



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

T E S I S

IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES DEL GEN *PINK1* EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON DE INICIO
TEMPRANO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

DARIEL MÁRQUEZ GUTIÉRREZ



MÉXICO, D.F.

2011



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: Profesor: MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
VOCAL: Profesor: FELIPE CRUZ GARCÍA
SECRETARIO: Profesor: NANCY MONROY JARAMILLO
1er. SUPLENTE: Profesor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
2º SUPLENTE: Profesor: NAYELLI NÁJERA GARCÍA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ**

ASESOR DEL TEMA:

NANCY MONROY JARAMILLO

SUPERVISOR TÉCNICO:

MARÍA ELISA ALONSO VILATELA

SUSTENTANTE:

DARIEL MÁRQUEZ GUTIÉRREZ

ÍNDICE

Páginas

I.	Resumen.....	8
II.	Introducción.....	5
I.I	Generalidades de la enfermedad de Parkinson.....	5
I.II	Genética de la enfermedad de Parkinson.....	10
	<i>SNCA</i>	10
	<i>LRRK2</i>	12
	<i>PINK1</i>	14
	<i>PRKN</i>	19
	<i>DJ-1</i>	20
III.	Planteamiento del problema.....	29
IV.	Hipótesis.....	29
V.	Objetivos.....	30
VI.	Metodología.....	31
VII.	Resultados.....	40
VIII.	Discusión.....	52
IX.	Conclusiones.....	57
X.	Bibliografía.....	59

I. Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es una de las enfermedades neurodegenerativas discapacitantes más frecuentes; hasta ahora es incurable y se estima afecta a 4 millones de personas en el mundo. Esta entidad del sistema nervioso central se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra pars compacta* y en algunos casos, la presencia de inclusiones proteicas llamadas cuerpos de Lewy. La muerte de estas neuronas altera el balance de dopamina en el estriado y resulta en una pérdida progresiva del control del movimiento.

Diversos estudios proyectan a la EP junto con otras enfermedades neurodegenerativas como la segunda causa de muerte más común dentro de la “población anciana” para el año 2040. La mayoría de los casos con EP son esporádicos y tienen un inicio tardío de las manifestaciones clínicas, mientras que las formas familiares (5-10%) se presentan antes de los 45 años de edad y se considera EP de inicio temprano (EP-IT).

En el 2004, se identificó al gen *PINK1* (*PTEN induced kinase*) que codifica para una serín-treonín cinasa mitocondrial y se asoció con la EP con patrón de herencia autosómica recesiva. Hasta la fecha se conocen 75 variantes patogénicas diferentes. La mayoría de ellas cae en el dominio catalítico, afectando la actividad de cinasa o su habilidad de unión a sustrato. En consecuencia, la disfunción de *PINK1* podría reducir la capacidad de almacenar dopamina en la región del estriado e incrementar la susceptibilidad de parkinsonismo.

Se llevó a cabo un estudio analítico de la secuencia del gen *PINK1* en pacientes con EP-IT. Los resultados de esta investigación permitieron establecer la prevalencia de mutaciones y polimorfismos en el gen recesivo *PINK1* en 100 pacientes mexicanos con EP-IT, así como establecer su posible efecto *in silico* en la proteína de aquellas mutaciones encontradas.

II. Introducción

II.I Generalidades de la enfermedad de Parkinson

En 1817, James Parkinson, médico británico, describió por primera vez la enfermedad que ahora lleva su nombre, a la cual denominó “parálisis agitante”^{1,2}. En su ensayo James Parkinson la describe como:

Parálisis agitante (Paralysis Agitans)

Movimiento involuntario trémulo, solo en ciertas partes, con reducción en la potencia muscular, en la acción e incluso en el apoyo, con una tendencia a doblar el tronco hacia adelante, y lentitud en el ritmo para pasar de caminar a correr; los sentidos e intelecto parecen intactos.

James Parkinson; 1817 “Essay on the Shaking Palsy”

Actualmente, la enfermedad de Parkinson (EP) es reconocida como el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente a nivel mundial, después de la enfermedad de Alzheimer. Se estima que la frecuencia de la EP es de 160 por cada 100000 habitantes y se considera que es la alteración motora más común.²

En México, la Secretaría de Salud en el año 2006 reportó más de 500,000 mil casos de EP. Actualmente se desconoce con exactitud las personas que puedan padecer EP en nuestro país.⁶

La EP afecta al 0.3% de la población general y su prevalencia aumenta con la edad. Así, esta enfermedad afecta 1-2% de la población mayor de 65 años y hasta el 5% de las personas mayores de 85 años.⁷ La edad de inicio promedio de la EP es de 55-65 años; sin embargo, existen casos de EP de inicio juvenil donde se presenta antes de los 20 años de edad y casos de EP de inicio temprano (EP-IT)². En particular, la edad de inicio es un parámetro subjetivo y muy controversial, por consenso de la literatura universal, la EP-IT se considera cuando las manifestaciones clínicas inician antes de los 45 años de edad.⁴

Este padecimiento neurodegenerativo es progresivo y de curso prolongado. Clínicamente se caracteriza por temblor rítmico involuntario, rigidez, pérdida de la expresión facial y manifestaciones psiquiátricas; entre ellas, la depresión. Para el diagnóstico de la EP se requiere la combinación de al menos cuatro de seis alteraciones cardinales motoras específicas: temblor en reposo, bradicinesia (lentitud de los movimientos), rigidez, postura flexionada del cuello, del tronco y extremidades, pérdida de reflejos de la postura y ralentización de la marcha. Dentro de los síntomas clínicos, los más indicativos de la EP son la rigidez, el temblor en reposo y la bradicinesia.⁹

El curso clínico de la EP se inicia con síntomas inespecíficos tales como hiposmia (disminución de la olfacción), estreñimiento, depresión y alteraciones del sueño que se atribuyen a los cambios degenerativos producidos principalmente por el estrés, la alimentación y/o la edad. Los síntomas locomotores se desarrollan en un estado más avanzado.¹⁰

Los pacientes con EP pueden experimentar una amplia gama de síntomas motores y no motores como: trastornos motor-orales, tales como disartria, disfagia y salivación. De éstos, la disartria se produce en aproximadamente el 70% de los pacientes, la disfagia también es frecuente y se presenta en 40-80% de los pacientes, mientras que la salivación es reportada en 25-50% de la población, según los criterios diagnósticos.¹¹ La mayoría de los casos con EP son esporádicos y se piensa que se deben a la interacción de factores genéticos y ambientales por lo que la EP es una enfermedad de etiología compleja¹⁶; y al menos el 10% de los casos son heredados en forma mendeliana.¹²⁻¹⁵

Por otro lado, en el cerebro de los pacientes con EP se han descrito varias anormalidades bioquímicas, incluyendo el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial¹⁷; sin embargo, el diagnóstico definitivo de la EP sigue siendo fisiopatológico. Las características histopatológicas incluyen pérdida de células en núcleos pigmentados y la formación de inclusiones intracitoplasmáticas, denominadas cuerpos de Lewy, en particular en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) del mesencéfalo de tejido cerebral *postmortem* de pacientes con EP.^{18,19} El principal tratamiento para esta enfermedad es el reemplazo del neurotransmisor dopamina. Esto se logra utilizando el precursor metabólico de la dopamina, la L-DOPA o agonistas de los receptores de dopamina que pueden temporalmente aliviar los síntomas motores en lugar de retardar la progresión de la EP. Sin embargo, este tratamiento no puede aliviar los síntomas no motores concomitantes (disfunción autonómica, depresión, ansiedad y demencia) que también tienen un alto impacto en los pacientes con EP.²⁰

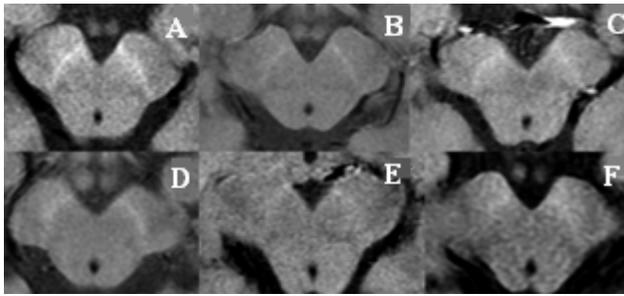


Figura 1. Imagenología por Resonancia Magnética. Presencia de neuromelanina por imagen de resonancia magnética de la sustancia *nigra pars compacta* del mesencéfalo. **A:** control, **B-F:** pacientes con EP (Tomado Kashihara et al 2011).

A través de Imagenología por Resonancia Magnética (MRI), Kashihara y colaboradores, observaron que la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc de pacientes con EP conlleva a un decremento en la presencia de neuromelanina (pigmento encontrado en algunas áreas específicas del cerebro), cuya función aún no está totalmente esclarecida (Figura 1); sin embargo, algunos autores proponen que ésta está relacionada con la quelación de metales, de hecho en las neuronas dopaminérgicas de pacientes con EP hay depósitos de neuromelanina y hierro.^{20,21}

La agregación anormal de proteínas puede conducir a disfunciones celulares y eventualmente a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas. En la mayoría de los cuerpos de Lewy se ha identificado a la proteína α -sinucleína, es por eso que la EP junto con otras enfermedades neurodegenerativas que se caracterizan por acumulados de ésta proteína, se les denomina α -sinucleinopatías.²² Los agregados intracitoplasmáticos de proteínas mal plegadas o dañadas, incluida la α -sinucleína producen un déficit en la función neuronal y consecuentemente la muerte de las neuronas de la SNpc las cuales están ligadas a la regulación de la función motora.¹²⁴

La mayoría de pacientes con EP presentan acumulados intracitoplasmáticos, incluidas las personas que presentan EP-IT, aunque el fenotipo en los pacientes EP-IT puede ser similar a la enfermedad de Parkinson de inicio tardío, una proporción significativa de pacientes con EP-IT también presenta distonia.²⁴

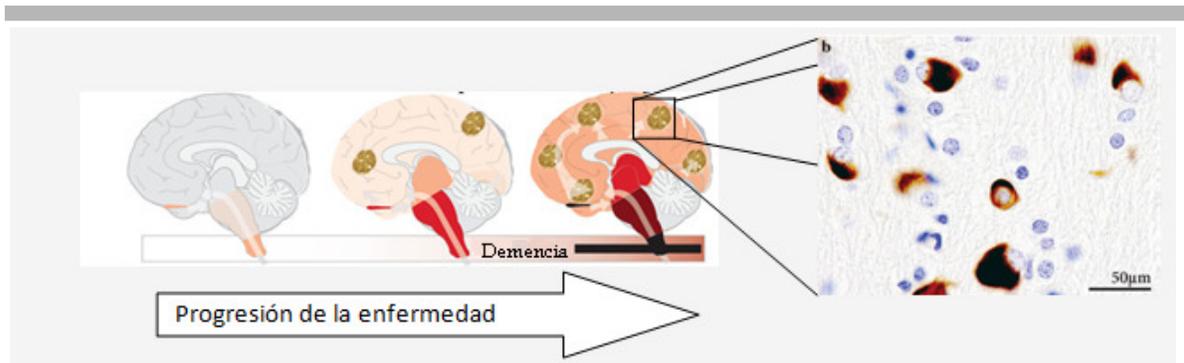


Figura 2. Progresión de la EP. Tinción inmunorreactiva para agregados proteicos, primordialmente α -sinucleína, se aprecia que conforme avanza la enfermedad, se presentan más Cuerpos de Lewy. (Modificado de Halliday et al 2011)

Se sabe que a mayor número de inclusiones citoplasmáticas, el déficit de las funciones motoras se incrementa. En la Figura 2 se observa la progresión de la EP asociado al incremento de cuerpos de Lewy que se sabe aumentan el grado de demencia en los pacientes.

Se desconoce la base molecular para la formación de los cuerpos de Lewy que eventualmente provoca la muerte neuronal, pero se piensa que puede ser consecuencia de las interacciones entre diversos factores genéticos (mutaciones en diferentes *loci*) y ambientales como exposición a pesticidas, herbicidas y neurotoxinas tanto endógenas como exógenas.^{25,26} Estos factores se asocian con una deficiencia en la degradación/eliminación de sustancias tóxicas exógenas o endógenas que pueden inducir una muerte neuronal selectiva por esos agregados intracelulares y por consiguiente ser un factor determinante en el desarrollo de la EP.²⁷

Se han buscado factores de riesgo entre la EP entre ellos los polimorfismos de nucleótido único (SNP) en el gen *CYP2D6*, una enzima del citocromo P450, se han asociado con varias enfermedades neurodegenerativas en algunas poblaciones. Individuos que heredan el fenotipo de metabolizador lento de *CYP2D6* les conlleva a acumular químicos neuroactivos o sus metabolitos en el cerebro, que puede hacerlo más susceptible al desarrollo de la EP.²⁸ Del mismo modo, polimorfismo en el gen *NAT-2* (N-acetiltransferasa-2), da como resultado enzimas *NAT2* con actividad enzimática y estabilidad variables, lo que conduce a la acetilación lenta o rápida.²⁹ Por otra parte, también la EP ha sido asociada a variantes del gen de la apolipoproteína E (*APOE*), aunque los datos son controversiales y no hay consistencia en cuanto a cual de los alelos de este gen está implicado con la EP.³⁰ Gao y colaboradores en un estudio de 786 pacientes con EP y 1537 controles, observaron que *APOE* está definitivamente relacionado con la EP, pero que el alelo $\epsilon 4$ está más asociado con una prevalencia menor de la EP, mientras que el alelo $\epsilon 2$ se presenta con mayor frecuencia en casos con EP.³¹ También SNPs localizados cerca de la región promotora y a lo largo del gen que codifica para la alfa-sinucleína (*SNCA*) se han relacionado con EP esporádica³², aunque también se ha visto que mutaciones en el gen que codifica para la proteína tau asociada a los microtúbulos (*MAPT*) en conjunto con las variantes en *SNCA* duplica el riesgo del desarrollo de EP que los polimorfismos en *SNCA* únicamente.³³ Del mismo modo las variantes G2385R y R1268P en el gen de la cinasa 2 rica en repetidos de leucina (*LRRK2*) confieren susceptibilidad a la EP en poblaciones asiáticas; aunque esos polimorfismos no han sido reportados en poblaciones caucásicas.^{15,34,35} Sin embargo, hasta ahora las mutaciones heterocigotas en el gen *GBA*, que codifica para la enzima glucocerebrosidasa son los factores que confieren mayor susceptibilidad para el desarrollo de la EP. En población Ashkenazi se ha descrito un riesgo de 7.0 (95% CI 4.2-11.4, $p < 0.001$). De hecho, mutaciones en *GBA* pueden ocasionar disfunción lisosomal o interferir en la degradación de la proteína alfa-sinucleína y generando toxicidad celular.^{36,37}

A pesar de una vasta literatura sobre el estilo de vida de los pacientes con EP y la participación de factores de riesgo o protección, los hallazgos son muy controversiales. Hay pruebas convincentes de los efectos protectores del consumo de tabaco y de café, pero los mecanismos biológicos de éstos, en conjunto con sus relaciones causales, son poco conocidas. Los niveles del ácido úrico también parece que se asocia con un menor riesgo de EP. Se ha documentado también que la exposición a plaguicidas aumenta el riesgo de la EP. Incluso se demostró en 1983 por Langston y colaboradores que la EP puede ser inducida por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), de igual forma se ha observado en análisis post-mórtem en tejido cerebral de pacientes con EP que hay daño por especies reactivas de oxígeno (EROs) y deficiencia en el complejo I de la respiración en las células de la SNpc.³⁸ También se ha visto que la exposición a ciertos químicos ambientales como herbicidas, plaguicidas y la rotenona, inhibe el complejo I de la cadena respiratoria. Diversos estudios epidemiológicos señalan consistentemente un aumento significativo en el riesgo de la EP tras la exposición ocupacional a estas toxinas. Más de la mitad de las proteínas codificadas por el DNA mitocondrial (mtDNA) se ensamblan en el complejo I y algunos polimorfismos en la secuencia del mtDNA que codifica para este complejo, parecen reducir el riesgo de desarrollar EP; es decir funcionan como factor de protección.³⁹ La producción de EROs en su mayoría tiene lugar dentro de la mitocondria cuyo DNA es particularmente vulnerable a mutaciones.⁴⁰

Cabe resaltar que a pesar de los avances descritos, se necesita investigación adicional para identificar los componentes específicos que pueden desempeñar un papel causal en la EP.⁴¹

Los estudios de agregación familiar también apoyan la participación de un componente genético en la EP. Un estudio en México encontró una prevalencia de pacientes con inicio temprano del 16,1% en la muestra de pacientes con EP estudiada y entre estos se encontró que un 23,5% presentaba historia familiar positiva de Parkinson en los familiares de primer grado.⁴² Estudios de meta-análisis demostraron que el riesgo relativo para desarrollar la enfermedad teniendo un familiar en primer grado con EP es de 2.9.⁴³ Tanner y colaboradores en un estudio de meta-análisis para concordancia en gemelos, el cual incluía a casi 20'000 individuos, reportaron tasas similares de concordancia entre gemelos monocigóticos y gemelos dicigóticos, pero en los casos con una edad de inicio temprana (antes de los 50 años) observaron que la tasa de concordancia era mayor y estadísticamente significativa con respecto a los gemelos dicigóticos.⁴⁴ Estos resultados sugieren que entre individuos con EP de inicio tardío los factores ambientales desempeñan un factor más determinante; en contraste con los individuos que presentan EP de inicio temprano donde los factores genéticos serían más importantes para el desarrollo de la enfermedad.⁴⁵

El impacto de esta enfermedad reside en el hecho de que la mortalidad entre las personas afectadas es dos a cinco veces más alta que entre controles pareados por edad, resultando en una disminución de la calidad y expectativa de vida. Empero el mecanismo de patogénesis de la EP permanece sin elucidarse y hasta ahora no existe un cura para la neurodegeneración que se observa en los pacientes.¹⁷ La investigación de series de pacientes

con EP genera datos de posibles factores causales o que contribuyen al desarrollo del padecimiento. En la literatura, se ha descrito una gran cantidad de factores de riesgo ambientales, aunque el riesgo atribuible a cualquiera de éstos no representa más que un pequeño porcentaje como probabilidad de desarrollar la enfermedad. Por otro lado, los análisis de ligamiento y la investigación de EP familiar han generado múltiples resultados acerca de la genética de la afección.⁴⁶

II.II Genética de la enfermedad de Parkinson

A pesar de que la causa primaria de la enfermedad aún permanece desconocida, en las últimas dos décadas han habido avances significativos gracias a los estudios de asociación amplia del genoma (GWAS). Los GWAS han facilitado la identificación de distintos *loci* que se han asociado con el desarrollo de la enfermedad; y a su vez, han permitido la comprensión de los mecanismos etiopatogénicos.⁴⁷ La participación de cinco genes en el desarrollo de esta enfermedad con herencia mendeliana ha sido ampliamente confirmada (*PARK2*, *LRRK2*, *SNCA*, *PINK1* y *DJ1*). En la Figura 3 se observan los dominios de los productos proteicos de cuatro de los genes causales de la enfermedad de Parkinson. El gen que codifica para la cinasa-2 rica en repetidos de Leucina (*LRRK2*), el gen de la α -sinucleína (*SNCA*), el gen de parkina (*PRKN*), el gen *DJ-1*, y el gen que codifica para la Cinasa-inducida del homólogo de fostatasa y tensina (*PINK1*).⁴⁸

Las formas autosómicas dominantes de EP pueden ser causadas por mutaciones heterocigotas en el gen *LRRK2* y por mutaciones y/o multiplicaciones (aumento de dosis génica) en el gen *SNCA*. Mientras que alteraciones homocigotas de la secuencia y de la dosis de los genes *PINK1*, *PRKN* y *DJ-1* son causantes de la EP con un patrón de herencia autosómico recesivo.⁴⁹

a) *SNCA* (α -sinucleína)

El gen *SNCA* codifica para la proteína α -sinucleína, la cual tiene un peso de 140 kDa. Numerosos estudios han establecido que las mutaciones, duplicaciones o triplicaciones en el gen *SNCA* son causantes de enfermedad de Parkinson familiar.⁷ Se ha observado que la triplicación del gen conduce a una progresión más rápida y un inicio más temprano de la enfermedad que el de la duplicación, lo que indica que la severidad de la enfermedad depende de los niveles de expresión de la proteína α -sinucleína. Estos hallazgos han podido obtenerse a través de estudios en modelos animales y celulares. Además, se ha establecido una fuerte asociación entre la EP esporádica y la expresión de *SNCA* mediada por mecanismos moleculares epigenéticos; reforzando el hecho fundamental de que la α -

sinucleína desempeña una función ponderal en la patogénesis de la EP.⁵⁰ Adicionalmente, se ha visto que algunos polimorfismos del promotor de *SNCA* pueden aumentar la expresión de la proteína.⁵¹ Aunque la función bioquímica precisa de la *SNCA* aún no está clara, evidencias recientes apuntan hacia una posible función en la liberación de neurotransmisores. Y varias pruebas *in vivo* demuestran que α -sinucleína se une y promueve el ensamblaje del polipeptoma SNARE (receptor de proteínas de unión solubles y sensibles al factor N-etilmaleimida), un complejo de proteínas que se requiere para la movilización de vesículas en la membrana presináptica.⁵² Varios factores genéticos y ambientales pueden contribuir a la formación de oligómeros y fibrillas de α -sinucleína y por lo tanto, afectar también a la neurotransmisión.⁵³ Se ha comprobado que las mutaciones no sinónimas A53P y A30T promueven la formación de agregados fibrilares de α -sinucleína.⁵⁴

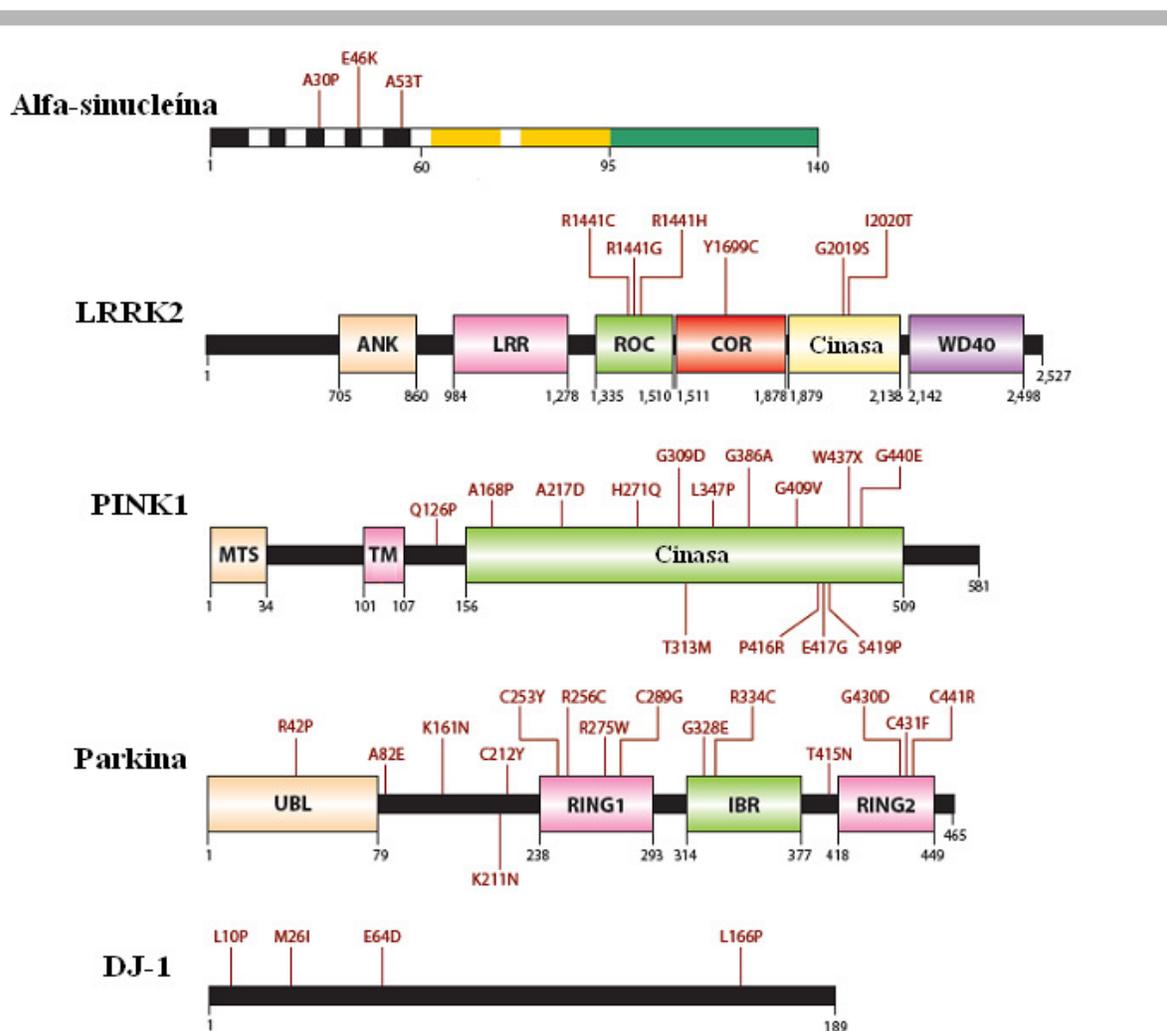


Figura 3. Esquema de las proteínas asociadas con la enfermedad de Parkinson. Se muestran sus principales dominios, se presentan de extremo N-terminal a extremo C-terminal. Así como también se presentan las variantes que se han encontrado en mayor frecuencia y que han sido reportadas (Tomado de Martin et al 2011).

