



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Análisis del número de copias del DNA mitocondrial como  
marcador de envejecimiento en pacientes con enfermedad de  
Parkinson**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

**Isabel Ávila Gutiérrez**

TUTOR DEL TEMA: Nancy Monroy Jaramillo



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE: LÓPEZ LÓPEZ MARISOL  
VOCAL: DIMITROVA DINKOVA TZVETANKA  
SECRETARIO: MONROY JARAMILLO NANCY (ASESORA)  
1ER SUPLENTE: ORTEGA VÁZQUEZ ALBERTO  
2DO SUPLENTE: AXOSCO MARÍN JAVIER

**EL PROYECTO SE DESARROLLÓ EN EL INSTITUTO NACIONAL DE  
NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ.  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.**

ASESOR DEL TEMA: NANCY MONROY JARAMILLO  
SUSTENTANTE: ISABEL ÁVILA GUTIÉRREZ

## Contenido

Resumen .....	5
1. Introducción .....	7
1.1 Generalidades de la enfermedad de Parkinson .....	7
1.2 Síntomas .....	8
1.2.1 Síntomas motores.....	9
1.2.2 Síntomas no motores.....	9
1.3 Diagnóstico.....	10
1.4 Factores asociados a la EP .....	11
1.4.1 Envejecimiento .....	13
1.4.2 Género.....	14
1.4.3 Genética de la EP .....	17
1.5 Estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y neuroinflamación.....	18
1.6 Variaciones en el número de copias o contenido del DNAMt.....	21
1.7 Métodos de detección para el CN-DNAMt .....	24
2 Planteamiento del problema .....	25
3 Hipótesis.....	26
4 Objetivos.....	27
4.1 Objetivos secundarios .....	27
5 Sujetos y métodos .....	28
5.1 Sujetos de estudio.....	28
5.2 Extracción de DNA .....	29
5.3 Cuantificación de DNA y preparación de diluciones.....	30

5.4	Análisis de especificidad de los oligonucleótidos y estandarización de la PCR de punto final.....	31
5.5	Cuantificación relativa de dosis génica por PCR tiempo real .....	34
5.6	Ensayo de PCR-TR empleando <i>SYBR Green</i> .....	37
6.	Resultados .....	39
7.	Discusión.....	50
8.	Conclusiones.....	58
9.	Perspectivas.....	59
10.	Material complementario .....	59
11.	Referencias .....	68

## Resumen

**INTRODUCCIÓN:** El envejecimiento es un cambio fisiológico inevitable que ocurre en todos los organismos, y que, es resultado de factores genéticos y ambientales que operan desde el momento del nacimiento. La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa, progresiva, y es el trastorno del movimiento más frecuente. Suele comenzar entre los 50 y 65 años de edad y el envejecimiento es el mayor factor de riesgo. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía es la cuarta causa de consulta, y se ha estimado una prevalencia de 50 casos nuevos por cada 100 mil habitantes al año. A nivel mundial, se calcula que cuatro o cinco millones de personas mayores de 50 años puedan padecer esta enfermedad.

La disfunción mitocondrial desempeña un papel importante en la etiología subyacente de varias enfermedades relacionadas con el envejecimiento; el estudio del contenido o número de copias de DNA mitocondrial (CN-DNAmt) permite evaluar su biogénesis en estas enfermedades. El CN-DNAmt disminuye con la edad (también conocida como depleción mt) y se correlaciona negativamente con recuento de glóbulos blancos. Sin embargo, se ha demostrado que un alto CN-DNAmt se asocia con una menor incidencia de trastornos neurodegenerativos como la EP y la enfermedad de Alzheimer (EA).

**SUJETOS Y MÉTODOS:** Se incluyeron 30 pacientes con diagnóstico clínico de EP esporádica y 22 controles pareados para la cuantificación relativa del CN-DNAmt por PCR en tiempo real. El estudio fue longitudinal y observacional, se obtuvieron 3 muestras de los participantes a tiempo cero, a uno y dos años de seguimiento. En el tiempo cero, los pacientes se encontraban sin tratamiento dopaminérgico para la toma de muestra; este se inició inmediatamente después. Los datos moleculares, junto con datos de interleucinas y clínicos de los pacientes, se analizaron estadísticamente.

**RESULTADOS:** La comparación del CN-DNAmt mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 0 y 1 ( $P=0.001$ ) y los tiempos 0 y 2 ( $P=0.002$ ), en los pacientes. Se obtuvieron diferencias significativas entre CN-DNAmt en pacientes con EP y controles al tiempo 1 ( $P=0.034$ ). Se observó una correlación negativa en el CN-DNAmt y la edad en los pacientes.

Al analizar los niveles de diferentes interleucinas, los datos clínicos y CN-DNAmt en los participantes, no se encontraron correlaciones significativas.

Los resultados sugieren que el inicio del tratamiento dopaminérgico en pacientes con EP influye en el contenido de DNAmt de alguna manera, pero esto no mostró correlación con procesos de inflamación modulados inmunológicamente en la muestra estudiada. Estos resultados deberán confirmarse en una muestra ampliada.

# 1. Introducción

## 1.1 Generalidades de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817 en su ensayo sobre la “parálisis agitante”. La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común y el primer desorden de movimiento en el mundo, se estiman de 5 a 35 nuevos casos por cada 100 mil habitantes con esta enfermedad cada año (Reich 2018; Poewe et al. 2017). En México no existen cifras exactas, sin embargo, el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía estima una incidencia de 40 a 50 casos nuevos cada 100 mil habitantes al año (INNNMVS, Gobierno de México, 2018).

La EP es multifactorial, progresiva y degenerativa, en esta entidad se presentan síntomas motores y no motores. Sus características patológicas principales son la degeneración progresiva de la vía dopaminérgica nigroestriatal con una pérdida sustancial de neuronas de la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) y por ende una depleción en los niveles de la dopamina (DA) y la acumulación de filamentos, formando así inclusiones citoplasmáticas intraneuronales denominadas “cuerpos de Lewy”. Se sabe que, cuando el 60%-80% de las neuronas dopaminérgicas en el cuerpo estriado están perdidas, empieza la aparición de los síntomas motores en la EP (Raza, Anjum, & Shekeel, 2019).

La rigidez, el temblor en una extremidad en reposo, la bradicinesia y la inestabilidad postural son los síntomas motores más característicos de la EP (Raza, Anjum, & Shekeel, 2019). Estos síntomas están relacionados con la acumulación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína en los cuerpos de Lewy y con la neurodegeneración de la vía nigroestriada dopaminérgica.

Los síntomas no motores de la EP son más comunes, ya que suelen presentarse en el 90% de los pacientes disminuyendo la calidad de vida. Entre ellos se encuentra la depresión, la ansiedad, los trastornos del sueño y el deterioro cognitivo (Van Laar & Jain, 2014).

El diagnóstico clínico de EP se basa en cuatro criterios propuestos por la *Movement Disorder Society* y consisten en 1) presencia de bradicinesia, temblor y rigidez en reposo. 2) una respuesta inequívoca a la levodopa. 3) que no haya criterios de exclusión y 4) presencia de señales que indiquen un diagnóstico dudoso (Reich, 2018).

La levodopa es el medicamento más efectivo y potente hasta ahora para el tratamiento de la EP. Es un precursor inmediato de la DA, la cual puede atravesar la barrera hematoencefálica, permitiendo así que las pocas neuronas dopaminérgicas que quedan puedan seguir produciendo DA y aliviar los síntomas.

Usualmente la levodopa se usa en conjunto con carbidopa para aumentar su biodisponibilidad en el sistema nervioso central (SNC) y evitar efectos secundarios en la periferia. También se usan agonistas de DA para estimular los receptores dopaminérgicos en el SNC y aliviar los síntomas de la EP, aunque suelen causar discinesias. Los inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa y de la monoamina oxidasa aldehído deshidrogenasa B suelen prolongar el efecto de la carbidopa y levodopa, aunque también aumentan los efectos secundarios como las alucinaciones, discinesias y náuseas. Otros medicamentos que se usan en la EP son antipsicóticos, anticolinérgicos y antidepresivos tricíclicos (Hayes, 2019).

Cervantes y colaboradores (2013) indicaron que, en México, el 76.8% de los pacientes estudiados recibían alguna formulación con levodopa, el 54.4% de los sujetos se encontraba en tratamiento con algún agonista dopaminérgico y el 18.1% recibían algún inhibidor de monoaminoxidasa.

## 1.2 Síntomas

La presentación clínica de la EP suele empezar con trastornos asociados al sueño, temblores leves, dificultades del habla (habla suave), alteraciones posturales, cambios en las expresiones faciales, una reducción en el movimiento de las extremidades, pérdida de la concentración, fatiga general y depresión sin una causa evidente (Raza, Anjum, & Shekeel, 2019).

### 1.2.1 Síntomas motores

Los pacientes con EP frecuentemente inician con un típico temblor en una sola extremidad (a veces un dedo), y este suele subir de intensidad (8-10Hz) cuando están en reposo, involucrando cabeza, mandíbula y lengua (Hayes, 2019). La bradicinesia se refiere a la ralentización del movimiento y la simplificación de tareas motoras complejas. Generalmente, hay pérdida de expresiones faciales en donde el paciente disminuye el parpadeo, mantiene los ojos más abiertos y los músculos faciales en general se mueven menos, manteniendo la boca ligeramente abierta. La rigidez es uno de los primeros síntomas en presentarse y se experimenta como una resistencia mayor durante la movilización pasiva de algunas partes del cuerpo. La inestabilidad postural se refiere a alteraciones que comprometen la capacidad para mantener la postura. Los pacientes con EP avanzada presentan altas tasas de caídas y pérdidas de independencia.

Además, existen síntomas motores secundarios como alteraciones en la marcha, micrografía, dificultades del habla, sialorrea, disfagia y distonías que empeoran la calidad de vida del paciente.

### 1.2.2 Síntomas no motores

Los síntomas no motores son las manifestaciones clínicas de la degeneración de la enfermedad; e incluyen: depresión, ansiedad, trastornos del sueño, deterioro cognitivo o disautonomía; además, son los que más deterioran la calidad de vida en comparación con los síntomas motores. La prevalencia de la depresión en pacientes suele ser de 4%-72%, presentándose en cualquier etapa de la EP, incluso antes del diagnóstico (Van Laar & Jain, 2014). La depresión suele aumentar sus niveles de ansiedad y empeorar sus síntomas, en especial, los temblores y la cognición. Las pacientes femeninas presentan mayor prevalencia de ansiedad. Otros factores de riesgo para desarrollar ansiedad en la EP son: fluctuaciones motoras, antecedentes familiares y una edad de inicio temprana.

El deterioro cognitivo es otro de estos síntomas y puede no apreciarse hasta que los síntomas generales de la EP se agraven y es un contribuyente significativo a la mortalidad del paciente. Otros síntomas no motores pueden ser: alucinaciones,

psicosis, desórdenes compulsivos y del sueño, disfunción autonómica y síntomas sensoriales (dolor) (Van Laar & Jain, 2014).

### 1.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la EP se basa en la examinación médica e historia clínica del paciente. La historia debe evaluar síntomas motores y no motores, incluyendo características prodrómicas (trastorno de conducta durante el sueño MOR, hiposmia, constipación), dificultad del movimiento característica (temblor, rigidez, lentitud) y problemas psicológicos o cognitivos (deterioro cognitivo, depresión, ansiedad). También deberán evaluarse los antecedentes heredofamiliares (AHF) en la genealogía del paciente, ya que un familiar con EP incrementa la probabilidad de recurrencia de la enfermedad (Armstrong & Okun, 2020).

Para estar clínicamente seguros de que se trata de EP (sin confirmación patológica *post mortem*), los individuos deben cumplir al menos 2 de 4 criterios de apoyo:

1. Temblor en reposo
2. Una mejoría con terapia dopaminérgica (carbidopa, levodopa)
3. La presencia de discinesias inducidas por levodopa o
4. La presencia de pérdida olfativa o denervación simpática cardíaca en la gammagrafía miocárdica

La tomografía computarizada por emisión de único fotón con transportador de dopamina (DaT- SPECT) puede mejorar la precisión del diagnóstico cuando éste es incierto ya que identifica la disfunción neuronal presináptica de la dopamina presente en la EP y otros parkinsonismos neurodegenerativos al demostrar una captación reducida de un trazador radiactivo que se une a los transportadores de dopamina en los ganglios basales. DaT-SPECT es altamente preciso (98% -100% de sensibilidad y especificidad) para detectar la pérdida de células nigroestriatales en personas con parkinsonismo. La resonancia magnética puede ayudar a diferenciar la EP de otros parkinsonismos. (Armstrong & Okun, 2020)

La lista de mutaciones que causan EP familiar monogénico sigue creciendo al igual que el número de genes asociados con el complejo fenotípico que incluyen

parkinsonismo y se les ha denominado como *loci PARK* (Tabla 1). Otros genes (*GBA*, *GCHI*, *ADH1C*, *TBP*, *ATXN2*, *MAPT* y *GLUD2*) contribuyen a un riesgo incrementado para la forma esporádica de la enfermedad. También se han identificado muchas más variantes comunes de susceptibilidad de menor riesgo en otros *loci*, cada una de las cuales actúa de manera aditiva y en conjunto que explican la heredabilidad adicional en la EP. La utilidad de las pruebas genéticas en EP está limitada por la penetrancia reducida de las variantes y la expresividad variable, y actualmente no hay un impacto relevante de los hallazgos genéticos en las decisiones prácticas de tratamiento (Poewe et al. 2017).

#### 1.4 Factores asociados a la EP

La EP es una enfermedad compleja, multifactorial, causada por la interacción de factores genéticos y ambientales.

La evaluación de los pacientes con EP por un médico genetista es importante ya que se puede establecer un patrón de herencia, agregación familiar y facilitar la determinación de factores que pudieran agregar susceptibilidad y riesgo de recurrencia en la familia.

El estrés crónico es un factor ambiental asociado con un riesgo elevado de presentar EP. Un estudio comprobó la asociación entre el estrés ocupacional y el riesgo de EP en los hombres, especialmente con educación a nivel superior. Uno de los factores ambientales más destacados conectado a un riesgo elevado de la EP es el estrés crónico, en donde las altas demandas laborales parecen aumentar con el riesgo de sufrir EP en los hombres. Esto se relaciona con los niveles de colesterol total  $\geq 180$  mg/dL; mientras que los niveles de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad  $\geq 110$  mg/dL se asocian con un menor riesgo de EP en hombres de mediana edad y mujeres ancianas (Cerri, Mus, & Blandini, 2019).

El estilo de vida es otro factor importante que puede afectar el inicio, la gravedad y la progresión de EP. El ejercicio en la mediana edad está asociado con un menor riesgo de EP, mejor pronóstico y tasas más bajas de complicaciones graves (Cerri, Mus, & Blandini, 2019).

Tabla 1. Loci *PARK* asociados a enfermedad de Parkinson, otros parkinsonismos y sus modos de herencia.

<i>Locus</i>	<i>Localización cromosómica</i>	<i>Gen</i>	<i>Herencia</i>	<i>Comentarios clínicos</i>
<i>PARK1/ PARK4</i>	4q21.1	<i>PARK-SNCA</i>	AD	Mutación sin sentido ( <i>PARK1</i> ) causa fenotipo de EP clásica. Las duplicaciones o triplicaciones causan EP de inicio temprano con demencia.
<i>PARK2</i>	6q25.2–q27	<i>PRKN</i>	AR	Fenotipo con EP de inicio temprano y a menudo se presenta con distonía en miembros inferiores.
<i>PARK6</i>	1p36.12	<i>PINK1</i>	AR	EP de inicio temprano y características psiquiátricas.
<i>PARK7</i>	1p36.23	<i>DJ1</i>	AR	Fenotipo con EP de inicio temprano.
<i>PARK8</i>	12q12	<i>LRRK2</i>	AD	EP clásica. Variantes en <i>LRRK2</i> incluyen factores de riesgo y mutaciones causantes de EP.
<i>PARK9</i>	1p36.13	<i>ATP13A2</i>	AR	Parkinsonismo de inicio temprano y complejo de fenotipo (por ejemplo: distonía, parálisis de la mirada supranuclear, signos piramidales y deterioro cognitivo).
<i>PARK15</i>	22q12.3	<i>FBXO7</i>	AR	Parkinsonismo de inicio temprano con signos piramidales y variable complejo fenotípico (parálisis de la mirada supranuclear, temprana inestabilidad postural, corea y distonía).
<i>PARK19A</i>	1p31.3	<i>DNAJC6</i>	AR	Parkinsonismo de inicio temprano- juvenil, usualmente asociada a retraso mental y convulsiones.
<i>PARK19B</i>	1p31.3	<i>DNAJC6</i>	AR	Comienzo de parkinsonismo entre la tercera y quinta década de vida
<i>PARK23</i>	15q22.2	<i>VPS13C</i>	AD	Parkinsonismo temprano en adultos jóvenes asociado con discapacidad progresiva cognitiva que conlleva a demencia y disautonomía.

