



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN SIETE *LOCI PARK* EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON MEDIANTE
LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN DE SONDAS
DEPENDIENTES DE LIGANDO.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Allan Lozano Romero



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: Alicia Beatriz Cervantes Peredo**

VOCAL: **Profesor: Samuel Canizales Quinteros**

SECRETARIO: **Profesor: Nancy Monroy Jaramillo**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Martha Patricia Coello Coutiño**

2º SUPLENTE: **Profesor: María Benita Leonor Fernandez Salgado**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA "DR. MANUEL VELASCO SUAREZ"

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Nancy Monroy Jaramillo _____

SUSTENTANTE (S):

Allan Lozano Romero _____

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa en incidencia después de la enfermedad de Alzheimer, afecta aproximadamente al 2% de la población mayor de 60 años y se incrementa al 5% en población mayor de 80 años, también es el desorden del movimiento de mayor incidencia. Se han identificado mutaciones en diversos genes asociadas a una fracción de enfermedad de Parkinson de inicio temprano cuando los síntomas inician antes de los 45 años y a algunos casos esporádicos de inicio tardío, además se han encontrado mutaciones implicadas en los casos familiares en EP. MLPA es una técnica de detección de mutaciones estructurales (deleciones, duplicaciones y multiplicaciones) y de secuencia con paneles que incluyen sondas para los principales genes asociados con la enfermedad.

En el presente trabajo se estandarizó la técnica de MLPA con dos paneles comerciales (P051, P052) que incluyen sondas para siete *loci* *PARK* (*SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ1*, *LRRK2*, *GCH1* y *ATP13A2*) y un gen para diagnóstico diferencial con distonía respondedora a DOPA, *UCHL1*, para el diagnóstico molecular de algunos casos de enfermedad de Parkinson.

Se estudiaron 18 casos índice en 13 familias, 64 casos esporádicos y se compararon con 12 controles sin antecedentes de enfermedades neurodegenerativas, todos pertenecientes a población mestizo mexicana. Se identificaron diecinueve mutaciones estructurales y tres mutaciones puntuales, los resultados fueron confirmados por QPCR y secuenciación de Sanger. Se confirmaron catorce mutaciones estructurales y dos de secuencia y seis casos de falsos positivos. El gen con mayor número de mutaciones es *PARK2* con diez seguidas de tres

mutaciones para *LRRK2* (dos mutaciones puntuales y una estructural), dos digénicas *PARK2/PINK1* y una mutación en *DJ1*.

Los resultados obtenidos por MLPA fueron concordantes con aquellos de otras técnicas para detectar mutaciones estructurales y con los resultados publicados. De las mutaciones estructurales encontradas tres no han sido descritas anteriormente, incluida la mutación digénica *PARK2/PINK1*.

La técnica de MLPA se introdujo como primer tamizaje en pacientes con diagnóstico clínico de enfermedad de Parkinson obteniendo un panorama amplio de la dosis génica en siete genes asociados con enfermedad de Parkinson monogénica.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Definición de la enfermedad de Parkinson	4
1.2.1 Clasificación de la enfermedad de Parkinson	4
1.3 Epidemiología de la enfermedad de Parkinson	6
1.4 Patogenia de enfermedad de Parkinson	6
1.5 Diagnóstico clínico de la enfermedad de Parkinson	8
1.6 Tratamiento de la enfermedad de Parkinson	9
1.7 Factores de riesgo para la enfermedad de Parkinson	10
1.8 Genes asociados con la enfermedad de Parkinson	11
1.8.1 <i>SNCA</i>	13
1.8.2 <i>PARK2</i>	14
1.8.3 <i>LRRK2</i>	16
1.8.4 <i>DJ1</i>	17
1.8.5 <i>GCH1</i>	18
1.8.6 <i>PINK1</i>	18
1.8.7 <i>ATP13A2</i>	19
1.9 Mutaciones asociadas a enfermedad de Parkinson	19
1.9.1 Mutaciones de secuencia	19
1.9.2 Mutaciones Estructurales	20
1.10 Técnicas de tamizaje de mutaciones	21
1.10.1 MLPA	22
1.10.2 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	24

1.10.3 Otras técnicas	25
1.11 Técnicas de confirmación	28
1.11.1 Secuenciación	28
1.11.2 PCR en tiempo real	28
2.0 Planteamiento del problema.....	30
3.0 Justificación	31
4.0 Hipótesis	32
5.0 Objetivos.....	33
6.0 Sujetos y Métodos	34
6.1 Pacientes.....	34
6.1.1 Criterios de inclusión	34
6.1.2 Criterios de exclusión	35
6.2 Controles.....	35
6.3Tipo de muestra	35
6.4 Extracción de DNA	35
6.4.1 Extracción a partir de sangre periférica	36
6.4.2 Extracción de DNA a partir de muestras de saliva.....	37
6.5 Reacción de MLPA	37
6.6 Electroforesis capilar	39
6.5 Análisis de datos con el programa Coffalyzer.net	40
6.5 Análisis de resultados.	41
7.0 Confirmación de los resultados por QPCR y secuenciación directa	46
8.0 Resultados.....	47
8.1 Resultados globales	47

8.2 Resultados Normales	50
8.3 Resultados Positivos	51
8.4 Mutaciones estructurales	51
8.5 Mutaciones puntuales.....	55
8.6 Relación fenotipo- genotipo	57
9.0 Discusión de resultados.....	59
9.1 Genética de la enfermedad de Parkinson	59
9.2 Discusión de MLPA como técnica de biología molecular.....	60
9.2.1 Limitantes de la técnica de MLPA	62
9.3 Mutaciones encontradas	63
9.3.1 Discusión de mutaciones en <i>PARK2</i>	65
9.3.2 Discusión de mutaciones en <i>SNCA</i>	67
9.3.3 Discusión de mutaciones en <i>LRRK2</i>	67
9.3.4 Discusión de mutación en <i>DJ1</i>	68
9.3.4 Discusión de herencia digénica.	69
9.4 Discusión sobre la inclusión de <i>GCH1</i> en el panel de MLPA	70
10.0 Conclusiones	71
BIBLIOGRAFIA.....	72
ANEXO A.....	84
ANEXO B.....	87

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La enfermedad de Parkinson (EP) fue conocida y estudiada desde la antigüedad por médicos como Sylvius de la Boë (1680), Sauvages (1768), van Swieten (1749) Gaubius (1758), ellos aportaron datos importantes como la diferenciación entre el temblor que ocurre en movimiento y el temblor que ocurre en reposo, del temblor de causa desconocida, y del temblor originado por ingerir bebidas espirituosas (Sanders, 1880).

La EP fue estudiada como una enfermedad única y característica por el doctor James Parkinson en su trabajo titulado *An Essay on Shaky Palsy* de 1817, su publicación de 66 páginas y cinco capítulos, contenía la descripción de 6 casos y la definió como *parálisis agitans*: "Temblor involuntario con disminución en la fuerza muscular en miembros en reposo, incluso cuando están apoyados; con propensión a encorvar el tronco hacia el frente, y a pasar de una posición de caminar a una posición de correr: los sentidos y el intelecto no están afectados" (Parkinson, 1817).

El escrito describe claramente los síntomas de los pacientes que Parkinson estudió, sin embargo no puede explicar la etiología de la enfermedad. Durante los siguientes cincuenta años el ensayo de Parkinson fue poco cuestionado y usado como base en trabajos subsecuentes (Koller, 1992).

John Cooke cita el trabajo de Parkinson en el segundo volumen de *Treatise on Nervous Disease* (Cooke, 1821), su descripción no aportaba nada nuevo y parecía estar basada en el trabajo previo. Marshall Hall también comentó sobre la enfermedad en sus trabajos (Hall, 1941). Ambos añadieron poco a la descripción dada por Parkinson excepto la mención de las similitudes entre el padecimiento y los tuberculomas y las diferencias con los pacientes con "*tremor mercurialis*" el cual se presentaba en trabajadores que utilizaban mercurio en la fabricación de espejos. Robert Bentley Todd discutió también la enfermedad en artículos donde citaba el trabajo de Parkinson (Todd, 1859).

Durante la primera mitad del siglo XX los trabajos discutieron muy poco los resultados de éste. Sin embargo el panorama cambiaría con la contribución de neurólogos como Trousseau y Charcot. Trousseau dedicó su décimo quinto volumen de *Lectures on Clinical Medicine* al temblor senil y *paralysis agitans*, aunque usó el término, consideraba inapropiado el nombre ya que no había una parálisis al inicio de lo que él consideraba un tipo de corea. Para confirmar sus observaciones usó dinamómetros para medir la fuerza en varios de sus pacientes, y admitió que en las etapas finales de la enfermedad se presentaba una parálisis debida a la pérdida de fuerza muscular (Trousseau, 1868).

Sus otras contribuciones mayores fueron los reportes de bradicinesia en los pacientes y las afecciones mentales que suelen presentarse en las etapas finales de la enfermedad. Charcot y sus alumnos contribuyeron al estudio de la enfermedad en artículos, monografías y tesis, en ellas diferenciaban la *paralysis agitans* de la esclerosis múltiple. Romberg y Charcot aparentemente basaron su conocimiento de la enfermedad en la sinopsis de Todd al trabajo de Parkinson, ambos coincidieron en llamar

al padecimiento una neurosis lo que significaba que no existía una lesión propia (Koller, 1992).

Charcot consideraba fundamental el síntoma del temblor, mencionaba la presencia de éste en miembros en reposo y la desaparición cuando se deseaba mover voluntariamente la parte del cuerpo afectada. Observó el progreso de un temblor localizado en una extremidad que, con el tiempo, se extendía a todo un hemisferio del cuerpo y terminaba en un temblor generalizado; aunque desaparecía mientras el paciente se encontraba dormido (Charcot, 1877).

Brissaud dedicó dos de sus lecciones a la "*Maladie de Parkinson*" (EP), fue el primero en referirse así al padecimiento en lugar de *parálisis agitans* (Brissaud y Vingt-Deuxième, 1895). Reportó la aparición de problemas de conducta como pérdida de interés, cambios de humor y carácter. Brissaud mostró particular interés en un caso reportado por Blocq y Marinesco (Blocq y Marinesco, 1894) en el cual examinaron un tuberculoma que destruyó por completo la sustancia *nigra* del paciente, los autores comentaron que esta zona obscura del cerebro podría estar actuando en los movimientos voluntarios e involuntarios con lo cual postuló la hipótesis de que las lesiones a dicha región podrían ser la razón anatómica de la EP.

Sir William Gowers estudió ochenta casos y encontró una predominancia del género masculino (63%), una edad de inicio mayor a los cuarenta años y un factor de heredabilidad del 15%. Sus estudios incluyeron métodos de mayor precisión para cuantificar los temblores, así como frecuencia de éstos y estudios electromiográficos (Koller, 1992).

Durante la segunda mitad del siglo XX se desarrollaron nuevas técnicas de diagnóstico y estudios de la patogénesis de la enfermedad.

1.2 Definición de la enfermedad de Parkinson

Es un desorden degenerativo del sistema nervioso, caracterizado por presentar movimientos involuntarios de tipo temblor en reposo, rigidez y bradicinesia. Originalmente se clasificó como un desorden ocasionado por un déficit de dopamina, sin embargo actualmente se le considera una enfermedad multisistémica cerebral en la cual varias rutas no dopaminérgicas del sistema motor se ven afectadas de manera progresiva a lo largo de la enfermedad (Perry et al., 1999).

La EP es el desorden de movimiento más común y la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente. Neuropatológicamente, se caracteriza por la pérdida de células en la región *nigro* estriatal y la presencia de inclusiones intracelulares llamadas cuerpos de Lewy, cuyo principal componente es la proteína α -sinucleína (Tanner y Aston, 2000).

1.2.1 Clasificación de la enfermedad de Parkinson

La EP puede clasificarse de muchas formas dependiendo de las características de la enfermedad que se presentan en el paciente (de acuerdo a la edad de inicio de los síntomas, respuesta al tratamiento, antecedentes familiares). En la mayoría de los casos, la edad promedio de inicio es de 60 años, los casos con aparición de síntomas antes de los 45 años se consideran como enfermedad de Parkinson de inicio temprano (EPIT), y además existen casos de EP juvenil con una edad de inicio menor a los 20 años (Lohmann et al., 2009).

Algunos autores consideran ambas enfermedades como padecimientos diferentes e independientes uno de otro; sin embargo, ambos comparten signos y síntomas que los caracterizan como EP. La EPIT tiene un amplio rango de fenotipos clínicos y algunos atípicos pero generalmente se observan casos con progreso lento, con respuestas excelentes a dosis bajas de levodopa, discinesias y sin demencia. La mayoría de los pacientes no muestran señales de daño cognitivo, pero se han reportado desórdenes de conducta, incluyendo ansiedad, psicosis, ataques de pánico, depresión, impotencia sexual y desórdenes obsesivo-compulsivos (Lohmann, 2009).

Se considera que cerca del 4% del total de los pacientes con EP desarrollan signos clínicos antes de los 50 años de edad (Van der Eeden, 2003).

Otra forma de clasificar la EP es con base a la historia familiar. La mayoría de los pacientes con EP son esporádicos, en 10-15% de los casos se observa agregación familiar y en 5-10% del total de los casos se han identificado formas monogénicas con patrón de herencia autosómico dominante o autosómico recesivo. Si se toma en cuenta el tratamiento existen pacientes que son respondedores a Levodopa y pacientes que no lo son (Van Den Eeden et al., 2003)

1.3 Epidemiología de la enfermedad de Parkinson

Aproximadamente 1-2 % de la población mayor de 65 años sufre EP y este número asciende a 3-5 % en personas mayores de 85 años (Fahn, 2003).

En México de acuerdo a las cifras publicadas por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en el censo de población y vivienda realizado en 2010, existe una población mayor de 65 años de 6,233,618 y una mayor 85 años de 703,295 individuos. De acuerdo con los datos epidemiológicos, aproximadamente 159,837 personas pueden padecer la enfermedad. En nuestro país se ha estimado una prevalencia de 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes al año y en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velasco Suarez" (INNNMVS) es la cuarta causa de consulta. Se ha calculado que en el mundo debido al aumento de la tasa de sobrevivencia, la EP afecta actualmente de 4.1 a 4.6 millones de personas mayores de 50 años y se espera que para el año 2030 esta cifra sea duplicada (SSA, 2008).

1.4 Patogenia de enfermedad de Parkinson

La patogénesis de la EP como la entendemos en la actualidad incluye una amplia gama de rutas metabólicas alteradas, estrés oxidante causado por disfunción mitocondrial, inflamación, metabolismo de proteínas anormales; en donde dichas alteraciones, se incrementan con la edad (Dawson, 2003).

La pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en los núcleos del tronco cerebral, principalmente la zona *pars compacta* de la sustancia *nigra*, genera una disminución de los niveles de dopamina en el estriado llevando a la aparición de los síntomas motores y su incremento en intensidad con el tiempo. En algunos casos se encuentran agregados intracelulares proteínicos donde el componente principal es α -sinucleína. Los mecanismos mediante los cuales se presenta la degeneración neuronal no son conocidos. El descubrimiento de mutaciones genéticas y el mayor entendimiento de las disfunciones de las proteínas aberrantes han proporcionado nuevas e importantes perspectivas en la patogénesis a nivel molecular. Existe evidencia de que el desacople del sistema ubiquitina proteosoma, la disfunción mitocondrial y el decremento en la tolerancia al estrés oxidante son mecanismos clave en la patogénesis de la EP (Nishioka et al. 2006)

En la figura 1 se observan tres neuronas que muestran los diferentes organelos con los que interactúan los productos proteicos de genes ligados con EP. Se ve la participación de la mitocondria y las funciones que realizan como parte de la señalización celular. Se aprecia el trabajo de las proteínas en la formación de vesículas transportadoras de dopamina.

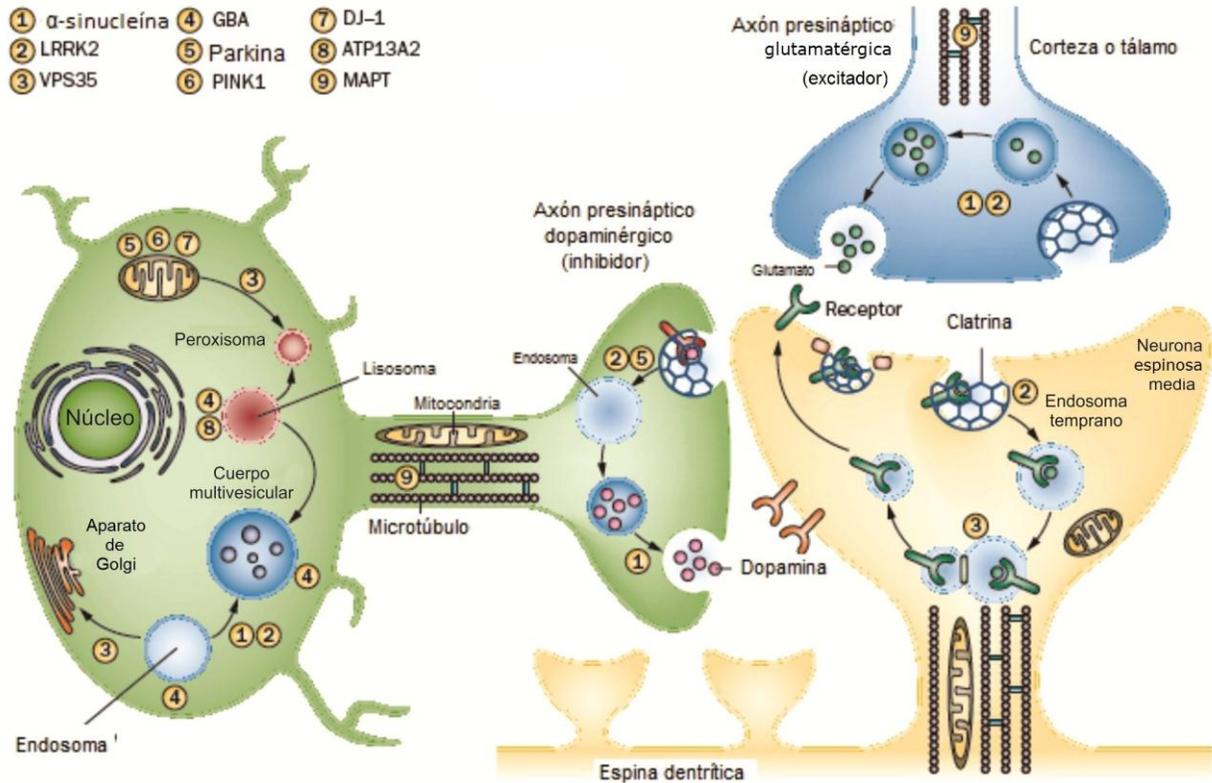


Figura 1. Ubicación neuronal de los productos proteicos de los genes *PARK*. Modificada de Trinh, J y Farrer M, 2013

1.5 Diagnóstico clínico de la enfermedad de Parkinson

El diagnóstico de la EP idiopática es principalmente clínico con manifestaciones como: temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural. Adicionalmente, pueden encontrarse otras características como anomalías posturales, disautonomías, distonía y demencia (Alves, et al. 2008).