La pérdida de neuronas dopaminérgicas en la EP puede estar relacionada con un efecto estabilizador de estos agregados protofibrilares de α -sinucleína que promueven la toxicidad. El envejecimiento puede contribuir a la toxicidad de α -sinucleína a través de la acumulación, ocasionada por la edad, de modificaciones oxidativas y de nitración de la α -sinucleína, que promueven la agregación de ésta misma. Por todo lo anterior, se han propuesto las terapias enfocadas en la protección contra la acumulación neurotóxica de los agregados fibrilares de α -sinucleína. Los flavonoides como la baicaleína bloquean la formación fibrilar de α -sinucleína y desagrega fibrillas maduras formadas previamente.⁵⁵ También se ha observado que el galato de epigallocatequina inhibe potencialmente la fibrillogénesis de α -sinucleína y muestra el potencial de detener la agregación en sus inicios, así como reducir la toxicidad de agregados preformados. También está la catequina que se une selectivamente a monómeros no estructurados de α -sinucleína, previniendo su conversión a estructuras ricas en hojas β y bloqueando la formación de fibrillas y oligómeros tóxicos.⁵⁶

b) *LRRK2 (Leucine Rich Repeat Kinase-2)*

El gen *LRRK2* que codifica para la enzima cinasa-2 abundante en repetidos de leucina, es una proteína de múltiples dominios con una actividad serín-treonina dependiente de GTP, posee un dominio de ankirina seguido de un tándem tipo ROC (Complejo tipo RAS), seguido del dominio COR (C-terminal de ROC), presenta el dominio de Cinasa y finalmente un dominio llamado WD40 que permite la interacción con proteínas de membrana.⁵⁷ Las mutaciones que ocasionan las sustituciones en los siguientes residuos proteicos: Y1699C, I2020T, R1441C y R1441G han segregado con la EP familiar autosómica dominante. La mutación G2019S que se presenta en el dominio de cinasa es la más común de todas en diferentes poblaciones del mundo.⁵⁸ Sin embargo, los estudios GWAS han demostrado que existe una gran cantidad de variantes en esta misma proteína que han sido asociadas con un incremento en el riesgo del desarrollo de la enfermedad.⁵⁹ Además otras investigaciones han observado que las mutaciones en este gen están relacionadas con un inicio tardío de la EP e incluso varios casos han presentado disminución o incluso ausencia de los cuerpos de Lewy.⁶⁰

Recientemente se ha demostrado que las mutaciones en el núcleo enzimático pueden afectar la interacción de las proteínas 14-3-3 con el extremo N-terminal de *LRRK2*, inmediatamente justo arriba de su dominio de repeticiones de leucina. Las proteínas 14-3-3 son moduladores importantes de la señalización celular y varios miembros de esta familia pueden unirse a los residuos de serina como Ser⁹¹⁰ y Ser⁹³⁵ fosforilados en *LRRK2*. Es importante destacar que numerosas mutaciones en el núcleo de los dominios ROC-COR, o en los dominios de cinasa de *LRRK2* pueden afectar considerablemente la unión con las proteínas 14-3-3 y/o causar la

disminución de la fosforilación de Ser⁹¹⁰ y Ser⁹³⁵. En conclusión, la mayoría de estas mutaciones explican la disminución de la interacción de LRRK2 con otras proteínas.⁶¹

La proteína LRRK2 existe principalmente como un dímero⁵⁷ y su actividad de cinasa puede depender de la formación de dímeros ya que se ha observado que sus monómeros u oligómeros, en contraste con dímeros de LRRK2, al parecer son catalíticamente inactivos. De acuerdo con esto, varias mutaciones patogénicas de LRRK2 resultan en una mayor proporción de dímeros en relación con las proteínas totales, lo cual estaría causando aglomerados proteicos que podrían dañar selectivamente a las neuronas dopaminérgicas. En consecuencia, la interrupción de la formación de dímeros puede ser un importante blanco terapéutico.⁶²

En contraste, varias líneas de investigación evidencian una interacción posible del LRRK2 y la α -sinucleína en la EP. Los exámenes neuropatológicos del cerebro de pacientes con EP positivos para mutaciones en *LRRK2* indican que los cuerpos de Lewy se presentan con frecuencia. LRRK2 se suele encontrar también, en parte, con la α -sinucleína en las primeras etapas de agregación en el tronco cerebral de los pacientes con EP, y la inmunorreactividad para LRRK2 en ocasiones se detecta en los cuerpos de Lewy. En modelos animales, se ha postulado que el LRRK2 podría modular la progresión neuropatológica de la EP cuando ésta está altamente ligada a la mutación A53T de α -sinucleína. Ni la sobreexpresión ni la ablación de LRRK2 ha llevado presuntamente a ninguna neurodegeneración observada en los ratones de hasta 20 meses de edad. Sin embargo, en experimentos de co-sobreexpresión de la mutante G2019S de *LRRK2* y A53T de α -sinucleína se ha observado que la variante G2019S de *LRRK2* acelera la progresión de los cambios neuropatológicos causados por la mutante A53T de α -sinucleína y da como inicio la agregación de α -sinucleína y la acumulación anormal en las neuronas del cuerpo estriado. Es importante destacar que en los modelos animales *knock-out* para *LRRK2* se observa una disminución en la acumulación y agregación de mutantes A53T de α -sinucleína y de igual forma un retraso en su patología, lo cual apoya a una interacción genética importante entre ambos *loci*, *SNCA* y *LRRK2*. Acerca de la investigación sobre los posibles mecanismos subyacentes de esta interacción, se ha visto que las alteraciones en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi se producen en mayor medida en ratones doblemente transgénicos (que tienen *SNCA* y *LRRK2* mutados) que en los que expresan solamente la mutante de A53T de α -sinucleína o la mutante del G2019S de *LRRK2*. En conjunto, estos estudios sugieren que LRRK2 podría promover la expresión de α -sinucleína así como su agregación y toxicidad.⁴⁷

Otra complicación de la posible relación entre la α -sinucleína y LRRK2 es el hecho de que los pacientes α -sinucleína-positivos generan cuerpos de Lewy contrario a los cerebros de pacientes con mutaciones en *LRRK2* donde muchas veces éstos están ausentes.⁶⁰ Por lo tanto, la relación precisa entre LRRK2 y α -sinucleína requiere de más investigaciones.

Las formas familiares de EP-IT presentan un patrón de herencia autosómico recesivo y son causadas por mutaciones en tres genes principales: *PRKN*, *PINK1* y *DJ-1* con una prevalencia que varía entre diferentes estudios y poblaciones.

c) *PINK1* (*PTEN kinase 1*)

PINK1 fue originalmente mapeado en una familia siciliana con EP con herencia autosómica recesiva¹². Subsecuentemente mutaciones en este gen han sido asociadas con una anticipación en la edad de inicio de casos familiares y en un 2-4% de los casos esporádicos de EP-IT siendo el segundo gen más frecuente causante de esta entidad.^{48,63} El gen *PINK1* mapea en 1p36 y abarca de 18 Kb, y está constituido por 8 exones. Su transcrito principal es de 2660 pb y genera una proteína de 581 aminoácidos con un peso de 63 kDa (Fig 4). En la figura 3, se observan las más frecuentes mutaciones que han sido reportadas. Sin embargo hasta 2009 se han reportado más de 50 variantes en todo el gen de *PINK1*, las mutaciones varían de población a población, y se reportan en distintas regiones geográficas.^{3,14}

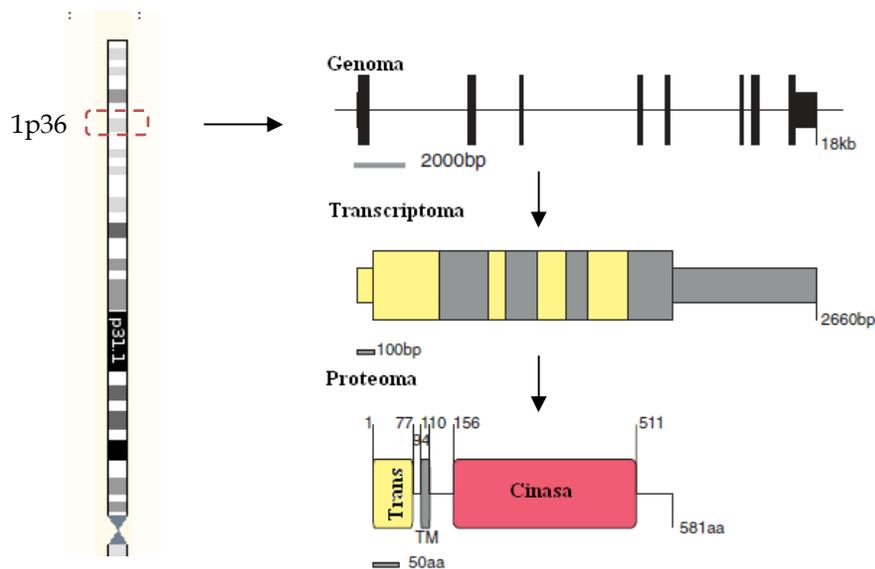


Figura 4. Representación gráfica del gen, el transcrito y la proteína *PINK1*. A la izquierda, se muestra un idiograma parcial del brazo corto del cromosoma uno humano. Se indica la localización cromosómica de *PINK1* dentro de la caja roja punteada en la banda citogenética 1p36. A la derecha, de arriba abajo, se esquematizan: gen, transcrito, proteína y sus respectivos tamaños. En la proteína se muestran los tres dominios de *PINK1*; TM: Región transmembranal, Trans: Región de transición (Tomado de Nuytemans et al 2010).

Se han propuesto tres mecanismos diferentes para explicar como las mutaciones en el gen *PINK1* provocan EP⁶⁴: de un lado, la fosforilación y ensamblaje incorrectos de complejos mitocondriales, lo que podría inducir deficiencia de ATP y afectar a la capacidad de las neuronas dopaminérgicas a mantener la homeostasis Na⁺/K⁺; por otra parte, otros autores proponen que *PINK1* participa en la activación de la apoptosis vía mitocondrial liberando señales proapoptóticas, probablemente mediadas por calcio.⁶⁵ Una tercera explicación para el papel de *PINK1* en la EP es su efecto mitocondrial en el reclutamiento de parkina⁶⁶ que parece modificarse en mutaciones relacionadas estrechamente con la EP.^{67,68}

Las características clínicas de la EP vinculada con mutaciones en el gen *PINK1* incluyen parkinsonismo con una buena respuesta a levodopa (el precursor de la dopamina), discinesias por causa de la levodopa y es poco frecuente la aparición de distonía o de hiperreflexia al inicio de la enfermedad. Las características distintivas sólo son la edad de aparición alrededor de los 30 años y progresión más lenta.⁶⁹⁻⁷¹

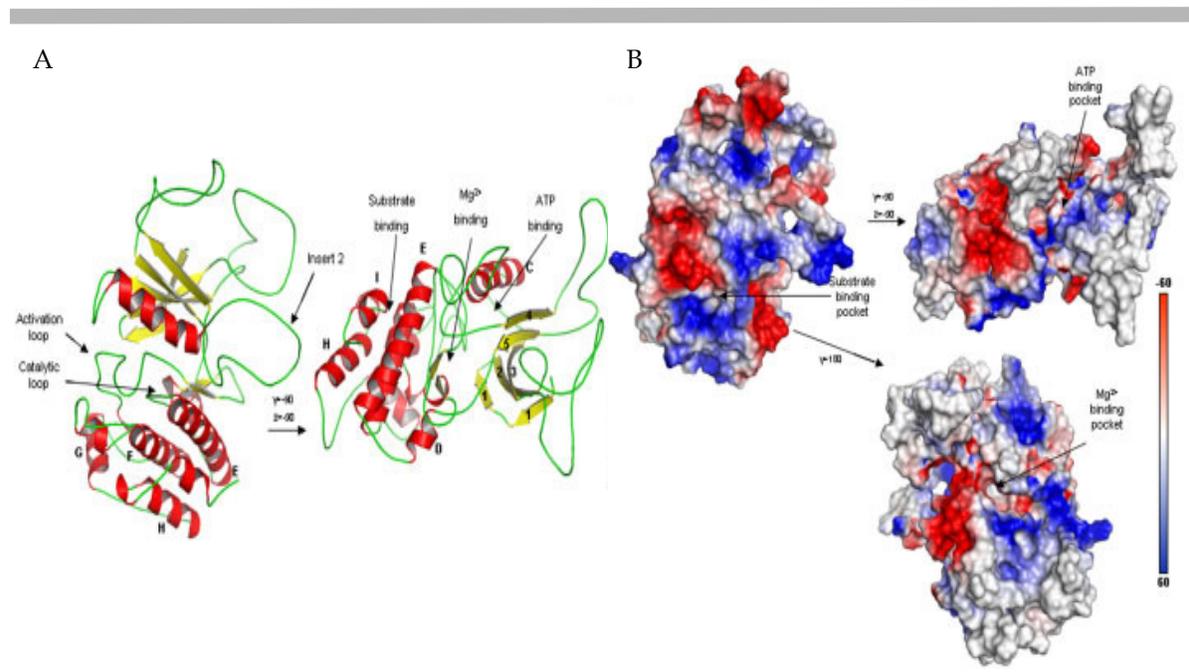


Figura 5. Estructura tridimensional de la proteína PINK1. **A.** En color rojo se muestran las estructuras de las alfa-hélices; en amarillo, las hojas beta plegadas y las secuencias de aminoácidos conectoras. **B.** Estructura de PINK1, donde se resalta las zonas altamente electrostáticas y los sitios de unión al sustrato, ATP y al magnesio; las regiones rojas denotan los sitios altamente electronegativos mientras que las zonas azules muestran sitios electropositivos (Tomado de Camargo et al 2011).

La proteína *PINK1* contiene dominios típicos de cinasa de serina/treonina que comparte con otras proteínas-quinasas diferentes y que están conservados en otras especies. Basándose en su homología con otras cinasas, se han generado modelos tridimensionales del dominio de cinasa de *PINK1*. Se han identificado genes ortólogos de *PINK1* en nemátodos, artrópodos y cordados, indicando que la secuencia de este gen está conservada evolutivamente.¹³ Los genes ortólogos poseen la peculiaridad de diversificar justo cuando se da un evento de

especiación, su estudio permitió que en fechas recientes se determinara el árbol filogenético y la estructura tridimensional de PINK1 (Figura 5).⁷²

Diversos estudios *in vitro* han demostrado que la sobreexpresión de *PINK1* protege contra el estrés intracelular causado por las EROs y contra el daño de la toxina MPP+. De manera contraria, este efecto protector se ve anulado por mutaciones en la secuencia del gen; ya que en líneas celulares con falta de función de *PINK1* se observó un incremento de EROs a nivel mitocondrial.⁷⁴

En modelos murinos *knockout* para *PINK1* se observan reducciones en la actividad del complejo I de las células del estriado en el cerebro. Asimismo, se demostró que la expresión silvestre de la proteína PINK1 en fibroblastos de ratón *knockout* es suficiente para el rescate de la actividad enzimática del complejo I en estas células. En concordancia con estos estudios, se observó que la expresión de PINK1 que contenía mutaciones asociadas a la EP (inactivando el dominio de cinasa) falló en el rescate del complejo I de la cadena respiratoria. Además, la exposición de la progenie de estos ratones a toxinas ambientales reveló que sus neuronas carecen de la proteína PINK1 y fueron más susceptibles al estrés oxidativo.⁷⁵

PINK1 ejerce su acción neuroprotectora ante el daño ocasionado por las EROs al fosforilar a la proteína asociada al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAP1). TRAP1 es una proteína de choque térmico de 75 KDa (Hsp75) que interactúa con PINK1 en el espacio intermembranal de la mitocondria (Figura 6).⁷⁶ La fosforilación de TRAP1 evita la liberación del citocromo C e inhibe la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno (H₂O₂), pero el mecanismo aún se desconoce. En este mecanismo, se ha sugerido la participación mediadora de la Hemo-Oxigenasa (HO), enzima que degrada principalmente grupos hemo intracelulares libres de hierro, monóxido de carbono y biliverdina. La expresión de la HO puede ser inducida por su sustrato hemo y una gran variedad de estímulos o condiciones oxidativas en el cerebro o en otros tejidos. Además, se ha descrito un aumento de los niveles de esta enzima en el suero y en la SNpc de pacientes con EP, indicando una reacción sistémica antioxidante relacionada con un estado de estrés oxidativo.⁷⁷ Investigaciones recientes examinaron el efecto de la mutante G309D de PINK1 en la toxicidad inducida por MPTP y el generador de radicales libres, H₂O₂, en células dopaminérgicas humanas SH-SY5Y. La expresión de la mutante G309D de PINK1 bloquea la inducción de HO después del estrés oxidativo. El bloqueo de la HO ocasionado por PINK1 mutante puede estar relacionado con la patogénesis de la EP.¹⁹ Adicionalmente, el silenciamiento de PINK1 en las células SH-SY5Y disminuyó los niveles de glutatión reducido, un antioxidante clave en el cerebro que se encuentra en niveles bajos en la SNpc de pacientes con EP esporádica. Los niveles de glutatión total pueden estar afectados en cultivos de neuronas humanas *knockdown* para PINK1 y de fibroblastos humanos que expresan la mutación G309D de PINK1.⁷⁸ En contraste, en ausencia de TRAP1, la sobreexpresión de tipo silvestre de PINK1 es incapaz de proteger a las células contra la apoptosis mediada por el estrés oxidativo, indicando que TRAP1 es esencial para los efectos pro-supervivencia de PINK1.⁷⁶

En cultivos de fibroblastos de pacientes con EP-IT con la mutación homocigota sin-sentido W437X mostraron una disminución significativa en la actividad respiratoria de sus mitocondrias y una acumulación de EROs en comparación con los controles sanos.⁷⁹ Más tarde, Liu y colaboradores demostraron que las mutaciones en *PINK1* con pérdida de función, asociadas a EP-IT, alteran la respiración mitocondrial (medida por el consumo de oxígeno, y producción de ATP). Los investigadores observaron que un suministro reducido de energía, afecta la función del proteasoma y se asocia con una mayor agregación de alfa-sinucleína.⁸⁰ Por otro lado se sabe que en diferentes condiciones patológicas, el deterioro de la función de la cadena respiratoria se debe a mutaciones en el mtDNA que pueden a su vez originarse por la formación de las EROs (Figura 6A). La pérdida de la expresión de *PINK1* en células dopaminérgicas humanas SH-SY5Y resultó en una disminución de la síntesis de mtDNA y en un deterioro de la cadena respiratoria afectando particularmente al complejo IV.⁷⁸

Otros grupos de investigación han demostrado que *PINK1* regula el flujo del calcio en las mitocondrias (Figura 6B). Cuando existe deficiencia de *PINK1*, las mitocondrias sufren de sobrecarga de calcio y se estimula la producción de EROs en la mitocondria y en el citosol. La sobreproducción de radicales libres causa inhibición del transportador de glucosa, resultando en una falta de entrega de sustrato y problemas en la respiración. El deterioro generalizado de la respiración mitocondrial parece ser una consecuencia de la falta de sustratos para los complejos I y II y está asociado con el consumo de oxígeno reducido en modelos *knockdown* y *knockout* para *PINK1*.⁶⁵ La menor actividad de los complejos de fosforilación oxidativa lleva a una disminución del potencial de membrana mitocondrial. En consecuencia, las mitocondrias cambian de la producción de ATP, al consumo de ATP mediante la acción de la ATP-sintasa, para así poder mantener su potencial de membrana.⁸¹

Estudios recientes han propuesto una función para *PINK1* en la señalización intramitocondrial mediada por calcio. Al evaluar el flujo directo del calcio en células SH-SY5Y, se demostró que la expresión de la proteína mutante *PINK1* puede inducir sobrecarga de calcio mitocondrial, lo cual podría explicar los fenotipos mitocondriales asociados con mutantes de *PINK1*. Los investigadores han proporcionado un análisis bioquímico y fisiológico detallado de la señalización del calcio en tres poblaciones de células deficientes de *PINK1* y han demostrado que *PINK1* regula directamente el flujo del calcio mitocondrial a través del intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$.⁸² Demostraron que los fenotipos mitocondriales (bajo potencial mitocondrial, aumento de la producción de EROs y deficiencias complejas en las funciones respiratorias) asociados con deficiencia de *PINK1* son consecuencia de la sobrecarga de calcio mitocondrial (Figura 6B). La acumulación de calcio estimula la producción de EROs, reduce la capacidad de amortiguamiento del pH y disminuye el umbral requerido por la célula para abrir el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) lo que resulta en la liberación de factores pro-apoptóticos como el citocromo C.⁸³ En particular, las neuronas dopaminérgicas utilizan canales de calcio, en lugar de canales de sodio, para mantener su ritmo autónomo y con frecuencia están expuestas a microambientes electrostáticos generados por calcio.⁸⁴

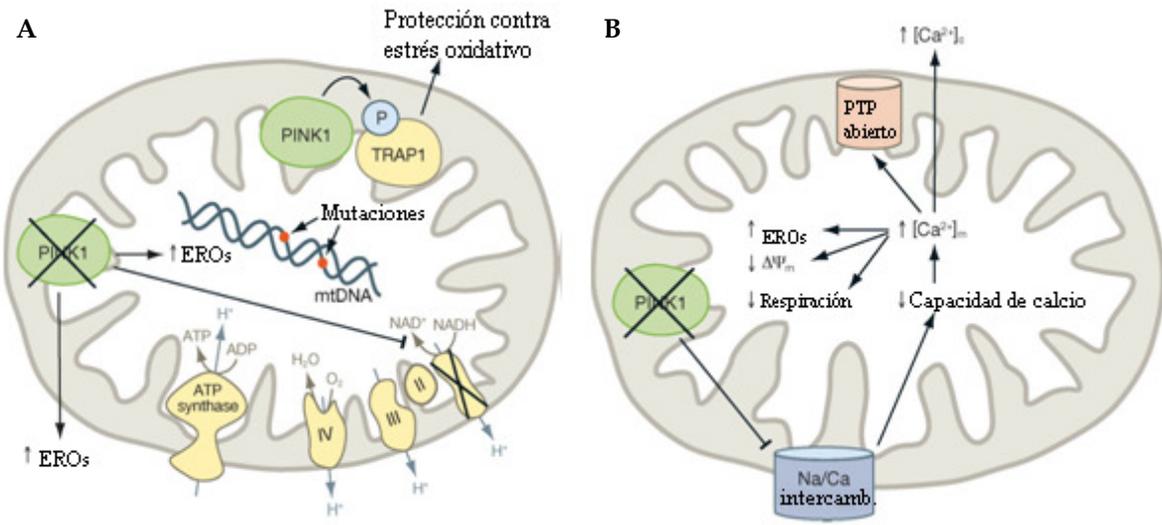


Figura 6. Funciones de PINK1 en la mitocondria. A. acción neuroprotectora de PINK1 mediante su interacción con TRAP1, para evitar acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs) B. Participación propuesta de la proteína PINK1 en la señalización y acumulación de Ca²⁺ intramitocondrial (Tomado de Deas et al 2009).