Notas: 1 AD, herencia autosómica dominante y AR, herencia autosómica recesiva. Los símbolos de los loci están de acuerdo con *The Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM).

Algunos factores como el género han sido relacionados con la EP prodrómica, en tanto no solo que los hombres y las mujeres sufren la EP de manera diferente, sino también experimentan diferentes mecanismos involucrados en la patogenia de la enfermedad. Los síntomas como fatiga, depresión, síndrome de piernas inquietas, estreñimiento, dolor, pérdida del gusto u olfato, cambio en el peso, y sudoración excesiva son más graves y comunes en las mujeres con EP vs. los pacientes masculinos (Cerri, Mus, & Blandini, 2019).

#### 1.4.1 Envejecimiento

El envejecimiento celular y de los organismos involucra una serie de procesos complejos con muchos aspectos relacionados. Este conjunto de procesos biológicos es irreversible y progresivo, que conduce a una acumulación de errores y desemboca en pérdidas funcionales y de adaptabilidad frente al estrés, debido a su incapacidad de reparación y protección (López-Otín, Blasco, Partridge, & Serrano, 2013).

La senescencia es un proceso en la célula caracterizado por una detención proliferativa estable que interviene en el proceso de envejecimiento. Para minimizar este daño (acortamiento de telómeros, disfunción mitocondrial, entre otros), el organismo ha desarrollado una red de mecanismos que desencadenan la respuesta al daño del DNA. Cuando no se resuelve, provoca la activación de la senescencia (Slawinska & Krupa, 2021).

Así, cada organismo tiene una cierta predisposición genética para envejecer que es modulada por la acción de factores exógenos (ambientales o de la dieta) y productos del propio metabolismo que, en conjunto con el tiempo, se acumulan a lo largo de la vida y modifican la expresión de genes relacionados con los procesos de envejecimiento (López-Novoa & Rodríguez-Puyol, 1997).

Las mutaciones y deleciones en el DNAm envejecido también pueden contribuir al envejecimiento. El DNAm se ha considerado un objetivo importante para las mutaciones somáticas asociadas al envejecimiento debido al microambiente oxidativo de las mitocondrias, la falta de histonas protectoras y eficacia limitada de

los mecanismos de reparación en comparación con los del DNA nuclear (López-Novoa & Rodríguez-Puyol, 1997).

La EP es una enfermedad prototípica neurodegenerativa relacionada con la edad, que afecta aproximadamente a 1% de la población adulta mayor en todo el mundo. La etiopatogenia de la EP es compleja y multifactorial, siendo el envejecimiento el factor de riesgo más importante (Pyle et al. 2016).

#### 1.4.2 Género

El riesgo de desarrollar EP es dos veces más alto en hombres que en mujeres, pero las mujeres tienen una mayor tasa de mortalidad y una progresión más rápida de la enfermedad (Cerri, Mus, & Blandini, 2019). Además, las mujeres muestran síntomas distintivos, como una respuesta a terapia farmacológica y al procedimiento de estimulación cerebral profunda (tratamiento quirúrgico) diferentes en comparación con los hombres (Cerri, Mus, & Blandini, 2019). Estudios recientes demostraron que un diagnóstico de EP con demencia tiene un mayor impacto en la esperanza de vida en mujeres con EP que, en hombres, ya que las mujeres suelen comenzar con un fenotipo más benigno y posteriormente presentan un deterioro progresivo constante a medida que avanza la enfermedad (Fig. 1).

Las diferencias de género en la EP pueden atribuirse a factores biológicos como los son los estrógenos, sin embargo, no se debe pasar por alto el comportamiento de atención médica, ya que en un estudio se mostró que la duración esperada desde el inicio de los síntomas hasta la visita al especialista en trastornos del movimiento para las mujeres fue un 61% mayor que para los hombres, lo que conduce a un diagnóstico y tratamiento tardío (Picillo et al. 2017).

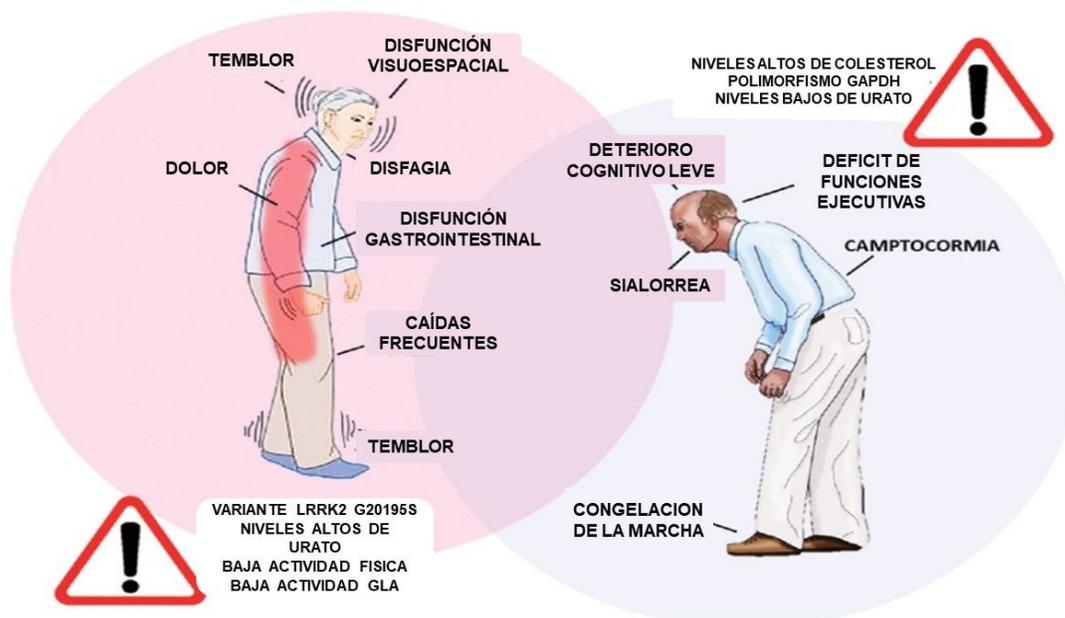


Figura 1. Diferentes sintomatologías de la EP y factores de riesgo entre hombres y mujeres. Ilustración de diferencias sintomatológicas entre hombres y mujeres con EP. Traducido de Cerri, S. et al. (2019) *Parkinson's Disease in Women and Men*.

Además, en las mujeres los síntomas motores surgen más tarde con características específicas como la rigidez reducida, temblor como primer síntoma, inestabilidad postural y un mayor riesgo de presentar complicaciones motoras. Los varones en cambio se han asociado a la complicación motora más incapacitante que es el congelamiento de la marcha.

Los síntomas no motores como fatiga, depresión, piernas inquietas, estreñimiento, dolor, pérdida del gusto y del olfato, cambio en el peso y sudoración excesiva son más graves y comunes en las mujeres.

Las características clínicas distintivas, así como los diferentes factores de riesgo, muestran que el desarrollo de la EP implica distintos mecanismos genéticos en pacientes masculinos y femeninos. Los estrógenos proporcionan protección contra el daño dopaminérgico como lo demuestra la incidencia de la EP entre hombres y mujeres posmenopáusicas (Cerri, Mus, & Blandini, 2019). Además, los estrógenos pueden afectar la patogenia de la EP a través de su influencia en la función y respuesta mitocondrial al estrés oxidativo, pero ya que el estrógeno es un

compuesto endógeno con niveles fluctuantes a lo largo de la vida, los estudios convencionales tienen dificultades para evaluar las variables tan complejas (Picillo et al. 2017).

La neuroinflamación tiene una participación relevante en la patogénesis de la EP. La evidencia sugiere que el papel fisiológico que ejercen la microglía y las células astrocíticas podrían verse comprometidas durante el envejecimiento contribuyendo así a la aparición y progresión de la EP. Dado que los estrógenos tienen propiedades antiinflamatorias sus acciones podrían explicar parcialmente el riesgo relacionado con el sexo y la manifestación de la EP. El efecto neuroprotector de los estrógenos también se debe a su capacidad para atenuar la activación de la microglía y modular la polarización de la microglía hacia un fenotipo citoprotector. De manera similar, los astrocitos corticales masculinos y femeninos responden de manera diferente ante un desafío inflamatorio por lipopolisacáridos (Cerri, Mus, & Blandini, 2019). Los astrocitos masculinos han mostrado una mayor expresión de IL6, TNF e IL1 después del tratamiento con lipopolisacáridos, mientras que los niveles de proteína inducible por interferón fueron 10 veces más altos en los astrocitos derivados de mujeres.

Diferentes factores parecen contribuir al estrés oxidativo en la EP, incluido el metabolismo de la DA, la disfunción mitocondrial, la sobrecarga de hierro, la neuroinflamación, la desregulación del calcio y el envejecimiento.

En particular, dadas las funciones vitales que ejercen las mitocondrias, la alta tasa metabólica y la mayor sensibilidad a los daños oxidativos del cerebro, el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial es fundamental para la viabilidad y función neuronal. Debido a su transmisión exclusivamente materna, las mitocondrias exhiben un fuerte comportamiento específico del sexo y ejercen efectos diferenciales en hombres y mujeres. El género impacta indiscriminadamente en todas las funciones de las mitocondrias. Los estudios realizados en animales y muestras humanas *post mortem* han demostrado que las neuronas femeninas tienen una mayor actividad de la cadena de transporte de electrones y mayores

capacidades funcionales en comparación con las neuronas masculinas (Fig. 2) (Cerri, Mus, & Blandini, 2019).



Figura 2. Diferencias psicopatológicas entre hombres y mujeres con enfermedad de Parkinson. En la parte superior de la figura se encuentran las vulnerabilidades del sistema dopaminérgico, en la parte central las células inflamatorias, y en la parte inferior se enfoca en el estrés oxidativo. Ilustración de impactos psicopatológicos en los diferentes géneros en la EP. Traducido de: Cerri, et al. (2019) *Parkinson's Disease in Women and Men*

### 1.4.3 Genética de la EP

Hasta ahora, las causas genéticas han podido explicar aproximadamente un 10% de los casos de EP familiar, que presentan patrones de herencia monogénicos (dominante o recesivo), el resto de los casos se consideran EP esporádica (Cerri, Mus, & Blandini, 2019).

Debido a que la EP es una enfermedad genéticamente heterogénea y de herencia compleja, cuando existen AHF el riesgo de recurrencia para desarrollar la EP es de 3% a 7%; en cambio cuando no hay antecedentes es de 1 a 2%.

Se han identificado mutaciones y variantes funcionales en más de 10 genes relacionados con la EP ya sea causales o genes de susceptibilidad. La presencia del alelo  $\epsilon 4$  de *ApoE* ha sido asociada como factor de susceptibilidad para desarrollar la EP (Elizono-Cárdenas & Martínez Rodríguez, 2011).

*PARK1*, *PARK2*, *PARK5*, *PARK6* y *PARK7* son genes causales de EP familiar y de EP esporádica, en conjunto explican hasta el 5% de todos los casos de EP. *LRRK2* (*PARK8*) explica del 2%-7% de los casos a nivel mundial, debido a que se considera un gen causal con herencia autosómica dominante (Elizono-Cárdenas & Martínez Rodríguez, 2011).

El gen *PARK2* o *PRKN* codifica para la proteína Parkina con mutaciones asociadas a formas autosómicas recesivas de inicio temprano o juvenil de progresión lenta. Parkina se localiza en las sinapsis y funciona como ubiquitín-ligasa, importante en la vía de degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma. Las alteraciones en *PARK6/PINK1* que codifica para la proteína cinasa PTEN1 y/o en el gen *PARK7* o *DJ-1* que codifica para la proteína DJ1, también se asocian con EP autosómico recesivo y sus productos proteicos participan en los procesos de neuroprotección, en función mitocondrial y regulación del estrés oxidativo. Por lo que, las mutaciones en estos genes afectarán dichas funciones (Klein & Westenberger, 2012; Giannoccaro, et al. 2017).

En la tabla 1, se representan los genes más importantes para la EP, clasificándose según su *locus* y modo de herencia.

### 1.5 Estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y neuroinflamación.

El estrés oxidativo juega un papel importante en la cascada neurodegenerativa dopaminérgica de la EP. Surge de la desregulación de la actividad redox de la célula, donde la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) supera claramente a las enzimas endógenas antioxidantes y otras moléculas chaperonas. Por lo tanto, el estrés oxidativo no es patológico por sí mismo; más bien es la acumulación de ROS y radicales libres lo que causa un desequilibrio y daño neuronal, que resultaría en daño oxidativo a lípidos, proteínas, RNA, DNA

(incluyendo al DNAMt) e integridad estructural dependiendo de la ubicación subcelular de la producción de ROS (Fig. 3) (Trist, Hare, & Double, 2019).

En etapas tempranas de la EP se ha demostrado que el estrés oxidativo es una característica sólida de las etapas iniciales y ocurre antes de la pérdida de neuronas dopaminérgicas.

Las mitocondrias son una fuente intracelular primaria de ROS durante el envejecimiento saludable. También se encargan de producir su propio ATP que potencia la actividad neuronal y mantienen la homeostasis celular a través de la fosforilación oxidativa y la cadena transportadora de electrones (CTE). A medida que las células envejecen, las mitocondrias van perdiendo su integridad debido al estrés oxidativo acumulado. La función mitocondrial comprometida conduce a una serie de eventos (como un aumento de la inducción de apoptosis), que se correlacionan con el envejecimiento (Merck KGaA, 2020; Alexeyev, 2009).

La transferencia prematura de electrones de los complejos I y III de la CTE al  $O_2$  ocurre naturalmente en las mitocondrias intactas y genera radicales superóxidos ( $O_2^-$ ) como un subproducto fisiológico de la producción de energía. Estas ROS pueden desencadenar la formación de radicales hidroxilos ( $\bullet OH$ ), que median el daño oxidativo neuronal primario tanto dentro como fuera de las mitocondrias después de su difusión fuera de estas. Como contrapeso, las mitocondrias contienen dos de las tres enzimas superóxidos dismutasas (SOD), que desintoxican el  $O_2^-$  en peróxido de hidrógeno, que es menos dañino. La enzima superóxido dismutasa de manganeso (SOD2) se localiza en la matriz mitocondrial y la membrana interna; mientras que el superóxido dismutasa de cobre/zinc (SOD1) existe dentro del espacio intermembrana mitocondrial, citosol y muchos otros compartimentos celulares. El  $H_2O_2$  mitocondrial producido por SOD1/2 se descompone en  $O_2$  y  $H_2O$  inocuos a través de las enzimas glutatión peroxidasas mitocondriales específicas y de las peroxirredoxinas (Trist, Hare, & Double, 2019).

Si bien el aumento de la producción de ROS mitocondriales en la SNpc envejecida surge del deterioro gradual de la regulación redox fisiológica; la generación excesiva de ROS por parte de las mitocondrias se asocia con un deterioro grave de la CTE y

daño oxidativo impuesto por toxinas ambientales y mutaciones genéticas. Es probable que estos elementos compuestos impulsen un sistema CTE mitocondrial ya estresado energéticamente más allá de su capacidad redox absoluta, combinándose con las altas demandas de energía de un eje axonal complejo y una gran carga de calcio para desencadenar un desequilibrio severo en la entrega y utilización de electrones por parte del CTE.