En 1967 se ideó la escala de Hoehn y Yahr, la cual evalúa en una escala de 0 (sin síntomas) a 5 (invalidez) impedimento del movimiento, postura y marcha. En esta escala no se captan datos de los síntomas no motores de la EP. La herramienta más usada y aceptada para evaluar la

enfermedad es la escala unificada para la evaluación de la EP (UPDRS) que se introdujo en 1987 por un grupo de especialistas en desórdenes del movimiento. Se divide en cuatro partes: cubre síntomas de actividad mental, comportamiento y humor en la primera parte, actividades de la vida diaria en la segunda, síntomas motores en la tercera y complicaciones terapéuticas en la última. Estas evaluaciones deben realizarse por un médico neurólogo especialista en desórdenes del movimiento para asegurar la veracidad de los resultados. Sin embargo, el diagnóstico definitivo de la EP requiere la confirmación *posmortem* (Alves, et al. 2008).

1.6 Tratamiento de la enfermedad de Parkinson

Los tratamientos son prescritos por el médico tratante pero generalmente se mantiene una terapia física aplicada al estadio de la EP, en coordinación con el médico rehabilitador, no menos de tres veces por semana. Si el paciente no recibe ningún tratamiento para la enfermedad y se encuentra en estadio inicial, se inicia con levodopa a dosis baja y se incrementa progresivamente. Se puede adicionar un inhibidor de la mono amino oxidasa B (MAO-B). En los pacientes diagnosticados con EPIT, se inicia con un agonista dopaminérgico como monoterapia, incrementando progresivamente la dosis. En los casos cuando el paciente no presenta deterioro cognitivo evidenciado a través de pruebas neuropsicológicas y el temblor al reposo es el síntoma más importante, puede iniciarse con un anticolinérgico oral a dosis paulatinamente crecientes (Antonini, et al. 2012).

En los pacientes con estadios intermedios o avanzados que no han recibido ningún tratamiento, se inicia con levodopa y se adiciona un agonista dopaminérgico o un inhibidor de la Catecol-O-metiltransferasa (COMT). En casos específicos de EPIT con antecedentes familiares de progreso rápido, se pueden llevar a cabo procedimientos de estimulación cerebral profunda que consiste en la colocación de electrodos que estimularán las neuronas dopaminérgicas restantes en la sustancia *nigra* del paciente. (Antonini, et al. 2012).

1.7 Factores de riesgo para la enfermedad de Parkinson

La EP es un desorden asociado a la edad. La prevalencia e incidencia de la enfermedad muestran una fuerte correlación con la edad. La probabilidad de desarrollar la enfermedad aumenta con la edad, sin embargo en las formas familiares se pueden observar edades de inicio más tempranas con aparición de los síntomas antes de los 45 años e incluso, casos juveniles con edades de inicio antes de los 20 años. A la fecha, el proceso de envejecimiento representa el factor más importante para desarrollar la EP (Hindle, 2010).

Se ha demostrado que la exposición a toxinas ambientales aumenta el riesgo de presentar EP. Existen pruebas del daño que pueden causar dichos agentes como la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), un producto secundario en la síntesis de narcóticos que causa parkinsonismo con todos los signos de la EP. MPTP es un inhibidor del complejo I de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. Esta observación fue fundamental para identificar el papel clave de la mitocondria en la patogénesis de la EP. Después se descubrió que varios

insecticidas y algunos solventes también pueden causar disfunción mitocondrial. El papel exacto de los factores ambientales en la patogénesis de la EP es poco claro. Sin embargo, se ha considerado que la correlación de factores ambientales y factores genéticos con el fenotipo celular son piezas clave en la EP (Paul, et al. 2013).

Se han asociado polimorfismos de múltiples en genes como *GBA*, *MAPT*, *MC1R*, *ADH1C*, genes de la familia *HLA* y existe evidencia de que algunas mutaciones mitocondriales también pueden contribuir al desarrollo de la EP. Cada uno de estos factores independientes puede tener un efecto modesto en el desarrollo de la enfermedad pero en conjunto pueden tener un efecto acumulativo (Paul, et al. 2013).

1.8 Genes asociados con la enfermedad de Parkinson

Los estudios recientes de casos y controles han confirmado que la EP es más frecuente en los parientes de los afectados comparándolos con controles pareados por edad y género. En general, el riesgo relativo en familiares de primer grado incrementa 2 a 3 veces para el desarrollo de la EP de inicio tardío y hasta 14 veces para la EPIT comparado con el riesgo de la población general (Kurz, et al. 2003; Myrheet al. 2008).

En los estudios en gemelos se ha visto que la concordancia es alta para pacientes con EP que inician antes de los 50 años, lo que sugiere que el factor genético es importante al menos en los casos de inicio temprano de la enfermedad. Existen también numerosos reportes de agregación familiar de EP sin un patrón de herencia definido y una menor proporción de casos familiares con un patrón de herencia autosómico dominante o autosómico recesivo (5-10% del total de los casos).

Actualmente se han identificado varias mutaciones génicas y regiones cromosómicas asociadas a la presentación de formas de EP monogénicas (Tabla 1). Los genes causantes de formas monogénicas de EP con patrones de herencia autosómico dominante son *SNCA*, *UCHL1* y *LRRK2*, y los genes asociados con EP con herencia autosómica recesiva son *PARK2*, *DJ1* y *PINK1* (Tabla 1). Clínicamente, los casos familiares son indistinguibles de los casos esporádicos (Scarciolla, et al. 2007).

Se han detectado diferentes tipos de mutaciones (Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), deleciones o inserciones y rearrreglos estructurales en los genes asociados con EP. Los rearrreglos estructurales se han encontrado en algunos de los *loci PARK*, como *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ-1* y éstos pueden variar de tamaño afectando solo un exón, abarcar varios exones o al gen completo (Nishioka, et al. 2006).

Tabla 1. *Loci* PARK asociados con la enfermedad de Parkinson

EP Autosómica dominante		
<i>Locus</i>	Gen	Localización
PARK1/ PARK4	SNCA	4q22.1
PARK5	UCHL1	4p14
PARK8	LRRK2	12q12
PARK11	GIGYF2	2q37
PARK13	HTRA2	2p12
PARK17	VPS35	16q12
PARK18	EIF4G1	3q27
EP Autosómica Recesiva		
<i>Locus</i>	Gen	Localización
PARK2	PARK2, Parkina	6q25.2-q27
PARK6	PINK1	1p36
PARK7	DJ1	1p36
PARK9	ATP13A2	1p36
PARK14	PLA2G6	22q13
PARK19	DNAJC6	1p32
PARK20	SYNJ1	21q22
<i>Loci</i> asociados a EP con genes desconocidos		
<i>Locus</i>	Gen	Localización
PARK3		2p13
PARK10		1p34-p32
PARK12		<i>Locus</i> cromosoma X
PARK15	FBX07	22q11.2-qter
PARK16		1q32

En negritas se muestran los principales genes causales de EP. Modificada de Coppedè, 2012.

1.8.1 SNCA

SNCA es un gen localizado en el cromosoma 4q21, consiste en siete exones, aunque solo los exones 2 al 6 se traducen. El producto de este gen, una proteína de 140 aminoácidos llamada α -sinucleína, se cree que

participa en la liberación de neurotransmisores y en la recuperación de estos a través de vesículas en la neurona presináptica (Ramesh, et al. 2011).

Las mutaciones puntuales en este gen parecen ser una causa rara de EP. En la base de datos de mutaciones para la EP (PDmutDB) se han documentado 27 mutaciones diferentes en este gen. Adicionalmente se han descrito triplicaciones de una región de 2.04 Mb que incluye al gen *SNCA* en familias que presentan enfermedad por cuerpos de Lewy con patrón de herencia autosómico dominante. Esto sugiere que la sobreexpresión de *SNCA* es suficiente para causar la degeneración neuronal con la producción de cuerpos de Lewy (Singleton, et al. 2003).

SNCA fue el primer gen implicado en casos raros con patrón de herencia autosómico dominante debido a mutaciones de sentido erróneo, duplicaciones o triplicaciones. Estos últimos se asocian con casos severos de progresión rápida y signos físicos atípicos que indican neurodegeneración fuera de la sustancia *nigra* (Farrer, et al. 2004). A la fecha se han reportado tres mutaciones de sentido erróneo en este gen: p.A53T, p.A30P y p.E46K. De ellas la mutación p.A30P es la más frecuente para mutaciones en la secuencia de este gen (Singleton, et al. 2003).

1.8.2 PARK2

El gen *PARK2* se ubica en el sitio frágil común (CFS) *FRA6E* del cromosoma 6q25.2-q27, está constituido por doce exones y codifica para la proteína Parkina. Esta proteína tiene actividad de ligasa de ubiquitina E3 y se le considera gen supresor de tumores. En la base

PDmutDB (<http://www.molgen.vib-ua.be/PDMutDB>) se han documentado 214 mutaciones diferentes en este gen. Originalmente las mutaciones en este gen se describieron como las causales de EPIT. Actualmente las mutaciones heterocigotas somáticas en *PARK2* se han asociado al desarrollo de otras enfermedades como cáncer, lepra, autismo, diabetes tipo 2 (Kay, et al. 2010).

Algunos de los casos con mutación en este gen recesivo son heterocigotos simples, por lo que resultan difíciles de interpretar, ya que no se sabe si la presencia de un solo alelo mutado es suficiente para causar la EP, aumenta el riesgo o disminuye la edad de inicio. Las mutaciones en *PARK2* son las más comunes en la EP (explican 18% de los casos esporádicos y 50% de los casos familiares) con patrón de herencia autosómico recesivo. Como parte de la vía ubiquitina proteosoma, parkina puede proteger a las neuronas contra el estrés oxidante, toxicidad por α -sinucleína y disfunción del proteosoma (von Coelln, 2004). Aproximadamente el 50% de las mutaciones identificadas en este gen son puntuales, detectables por secuenciación. El otro 50% consiste en rearrreglos estructurales como deleciones, duplicaciones y triplicaciones. El alto número de mutaciones estructurales puede explicarse por el hecho de que *PARK2* se localiza en el CFS *FRA6E* (Hendrich, et al. 2004).

Los CFS constituyen segmentos en el genoma susceptibles a inestabilidades cromosómicas. Aunque se conoce poco del papel de los CFS, muchos de los genes en estas regiones tienen una función en los sistemas de respuesta a estrés y en el desarrollo neuronal. El hecho de observar genes altamente conservados evolutivamente en una región inestable sugiere que comparten un papel en la función normal de la célula (Smith, et al. 2006).

Estudios de tomografía por emisión de positrones revelan que las personas portadoras de mutaciones heterocigotas en el gen *PARK2* sin síntomas de EP poseen una actividad disminuida en el transporte de fluorodopa (FDOPA) en la región del estriado. Esto sugiere que estas mutaciones pueden estar asociadas con cambios subclínicos en el sistema dopaminérgico (Hendrich, et al. 2001).

1.8.3 LRRK2

El gen *LRRK2* (12q12-q13.1) consiste de 51 exones y abarca 144275 pb. Se han asociado 21 mutaciones de este gen a EP y causa aproximadamente 7% de los casos familiares de EP (Elliott, et al. 2012).

Este gen codifica para una proteína de 2527 aminoácidos de función desconocida llamada Dardarina que contiene repetidos ricos en leucina, un dominio RAS y un dominio cinasa. Aunque su función fisiológica todavía no se conoce claramente, la presencia de los dominios de GTPasa y cinasa sugieren que la señalización intracelular puede ser una de sus funciones, y la existencia de los dominios de anclaje a otras proteínas apuntan a que Dardarina puede ser la base para la formación de complejos proteínicos (Bosgraaf, et al. 2003).

Las mutaciones claramente patogénicas de *LRRK2*, con segregación confirmada y estudios funcionales que han confirmado su efecto, se localizan en los exones 31, 35 y 41 de *LRRK2*: p.R1441C/G/H, p.Y1699C, p.G2019S ep.I2020T respectivamente, se asocian a EP de inicio tardío. La más común de estas es la mutación p.G2019S cuya presencia se ha reportado en 2% de los pacientes con EP esporádica y

6% de las formas familiares de la enfermedad (Xiromerisiou, et al. 2007).

Existen reportes de variantes diferentes en este gen en poblaciones específicas, como las sustituciones p.A211V y p.K544E en griegos (Xiromerisiou, et al. 2007) y la variante p.R1441G que se ha descrito en 8% de pacientes con EP en población vasca (Paisan-Ruiz, et al. 2004).

La expresión de *LRRK2* con la presencia de la mutación G2019S se relaciona con EP por un aumento en la actividad de cinasa que conlleva a la degeneración neuronal (Bras, et al. 2005).

1.8.4 DJ1

DJ1 está organizado en ocho exones que abarcan 24 kb en 1p36. Los primeros dos exones no codifican y sufren procesamiento alternativo de exones durante la transcripción, el proceso post transcripcional se ve regulado por ambientes de estrés oxidante con velocidades de traducción diferentes, traduciéndose en un producto de 189 aminoácidos. El gen *DJ-1* codifica para una peptidasa que funciona como un regulador positivo para la transcripción de andrógenos dependientes de receptor. También puede funcionar como un chaperón, y un sensor para estrés oxidante que aparentemente protege a las neuronas contra éste y la muerte celular (Bonifati, et al. 2003).

A la fecha, se han reportado 28 mutaciones en PDmutDB y aunque se tienen las descripciones de estas, en general, son muy raras como causa de la EP autosómico recesiva (solo explican 0-1% de los casos de EPIT). Solo algunos pacientes con mutaciones homocigotas para *DJ1* se han descrito, en su mayoría con EPIT. Las mutaciones en este gen se han

asociado con EPIT con patrón de herencia autosómica recesiva (Annesi, et al. 2005)

1.8.5 *GCH1*

GCH1 se ubica en 14q22.1-q22.2, abarca 60.8 kb y consta de 6 exones traducibles para un producto de 250 aminoácidos. *GCH1* codifica para una ciclohidrolasa de GTP, una enzima reguladora de tetrahidrobiopterina, la cual a su vez tiene una función en la síntesis de neurotransmisores de monoamina y óxido nítrico (Romstad, et al. 2003).

Se han encontrado mutaciones con patrón de herencia autosómico dominante asociadas a distonía respondedora a DOPA (DRD). En la EPIT, una porción significativa de pacientes presentan distonía. Existen pacientes de DRD que presentan cuadros con parkinsonismo, el cual puede ser mal diagnosticado como EPIT (Romstad, et al. 2003).

1.8.6 *PINK1*

PINK1 se encuentra localizado en 1p36.12 con un tamaño de 1.8 kb y constituido por 8 exones. El producto de este gen tiene un tamaño de 581 aminoácidos. El gen *PINK* codifica para una cinasa localizada en la mitocondria. Se cree que protege a las células del estrés inducido por disfunciones dentro de la mitocondria. Las mutaciones en este gen causan EPIT con patrón de herencia autosómico recesivo y explican 1-7 % de los casos. Se piensa que la forma en la que protege a la célula es mediante la fosforilación de proteínas mitocondriales y se le involucra en

la eliminación de mitocondrias dañadas por medio de autofagia selectiva con ayuda de *PARK2* (Funuyama, et al. 2008).

Se han reportado 138 mutaciones para este gen en PDMutDB. (<http://www.molgen.vib-ua.be/PDMutDB>)

1.8.7 *ATP13A2*

Se localiza en 1p36. Contiene 29 exones todos codificantes y abarca una longitud de 26 kb. *ATP13A2* codifica para un producto de 1175 aminoácidos. Este gen pertenece a la subfamilia P5 de ATPasas que transportan cationes inorgánicos. Las mutaciones en *ATP13A2* se asocian a síndrome de Kufor-Rakeb y a EPIT. En la literatura, se han descrito múltiples isoformas de *ATP13A2* (Trinh, J y Farrer M, 2013)

1.9 Mutaciones asociadas a enfermedad de Parkinson

En la EP se han documentado numerosas mutaciones en genes causantes de formas mendelianas. La mayoría de los casos de EP son esporádicos y en ellos también se han descrito varios factores de riesgo genéticos de la enfermedad.

1.9.1 Mutaciones de secuencia

Una mutación puntual es la substitución de una base por otra y cuando tiene lugar en regiones codificantes se pueden clasificar por su efecto sobre la secuencia proteica en: sinónimas, sin sentido, de cambio de sentido y mutaciones de ganancia de sentido. También se pueden

encontrar deleciones o inserciones pequeñas que pueden resultar en un cambio en el marco abierto de lectura. Estas mutaciones pueden modificar tanto la función de la proteína, ganancia o pérdida de función, como la regulación de la expresión de la misma (Cox, et al. 2012).

1.9.2 Mutaciones Estructurales

La base genética de varias enfermedades se relaciona con variación en el número de copias (CNV), que generalmente se definen como una ganancia o pérdida de nucleótidos en la secuencia de DNA mayor a 1 kb en longitud que muestra una diferencia en comparación con un genoma de referencia (Lee, et al. 2007). Las CNV varían en tamaño desde 1 kb hasta megabases, de 50 pares de bases a 1 kb se consideran inserciones y deleciones (indel). Al abarcar tamaños tan variables pueden ocupar desde un exón hasta genes completos. Los eventos que originan las CNV incluyen: recombinación homóloga no alélica, transposición de elementos móviles, transposición de pseudogenes, repetidos de bajo número de copias y errores en la replicación, entre otros. Las CNV son la principal fuente de mutaciones con una tasa de aproximadamente 1.7×10^{-6} por *locus*/ meiosis/ generación en comparación a los 1.8×10^{-8} de mutaciones en la secuencia (Lupski, 2007).

Aunque la mayoría de las enfermedades hereditarias se deben a anomalías en la secuencia de DNA de genes específicos (mutaciones puntuales), la deleción o duplicación de genes representa una porción relevante (5%) de todas las mutaciones causales de enfermedades (Stuppia, 2012). La caracterización correcta de deleciones o

duplicaciones en los genes es crucial para un diagnóstico correcto, de hecho si las mutaciones estructurales son completas o parciales pueden producir fenotipos completamente diferentes dependiendo del gen en el que residan. Una duplicación de un gen completo puede conducir a una enfermedad por la presencia de una copia extra del gen, mientras que una duplicación parcial puede generar la pérdida de función de esa copia, que puede generar enfermedades ya que una copia no puede ser suficiente para mantener la función normal (Stuppia, 2012).

1.10 Técnicas de tamizaje de mutaciones

En un principio la detección de indel se basaba principalmente en el uso de técnicas como *Southern Blot* e hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Sin embargo, ambas consumen mucho tiempo y presentan un rendimiento bajo. La detección de CNV se realizaba con el uso de ensayos arreglos de hibridación genómica comparada (aCGH) validados por otros métodos como genotipificación con microsatélites, PCR cuantitativo u otros ensayos de aCGH con sondas diferentes (Lee, et al. 2007).

Amplificación múltiple de sondas dependientes de ligando (MLPA del inglés *Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*) es una técnica capaz de analizar en una reacción 50 secuencias de DNA para la búsqueda de deleciones y duplicaciones (Schouten, et al. 2002).

En la figura 2 se muestra una comparación de las técnicas más utilizadas en relación a los tamaños de DNA que pueden ser estudiados por estas.