La localización de PINK1, su función ponderal en las mitocondrias, así como su participación en la neurodegeneración de la EP indican que PINK1 tiene un efecto modulador en las rutas de muerte celular, dependientes y mediadas por la mitocondria. Petit y colaboradores realizaron un estudio donde exploraron la participación de la proteína PINK1 en la apoptosis neuronal basal y la inducida por estaurosporina. Los resultados de esa investigación establecen que en células neuronales la expresión transitoria y estable de PINK1: 1) impide la translocación mitocondria-citoplasma del citocromo C tanto en condiciones basales como inducidas por estaurosporina; 2) reduce la activación de las caspasas -9, -7 y -3 y de la polimerasa de poli-(ADP-ribosa) (PARP); 3) previene contra la fragmentación del DNA inducida por estaurosporina y 4) reduce potencialmente las actividades apoptóticas basales y de muerte celular inducida por estaurosporina (Figura 7).

En dicho estudio, demostraron que la presencia de mutaciones en la secuencia de *PINK1* deroga totalmente la protección proporcionada por la proteína contra la muerte celular, confirmando que la función alterada de PINK1, o bien a través de la pérdida de la actividad catalítica o a través de la inestabilidad de la proteína mutante, genera un índice mayor de muerte celular. Si se inhibe la función anti-apoptótica de PINK1 silvestre, se altera la fosforilación de una o más proteínas blanco que podrían participar en la degeneración neuronal de la EP.⁸⁵

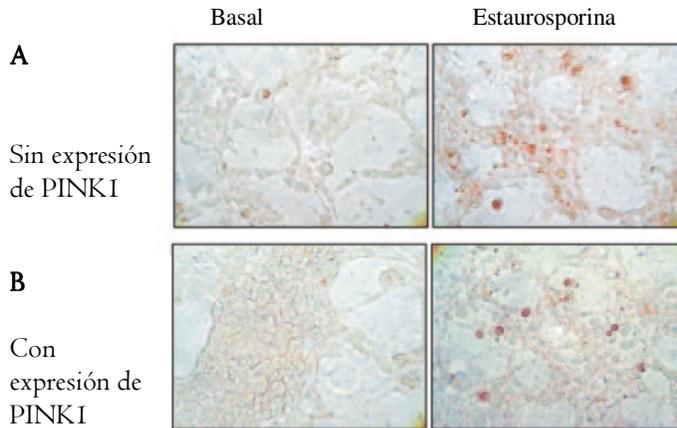


Figura 7. Evaluación de PINK1 en la apoptosis. **A.** Muerte de células SH-SY5Y transfectadas con un vector vacío de PINK1, en estado basal y en presencia de estaurosporina. **B.** Muerte de células SH-SY5Y transfectadas con un vector contenedor de PINK1 en condiciones basales y en tratamiento con estaurosporina. *Empleada técnica de TUNEL (Petit et al 2005).*

Por otra parte los hallazgos recientes sugieren que las proteínas parkina y PINK1 tienen una función crítica en el mantenimiento de la integridad y función mitocondriales y por ello se postula a la disfunción mitocondrial como la causa prominente de la EP. Dichas investigaciones han permitido esclarecer de una mejor manera los mecanismos patológicos de la enfermedad a nivel molecular. El hecho de que mutaciones homocigotas en parkina o PINK1 causan EP autosómica recesiva, indica que la función normal de estas proteínas es necesaria para la supervivencia celular, particularmente en el mantenimiento y desarrollo de las neuronas dopaminérgicas.⁸⁶ En células de mamíferos se apoya un vínculo donde PINK1 fosforila a parkina en una vía metabólica en común.⁸⁷ Asimismo, se ha observado que el fenotipo mutante de *PINK1* en *Drosophila melanogaster* puede ser rescatado por la sobreexpresión de parkina, sugiriendo que PINK1 actúa río arriba de parkina en esa vía bioquímica que comparten.^{88-90,125}

d) *PRKN*

Parkina es una proteína codificada por el gen *PRKN*. Esta proteína posee un dominio de E3 ubiquitín-ligasa en su extremo N-terminal y dos dominios de tipo RING (*Really Interesting Gene* por sus siglas en inglés) en su terminal carboxílica. En mamíferos la parkina puede ubiquitinar y degradar varias proteínas por la vía del proteasoma. De estos resultados, se propuso que el estrés intracelular podía resultar de sustratos acumulados que parkina no pudo ubiquitinar y eventualmente no se degradaron y en conjunto, causan la muerte de las

neuronas dopaminérgicas en la EP.⁹¹ Amplia evidencia indica que parkina tiene la capacidad de proteger a las células contra la muerte celular inducida por una amplia variedad de factores como estrés oxidativo, inhibición del proteasoma, disfunción mitocondrial y estrés proteotóxico por sobreexpresión de proteínas mal plegadas.^{92,93} El mecanismo molecular subyacente en la acción de su actividad catalítica de E3 ligasa no está del todo claro. Esta actividad está vinculada estrechamente con la poliubiquitinación en la lisina 63 (K63) de la ubiquitina para formar una cadena de monómeros de ubiquitinas que es la señal para la degradación por la unidad 20S del proteasoma y subsecuentemente activar una vía de respuesta citoprotectora mediada por el factor nuclear Kappa B (NF-kB).⁹⁴

Sha y colaboradores indican que hay una conexión directa entre la fosforilación mediada por PINK1 y la poliubiquitinación de K63 mediada por parkina en las neuronas dopaminérgicas. Además el silenciamiento de PINK1 disminuye la activación de NF-kB y sensibiliza a las células dopaminérgicas a una apoptosis inducida por rotenona. Sin embargo, el fenotipo mutante y pro-apoptótico a causa del decremento de NF-kB por la falta de expresión PINK1 puede ser rescatado por sobreexpresión de parkina. Colectivamente, estos resultados apuntan a una ruta específica en la que PINK1 ejerce su función efectora de citoprotección por fosforilación río arriba de parkina y mejorando la poliubiquitinación de K63 y de esta forma beneficiando a la supervivencia celular y a la activación de NF-kB.⁸⁶

e) DJ-1

PINK1 también se ha relacionado con otra proteína llamada DJ-1, la cual protege a las células contra el estrés oxidativo en diversos modelos celulares transfectados en ratón y en *Drosophila*. Juntos, parkina, PINK1 y DJ-1 pueden actuar en una misma vía y proteger contra el estrés oxidativo en las células a través de un mecanismo común, sugiriendo posibles interacciones funcionales entre las tres proteínas. Adicionalmente, se demostró que las tres proteínas forman un complejo proteico parkina/PINK1/DJ-1 (PPD). Este complejo desempeña una función importante en la degradación de proteínas mal plegadas, que son blanco para parkina.⁹⁵ Otros trabajos demostraron que DJ-1 provoca varios defectos en las mitocondrias relacionados con el estrés oxidativo. Específicamente, las mitocondrias en las células deficientes de DJ-1 se despolarizan y tienen una mayor tendencia a fragmentarse.⁹⁶

Otros estudios demostraron que el dominio E3 ligasa del complejo PPD desempeña una función importante en la promoción de la degradación de sustratos de parkina mal-plegados o sin plegar. Las mutantes patogénicas de parkina y PINK1 causantes de EP, redujeron la actividad de E3 ligasa del complejo PPD. Los resultados de este grupo de investigación, sugieren una función de PINK1 y DJ-1 que es independiente del mantenimiento de la homeostasis mitocondrial. En su investigación utilizaron cuatro métodos diferentes para

determinar la formación del complejo PPD *in vitro* e *in vivo*: co-inmunoprecipitación en células que sobreexpresaban las tres proteínas, ensamblaje del complejo *in vitro* utilizando proteínas recombinantes purificadas, co-inmunoprecipitación de lisados de cerebro humano e inmunoprecipitación seguido por análisis de espectrometría de masas.⁹⁵ Los resultados proporcionan pruebas bioquímicas y mecanismos de acción en apoyo de reportes anteriores de interacción genética entre parkina y PINK1 en *Drosophila*⁹⁰ y la asociación de mutaciones con herencia digénica de PINK1 y DJ-1 en casos de EP-IT familiar.⁹⁷ Sin embargo, el complejo PPD no es el único que involucra una participación de PINK1, dado que el análisis de espectrometría de masas identifica varias proteínas interactuantes con PINK1, incluyendo a varios sustratos de parkina y la Sinfilina, otra proteína relacionada con los procesos de patogénesis de la EP.⁹⁵

En el complejo de PPD, parkina en su dominio *RING-finger* sirve de enlace entre una enzima E2 y su sustrato, mientras PINK1 y DJ-1 actúan como componentes reglamentarios. Se desconoce la participación de la actividad de cinasa de PINK1 en este complejo. Una posibilidad es que PINK1 regule la ubiquitinación de proteínas por fosforilación de sustratos o componentes de otros complejos. DJ-1 facilita el proceso pero no es necesario para la actividad de ligasa E3 del complejo PPD, se sugiere que DJ-1 puede estabilizar a PINK1.⁹⁷

Algunas mutaciones somáticas de los genes *PRKN* y *DJ-1* se han documentado en diferentes tipos de cáncer. De hecho, *PRKN* es un gen supresor de tumores y *DJ1* se considera un proto-oncogén debido a sus efectos negativos reglamentarios en la proteína PTEN (Homólogo de fosfatasa y tensina, proteína implicada en la regulación del ciclo celular).⁹⁸ Se ha propuesto que *PINK1* también podría ser un gen supresor de tumores. Curiosamente, parkina y DJ-1 se han relacionado con la vía de señalización PI3K/Akt que también está implicada en cáncer.⁹⁹

Por otro lado se ha inferido que mutantes de PINK1 pueden estar implicadas en la agregación de alfa-sinucleína, como consecuencia de la disfunción del proteasoma. En la mayoría de los casos la EP, hay cuerpos de Lewy y éstos contienen alfa-sinucleína como componente principal, se especula que PINK1 podría ser un factor importante para la acumulación y agregación de esta proteína a través de la interacción de PINK1-parkina-Proteasoma. Liu y colaboradores demostraron que la pérdida de la actividad de PINK1 causa acumulación de agregados intracitoplasmáticos de alfa-sinucleína en las células SH-SY5Y mediante estudios de co-transfección y microscopia confocal (Figura 8).⁸⁰

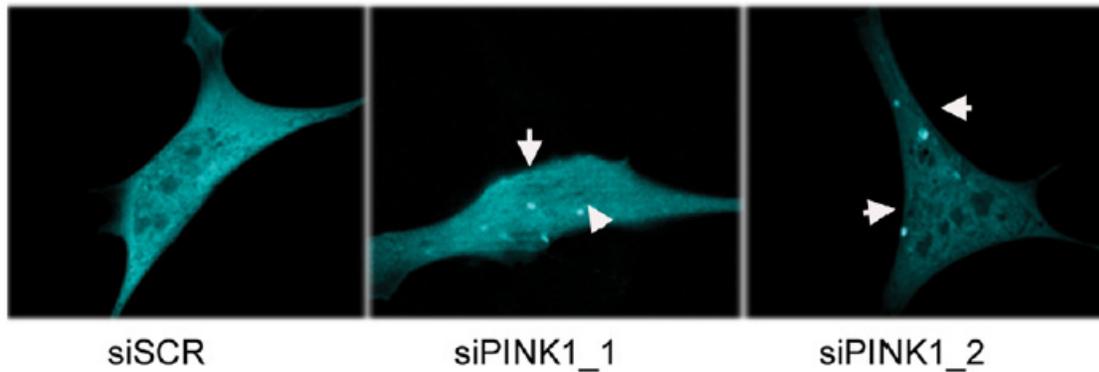


Figura 8. Evaluación de PINK1 en la agregación de proteínas. Células SH-SY5Y transfectadas con RNAs pequeños interferentes (siRNA) las células se observan con agregados citoplasmáticos de α -sinucleína visualizados por microscopía confocal, los acumulados de sinucleína se pueden ver por estar acoplados a una mCFP (proteína cian fluorescente monomérica), siSCR es un control negativo, mientras que siPINK1_1 y siPINK1_2, son células transfectadas con un siRNA para PINK1 (Liu et al 2009).

Uno de los primeros vínculos funcionales de PINK1 en un proceso biológico caracterizado, proviene de los estudios donde *PINK1* interactúa con genes que controlan la morfología mitocondrial. Las mitocondrias se someten a rondas de fisión y fusión constantes causando cambios de morfología dinámica en la red mitocondrial reticulada. Los genes que controlan la fusión de las mitocondrias incluyen el gen causante de la atrofia óptica 1 (*Opa1*) y el gen de la mitofusina (*Mfn*). Los genes que controlan la fisión mitocondrial incluyen proteínas relacionadas con la dinamina I (*Drp1*) y *Fis1*. La dinámica mitocondrial adecuada es crucial para mantener la homeostasis celular y su probable impacto sobre una serie de procesos clave dentro de la célula, tales como la distribución de las mitocondrias a lo largo de la célula para satisfacer las demandas de energía local y mantener un estado balanceado en la red mitocondrial quitando componentes mitocondriales disfuncionales. PINK1 primero fue vinculado en la dinámica mitocondrial a través de estudios genéticos en *Drosophila*, donde la sobreexpresión de genes pro-fisión como lo es *Drp1* o mutaciones de pérdida de función de genes pro-fusión como lo es *Mfn* eran suficientes para rescatar fenotipos mutantes de PINK1.¹⁰⁰

Otros trabajos recientes en moscas y vertebrados sugieren que PINK1 y parkina, no solo actúan como una vía para degradar proteínas sino que están íntimamente ligadas en una vía común para regular la morfología y la dinámica mitocondrial.¹⁰¹ En el organismo modelo de *Drosophila*, las mutaciones con pérdida de función en PINK1 y parkina dan como resultado mitocondrias hinchadas y degeneradas.⁹⁰ Este fenotipo se puede suprimir al menos parcialmente al aumentar la dosis génica del factor de promoción de fisión mitocondrial *Drp1* o disminuyendo la dosis de genes de los factores de promoción de la fusión mitocondrial *Opa1* o *Mfn*.¹⁰² Los hallazgos sugieren que esta vía PINK1/parkina actúa para promover la fisión mitocondrial o inhiben la fusión mitocondrial.¹⁰³

Poole y colaboradores generaron resultados demostrando que Mfn es ubiquitinizada en una vía dependiente de PINK-parkina y que la abundancia de Mfn es mayor en mutantes de PINK1 y parkina y disminuye en sobreexpresión de PINK1 y parkina. Estos hallazgos sugieren un modelo en el que PINK1 fosforila a Mfn y que da como resultado un aumento en la eficiencia de la ubiquitinación mediada por parkina.¹⁰³

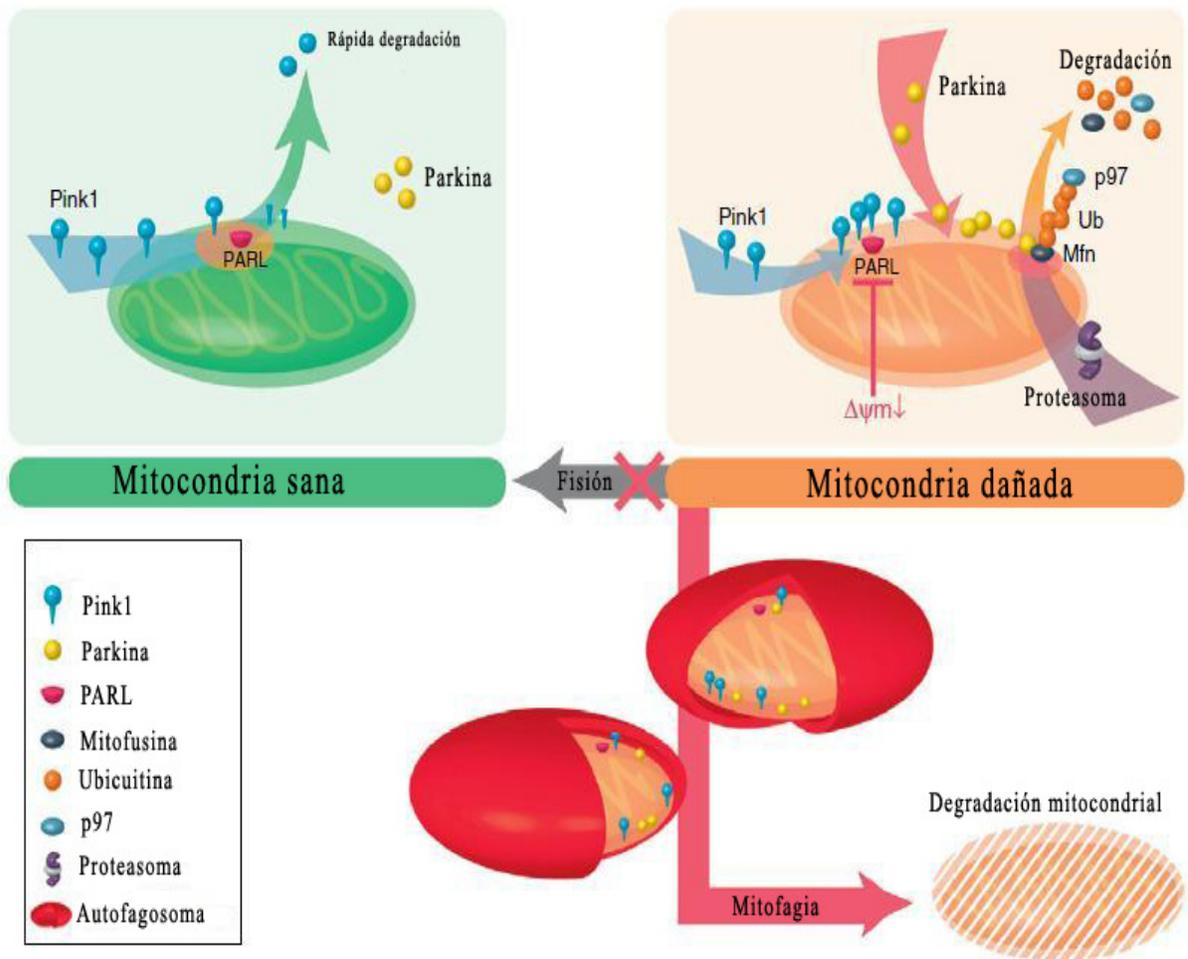


Figura 9. Mecanismo propuesto para la participación de PINK1 en la morfología mitocondrial. En la mitocondria sana PINK1 experimenta proteólisis mediada por PARL, esto se da en condiciones polarizadas de la membrana mitocondrial, la fracción resultante se degrada rápidamente en el citoplasma, y parkina no es reclutada a la mitocondria lo cual mantiene la homeostasis. En una mitocondria dañada hay un decremento en el potencial de membrana, debido a esto PINK1 no se proteoliza liberando el fragmento de aproximadamente 52 kDa, esto ocasiona que la proteína PINK1 se acumule en la mitocondria, por extensión parkina es reclutada a la mitocondria, y con su dominio de E3 ubiquitín-ligasa poliubiquitina en K63 a la mitofusina, eventualmente se ensambla p97 y todo este complejo proteico es degradado por la vía del proteasoma, la mitocondria es desprovista en su mayoría de mitofusinas por lo anterior y esto repercute en el hecho de que la mitocondria no puede ser fusionada con otra mitocondria sana, lo cual convierte a la proteína en un blanco para la degradación vía mitofagia, lo cual implica la formación del fagosoma (Tomado de Kawajiri et al 2011).

Esta interacción entre PINK1 y parkina también es apoyada por estudios celulares en donde la morfología mitocondrial y despolarización anormales es apreciable en células HeLa con

un déficit de PINK1 y son rescatadas por sobreexpresión de ésta de tipo silvestre, pero no lo son con proteína que presenten mutaciones relacionadas con el desarrollo de la EP.⁸⁷ Lo cual propone que tanto PINK1 como parkina podrían regular la autofagia mitocondrial, llamada específicamente mitofagia (Figura 9); reciente evidencia sugiere que parkina puede ser reclutada selectivamente en presencia de mitocondrias dañadas (las cuales se han despolarizado debido a la pérdida de potencial de membrana mitocondrial) para promover la mitofagia en una ruta que es dependiente de la proteína PINK1.¹⁰⁴

Narendra y colaboradores proponen un modelo que ofrece una explicación parsimoniosa por varias observaciones que se han realizado anteriormente. La proteína completa de PINK1-mitocondrial, cuyo peso es de 63 KDa, sufre una proteólisis dependiente de voltaje, ésta dicha ruptura proteica debe estar mediada por la proteína romboide asociada a presenilina (PARL) la cual es una proteasa cuya localización es en el interior mitocondrial, la ruptura de PINK1 es en una forma más corta, una fracción de 52-kDa, pero éste fragmento se encuentra principalmente en el citosol y es particularmente inestable. Sus resultados sugieren que la estructura completa de PINK1 que se encuentra en la mitocondria es la forma activa en la vía PINK1/parkina, y que la fracción pequeña inestable y citosólica de PINK1 mantiene bajos niveles de PINK1 en las mitocondrias sanas para reprimir la vía PINK1/parkina en ausencia de daño mitocondrial.⁶⁷

También es sugerido que PINK1 induce el reclutamiento de parkina a un subconjunto específico de las mitocondrias dañadas, tras su acumulación, se proponen varias hipótesis de cómo PINK1 podría inducir el reclutamiento de parkina. En un aspecto simple, parkina puede ser reclutada hacia las mitocondrias a través de una interacción directa con la proteína PINK1 acumulada. En apoyo de este modelo, PINK1 parece interactuar directamente con parkina en al menos en algunos contextos.⁶⁷

Como alternativa, PINK1 debe fosforilar a parkina, un sustrato de parkina o un mediador entre PINK1 y parkina, y aumentar así la afinidad de parkina para un sustrato o un receptor en las mitocondrias. En contraste con la hipótesis de fosforilación para la activación de parkina, se encontró que proteínas PINK1 deficientes de la actividad de cinasa no son capaces de llevar a cabo el reclutamiento de parkina de mitocondrias en mitocondrias dañadas. Por otra parte el modelo de la interacción PINK1_{acumulada}-parkina contempla que la pérdida de potencial de membrana mitocondrial inhibe la fracturación de PINK1, haciendo que su acumule en la membrana externa mitocondrial.⁶⁷ Y esto conduce al reclutamiento de parkina en la mitocondria, y la ubiquitinación de sustratos potenciales como lo son el canal I aniónico dependiente de voltaje (VDAC1) y la mitofusina.^{105,106}

La ubiquitinación de VDAC1 permanece sin esclarecerse por completo, se desconoce la finalidad por la cual parkina ubiquitina a esta proteína, empero se conoce que la poliubiquitinación de Mfn en K63 termina en el ensamblaje con p97^{71,107,108} o con el ensamblaje de p62^{14,68} y esto con lleva a la degradación vía proteasoma, por consiguiente una mitocondria dañada que ha sido eliminada de mitofusinas, es una mitocondria blanca para

degradación mitocondrial, vía mitofagia. En consecuencia, mutaciones patogénicas en PINK1 o parkina parecen perturbar el reclutamiento de parkina, sustratos de ubiquitinación y la mitofagia¹⁰⁵, reiterando de ésta forma que las mitocondrias son parkina y PINK1 dependientes, lo cual es hasta ahora ponderal en la patología de la EP.