Dentro de las mitocondrias, hay alteración de la actividad redox del complejo I mitocondrial al bloquear el flujo de electrones de la NADH deshidrogenasa a la coenzima Q, promoviendo una generación significativa de  $O_2^-$  y reduciendo la síntesis de ATP. Estos compuestos demuestran una citotoxicidad aguda para las neuronas dopaminérgicas estriatales (Trist, Hare, & Double, 2019).

Las mitocondrias no solo son responsables de generar ATP, sino que actúan como sensores del malestar celular y son los primeros organelos en enviar y responder a las señales de muerte celular. Las mitocondrias tienen una función importante en la regulación de la inflamación en respuesta al cambio metabólico (a través de la acción de las sirtuinas mitocondriales).

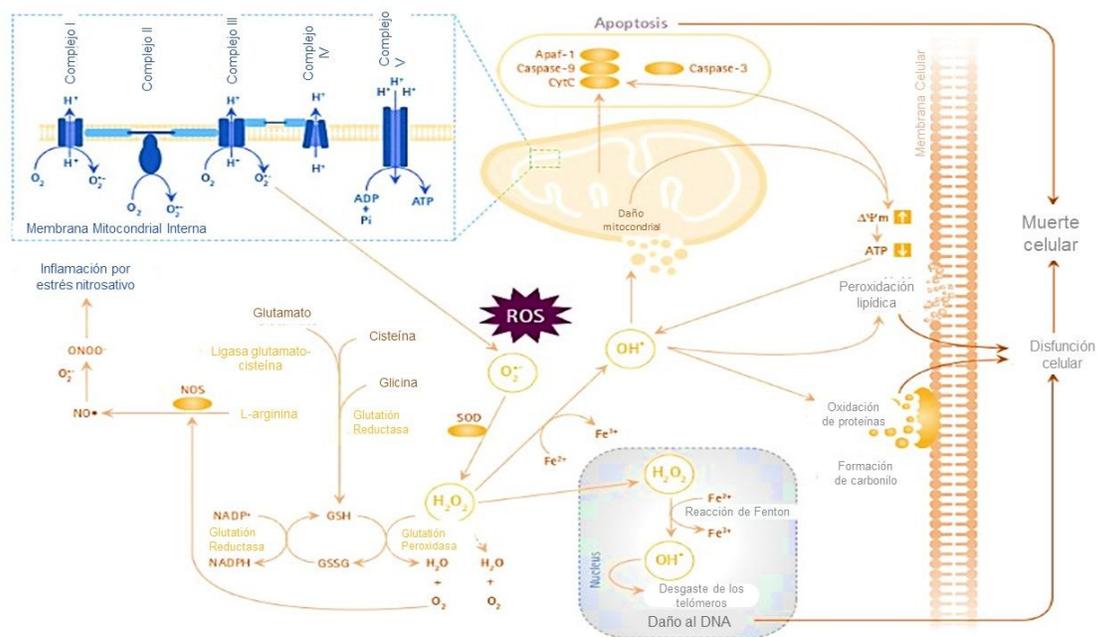


Figura 3. Vías de señalización de la respiración celular, estrés oxidativo y producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Traducido de EMD Millipore Corporation® (2015), *Modern Methods in Oxidative Stress*

A través de la señalización de calcio y ROS a la vía NF- $\kappa$ B, así como a través de patrones moleculares asociados al daño y al inflamasoma, las mitocondrias envían señales para activar la "inflamación". A su vez, las moléculas proinflamatorias regulan a las mitocondrias al provocar disminuciones en el potencial de la membrana mitocondrial, un signo de mala salud celular.

La neuroinflamación es un rasgo característico de la EP, pero aún no se ha establecido si esta promueve o protege de la neurodegeneración (Dib et al. 2015). Se ha observado que el suero de los pacientes con EP muestra niveles elevados de numerosas citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN $\beta$ 1, se desconoce si la inflamación contribuye o es una consecuencia de la pérdida neuronal. Además, se ha encontrado que *PINK1* y *PRKN* eliminan las mitocondrias dañadas de las células en cultivo y en modelos animales a través de mitofagia. Dado que el estrés mitocondrial puede conducir a la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMP) que pueden activar la inmunidad innata, la mitofagia puede ser una vía para mitigar la inflamación (Sliter et al. 2018; De Virgilio et al. 2016).

### 1.6 Variaciones en el número de copias o contenido del DNAm

Las mitocondrias tienen múltiples funciones biológicas, pero son el principal centro energético de la célula y casi todo el ATP se produce en las mitocondrias a través de la fosforilación oxidativa (Mengel-From et al 2014).

El número de mitocondrias por célula varía en función de la demanda de energía, el estrés oxidativo y la presencia de condiciones patológicas. En promedio cada mitocondria contiene de 2 a 10 copias de DNAm y hay de  $10^3$  a  $10^4$  mitocondrias por célula, aunque este número varía dependiendo del tipo de célula y etapa del desarrollo (Rooney et al. 2015; Fazzini et al. 2018).

La variación del número de copias (CNV) de DNAm difiere dependiendo del tejido según las necesidades energéticas, por ejemplo, una célula del cerebro contiene

2000 copias aproximadamente, pero en glóbulos blancos hay menos de 100 (Tanaka et al. 2017).

El CN-DNAmt es considerado un biomarcador potencial de disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, envejecimiento y, en consecuencia, puede ser útil en el estudio de algunas enfermedades neurodegenerativas. Esto debido a que el contenido mitocondrial refleja la demanda de energía de una célula que puede alterarse por un metabolismo energético desequilibrado.

Debido a su naturaleza de múltiples copias, las mutaciones espontáneas del DNAmt a menudo afectan solo a una pequeña proporción del DNAmt de la célula, un estado denominado heteroplasmia. Por el contrario, si todas las moléculas de DNAmt albergan una mutación específica, se dice que está en un estado de homoplasmia. Se ha especulado que tanto la heteroplasmia del DNAmt como el número de copias pueden contribuir al proceso de envejecimiento, sin embargo, hasta ahora los resultados en humanos no son concluyentes (Zhang et al. 2017).

También se le ha considerado como un potencial biomarcador de reloj biológico que está estrechamente asociado con la función mitocondrial.

El envejecimiento se ha vinculado con una disfunción progresiva en la actividad de la cadena respiratoria y disfunción mitocondrial acumulativa. En consecuencia, se ha relacionado con el CN-DNAmt y la edad cronológica (Fries et al. 2017).

Actualmente no se comprende completamente cómo es que el contenido de DNAmt celular se ajusta (Filograna et al. 2020).

La edad epigenética es una nueva medida de edad biológica que indica cambios epigenéticos y su gran influencia en el proceso de envejecimiento. Estos cambios epigenéticos ocurren en varios niveles, principalmente la metilación de DNA y la modificación de histonas. El resultado final de los cambios epigenéticos durante el envejecimiento es la accesibilidad alterada al material genético, lo que conduce a una expresión génica aberrante, reactivación de elementos transponibles e inestabilidad genómica (Pal & Tyler, 2016). El método más reconocido de

estimación de edad epigenética es el método de Horvath que se basa en caracterizar 353 marcadores en dinucleótidos CpG (Horvath, 2013).

Se ha demostrado una disminución en el CN-DNAmt que correlaciona con la edad epigenética (en pacientes con trastorno bipolar) y con el estado de salud en general en individuos sanos entre 18 y 93 años. Además, se demostró que a un menor CN-DNAmt, los adultos mayores presentan un mayor deterioro cognitivo. Esta disminución de número de copias inicia en la mediana edad aproximadamente a los 50 años (Mengel-From et al. 2014; Dib et al. 2015; Fries et al. 2017).

Otros estudios recientes sugieren que las mutaciones somáticas de DNAmt pueden contribuir a los trastornos neurodegenerativos relacionados con la edad, como la EP y la EA. En la SNpc se ha observado una acumulación de mutaciones de DNAmt y una reducción en el CN-DNAmt en individuos de edad avanzada con EP (Filograna et al. 2020).

Se encontró que, en muestras de sangre de personas a partir de los 50 años, el CN-DNAmt empieza a disminuir y en sujetos mayores el descenso sigue drásticamente, sugiriendo que hay una pérdida de un pequeño porcentaje de copias por década. La disminución de CN-DNAmt se asoció con una alta mortalidad y mala salud incluyendo una disminución del rendimiento cognitivo y físico. Actualmente no está claro si un número bajo de copias de DNAmt se correlaciona con un impacto negativo o positivo en la longevidad, debido a que hay muchos factores que influyen en el CN-DNAmt (fármacos que se estén consumiendo y diversos factores ambientales como el consumo de tabaco y alcohol) (Pyle et al. 2016; Rooney et al. 2015).

La replicación del DNAmt se lleva a cabo independientemente del ciclo celular del DNA nuclear por lo que la relación entre genomas mitocondriales y nucleares es una medida adecuada para el contenido de DNAmt ya que actualmente existen pocas mediciones precisas del CN-DNAmt en las células (Refnetti, Warren, & Morgenthaler, 2017).

## 1.7 Métodos de detección para el CN-DNAmt

En este trabajo se utilizó el método de cuantificación relativa por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR), amplificando un gen mitocondrial (*NADH*) y comparándolo con un gen nuclear monocopia (*TH*) para conocer el CNV del DNAmt.

La PCR es una técnica de biología molecular que utiliza secuencias específicas de DNA como plantilla, las cuales son amplificadas miles de veces usando principalmente secuencias específicas como oligonucleótidos, DNA polimerasa y un termociclador. En la PCR-TR se detectan amplicones en tiempo real y el proceso se puede observar conforme la amplificación progresa, lo que elimina el análisis post-PCR, dándole a esta técnica una mejor sensibilidad y reproducibilidad, además de un bajo riesgo de contaminación y rapidez (Fazzini et al. 2018).

La cuantificación se realizó con *SYBR Green*, un agente intercalante inespecífico que se incorpora a cualquier molécula de DNA de doble cadena. En consecuencia, al generarse una nueva molécula de DNA en la PCR, el *SYBR Green* se incorpora y al ser excitado mediante una fuente luminosa, genera fluorescencia, misma que será detectada por el equipo de PCR-TR (*STEP ONE*, AB y *Quant Studio 5*, AB).

Para la cuantificación relativa de CN-DNAmt es necesaria una curva estándar con diluciones seriadas del DNA blanco y así normalizar la proporción de una secuencia de DNAmt respecto a un gen del DNA nuclear que amplifican en órdenes de magnitud similares. El DNA nuclear es una referencia activa de amplificación, de la misma muestra (sangre periférica), bajo las mismas condiciones experimentales. (Refnetti, Warren, & Morgenthaler, 2017).

## **2 Planteamiento del problema**

En el departamento de genética del INNNMVS se estudian diversas variantes genéticas causales y de riesgo para la EP. Considerando que la EP es el trastorno de movimiento más frecuente que afecta al 1% de la población mayor de 55 años y 3% de la población mayor a 75 años, el envejecimiento es considerado el factor de riesgo más importante. Se ha reportado que el envejecimiento acelerado del sistema inmune y la disminución de la cuenta de células sanguíneas precede a la aparición de síntomas cognitivos y motores de la EP. La mitocondria ha sido el centro de la investigación en el envejecimiento. Existe la teoría del envejecimiento por radicales libres, y la teoría mitocondrial del envejecimiento. Ambas postulan que las ROS son las principales determinantes de la pérdida del funcionamiento celular conforme avanza la edad.

Con estos antecedentes, en este trabajo se exploró si el CN-DNAmt cambia con el tratamiento dopaminérgico; así mismo se analizó si repercuten en el deterioro cognitivo y otras características clínicas de los pacientes con EP esporádica. Los resultados se compararon con el CN-DNAmt de controles sanos, pareados por edad y género, y se discutió si el CN-DNAmt puede ser un biomarcador útil para predecir el deterioro de la EP.

### **3 Hipótesis**

El número de copias de DNA mitocondrial tendrá una diferencia significativa entre pacientes con EP y controles sanos pareados. Así mismo, el contenido de DNA mitocondrial variará en los pacientes con EP, una vez iniciado su tratamiento dopaminérgico, y dependiendo de su evolución clínica y su estado cognitivo en el tiempo.

## 4 Objetivos

Analizar el número de copias de DNA mitocondrial en pacientes con enfermedad de Parkinson esporádica en comparación con controles sanos, a lo largo de dos años. Explorar si existe influencia del tratamiento con dopamina sobre este marcador de envejecimiento biológico en los pacientes.

### 4.1 Objetivos secundarios

- ▶ Estandarizar la técnica de PCR-TR para la cuantificación relativa de CN-DNAmt.
- ▶ Analizar la relación entre CN-DNAmt con la edad y el género.
- ▶ Explorar correlaciones entre datos de citocinas inflamatorias, datos clínicos y de cognición con el CN-DNAmt en pacientes sin tratamiento y a uno y dos años de iniciado el tratamiento con dopamina.

## 5 Sujetos y métodos

Es un estudio longitudinal a dos años con pacientes con EP sin tratamiento (tiempo cero,  $T_0$ ), y seguimiento de mismos pacientes después de uno y dos años con tratamiento ( $T_1$  y  $T_2$ , respectivamente).

### 5.1 Sujetos de estudio

Se incluyeron 30 pacientes con diagnóstico clínico de EP esporádica a través de la consulta externa del INNNMVS. Los pacientes estaban libres de tratamiento dopaminérgico al momento de la toma de muestra de  $T_0$ .

Se incluyeron 22 controles pareados por edad y género. Todos los pacientes y controles que se incluyeron en el protocolo firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo 1). El protocolo fue aprobado por los comités de Ética y de Investigación del Instituto (INNN 38/19).

El Departamento de Neuroinflamación del INNNMVS realizó la toma de muestra sanguínea de los participantes y recabó los datos clínicos de los mismos. Ellos nos proporcionaron el paquete de células blancas congeladas para posteriormente extraer el DNA para este estudio.

#### Criterios de inclusión

- ▶ Pacientes con diagnóstico clínico de EP esporádica sin tratamiento y posterior seguimiento a uno y dos años de tratamiento dopaminérgico que acudieron a consulta externa en el INNNMVS, aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.
- ▶ Pacientes mestizo mexicanos (MM) mayores de 18 años y de ambos sexos.
- ▶ Escolaridad mínima de 6 años.
- ▶ Pacientes sin deterioro cognitivo o con deterioro cognitivo leve-moderado (evaluados por Neuropsicología).

#### Criterios de exclusión

- ▶ Pacientes que no aceptaron participar en el estudio.
- ▶ Pacientes con demencia.

► Pacientes extranjeros.

Los datos que se recabaron de los pacientes con EP incluyeron:

Edad, sexo, niveles plasmáticos de las siguientes moléculas: TNF- $\alpha$ , GM-CSF, TGF- $\beta$ , IFN, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-35. Escala de Hoehn y Yahr, inventario de Beck para depresión y ansiedad, escala de la evaluación cognitiva de Montreal (MoCA) y escala de movilidad (Schwab & England).

## 5.2 Extracción de DNA

A partir de un volumen de paquete celular congelado (de leucocitos con eritrocitos) se añadieron 3 volúmenes de una solución amortiguadora de lisis de eritrocitos (BLGR) [NH<sub>4</sub>Cl 0.155M, KHCO<sub>3</sub> 10mM, EDTA 0.5M, pH 7.6] en un tubo cónico de 15mL para homogeneizar por inversión aproximadamente 3 minutos. Posteriormente se centrifugó a 3000rpm por 6 minutos. Los ingredientes del BLGR al ser soluciones hipertónicas favorecen la lisis de los eritrocitos por osmosis, y el EDTA funciona como quelante iónico. Después de la centrifugación se decanta y se trabaja con el “botón blanco” que contiene las células mononucleares, las cuales se suspenden con 1mL de BLGR y se centrifuga a 3000rpm por 6min para quitar remanentes de eritrocitos. Después de decantar el sobrenadante se añaden 570  $\mu$ L de una solución de NaCl [5mM] y se agita por 2 minutos para generar un cambio en las proteínas de la membrana citoplasmática, atrapando a las moléculas de agua que están rodeándolas, para posteriormente precipitarlas. Después se añadieron 40 $\mu$ L de dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 10% (v/v) y se agitó vigorosamente por 5 minutos; el SDS al ser tensoactivo ocasiona la formación de micelas para disolver las membranas lipídicas del núcleo celular. Se agregaron 200 $\mu$ L de una solución saturada de NaCl [7M] y se agitó por 10 minutos para llevar a cabo la precipitación de proteínas nucleares. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C para obtener un precipitado salino y proteico, junto con un sobrenadante viscoso que contiene el DNA.