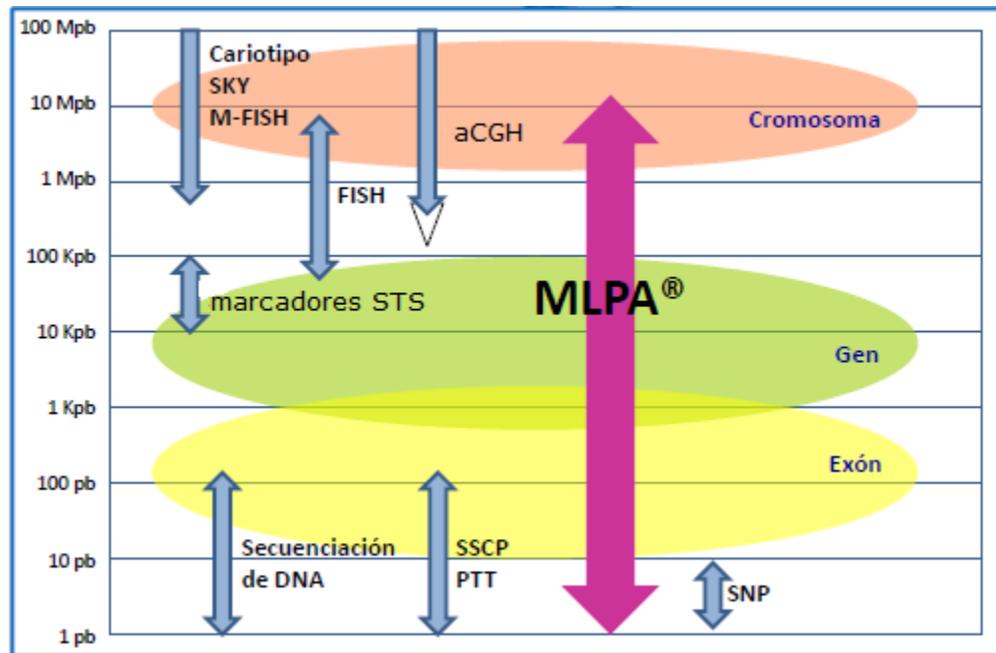


Figura 2. Comparación de técnicas en relación a tamaños de DNA que pueden estudiar. SKY: cariotipificación espectral, M-FISH: FISH multicolor, STS: secuencia de sitios marcados, SSCP: polimorfismo de conformación de cadena sencilla, PTT: prueba de truncamiento de proteína. Imagen modificada de www.mlpa.com.

1.10.1 MLPA

MLPA es la amplificación de sondas múltiple ligadas mediante una reacción de PCR, utiliza sondas específicas para una secuencia diferente de DNA (principalmente exones de un gen de interés), con la cual se obtendrá la cuantificación del número de copias relativo para la secuencia. Las sondas están compuestas por dos medias sondas (5' y 3') las cuales constan de tres partes: una secuencia específica complementaria al blanco a estudiar, una región llamada espaciadora que confiere un tamaño único a cada sonda y una secuencia complementaria a un cebador universal el cual contienen todas las sondas permitiendo la amplificación simultánea de estas. La reacción de

MLPA se puede dividir en cinco pasos: 1) Desnaturalización de DNA e hibridación con las sondas, 2) reacción de ligación, 3) PCR de amplificación, 4) separación de los productos amplificados vía electroforesis capilar, y 5) análisis de datos. En el primer paso el DNA es desnaturalizado e incubado con una mezcla de las sondas. Las dos medias sondas reconocen la secuencia blanco específica e hibridan con esta, en el siguiente paso se agrega una ligasa que, de encontrar complementariedad absoluta después de la hibridación, liga ambas medias sondas y utilizando las sondas ligadas como template se amplifican con una PCR utilizando un solo par de cebadores, uno de ellos marcado con fluorescencia (FAM), gracias a los extremos complementarios a cebadores universales que contienen todas las sondas. Ya que solo las sondas completas, ligadas con la enzima, son amplificadas durante la reacción de PCR la cantidad de producto amplificado es directamente proporcional a las secuencias blanco en la muestra. De existir una delección la cantidad de secuencias blanco será menor y por lo tanto la cantidad de amplicones también y viceversa para las duplicaciones. Los productos de la reacción de PCR son entonces separados utilizando electroforesis capilar en condiciones desnaturalizantes. Cada sonda genera una señal de altura o área bajo la curva gracias al fluoróforo y a su tamaño único dentro del estudio. Las alturas se miden y comparan tanto con controles intra estudio, con sondas para genes de copia única, como inter estudio con controles sanos para determinar la cantidad relativa de secuencia blanco o muestra a analizada. La figura 3 muestra la representación de dos ejemplos de sondas dentro de un estudio de MLPA

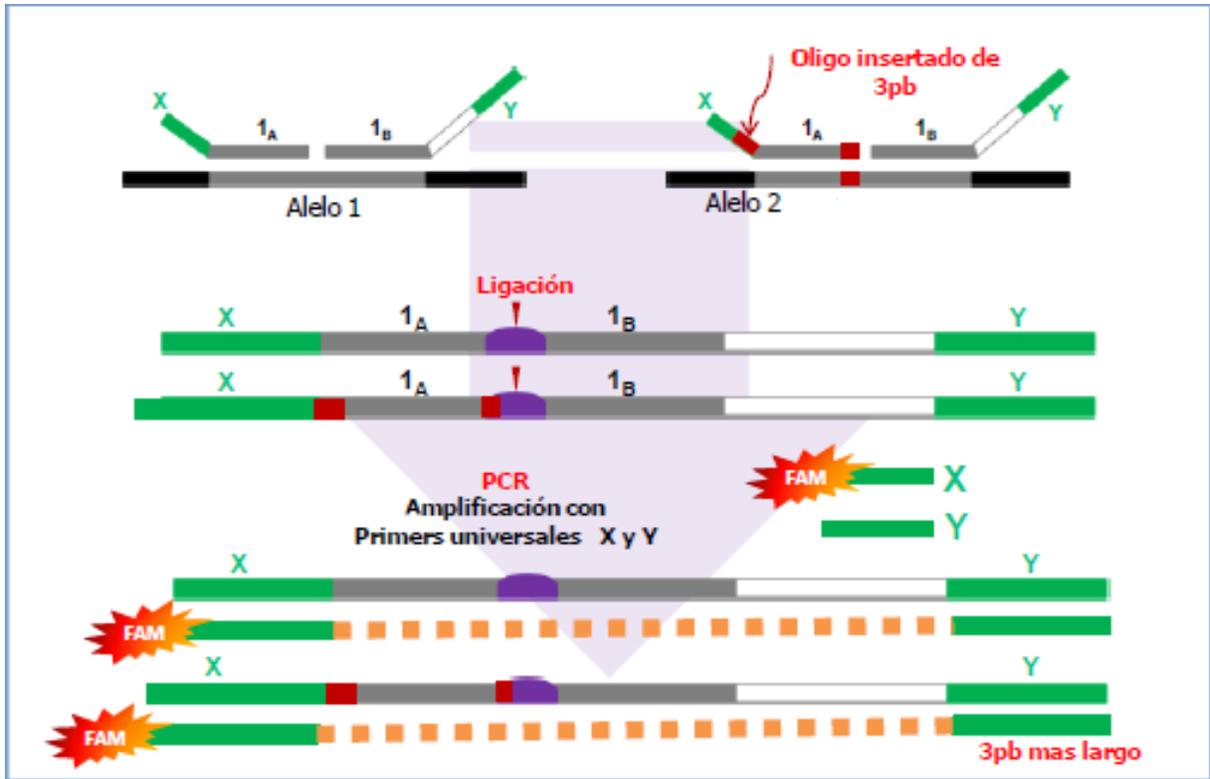


Figura 3. Descripción de la técnica de MLPA desde alineamiento de sondas hasta PCR. Modificada de www.mlpa.com.

1.10.2 Hibridación *in situ* fluorescente

La técnica de FISH consiste en la hibridación de sondas de DNA específicas sobre cromosomas metafásicos, que previamente han sido desnaturalizados como en cualquier reacción de hibridación. Aunque inicialmente se utilizaban preparaciones de metafases, también se puede hacer FISH directamente en núcleos interfásicos, lo que permite detectar anomalías cromosómicas numéricas o estructurales específicas (utilizando sondas específicas) incluso en poblaciones celulares que no pueden dividirse o que no producen buenas metafases. La técnica de FISH utiliza sondas de DNA marcadas con fluorocromos que son

complementarias e hibridan a regiones cromosómicas de interés. Esta técnica se basa en la fijación de DNA desnaturalizado sobre una placa o superficie sólida que se hibridara con una sonda que debe estar marcada con un nucleótido conjugado con un fluorocromo y/o con un hapteno no fluorescente. FISH genera señales de que son captadas con un microscopio y una cámara captura la imagen para después cuantificar la fluorescencia generada (Riegel, 2014).

1.10.3 Otras técnicas

La técnica de CGH permite detectar ganancias o pérdidas de material genético en un DNA prueba cuando se compara con un DNA de referencia y es muy utilizada en la búsqueda de regiones cromosómicas amplificadas o deletadas. Esta técnica necesita del marcaje de fragmentos de DNA genómico tanto de un sujeto control como del sujeto de estudio. El fragmento perteneciente al control es marcado con fluorescencia verde y el del sujeto experimental es marcado con fluorescencia roja. Ambas muestras son utilizadas como sondas para hibridación con cromosomas normales. En regiones sin alteración ambas sondas deben unirse por igual, resultando en la combinación de los colores, generalmente amarillo. Sin embargo, en las regiones modificadas se obtendrán señales verdes o rojas. Con esto se pueden estudiar regiones cromosómicas para identificar alteraciones genómicas (Chial, 2008).

En la tabla 2 se muestra la comparación entre diferentes técnicas de biología molecular que pueden utilizarse para detectar indel, se comparan las ventajas y desventajas que presentan al utilizarlas en estudios de diagnóstico clínico.

Tabla 2 Comparación entre la técnica de MLPA y otra técnicas para detectar duplicaciones y deleciones.

Método	Ventajas	Desventajas
MLPA	<p>Detecta rearrreglos pequeños</p> <p>Capaz de analizar hasta 40 blancos</p> <p>Alto rendimiento</p> <p>Bajo costo</p>	<p>No puede detectar heterocigotos compuestos.</p> <p>No puede detectar mosaicismo,</p> <p>No puede usarse para análisis de una sola célula.</p>
FISH	<p>Detecta rearrreglos balanceados</p> <p>Detecta mosaicismo</p> <p>Puede cuantificar múltiples copias</p>	<p>No puede detectar heterocigotos compuestos.</p> <p>No puede detectar rearrreglos pequeños (>100 kb, <500 Kb)</p> <p>Limitado número de blancos y rendimiento</p>
QPCR	<p>Detecta rearrreglos pequeños y mutaciones puntuales.</p> <p>Puede cuantificar múltiples copias</p> <p>Bajo costo</p>	<p>Estandarización de la prueba y eficiencia</p> <p>Bajo número de blancos</p> <p>Problemas con mosaicismo.</p>
<i>Southern Blot</i>	<p>Detecta rearrreglos pequeños</p> <p>Detecta mosaicismo</p>	<p>No puede detectar heterocigotos compuestos</p> <p>No es cuantitativo</p> <p>Laborioso y tardado</p> <p>Limitado número de blancos y rendimiento</p>
Ensayos aCGH	<p>Puede detectar rearrreglos muy pequeños</p> <p>Puede analizar el genoma completo</p> <p>Bajo costo para la información obtenida</p>	<p>No puede detectar heterocigotos compuestos.</p> <p>Costo alto de equipo y reactivos</p> <p>Bajo rendimiento.</p>

Modificada de (Stuppia, 2012)

1.11 Técnicas de confirmación

Son las técnicas consideradas estándares de oro y que tienen validez por sí solas. Para la confirmación de mutaciones en la secuencia, la secuenciación del DNA es el estándar de oro y para la detección de alteraciones estructurales o de dosis génica se emplea QPCR.

1.11.1 Secuenciación

La secuenciación automática de Sanger se basa en una reacción de PCR utilizando una pequeña porción de dideoxynucleótido trifosfato marcado con fluorescencia que interrumpirá el proceso de extensión de un cebador, dando lugar a cadenas de todas las longitudes posibles, puesto que cada una ha sido interrumpida en una posición distinta; la separación de las cadenas de distintos tamaños y la detección del nucleótido marcado permite deducir la secuencia de la molécula original (Adams, 2008).

1.11.2 PCR en tiempo real

Es una técnica de biología molecular que amplifica secuencias específicas de DNA, usando oligonucleótidos de secuencia específica, gracias a una DNA polimerasa. A diferencia de la PCR tradicional, en la QPCR se utiliza un termociclador equipado con detectores de fluorescencia, la cual será incorporada cada ciclo al producto amplificado, así monitoreando la reacción durante la fase exponencial de

la amplificación se puede determinar la cantidad inicial de DNA blanco. Existen dos métodos para la cuantificación, uno es la construcción de una curva de concentración utilizando diferentes concentraciones de DNA blanco para obtener concentraciones de amplificado directamente proporcionales a la materia prima utilizada, el otro método es la cuantificación relativa donde se utilizan genes monocopia para la amplificación simultánea con el gen de interés y al final realizar la comparación entre ambos. PCR en tiempo real es una herramienta valiosa para la cuantificación de la expresión génica, utiliza un ciclo umbral el cual representa el número de ciclo en el cual la señal de fluorescencia cruza un valor límite asegurando que la amplificación se encuentra en su fase exponencial. El valor umbral es inversamente proporcional a la cantidad de amplificado en la reacción. Existen diversos métodos para reportar la cuantificación en PCR en tiempo real, incluyendo niveles de expresión absoluta y relativa. La cuantificación absoluta representa el número de copias exacto utilizando curvas de calibración. Los resultados se reportan en número de copia por célula usualmente. En cuantificación relativa se obtiene el número de copias en comparación con otro gen utilizado como control interno. En muchos casos la cuantificación relativa es suficiente (SchmittgenyLivak2008).

2.0 Planteamiento del problema

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente, después de la enfermedad de Alzheimer. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), la EP ocupa el cuarto lugar en motivo de consulta. Es una enfermedad que no tiene cura, a la fecha no existen biomarcadores que orienten el diagnóstico y éste es exclusivamente clínico. El único diagnóstico confirmatorio de la EP es el análisis histopatológico postmortem del cerebro del paciente. En las últimas dos décadas se ha descubierto la participación de genes en la etiología de la EP monogénica. Simultáneamente, se han desarrollado técnicas de biología molecular como MLPA que permite tamizar varios genes en una sola reacción y técnicas de confirmación como secuenciación y QPCR. Los marcadores genéticos ofrecen una nueva herramienta de ayuda en el diagnóstico de esta enfermedad. En el departamento de genética del INNN se estudian los factores genéticos de riesgo y causales más frecuentes de la EP.

3.0 Justificación

La técnica de MLPA permite obtener la dosis y las principales mutaciones puntuales en 40 exones de siete genes asociados con EP en una sola reacción. Los pacientes con EP que refieran antecedentes familiares positivos o que presenten una edad de inicio temprana de la enfermedad poseerán un mayor componente genético, comparado con los casos de EP esporádica. Los métodos de secuenciación de Sanger y de QPCR por separado, son laboriosos, requieren de mucho tiempo y el costo de los reactivos es alto. Por ello, existe la necesidad de realizar un tamizaje de mutaciones de una manera rápida y con certeza de diagnóstico, que permite analizar las mutaciones puntuales más frecuentes y las mutaciones estructurales de los principales genes asociados con la EP.

4.0 Hipótesis

La técnica de MLPA podrá utilizarse para tamizaje de mutaciones en *loci PARK* en pacientes con diagnóstico clínico de EP, si los resultados de MLPA son concordantes con los obtenidos por secuenciación y QPCR.

Debido a que se incluyeron casos de EP con antecedentes heredo familiares positivos, varios de ellos presentarán mutación en alguno de los *loci PARK* tamizados por la técnica de MLPA.

5.0 Objetivos

Principal

- Estandarizar la técnica de MLPA para tamizar mutaciones en siete *loci PARK* en pacientes con sospecha clínica de EP.

Secundarios

- Confirmar los resultados obtenidos con MLPA mediante secuenciación de Sanger o QPCR.
- Establecer una correlación genotipo- fenotipo en los casos familiares.

6.0 Sujetos y Métodos

6.1 Pacientes

Para el presente estudio se incluyeron 81 casos índices pertenecientes a 76 familias, 63 casos índices de 63 familias con EP esporádica, 35 familias refirieron antecedentes heredo-familiares (AHF) positivos a EP y 18 casos índices de 13 familias con pacientes de EP familiar con más de un miembro diagnosticado con EP. Todas las valoraciones se realizaron en la consulta externa del INNN. Los pacientes fueron evaluados por al menos dos neurólogos especialistas en desórdenes de movimiento. El grupo de pacientes estaba conformado por 47 mujeres y 34 hombres, en un rango de edad entre 5 y 81 años. Los pacientes firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo A) dentro de un protocolo de investigación aprobado por el comité de ética y de investigación del instituto.

6.1.1 Criterios de inclusión

Pacientes de población mestizo mexicano (MM), que refieran historia familiar positiva para EP o que presento una edad de inicio temprana de la enfermedad (antes de los 45 años de edad) y que aceptaran participar en el estudio de manera voluntaria y firmaran carta de consentimiento informado.

6.1.2 Criterios de exclusión

Pacientes con EP de nacionalidad extranjera.

Pacientes que no aceptaran participación voluntaria en el estudio.

6.2 Controles

Siguiendo el protocolo del fabricante (MRC[®]- Holland) se incluyó un control por cada siete pacientes, todos aparentemente sanos y sin referir antecedentes de enfermedades neurodegenerativas, pertenecientes a población MM y que también firmaron carta de consentimiento informado para su participación voluntaria en el estudio (Anexo B).

Ambas muestras (paciente y control) fueron tratadas de la misma manera.

6.3 Tipo de muestra

Las muestras de DNA de pacientes y controles se obtuvieron de saliva en un juego de reactivos de recolección Oragene[™] siguiendo las instrucciones del proveedor y de sangre periférica por venopunción recolectada tubos Vacutainer[™] con citrato de sodio (22 mg/ml) como anticoagulante.

6.4 Extracción de DNA

Las extracciones de DNA se realizaron de manera diferente dependiendo de la muestra biológica obtenida de los pacientes. El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría en un equipo Nanodrop® y se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador Tris 89 mM, ácido Bórico 89 mM, Ácido Etilendiamino Tetracético (EDTA) 2mM (TBE) 10X pH 8.08.

Todas los DNA se trabajaron en diluciones a una concentración final de 30 ng/ μ L en una solución amortiguadora de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.2 + 0.1 mM EDTA).

6.4.1 Extracción a partir de sangre periférica

A un volumen de sangre obtenida se agregan 3 volúmenes de BLGR (NH₄Cl 0.155 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4) en un tubo cónico de 15 mL. Esta mezcla se homogenizó por inversión y se centrifugó a 3000 RPM por 6 minutos. Durante este tiempo el BLGR somete a las células a un choque osmótico con el EDTA funcionando como quelante del hierro del grupo hemo de los eritrocitos. El proceso se repite hasta obtener las células blancas con el menor número de eritrocitos posibles. Enseguida al paquete de células blancas se le agregaron 570 μ L de NaCl 5 mM y se agitó por dos minutos. Posteriormente se agregaron 40 μ L de SDS 10% v/v y se agitó por 5 minutos. A la mezcla se le adicionaron 200 μ L de NaCl 7 M agitando por 10 minutos. Se centrifugó la mezcla a 11500 RPM por 20 minutos a una temperatura de 4°C. La primera solución de NaCl provoca una turgencia celular y la posterior ruptura de las membranas, el SDS actúa como detergente creando micelas con las membranas lipídicas, la solución de NaCl saturada propicia la precipitación proteica dejando el DNA en solución. Una vez concluida la centrifugación se separó el sobrenadante al que se le agregaron 600 μ L de una mezcla alcohol cloroformo:

isoamílico en relación 49:1 y se centrifugaron a 14000 RPM por 15 minutos. En este paso se realizó una extracción orgánica de todos los componentes no polares celulares dejando al DNA en la fracción acuosa la cual se separa terminada la centrifugación. A la fracción acuosa se le agregaron 600 µL de alcohol etílico absoluto y se centrifugó a 14000 RPM por 15 minutos. Al agregar alcohol, el DNA en solución precipitó permitiendo su separación de la mayoría de las sales remanentes. Se realizó un lavado adicional con alcohol etílico al 70% y una centrifugación a 14000 RPM por 15 minutos. Una vez concluido el segundo lavado, la muestra se secó por evaporación al vacío y se resuspendió en 200 µL de agua inyectable.

