquete eritrocitario. Se adicionó 900 µl de *RCLB* y agitó con vortex procurando despegar todo el paquete de eritrocitos del fondo del tubo. Se mezcló por 3 intervalos más de 5 segundos c/u.
4. Se centrifugó por 30 segundos a 13,000 – 16,000 x g.
5. El sobrenadante fue removido, procurando no arrastrar el pellet de células y repetir el paso 3 y 4 una vez más.
6. Se adicionó 900 µl de *RCB Lysis Solution*; se mezcló por inversión varias veces y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente ó 37°C, procurando despegar todo el pellet de leucocitos.
7. Después se centrifugó por 30 segundos a 13,000 – 16,000 x g.
8. Se decantó la mayor cantidad de sobrenadante que sea posible, procurando no arrastrar el botón de leucocitos. Para resuspender las células en el líquido residual se agitó con vortex.

↳ Para limpiar el botón de leucocitos se puede utilizar una micropipeta, la cual se debe enjuagar en agua con un poco de cloro antes de limpiar otro botón de leucocitos.

9. Finalmente se adicionó 300 μ l de *Genomic DNA Lysis Solution* para resuspender las células. Se mezcló por inversión (o con ayuda de una pipeta de transferencia) varias veces para lisar a las células. Este proceso debe realizarse suavemente para no romper el DNA. Si después de que se mezclara la solución se observaron algunos cúmulos de células, se incubó a temperatura ambiente ó 37°C por 30 minutos con mezclado ocasional hasta que la solución sea homogénea.

↳ Las muestras son estables en *Genomic DNA Lysis Solution* por al menos 18 meses a temperatura ambiente

10. Se adicionaron 100 μ l de *Protein Precipitation Solution* al lisado de células.

11. Se agitó vigorosamente en vortex por 20 segundos para mezclar uniformemente el buffer de precipitación de proteínas con el lisado de células.

12. Se centrifugó por 3 minutos a 13,000 – 16,000 x g.

↳ Se debió formar un botón con las proteínas precipitadas. De lo contrario se repetir el paso 10 seguido por incubación en hielo por 5 minutos y repetir el paso 11.

13. El sobrenadante fue recuperado y se colocó en un tubo de reacción de 1.5 mL limpio (se procuró no arrastrar el botón de proteínas) que contenía 500 μ L de isopropanol (2-propanol) frío al 100%. Se mezcló suavemente la muestra por inversión, al menos 50 veces.

14. Se centrifugó r por 1 minuto a 13,000 – 16,000 x g.

15. El sobrenadante se decantó, evitando arrastrar el botón de DNA. Se adicionó 300 μ L de etanol al 70% y se invirtió el tubo varias veces para lavar el botón de DNA.

16. Se centrifugó por 1 minuto a 13,000 – 16,000 x g

- 17.** Se decantó todo el etanol, posteriormente se colocó el tubo con el botón en el concentrador de vacío por 30 minutos a temperatura ambiente, para evaporar completamente el etanol y llevarlo a sequedad.
- 18.** Se adicionó 100 μ L agua inyectable y se dejó incubando durante toda la noche a temperatura ambiente.
- 19.** Se almacenó el DNA a 4°C. En caso de un almacenamiento por periodos largos, se debe realizar a -20°C ó -80°C.