El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 mL para realizar una extracción orgánica con 600 $\mu$ L de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico en una

proporción 49:1 (v/v) para separar el DNA que es soluble en agua (fase superior) de los lípidos de la membrana y algunas proteínas. Esta mezcla de reacción se agitó por 5 minutos y se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos. En este paso se obtuvieron dos fases, cuidadosamente con ayuda de una pipeta Pasteur se transfirió la fase superior a un tubo con 600µl de etanol absoluto para la precipitación del DNA. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y al DNA precipitado se le hizo un lavado con etanol al 70% (v/v) y se volvió a centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante (etanol) para secar el botón (DNA) en un concentrador al vacío (*SpeedVac*®) a 30°C. El DNA seco se solubilizó en 200 µl agua estéril y se dejó hidratando a temperatura ambiente por 24 horas.

### 5.3 Cuantificación de DNA y preparación de diluciones

Se realizó la cuantificación de las muestras para evaluar la calidad del DNA genómico mediante un espectrofotómetro *NanoDrop 2000*® a una longitud de onda de 260 nm y se tomó en cuenta la lectura a 280nm para cuantificar la presencia de proteínas. El factor de 260/280 en la muestra debe ser 1.8-2.0. Los valores de 260/230 para ver la presencia de carbohidratos, péptidos, en la muestra, también debe presentar valores en un rango 1.8 – 2.2, esto indicaría una muestra de DNA sin contaminantes (Fig. 4). Se realizaron las diluciones del DNA genómico a una concentración final de 25 ng/µL.

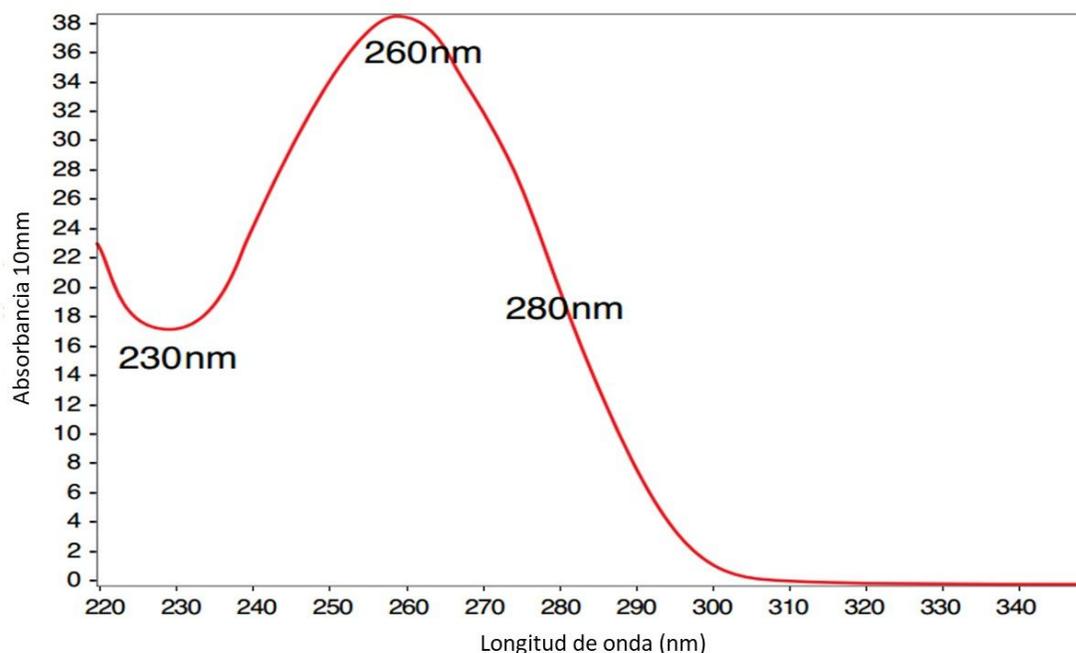


Figura 4. Imagen representativa de una cuantificación de una muestra de DNA por espectrofotometría. Recuperado de *Handbook Nucleic Acid Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers*

#### 5.4 Análisis de especificidad de los oligonucleótidos y estandarización de la PCR de punto final

Para la cuantificación relativa se amplificó al gen mitocondrial de la NADH deshidrogenasa subunidad 3 (*MT-ND3*), y su dosis se normalizó con la del gen nuclear de la tirosín hidroxilasa (*TH*). Las secuencias de cada par de oligonucleótidos utilizados se obtuvieron de una revisión de la literatura (Refnetti, Warren, & Morgenthaler, 2017) y se verificaron con la herramienta *Primer Blast* para conocer su especificidad de hibridación y que los valores de complementariedad hacia el extremo 3' fueran menores a 5 para garantizar un mejor alineamiento con la secuencia molde y determinar la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos (Fig. 5). Los oligonucleótidos para el CN-DNAmt son específicos para DNAmt y no amplifican secuencias del genoma nuclear y lo mismo para los cebadores de *TH*, esto se basó en una revisión de literatura (Refinetti, 2017).

Posteriormente se realizaron pruebas de PCR punto final para cada par de cebadores (Fig. 6) con la finalidad de ajustar la cantidad de DNA y oligonucleótidos para evitar un exceso y la formación de productos inespecíficos que se pudieran amplificar en la PCR-TR.

a)

	Secuencia 5'→3'	Tamaño	Tm	GC%	Complementariedad	Complementariedad 3'
Oligonucleótido sentido	ACACCCCTCCTAGCCTTACTAC	21	57.97	52.38	4.00	1.00
Oligonucleótido anti-sentido	GATATAGGGTCTGAAGCCGC	19	57.58	57.89	4.00	3.00

>[NC\\_012920.1](#) Mitochondria *Homo sapiens*, genoma completo

Tamaño del producto 106

Oligonucleótido sentido	1	ACACCCCTCCTAGCCTTACTAC	21
	10087	.....	10107
Oligonucleótido anti-sentido	1	GATATAGGGTCTGAAGCCGC	19
	10192	.....	10174

b)

	Secuencia 5'→3'	Tamaño	Tm	GC%	Complementariedad	Complementariedad 3'
Oligonucleótido sentido	AGGGTATCTGGGCTCTGG	18	57.26	61.11	2.00	0.00
Oligonucleótido anti-sentido	GGCTGAAAAGCTCCCGATTAT	21	58.42	47.62	4.00	3.00

>[NC\\_000011.10](#) Cromosoma 11 *Homo sapiens*, GRCH38.p13

Tamaño del producto 178  
 Características asociadas con el producto:  
 Tirosina Hidroxilasa isoforma b  
 Tirosina Hidroxilasa isoforma a

Oligonucleótido sentido	1	AGGGTATCTGGGCTCTGG	18
	2171170	.....	2171153
Oligonucleótido anti-sentido	1	GGCTGAAAAGCTCCCGATTAT	21
	2170993	.....	2171013

Figura 5. Análisis de los pares de oligonucleótidos para PCR-TR con la herramienta Primer Blast. (Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) a) Par de oligonucleótidos para amplificar al gen MT-ND3, con temperaturas de amplificación parecidas y valores de complementariedad <5. b) Par de oligonucleótidos que amplifican el gen nuclear TH, con temperaturas de amplificación parecidas y valores de complementariedad <5.0.

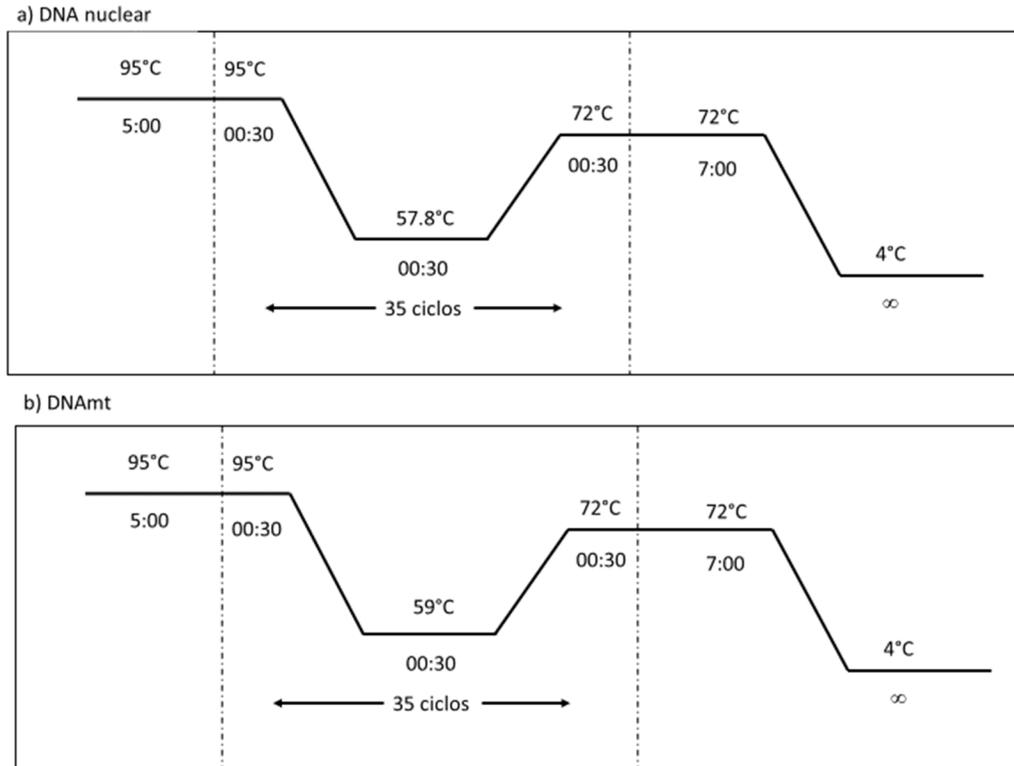


Figura 6. Programa usado en la amplificación de los genes de estudio mediante PCR punto final. a) Programa de amplificación de *TH*. B) Programa de PCR de *MT-ND3*.

Para observar los resultados de la PCR punto final, los amplicones se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 4.0% en amortiguador de boratos, SB 1X (10mM) teñido con bromuro de etidio a 10mg/ml, por 90 minutos a 70V. El gel se visualizó en fotodocumentador *Gel Documentation System BioRad®* con luz ultravioleta. Esto permitió dejar concentraciones de reactivos de PCR aptas para evitar formación de dímeros ocasionados por exceso de oligonucleótidos o productos inespecíficos (Fig. 7).

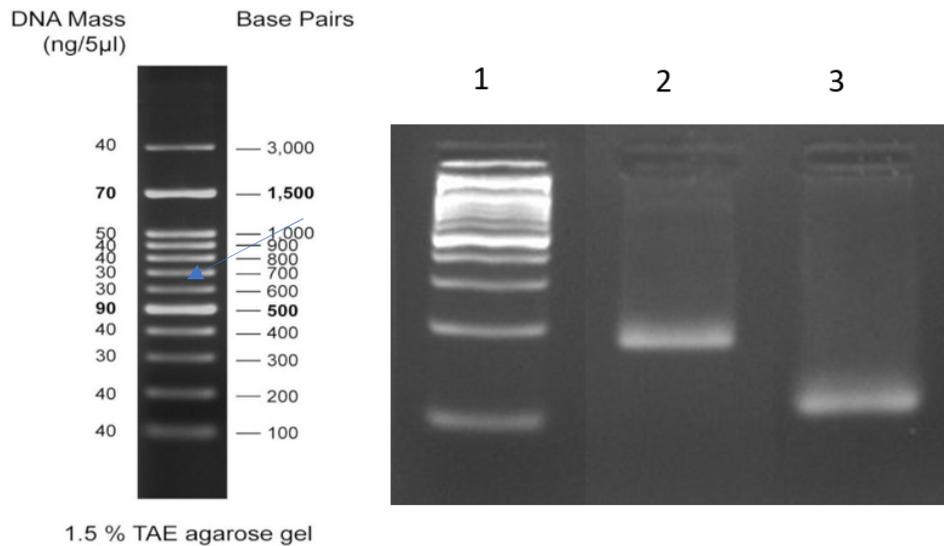


Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR punto final. Marcador de peso molecular *FastGene 100bp DNA Marker*. Electroforesis en gel de agarosa al 4%. En el carril 1 se observa el marcador de pesos; En el carril 2 se encuentra el amplicón de *TH* (178pb). En el carril 3 se aprecia el amplicón de *MT-ND3* (105pb). A la izquierda se señalan las concentraciones (ng) y tamaños de cada fragmento (pb) del marcador de pesos utilizado.

## 5.5 Cuantificación relativa de dosis génica por PCR tiempo real

Para evaluar el CN-DNAmt se amplificaron simultáneamente *ND3* y *TH* en la misma placa con las cantidades que se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Cantidades de cada reactivo para la PCR tiempo real para una sola muestra de ambos genes

Reactivos	Cantidad ( $\mu$ L)
DNA genómico (25ng/ $\mu$ L)	2.0
Mezcla comercial de <i>SYBR green</i> ( <i>Thermofisher/Kapabiosystems</i> )	5.0
Oligonucleótido sentido (5 $\mu$ M)	0.5
Oligonucleótido antisentido (5 $\mu$ M)	0.5
Agua c.b.p. 10 $\mu$ L	2.0

c.b.p., cuanto baste para.

La detección de la fluorescencia generada en cada ciclo de amplificación en tiempo real fue detectada por el sistema óptico (LED). La cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo es proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado en la fase lineal de la reacción de PCR que obedece una cinética  $2^n$  ( $n$ =número de ciclos). Esto se verá reflejado en una gráfica de amplificación como se muestra en la Fig. 8.

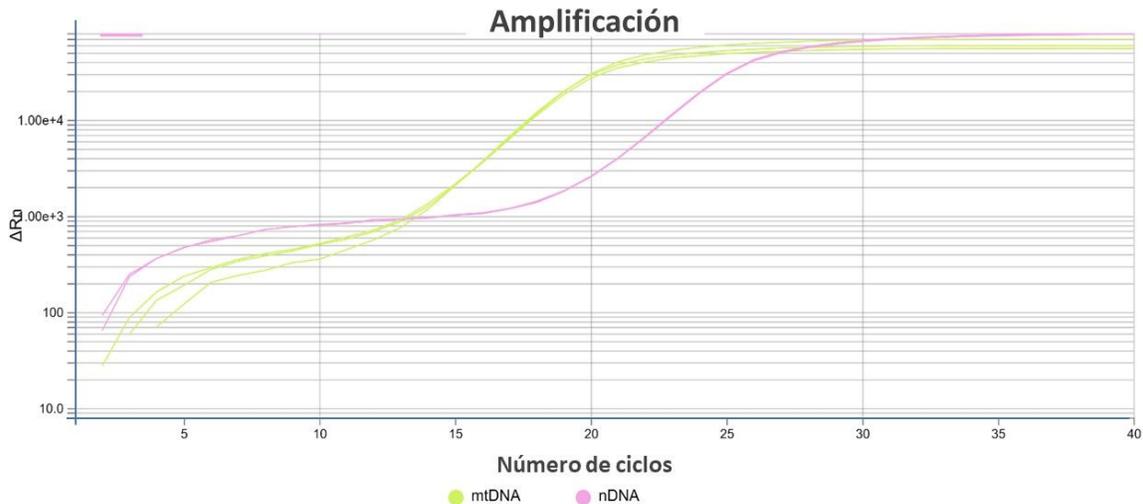


Figura 8. Imagen representativa de una gráfica de PCR-TR de una muestra control (analizada por triplicado), donde se observan los diferentes  $C_T$  (Ciclos umbrales) para cada gen analizado.