6.4.2 Extracción de DNA a partir de muestras de saliva

La extracción se realizó utilizando el protocolo incluido en el juego de reactivos de recolección de DNA Oragene™ (*DNA Genotek*). Se modificó el procedimiento con la introducción de extracción orgánica con cloroformo: alcohol isoamílico en relación 49:1, previo a la precipitación de DNA en alcohol etílico absoluto. Este último paso se realizó para una eliminación mayor de componentes celulares no polares.

6.5 Reacción de MLPA

Se utilizaron los paneles comerciales P051 y P052 para el estudio de EP diseñados por el fabricante MRC®- Holland. La composición de éstos se muestra en la tabla 3, también se muestran las sondas control incluidas pertenecientes a genes mono copia.

Tabla 3. Composición de paneles comerciales utilizados para MLPA.

P051	Ambas	P052
<i>PINK1</i> Exón 1,2,3,4,5,6,7,8		<i>GCH1</i> Exón 1, 2, 3, 5, 6b
<i>SNCA</i> Exón 2a, 3 A30P , 4, 5, 6 7b		<i>SNCA</i> Exón 3
<i>PARK2</i> Exón 1,2,3,4r,5r,6,7,8,9,10,11,12		<i>PARK2</i> Exón 1 (<i>PACRG</i>), 2, 3r, 4, 5, 6 (13nt después del exón), 7, 8r, 9, 10r, 11, 12
	<i>LRRK2</i> Exón 41 G2019S	<i>LRRK2</i> Exón 1, 2, 10, 15, 27, 41, 49
<i>PARK7 (DJ1)</i> Exón 1b, 3 (<i>TNFRSF9</i>), 3, 5, 7		<i>UCHL1</i> Exón 1, 4, 5, 9
		<i>CAV1</i> Exón 3
<i>ATP13A2</i> Exón 2, 9		<i>ATP13A2</i> Exón 14 28
Controles mono gen		
Localización	Gen	
5q31	<i>IL5</i>	
10p14	Keratina 8	
3p22	Receptor peptido intestinal vasoactivo	
8q13	Sulfatasa 1	
1p36	Receptor GABA	
4q35	FSH	
2p16	factor de coagulación 10	
11q13	ciclina D1	

Se muestran las sondas incluidas en cada panel comercial. (*SNCA* exón 3 p.A30P y *LRRK2* exón 41 p.G2019S) y controles incluidos.

La reacción de MLPA se realizó siguiendo el protocolo general publicado por el fabricante para la técnica de MLPA (MRC-Holland, 2011). Modificando los volúmenes de reacción como se muestra en la tabla 4

Tabla 4. Modificación de volúmenes para reacción de MLPA

Reactivo	Volumen (μ l)
Hibridación	
Solución amortiguadora de hibridación	0.75
Mezcla de Sondas	0.75
Ligación	
Solución amortiguadora A	1.5
Solución amortiguadora B	1.5
Ligasa	0.5
Agua	12.5
PCR	
Cedabores universales	1
DNA Polimerasa	0.25
Agua	3.75

6.6 Electroforesis capilar

Se realizó en un equipo de *Applied Biosystems*[®] modelo 3130 utilizando 1 μ L de reacción de PCR, 0.2 μ L de estándar de tamaños LIZ 500 y 8.8 μ L de formamida. Se desnaturalizó a 80°C por dos minutos y se descendió la temperatura rápidamente a 4°C. Se utilizó un arreglo de cuatro capilares de 50 cm de longitud y polímero POP7. Las condiciones de corrida fueron voltaje de inyección: 1.6 kV; tiempo de inyección: 15

s; voltaje de corrida: 10 kV; tiempo de corrida: 2500 s. Los datos crudos se visualizaron con el programa *GeneMapper v5.0*.

6.5 Análisis de datos con el programa Coffalyzer.net

Los datos obtenidos de la electroforesis capilar se analizaron con el programa *Coffalyzer.net*. El programa consta de dos partes para la interpretación de resultados: La primera llamada *Size Calling* hace la comparación entre tamaños teóricos y los tamaños obtenidos experimentalmente, ambos en pares de bases, para etiquetar cada sonda con la región génica asignada a dicho tamaño. El programa cuenta con un margen de más menos tres nucleótidos para la búsqueda de sondas y la asignación de etiquetas.

La segunda parte en la interpretación de resultados es la asignación de dosis relativa. Para llevar a cabo esto se analizan controles sanos, uno por cada siete pacientes por recomendación del fabricante, las señales de fluorescencia obtenidas serán denominadas como dosis normal, dos pares de copias, con un valor arbitrario de uno, con una desviación estándar de más menos 0.3, obteniendo un rango de valores de dosis normal de 0.7 a 1.3. Las muestras de los pacientes se comparan con los de los controles, La obtención señales de fluorescencia inferiores son denominados como deleciones y señales superiores como duplicaciones.

6.5 Análisis de resultados.

De los productos separados mediante electroforesis capilar se obtienen gráficos o electroferogramas de datos crudos con el tamaño en pares de bases en el eje de las X y valores arbitrarios de emisión de fluorescencia en el eje de las ordenadas (Y). Un ejemplo de los resultados crudos de electroforesis capilar realizada a un control, femenino (CT 208) con el panel P051. Se observa la amplificación de 43 sondas para *loci PARK*, 9 sondas controles y señales de control de calidad: cantidad de DNA (Q), Desnaturalización de DNA (D), sondas específicas a cromosomas X y Y. se muestra en la figura 4.

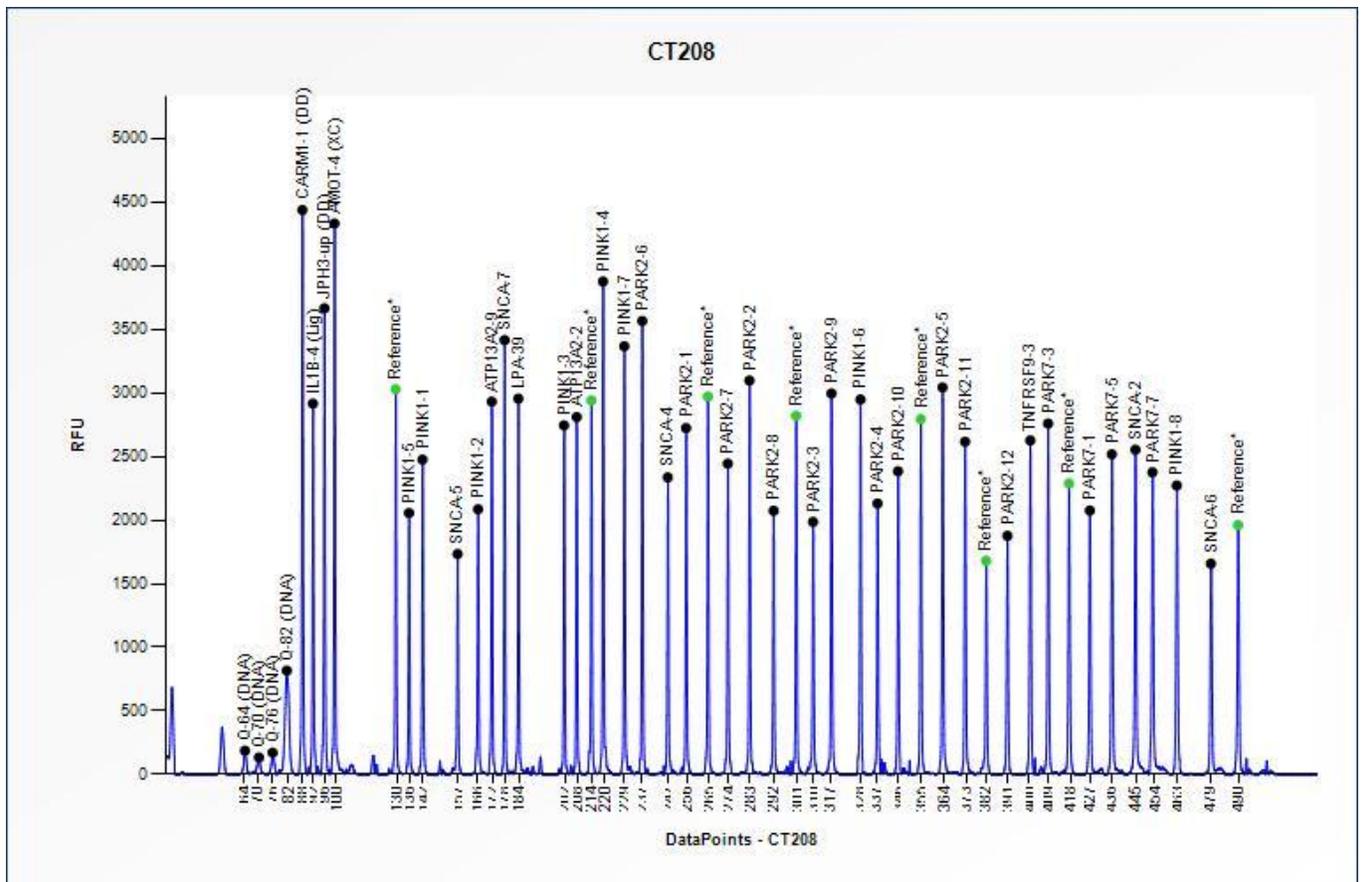


Figura 4. Datos crudos de la electroforesis capilar de la reacción.

El programa *Coffalyzer.net* realiza la identificación de las sondas dependiendo de su tamaño en pares de bases. La técnica se basa en una cuantificación comparativa por lo que son necesarios los controles, las señales obtenidas de éstos son asignadas a valores de 1 ± 0.3 que representan la dosis normal de dos copias de un gen. Después se compararon estos valores con las señales obtenidas en los pacientes. En los casos con deleciones se obtuvieron valores menores a 0.7 y en casos con duplicaciones se obtuvieron valores superiores a 1.3. Una vez que se analizaron todas las sondas y se les asignaron valores comparativos de dosis génica se pudo construir un diagrama de dosis con los valores relativos a la cuantificación en el eje de las ordenadas y las sondas organizadas por gen en el eje de las X. Algunos ejemplos representativos se muestran a continuación (Figuras 5, 6 - 9).

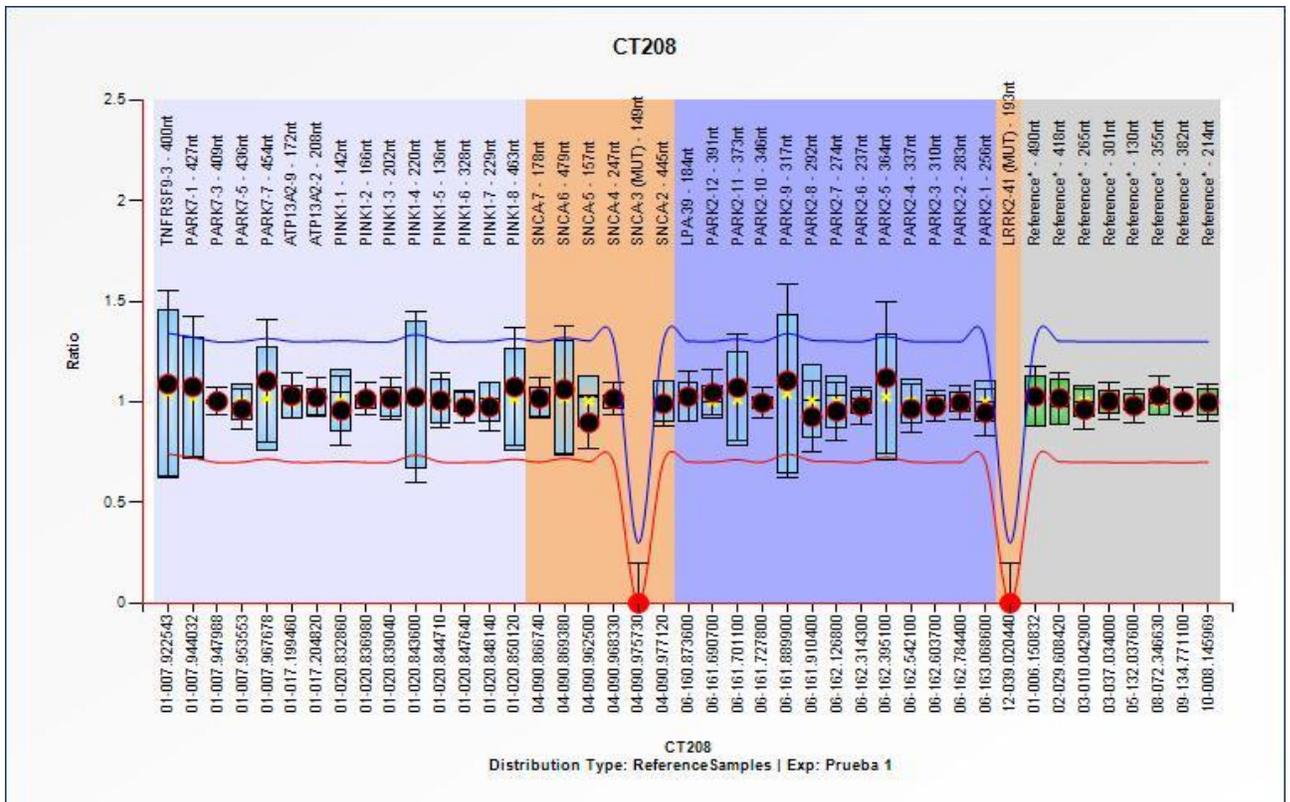


Figura 5. Diagrama de dosis relativa en un control (CT208). Se observa la normalidad en la dosis génica con valores cercanos a 1.0. Los límites inferior y superior están denotados por línea roja y azul respectivamente dentro de los cuales se considera la dosis génica normal.

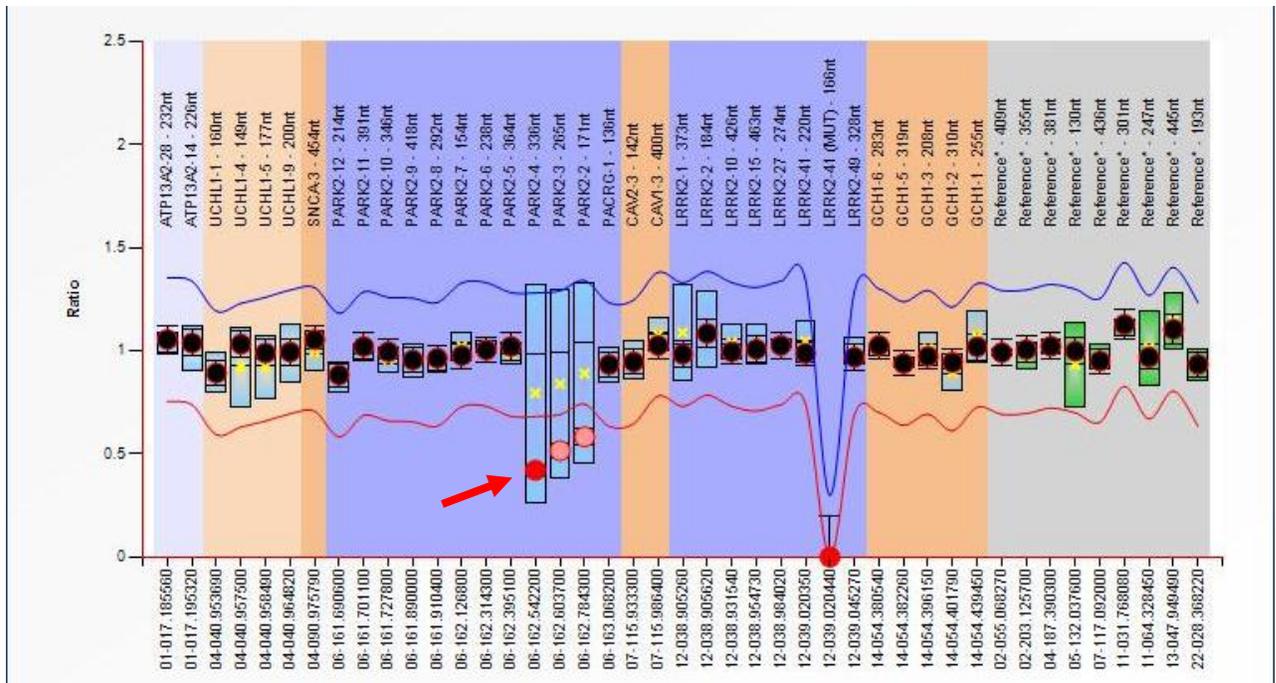


Figura 6. Diagrama de dosis relativa de un paciente con EP (E1). La flecha señala la delección heterocigota de tres exones continuos en *PARK2* (DELEX2-4) en paciente con EP.

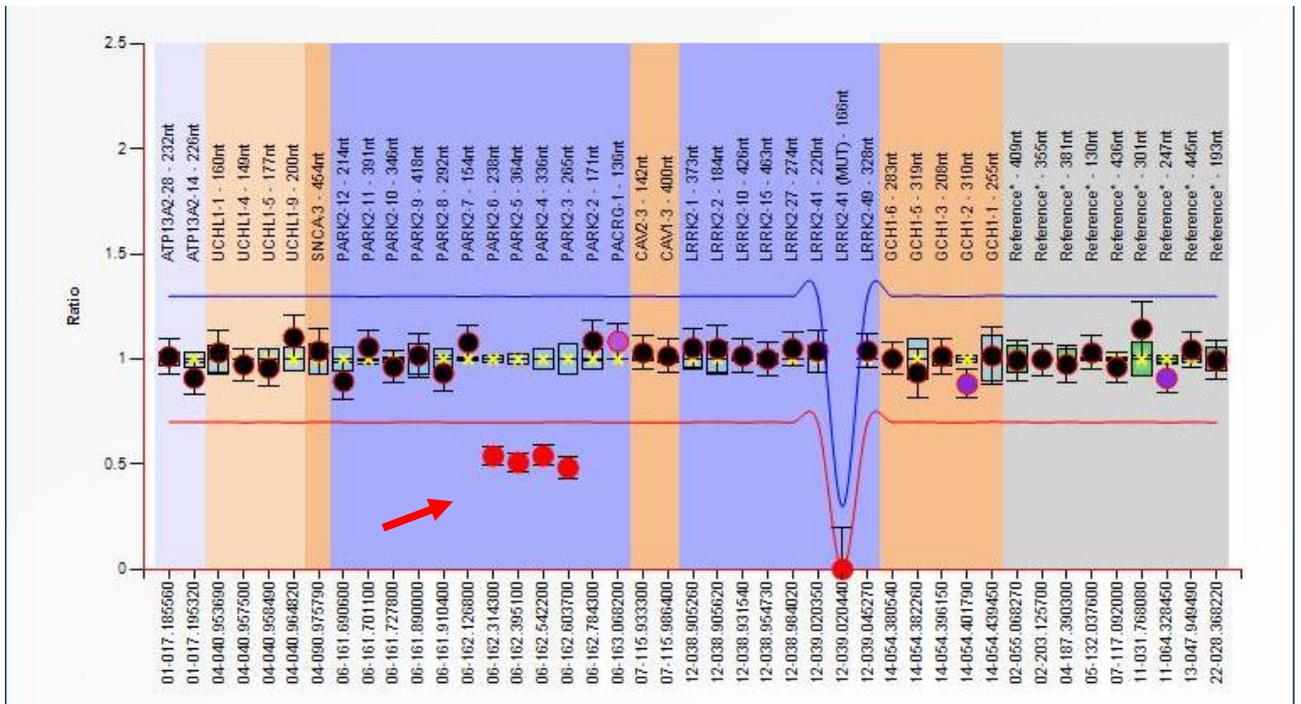


Figura 7. Diagrama de dosis relativa del paciente (E18). La flecha indica la delección heterocigota en cuatro exones contiguos de *PARK2* (EX3-6), caso de EPIT.