Además de su función inducida en la morfología mitocondrial, PINK1 se ha asociado con otro aspecto de la dinámica mitocondrial: el tráfico mitocondrial. El tráfico mitocondrial es un aspecto vital de homeostasis celular, especialmente en las células grandes como las neuronas, donde el tráfico permite la redistribución de las mitocondrias a regiones de alta demanda de energía como lo es las regiones neuronales donde se lleva a cabo la sinapsis y zonas de desarrollo neuronal. Se ha encontrado usando espectrometría de masas que PINK1 forma un complejo con Miro, una GTPasa común de la membrana externa mitocondrial y Milton, una proteína citoplasmática adaptadora.¹⁰⁹ Este complejo proteico es responsable de la circulación de mitocondrias a través de los microtúbulos y se piensa que implica la adhesión de las mitocondrias a microtúbulos a través de una interacción entre Milton y la cadena pesada de la cinesina I.¹¹⁰ Esto permite el transporte de las mitocondrias de manera dirigida hasta llegar a una región de alto calcio intracelular. En consecuencia, defectos en el tráfico y distribución mitocondrial pueden ser la base de una enfermedad neurodegenerativa.¹¹¹

Miro posee un dominio tipo “mano” (Figura 10) (*EF-hands*), que al acoplarse a calcio intracelular bloquea transporte y resulta en una acumulación de mitocondrias en regiones altamente activas de la célula.¹¹² Sin la formación de este complejo, las mitocondrias ya no son transportadas y no pueden cumplir con eficiencia las demandas de energía de la célula. Estos vínculos con procesos morfológicos y tráfico mitocondrial proporcionan una perspectiva interesante que PINK1 puede influir tanto corto y largo alcance en la dinámica mitocondrial de forma aún desconocida para mantener la salud neuronal.¹¹⁰

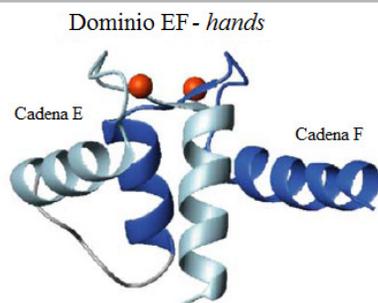


Figura 10. Estructura tridimensional del dominio EF-*hands* de Miro. Se indican la hélice E y la F, mientras que las cadenas intermedias permiten la unión al calcio¹¹³ (Tomado de Bhattacharya et al 2004).

Miro es una GTPasa mientras que Milton es una proteína adaptadora, se sabe que ambas son parte de un complejo de proteínas que se unen a la membrana externa mitocondrial de cara al citoplasma. Este complejo vincula la cadena pesada de la Cinesina I convencional a las

mitocondrias para transporte axonal anterógrado de las mitocondrias a lo largo de los microtúbulos (Figura 11) en la mosca *Drosophila*.¹¹⁴ Weihofen y colaboradores demostraron una interacción entre Pink y Miro lo cual implica que Pink1 forma parte del complejo de Miro-Milton y por lo tanto está potencialmente involucrada en la regulación del tráfico mitocondrial.¹⁰⁹ Los estudios genéticos en levaduras muestran que todos los dominios de Gem1p (homólogo de Miro en levadura) son necesarios para la correcta morfología mitocondrial.¹¹⁵ Por otro lado, el calcio detiene el movimiento mitocondrial y se ha especulado que el dominio *EF-hands* de Miro que permite el enlace de calcio podría ser importante para este efecto.¹¹⁴

En un mecanismo alternativo, la sobreexpresión de Miro conduce a una mayor proporción de la fracción de PINK1 de 63 kDa, sugiriendo también posibles efectos río arriba de Miro sobre Pink1.¹⁰⁹

Debido a que una adecuada fusión requiere de un tráfico mitocondrial controlado, es posible que las deficiencias de la función del complejo de proteínas PINK1/Miro/Milton causen un fenotipo de fragmentación en la mitocondria. También se han encontrado alteraciones en la morfología de crestas mitocondriales en modelos con pérdida de función de *PINK1*⁸⁸ y se ha identificado que la mitofilina (proteína mitocondrial de membrana interna) interactúa con la proteína Pink1 y puede tener especial importancia en el modelamiento interno mitocondrial. De hecho, Mitofilina es el organizador crítico de la morfología de crestas mitocondriales y es indispensable para el funcionamiento mitocondrial normal.¹⁰⁹

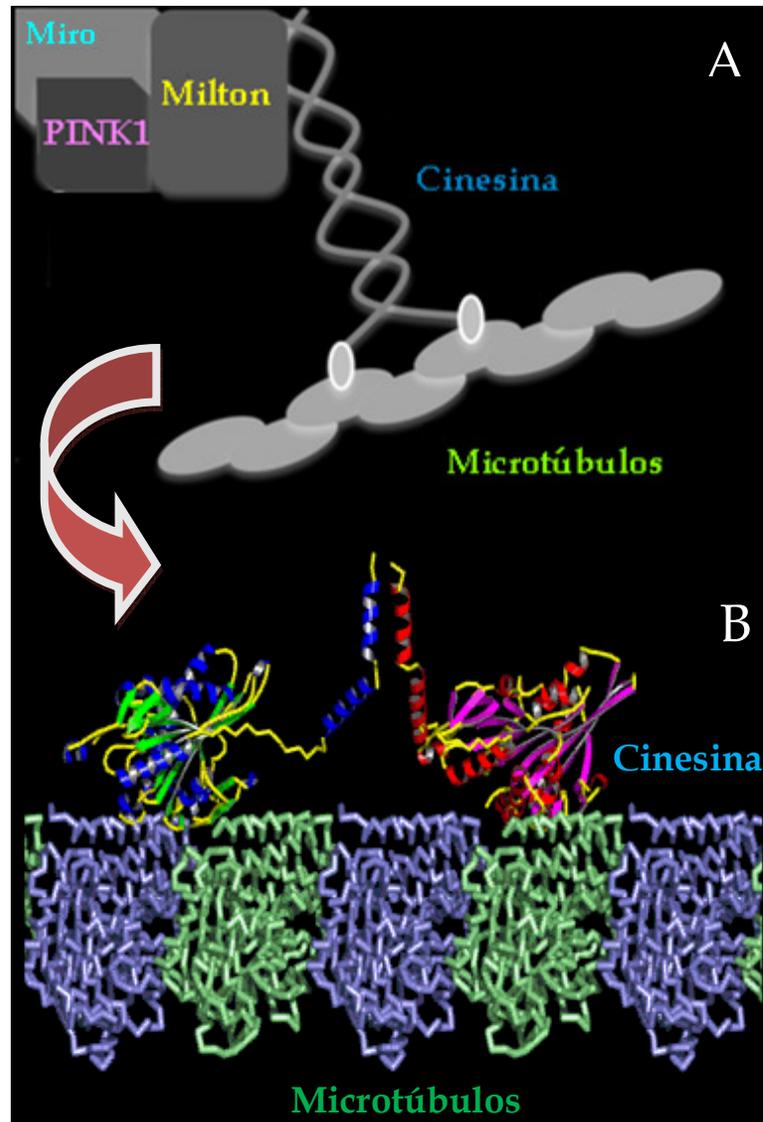


Figura 11. Complejo propuesto entre PINK1-Miro-Milton. A. PINK1 que se encuentra en la mitocondria forma un complejo con las proteínas Miro y Milton, éstas están altamente ligadas con el movimiento de organelos, al formar un complejo protéico, la proteína Milton se une a la cadena pesada de la Cinesina, otra proteína involucrada en el tráfico mitocondrial. B. La Cinesina se une a través de sus unidades “cabeza” a los monómeros de α y β -tubulina, y de esta forma se mueve a través de los Microtúbulos para el transporte de organelos (-A- Weihofen et al 2009; -B- Unidad Max Planck de Biología Molecular Estructural de Hamburgo).

Las rutas bioquímicas en las que participa PINK1 son diferentes y de suma importancia para las células, específicamente para mantener la homeostasis celular de las neuronas dopaminérgicas y principalmente la integridad molecular de la mitocondria, a través de la interacción con distintas proteínas, en resumen dichas interacciones forman parte del reactoma mitocondrial y mantienen un balance celular (Figura 12).

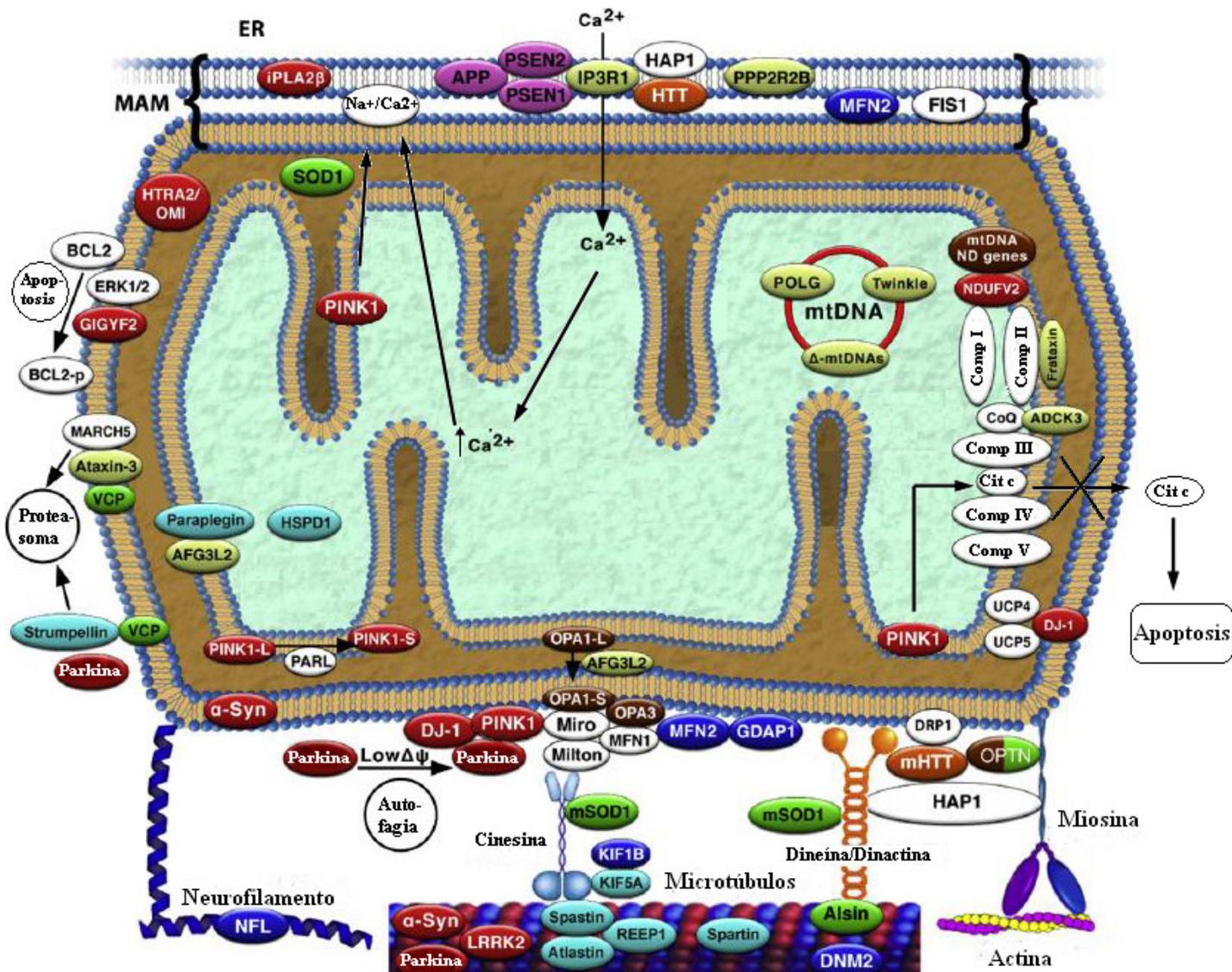


Figura 12. Diversas interacciones en la mitocondria específicamente aquellas que están implicadas en las enfermedades neurodegenerativas particularmente en la Enfermedad de Parkinson. Se denota que en aumento de Ca^{2+} PINK1 activa a la proteína intercambiadora de Na^{+}/Ca^{2+} para externalizar el aumento de calcio y evitar daño mitocondrial por generación de EROs. También se observa PINK1 y su interacción con Parkina y DJ-1, formando el complejo PPD, así como la hidrólisis de PINK-L (63 kDa) generando PINK-S (fracción de 52 kDa) y que si esta vía es bloqueada ocasiona el reclutamiento de Parkina, para que de ésta forma se active si es necesario la mitofagia. También muestra si que PINK1 está relacionando con la liberación del citocromo C que es una señal para que se desencadene la apoptosis. De la misma forma PINK1 interactúa con la proteína mitocondrial Miro, para que eventualmente se forme el complejo Miro-PINK2-Milton, donde éste último se une a la cadena pesada de la Cinesina y poder de esta manera irse desplazando a través de las unidades de α y β -tubulina componentes de los microtúbulos del citoesqueleto⁵ (Modificado Schon et al 2011).

III. Planteamiento del Problema

En el Departamento de Genética del INNNMVS se estudian diversas enfermedades neurodegenerativas (ENDGs), incluyendo la enfermedad de Parkinson. La amplia experiencia de más de dos décadas en el estudio de las ENDGs ha permitido brindar consejo genético, predictivo y detección de portadores en muchas de ellas.

En estudios previos, el grupo de trabajo ha estudiado diversos factores causales y de susceptibilidad de la EP. Basándose en una investigación preliminar de tamizaje de mutaciones en el gen *PRKN* en EP-IT se decidió investigar la presencia de mutaciones en *PINK1* en los casos negativos para *PRKN*.

IV. Hipótesis

Las mutaciones en *PINK1* pueden asociarse con algunos casos familiares y esporádicos de EP-IT en población mexicana.

V. Objetivos

Objetivo General:

Analizar el marco abierto de lectura del gen *PINK1* para la identificación de variaciones en secuencia, en pacientes diagnosticados con enfermedad de Parkinson de inicio temprano.

Objetivos Particulares:

- ❖ Estimar la prevalencia de mutaciones y polimorfismos del gen *PINK1* en 100 pacientes con enfermedad de Parkinson de inicio temprano.

- ❖ Analizar *in silico* el posible efecto de las variantes alélicas nuevas que se identifiquen en *PINK1* mediante el uso de herramientas de bioinformática.

VI. Metodología

Sujetos de estudio

La muestra estudiada fue de 100 pacientes diagnosticados con enfermedad de Parkinson a través de la consulta externa del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez. Los pacientes fueron evaluados por dos neurólogos especialistas en movimientos anormales.

Criterios de inclusión

- El paciente debe ser diagnosticado con 2 de los 4 síntomas cardinales de la enfermedad de Parkinson.
- La edad de inicio de la enfermedad en el paciente debe ser antes de los 45 años de edad.
- Que el paciente acepte participar y firme carta de consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Que la edad de inicio de la EP del paciente sea mayor de 45 años de edad.
- Que el paciente no acepte participar y no firme carta de consentimiento informado.

a) Toma de muestras biológicas

La toma de la muestra sanguínea se realizó en tubos Vacutainer® de 6 mL que contienen Citrato de Sodio (22mg/mL) como anticoagulante. La muestra sanguínea se dividió en dos alícuotas para la separación de células mononucleares (CMNs) y para la extracción del DNA genómico.

b) Separación de Células Mononucleares

A un volumen de la sangre obtenida, se le agregaron tres volúmenes de una solución amortiguadora de lisis de glóbulos rojos (BLGR¹) en un tubo para centrífuga. Esta mezcla se homogenizó por inversión y se centrifuga a 3000 rpm durante 6 minutos. Los componentes del BLGR generan un choque osmótico a las membranas de los eritrocitos, y contiene ácido etilendiamino tetra-acético o EDTA como quelante iónico.

Después de la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se trabajó con el botón o *pellet* de las CMNs. Las células se resuspendieron con 1mL de solución BLGR y se centrifugaron a 3000 rpm/2 min. Este paso se repitió hasta obtener un botón blanco, después de decantar el sobrenadante.

c) Extracción de DNA

Se agregó 570 µL de una solución de cloruro de sodio, NaCl [5mM] al botón de CMNs y se dejó en agitación por dos minutos. A esta reacción, se adicionaron 40 µL del detergente dodecil sulfato de sodio, SDS [10 % v/v], se homogenizó la reacción y después se le agregaron 200 µL de una solución de NaCl [7M]. La mezcla anterior se centrifugó a 11500 rpm /20 min a 4°C.

La primera solución de NaCl genera un cambio en las proteínas de la membrana citoplasmática atrapando a las moléculas de agua que rodean a éstas, para que posteriormente puedan precipitar. El SDS al ser un tensoactivo iónico, ocasiona la formación de micelas generando que se disuelvan las membranas lipídicas del núcleo celular. Finalmente el NaCl saturado favorecerá la precipitación de las proteínas nucleares. Después de centrifugar se obtiene un precipitado salino y proteico en el fondo del tubo y un sobrenadante viscoso. El sobrenadante que contiene el DNA se transfiere a un tubo limpio.

Se realizó partición orgánica del sobrenadante, donde la fase orgánica son 600 µL de una mezcla de alcohol isoamílico-cloroformo en una proporción 49:1 (v/v), se agitó y se centrifugó a 14000 rpm/15 min. La partición orgánica separa el DNA que es soluble en agua (fase superior) de los lípidos de la membrana. Después de centrifugar se retiró cuidadosamente la fase acuosa y ésta se traspasa a otro tubo que contiene 600 µL de etanol absoluto.

¹NH₄Cl 0.155 M; KHCO₃ 10 mM y EDTA 0.1 mM, pH = 7.4

Se mezcla por inversión para precipitar el DNA. La reacción se centrifugó a 14000 rpm/15 min y se descartó el sobrenadante para quedarse con el botón de DNA. El botón se lava con etanol al 70% (v/v) y se vuelve a centrifugar de la misma forma.

Se decantó el etanol y el botón de DNA se secó al vacío con temperatura baja (30-50°C). El DNA seco se resuspendió en 300 µL de agua estéril y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche ó alternativamente a 60°C durante 2h.

El DNA homogenizado, se cuantificó por espectrofotometría (equipo *AmpliQuant*) a una longitud de onda de 260 nm y se evaluó su calidad mediante el cociente de 260/280nm. Las muestras se consideran de buena calidad cuando este factor es ≥ 8.0 . Las muestras de DNA cuantificadas se diluyeron para preparar las soluciones de trabajo a una concentración final de 100 ng/ µL.

d) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación del gen *PINK1* se llevó a cabo en 8 reacciones independientes (monoplex). Los oligonucleótidos y las condiciones para las PCRs de los exones 2 al 8 fueron previamente reportados por Rogaeva et al (2004). Para la amplificación del exón 1 se emplearon los oligonucleótidos y condiciones de PCR-*touchdown* descritas por Brooks et al (2009) (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen *PINK1*

Exón	Ractivos y concentraciones de PCR		Longitud del amplicón (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)
	Oligonucleótidos (5' → 3') Sentido y Antitendido			
1	GGGAAAGTCACTGCTAGAGGC GAGGGTCCTTAAAGCTCATCTATT		730	Touchdown*
2	GTGGGGTTTCTGACCTCTCA GGCACCTTTCCTGTGGATAA		550	59
3	TACAGGCAGGGCTTACAAGG GCTGAGGACATAAGTGATGGA		250	59
4	GTGTTGGTGTGGCCTTAGGT TGACCCTGTTCTCCAAAACC		373	59
5	ACGTATTGGGAGTCGTCGAT CCTGAAGAGTCAGTCCTAAATGC		299	59
6	TGCTGGTGGCTTTAGTAGGG ACAAGGCATCGAGTCTCCTG		293	59
7	CTCAAGCTCTGGGTTTCCTTG CCCAAACCTGACCTTCACTC		435	59
8	GGGTAGAGGAAGAATTGGGTTG AGTTCCTCCATTTGCCAAGC		529	59

Tabla 2. Concentraciones y volúmenes requeridos para la PCR del marco abierto de lectura de *PINK1*.
Exón 1-8

Reactivo	Concentración inicial	Volumen por reacción
<i>GreenTaq® MasterMix</i>	20X	25 µL
Oligont sentido	10 µM	2 µL
Oligont antisentido	10 µM	2 µL
DMSO*	5X	6 µL
H ₂ O libre de nucleasas	-	9 µL
cbp 50 µL		
DNA genómico	100 ng/µL	6 µL
Total	-	50 µL

*Dimetilsulfóxido, cbp.- cuanto baste para.

Nota: para la amplificación solamente del exón 1, se adicionó dimetilsulfóxido.

➤ Condiciones de amplificación

Tabla 3. Temperaturas y tiempos de las distintas etapas de la PCR-touchdown para el exón 1 de *PINK1*.

Exón 1 (PCR-touchdown)

Ciclos	Temperatura	Tiempo (min)
	94°C - Desnaturalización inicial	5:00
8 ciclos	94°C - Desnaturalización	0:30
	60°C - Alineamiento	0:30
	72°C - Elongación	0:30
10 ciclos	94°C - Desnaturalización	0:30
	60°C - Touchdown -0.5°C/por ciclo	0:30
	72°C - Elongación	0:30
16 ciclos	94°C - Desnaturalización	0:30
	55°C - Alineamiento	0:20
	72°C - Extensión	0:30
	72°C - Extensión	5:00

La PCR-*touchdown* se realizó debido a que la temperatura de alineamiento (T_m) de los oligonucleótidos es muy distinta. La T_m del oligonucleótido sentido es de 53°C mientras que la T_m de su par es de 62°C. De acuerdo con las condiciones de amplificación de Brooks y colaboradores con una PCR-*touchdown* se favorece el alineamiento de los cebadores.

Tabla 4. Temperaturas y tiempos de las distintas etapas de la PCR-touchdown para los exones 2-8 *PINK1*.

Exón 2-8 (PCR-de punto final)

Ciclos	Temperatura	Tiempo (min)
30 ciclos	94°C – Desnaturalización inicial	5:00
	94°C – Desnaturalización por ciclo	0:30
	59°C – Alineamiento de oligonucleótidos	0:40
	72°C – Elongación por ciclo	0:40
	72°C – Elongación final	7:00

e) Purificación de la reacción de PCR

La purificación del producto de PCR se realizó mediante elución del gel, empleando un paquete comercial de purificación, *Wizard Genomic Gel Purification*[®] de Promega. El volumen total de la PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en amortiguador TBE² 1X y teñido con Bromuro de Etidio (10X).

Se añadió un marcador de pesos moleculares en la electroforesis para referencia de tamaños. En un transiluminador de luz ultravioleta y con ayuda de una hoja de bisturí se cortó el trozo de gel que contiene el producto del tamaño esperado. El trozo del gel se transfirió a un tubo de 1.5 mL. Se calculó el peso del trozo de gel y por cada 10 mg se adicionaron 10 µL de la solución de unión a membrana. Esta mezcla se incubó a 55-60°C hasta la disolución de la agarosa.

La mezcla a temperatura ambiente, se pasó por una columna (y su colector) que posee una membrana que retiene el DNA. La columna se centrifugó a 14000 rpm/un minuto. Después de la centrifugación se desechó el eluido y se volvió a colocar la columna. Se realizaron dos lavados con 700 µL de la solución de lavado de membrana y se centrifugó a 14000 rpm/un minuto. Se desechó lo colectado y la columna vacía se volvió a centrifugar para evaporar los remanentes de alcohol de la solución de lavado.

Finalmente sobre la membrana de la columna con un microtubo colector limpio, se agregaron 30 µL de agua libre de nucleasas y se dejó incubar 2 minutos a temperatura ambiente. La columna se centrifugó a 14000 rpm/2 minutos. El volumen eluido en el

²Tris-base [0.435 M], Ácido Bórico [0.44 M] y EDTA [0.5 M, pH=8].

microtubo fue el producto de PCR purificado. Para conocer la cantidad recuperada del producto de PCR purificado, se separaron 4 μL del purificado nuevamente por electroforesis junto con un marcador de pesos moleculares y masas que incluía concentraciones de las bandas. Con este marcador se determinó la cantidad de producto de PCR necesaria (10-20 ng) para la reacción de secuenciación (Figura 13).

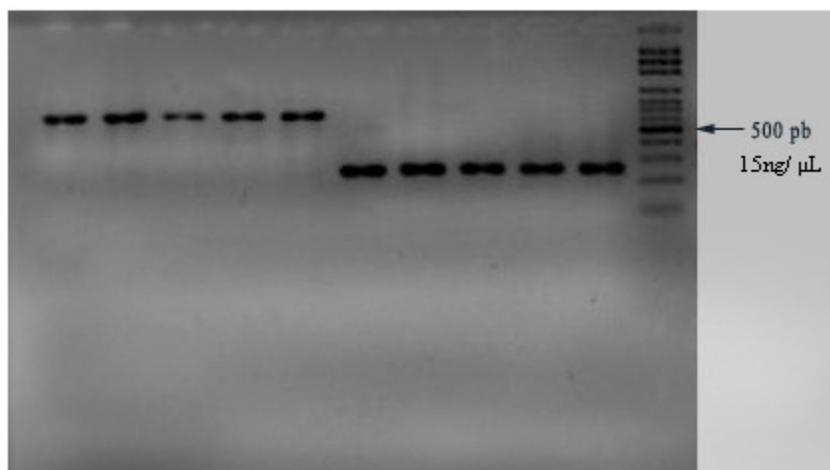


Figura 13. Visualización de purificados de PCR. Electroforesis en Gel de agarosa al 1,5% de purificados del exón 1 y el exón 5, para cinco distintos pacientes, se observa que la intensidad de las bandas de los purificados es aproximadamente la misma intensidad de la banda de 500 pb del marcador de pesos moleculares, dicha banda posee una concentración aproximada de 15ng/ μL .

f) Reacción de Secuenciación

Para la reacción de secuenciación se utilizó los reactivos de Applied Biosystems® el BigDye Terminator v3.1, así como su amortiguador correspondiente.