### Pasos para la PCR en tiempo real

1. Desnaturalización: se usan temperaturas altas para separar la doble cadena del DNA en cadenas de solo una hebra. La DNA polimerasa soporta una temperatura máxima de  $95^{\circ}\text{C}$ .
2. Alineamiento y extensión a  $60^{\circ}\text{C}$ : las secuencias complementarias hibridan y la polimerasa extiende a esta misma temperatura (Fig. 9). El *SYBR green* se incorpora en el DNA de doble hebra resultante de la amplificación específica de los oligonucleótidos. Esta fluorescencia es detectada por el equipo.
3. Curva de disociación de  $95^{\circ}\text{C}$  a  $60^{\circ}\text{C}$ : ocurre una disociación en el DNA bicatenario unido con el *SYBR green* dando como resultado un cambio en la fluorescencia debido a la obtención de DNA monocatenario y la posterior

liberación del colorante. Es una forma simple y directa de verificar las reacciones de PCR en tiempo real para detectar artefactos de dímeros de cebadores y garantizar la especificidad de la reacción.

Volumen de reacción por pozo: 10µl

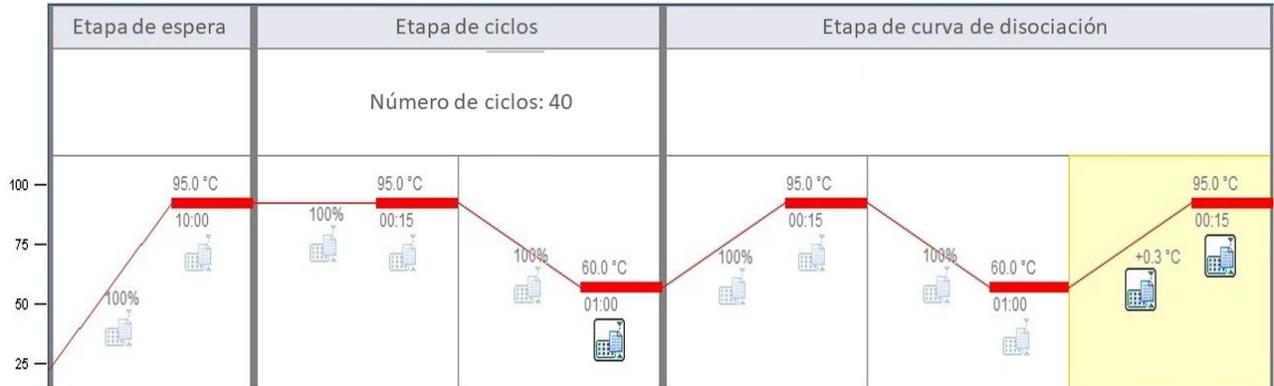


Figura 9. Programa para la amplificación de los genes de interés mediante PCR-TR en un equipo StepOne (AB). Los cuadros indican los puntos de captación de fluorescencia. El proceso post-PCR involucra las curvas de disociación (*melting curves*) que liberan lentamente el fluoróforo incorporado e indican si hay productos inespecíficos.

### 5.5.1 Cuantificación relativa

En este ensayo se incluyó una referencia activa de amplificación que tuviera una dosis de copia única en el genoma humano, y que se amplificara bajo las mismas condiciones experimentales que el gen de interés. El valor del ciclo umbral (Ct) obtenido del gen de interés se le resta al valor de Ct obtenido del gen endógeno para normalizar los resultados. Adicionalmente la mezcla de PCR contiene otra fluorescencia pasiva (ROX) para asegurar una homogenización de fluorescencia y que las variaciones observadas sean debido a cambios en la dosis y no a la cantidad variable de muestra/mezcla añadida entre dos ensayos. Ya con los datos normalizados, se hará otra resta del valor de la primera diferencia/delta/derivada en cada paciente a la del valor de la muestra control. Para los cálculos se utilizó el método comparativo  $\Delta\Delta C_T$  para determinar la cantidad relativa del gen blanco en las muestras. Para ello, es necesario calcular la eficiencia de amplificación para ambos genes mediante una curva estándar con diluciones seriadas de un DNA comercial,

y así obtener el  $\Delta C_T$  ( $C_{T-ND3} - C_{T-TH}$ ) para cada una de las diferentes concentraciones de DNA. Este  $\Delta C_T$  se grafica contra el logaritmo de las distintas concentraciones usadas en la curva estándar (6.4 ng/ $\mu$ L – 58.8 ng/ $\mu$ L) y la pendiente resultante debe ser menor o igual a 0.1 indicando que ambos genes (gen mitocondrial de interés y gen nuclear de referencia) presentan eficiencia de amplificación comparables. Una vez realizado esto, se indican las eficiencias de cada gen en las corridas de PCR-TR en el equipo, para que haga el ajuste y aplique la fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Applied Biosystems , 2010).

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ muestra de interés (paciente con EP)} - \Delta C_T \text{ calibrador (control)}$$

$\Delta C_T$  calibrador: estudio con control sano en las mismas condiciones experimentales que los genes de interés contra las cuales se compara.

## 5.6 Ensayo de PCR-TR empleando *SYBR Green*

Durante la reacción de PCR, al generarse una nueva molécula de DNA, ésta inmediatamente incorpora *SYBR green* que al intercalarse y ser excitado mediante una fuente luminosa, genera fluorescencia, misma que será detectada por el equipo *Step One* (AB). El proceso de validación para trabajar con *SYBR Green* consiste en probar que un solo producto de amplificación se está generando en la reacción y que la fluorescencia registrada corresponde a ese producto en particular y no a productos inespecíficos, para esto se realizan las curvas de disociación post-PCR, en el cual la temperatura aumenta hasta 96°C, registrando la intensidad de fluorescencia en ese momento. Al subir la temperatura, las dobles cadenas del DNA se desnaturalizarán gradualmente, disminuyendo proporcionalmente la fluorescencia y registrando la intensidad; al llegar a la temperatura de desnaturalización del 50% (*melting temperature, Tm*) del amplicón, la velocidad de disociación incrementará drásticamente dado que el 50% del producto de amplificación se encuentra desnaturalizado, la curva de amplificación presentará un punto de inflexión a esta temperatura. La derivada negativa  $dF/dT$  resulta en un pico el cual muestra la temperatura de desnaturalización del producto de amplificación presente en la reacción. De esta forma una reacción de PCR-TR con *SYBR Green*

debe validarse mediante este análisis que debe presentar un solo pico en la gráfica de disolución para garantizar su especificidad (Fig. 10).

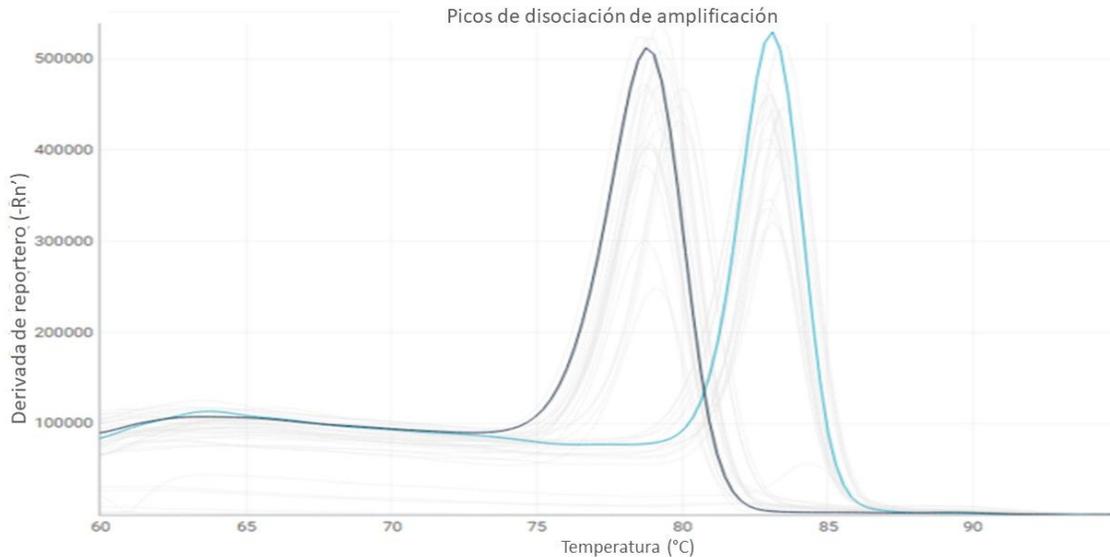


Figura 10. Picos de disociación de amplificación en PCR-TR. De izquierda a derecha, pico perteneciente al gen *MT-ND3*, seguido del gen *TH*.

Para el análisis de dosis génica, cada muestra de DNA se analizó por triplicado y en cada corrida se incluyeron, blancos y un control de DNA comercial (permitió ver variabilidad intra e interplaca).

La muestra que se empleó como control fue un DNA comercial masculino del Centro de Estudios de Polimorfismos Humanos de Paris, Francia (CEPH 1347-02, AB) cuyo cariotipo es normal, según especificaciones del proveedor. Adicionalmente se incluyó un control sano del banco de controles del Departamento, de quien se conoce su genealogía, lugar de origen, antecedentes heredofamiliares, edad y género. El blanco contenía todos los reactivos de PCR, excepto DNA que fue sustituido por agua estéril en la proporción indicada, esto para verificar que no hubiera contaminación en los reactivos.

## 6. Resultados

En este estudio longitudinal de dos años (T0-1-2), se incluyeron 30 pacientes con EP y 22 controles pareados en T0, 20 pacientes y 18 controles en T1 y por último, 9 pacientes y 12 controles en T2.

La edad promedio de los 30 pacientes al inicio del estudio fue de  $62.34 \pm 10.16$  años y el 53.34% fueron varones (Tabla 3). La edad promedio de los 22 controles al inicio del estudio fue de  $55.72 \pm 10.16$  años y el 54.55% fueron varones (Fig. 11) Al comparar la edad y sexo entre ambos grupos, no se observaron diferencias estadísticas ( $p=0.707$  y  $p=1.00$ , respectivamente).

Tabla 3. Edad y sexo de los sujetos de estudio

Variable	Pacientes (n=30)	Controles (n=22)	Valor P
Edad (promedio, mediana $\pm$ DE, años)	62.34, 63 $\pm$ 10.16	55.72, 55.5 $\pm$ 10.16	0.707
Sexo (%)			
Masculino	53.34	54.55	1.000
Femenino	46.66	45.45	

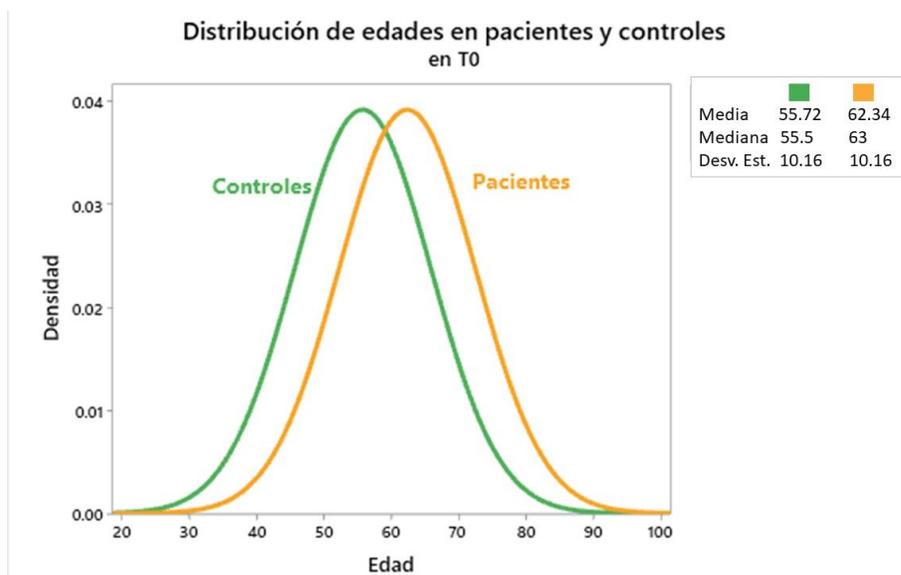


Figura 11. Gráfica de distribución de edades para pacientes y controles en tiempo 0.

Se determinó un rango dinámico de 6-60ng/ $\mu$ L de DNA para la PCR-TR para *ND3* y *TH*. En las curvas estándar se ajustaron las eficiencias de amplificación con valores cercanos al 100% para los dos genes (Figs. 12 y 13, Tabla 4).

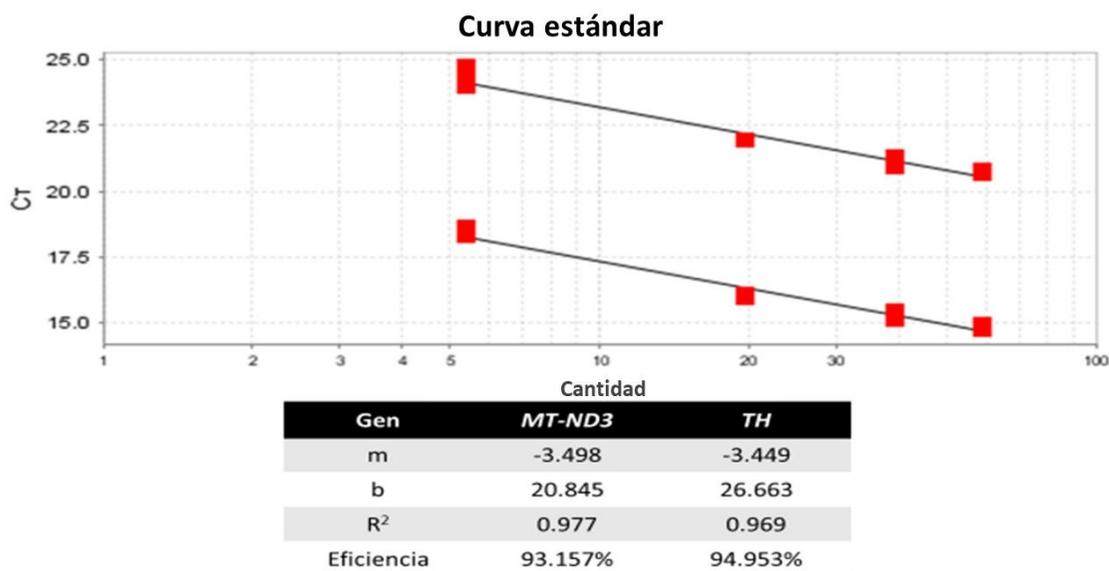


Figura 12. Gráfica de las eficiencias de PCR para los genes *ND3* y *TH*. Curvas estándar para determinar la eficiencia de amplificación de los genes analizados para su posterior validación mediante  $\Delta C_T$ . Una pendiente cercana a -3.3 corresponde a una eficiencia de PCR del 100%.

Tabla 4. Datos obtenidos para la validación de eficiencias comparables de las curvas patrón de *TH* y *MT-ND3*.