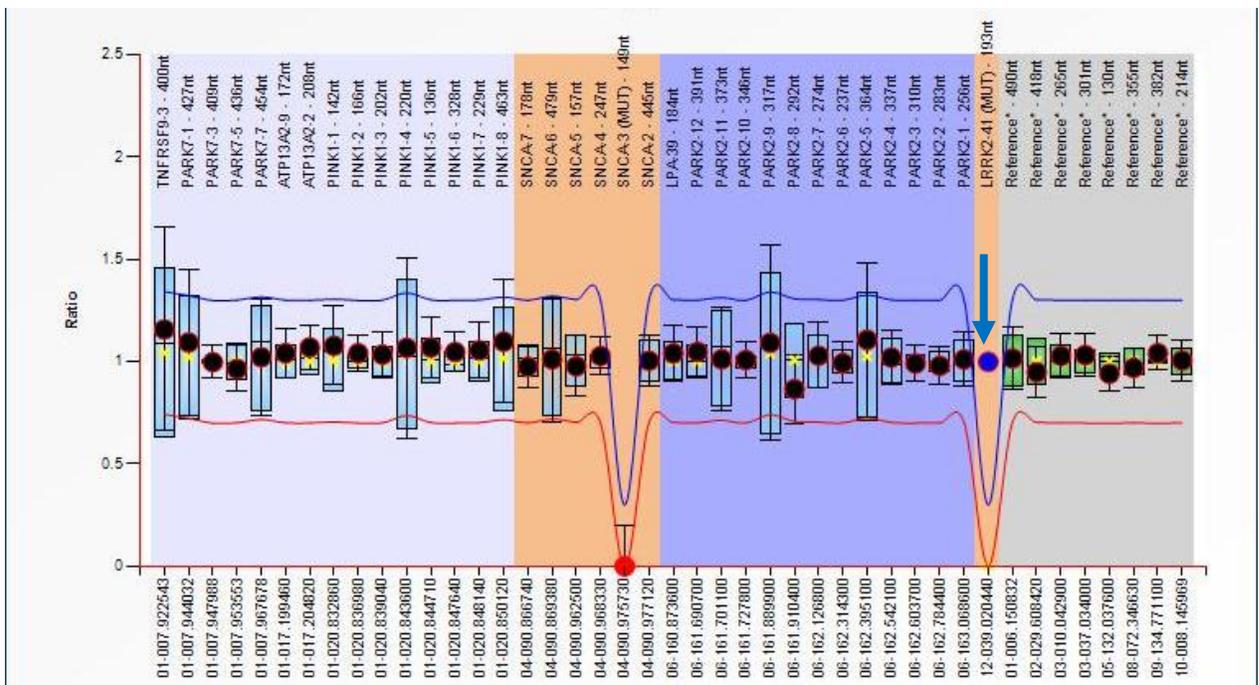


Figura 8. Diagrama de dosis relativa en paciente E2. La flecha señala la presencia de mutación puntual G2019S en el exón 41 de *LRRK2* en estado heterocigoto.

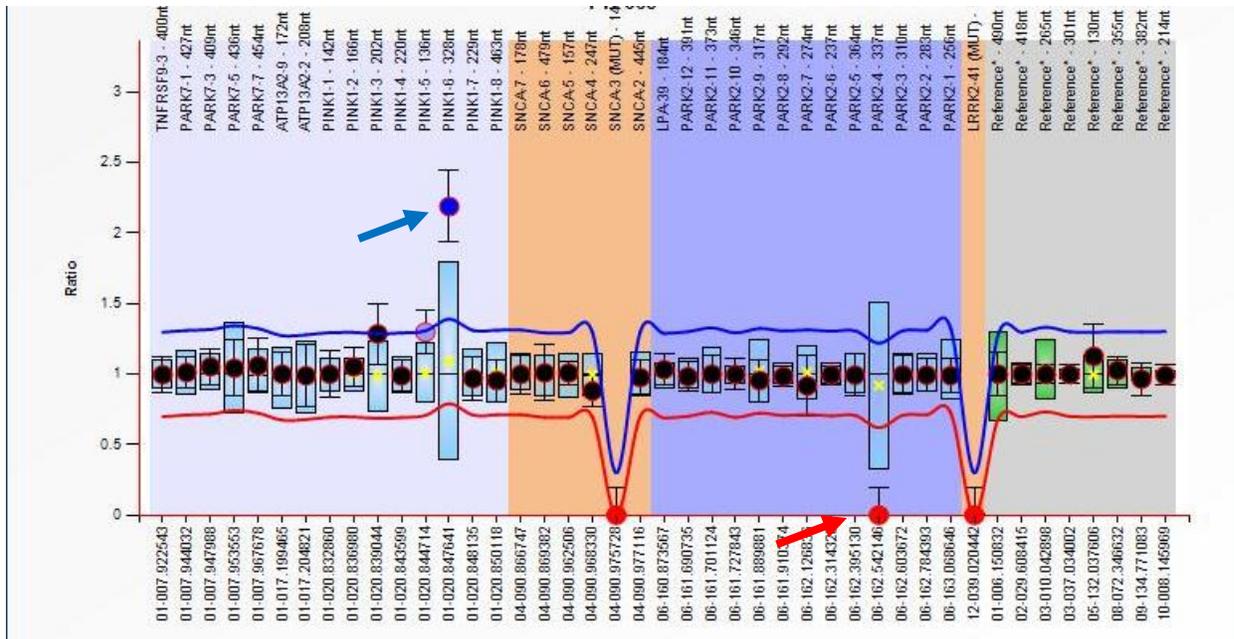


Figura 9. Diagrama de dosis relativa en paciente F2-2 caso con herencia digénica. Las flechas señalan la presencia de mutaciones tanto de una duplicación en *PINK1* exón 6 en estado homocigoto como una deleción en *PARK2* exón 4 también en estado homocigoto.

7.0 Confirmación de los resultados por QPCR y secuenciación directa

Los resultados positivos para mutaciones estructurales se confirmaron mediante QPCR por triplicado en un mínimo de dos ensayos independientes con un método de cuantificación relativa utilizando el gen de la *RNAsa P* como control endógeno.

Las mutaciones puntuales se confirmaron por secuenciación automatizada de Sanger y la mutación p.G2019S de *LRRK2* con la técnica de discriminación alélica.

8.0 Resultados

Los ochenta y un pacientes analizados se dividieron en dos grupos: casos esporádicos y familiares. Consideramos un paciente esporádico cuando no refería familiares afectados o éstos no se encontraban dentro del programa de pacientes con EP del INNN. Las familias analizadas contaban con más de un miembro como paciente del instituto y con diagnósticos para EP.

8.1 Resultados globales

La tabla 5 contiene los resultados globales de los sesenta y tres pacientes esporádicos y los dieciocho casos pertenecientes a trece familias.

Tabla 5. Resultados globales de población analizada

Paciente	P051 (gen/exón)	P052 (gen/exón)	Técnicas de Confirmación	AHF
E1	<i>PARK2</i> 2,3,4	<i>PARK2</i> 2,3,4	QPCR	-
E2	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>LRRK2</i> G2019S	Secuenciación	-
E3	Normal	Normal		+
E4	Normal	Normal		-
E5	Normal	Normal		-
E6	Normal	Normal		-
E7	Normal	Normal		+
E8	<i>LRRK2</i> G2019S	Normal	Secuenciación	+
E9	Normal	Normal		-
E10	Normal	Normal		+
E11	Normal	<i>LRRK2</i> 27	Por Confirmar	+
E12	<i>SNCA</i> 5	Normal	QPCR	+
E13	Normal	Normal		+
E14	Normal	Normal		-
E15	Normal	Normal		-
E16	Normal	Normal		-
E17	Normal	Normal		-
E18	<i>PARK2</i> 3,4,5,6	<i>PARK2</i> 3,4,5,6		-
E19	Normal	Normal		+
E20	Normal	Normal		-
E21	Normal	Normal		+
E22	Normal	Normal		
E23	Normal	Normal		-
E24	Normal	Normal		-
E25	<i>PARK2</i> 5	<i>PARK2</i> 5	QPCR	+
E26	Normal	Normal		+
E27	Normal	Normal		+
E28	Normal	Normal		+
E29	Normal	Normal		+
E30	Normal	Normal		+
E31	Normal	Normal		+
E32	Normal	Normal		+
E33	Normal	Normal		-

Paciente	P051 (gen/ exón)	P052 (gen/ exón)	Técnicas de Confirmación	AHF
E34	<i>PARK2</i> 7	<i>PARK2</i> 7	QPCR	-
E35	<i>PARK2</i> 7	<i>PARK2</i> 7	QPCR	+
E36	<i>SNCA</i> - 5	Normal	QPCR	+
E37	Normal	Normal		+
E38	Normal	Normal		+
E39	Normal	Normal		+
E40	Normal	Normal		-
E41	Normal	Normal		-
E42	Normal	Normal		-
E43	Normal	Normal		+
E44	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>LRRK2</i> G2019S	Secuenciación	+
E45	Normal	<i>PARK2</i> 9		+
E46	Normal	Normal		-
E47	<i>PARK2</i> 3	<i>PARK2</i> 3	QPCR	-
E48	Normal	Normal		-
E49	Normal	Normal		-
E50	Normal	Normal		+
E51	Normal	Normal		-
E52	Normal	Normal		+
E53	Normal	Normal		+
E54	<i>PARK2</i> 12	Normal	QPCR	+
E55	Normal	Normal		-
E56	<i>PARK2</i> 4	<i>PARK2</i> 4	QPCR	+
E57	Normal	Normal		+
E58	Normal	Normal		+
E59	Normal	Normal		+
E60	<i>PARK2</i> 2,3,9	<i>PARK2</i> 2,3,9	QPCR	-
E61	Normal	Normal		+
E62	Normal	Normal		+
E63	Normal	Normal		-
F1-1	Normal	Normal		+
F2-1	<i>PINK1</i> 6/ <i>PARK2</i> 4	<i>PARK2</i> 4	QPCR	+
F2-2	<i>PINK1</i> 6/ <i>PARK2</i> 4	<i>PARK2</i> 4	QPCR	+
F3-1	<i>PARK7</i> 5	Normal	QPCR	+

Paciente	P051 (gen/exón)	P052 (gen/exón)	Técnicas de Confirmación	AHF
F4-1	<i>SNCA7</i>	Normal	QPCR	+
F5-1	<i>PARK2 12</i>	Normal	QPCR	+
F6-1	Normal	Normal		+
F7-1	Normal	Normal		+
F7-2	Normal	Normal		+
F7-3	Normal	Normal		+
F8-1	Normal	Normal		+
F9-1	Normal	Normal		+
F10-1	Normal	Normal		+
F11-1	<i>PARK2 4,5</i>	<i>PARK2 4,5</i>	QPCR	+
F11-2	Normal	Normal		+
F12-1	Normal	Normal		+
F13-1	Normal	Normal		+
F13-2	Normal	Normal		+

Se presentan los pacientes divididos por tipo de caso, E representa a los casos esporádicos y F casos familiares, el primer número de los últimos es el código asignado a cada familia. Los resultados mostrados se obtuvieron por cada panel comercial de MLPA para la EP, los normales se muestran en verde, deleciones en amarillo, duplicaciones en azul y mutaciones digénicas en gris. La última columna representa el método de confirmación de la mutación utilizado para cada muestra. Para los pacientes esporádicos se muestran antecedentes heredo-familiares referidos por los pacientes.

8.2 Resultados Normales

Los pacientes sin mutaciones estructurales o mutaciones puntuales fueron comparados con bases de datos pertenecientes al departamento de genética del INNN con información de dosis génica. Todos los resultados fueron concordantes con los otros resultados previamente obtenidos por otras técnicas de biología molecular.

8.3 Resultados Positivos

Los resultados positivos obtenidos fueron separados en dos grupos: mutaciones estructurales y mutaciones puntuales para su confirmación. Una vez que fueron confirmados los resultados se compararon con la información clínica de cada caso.

8.4 Mutaciones estructurales

Los resultados positivos fueron confirmados, por QPCR. Los resultados de las confirmaciones se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados confirmatorios para mutaciones estructurales por QPCR

Paciente	Gen	Mutación	Exón	Resultado MLPA	Resultados QPCR	
E1	PARK2	Delección heterocigota	2	0.56±0.03	0.53	
		Delección heterocigota	3	0.49±0.02	0.50	
		Delección heterocigota	4	0.51±0.03	0.52	
E11	LRRK2	Delección heterocigota	27	0.53±0.07	Pendiente	
E12	SNCA	Delección heterocigota	5	0.63±0.32	0.87/0.907/0.945	Falso positivo
E18	PARK2	Delección heterocigota	3	0.53±0.03	0.50	
		Delección heterocigota	4	0.55±0.03	0.59	
		Delección heterocigota	5	0.55±0.07	0.57	
		Delección heterocigota	6	0.54±0.04	0.56	
E25	PARK2	Delección heterocigota	5	0.5±0.08	0.462/0.498/0.538	
E34	PARK2	Delección heterocigota	7	0.51±0.04	0.56	

Paciente	Gen	Mutación	Exón	Resultado MLPA	Resultados QPCR	
E35	<i>PARK2</i>	Deleción heterocigota	7	0.53±0.1	0.608/0.617/0.627	
E36	<i>SNCA</i>	Duplicación heterocigota	5	1.71±0.27	1.031/1.05/1.069	Falso positivo
E45	<i>PARK2</i>	Deleción homocigota	9	0	-/0/-	
E47	<i>PARK2</i>	Deleción homocigota	3	0	0/0/0.008	
E54	<i>PARK2</i>	Deleción heterocigota	12	0.55±0.04	1.068/1.114/1.161	Falso positivo
E56	<i>PARK2</i>	Duplicación heterocigota	4	1.67±0.22	1.587/1.592/1.607	
E60	<i>PARK2</i>	Deleción heterocigota	2	0.55±0.07	0.538/0.585/0.599	
		Deleción heterocigota	3	0.5±0.09	0.489/0.513/0.527	
		Deleción heterocigota	9	0.53±0.11	0.506/0.511/0.524	
F2-1	<i>PARK2</i>	Deleción heterocigota	4	0.52±0.05	0.639/0.651/0.674	
	<i>PINK1</i>	Duplicación homocigota	6	2.13±0.15	1.942/2.058/2.203	
F2-2	<i>PARK2</i>	Deleción homocigota	4	0	-/0/-	
	<i>PINK1</i>	Duplicación homocigota	6	2.19±0.13	2.231/2.347/2.582	
F3-1	<i>DJ1</i>	Duplicación heterocigota	5	1.52±0.14		
F4-1	<i>SNCA</i>	Deleción homocigota	7	0	0.835/0.961/1.076	Falso positivo
F5-1	<i>PARK2</i>	Deleción heterocigota	12	0.55±0.04	0.952/0.968/0.984	Falso positivo
F11-1	<i>PARK2</i>	Deleción heterocigota	4	0.61±1.0	0.671/0.681/0.691	
		Deleción heterocigota	5	0.42±0.04	0.434/0.453/0.479	

La tabla muestra los resultados obtenidos por MLPA en valor numérico con desviación estándar, seguido de los valores obtenidos en la QPCR de la siguiente manera: valor mínimo, valor de dosis y valor máximo. La última columna marca la presencia de falsos positivos.

En la figura 10 se muestra el resultado del ensayo de QPCR para los pacientes F2-1 y F2-2 para el exón 6 de *PINK1*, comparados con un control sano. Se observa la amplificación de un control con dosis 1 (2 copias del gen) valores por encima de 2 para los pacientes, esto representa una duplicación homocigota.

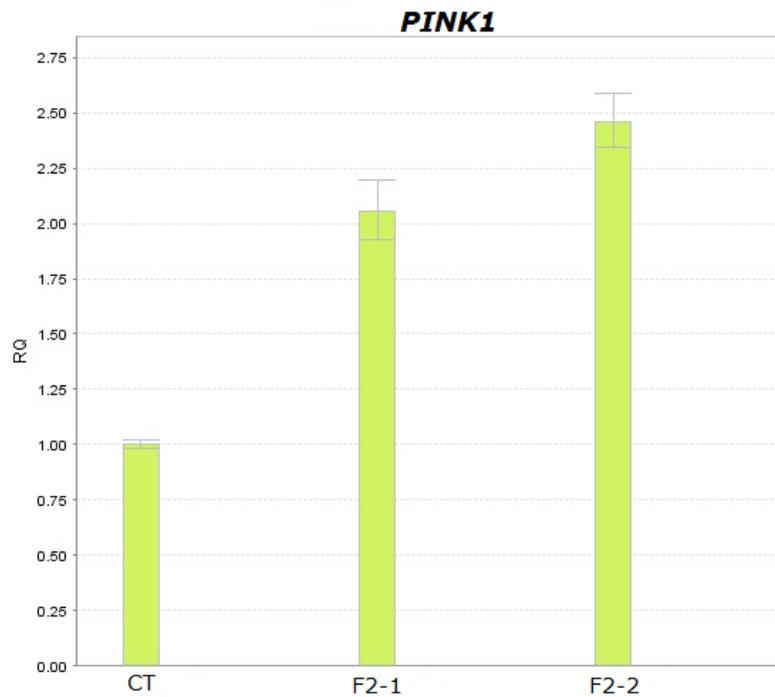


Figura 10. QPCR de exón 6 de *PINK1* a un control (CT) y a los pacientes F2-1 y F2-2

La figura 11 muestra los resultados del ensayo de QPCR para los pacientes F2-1 y F2-2 para el exón 4 de *PARK2*, comparados con un control sano. Se observa la amplificación de control con dosis 1 (2 copias del gen), valores por debajo de 0.70 representa una delección heterocigota para el paciente F2-1 y un valor de cero para la paciente F2-2, lo que significa una delección homocigota.

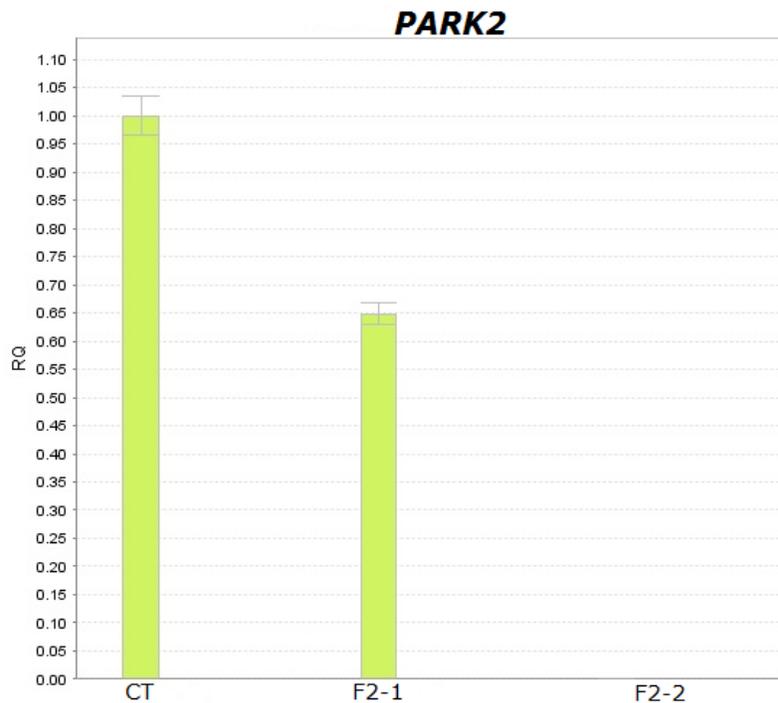


Figura 11. QPCR de exón 4 de *PARK2* a un control (CT) y a los pacientes F2-1 y F2-2

8.5 Mutaciones puntuales

Los resultados positivos para mutaciones de secuencia fueron confirmados por secuenciación y por discriminación alélica. La tabla 7 contiene los casos positivos para mutaciones puntuales.