Tabla 5. Reactivos y volúmenes para la reacción de secuenciación

Reactivo	Volumen
PCR-producto	1-3 μL ³
<i>Kit BigDye terminator</i>	2-3 μL ⁴
Amortiguador	3 μL
Oligonucleótido Sentido	1 μL
H ₂ O cbp 20 μL	10-13 μL

³Dependiendo de la cantidad recuperada de DNA de la PCR se empleaba entre 1-3 μL , ⁴Dependiendo de que tan grande sea el producto de de PCR se usaba entre 2-3 μL de kit de secuenciación, por ejemplo para el exón 1 se usaba 3 μL y para el exón 3 solo 1 μL .

➤ Condiciones de reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación debe purificarse para eliminar los didesoxinucleótidos trifosfato fluorescentes. Este proceso se realizó por filtración en columnas con la resina sefarosa de poro medio (*Sephadex G-50*[®]). La sefarosa es gel dextrano, un polímero que al hidratarse forma estructuras porosas que atrapan las moléculas pequeñas, permitiendo eluir a las moléculas más grandes.

Tabla 6. Tiempos de cada una de las temperaturas que se emplean en la reacción de secuenciación.

Reacción de Secuenciación

Ciclos	Temperatura	Tiempo (min)
25 ciclos	94°C - Desnaturalización inicial	5:00
	94°C - Desnaturalización por ciclo	0:30
	55°C - Alineamiento de oligonts	0:30
	72°C - Elongación por ciclo	0:30
	72°C - Elongación final	7:00

g) Purificación de la reacción de secuencia

Después de finalizar la reacción de secuenciación, ésta debe ser purificada, en este caso se purificó con columnas *SpinReact* para *Sephadex G-50*[®] el cual es gel dextrano, un polímero que al hidratarse forma estructuras porosas que atrapan las moléculas pequeñas, permitiendo eluir a las moléculas más grandes.

El procedimiento es el siguiente

- ∞ La columna *SpinReact* con 0.05 g de resina, se hidrata con 800 µL de agua estéril.
- ∞ La columna se hidrata al menos una hora a temperatura ambiente o puede mantenerse toda la noche a 4°C.
- ∞ La columna hidratada se coloca sobre un tubo colector y se centrifuga a 3000 rpm/2 minutos.
- ∞ Se descarta el eluido y la columna se coloca sobre un microtubo de 1.5 mL. El volumen total de la reacción de secuenciación se aplica sobre la columna con gel hidratado y se centrifuga a 3000 rpm/2 minutos.

∞ El eluido es la reacción de secuenciación purificada y éste se seca al vacío a temperatura ambiente.

h) Secuenciación

El producto de secuenciación seco se resuspende en 14 µL de formamida desionizada. La reacción se transfiere a una placa de 96 pozos. Este procedimiento se realiza para todas las muestras y al final se realiza un choque térmico a la reacción: 95°C /5 min e inmediatamente a 4°C hasta su análisis en el secuenciador automatizado AB3130 (Applied Biosystems).

Este analizador genético realiza la separación y detección de los productos marcados con fluorescencia mediante electroforesis capilar y una cámara CCD. El equipo nos genera el electroferograma de las secuencias de cada muestra analizada.

Las secuencias se analizan con el programa *Sequencing Analysis* versión 5.3 (AB) que proporciona datos del equipo y de la muestra como: valores de calidad de los resultados, bases mixtas y secuencia en formato texto. La secuencia en texto se compara con diferentes bases de datos públicas (Tabla 8), se realiza el *BLAST* de la misma y se determina la presencia de variantes alélicas nuevas o previamente descritas. En caso de identificar una variante alélica, esta se confirmó en ambas hebras de DNA y en muestras independientes.

i) Herramientas Bioinformáticas

Para el análisis de las secuencias se emplearon distintas herramientas de bioinformática de diferentes bases de datos públicas que se resumen en la siguiente tabla. Para todas las variantes alélicas identificadas se analizó su probable efecto funcional (a nivel *splicing*, proteico), su conservación evolutiva con proteínas relacionadas y/o en diferentes especies y se realizó una revisión exhaustiva de las publicaciones de mutaciones de *PINK1*.

Tabla 7. Herramientas bioinformáticas empleadas para el análisis de las variantes alélicas identificadas en este estudio.

Herramienta	URL	Función
Nucleotide-Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN)	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Realiza el alineamiento de la secuencia obtenida contra las secuencias de nucleótidos en la base de datos pública
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html	Muestra datos genómicos de la

		secuencia de interés (la secuencia génica, sus variantes alélicas, genómica comparativa, etc.)
UniProt	http://www.uniprot.org/	Datos proteicos, dominios, etc.
PolyPhen	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/	Predice que tan dañina o neutral es una variante no sinónima dentro de una proteína
PDmutDB	http://www.molgen.ua.ac.be/PDMutDB/	Base de datos de mutaciones y polimorfismos en distintos <i>loci</i> asociados con la EP
BLASTX	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Realiza búsqueda de secuencias proteicas en bases de datos a partir de una secuencia de DNA (traducción)
SNP Home	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp	Base datos pública de SNPs en NCBI
Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF/	Permite determinar si una variante intrónica afecta el proceso de <i>splicing</i>

VII. Resultados

La edad promedio de inicio en la población estudiada, n=100, fue de 34.51 años, con un rango de edad de 16-44 años. Veinticinco de los casos presentaron antecedentes familiares de EP, mientras que el resto son casos esporádicos.

Los resultados muestran que el gen *PINK1* es altamente polimórfico. El análisis de los 8 exones de *PINK1* permitió determinar la prevalencia de distintas variaciones: polimorfismos sinónimos, no sinónimos, variaciones intrónicas, indels, deleciones intrónicas y exónicas.

En las tablas 9-11 se presentan las variantes sinónimas encontradas y su prevalencia en estado heterocigoto y homocigoto en la muestra estudiada.

Tabla 8. Polimorfismos sinónimos de *PINK1* identificados en pacientes con EP-IT en este estudio.

Exón	Polimorfismo DNA	Pacientes con genotipo		*rs	residuo proteico
		Heterocigoto	Homocigoto		
1	g.5283C>T	16	1	45530340	L63L
3	g.11498C>A	1	-	NR	R246R
4	g.16207C>T	2	-	NR	L316L
5	g.17151 C>T	1	-	NR	S335S

(*rs de dbSNP, NCBI; NR.-no reportado)

Tabla 9. Variantes intrónicas y de región 3' no traducida (3'UTR) de *PINK1* observadas

Localización	Nomenclatura de la variante	Pacientes con genotipo		rs
		Heterocigoto	Homocigoto	
Intrón 1	IVS1+3842C>G	20	3	2298297
	IVS1+3900A>G	19	42	2298298
	g.9323-9324delCT	16	-	35832516
	IVS1+3814T>C	1	-	2298296
Intrón 4	IVS4+72C>G	1	-	115998841
Intrón 5	IVS5+15C>T	1	-	NR
3' UTR	g.22274A>T	25	33	686658

Tabla 10. Mutaciones exónicas de *PINK1* identificadas en pacientes con EP-IT en este estudio.

Exón	Mutación	Pacientes con genotipo		rs	Cambio de residuo
		Heterocigotos	Homocigotos		
1	g.5367delC	1	-	NR	C91fsX14
	g.5438A>T	2	-	NR	Q115L
5	g.17164G>A	34	3	3738136	A339T
7	g.20618delC	16	5	NR	Y444fsX37
8	g.22053A>C	40	30	1043424	N521T

La Figura 14, muestra las frecuencias absolutas que se observaron al analizar los 8 exones de *PINK1*.

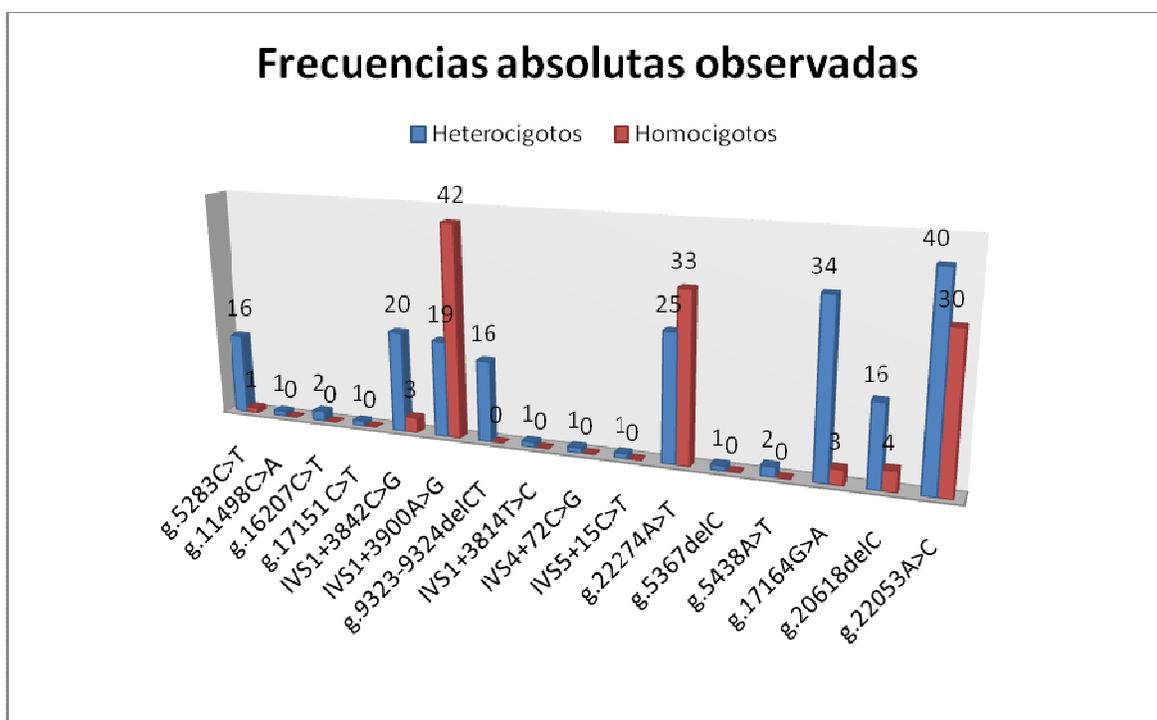


Figura 14. Proporciones de las variantes. Frecuencias absolutas observadas de todas las variantes al analizar el gen *PINK1*.

Tabla 11. Frecuencias alélicas (q) de todas las variaciones en secuencias.

Región	Variante	Frecuencias alélicas (q)
Ex 1	g.5283C>T	0.09
Ex 1	g.5367delC	0.005
Ex 1	g.5438A>T	0.01
Int 1	IVS1+3842C>G	0.26
Int 1	IVS1+3900A>G	0.515
Int 1	g.9323-9324delCT	0.08
Int 1	IVS1+3814T>C	0.005
Ex 3	g.11498C>A	0.005
Ex 4	g.16207C>T	0.01
Int 4	IVS4+72C>G	0.005
Ex 5	g.17151 C>T	0.13
Ex 5	g.17164G>A	0.2
Int 5	IVS5+15C>T	0.005
Ex 7	g.20618delC	0.12
Ex 8	g.22053A>C	0.5
3'UTR	g.22274A>T	0.455

*Ex = Exón; Int = Intrón

Variantes sinónimas

Las variaciones sinónimas encontradas fueron 4 en donde el porcentaje de éstos cambios sinónimos está determinado en mayor medida por la frecuencia del polimorfismo g.5283C>T (L63L), que se encuentra tanto en estado homocigoto y heterocigoto en los pacientes analizados.

A continuación se presentan las secuencias parciales del exón 1 de *PINK1* donde se observan las variantes alélicas identificadas en casos, portadores y controles (individuos homocigotos mutantes, heterocigotos y homocigotos silvestres, respectivamente).

En la parte inferior de cada secuencia parcial, se muestra la secuencia del cDNA (tomada de la base de datos de *Ensembl*), resaltando el cambio puntual con la letra que le corresponde de acuerdo al código de ambigüedad estandarizado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC).

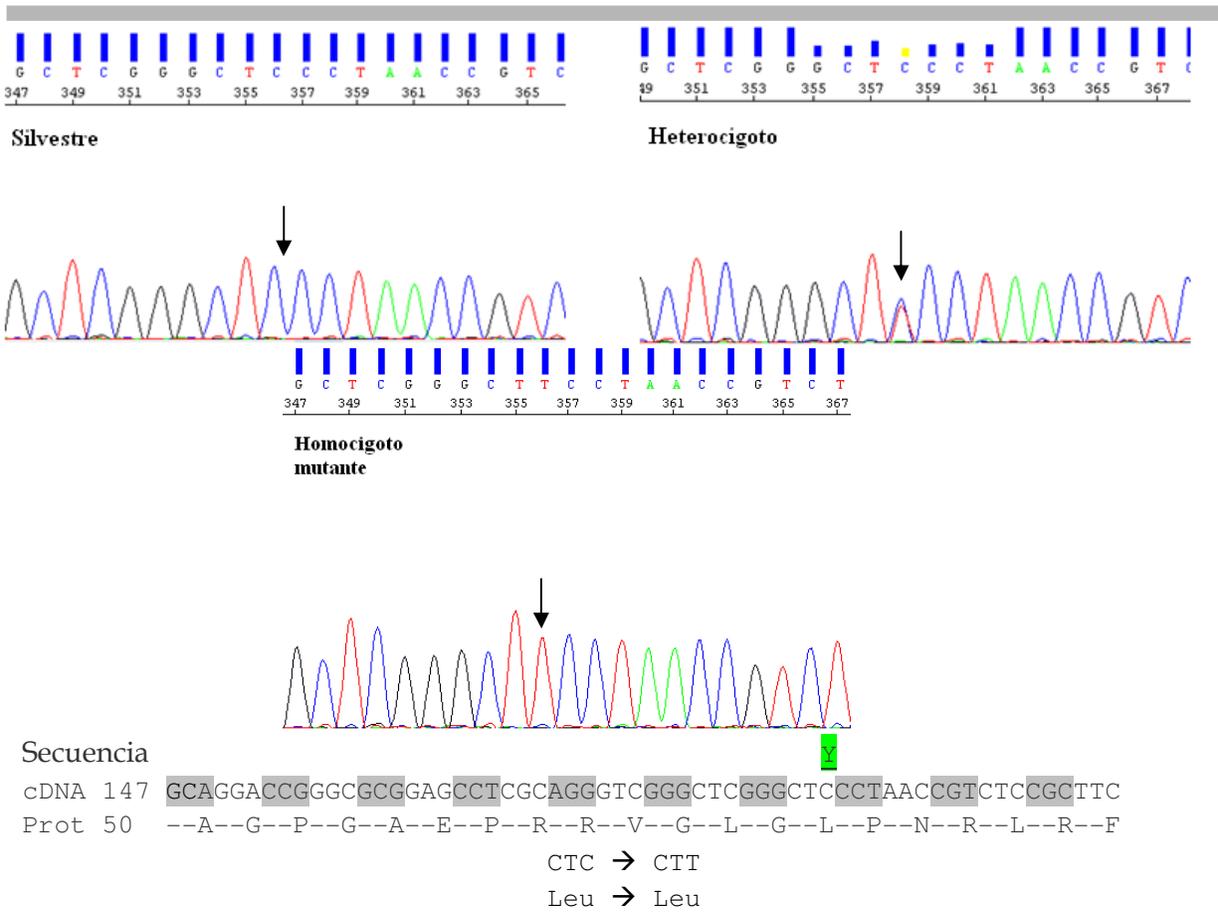


Figura 15. Exón 1 L63L. Secuencias de los tres distintos genotipos para la variante g.5283C>T, donde se denota que no produce cambio de residuo. SNP sinónimo.

Las siguientes variaciones g.11498C>A, g.16207C>T, g.17151C>T solo fueron encontradas en estado heterocigoto, y en una frecuencia de: 0.005, 0.01 y 0.13, respectivamente. Las siguientes Figuras 16-18 presentan estas variaciones sinónimas.

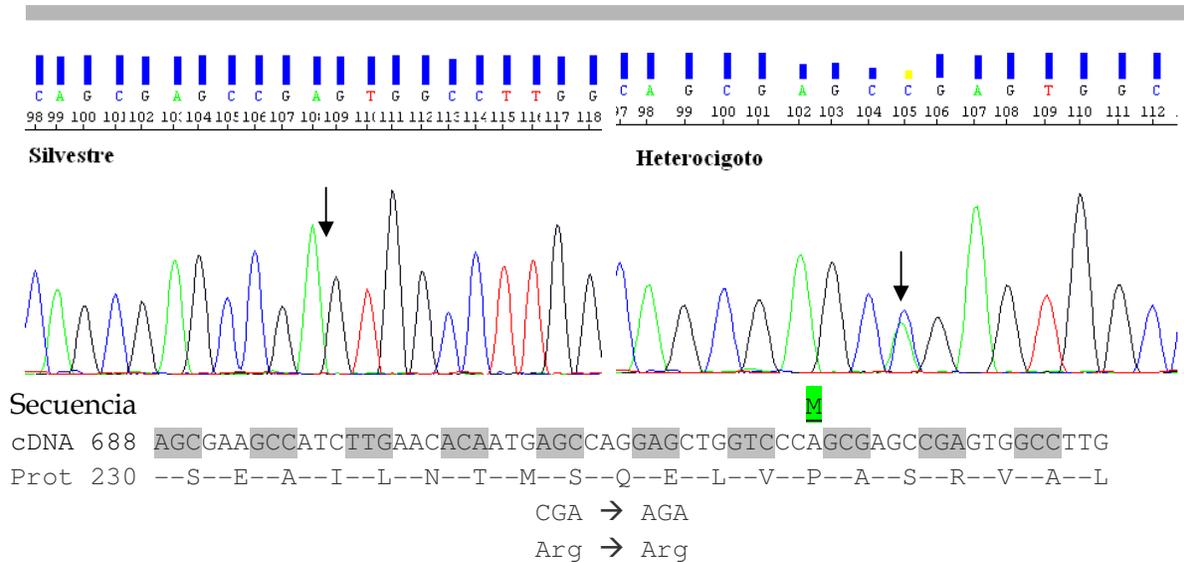


Figura 16. Exón 3 R246R. Secuencias parciales del exón 3, se presentan la secuencia silvestre y el heterocigoto para g.11498C>A.

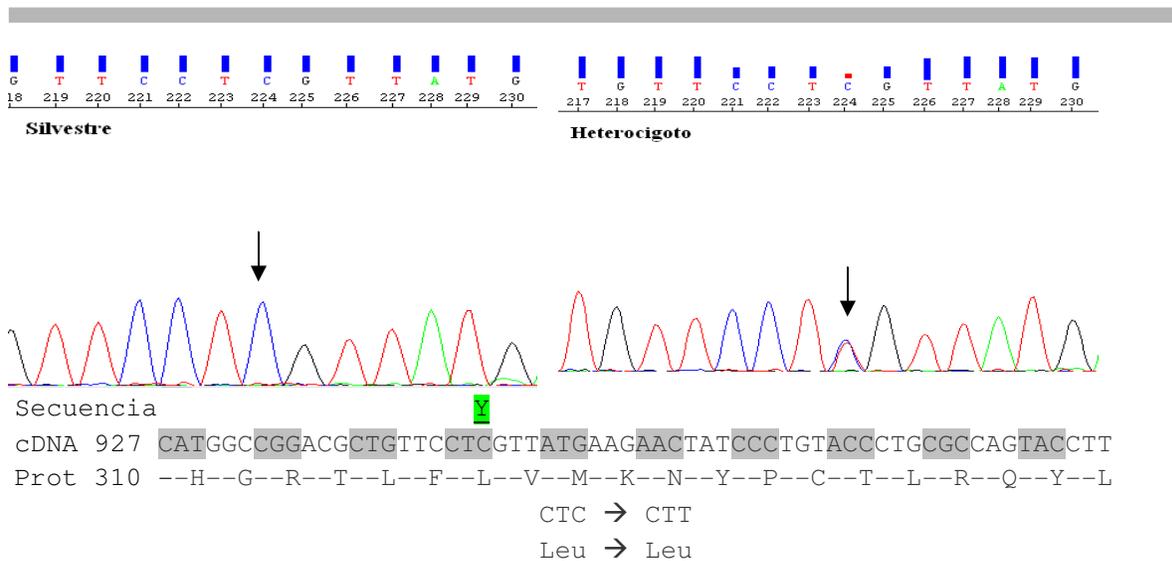


Figura 17. Exón 4 L316L. Genotipos encontrados para la variante g.16207C>T localizada en el exón 4.

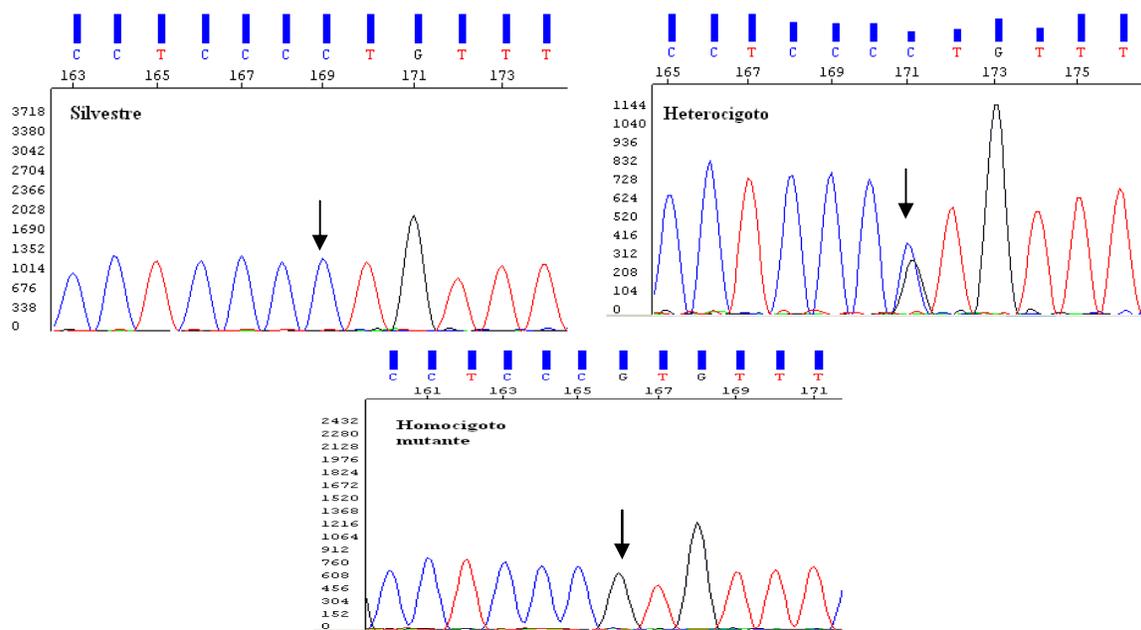


Figura 19. Intrón 1, IVS1+3842C>G. Se muestran los tres genotipos encontrados

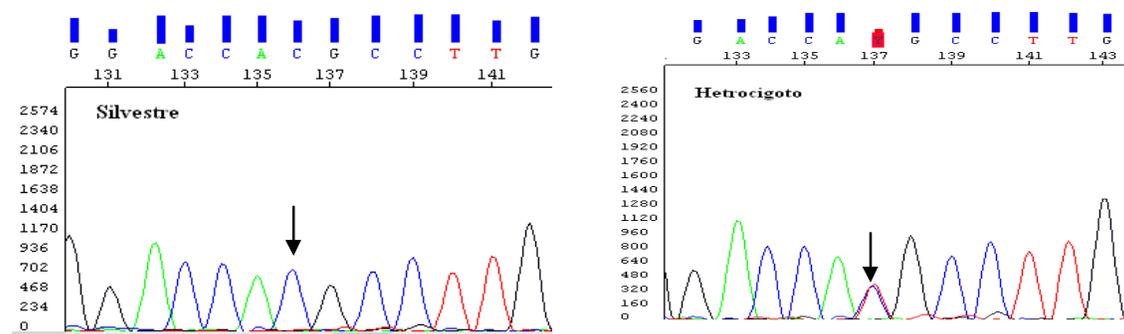


Figura 20. IVS1+3814C>T. Se muestran las secuencias parciales tanto del genotipo silvestre como del heterocigoto que fueron los únicos genotipos encontrados.