Concentración de DNA (ng/ $\mu$ L)	Concentración $Log_{10}$	$\Delta C_T$ promedio
58.8	1.77	-5.90
39.2	1.60	-5.86
19.6	1.30	-5.93
6.4	0.80	-5.83

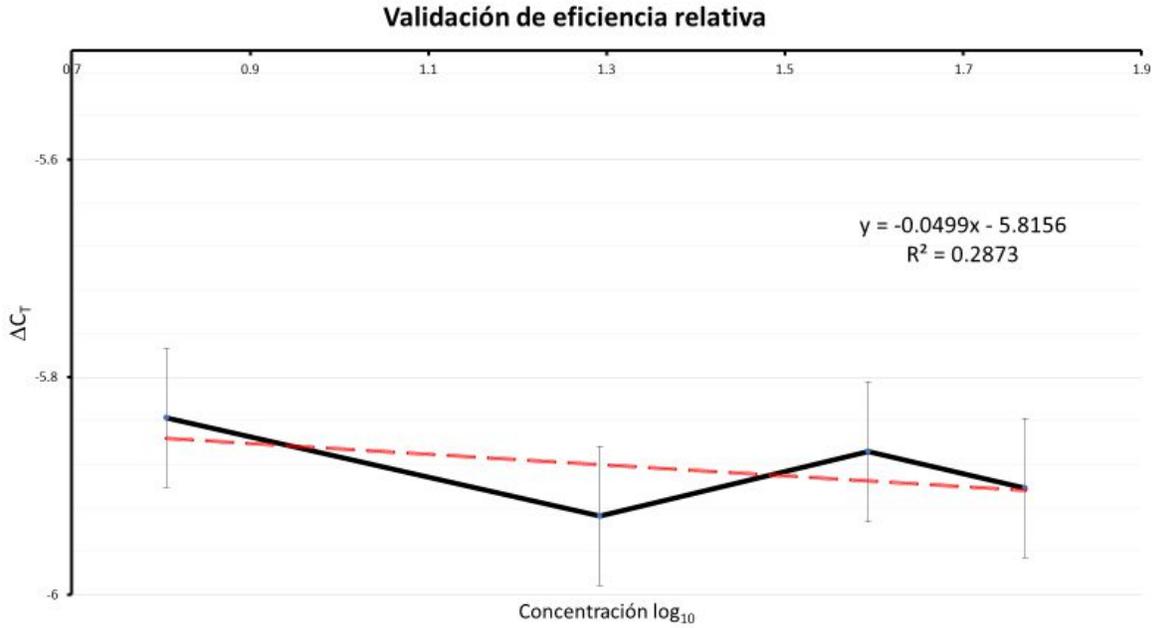


Figura 13. Gráfica comparativa entre los genes *TH* vs. *MT-ND3* para validación de eficiencia relativa. La pendiente fue menor a 0.1 lo que indica que la eficiencia de ambos genes es comparable para usar el método comparativo de  $\Delta\Delta C_T$ .

Las curvas de disociación de todas las muestras presentaron un solo pico de  $T_m$  por gen, lo que indica que no se amplificaron otras secuencias inespecíficas (Fig. 10).

En la figura 14 se muestra la curva de amplificación para los dos genes empleados en la cuantificación relativa del CN-DNAmt por PCR-TR. El  $C_t$  de cada gen amplificado fue diferente (desviación estándar entre las dos  $C_t < 0.2$  unidades).

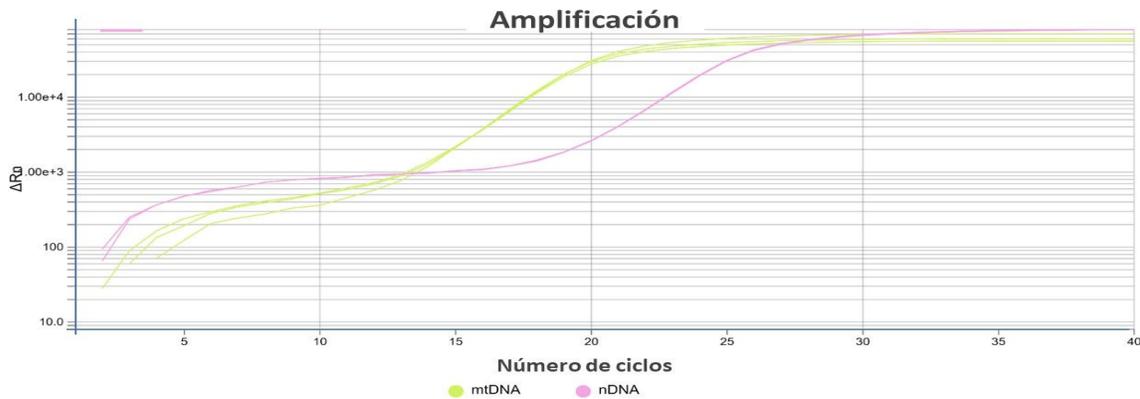


Figura 14. Imagen representativa de una gráfica de las curvas de amplificación. En el eje de las X se muestra el número de ciclos de la PCR, y en el eje Y se indica la emisión de la fluorescencia. En color amarillo se muestra la curva de amplificación de *ND3* para cuantificar al DNAm<sub>t</sub> y en rosa la de *TH* para cuantificar al DNA nuclear.

Se identificaron las temperaturas de disociación para cada gen amplificado y se observó una separación entre las curvas de cada gen amplificado (Fig. 15), no se presentaron picos adicionales, comprobando así la especificidad del ensayo.

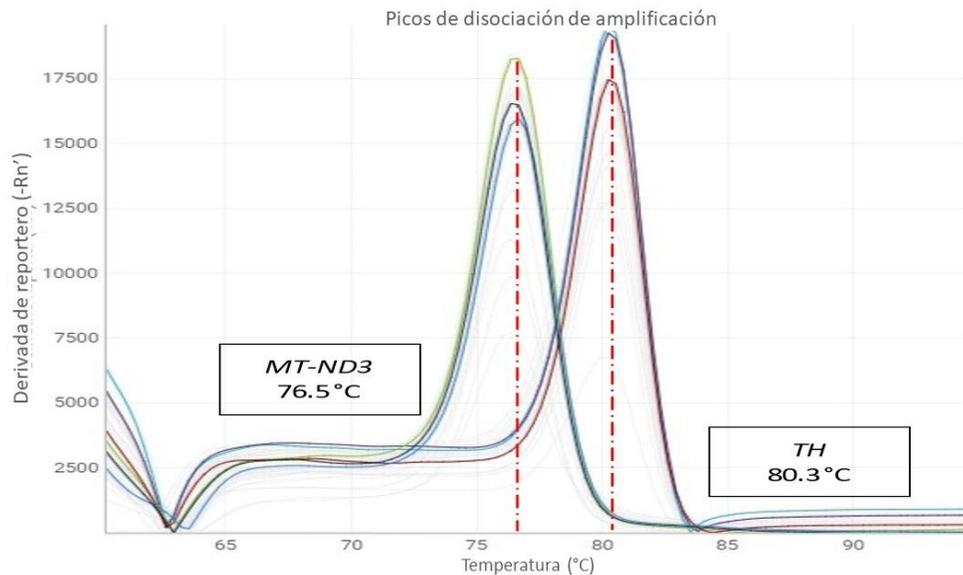


Figura 15. Curvas de disociación para *ND3* y *TH*. Imagen representativa de temperatura (eje X) vs. Emisión/liberación de fluorescencia (eje Y), para demostrar un solo pico característico para cada amplicón.

Se realizó la prueba estadística de normalidad Shapiro-Wilk de los datos obtenidos de *MT-ND3/TH* ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) en los tres tiempos y se observó que los datos tuvieron una distribución no normal. Por ello se aplicaron pruebas estadísticas no paramétricas (tiempo 0,  $P= 1.189e-10$ ; tiempo 1,  $P=0.0001066$ , tiempo 2,  $P=0.01722$ ).

A)

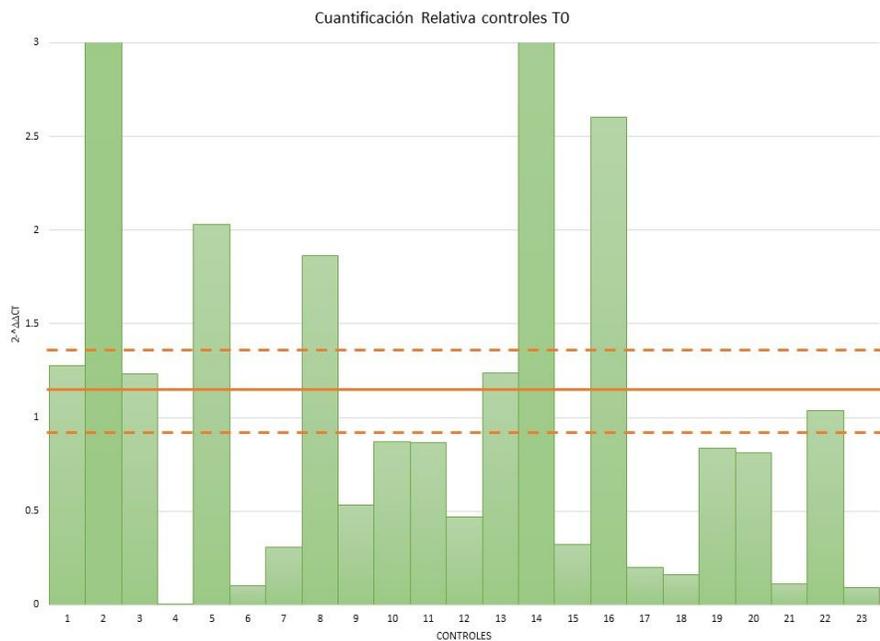
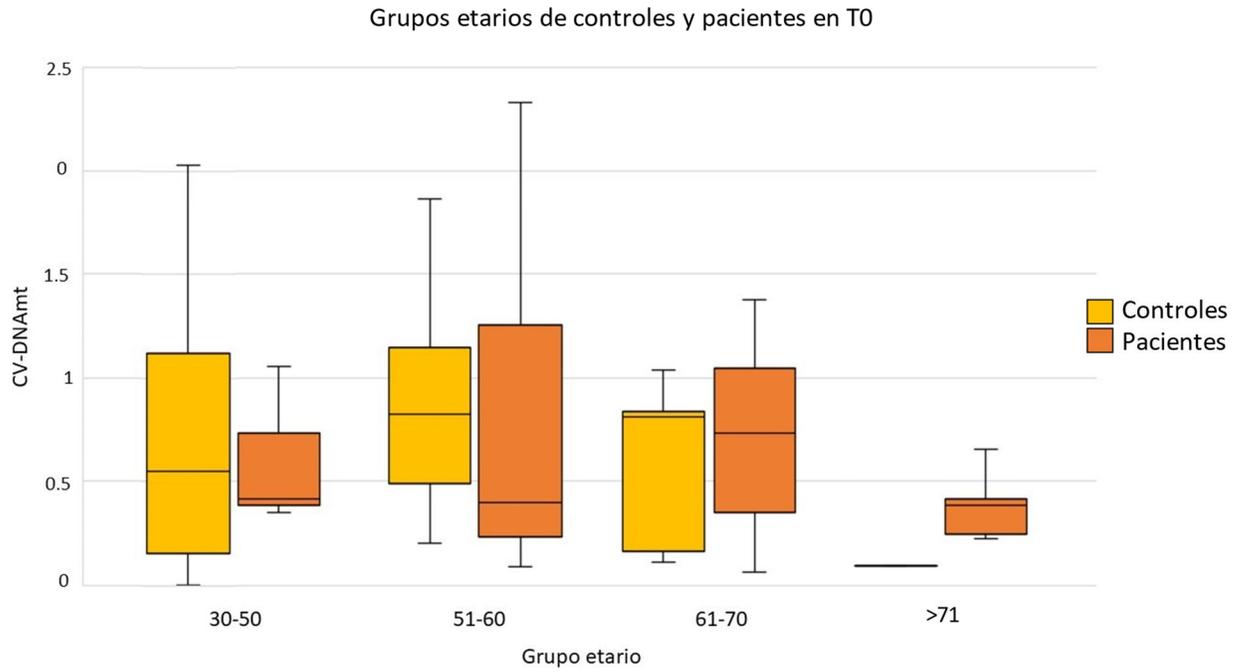


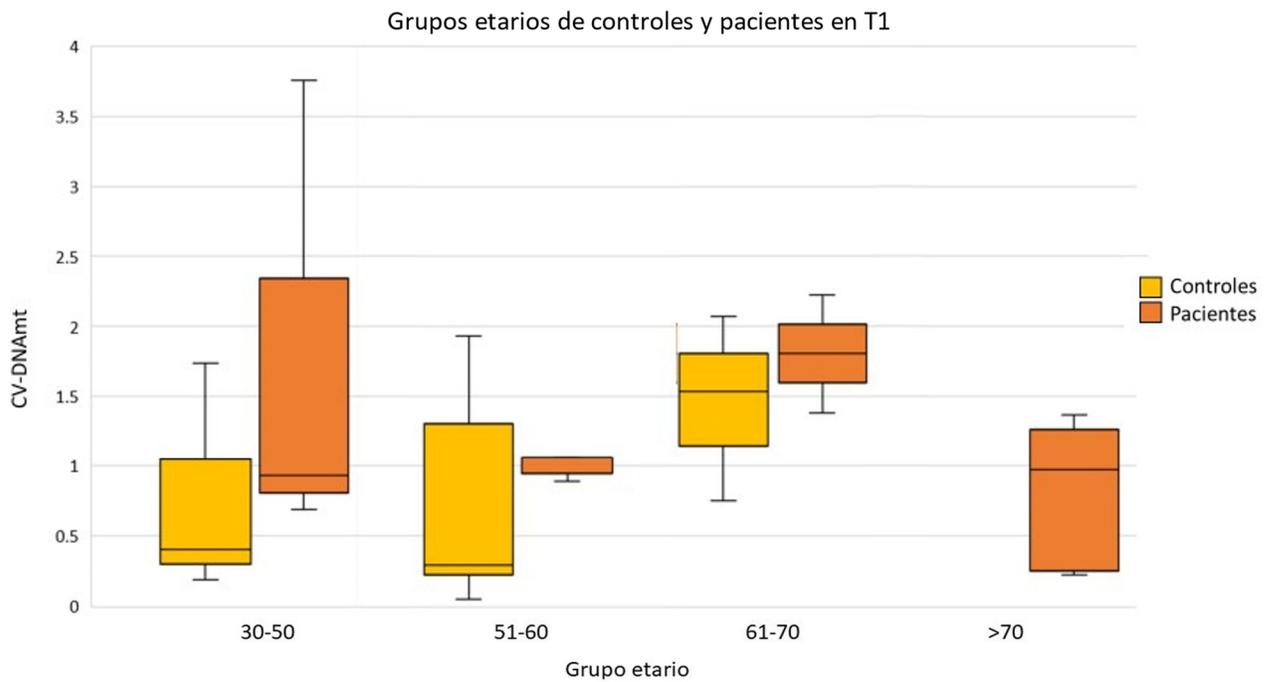
Figura 16. Imagen representativa de cuantificación relativa en el tiempo 0 de controles para el gen *MT-ND3*. Muestra 1 corresponde al control sano y las líneas naranjas punteadas delimitan al intervalo de dosis normal (0.85-1.45), la línea continua representa al promedio. En el eje de las X, cada barra representa una muestra, y en el eje de las Y se muestra la cuantificación relativa de CN-DNAmt.

El promedio de CNV de *MT-ND3* fue de 1.15 con un rango=0.85-1.45 (Fig. 16 y material complementario). Los resultados se separaron en grupos etarios por década para evaluar CN-DNAmt vs. edad. En T0 se observó una disminución del CN-DNAmt a partir de los 60 años de edad tanto en pacientes como en controles; en contraste, en el T1 se observa en los pacientes >60 años una disminución y los controles un aumento. Por último, en T2, se observa que los pacientes >50 años tienen un aumento en CV-DNAmt al igual que los controles (Fig. 17).