Tabla 7 Resultados positivos para mutaciones de secuencia.

Paciente	Gen	Mutación	Exón	Confirmación	
E2	<i>LRRK2</i>	p.G2019S	41	Positiva	
E8	<i>LRRK2</i>	p.G2019S	41	Negativa	Falso positivo
E44	<i>LRRK2</i>	p.G2019S	41	Positiva	

La figura 12 muestra la comparación de electroferogramas de paciente (P) con presencia de la mutación p.G2019S en *LRRK2*. Se observa un doble pico (A/G), señalada con una flecha roja y el control (C) sin la presencia de la mutación.

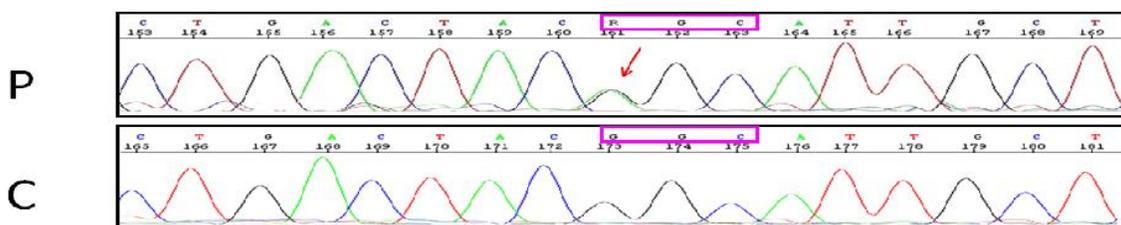


Figura 12. Comparación de electroferogramas obtenidos por secuenciación de Sanger para la búsqueda de la mutación puntual p.G2019S. Comparación entre un control (C) y un paciente (P).

La figura 13 muestra los resultados de un ensayo de discriminación alélica buscando la mutación p.G2019S para *LRRK2* se observa el genotipo homocigoto silvestre G/G en los controles, el genotipo heterocigoto A/G en el pacientes y controles sin negativos (sin DNA) incluidos en el ensayo.

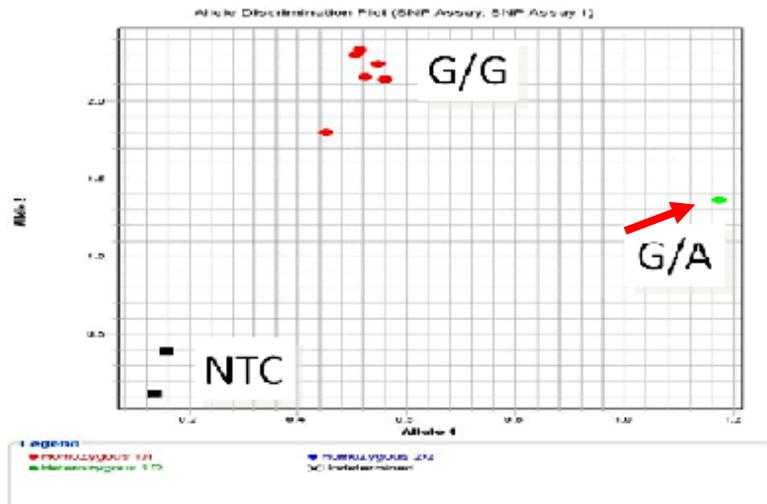


Figura 13 Resultados para ensayo de discriminación alélica. Con una flecha se señala el genotipo heterocigoto del paciente.

8.6 Relación fenotipo- genotipo

La familia 2 tiene dos pacientes afectados como pacientes del INNN con antecedentes heredo familiares positivos, en la figura 14 se muestra el árbol genealógico de dicha familia.

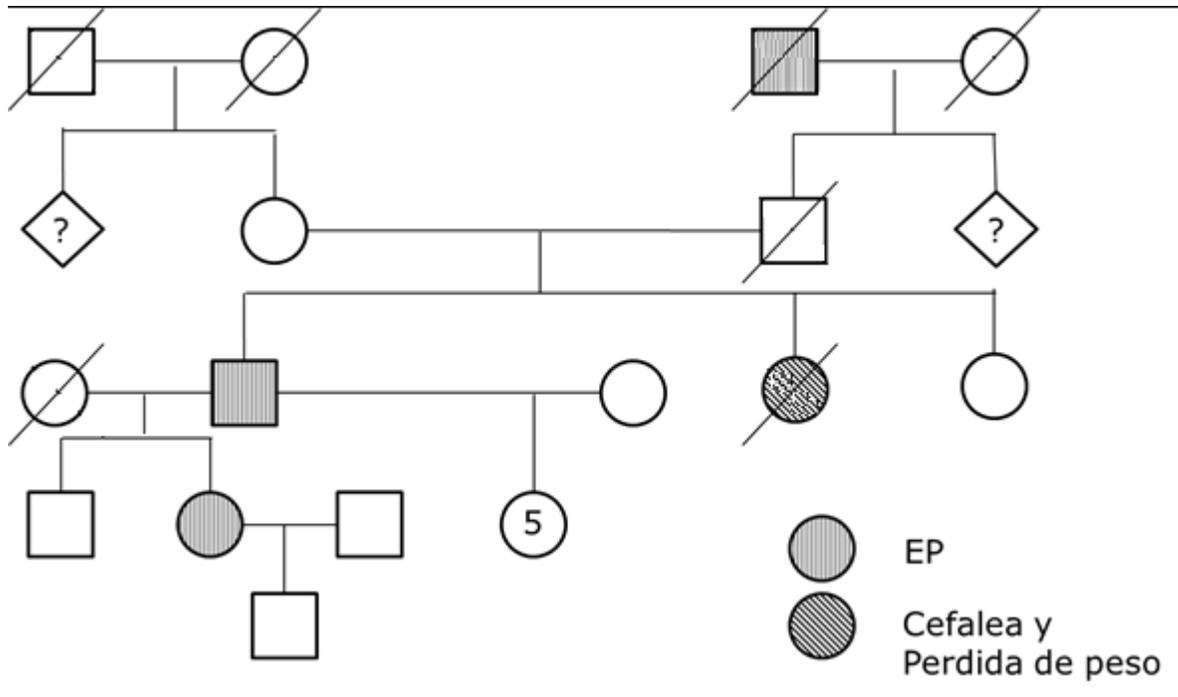


Figura 14. Árbol genealógico de pacientes F2-1 y F2-2. Ambos pertenecen a una comunidad en el estado de Morelos. Se observa un pariente con EP ya fallecido.

De los pacientes con resultados positivos se estudió el historial clínico buscando los principales síntomas de los pacientes y la evolución de la enfermedad. La información obtenida se concentra en la tabla 8.

Tabla 8. Síntomas principales y progresión de los pacientes con resultados positivos.

Gen	Paciente	Mutación	E. I.	T	R	B	Evol	Otros
<i>DJ1</i>	F3-1	EX5DUP	40	X	X	X	14	Distonía, Demencia, Inatención
<i>LRRK2</i>	E2	G2019S	61	X	X	X	3	Inatención
	E11	EX27DEL	45				ND	
	E44	G2019S	43				ND	
<i>PARK2</i>	E1	EX2-4DEL	16	X			13	Distonía
	F11-1	EX4-5DEL	33	X	X		6	Hiperreflexia, alteracion de memoria
	E18	EX3-6DEL	27	X	X		10	Hiperreflexia, alteracion de memoria
	E25	EX5DEL	ND				ND	
	E34	EX7DEL	45	X	X	X	10	
	E35	EX7DEL	ND				ND	
	E45	EX9DEL	42	X	X	X	2	
	E47	EX3DEL	28	X	X	X	7	Distinía, Inatención
	E56	EX4DUP	59	X	X	X	7	Inatención
E60	EX2,3,9DEL	29	X	X	X	3		
<i>PINK1</i>	F2-1	EX6DUP, EX4DEL	39		X	X	12	Inatención, alteracion de memoria
<i>PARK2</i>	F2-2	EX6DUP, EX4DEL	25	X	X	X	4	Hiperreflexia, Inatención

En la tabla se muestran la edad de inicio de los síntomas, la presencia de la triada principal de síntomas para

EP para los pacientes con confirmaciones positivas, T = temblor, R = rigidez, B = bradicinesia. La evolución (Evol) se muestra en años y es el tiempo en el cual el temblor pasó de ser localizado a generalizado o en más de una extremidad. En la última columna se muestran los síntomas no principales pero que son referidos como importantes en cada caso.

9.0 Discusión de resultados

9.1 Genética de la enfermedad de Parkinson

La mayoría de los casos son esporádicos y resultan de la combinación de herencia poligénica, factores ambientales, interacciones entre ambos y el deterioro neuronal resultante del envejecimiento (Coppedè, 2011).

En el Departamento de Genética del INNNMVS se han estudiado diversos factores genéticos causales y de riesgo asociados con a EP. En una muestra de 321 casos con EP se analizó la "región caliente" de mutaciones de *LRRK2* (Yescas, et al. 2010) con frecuencia cercana al 2%. En casos de EP AD, la frecuencia de las mutaciones p.A30P, p.A53T, p.E46K de *SNCA* fue cero (Dávila-Ortiz, et al. 2012). Asimismo, se han estudiado diversos polimorfismos de riesgo de *SNCA* en pacientes con EP y en población sana (manuscrito en preparación). En casos de EPIT se estudió *PARK2*, encontrando un mayor número de mutaciones estructurales (duplicaciones y deleciones) (Guerrero, et al. 2012). También se han analizado los genes recesivos *PARK2*, *PINK1* y *DJ-1* en 125 pacientes con EPIT. En este último trabajo se describieron varias mutaciones digénicas *PARK2/PINK1* y *PARK2/LRRK2* (Monroy-Jaramillo, et al. 2014). Con los antecedentes mencionados, donde la frecuencia de mutaciones estructurales es elevada, se decidió utilizar la técnica de MLPA para el estudio de mutaciones estructurales para los siete principales genes asociados con la EP.

9.2 Discusión de MLPA como técnica de biología molecular

La técnica de MLPA es utilizada actualmente para el estudio de múltiples enfermedades con componente genético como: anemia de Fanconi (Gille, et al. 2012), cáncer de vejiga (Cabello, et al. 2011), desarrollo de tumores cerebrales (Truong, et al. 2012), aneuploidías cromosómicas (Yan, et al. 2011), síndrome de Lynch (Thosi, et al. 2010). Esta técnica ha demostrado ser rápida, barata y ofrece un amplio potencial de resultados; de hecho, en algunos estudios se ha utilizado como método para validar los resultados obtenidos por otras técnicas (Pankratz, et al. 2011).

Un punto crucial en el uso de MLPA para pruebas genéticas de diagnóstico molecular es la interpretación de los datos. En este sentido, las deleciones en estado homocigoto son evidentes por la ausencia de los picos específicos para el blanco particular, en comparación con las muestras de los controles. Por otro lado las deleciones y duplicaciones heterocigotas producen alturas o áreas de los picos diferentes y que pueden modificarse por eficiencias en la PCR y variaciones de muestra a muestra y que son de difícil interpretación. Para la interpretación correcta de los datos se empleó *Coffalyzer.net*, un programa basado en *Excel*, capaz de realizar la normalización y corrección de las señales (Coffa, 2008).

Los límites inferior y superior utilizados son los que el programa establece como normales, en otros experimentos se ha estudiado una población sana para establecer límites específicos de dosis. En este trabajo no se realizó un estudio amplio de controles porque al introducir la técnica se buscaban resultados positivos que pudieran ser confirmados por otras técnicas. La cantidad de falsos positivos se puede

asociar a la falta de controles para el estudio, aunque se usaron los recomendados por el fabricante (1 control por cada 7 pacientes) es evidente que la generación de un banco de puntos de comparación requiere una mayor población de controles analizados. Existen trabajos donde analizan muestras de tamaño pequeño y se observan resultados falsos positivos hasta en 17% de los casos (Yonova-Doing, et al. 2012).

Los valores cercanos al límite inferior (0.7) presentaron una dificultad de análisis porque al estar cerca de la normalidad es difícil determinar si se trata de una delección o de una dosis normal, ya que al tomar en cuenta la desviación estándar esos resultados pudieran estar dentro de la normalidad de la dosis génica.

En el análisis de pacientes con EP ha sido utilizada como técnica principal de tamizaje para el diagnóstico molecular de la enfermedad (Elfferich, et al. 2011; Keyser, et al. 2011).

Mediante la técnica de MLPA comparamos CNV exónicas en muestras de pacientes con EP y su posterior confirmación con QPCR. Sin embargo, al solo estudiar exones se pierde la información que contienen los intrones y las regiones promotoras que se encargan de regular la expresión de los genes. Adicionalmente, sin sondas intrónicas ni estudios de segregación es imposible inferir duplicaciones o delecciones multiexónicas como eventos en cis o trans.

Se han empleado ensayos de aCGH en búsqueda de mutaciones estructurales intrónicas para *SNCA* y *PARK2*, donde no se encontraron diferencias significativas entre controles y pacientes en población caucásica no hispana (Wang, et al. 2013). No se puede descartar la presencia de mutaciones estructurales intrónicas en nuestra población.

Para *PARK2* las variaciones exónicas son más frecuentes y suelen ser de mayor impacto pues modifican la proteína. Para *SNCA* se ha observado la toxicidad debida a la sobreexpresión de la proteína. Podrían realizarse estudios para la búsqueda de este tipo de mutaciones en este gen, ya que hasta el momento no se han encontrado mutaciones causales de EP en *SNCA* en nuestra población.

9.2.1 Limitantes de la técnica de MLPA

Una limitante de la técnica empleada es la calidad y la cantidad de ADN requerida. El fabricante refiere que se pueden lograr resultados utilizando cantidades desde los 20 ng de DNA. En este estudio se utilizaron 150 ng de DNA para obtener resultados confiables y reproducibles, aunque no se realizaron pruebas variando la cantidad de DNA, en los ensayos de muestras con una menor concentración se observaban tamaños de picos menores que comprometían el análisis de resultados al intentar compararlos con otros. El fabricante recomienda analizar solo muestras con el mismo método de extracción y tipo de tejido del cual se obtiene la muestra. Sin embargo, logramos analizar las muestras de saliva y sangre de igual manera pero se tuvo que realizar la modificación al método de extracción de saliva para lograr una concentración de sales y proteínas menor. La mayor limitante en la técnica de MLPA es la calidad del DNA, en este trabajo el problema principal con las muestras de DNA extraídas de saliva fue la presencia de las sales remanentes de la extracción, la reacción de MLPA es más sensible a la presencia de contaminantes y a la degradación de DNA que la PCR convencional. No se analizaron muestras por duplicado de sangre

y saliva, de cualquier manera los resultados fueron analizados de la misma manera sin importar el tipo de muestra con la que se contó.

Otra limitante de la técnica de MLPA es que en ocasiones una delección aparente en un solo exón puede deberse en realidad a un cambio en la secuencia del exón evitando la correcta hibridación de la sonda. Este cambio puede ser una mutación o un polimorfismo. Por ello, en aquellos casos con valores cercanos a los límites debe considerarse la secuenciación de esa región.

En comparación con la técnica de FISH, MLPA no puede utilizarse para estudiar células únicas. En los análisis de MLPA se utiliza una mezcla de células y se obtiene un número de copias promedio en las células (Tabla 2). Al no poder separar células únicas no se pueden analizar diferentes poblaciones celulares dentro de una misma muestra.

9.3 Mutaciones encontradas

De la población de 76 familias incluidas en el estudio se encontraron mutaciones en 15 de ellas (19.73%), incluyendo dos casos índice de una familia con herencia digénica. El gen con mayor número de mutaciones encontradas fue *PARK2*, se encontraron mutaciones en 10 de las familias (13.15%), el siguiente gen en frecuencia de mutaciones fue *LRRK2* con 3.93% de los casos, dos mutaciones puntuales p.G2019S (2.63%) y una delección del exón 27 (1.3%). Las mutaciones en *DJ1* y mutaciones digénicas *PARK2/PINK1* se encontraron en una familia cada una (1.3%).

Seleccionamos a los pacientes en los que sospechábamos que tendrían mutaciones en algún *loci PARK* por presentar síntomas a una edad temprana (<45 años de edad) o pacientes que pertenecían a familias con más de un integrante afectado con un claro patrón de herencia mendeliana. El estudio no se realizó a todos los pacientes con EP porque se buscaban resultados positivos que nos ayudaran a estandarizar la técnica de MLPA y a comprobar la efectividad de la misma confirmando los resultados obtenidos por otras técnicas en búsqueda de resultados falsos positivos y falsos negativos.

Las mutaciones encontradas fueron comparadas con las reportadas en la base de datos PDMutDB (<http://www.molgen.vib-ua.be/PDMutDB>) y la comparación se muestra en la tabla 9

Tabla 9 Comparación entre mutaciones encontradas y resultados en la base de datos PDMutDB.

Gen	Exón	Mutación	Cigosidad	Referencia
<i>DJ1</i>	5	Duplicación	Heterocigota	Macedo, 2009
<i>LRRK2</i>	41	p.G2019S	Heterocigota	Di Fonso, 2005 Bardien, 2010
	27	Delección	Heterocigota	Nueva
<i>PARK2</i>	2-4	Delección	Heterocigota	Amboni 2009
	2,3 y 9	Delección	Heterocigota	Nueva
	3	Delección	Homocigota	Hattori, 1998 Guo, 2010
	3-6	Delección	Heterocigota	Pankratz, 2009
	4	Duplicación	Heterocigota	Hedrich, 2001 Pankratz, 2009
	4-5	Delección	Heterocigota	Pankratz, 2009
	5	Delección	Heterocigota	Hattori, 1998

				Guo, 2010
	7	Delección	Heterocigota	Brüggemann, 2009
	9	Delección	Homocigota	Keyser, 2009
<i>PINK1</i> y <i>PARK2</i>	6 y 4	Duplicación Delección	Homocigota Homocigota	Nueva

9.3.1 Discusión de mutaciones en *PARK2*

La frecuencia de mutaciones encontradas en *PARK2* varía dependiendo de los parámetros utilizados en los estudios. Comparando con un estudio con 5800 pacientes se encontraron mutaciones en *PARK2* en el 8.6% de los casos (Kilarski et al. 2012). En nuestro estudio se encontraron mutaciones en 13.15%, de las cuales 10.52% fueron mutaciones heterocigotas y 2.63% mutaciones homocigotas, el aumento en la frecuencia se puede deber al sesgo en la población estudiada.

PARK2 es considerado un gen recesivo, en donde solo los individuos con ambos alelos afectados presentan EP. La frecuencia de mutaciones homocigotas fluctúa en diferentes poblaciones entre 8.2% en población de Italia (Sironi et al. 2008), 2.7% en población de Corea (Choi et al. 2008), 2.5% población de Polonia (Koziorowski et al. 2009) y 1.4% en población de Australia (Mellick et al. 2009). Comparando con el 2.63% obtenido en nuestro estudio, las frecuencias son similares a las poblaciones reportadas, excepto la italiana.