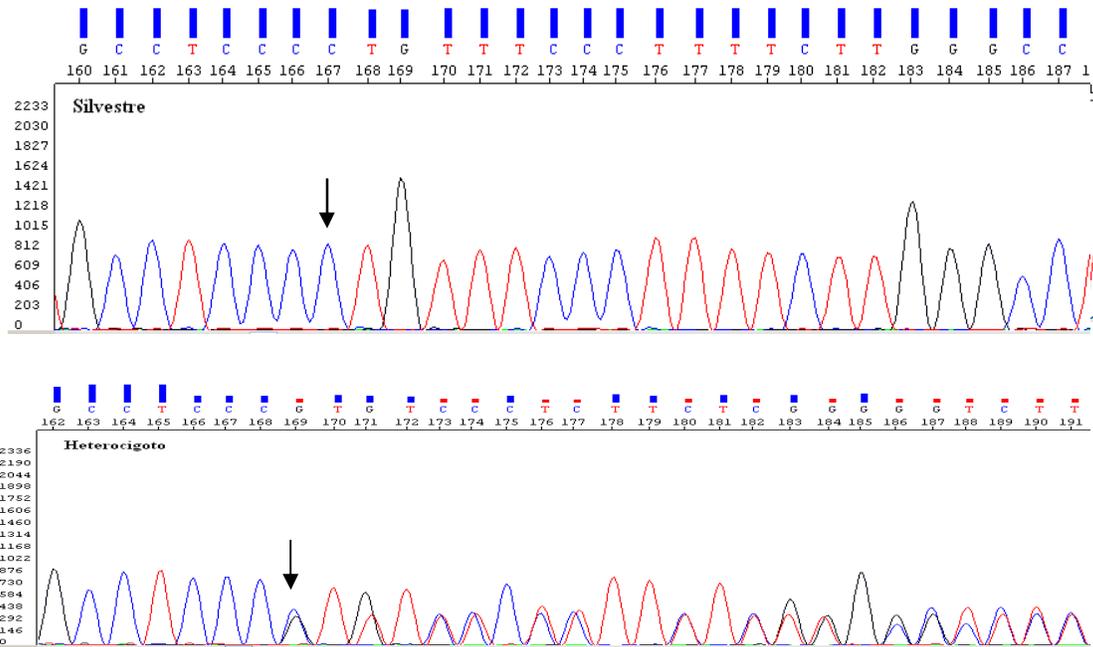
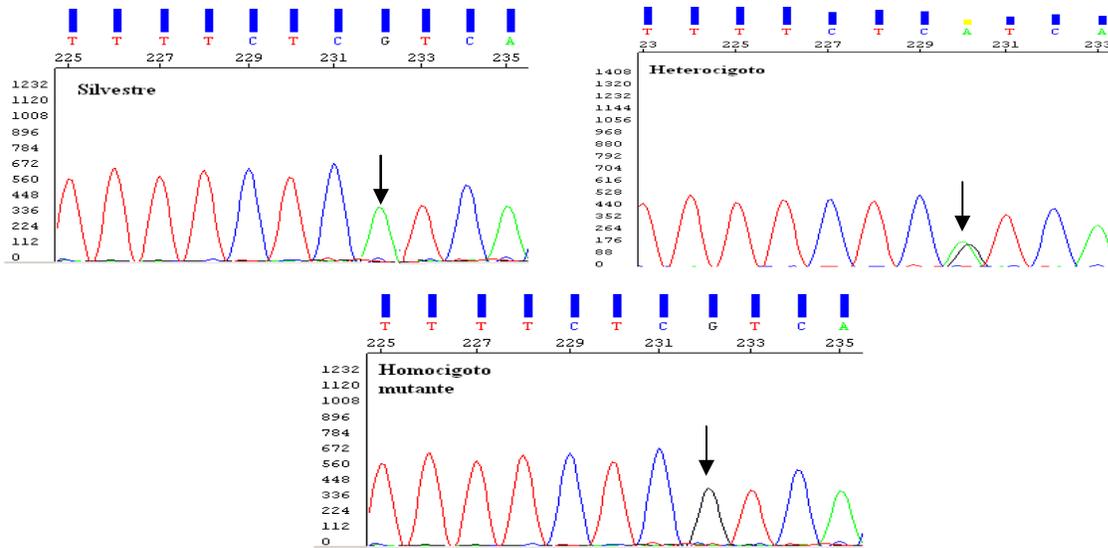


Figura 21. g.9323-9324delCT. Secuencia parcial del intrón 1, se observa en la secuencia del heterocigoto la presencia, a partir de la posición 169 del electroferograma, de dobles picos que indican delección en estado heterocigoto, en este caso de dos bases (CT).

Sin embargo como se observa en la tabla 12 el intrón 1 es el que presenta mayor cantidad de variaciones, y la mayor frecuencia, 0.515; de éstas variantes de tipo intrónico está representada por el SNP IVS1+3900A>G. El análisis de ésta variante intrónica se presenta en la Figura 22.



Secuencia silvestre

```

1 cctggttccc ttttctggg ccttctaggt ctccttggct cactggtgat tttttctca tcacagGCAA TTTTACCCA GAAAAGCAAG CCGGGGCTG
101 ACCCGTTGGA CACGAGACGC TTGCAGGGCT TTCGGCTGGA GGAGTATCTG ATAGGGCAGT CCATTGGTAA GGGCTGCAGT GCTGCTGTGT ATGAAGCCAC
201 CATGCCTACA TTGCCCCAGA ACCTGGAGGT GACAAAAGAGC ACCGGGTTGC TTCCAGGGAG AGGCCAGGT ACCAGTGCAC CAGGAGAAGG GCAGGAGCGA
301 GCTCCGGGGG CCCCTGCCTT CCCCTTGCC ATCAAAGATGA TGTGGAACAT CTCGgtaagc accaggcctt tcatttttaa aggagatggt ctcaaatgc
401 ccatcttagt gggcctggtg aggatttttt ccaggaagta ggtaggaata gacagattat ccacaggaata ggtgcctgta tagtcaggtt acctcccctt
501 gttacacaga agtctaaacc agaattgttg aaat
  
```

Secuencia mutante

```

1 cctggttccc ttttctggg ccttctaggt ctccttggct cactggtgat tttttctcG tcacagGCAA TTTTACCCA GAAAAGCAAG CCGGGGCTG
101 ACCCGTTGGA CACGAGACGC TTGCAGGGCT TTCGGCTGGA GGAGTATCTG ATAGGGCAGT CCATTGGTAA GGGCTGCAGT GCTGCTGTGT ATGAAGCCAC
201 CATGCCTACA TTGCCCCAGA ACCTGGAGGT GACAAAAGAGC ACCGGGTTGC TTCCAGGGAG AGGCCAGGT ACCAGTGCAC CAGGAGAAGG GCAGGAGCGA
301 GCTCCGGGGG CCCCTGCCTT CCCCTTGCC ATCAAAGATGA TGTGGAACAT CTCGgtaagc accaggcctt tcatttttaa aggagatggt ctcaaatgc
401 ccatcttagt gggcctggtg aggatttttt ccaggaagta ggtaggaata gacagattat ccacaggaata ggtgcctgta tagtcaggtt acctcccctt
501 gttacacaga agtctaaacc agaattgttg aaat
  
```

La secuencia remarcadas son las analizadas por HSF

Posición en secuencia	Posición cDNA	Tipo de sitio de splicing	Secuencia silvestre	Secuencia mutante	Matriz		
					Silv	Mut	(%)
55	-12	Aceptor	ttctcAtcAcagGC	ttctcgtcAcagGC	93.77	93.73	-0.05

Posición en secuencia	Posición cDNA	Puntos de Ramificación potenciales	CV para secuencia de referencia (0-100)	CV para secuencia mutante (0-100)	Variación
55	-12	ttctcAt	91.22	61.59	Sitio Roto
60	-7	atcacAg	74.57	77.19	+3.51 %

Figura 22. IVS1+3900A>G. Secuencia parcial del intrón I que se sitúa río arriba del exón 2, se observa tanto la secuencia silvestre y la mutante, analizadas por HSF, se observa que por arreglos de matrices que realiza el programa el sitio aceptor del splicing varía sólo en 0.05%, también se observan 2 sitios potenciales de ramificación el primero (a posición -12 con respecto al cDNA) es el principal de acuerdo al arreglo matricial de HSF, y es precisamente éste sitio de ramificación el que se rompe con la secuencia mutante.

Mutaciones en *PINK1*

La siguiente mutación es una deleción del exón 1, solo se encontró en estado heterocigoto.

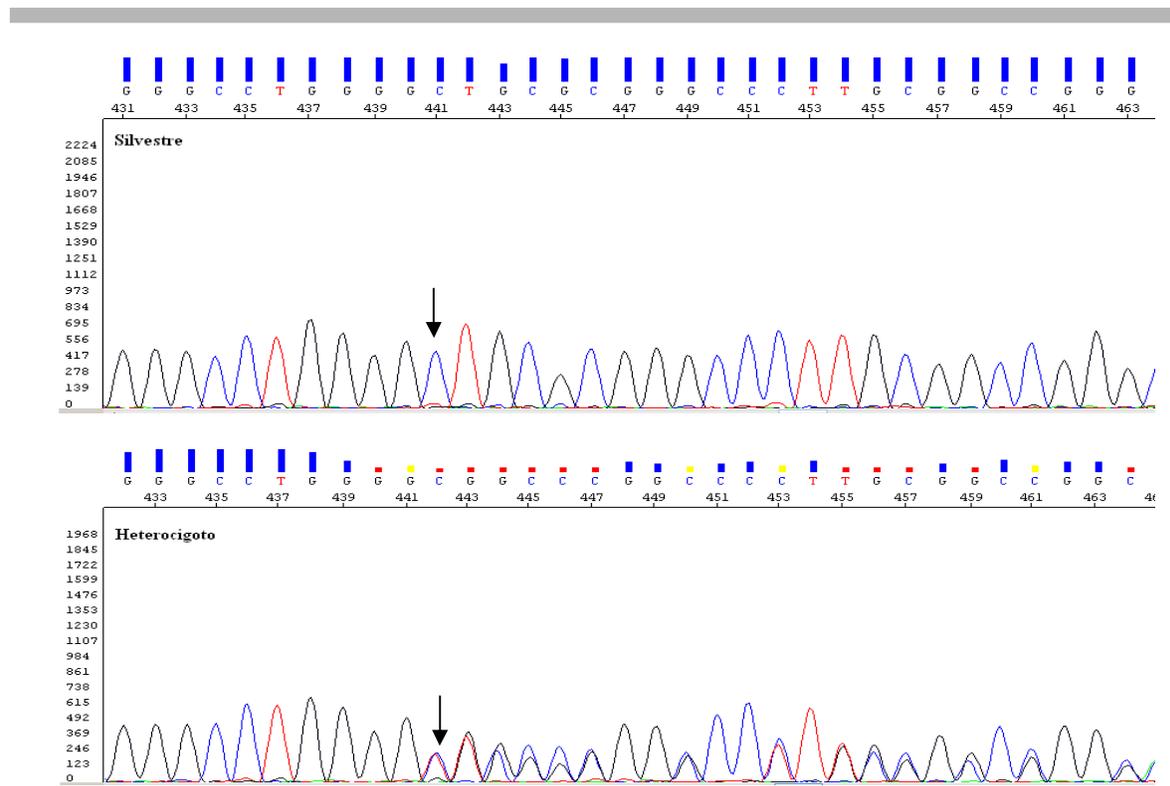


Figura 23. g.5367delC. Secuencia parcial del exón 1, se presentan los dos genotipos encontrados con respecto a esta deleción.

Las siguientes mutantes g.17164G>A (A339T) y g.22053A>C (N521T) fueron encontradas con unas frecuencias de 0.2 y 0.5 respectivamente. Se muestran en las Figuras 24 y 26.

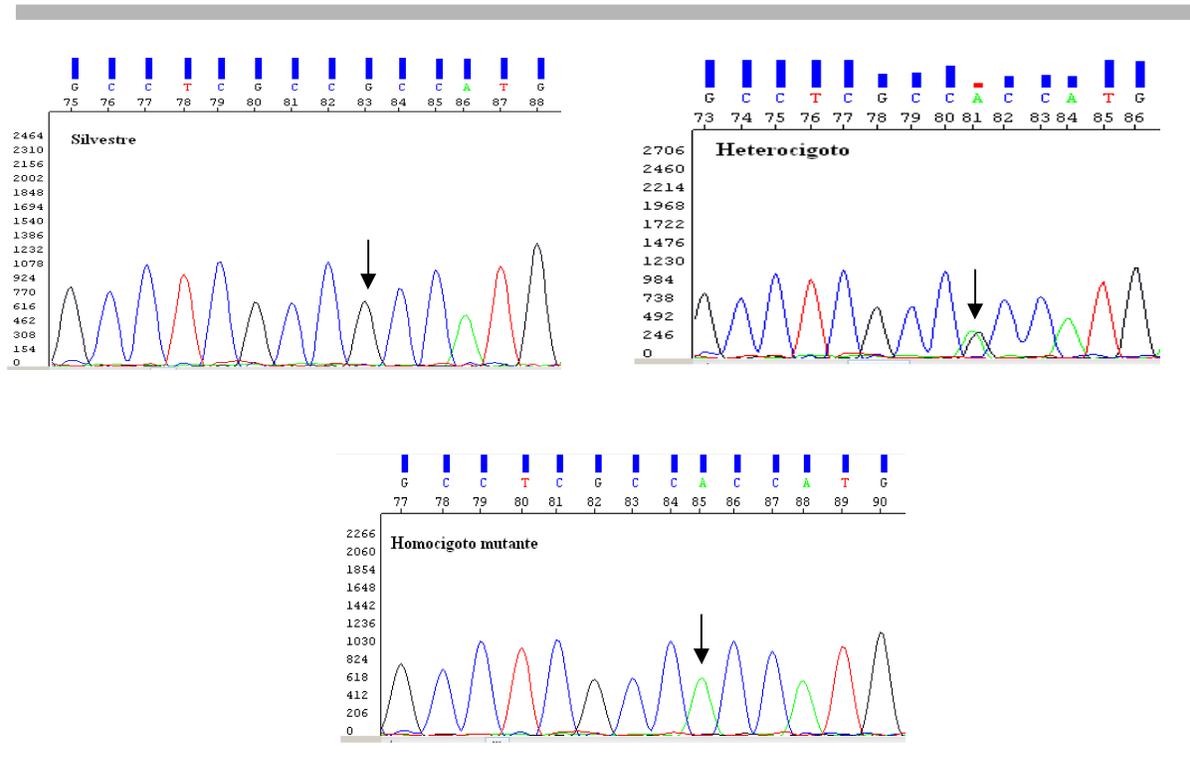


Figura 24. A339T. Secuencias parciales del exón 5 que muestran los 3 genotipos encontrados para la variante A339T.

El programa *PolyPhen* predice la variante como benigna, a pesar de que es un aminoácido conservado en varias proteínas homólogas (Figura 25).

0	Búsqueda	... LFLVMKNYPCTLRQYLCVNTSPSRL A AMMLLQLEGVVDHLVQQGIAHRDLK ...	
1	dbj BAB64474.1 	<i>Macaca fascicularis</i>	... LFLVMKNYPCTLRQYLRANTSPSRL A THMMLQLEGVVDHLVQQGIAHRDLK ...
2	dbj BAD90392.1 	<i>Mus musculus</i>	... LFLVMKNYPCTLRQYLEEQTPSSRL A THMTLQLEGVVDHLVQQGIAHRDLK ...
3	reflXP_001377483.1	<i>Monodelphis domestica</i>	... LFLVMKNYPWTLRQYLQVRRPPSPRL A AMMILQLEGVVDHLVQQGIAHRDLK ...
4	reflXP_001164912.1	<i>Pan troglodytes</i>	... LFLVMKNYPCTLRQYLCVNTSPSRL A AMMLLQLEGVVDHLVQQGIAHRDLK ...
5	reflXP_995264.1 	Tipo serin-treonina	... LFLVMKNYPCTLRQYLEEQTPSSRL A THMTLQLEGVVDHLVQQGIAHRDLK ...
6	reflINP_001008628.1 	<i>Danio rerio</i>	... LFLVMKNYPCTLRQYLEVCVPKRTQ A SLMFLQLEGVVDHLVCRQNIHRDLK ...
7	dbj BAC11484.1 	<i>Homo sapiens</i>	...-----SYPC T LRQYLCVNTSPSRL A THMILQLEGVVDHLVRRHRIHRDLK ...
8	reflXP_423139.2 	<i>Gallus gallus</i>	... LFLVMKNYPCTLCQYLQVNSPDSRL S THMILQLEGVVDHLVRRHRIHRDLK ...
9	emb CA603824.1 	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	... LFLVMKNYPYTLQRFLAESAPSRRO R ALMLLQLEGVVDHLVCRHGVHRDLK ...
10	reflXP_623327.1 	<i>Apis mellifera</i>	... LFLLMKRYDITLQYLNDRHRLSTRE S ILLLAQLEGVVTHLNAHGIAHRDLK ...

Figura 25. Alineamiento de secuencias proteicas homólogas de distintas especies. Se observa que la A339 es está conservada en la mayoría de las especies.

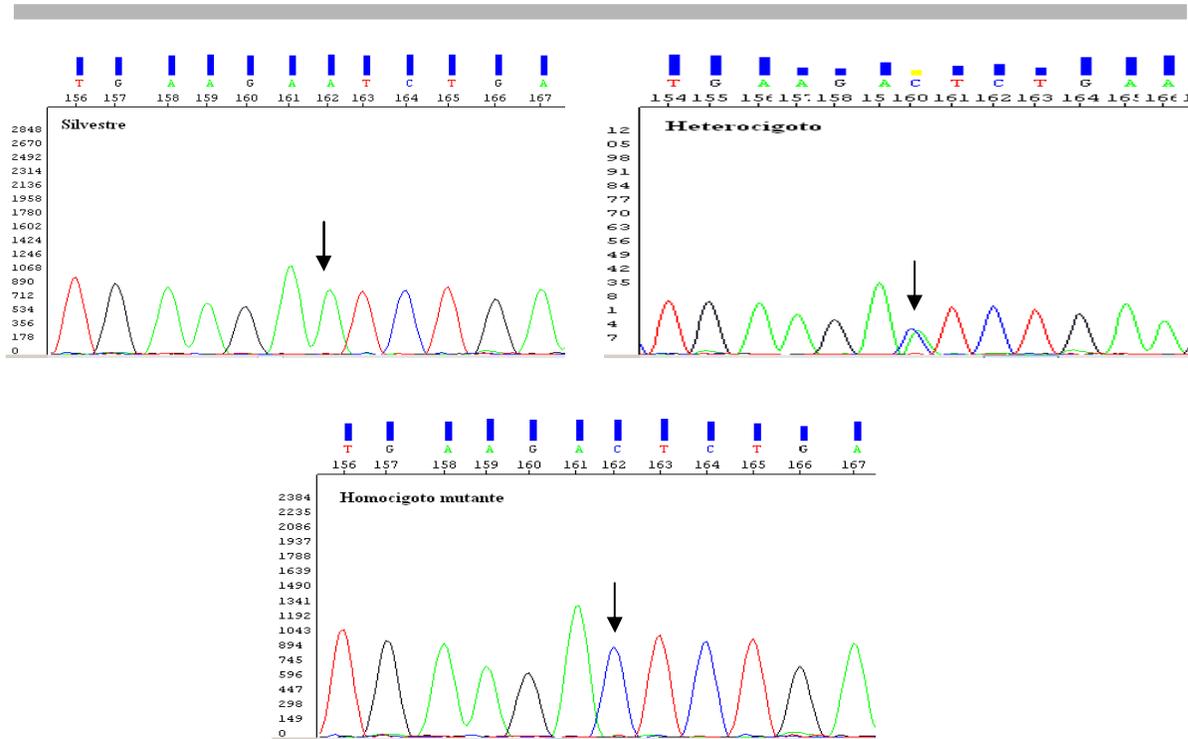


Figura 26. N521T. Secuencias parciales del exón 8 donde se señalan los cambios de nucleótido sencillo para los 3 distintos genotipos.

0	Búsqueda	... KRPSARVAANVHLHLSLWGEHILALK N LKLDKMGVWLLQSSAATLLANRLTE ...
1	dbj BAB64474.1	Macaca fascicularis ... KRPSARVAANVHLHLSLWGEQILALK N LKLDKMGVWLLQSSAATLLANRLTE ...
2	dbj BAD90392.1	Mus musculus ... KRPSARLAANVHLHLSLWGEHLLALK N LKLDKMIWLLQSSAATLLADRLRE ...
3	ref XP_001377483.1	Monodelphis domestica ... KRPSARVAANVHLHLSLWGERVLALK S LKADKHIGULLHQSSAATLLTNRLIE ...
4	ref XP_001164912.1	Pan troglodytes ... -----
5	ref XP_995264.1	Tipo serin-treonina ... KRPSARLAANVHLHLSLWGEHLLALK N LKLDKMIWLLQSSAATLLADRLRE ...
6	ref INP_001008628.1	Danio rerio ... KRPSARVAANILHLSLWGRVGLD K VQMAEMHNAVLLQSSAVVLLKGRGRD ...
7	dbj BAC11484.1	Homo sapiens ... KRPSARVAANVHLHLSLWGEHILALK T LKLDKMGVWLLQSSAATLLANRLTE ...
8	ref XP_423139.2	Gallus gallus ... KRLSARVAANVHLHLSLWGESILASE A LKPDQMTAVLLCQSSAATLLMDGLVD ...
9	emb CA603824.1	Tetraodon nigroviridis ... KRPSARVAANMLHLSLWRRALADH D AANGELVDWLLCQSSALVLLKG--PR ...
10	ref XP_623327.1	Apis mellifera ... KRLDTETAATIVQLHLWAPSIFKSE WKLNEVMQULLCLTTKVLCEGR--- ...

Figura 27. Alineamiento de secuencias homólogas de proteínas de distintas especies. Se resalta la posición de la asparagina (N) 521.

De igual forma la mutante N521T, *PolyPhen* la predice como benigna. En las figuras 27 y 28 se presenta la mutante Q115L que solo fue encontrada en estado heterocigoto.

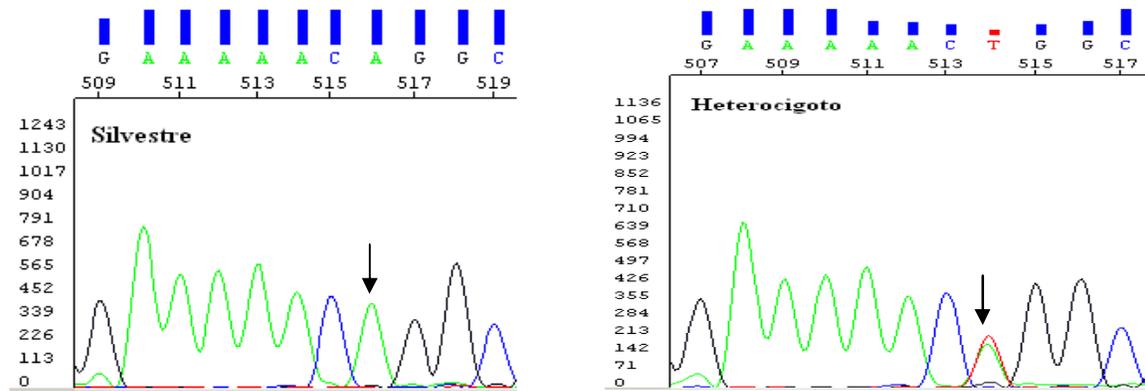


Figura 28. Q115L. Secuencias del exón 8 que muestran los genotipos que se encontraron para la variante Q115L.