A)



B)



C)

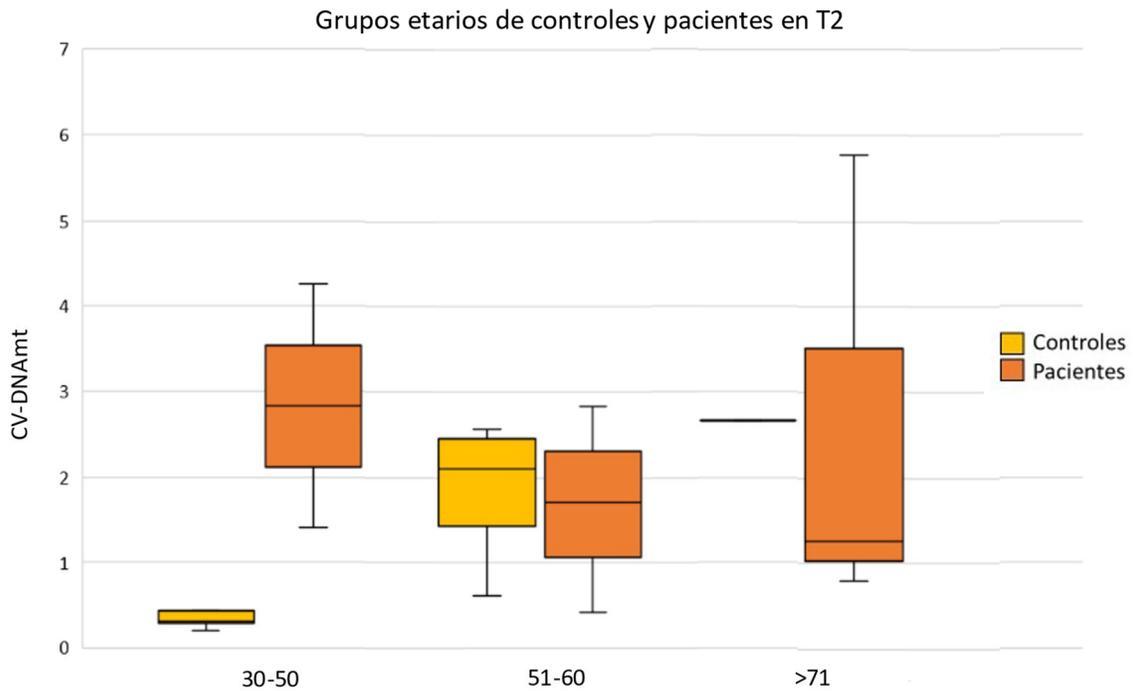


Figura 17 Diagramas de caja y bigotes representando edad contra CNV-DNAmt ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ), para: A) tiempo 0, B) tiempo 1 y C) tiempo 2.

Se utilizó el coeficiente de correlación por rangos de Spearman para evaluar CNV-DNAmt vs. edad cronológica en cada tiempo en pacientes. En T0,  $P=0.267$  y  $r=-0.225$ , en T1  $P=0.583$  y  $r=0.134$ ; y T2,  $P=0.948$  y  $r=-0.033$ . Las correlaciones fueron débiles y no mostraron diferencias significativas (Fig. 18).

Se realizó la misma comparación en los controles: en T0,  $P=0.30$  y  $r=-0.236$ , en T1,  $P=0.762$  y  $r=0.076$  y T2,  $P=0.784$  y  $r=-0.088$ . Se confirmaron las tendencias de la regresión lineal y no hubo diferencias significativas.

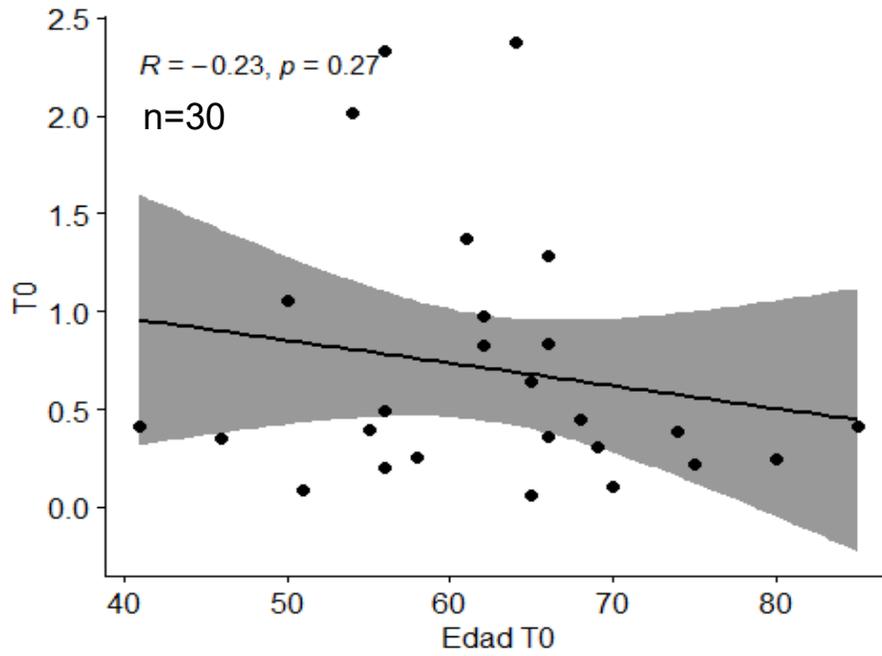


Figura 18. Diagrama de dispersión de los datos en tiempo cero de pacientes con EP.

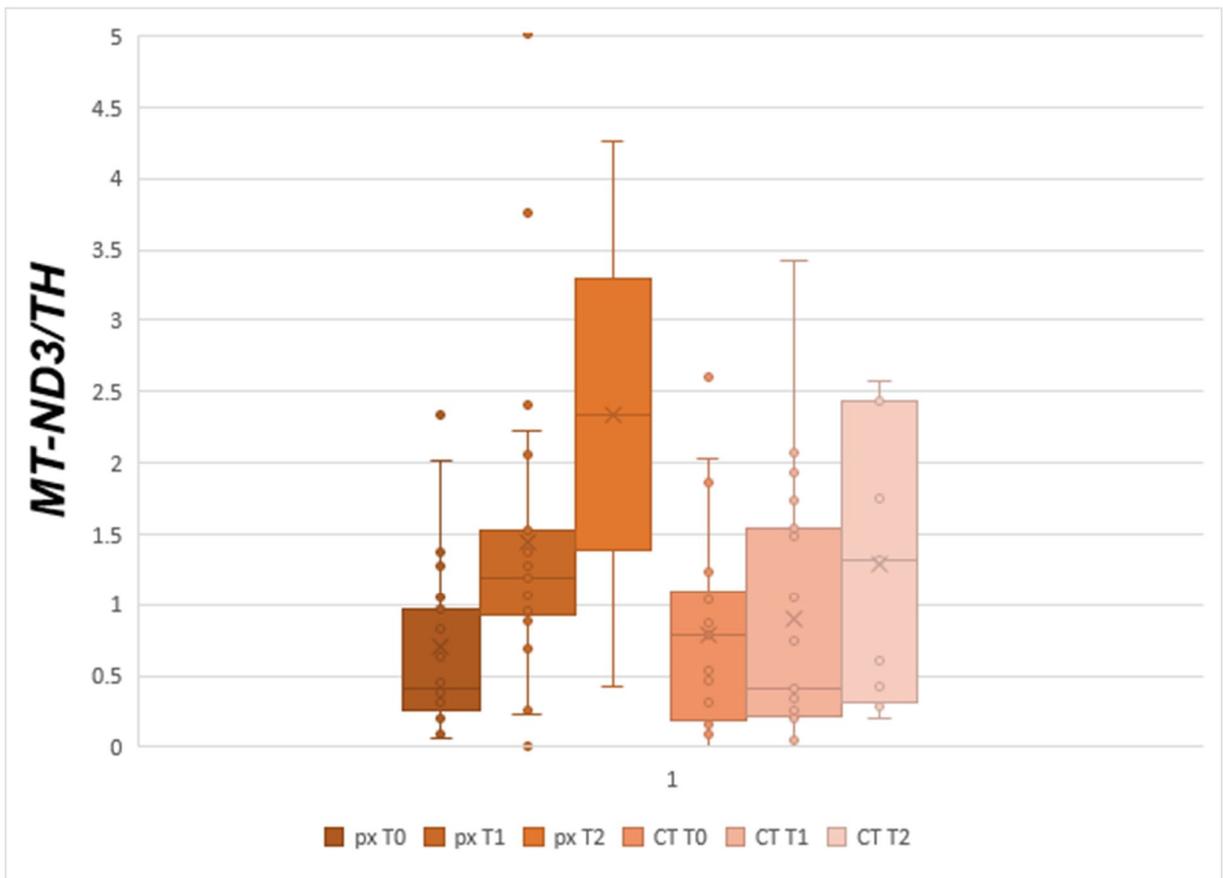
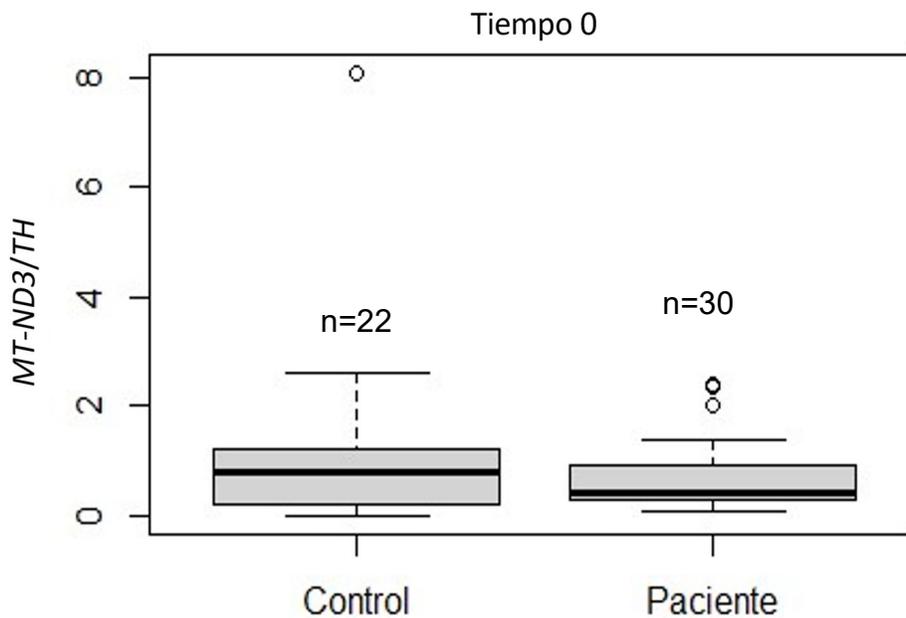


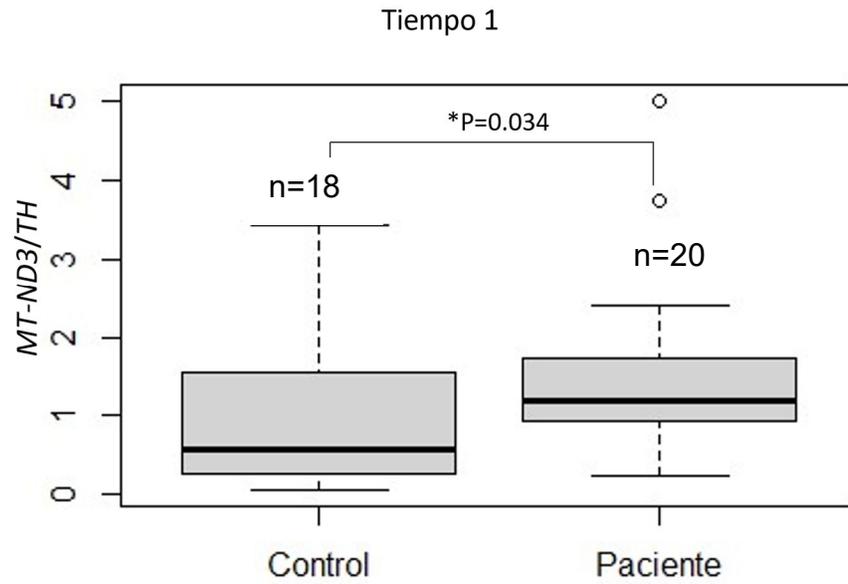
Figura 19. Gráfica de dosis relativa de *MT-ND3/TH* (número relativo de copias de DNAm<sub>t</sub> con respecto a DNA nuclear) en los tres tiempos en pacientes y controles con sus respectivas desviaciones estándar.

Se realizó la prueba de Wilcoxon-Mann Whitney para comparar CN-DNAmt en el grupo de pacientes en los tres tiempos de toma de muestra (Fig. 19), se encontraron diferencias significativas entre T0 y T1 ( $P=0.001$ ) y entre T0 y T2 ( $P=0.002$ ), sugiriendo un aumento en el contenido de CN-DNAmt en pacientes al iniciar el tratamiento. Al comparar el contenido de DNAmt entre pacientes y controles en los diferentes tiempos, se observó que en T1 hubo diferencias significativas ( $P=0.034$ ) (Fig.20).

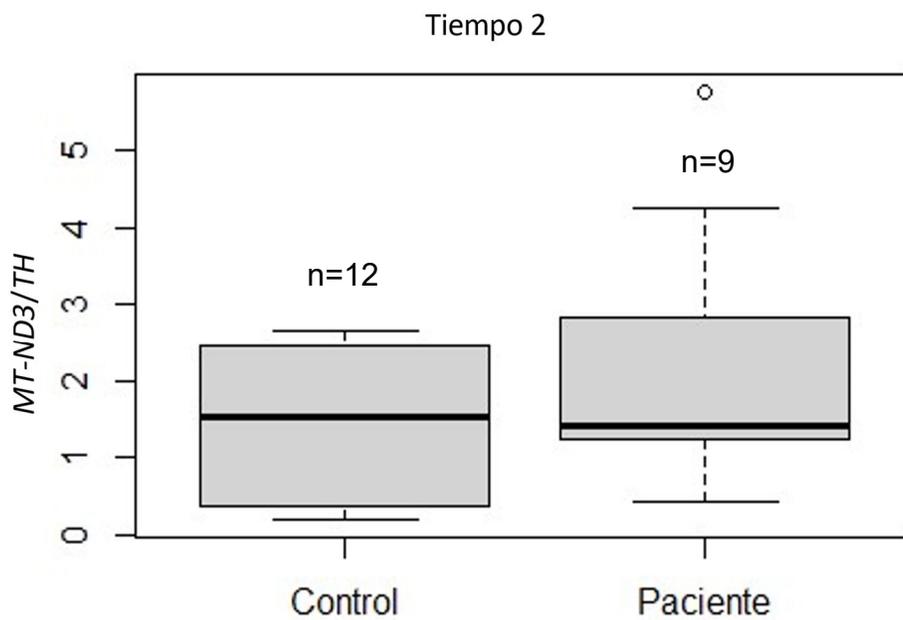
A)



B)

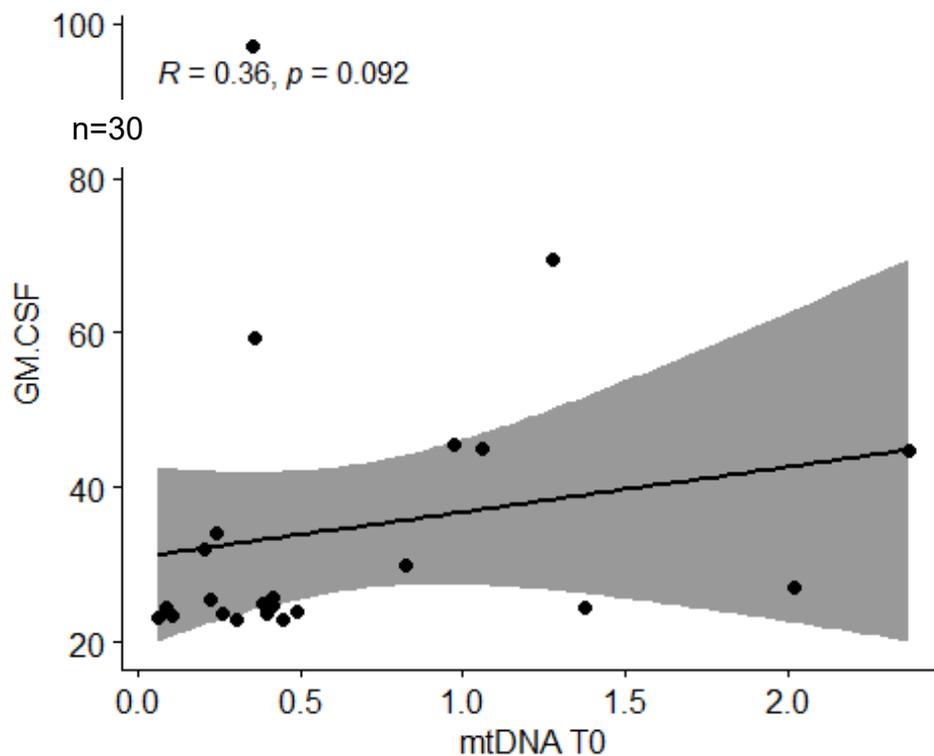


C)



**Figura 20.** Gráfica de caja para número de copias de *MT-ND3* normalizado con *TH*. Se comparan pacientes con EP y el grupo control con sus respectivas dispersiones: A) tiempo cero  $P=0.489$ , B) tiempo 1  $P=0.034$ , y C) tiempo 2  $P=0.254$ .