Aunque no hay duda de que las mutaciones homocigotas en este gen están asociadas con EP, las mutaciones heterocigotas son difíciles de asociar con certeza el impacto en el desarrollo y curso de la enfermedad, sin embargo existen reportes que sugieren que la

haploinsuficiencia de *PARK2* puede aumentar el riesgo de desarrollar EP. Se ha demostrado que la haploinsuficiencia causada por mutaciones estructurales más que la causada por mutaciones de secuencia es un factor de riesgo y se puede asociar a una edad de inicio temprana de la EP (Pankratz, et al. 2009).

En investigaciones previas del mismo equipo de trabajo (Guerrero, et al. 2012) se reporta una frecuencia de mutaciones estructurales de 94.1% (93.7% deleciones y 6.3% duplicaciones), en nuestro estudio las mutaciones en *PARK2* representan el 62.5% (90% deleciones y 10% duplicaciones) de las mutaciones encontradas, es un porcentaje menor debido a las mutaciones encontradas en los otros genes, pero concuerda en frecuencia entre deleciones y duplicaciones. También es congruente con los reportes sobre el comportamiento del gen en otras poblaciones donde se ha encontrado que explica hasta 18% de los casos esporádicos de EP y 50% de los casos familiares de EPIT (Gaweda-Walerych, et al. 2011).

Las mutaciones en *PARK2* que abarcan varios exones continuos fueron consideradas como eventos únicos, pero podrían deberse a mutaciones en estado heterocigoto compuesto. Sin embargo, esto no es posible saberlo con los datos obtenidos por MLPA. Para dilucidar esto, se tendría que realizar el estudio de dosis génica en los progenitores de los afectados y analizar la segregación de las mutaciones. Otra alternativa sería analizar el transcrito del gen afectado en el paciente.

9.3.2 Discusión de mutaciones en *SNCA*

La frecuencia de multiplicaciones en *SNCA* es baja y relativamente rara. Alrededor del mundo se han identificado nueve familias con multiplicaciones de *SNCA*: una triplicación en Iowa, E.U.A. (Farrer, et al. 2004), siete familias con duplicaciones, dos francesas, dos japonesas, una italiana, una coreana y una sudafricana (Chartier-Harlin, et al. 2004; Nishioka, et al. 2006; Fuchs, et al. 2007; Ahn, et al. 2008; Keyser, et al. 2011). Una familia sueco-americana ha sido reportada con duplicaciones y triplicaciones (Fuchs, et al. 2007).

En el presente estudio no se encontraron mutaciones estructurales para *SNCA*. Sin embargo, si se han encontrado algunos polimorfismos de riesgo que junto con otras variables ambientales incrementan el riesgo para el desarrollo de la enfermedad, en población mestiza mexicana (Dávila, 2014, manuscrito en preparación).

9.3.3 Discusión de mutaciones en *LRRK2*

En nuestro estudio el gen *LRRK2* representó el segundo lugar en frecuencia de mutaciones (3.93%). La frecuencia de mutaciones en *LRRK2* varía de población a población; por ejemplo, en población portuguesa representan hasta el 11% de los casos idiopáticos y familiares (Bras, et al. 2005), 20% en judíos Ashkanezi (Ozelius, et al. 2006) y 40% en población árabe del norte de África (Lesage, et al. 2005). En otras poblaciones se calcula una frecuencia de mutaciones en *LRRK2* entre el rango 0-2%. En nuestro estudio las mutaciones en *LRRK2* explicaron 2.47% de los casos, congruente con los resultados

obtenidos por el equipo de trabajo en una publicación previa (Yescas, et al. 2010). En este trabajo se encontró una mutación estructural (delección heterocigota en el exón 27) que no se pudo confirmar por la falta de cebadores específicos para el exón en cuestión. Sin embargo, en la literatura no se han reportado este tipo de rearrreglos por lo que podría ser un falso positivo que será necesario confirmar posteriormente. Analizando la región de complementariedad de las sondas utilizadas para el exón 27 de *LRRK2* se encontró que dentro de esta secuencia se ubican dos mutaciones: una sin sentido (A>G) y una sinónima (A>G), la presencia de alguna de estas podría traducirse en una falsa delección puesto que al no hibridar completamente la sonda no podría ligarse para su posterior amplificación. Como ya se mencionó es necesario confirmar este resultado, no solo analizando dosis génica sino también incluyendo análisis de secuencia del exón 27.

9.3.4 Discusión de mutación en *DJ1*

Las mutaciones en *DJ1* son raras, la frecuencia reportada para mutaciones en este gen es de 0.4% (Kilarski et al. 2012) nosotros solo encontramos una mutación en este gen que representa el 1.3% es un porcentaje mayor debido al tamaño de la población estudiada. Sin embargo en pacientes con mutaciones en este gen se ha descrito que desarrollan demencia y distonía, esto concuerda con los datos clínicos del paciente (tabla 8) (Abou-Sleiman et al. 2003)

9.3.4 Discusión de herencia digénica.

La familia 2 presentó mutaciones digénicas *PARK2/PINK1*, deleción en el exón 4 de *PARK2* y una duplicación en el exón 6 de *PINK1*. La familia pertenece a una comunidad de Morelos con aproximadamente 1000 habitantes. Dentro de su genealogía mencionaron tener un familiar afectado tres generaciones antes, la población de la comunidad en ese entonces debió ser inferior con una mayor probabilidad de estar relacionados, pero niegan consanguinidad. El progenitor F2-1 tuvo una edad de inicio de 39 años, presentó deleción heterocigota y duplicación homocigota. Mientras que su hija F2-2 con edad de inicio de 25 años mostró ambas mutaciones en estado homocigoto. La diferencia en las edades de inicio puede ser por la cigosidad de las mutaciones.

Los pacientes refirieron que la madre era aparentemente sana, en la genealogía mencionaron que ya había fallecido por lo que no se pudo contar con su muestra de DNA. De los resultados moleculares, se infiere que la madre era portadora heterocigota de ambas mutaciones y que debido a que murió joven no tuvo manifestaciones de EP. Se necesita analizar por otras técnicas que nos permitan visualizar ambos cromosomas por separado. Otra opción ya que la muestra de la madre no es posible obtenerla, es obtener muestra de los hermanos de la paciente F2-2 así como de los medios hermanos hijos del paciente F1-1 que se muestran en la genealogía de la familia (figura 14).

En la literatura, se han reportado diferentes combinaciones de herencia digénica en *loci PARK* para EP. Se ha descrito un caso con herencia digénica heterocigota anteriormente con esta misma combinación (Funuyama, et al. 2008). La interacción de *PARK2* y *PINK1* y su

participación en la vía que regula la morfología mitocondrial y su dinámica ya han sido descritos, confirmando su interacción física.

Este es el segundo caso de duplicaciones en *PINK1* que se ha descrito por nuestro equipo de trabajo, anteriormente se publicó el primer caso de duplicación en dicho gen (Monroy, et al. 2014). En nuestro caso familiar, la única diferencia fue la edad de inicio de los síntomas de la EP, el resto de las características clínicas registradas en los expedientes clínicos son muy similares entre los dos pacientes.

9.4 Discusión sobre la inclusión de *GCH1* en el panel de MLPA

Es importante el tamizaje de mutaciones en *GCH1* porque aunque no esté relacionado directamente con EP es de suma importancia descartar la posibilidad de un diagnóstico erróneo en ambos sentidos entre EPIT y DRD. Actualmente no se han reportado pacientes con EPIT con mutaciones puntuales o estructurales en *GCH1* (Cobb et al. 2009). Aunque ambas entidades presentan síntomas de EP como temblores, bradicinesia y distonías, existen otros puntos de diferencia entre ambas enfermedades como la falta de neurodegeneración en la región *nigra* en pacientes con DRD.

No se pudo lograr una relación fenotipo – genotipo, sin embargo en los pacientes que poseen mutaciones en *PARK2* que abarcan más de un exón las edades de inicio de la enfermedad son menores, sin embargo este patrón no es definitivo.

Los resultados obtenidos sirven para emplear MLPA como una técnica de tamizaje para EP.

10.0 Conclusiones

- Se comprobó la utilidad de MLPA como técnica de tamizaje de mutaciones estructurales y las principales mutaciones de secuencia en siete *loci* *PARK* asociados con la EP.
- Los resultados obtenidos por MLPA fueron concordantes con los resultados obtenidos mediante PCR en tiempo real, discriminación alélica y secuenciación. De tal manera que MLPA plantea una estrategia en el laboratorio para el abordaje primario de pacientes con diagnóstico clínico de EP.
- La técnica de MLPA se recomienda utilizarla dentro del proceso básico de búsqueda de mutaciones en pacientes como primer método de tamizaje genético. Los resultados de MLPA fueron confiables y la técnica resultó económica y rápida ya que permitió analizar 40 regiones de siete genes asociados a EP en un solo tubo de reacción. Adicionalmente los resultados que se obtienen de los siete *loci* es útil para encontrar posibles casos con herencia digénica.
- Los resultados de este trabajo ofrecen una estrategia rápida que facilita un diagnóstico confirmatorio de EP junto con un tratamiento y seguimiento adecuados.
- A los pacientes positivos para mutación en *loci* *PARK* y a sus familiares se les brindó asesoramiento genético.
- En los casos estudiados que no presentaron resultado positivo para MLPA, no podemos descartar mutación en la secuencia de los genes analizados.

BIBLIOGRAFIA

1. Adams, J. DNA sequencing technologies. *Nat Ed.* **2008.** 1. 193.
2. Ahn, T. B; Kim, S. Y; Kim, J. Y. alpha-Synuclein gene duplication is present in sporadic Parkinson disease. *Neurol.* **2008.** 70. 43-49.
3. Alves, G; Forsa, E.B; Pedersen, K.F; Gjerstad, M.D; Larsen, J.P. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol* **2008.** 255 (5). 18-35.
4. Annesi, G; Savettieri, G; Pugliese, P; D'Amelio, M; Tarantino, P; Ragonese, P. DJ-1 mutations and parkinsonism-dementia-amyotrophic lateral sclerosis complex. *Ann Neurol.* **2005.** 58. 803-807.
5. Antonini, A; Pilleri, M; Padoan, A; Landi, A; Ferla, S; Biundo, R; D'Avella, D. Successful subthalamic stimulation in genetic Parkinson's disease caused by duplication of the α -synuclein gene. *J. Neurol.* **2012.** 259. 165-167.
6. Autere, J. M; Moilanen J. S; Myllyla V. V; Majamaa K. Familial aggregation of Parkinson's disease in a Finnish population. *J NeurolNeurosurgPsychiatry.* **2000.**69. 107-109.
7. Blocq, P. Marinesco, G. Sur un cas de tremblement parkinsonien hémiplégique symptomatique d'une tumeur du pedoncule cérébrale. *Rev. Neurol.* **1894.**
8. Bonifati, V. Genetics of parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* **2007.** 3 (3). 233-241.

9. Bonifati, V; Rizzu, P; Squitieri, F; Krieger, E; Vanacore, N; van Swieten, J. C; Brice, A; van Duijin, C, M; Oostra, B; Meco, G; Heutink, P. *DJ-1(PARK7)*, a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci.* **2003**. 24. 159–160.
10. Bosgraaf, L. Van Haastert, P. J. Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. *Biochim Biophys Acta.* **2003**. 23. 2423-2433.
11. Bras, J. M; Guerreiro, R. J; Ribeiro, M-H; Januario, C; Morgadinho, A; Oliveira, C. R; Cunha, L; Hardy, J; Singleton, A. G2019S dardarin substitution in a common cause of Parkinson's disease in a Portuguese cohort. *Mov. Disord.* **2005**. 20. 1653-1655.
12. Brissaud, E. Vingt-Deuxième, L. Pathogenie et symptoms de la maladie de Parkinson. Paris. G Masson. **1895**. 469-501.
13. Cáceres, A; Armengol, L; Villatoro, S; González, J.R; MLPAstats: An R GUI package for the integrated analysis of copy number alterations using MLPA data. *BMC Bioinform.* **2011**. 12.
14. Charcot, J.M. Lecture V: On paralysis agitans. In: Lectures on diseases of the nervous system delivered at La Salpetriere. London. New Sydenham Society, **1877**. 129-156.
15. Chartier-Harlin, M C; Kachergus, J; Roumier, C. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet.* **2004**. 364. 1167-1169.
16. Chial, H. Cytogenetic methods and disease: Flow cytometry, CGH, and FISH. *Nat Ed.* **2008**. 1. 76.

17. Choi JM, Woo MS, Ma HI, Kang SY, Sung YH, Yong SW, et al. Analysis of PARK genes in a Korean cohort of early-onset Parkinson disease. *Neurogenetics*. **2008**. 9. 263 - 269.
18. Cobb, S. A; Wider, C, Ross, O. A; Mata, I. F; Adler, C. H; Rajput, A; Rajput, A, H; Wu, R; Hauser, R; Josephs, K. A; Carr, J; Gwinn, K; Heckman, M. G; Aasly, J. O; Lynch, T; Uitti, R. J; Wszolek, Z. K; Kapatos, G; Farrer, M. J. *GCH1* in Early- Onset Parkinson's Disease. *Mov Disord*. **2009**. 24. 2070- 2075.
19. Coffa, J; van der Wiel, M. A; Diosdado, B; Carvalho, B; Schouten, J; Meijer, G. A. MLPAlyzer: Data analysis tool for reliable automated normalization of MLPA fragment data. *Cell. Oncol*. **2008**. 30.323- 335.
20. Cooke, R. History of the method of cure of the various species of palsy (vol. II, Part I) of: A treatise of nervous diseases. London: Longman, Hurst, Rees, Orme and Brown. **1821**. 207.
21. Coppedè, F. Genetics and Epigenetics of Parkinson's disease. *The Sci World J*. **2012**. 2012. 1-12.
22. Cox, M. M; Doudna, J. A; O'Donnell, M. *Molecular Biology Principles and Practice*. Quinta edición; W.H. Freeman & Co: EUA, **2012**. 410-414.
23. Davila-Ortiz, D. J; Alonso-Vilatela, M. A; Monroy-Jaramillo, N; Rodriguez-Violante, M; Lopez-Lopez, M; Yescas-Gomez, P. Detección de mutaciones puntuales en el gen de alfa-sinucleína en pacientes mexicanos con enfermedad de Parkinson y herencia autosómica dominante. *Arch. Neurocién*. **2012**. 17 (II). 17-21.

24. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Parkinson inicial en el primer nivel de atención. México: Secretaría de Salud. **2008.**
25. Elfferich, P; Marja, C; Verleun-Mooijman, J; Maat-Kievit, A; van de Warremburg, B; Wilson, Abdo, W; Eshus, S; Leenders, K; Hovestadt, A; Zijlmans, J; Story, J; van Swieten, J; Boon, A; van Engelen, K; Verschuuren- Bemelmans, C; Lesnik- Oberstein, S; Tassorelli, C; Lopiano, L; Boniati, V; Dooijes, D; van Minkelen, R. Breakpoint mapping of 13 large *parkin* deletions/duplications reveals an exon 4 deletion and an exon 7 duplication as founder mutations. *Neurogen.* **2011.** 12.263- 271.
26. Elliott, D. A; Kim, W. S; Gorissen S; Halliday, G. M; Kwok, J. Leucine-Rich Repeat Kinase 2 and Alternative Splicing in Parkinson's Disease. *Mov Disord.* **2012.** 27. 1004-1011.
27. Fahn, S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann NY Acad Sci.* **2003.**991, 1-14.
28. Farrer, M; Kachergus, J; Formo, L. Comparison of kindreds with familial parkinsonism and α -synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol.* **2004.** 55. 174-79.
29. Farrer, M; Kachergus, J; Forno, L. Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol.* **2004.** 55. 174-179.
30. Fuchs, J; Nilsson, C; Kachergus, J. Phenotypic variations in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. *Neurol.* **2007.** 68. 916-922.

31. Funuyama, M; Liy, Y; Tsoi, T. H; Lam, C. W; Ohi, T; Yazawa, S; Uyama, E; Djaldetti, R; Melamed, E; Yoshino, H. Familial parkinsonism with digenic Parkin and PINK1 mutations. *Mov Disord.* **2008.** *23.* 1461-1465.
32. Gaweda-Walerych, K; Safranow, K; Jasinska-Myga, B; Bialecka, M; Klodowska-Duda, G; Rudzinska, M; Czyzewski, K; Cobb, S. A; Slawek, J; Styczynska, M; Opala, G; Drozdziak, M; Nishioka, K; Farrer, M. J; Ross, O. A; Wszolek, Z. K; Barcikowska, M; Zekanowski, C. *PARK2* variability in Polish Parkinson's disease patients – interaction with mitochondrial haplogroups. *Parkinsonism and Rel Disord.* **2012.** *18.* 520- 524.
33. Guerrero, J. L; Monroy, N; Yescas, P; Rodríguez-Violante, M; Boll, M-C; Alonso, M. E; López, M. High Frequency of Parkin Exon Rearrangements in Mexican-Mestizo Patients with Early-Onset Parkinson's Disease. *Mov Disord.* **2012.** *27. (8).* 1047 – 1051.
34. Hall, M. On the diseases and derangements of the nervous system. London. Bailliere, **1841.**
35. Hedrich, K; Eskelson, C; Wilmot, B; Marder, K; Harris, J; Garrels, J; Meija- Santana, H; Vieregge, P; Jacobs, H; Bressman, S. B; Lang, A. E; Kann, M; Abbruzzese, G; Martinelli, P; Schiwinger, E; Ozelius, L. J; Pramstaller, P. P; Klein, C; Kramer, P. Distribution, type, and origin of Parkin mutations: review and cases studies. *Mov. Disord.* **2004.** *19.* 1146- 1157.
36. Hedrich,K; Kann, M; Lanthaler, A. J; Dalski, A; Eskelson, C; Landt, O; Schwinger, E; Vieregge, P; Lang, A. E; Breakefield, X. O; Ozelius, L. J; Pramstaller, P. P; Klein, C. The importance of gene dosage studies: mutational analysis of the *parkin* gene in

- early-onset parkinsonism. *Hum Mol Gen.* **2001.** 10. (16), 1649-1656.
37. Hindle, J. V. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing.* **2010.** 39. 156-161.
38. Hindle, S; Elliott, C. Spread of neuronal degeneration in a dopaminergic, *Lrrk2*-G2019S model of Parkinson disease. *Autophagy.* **2013.** 9. 1-3.
39. Hofer, A; Berg, D; Asmus, F; Niwar, M; Ransmayr, G; Riemenschneider, M; Bonelli, S. B; Steffelbauer, M; Ceballos, Baumann, A; Haussermann, P; Behnke, S; Krüger, R; Prestel, J; Sharma, M; Zimprich, A; Riess, O; Gasser, T. The Role of α -synuclein gene multiplications in early-onset Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *J. Neural. Transm.* **2005.** 112. 1249-1254.
40. Ibañez, P; Bonnet, A. M; Débarges, B; Lohnmann, E; Tison, F; Pollak, P; Agid, Y; Dürr, A; Brice, A. Causal relation between α -synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet Research Let.* **2004.** 364. 1169-1171.
41. INEGI. Censo de población y vivienda 2010 www.inegi.org.mx (consultado 10 Febrero 2014).
42. Jankowski, S; Currie- Fraser, E; Xu, L; Coffa, J. Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis on capillary electrophoresis instruments for a rapid gene copy number study. *J. Biomol. Tech.* **2008.** 9. 238-243.