0	Búsqueda	...WGCAGPCGRAVFLAFGLGLGLIEEK Q AESRRAVSACQEIQAIF TQKSKPGP ...	
1	dbj BA864474.1 	<i>Macaca fascicularis</i>	...-----AVFLAFGLGLGLIEEK Q AESRRAVSACQEIQAIF TQKSKPGP ...
2	dbj BAD90392.1 	<i>Mus musculus</i>	...RGGAGPCGRAVFLAFGLGLGLIEEK Q AEGRRASACQEIQAIF TQKTKRVS ...
3	reflXP_001377483.1	<i>Monodelphis domestica</i>	...RGAGAPCGRAVFLAFGLGLGLIEEK Q AEGQRAVSACRDIQE IFTQKNLIP ...
4	reflXP_001164912.1	<i>Pan troglodytes</i>	...WGCAGPCGRAVFLAFGLGLGLIEEK Q AESRRAVSACQEIQAIF TQKSKPGP ...
5	reflXP_995264.1 	Tipo serin-treonina	-----
6	reflNP_001008628.1 	<i>Danio rerio</i>	...IGGCSARNRAVFLAFGVGLGLIEQE Q EEDRTS AALCQEIQAVFRKKKQSLP ...
7	dbj BAC11484.1 	<i>Homo sapiens</i>	...WGCAGPCGRAVFLAFGLGLGLIEEK Q AESRRAVSACQEIQAIF TQKSKPGP ...
8	reflXP_423139.2 	<i>Gallus gallus</i>	-----EQRRAVAVCGRIQT VVFGHNKAQK ...
9	emb CA903824.1 	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	...SAAFRRGFASQIPQAVFKKKRLQAP ...
10	reflXP_623327.1 	<i>Apis mellifera</i>	...VGDSAPFFALVGISLASGTGIL---TKDDELEGVCWEIREAVSKLQWNP ...

Figura 29. Alineamiento de secuencias homólogas de proteínas de distintas especies. Se observa que la Q115 está altamente conservada en la mayoría de las especies, PolyPhen.

Esta mutación el programa la predice como una variante dañina.

Finalmente la última mutante encontrada es una deleción exónica, que genera un corrimiento de marco de lectura, y explica un caso familiar con EP-IT. En la Figura 30 se muestran los genotipos de esta deleción.

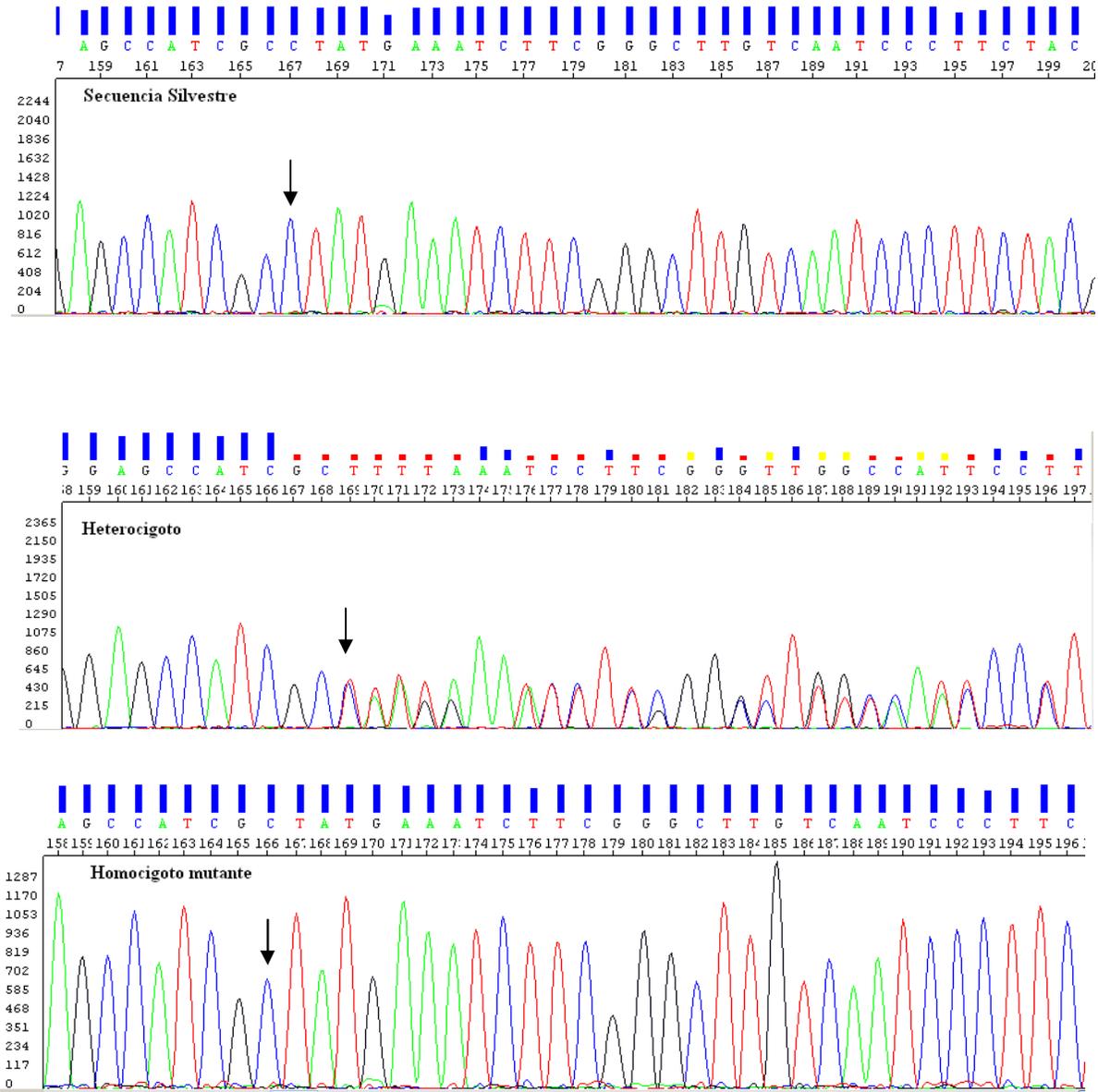


Figura 30. g.20618delC. Delección monobásica (Citosina) en el exón 7, se observan los tres genotipos encontrados.

En las siguientes imágenes se presentan la secuencia de la proteína silvestre (581 residuos) y la proteína que se genera por la delección anterior.

A Proteína Silvestre

```

A E A P P Q V C C D R R G T P V V A A A A A G A P G R G A T M A
V R Q A L G R G L O L G R A L L L R F T G K P G R A Y G L G R P G
P A A G C V R G E R P G W A A G P G A E P R R V G L G L P N R L R
F F R Q S V A G L A A R L Q R Q F V V R A W G C A G P C G R A V F
L A F G L G L G L I E E K Q A E S R R A V S A C Q E I Q A I F T Q
K S K P G P D P L D T R R L Q G F R L E E Y L I G Q S I G K G C S A
A A V Y E A T M P T L P Q N L E V T K S T G L L P G R G P G T S A
P G E G Q E R A P G A P A F P L A I K M M W N I S A G S S S E A I
L N T M S Q E L V P A S R V A L A G E Y G A V T Y R K S K R G P K
Q L A P H P N I I R V L R A F T S S V P L L P G A L V D Y P D V L
P S R L H P E G L G H G R T L F L V M K N Y P C T L R Q Y L C V N
T P S P R L A A M M L L Q L L E G V D H L V Q Q G I A H R D L K S
D N I L V E L D P D G C P W L V I A D F G C C L A D E S I G L Q L
P F S S W Y V D R G G N G C L M A P E V S T A R P G P R A V I D Y
S K A D A W A V G A I A Y E I F G L V N P F Y G O G K A H L E S R
S Y O E A O L P A L P E S V P P D V R Q L V R A L L Q R E A S K R
P S A R V A A N V L H L S L W G E H I L A L K N L K L D K M V G W
L L Q O S A A T L L A N R L T E K C C V E T K M K M L F L A N L E
C E T L C O A A L L L C S W R A A L
581 aa

```

B Proteína mutante

```

A E A P P Q V C C D R R G T P V V A A A A A G A P G R G A T M A
V R Q A L G R G L O L G R A L L L R F T G K P G R A Y G L G R P G
P A A G C V R G E R P G W A A G P G A E P R R V G L G L P N R L R
F F R Q S V A G L A A R L Q R Q F V V R A W G C A G P C G R A V F
L A F G L G L G L I E E K Q A E S R R A V S A C Q E I Q A I F T Q
K S K P G P D P L D T R R L Q G F R L E E Y L I G Q S I G K G C S A
A A V Y E A T M P T L P Q N L E V T K S T G L L P G R G P G T S A
P G E G Q E R A P G A P A F P L A I K M M W N I S A G S S S E A I
L N T M S Q E L V P A S R V A L A G E Y G A V T Y R K S K R G P K
Q L A P H P N I I R V L R A F T S S V P L L P G A L V D Y P D V L
P S R L H P E G L G H G R T L F L V M K N Y P C T L R Q Y L C V N
T P S P R L A A M M L L Q L L E G V D H L V Q Q G I A H R D L K S
D N I L V E L D P D G C P W L V I A D F G C C L A D E S I G L Q L
P F S S W Y V D R G G N G C L M A P E V S T A R P G P R A V I D Y
S K A D A W A V G A I A M K S S G L S I P S T A R A R P T L K A A
A T K R L S Y L H C P S Q C L Q T
481 aa

```

C

Silvestre	1	MAVRQALGRGLQLGRALLLRF	TGKPGRAYGLGRPGPAAGCVRGERPGWAAGPGAEP	PRRVGLGL
Mutante	1	MAVRQALGRGLQLGRALLLRF	TGKPGRAYGLGRPGPAAGCVRGERPGWAAGPGAEP	PRRVGLGL
Silvestre	64	PNRLRFFRQSVAGLAARLQRQFVVR	AWGCAGPCGRAVFLAFGLGLGLIEEKQAESRRAVSACQ	
Mutante	64	PNRLRFFRQSVAGLAARLQRQFVVR	AWGCAGPCGRAVFLAFGLGLGLIEEKQAESRRAVSACQ	
Silvestre	127	EIQAIFTQKSKPGPDPDLDRRLQGF	RLEEYLIGQSIGKGCSSAAVYEATMPTLPQNLEVT	KSTG
Mutante	127	EIQAIFTQKSKPGPDPDLDRRLQGF	RLEEYLIGQSIGKGCSSAAVYEATMPTLPQNLEVT	KSTG
Silvestre	190	LLPGRGPGTSAPGEGQERAPGAPAF	PLAIKMMWNISAGSSSEAILNTMSQELVPASRVALAGE	
Mutante	190	LLPGRGPGTSAPGEGQERAPGAPAF	PLAIKMMWNISAGSSSEAILNTMSQELVPASRVALAGE	
Silvestre	253	YGAVTYRKS KRGPQLAPHNII	IRVLAFTSSVPLLP	PGALVDYDPVLP
Mutante	253	YGAVTYRKS KRGPQLAPHNII	IRVLAFTSSVPLLP	PGALVDYDPVLP
Silvestre	316	LVMKNYPCTLRQYLCVNT	PSPRLAAMLLQLLE	VDHLVQQGIAHRDLKSDN
Mutante	316	LVMKNYPCTLRQYLCVNT	PSPRLAAMLLQLLE	VDHLVQQGIAHRDLKSDN
Silvestre	378	WLVIADFGCCLADESIGLQ	LPFSSWYVDRGGNGCLMAPEVSTARPGPRAVIDYSKADAWAVGA	
Mutante	378	WLVIADFGCCLADESIGLQ	LPFSSWYVDRGGNGCLMAPEVSTARPGPRAVIDYSKADAWAVGA	
Silvestre	442	IAYEIFGLVNPFGYGGKAHLES	RSYQEAQLPALPESVPPDVRQLV	RALLQREASKRPSARVAA
Mutante	442	IAMKSSGLSIPSTARARPTL	KAAATKRLSYLHCP	SQCLOT-----
Silvestre	505	NVLHLSLWGEHILALKNLKLDK	MVGWLLQQSAATLLANRLTEKCCVET	KMKMLFLANLE
Mutante		-----	-----	-----
Silvestre	568	CQAALLCSWRAAL		
Mutante		-----		

Figura 31 Secuencia de aminoácidos de la proteína silvestre y mutante (Y444fsX37). (A) Proteína normal, posee 581 residuos, la delección provoca un corrimiento de marco de lectura ocasionando un paro prematuro y generando una proteína de 481 aa (B). (C) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína silvestre (negro) y la mutante (rojo).

El árbol genealógico del caso familiar de EP con un patrón de herencia autosómico recesivo, se presenta en la Figura 32.

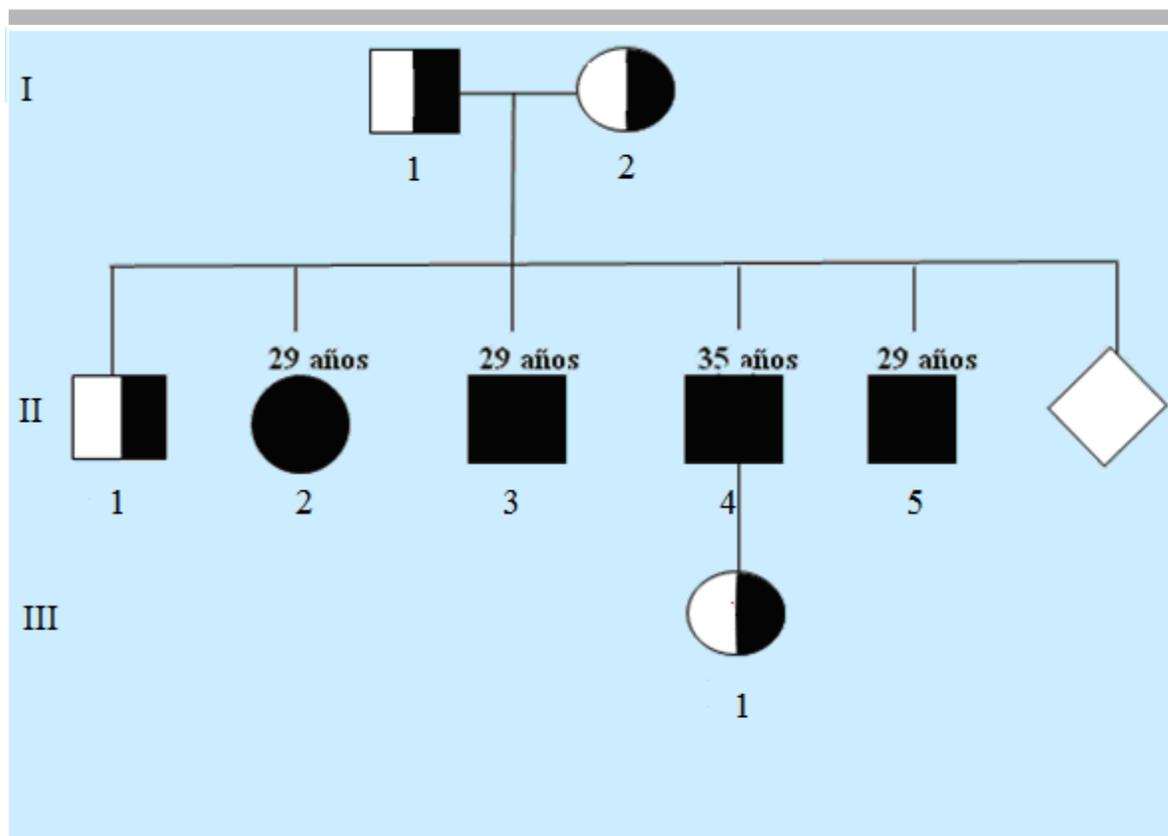


Figura 32. Genealogía de la familia que presenta la delección Y444fsX37. Mutación g.20618delC en el exón 7 de *PINK1*, se muestran los afectados y los portadores de la delección, así como las edades de inicio de aquellos que están enfermos.

VIII. Discusión

La frecuencia de casos homocigotos para mutaciones patogénicas (Y444fsX37 y A339T) identificadas en nuestra muestra estudiada fue del 6%, esto es aproximadamente seis veces más de lo reportado en la literatura en otras poblaciones⁶ donde se reporta del 1.02%. Sin embargo es importante enfatizar que el análisis de *PINK1* se hizo posterior al análisis del gen *PRKN* en los mismos pacientes, es decir los pacientes que fueron analizados en este estudio ya habían sido tamizados para posibles mutaciones en secuencia o dosis génica para el gen de *PRKN*.

Las dos nuevas mutaciones que se encontraron en este estudio fueron deleciones. La primera que se reporta en este trabajo es la deleción en el exón 1 (C91fsX14).

Esta es una variante que no ha sido reportada previamente y que solo se encontró en un paciente y en estado heterocigoto. Se requeriría hacer mayores estudios para saber cual es su efecto en esta patología.

Adicionalmente se identificó una deleción de una citosina en el exón 7 en cuatro casos. Es una variante que no ha sido descrita previamente y explica un caso familiar de enfermedad de Parkinson con un patrón de herencia autosómico recesivo (Figura 31). En la genealogía que se presenta en Resultados se observa el patrón de herencia autosómico recesiva. En este árbol se puede ver que los individuos 1 y 2 de la generación I son heterocigotos para la deleción y la heredan a 4 de sus hijos que son homocigotos (individuos II-2, II-3, II-4, II-5), los cuales desarrollan la enfermedad. También debe recordarse que la EP-IT no solo está determinada por mutaciones en el gen *PINK1* sino que también hay otras mutaciones en otros *loci* como lo son los genes *DJ-1* y *PRKN*; los cuales también están implicados en el desarrollo e inicio temprano de la EP. De manera interesante, estos individuos presentan también la sustitución A339T. Los individuos II-2 y II-3 son heterocigotos para la mutante; mientras que II-4 y II-5 fueron homocigotos. Estos datos sugieren que la variante g.17164G>A que ocasiona el cambio de residuo no está implicada con la edad de inicio de la EP con patrón de herencia autosómico recesivo.

La deleción homocigota del exón 7 es una mutación patogénica puesto que genera corrimiento del marco de lectura generando un paro prematuro y por extensión una proteína trunca que no es catalíticamente activa, y por lo tanto no podría fosforilar correctamente a sus sustratos como parkina. También podría ocasionar disfunción en la mitocondria tanto a nivel de remodelación mitocondrial como a nivel del tráfico mitocondrial, debido a que la deleción genera un paro prematuro reduciendo la proteína en 100 residuos (Y444fsX37), que en condiciones normales es de 581 aminoácidos (ver Figura 30)

En los casos heterocigotos, probablemente esas variantes pueden ser factores de riesgo para la edad de inicio de la EP o un factor determinante para la progresión de la enfermedad. También no se puede descartar que esos pacientes que son heterocigotos para mutaciones en *PINK1* posean otra mutación en otro gen recesivo, como *DJ-1*, lo cual implicaría que en esos casos en particular habría herencia digénica. Por tanto las alteraciones en secuencia en *PINK1* no pueden descartarse por completo, ya que pudiesen desempeñar una función más compleja al estar acompañadas de otras mutaciones en otros genes recesivos relacionados con la EP.

Adicionalmente se identificaron polimorfismos intrónicos (ver Tabla 9) y exónicos sinónimos (ver Tabla 8), también variantes no sinónimas han sido reportadas como polimorfismos, aunque su naturaleza ya sea patogénica o de riesgo permanece sin aclararse por completo.

El polimorfismo que probablemente está asociado a la EP es la variante A339T. Sin embargo para poder determinar lo anterior habría que analizar controles para que de esta manera se pueda concluir si la prevalencia entre controles y pacientes posee determinado grado de significancia y en último caso obtener un porcentaje de riesgo para el desarrollo de la EP de inicio temprano.

Esta variante A339T que fue encontrada en su mayoría en estado heterocigoto (34 heterocigotos y 3 homocigotos), ya ha sido reportada previamente en pacientes con EP-IT.^{13,116,120,82} El análisis *in silico* muestra que es una variante conservada evolutivamente; sin embargo, es necesario determinar su efecto funcional.

Por otra parte Abou-Sleiman y colaboradores reportaron que en pacientes de inicio tardío que presentan la variante en estado heterocigoto observaron que hay una prevaencia a desarrollar de manera intermedia (de acuerdo a su estudio realizado) movimientos involuntarios con respecto a otras variantes que ellos encontraron y que se observa que en pacientes con esta variante en heterocigosis, éstos presentan depresión y ansiedad pero menor grado de bradicinesia y rigidez con respecto a otras variantes.¹²¹ No ha habido otros estudios que revelen de manera clínica y fisiológica el posible efecto de ésta variante. Sin embargo ésta variante de acuerdo a la estructura de la proteína *PINK1* se localiza en el dominio de cinasa, y podría estar afectando la reacción catalítica de fosforilación, en particular desde un enfoque bioquímico la alanina y la treonina son aminoácidos totalmente diferentes en lo que respecta a la interacción con otras moléculas, debido a que la alanina es hidrofóbica y la treonina es hidrofílica, por consiguiente es probable que se afecte la fosforilación.

A pesar de todo ello la predicción por *PolyPhen* define a la variante A339T como benigna; es decir, no altera la función de la proteína. Por otra parte Brooks y colaboradores obtuvieron la frecuencia del alelo menor (MAF) que es el alelo mutante 339T en una proporción de 0.004 en una población de pacientes con EP, mientras que en 276 controles no la encontraron, estos datos sugieren que esta variante podría tratarse de un polimorfismo de riesgo.

La sustitución N521T fue encontrada en 40 heterocigotos y 30 homocigotos en este estudio, también ha sido descrita por varios investigadores. En la literatura se considera que es polimorfismo. En estudios previos no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles estudiados.^{118,121} Estos resultados sugieren que la variante no sinónima no está asociada con la EP. El alineamiento de proteínas en distintos organismos demuestra que la variante está escasamente conservada en las proteínas homólogas de PINK1 en otras especies (Figura 26). De igual manera Rohé y colaboradores afirman que la variante N521T es un polimorfismo frecuente¹²² y que está presente en un 34-39% en los cromosomas controles de acuerdo a Valente y colaboradores en 2004.¹¹⁷ En particular en un estudio donde se analizaron mutaciones en PINK1 se observó que tanto en controles como en pacientes había prácticamente la misma prevalencia de los tres genotipos posibles para ese alelo, tanto en pacientes como en controles, confirmando que la variación g.22053A>C es meramente polimórfica y no tiene relevancia en la patogénesis de la EP.

Desde un enfoque estructural, la variante N521T se localiza después del dominio de cinasa, por lo tanto no alteraría la actividad catalítica que posee PINK1. De hecho tanto la asparagina y la treonina comparten características bioquímicas en cuanto a la polaridad molecular.

La variante Q115L se identificó en estado heterocigoto y a pesar de que en algunos trabajos la reportan como una variante no asociada a la EP, el análisis realizado por el programa de *PolyPhen* denota que es un residuo altamente conservado en distintas especies. Este programa la predice como una variante potencialmente patogénica. Sin embargo, Bonifati y colaboradores en 2005 reportan que es un polimorfismo ya que se observó tanto en pacientes como en controles.¹²³ Más tarde, Ishihara en 2008 la reporta en estado homocigoto en sujetos controles, y concluye que es un polimorfismo.¹¹⁹

Las variantes intrónicas que fueron observadas están alejadas de los exones y no alteran el proceso de *splicing*, sin embargo como se muestra la variante IVS1+3900A>G, que fue la más común (19 heterocigotos y 42 homocigotos), podría generar un sitio roto de ramificación, puesto que está muy cerca de la secuencia consenso del sitio aceptor del *splicing*. Si el sitio de ramificación se rompe no puede generarse el ataque nucleofílico correctamente hacia el sitio donador del *splicing* y eventualmente la remoción de ese intrón se vería interrumpida.

A pesar de lo anterior, se ha reportado a esta mutante como una variante meramente polimórfica¹¹⁷; puesto que se reporta con una prevalencia de aproximadamente el 35% en pacientes con respecto a controles.¹¹⁸ lo cual está en contraste con la alta frecuencia con la que se encontró en este estudio ($q = 0.515$).

Desde el punto de vista molecular la secuencia consenso del sitio de ramificación incluye una Adenina que está cambiando por Guanina (IVS1+3900A>G). Este cambio tal vez no sea negativo puesto que el cambio es una transición, es decir un cambio de purina por purina, y tal vez debido a ello no se ve afectado el proceso de *splicing*.