43. Kay, D.M; Stevens, C. F; Hamza, T.H. et al. A comprehensive analysis of deletions, multiplications, and copy number variations in *PARK2*. *Neurol* **2010**. 75. 1189-1194.
44. Kilarski LL, Pearson JP, Newsway V, Majounie E, Knipe MD, Misbahuddin A, et al. Systematic review and UK-based study of *PARK2* (parkin), *PINK1*, *PARK7* (*DJ-1*) and *LRRK2* in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*. **2012**. 27. 1522 – 1529.
45. Koller, W, Eds. *Handbook of Parkinson's disease*. 2nd ed. Rev. and expanded. Marcel Dekker: New York. **1992**.
46. Kozirowski D, Hoffman-Zacharska D, Slawek J, Szirkowiec W, Janik P, Bal J, et al. Low frequency of the *PARK2* gene mutations in Polish patients with the early-onset form of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord*. **2009**. 16. 136 – 138.
47. Kurz, M; Alves, G; Aarsland, D; Larsen, J. P. Familial Parkinson's disease: a community based study. *Eur J Neurol*. **2003**. 10. 159-163.
48. Lee, C; Iafrate, A. J; Brothman, A. R. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat. Genet*. **2007**.117.391-398.
49. Lesage, S; Leutenegger, A. L; Ibanez, P; Janin, S; Lohmann, E; Dürr, A; Brice, A.*LRRK2* haplotype analyses in European and North African families with Parkinsons disease: a common founder for the G2019S mutation dating from the 13th century. *Am J Hum Genet*. **2005**. 77. 330-332.
50. Lohmann, E; Thobois, S; Lesage, S; Broussolle, E; Tezenas du Montcel, S; Ribeiro, M-J; Remy, P; Pelissolo, A; Dubois, B;

- Mallet, L; Pollak, P; Agid, Y; Brice, A. A multidisciplinary study of patients with early-onset PD with and without parkin mutations. *Neurology*. **2009**. 72. 110-116.
51. Lücking, C. B; Dürr, A; Bonifati, V; Vaughan, J; De Michele, G; Gasser, T; Harhangi, B. S; Meco, G; Denèfle, P; Wood, N. W; Agid, Y; Nicholl, D; Breteler, M. M. B; Oostra, B. A; De Mari, M; Marconi, R; Filla, A; Bonnet, A. M; Broussolle, E; Pollak, P; Rascol, O; Rosier, M; Arnould, A; Brice, A. French Parkinson's Disease Genetics Study G, European Consortium on Genetics Susceptibility in Parkinson's Association between early-onset Parkinson's disease and mutation in the parkin gene. *N. Engl. J. Med.* **2000**. 21. 1560- 1567.
52. Lupski, J. R. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat Genet.* **2007**. 39. S43-S47.
53. Mellick GD, Siebert GA, Funayama M, Buchanan DD, Li Y, Imamichi Y, et al. Screening PARK genes for mutations in early-onset Parkinson's disease patients from Queensland, Australia. *Parkinsonism Relat Disord.* **2009**. 15. 105 – 109.
54. Monroy, N; Guerrero, J. L; Rodríguez-Violante, M; Boll, M-C; Yescas, P; Alonso, M. E; López, M. Genetic Mutations in Early-Onset Parkinson's Disease Mexican Patients: Molecular Testing Implications. *Am J Med Genet.* **2014**. 165B (3). 235 - 244.
55. Nishioka, K; Hayashi, S; Farrer, M. J. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* **2006**. 59. 298- 309.
56. Olanow, W; Koller, W. Management of Parkinson's disease. *Neurology.* **1998**. 50 (3). 2-57.

57. Ozelius, L. J; Senthil, G; Saunders-Pullman, R; Ohmann, E; Deligtich, A; Tagliati, M; Hunt, A. L; Klein, C; Henick, B; Hailpern, S. M; Lipton, R. B; Soto-Valencia, J; Risch, N; Bressmanm S. B. *LRRK2G2019S* as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med.* **2006.** 26. 424-425.
58. Paisan-Ruiz, C; Jain, S; Evans, E. W; Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8- linked Parkinson's disease. *Neuron.* **2004.** 44. 601-607.
59. Paisán-Ruiz, C; Nath, P; Washecka, N; Gibbs, J. R; Singleton, A. B. Comprehensive Analysis of the *LRRK2* in Publicly Available Parkinson's Disease Cases and Neurologically Normal Controls. *Hum Mut.* **2008.** 29. 485-490.
60. Pankratz, N; Kissell, D. K; Pauciulo, M. W; Halter, C. A; Rudolph, A. Parkin dosage mutations have greater pathogenicity in familial PD than simple sequence mutations. *Neurol.* **2009.** 73. 279-286.
61. Pankratz; Dumitriu, A; Hetrick, K. N; Sun, M; Latourelle, J. C; Wilk, J. B; Halter, C; Doheny, K. F; Gusella, J. F; Nichols, W. C; Myers, R. H; Foroud, T; DeStefano, A. L. Copy number Variation in Familial Parkinson Disease. *PLoS ONE.* **2011.** 6. 1-9.
62. Paul, M; Antony, A; Diederich, N. J; Krüger, R; Balling, R. The hallmarks of Parkinson's disease. *FEBS J.* **2013.** 280. 5981-5993.
63. Perry, E.K; McKeith, I; Thompson, P; Marshall, E; Kerwin, J; Jabeen, S; Edwardson, J.A; Ince, P; Blessed G, Irving, D, et. Al. Topography extent and clinical relevance of neurochemical deficits

- indementia of Lewy body type, Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Ann N Acad. Sci.* **1999**. 640. 197-202.
64. Puchmann, A. Monogenic Parkinson's disease and Parkinsonism: Clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkinsonism and Rel Disord.* **2013**. 19. 407-415.
65. Riegel, M. Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Gen and mol Biol.* **2014**. 31 (1). 194-209.
66. Romstad, A; Dupont, E; Krag-Olsen B; Ostergaard, K; Guldberg, P; Guttler, F. Dopa- responsive dystonia and Tourette syndrome in a large Danish family. *Arch Neurol.* **2003**. 60. 618-622.
67. Sanders, W.R. Paralysis agitans. In: Reynolds, L.R. ed. A system of medicine. Philadelphia: Henry Lea's Son & Company. **1880**. 718-731.
68. Scarciolla, O; Brancati, F; Valente, E. M; Ferraris, A; De Angelis, M. V; Valbonesi, S; Garavaglia, B; Uncini, A; Palka G; Stuppia, L; Dallapiccola, B. Multiplex Ligation- Dependent Probe Amplification Assay for simultaneous Detection of Parkinson's Disease Gene Rearrangements. *Mov Disord.* **2007**. 22. 2274-2290.
69. Schmittgen, T. D; Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Prot.* **2008**. 3 (6). 1101-1108.
70. Schouten, J. P; McElgunn, C. J; Waaijer, R; Zwijnemburg, D; Diepvens, F; Pals, G. Relative quantification of 40 nucleic acids

sequences by multiplex ligation- dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* **2002.** 30.

71. Singleton, A; Farrer, M; Johnson, J; Singleton, A; Hague, S; Kachergus, J; Hulihan, M; Peuralinna, T; Dutra, A; Lincon, S; Crawley, A; Hanson, M; Cookson, M; Muenter, M; Baptista, M; Miller, D; Blancato, J, Hardy, J; Gwinn- Hardy, K. Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science.* **2003.** 30. 841.
72. Sironi F, Primignani P, Zini M, Tunesi S, Ruffmann C, Ricca S, et al. Parkin analysis in early onset Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* **2008.** 14. 326 – 633.
73. Smith, D. I; Zhu, Y; McAvoy, S; Kuhn, R. Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer. *Cancer Lett.* **2006.** 232. 48-57.
74. Stuppia, L; Antonucci, I; Palka, G; Gatta, V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int. J. Mol. Sci* **2012.** 13. 3245-3276.
75. Tanner, C.M; Aston, D.A; Epidemiology of Parkinson's disease and akinetics síndromes. *Curr Opin. Neurol.* **2000.** 13. 427-430.
76. Tanner, C; Goldman, S. Epidemiology of Parkinson's Disease. *NeurolClin.* **1996.** 14 (2). 317-335.
77. Todd, RB. Paralysis. Certain diseases of the brain, and other affections of the nervous system. Philadelphia: Lindsay and Blakiston. **1859.**

78. Trousseau A. Lecture XV: Seniletrembling and paralysis agitans. In: Lectures on clinical medicine delivered at the Hotel-Dieu Paris. London. New Sydenham Society. **1868**. 440-450.
79. Van Den Eeden, S.K; Tanner, C.M; Bernstein, A, L; Nelson L, M; Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender and race/ ethnicity. *Am J Epidemiol*. **2003**.157. 1015-1022.
80. vonCoelln R, Dawson VL, Dawson TM Parkin-associated. Parkinson's disease. *Cell Tissue Res*. **2004**. 318. 175–184.
81. Wang, L; Nuytemans, K; Bademci, G; Jauregui, C; Martin, E. R; Scott, W. K; Vance, J. M; Zuchner, S. High-Resolution Surven in Familial Parkinson Disease Genes Reveals Multiple Independent Copy Number Variation Events in PARK2. *Hum Mut*. **2013**. 34. (8). 1071-1074.
82. Xiromerisiou, G; Hadjigeorgiou, G. M; Gourbali, V; Johnson, J; Papakonstantinou, I; Papadimitriou, A; Singleton, A. B; Screening for *SNCA* and *LRRK2* mutations in Greek sporadic and autosomal dominant Parkinson's disease: identification of two novel *LRRK2* variants. *European J of Neurol*. **2007**. 14. 7-11.
83. Yescas, P; López, M; Monroy, N; Boll, M-C; Rodríguez-Violante, M; Rodríguez, U; Ochoa, A; Alonso, M. A. Low frequency of common *LRRK2* mutations in Mexican patients with Parkinson's disease. *Neurosci Let*. **2010**. 485. 79-82.
84. Yonova-Doing, E; Atadzhanov, M; Quadri, M; Kelly, P; Shawa, N; Musonda, S. T; Simons, E; Breedveld, G; Oostra, B. A; Bonifati, V. Analysis of *LRRK2*, *SNCA*, *Parkin*, *PINK1* and *DJ-1* in Zambian patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism and Rel Disord*. **2012**. 18. 567-571.

ANEXO A

Carta de consentimiento informado de pacientes con EP



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
DEPARTAMENTO DE NEUROGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
Consentimiento para participar en la Investigación:
"Análisis molecular en la enfermedad de Parkinson"

El departamento de Neurogenética y Biología Molecular dirigido por la Dra. Elisa Alonso, lo (a) invitan a participar en el protocolo de investigación "Estudio molecular de la enfermedad de Parkinson".

Usted ha sido invitado (a) a participar en este estudio debido a que en el Instituto se le ha realizado el diagnóstico de enfermedad de Parkinson. Le pedimos que lea con detenimiento los rubros que a continuación presentamos.

CONFIDENCIALIDAD

Si usted acepta participar en este estudio es necesario que sepa que la información de usted y su familia es confidencial y que nadie que no este inscrito en el proyecto tiene acceso a la misma. Los pacientes que ingresen serán identificados por medio de números con la finalidad de evitar la identificación del paciente. No se proporcionará información de usted o proporcionada por usted a ninguna persona o institución que lo solicite sin su previo consentimiento por escrito.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

El presente estudio tiene como propósito estudiar en pacientes con enfermedad de Parkinson los genes de la parkina, PINK 1 y DJ1; se ha observado que estos genes son causantes de la enfermedad en algunas familias con Parkinson, básicamente de inicio temprano, así como los genes de α -sinucleína y LRRK2 causantes de la enfermedad en algunos pacientes mayores de 50 años. También se van a estudiar algunos otros genes que pueden dar alguna susceptibilidad para que la enfermedad se desarrolle como lo es el gen de la Apo-E, el CYP2D6, gen GBA y la N-acetiltransferasa.

PROCEDIMIENTOS

Para poder realizar este estudio, le pediremos su participación en las siguientes acciones:

En primera instancia será necesario realizar una entrevista con un médico genetista que realizará su historia familiar y elaborará su árbol genealógico con la finalidad de determinar si existen otras personas en su familia que hayan padecido alguna enfermedad similar a la que usted padece. Este procedimiento durará aproximadamente 30 minutos.

Para realizar esta investigación es necesario tomar una muestra de sangre periférica (20ml) para poder extraer el DNA (material hereditario), y en él poder estudiar los genes antes descritos. La muestra será tomada por personal capacitado y con material estéril. La sangre será tomada sólo con fines de investigación genética y no será usada para determinar tratamiento.

BENEFICIOS PREVISTOS PARA LOS PACIENTES

Mediante este estudio no obtendrá beneficio económico y su condición de salud no mejorará como resultado de su participación en mismo, por tanto no se le darán resultados a menos que el estudio muestre algo que afecte directamente su estado de salud.



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
DEPARTAMENTO DE NEUROGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
Consentimiento para participar en la Investigación:
"Análisis molecular en la enfermedad de Parkinson"

El departamento de Neurogenética y Biología Molecular dirigido por la Dra. Elisa Alonso, lo (a) invitan a participar en el protocolo de investigación "Estudio molecular de la enfermedad de Parkinson".

Usted ha sido invitado (a) a participar en este estudio debido a que en el Instituto se le ha realizado el diagnóstico de enfermedad de Parkinson. Le pedimos que lea con detenimiento los rubros que a continuación presentamos.

CONFIDENCIALIDAD

Si usted acepta participar en este estudio es necesario que sepa que la información de usted y su familia es confidencial y que nadie que no este inscrito en el proyecto tiene acceso a la misma. Los pacientes que ingresen serán identificados por medio de números con la finalidad de evitar la identificación del paciente. No se proporcionará información de usted o proporcionada por usted a ninguna persona o institución que lo solicite sin su previo consentimiento por escrito.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

El presente estudio tiene como propósito estudiar en pacientes con enfermedad de Parkinson los genes de la parkina, PINK 1 y DJ1; se ha observado que estos genes son causantes de la enfermedad en algunas familias con Parkinson, básicamente de inicio temprano, así como los genes de α -sinucleína y LRRK2 causantes de la enfermedad en algunos pacientes mayores de 50 años. También se van a estudiar algunos otros genes que pueden dar alguna susceptibilidad para que la enfermedad se desarrolle como lo es el gen de la Apo-E, el CYP2D6, gen GBA y la N-acetiltransferasa.

PROCEDIMIENTOS

Para poder realizar este estudio, le pediremos su participación en las siguientes acciones:

En primera instancia será necesario realizar una entrevista con un médico genetista que realizará su historia familiar y elaborará su árbol genealógico con la finalidad de determinar si existen otras personas en su familia que hayan padecido alguna enfermedad similar a la que usted padece. Este procedimiento durará aproximadamente 30 minutos.

Para realizar esta investigación es necesario tomar una muestra de sangre periférica (20ml) para poder extraer el DNA (material hereditario), y en él poder estudiar los genes antes descritos. La muestra será tomada por personal capacitado y con material estéril. La sangre será tomada sólo con fines de investigación genética y no será usada para determinar tratamiento.

BENEFICIOS PREVISTOS PARA LOS PACIENTES

Mediante este estudio no obtendrá beneficio económico y su condición de salud no mejorará como resultado de su participación en mismo, por tanto no se le darán resultados a menos que el estudio muestre algo que afecte directamente su estado de salud.

BENEFICIOS PREVISTOS PARA LA SOCIEDAD

Los beneficios para la sociedad que surjan de esta investigación serán: 1) mejorar el diagnóstico de pacientes lo cual podría llevar a mejorar la selección del medicamento y 2) mejorar la información que se proporciona en el asesoramiento genético.

OBLIGACIONES FINANCIERAS

Su participación en este estudio no tiene costo alguno para usted.

ABANDONO DEL ESTUDIO

Su participación en este estudio es VOLUNTARIA. Si decide no participar, esto no afectará su relación con el INNN. Si decide participar, es libre de abandonar el estudio en cualquier momento sin que esto perjudique su atención futura en el INNN.

IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

Si en el transcurso del estudio le surgen dudas o comentarios, por favor contacte a la Dra. Ma. Elisa Alonso y/o la Lic. Adriana Ochoa en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía al teléfono 56 06 38 22 a las extensiones 2022 y 2018, respectivamente.

Mi muestra podría servir para otras investigaciones genéticas de enfermedades neurológicas.

Estoy de acuerdo en que se utilice

No estoy de acuerdo en que se utilice

FIRMA DEL SUJETO DE INVESTIGACIÓN Y RESPONSABLE LEGAL

AL FIRMAR ESTA FORMA, ACEPTO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN LA INVESTIGACIÓN

DESCRITA

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

FIRMA: _____ TELÉFONO _____

NOMBRE DEL RESPONSABLE LEGAL: _____

FIRMA: _____

TESTIGOS

Nombre y firma (parentesco)

Nombre y firma (parentesco)

FIRMA DEL INVESTIGADOR

Nombre del investigador que obtuvo el consentimiento: _____

Firma: _____

Nombre del investigador responsable del proyecto: _____

Firma: _____

ANEXO B

Carta de consentimiento informado para controles MM.



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA, "MANUEL VELASCO SUÁREZ"

DEPARTAMENTO DE NEUROGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Consentimiento para participar en la Investigación del "Estudio molecular de la enfermedad de Parkinson" en población mestizo mexicana.

México D. F., a ____ de _____ del 201__.

1. He sido informado (a) que en el Departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este Instituto se están realizando estudio para determinar las variaciones en genes (que son las unidades de la herencia) en personas, aparentemente sanas, de la población mexicana.
2. Las variaciones que se van a estudiar están en los genes *PARK2*, *PINK1* y *DJ-1*. Estos genes presentan variantes (polimorfismos) cuya frecuencia varía en diferentes poblaciones.
3. He sido informado (a) que para analizar estos genes es necesario que done una muestra de 20 ml de sangre periférica para que de ahí se extraiga el DNA que es el material hereditario y se estudie el gen antes mencionado.
4. He sido informado (a) que puedo sufrir enrojecimiento o ardor en la zona de punción.
5. He sido informado (a) que se me hará un árbol genealógico y se me preguntará acerca de las enfermedades que he padecido así como las de mi familia.
6. Toda la información obtenida será confidencial y estará disponible solo para los investigadores. Mi muestra será codificada con una combinación de letras y números para proteger mi identidad.
7. He sido informado (a) que mi participación en este estudio es **VOLUNTARIA** y no tiene costo alguno para mí, ni recibiré remuneración alguna.

8. He sido informado (a) que de acuerdo al artículo 103 Bis 4 capítulo único, título quinto Bis de la Ley General de Salud, si deseo conocer los resultados de los estudios que se realicen a mi muestra y si deseo participar en otros estudios que contribuyan a un diagnóstico y manejo adecuados, seré contactado por los investigadores.
9. He sido informado (a) de la garantía que tengo para recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a las dudas que surjan respecto a los asuntos relacionados con esta enfermedad.
10. Para cualquier duda o aclaración puede dirigirse al departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este Instituto con la Dra. Ma. Elisa Alonso y con la M. en C. Adriana Ochoa o comunicarse al Tel. 56 06 38 22 Ext. 2022 y 2018, respectivamente.

FIRMA DEL SUJETO DE INVESTIGACIÓN Y RESPONSABLE LEGAL

AL FIRMAR ESTA FORMA, ACEPTO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN LA INVESTIGACIÓN DESCRITA

Nombre del participante: _____ Género: H M

Firma _____ Teléfono _____

Correo electrónico _____

Dirección: _____

Origen _____ Edad _____ Ocupación _____

Edo. Civil _____ Escolaridad _____

Testigo

Testigo

Nombre del (la) investigador (a) que obtuvo el consentimiento _____

Firma _____