Cabe señalar que en los casos negativos del total de la muestra estudiada (n=100) no puede descartarse mutaciones de tipo estructural en el gen *PINK1*, puesto que es posible que haya alteraciones en la dosis génica.

IX. Conclusiones

Este estudio afirma la presencia de mutaciones en el gen *PINK1* en población mexicana.

El análisis del marco abierto de lectura de *PINK1* demostró que el gen es altamente polimórfico. Se encontró la mutante Y444fsX37 con una frecuencia del 3%, 5 casos homocigotos y 16 heterocigotos, donde en los homocigotos queda claro su efecto patogénico, mientras que en los heterocigotos es incierto pero no se descarta algún posible efecto, ya sea como factor de riesgo o por herencia digénica. La mutante A339T que se observó en 3 homocigotos y 30 heterocigotos, se ha reportado ya anteriormente y es factible que se trate de un polimorfismo de riesgo; aunque su naturaleza permanece incierta, y se requieren más estudios.

Se observó que el 25% de variantes son silenciosas y que el 18% (Q115L, A339T, N521T) permanecen sin esclarecerse por completo en cuanto a su naturaleza y si están ligadas a la EP-IT, o si son únicamente polimorfismos o en último caso polimorfismos de riesgo.

X. Perspectivas

Como perspectivas de este estudio, habría que analizar muestras control para observar la prevalencia de aquellas variantes cuya naturaleza aún es incierta. Para poder definir si dichas variaciones en secuencia son factores de riesgo; y si lo son poder conocer su OR (*Odds Ratio*); o si son meramente polimorfismos.

También sería conveniente realizar estudios funcionales, donde se pueda observar los efectos a nivel de proteínas, y su relación con el desarrollo y el inicio de la EP. Estudios a nivel subcelular, celular y tisular de la plasticidad fenotípica de la proteína *PINK1* podrían esclarecer de mejor manera la función de esta proteína y su participación en una ruta convergente para el desarrollo de la EP-IT.

XI. Bibliografía

1. Parkinson J. 1817. An Essay on the Shaking Palsy. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical of Neuroscience* 14:2.
2. Samii A, Nutt JG, Ransom BR. 2004. Parkinson's disease. *The Lancet* 369:1783-1793
3. Biswas A, Tamal S, Sayantani M, Amar K, Shyamal K, et al 2009. Evaluation of PINK1 variants in Indian Parkinson's disease patients. *Parkinsonism and Related Disorders* 31:1-5.
4. Schrag A, Schott JM. 2006. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early onset parkinsonism. *Lancet Neurology* 5:355-363
5. Schon E & Przedborski S. 2011. Mitochondria: The Next (Neurode)Generation. *Neuron* 70:1033-1053.
6. Programa Específico de Enfermedad de Parkinson 2001-2006, Secretaria de Salud.
7. Nuytemans K, Theuns J, Cruts M & Van Broeckhoven C. 2010. Genetic Etiology of Parkinson Disease Associated with Mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 Genes: A Mutation Update. *Human Mutation* 31:763-780.
8. Alcalay R, Caccappolo E, Mejia-Santana H, Xin Tang M, et al 2010. Frequency of Known Mutations in Early-Onset Parkinson Disease. *Archives of Neurology* 67:1116-1122.
9. Nass R & Przedborski S Parkinson's Disease: Molecular and Therapeutic Insights From Model Systems. Elsevier INC. Capítulo 35-37.
10. Jendrach M, Gispert S, Ricciardi F, Klinkenberg M, Schemm R & Auburger G. 2009. The mitochondrial kinase PINK1, stress response and Parkinson's disease. *Journal Bioenergetics and Biomembranes* 41:481-486.
11. Kalf J, Borm G, J. de Swart B, Bloem B, Zwarts M & Munneke M. 2011. Reproducibility and Validity of Patient-Rated Assessment of Speech, Swallowing, and Saliva Control in Parkinson's Disease. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 92:1152-1158.
12. Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, Albanese A, Wood NW. 2001. Localization of a novel locus for autosomal recessive earlyonset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *American Journal of Human Genetics* 68:895-900.
13. Rogaeva E, Johnson J., Lang AE, Gulick C et al. 2004. Analysis of the PINK1 Gene in a Large Cohort of Cases With Parkinson Disease. *Archives of Neurology* 61:1898-1904.
14. Deas E, Wood N, Plun-Favreau H. 2011. Mitophagy and Parkinson's disease: The PINK1-parkin link. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813:623-633.
15. Lesage S, Brice A. 2009. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human Molecular Genetics* 18:R48-R59

16. Navarro A & Boveris A. 2009. Brain mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Parkinson's disease. *Journal Bioenergetics and Biomembranes* 41:517-52.
17. Lin T-K, Liou C-W, Chen S-D, Chuang Y-C, Tiao M-M, Wang P-W, Chen J-B, Chuang J-H. 2009. Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Chang Gung Medical Journal* 32:589-599.
18. Taylor J, Wu R, Farrer M, Delatycki M, Lockhart P. 2009. Analysis of Parkin Co-Regulated Gene in a Taiwanese-Ethnic Chinese cohort with early-onset Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 30:1-5.
19. Chien W-L, Lee T-R, Hung S-Y, Kang K-H, Lee M-J, Fu W-M. 2011. Impairment of oxidative stress-induced heme oxygenase-1 expression by the defect of Parkinson-related gene PINK1. *Journal of Neurochemistry* 117:643-653.
20. Kashihara K, Shinya T, Higaki F. 2011. Neuromelanin magnetic resonance imaging of nigral volume loss in patients with Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience* 30:1-4.
21. Zecca L, Zucca FA, Albertini A, Rizzio E, & Fariello R.G. 2006. A proposed dual role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 66:S8-S11.
22. Kurzawski M, Bialecka M, Slawek J, Klodowska-Duda G, Drozdziak M. 2009. Association study of GATA-2 transcription factor gene (GATA2) polymorphism and Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 30:1-4
23. Halliday G, Holton J, Revesz T, Dickson D. 2011. Neuropathology underlying clinical variability in patients with synucleinopathies. *Acta Neuropathologica* 122:187-204.
24. Cobb S, Wider C, Ross O, Mata I, et al. 2009. GCH1 in Early-Onset Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 24:2070-2075.
25. Pereira D, Garret C. 2010. Risk factors for Parkinson's disease. An Epidemiologic Study. *Acta Medica Portuguesa* 23:015-024.
26. Borlak J, Reamon-Buettner SM. N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphisms in Parkinson's disease. *BMC Medical Genetics* 29:7-30.
27. Singh M, Khanna VK, Shukla R & Parmar D. 2010. Association of polymorphism in cytochrome P450 2D6 and N-acetyltransferase-2 with Parkinson's disease. *Disease Markers* 28:87-93.
28. Kurth MC & Kurth JH. 1993. Variant cytochrome P450CYP2D6 allelic frequencies in Parkinson's disease. *American Journal of Medical Genetics* 48:166-168.
29. Harhangi BS, Oostra BA, Heutink P, van Duijn CM, Hofman A & Breteler MMB. 1999. N-acetyltransferase-2 polymorphism in Parkinson's disease: the Rotterdam study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 67:518-520.
30. Williams-Gray CH, Goris A, Saiki M, Foltynie T, Compston DA, Sawcer SJ, Barker RA, 2009. Apolipoprotein E genotype as a risk factor for susceptibility to and dementia in Parkinson's disease. *Journal of Neurology* 256:493-498.
31. Gao J, Huang X, Park Y, Liu R, Hollenbeck A, Schatzkin A, Mailman RB, Chen H. 2011. Apolipoprotein E genotypes and the risk of Parkinson disease. *Neurology of Aging* publicado electrónicamente.

32. Mueller JC, Fuchs J, Hofer A, Zimprich A, Lichtner P, Illig T, Berg D, Wullner U, Meitinger T & Gasser T. 2005. Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 57:535-541.
33. Goris A, Williams-Gray CH, Clark GR, Foltynie T, Lewis SJ, Brown J, Ban M, Spillantini MG, Compston A, Burn DJ et al. 2007. Tau and alpha-synuclein in susceptibility to, and dementia in, Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 62, 145-153.
34. Di Fonzo A, Wu-Chou YH, Lu CS, van Doeselaar M, Simons EJ, Rohe CF, Chang HC, Chen RS, Weng YH, Vanacore N, et al. (2006) A common missense variant in the LRRK2 gene, Gly2385Arg, associated with Parkinson's disease risk in Taiwan. *Neurogenetics* 7: 133-138.
35. Ross OA, Wu YR, Lee MC, Funayama M, Chen ML, Soto AI, Mata IF, Lee-Chen GJ, Chen CM, Tang M, et al. 2008. Analysis of Lrrk2 R1628P as a risk factor for Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 64:88-92.
36. Aharon-Peretz J, Badarny S, Rosenbaum H & Gershoni-Baruch R. 2005. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson disease: phenotype-genotype correlation. *Neurology* 65:1460-1461.
37. Feany MB. 2004. New genetic insights into Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine* 351:1937-1940.
38. Wu DC, Teismann P, Tieu K, Vila M, Jackson-Lewis V, Ischiropoulos H, Przedborski S. 2003. NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 6145-6150.
39. Tsigelny IF, Crews L, Desplats P, Shaked GM, Sharikov Y, et al. 2008. Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. *PLoS One* 3:e3135
40. Westermann B (2008) Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *Journal of Biological Chemistry* 283: 13501-13505.
41. Wirdefeldt K, Adami H-O, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. 2011. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *European Journal of Epidemiology* 26:S1-S58.
42. Alonso ME, Otero E, D'Regules R, Figueroa HH. 1986. Parkinson's disease: a genetic study. *The Canadian Journal of Neurological Sciences* 13:248-251.
43. Thacker EL, Ascherio A. 2008. Familial aggregation of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Movement Disorders* 23:1174-1183.
44. Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, Ellenberg J, Chan P, Mayeux R, Langston JW. 1999. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *Journal of American Medical Association* 281:341-346.
45. Wirdefeldt K, Gatz M, Reynolds CA, Prescott CA, Pedersen NL. 2011. Heritability of Parkinson disease in Swedish twins: a longitudinal study. *Neurobiology of Aging* 32: e1-e8.
46. Ahlskog JE. 2009. Parkin and PINK1 parkinsonism may represent nigral mitochondrial cytopathies distinct from Lewy body Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 30:1-7.

47. Martin I, Dawson V & Dawson T. 2011. Recent Advances in the Genetics of Parkinson's Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* Publicado electrónicamente.
48. Chishti A, Bohlega S, Ahmed M, et al. 2006. T313M *PINK1* Mutation in an Extended Highly Consanguineous Saudi Family With Early-Onset Parkinson Disease. *Archives of Neurology* 63:1483-1485.
49. Chu C. 2010. Tickled PINK1: Mitochondrial homeostasis and autophagy in recessive Parkinsonism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1802:20-28.
50. Jowaed A, Schmitt I, Kaut O, Wullner U. 2010. Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains. *Journal of Neuroscience* 30:6355-6359
51. Puschmann A, Ross O, Vilarino-Guell C, Lincoln S, Kachergus J, Cobb S, et al. 2009. A Swedish family with de novo alpha-synuclein A53T mutation: evidence for early cortical dysfunction. *Parkinsonism Related Disorders* 15:627-632.
52. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Sudhof TC. 2010. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329:1663-67
53. Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, et al. 2010. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron* 65:66-79
54. Gaig C, Marti MJ, Ezquerra M., Rey MJ., Cardozo A., Tolosa E. 2007. G2019S LRRK2 mutation causing Parkinson's disease without Lewy bodies. *Journal of Neurology and Neurosurgery. Psychiatry* 78:626-28
55. Hong DP, Fink AL, Uversky VN. 2008. Structural characteristics of alpha-synuclein oligomers stabilized by the flavonoid baicalein. *Journal of Molecular Biology* 383:214-23.
56. Bieschke J, Russ J, Friedrich RP, Ehrnhoefer DE, Wobst H., et al. 2010. EGCG remodels mature alphasynuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:7710-15.
57. Cookson MR. 2010. The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 11:791-97
58. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, et al. 2004. Mutations in LRRK2 cause autosomal dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44:601-7.
59. Dachselt JC, Farrer MJ. 2010. LRRK2 and Parkinson disease. *Archives of Neurology* 67:542-47.
60. Marti-Masso JF, Ruiz-Martinez J, Bolano MJ, Ruiz I, Gorostidi A, et al. 2009. Neuropathology of Parkinson's disease with the R1441G mutation in LRRK2. *Movement Disorders* 24:1998-2001.
61. Nichols RJ, Dzamko N, Morrice NA, Campbell DG, Deak M, et al. 2010. 14-3-3 binding to LRRK2 is disrupted by multiple Parkinson's disease-associated mutations and regulates cytoplasmic localization. *Biochemistry Journal* 430:393-404.
62. Sen S, Webber PJ, West AB. 2009. Dependence of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) kinase activity on dimerization. *Journal of Biological Chemistry* 284:36346-36356.

63. Cazeneuve C, San C, Ibrahim SA, Mukhtar MM, Kheir MM, Leguern E, Brice A, Salih MA. 2009. A new complex homozygous large rearrangement of the PINK1 gene in a Sudanese family with early onset Parkinson's disease. *Neurogenetics* 10:265-270.
64. Mills RD, Sim CH, Mok SS, Mulhern TD, Culvenor JG, Cheng HC. 2008. Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *Journal of Neurochemistry* 105:18-33.
65. Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, Plun-Favreau H, Deas E, Klupsch K, Downward J, Latchman DS, Tabrizi SJ, Wood NW, Duchen MR, Abramov AY. 2009. PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Molecular Cell* 33:627-638.
66. Kim Y, Park J, Kim S, Song S, Kwon SK, Lee SH, Kitada T, Kim JM, Chung J. 2008. PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *Biochemistry Biophysical Research Communications* 377:975-980.
67. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen D-F, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ. 2010. PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin. *PLoS Biology* 8:e100298.
68. Vives-Bauza C, Przedborski S. 2011. Mitophagy: the latest problem for Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine* 17:158-165.
69. Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, et al. 2004. Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Annals of Neurology* 56:424-427.
70. Kumazawa R, Tomiyama H, Li Y, Imamichi Y et al. 2008. Mutation Analysis of the PINK1 Gene in 391 Patients With Parkinson Disease. *Archives of Neurology* 65:802-805.
71. Kawajiri S, Saiki S, Sato S & Hattori N. 2011. Genetic mutations and functions of PINK1 *Trends in Pharmacological Sciences* Publicado electrónicamente.
72. Cardona F, Sánchez-Mut V, Dopazo H & Pérez-Tur J. 2011. Phylogenetic and In Silico Structural Analysis of the Parkinson Disease-Related Kinase PINK1. *Human Mutation* 32:369-378.
73. Samaranch L, Lorenzo-Betancor O, Arbelo JM, Ferrer I, Lorenzo E, Irigoyen J. 2011. PINK1-linked parkinsonism is associated with Lewy body pathology. *Brain* 133; 1128-1142.
74. Deas E, Plun-Favreau H, Wood NW. 2009. PINK1 function in health and disease. *EMBO Molecular Medicine* 1:152-156.
75. Morais VA, Verstreken P, Roething A, Smet J, Snellinx A, Vanbrabant M, Haddad D, Frezza C, Mandemakers W, Vogt-Weisenhorn D, et al. 2009. Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO Molecular Medicine* 1: 1-13.
76. Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS, Li L. 2007. PINK1 Protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biology* 5: e172.
77. Mateo I, Infante J, Sanchez-Juan P, Garcia-Gorostiaga I, Rodriguez- Rodriguez E, Vazquez-Higuera JL, Berciano J & Combarros O. 2010. Serum heme oxygenase-1 levels are increased in Parkinson's disease but not in Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 121:136-138.

78. Gegg ME, Cooper JM, Schapira AHV, Taanman JW. 2009. Silencing of PINK1 Expression Affects Mitochondrial DNA and Oxidative Phosphorylation in DOPAMINERGIC Cells. *PLoS One* 4(1):1-10.
79. Piccoli C, Sardanelli A, Scrima R, Ripoli M, Quarato G, D'Aprile A, Bellomo F, Scacco S, De Michele G, Filla A, et al. 2008. Mitochondrial respiratory dysfunction in familiar Parkinsonism associated with PINK1 mutation. *Neurochemical Research* 45: 596-602.
80. Liu W, Vives-Bauza C, Acín-Pérez R, Yamamoto A, Tan Y, Li Y et al 2009. PINK1 Defect Causes Mitochondrial Dysfunction, Proteasomal Deficit and α -Synuclein Aggregation in Cell Culture Models of Parkinson's Disease. *PLoS One* 4(2):1-14.
81. Campanella M, Casswell E, Chong S, Farah Z, Wieckowski MR, Abramov AY, Tinker A, Duchen MR. 2008. Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metabolism* 8: 13-25.
82. Marongiu R, Spencer B, Crews L, Adame A, Patrick C, Trejo M, Dallapiccola B, Valente EM, Masliah E. 2009. Mutant Pink1 induces mitochondrial dysfunction in a neuronal cell model of Parkinson's disease by disturbing calcium flux. *Journal of Neurochemistry* 103: 1561-1574.
83. Gandhi S, Muqit MM, Stanyer L, Healy DG, Abou-Sleiman PM, Hargreaves I, Heales S, Ganguly M, Parsons L, Lees AJ, et al. 2006. PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain* 129: 1720-1731.
84. Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE, Surmeier DJ. 2007. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* 447: 1081-1086.
85. Petit A, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M, Chen F, Gu Y, Hasegawa H, Salehi-Rad S, et al. 2005. Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *Journal of Biological Chemistry* 280: 34025-34032.
86. Sha D, Chin LS & Li L. 2011. Phosphorylation of parkin by Parkinson disease-linked kinase PINK1 activates parkin E3 ligase function and NF- κ B signaling. *Human Molecular Genetics* 19:352-363.
87. Exner N, Treske B, Paquet D, Holmstrom K, Schiesling C, Gispert S, Carballo-Carbajal I, Berg D, Hoepken HH, Gasser T, et al. 2007. Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *Journal of Neuroscience* 27: 12413-12418.
88. Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, Yoo SJ, Hay BA, Guo M. 2006. *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441: 1162-1166.
89. Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, et al. 2006. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441:1157-61.
90. Yang Y, Gehrke S, Imai Y, Huang Z, Ouyang Y, Wang JW, Yang L, Beal MF, Vogel H, Lu B. 2006. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:10793-10798.
91. Koh H, Chung J. PINK1 and Parkin to control mitochondria remodeling. 2010. *Anatomy and Cell Biology* 49:179-184.

92. Dawson, TM. 2006. Parkin and defective ubiquitination in Parkinson's disease. *Journal of Neuronal Transmission Supplementa*, 70:209–213.
93. Moore, D.J. 2006. Parkin: a multifaceted ubiquitin ligase. *Biochemical Society Transactions*, 34: 749–753.
94. Henn IH, Bouman L, Schlehe JS, Schlierf A, Schramm JE, Wegener E, Nakaso K, Culmsee C, Berninger B, Krappmann D, et al. 2007. Parkin mediates neuroprotection through activation of I κ appaB kinase/nuclear factor-kappaB signaling. *Journal of Neuroscience* 27: 1868– 1878.
95. Xiong H, Wang D, Chen L, Su Choo Y, Ma H, Tang C, et al. 2009. Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *The Journal of Clinical Investigation* 10:1-11.
96. Jean Thomas K, K. McCoy M, Blackinton J, Beilina A, van der Brug M, et al 2011. DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. *Human Molecular Genetics* 20:40-50.
97. Tang B, et al. 2006. Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics* 15:1816–1825.
98. Inzelberg R, Jankovic J. 2007. Are Parkinson disease patients protected from some but not all cancers? *Neurology* 69: 1542-1550.
99. Fitzgerald JC, Plun-Favreau H. 2008. Emerging pathways in genetic Parkinson's disease: autosomal-recessive genes in Parkinson's disease—a common pathway? *FEBS Journal* 275: 5758-5766.
100. Yang Y, Ouyang Y, Yang L, Beal MF, McQuibban A, et al. (2008) Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 7070–7075.
101. Thomas KJ, Cookson MR. 2009. The role of PTEN-induced kinase 1 in mitochondrial dysfunction and dynamics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41: 2025–2035.
102. Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ & Pallanck LJ. 2008. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *PNAS* 105:1638-1643.
103. Poole AC, Thomas RE, Yu S, Vincow ES, Pallanck L. 2010. The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLoS One* 5:e10054.
104. Vives-Bauza C, Przedborski S. 2010. PINK1 points Parkin to mitochondria. *Autophagy* 6:674–675.
105. Geisler S, Holmstrom KM, Treis A, Skujat D, Weber SS, et al. 2010. The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. *Autophagy* 6:871–878
106. Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW. 2010. Mitofusin 1 and mitofusina 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Human Molecular Genetics* 19:4861–4870.
107. Narendra DP, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM & Youle RJ. 2010. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* 6:1090-1106.

108. Okatsu, K. et al. 2010. p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes to Cells* 15: 887-900
109. Weihofen A, Thomas KJ, Ostaszewski BL, Cookson MR & Selkoe DJ. 2009. Pink1 forms a multi-protein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry* 48:2045-2052.
110. Pogson JH, Ivatt RM, Whitworth AJ. 2011. Molecular Mechanisms of PINK1-Related Neurodegeneration. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 11:283-290.
111. Detmer SA, Chan DC. 2007. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 870-879.
112. Wang X & Schwarz TL. 2009. The Mechanism of Kinesin Regulation by Ca⁺⁺ for Control of Mitochondrial Motility. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41:1972-1976.
113. Bhattacharya S, Bunick SG, Chazin WJ. 2004. Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1742:69-79.
114. Glater EE, Megeath LJ, Stowers RS, Schwarz TL. 2006. Axonal transport of mitochondria requires Milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *Journal of Cell Biology* 173:545-557.
115. Frederick RL, McCaffery JM, Cunningham KW, Okamoto K, Shaw JM. 2004. Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *Journal of Cell Biology* 167:87-98.
116. Brooks J, Ding J, Simon-Sanchez J. 2009. Parkin and PINK1 mutations in early-onset Parkinson's disease: comprehensive screening in publicly available cases and control. *Journal of Medical Genetics* 46:375-381.
117. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, et al. 2004. Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in *PINK1*. *Science* 304:1158-1160.
118. Godeiro Junior C, de Carvalho Aguiar PM, Felício AC, Barsottini OGP, Silva SMA, Borges V, Andrade LA, Ferraz HB. 2009. PINK1 polymorphism IVS1-7 A→G, exposure to environmental risk factors and anticipation of disease onset in Brazilian patients with early-onset Parkinson's Disease. *Neuroscience Letters*. Publicado electrónicamente.
119. Ishihara-Paul I, Hulihan MM, Kachergus J, Upmanyu R, Warren L, Amouri R, Elango R, Prinjha RK, et al. 2008. PINK1 mutations and parkinsonism. *Neurology* 71:896-902.
120. Abou-Sleiman PM, Muqit MMK, McDonald NQ, Yang YX, Gandhi S, Healy DG, Harvey K, et al. 2006. A Heterozygous Effect for PINK1 Mutations in Parkinson's Disease? *Annals of Neurology* 60:414-419.
121. Groen JL, Kawarai T, Toulina A, Rivoiro C, Salehi-Rad S, Sato C, Morgan A, Liang Y, Postuma RB, St George-Hyslop P, Lang AE, Rogaeva E. 2004. Genetic association study of *PINK1* coding polymorphisms in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 372:226-229.
122. Rohé CF, Montagna P, Breedveld G, Cortelli P, Oostra BA & Bonifati V. 2004. Homozygous PINK1 C-Terminus Mutation Causing Early-Onset Parkinsonism. *Annals of Neurology* 56:427-431.

123. Bonifati V, Rohe CF, Breedveld GJ, Fabrizio E, De Mari M, Tassorelli C, et al. 2005. Early-onset parkinsonism associated with *PINK1* mutations -Frequency, genotypes, and phenotypes-. *Neurology* 65:87-95.
124. Litvan I, Halliday G, Hallet M, Christopher GG, Rocca W, Charles D, Yoav B-S, Dennis WD, et al 2007. The etiopathogenesis of Parkinson disease and suggestions for future research. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 66:251-257
125. Yang Y, Gehrke S, Imai Y, Huang Z, Ouyang Y, Wang J-W, Yang L, Beal M F, Vogel H & Lu B. 2006. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 28:10793-10798.