Se analizaron los datos de CN-DNAmt vs. citocinas pro-inflamatorias en pacientes y controles (ver sección 5.3). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas. Únicamente, se observó una correlación positiva significativa entre el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) y CN-DNAmt en T0, con una  $\rho = 0.36$  y un valor de  $p$  marginalmente significativo ( $p = 0.09$ ) (Fig.21). Así pues, se encontró que en promedio los niveles de GM-CSF son mayores en controles ( $38.0 \pm 44.5$  pg/mL) que en pacientes ( $33.8 \pm 20.7$  pg/mL) en el T0. No se tienen datos de T1 ni T2 porque ya no se midieron los niveles plasmáticos del panel de interleucinas.



**Figura 21.** Diagrama de dispersión de los datos en tiempo cero de pacientes con EP vs. niveles séricos de GM-CSF.

Se analizaron estadísticamente los datos clínicos de pacientes con EP con la escala para cuantificar la ansiedad y depresión (inventario de Beck), escala de la evaluación cognitiva de Montreal (MoCA), el avance de la enfermedad (Hoehn & Yahr, UPDRS) y la movilidad (Schwab & England). Todas las evaluaciones obtuvieron un valor de  $p > 0.05$ .

Además, en los datos clínicos, se estudiaron las diferencias entre hombres y mujeres. En los datos de controles de un mismo sexo no se encontró diferencia estadísticamente significativa, al igual que en pacientes ( $P > 0.05$ ).

## **7. Discusión**

En este estudio, en primer lugar, se observó una disminución de CN-DNAmt en pacientes y controles a mayor edad, exceptuando el T2 en pacientes y el T1 en controles con un aumento en sus niveles. En general, concuerda con lo descrito en la literatura de que el contenido mitocondrial tiende a disminuir con la edad.

La EP está asociada a la edad, el envejecimiento y la disfunción mitocondrial. La mayoría de las investigaciones de CN-DNAmt ha mostrado una reducción en el CNV en individuos de edad avanzada, en tejidos específicos, especialmente en muestras de sangre y neuronas dopaminérgicas microdisecionadas provenientes de la SNpc (Filograna et al. 2020). Al respecto, un estudio analizó CN-DNAmt en 1607 gemelos e hijos únicos de 18 a 93 años de edad y encontraron una reducción más pronunciada en el CN-DNAmt en muestras de sangre en individuos a partir de los 50 años y la reducción fue más pronunciada en sujetos mayores, ellos no observaron diferencias de sexo en el CN-DNAmt ni siquiera ajustando por edad (Mengel-From et al. 2014; Takahashi et al. 2018).

Otro trabajo utilizó datos de secuenciación del genoma completo de 1511 individuos de entre 17 a 85 años y documentó que el CN-DNAmt disminuye en un promedio de 0,4 copias por año (Zhang et al. 2017).

Tanto nuestros resultados de individuos sanos en T1, como los demostrados en el estudio de Dölle y colaboradores (2016), en sustancia *nigra* en EP, muestran un aumento de número de copias con respecto a la edad. El contenido de DNAm parecería ser regulado de manera tejido-específica; ya que, en el sistema nervioso, el envejecimiento de las neuronas de la SNpc puede regular positivamente el CN-DNAm existiendo un vínculo con los niveles de delección somática del DNAm en cada célula. Aparentemente, un mecanismo neuroprotector intrínseco permite a las neuronas mantener un conjunto adecuado de moléculas de DNAm pese a la acumulación de delecciones somáticas dependientes de la edad.

Además, Tyrka y colaboradores han demostrado recientemente que el estrés en la vida temprana está asociado con un aumento en CN-DNAm, que se ha planteado como un mecanismo compensatorio de los aumentos en la demanda de energía relacionados con el envejecimiento o la reducción de la función mitocondrial.

En la literatura, los datos en relación con CN-DNAm son contradictorios y esto puede deberse a:

- ▶ Los diferentes métodos de extracción de DNA que se usan y que pueden influir en la relación DNAm:nDNA.
- ▶ El tejido del que se extraiga el DNAm.
- ▶ La metodología empleada para la cuantificación absoluta o relativa del contenido del DNAm.
- ▶ Tamaño de muestra de estudio.

La cuantificación del CN-DNAm se pueden realizar con una gran variedad de técnicas, algunas son semicuantitativas como el *Southern blot* y requieren una cantidad grande de DNA. Existen otras técnicas que utilizan enfoques de hibridación fluorescente in situ (FISH) para visualizar el contenido de DNAm con resolución de una sola célula.

En este trabajo se utilizó PCR-TR, una de las técnicas estándar más populares debido a su simplicidad. PCR-TR es la técnica más utilizada para CN-DNAm, sin embargo, es una cuantificación relativa. El PCR digital en gota (ddPCR) también

tiene un rango efectivo limitado que podría afectar la precisión al medir un alto número de copias, no obstante, proporciona una cuantificación rigurosa de CN-DNAmt sin el uso de estándares externos (Filograna et al. 2020). También existen estudios con PCR-TR cuantitativo que requieren de una curva de calibración para determinar el número de copias exacto del DNAmt en la muestra. Estudios más recientes demuestran que la cuantificación puede hacerse a partir de datos de secuenciación de nueva generación (NGS), que permite una evaluación precisa, de alta sensibilidad, y de alto rendimiento en los niveles de DNAmt, aunque aún es una técnica muy costosa (Longchamps et al. 2019).

En segundo lugar y a pesar de tener una pérdida en el número de pacientes y controles en la muestra, se encontró un aumento significativo de CN-DNAmt en los pacientes en T1 respecto a T0 y T2 respecto a T0, lo que representa el tiempo en el que los pacientes llevaban uno y dos años, respectivamente de iniciar el tratamiento dopaminérgico (CN-DNAmt  $T0 < T1$  y  $T0 < T2$ ). Además, al compararlo con el contenido de los controles, hubo diferencias significativas en T1 (aumento). La reducción progresiva del CN-DNAmt correlaciona directamente con el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EP y la EA, causados por el daño y la disfunción mitocondrial (Filograna et al. 2020; Revee, 2008; Currais et al. 2015).

En pacientes con EP en T0 se observó menor CN-DNAmt en comparación con los controles (aunque no fue significativo). Este resultado es similar a lo observado en neuronas nigrales dopaminérgicas de individuos con EP vs. controles y que, además, se asociaba con niveles significativamente más altos de deleciones del DNAmt comparados con controles (Dölle et al. 2016).

La disminución de la función mitocondrial es causada, en parte, por la reducción del número de copias, sin embargo, también participan procesos que no fueron evaluados en este trabajo, como: la acumulación de mutaciones del DNAmt, las alteraciones en la expresión de proteínas mitocondriales y la capacidad oxidativa (Kowalska et al. 2020).

Aunque, en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de individuos sanos, el CN-DNAmt aumenta con la edad; esta regulación positiva podría ser un mecanismo compensatorio en individuos con EP. En la EP, al existir una reducción de energía asociada al envejecimiento y una disminución gradual de la capacidad para contrarrestar el aumento de la producción de ROS, ello contribuiría a la vulnerabilidad de la célula al daño oxidativo (Trist et al. 2019). Aunque se estudió un tejido periférico y no necesariamente esto sea un reflejo de lo que sucede en el cerebro de los pacientes. Deberán realizarse más estudios para confirmar nuestros resultados.

El aumento en CN-DNAmt podría estar vinculado a otros eventos genéticos aberrantes, tales como mutaciones en *POLG1*, *MYC* (familia de protooncogenes), grandes deleciones, entre otros (Ruiz-Heredia et al. 2021). Así mismo, Dölle y colaboradores (2016) demuestran que en ratones se acumulan altos niveles de deleción de DNAmt debido a una polimerasa de DNAmt propensa a errores (POLG) donde se muestra un aumento concomitante en el CN-DNAmt asociado con la supervivencia nigroestriatal e incluso la resistencia a la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

Aunque todavía no se tiene evidencia sustancial que indique un proceso similar en humanos, se ha identificado que los genes que codifican factores clave del metabolismo del DNAmt están involucrados, como lo son POLG y el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM). No obstante, el mecanismo preciso por el cual la pérdida del número de copias del DNAmt contribuye al envejecimiento cerebral y a la neurodegeneración sigue sin estar claro (Dölle et al. 2016).

El factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) es una proteína codificada en el núcleo que codifica el factor de inicio de la transcripción del DNAmt, la formación de nucleoides mitocondriales y el mantenimiento de DNAmt. TFAM se une al DNAmt tanto de manera específica como no específica y es probable que ambos modos de unión contribuyan al impacto de TFAM en el CN-DNAmt (Filograna et al. 2020; Kang et al. 2018; Guyatt et al. 2019). En consecuencia, cuando hay una sobreexpresión de TFAM se aumentan los niveles de CN-DNAmt (Min et al. 2017).

Aunque también se ha encontrado que TFAM puede actuar como un represor general de la expresión de DNAMt y este efecto puede ser contrarrestado por la expresión de factores reguladores específicos de cada tejido (Bonekamp et al. 2021).

Aunque en los valores obtenidos no se observó relación entre CN-DNAMt y citocinas proinflamatorias, TFAM también tiene una participación central en la respuesta inflamatoria mediada por el estrés del DNAMt y la disminución del CN-DNAMt se asocia con varias patologías relacionadas con el envejecimiento y la inflamación (Bonekamp et al. 2021; Kang et al. 2018).

La neuroinflamación es un rasgo característico de la EP y aunque aún no se ha demostrado si causa o consecuencia de la neurodegeneración, se ha visto un aumento significativo en el nivel de los componentes inmunitarios innatos, incluidos el complemento y algunas citocinas (IL-1, IL-2, IL-6 y TNF) en la SNpc y el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con EP (De Virgilio et al. 2016). La inflamación tiene una conexión plausible entre el daño mitocondrial y el envejecimiento en enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, en la muestra de estudio no encontramos una asociación entre niveles de citocinas proinflamatorias y el CN-DNAMt.

Existen reportes que apoyan el vínculo entre la inflamación y disfunción mitocondrial; explican que la inflamación en general cursa con una producción elevada de radicales libres que afectan directamente a las proteínas mitocondriales, lípidos y al DNAMt. A su vez, el deterioro mitocondrial también produce una cantidad considerable de ROS, reduciendo así la generación de ATP y aumentando la probabilidad de muerte celular. En caso de daño o muerte celular, las mitocondrias actúan como una fuente importante de patrones moleculares asociados al daño (DAMP). Estas DAMP son señales que estimulan la respuesta inmune y pueden tener diversos orígenes; actúan mediante la participación de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) intracelulares o extracelulares para estimular una respuesta inmune y la producción de citocinas. Entre los DAMP propuestos, el DNAMt ha recibido una atención considerable debido a su efecto

inmunoestimulador en enfermedades neurodegenerativas (Dib et al. 2015; Escames et al. 2012; Sławinska & Krupa, 2021).

Por otra parte, el DNAMt circulante libre de células (ccf-DNAMt) elevado es un sello distintivo de la mortalidad en unidades de cuidados intensivos y aumenta como una respuesta directa a la activación del inflamasoma, induciendo citocinas proinflamatorias IL-6, IL-8 y IL-1b. (Nakahira et al. 2013). Aunque no existe un estudio que explore la relación entre el CN-DNAMt y la inflamación, podría pensarse que los niveles alterados de DNAMt aumentarían el estrés oxidativo y estimularían la respuesta inmune patogénica en la EP.

De manera interesante, los resultados mostraron una correlación positiva significativa entre GM-CSF y CN-DNAMt al T0 del análisis. La señalización de GM-CSF es fundamental para el mantenimiento de la masa mitocondrial ya que actúa directamente en varias vías metabólicas importantes para la proliferación celular del metabolismo citosólico y mitocondrial. GM-CSF también tiene efecto sobre la expresión de genes codificados mitocondrialmente, relevantes para la producción de ATP y la apoptosis dependiente de citocromo C. Resumiendo, GM-CSF es un regulador crítico de las funciones mitocondriales principales para la proliferación de macrófagos y supervivencia celular general (Wessendarp et al. 2021). Es posible que las altas demandas de energía en las células debido a la neurodegeneración causada por la EP, se compense con el aumento de actividad respiratoria acompañada de un aumento de la masa mitocondrial. La abundancia mitocondrial está regulada en parte por la biogénesis y algunos factores de crecimiento celulares tales como GM-CSF (Trinei et al. 2006), así al aumentar la señalización de este factor celular, también aumenta el CNV- DNAMt en pacientes, pero esto no ocurre en controles. No hay estudios previos que relacionen directamente a GM-CSF y CN-DNAMt en pacientes con EP y esto deberá explorarse en estudios futuros.

Cabe destacar que GM-CSF es un regulador importante de la respuesta inmune que contribuye a procesos de inflamación y estrés (Li et al. 2021; Favalli & Caporali, 2020). Como ya se mencionó, en la EP existe una severa inflamación local que después se hace sistémica, a consecuencia de la disminución de la función

mitocondrial. Uno podría especular que esto se asociaría con una disminución en el CN-DNAmt, que podría ser llevada al extremo gracias a una tormenta de citocinas, o debido a la neuroinflamación ya presente en la EP.

Por último, los resultados de este estudio no mostraron diferencias significativas entre el contenido del DNAmt y datos clínicos como depresión, ansiedad y deterioro cognitivo. Sin embargo, la disminución del contenido de DNAmt está ligada al deterioro de funciones mitocondriales que, en parte, también disminuyen como resultado de mutaciones de DNAmt, el daño excesivo al DNA y sistemas de reparación debilitados, y que en conjunto pueden conducir a procesos patológicos acelerados y manifestación de síntomas no motores como demencia y depresión (Kowalska et al. 2020). Recientemente, en otro estudio, Gonçalves y cols. (2021) analizaron ccf-DNAmt en 32 adultos mayores con depresión y 21 controles y demostraron que los adultos mayores que habían presentado un episodio depresivo mayor tuvieron niveles plasmáticos más altos de ccf-DNAmt que los controles no deprimidos. Este último hallazgo, resalta que una reducción en los niveles de ccf-DNAmt o en CN-DNAmt son un sello distintivo de varios trastornos neurológicos (Pyle et al. 2015). Cabe resaltar que la muerte celular apoptótica o necrótica, y la extrusión mitocondrial dan lugar a la aparición de DNAmt en el plasma también llamado ccf-DNAmt. Además, el estrés oxidativo puede promover la liberación de DNAmt en el citoplasma celular y posiblemente en el espacio extracelular (Lindqvist et al. 2017).

Mengel-From y colaboradores (2014) también asociaron un bajo CN-DNAmt con un peor rendimiento cognitivo, fuerza física, autoevaluación de salud y una mayor mortalidad, en comparación con sujetos con alto CN-DNAmt. Esto sugiere que un alto número de copias en sangre este asociado a una mejor salud y supervivencia entre los adultos mayores. En este contexto, el CN-DNAmt podría ser un indicador de mejoría relacionado a la respuesta del tratamiento dopaminérgico o de seguimiento en pacientes con EP esporádica.

La depleción del DNAmt también está implicada en enfermedades comunes como diabetes tipo 2, obesidad, miocardiopatía, diversos tipos de cánceres y trastornos

neurodegenerativos, aunque no se han establecido vínculos causales directos. Estos datos sugieren que la preservación del número de copias del genoma mitocondrial y la integridad de su secuencia pueden desempeñar un papel crucial en el reemplazo de los complejos mitocondriales dañados para mantener los niveles de ATP y preservar la viabilidad celular bajo estrés (Kang et al. 2018).

La levodopa es el estándar de oro para el tratamiento de la EP y es considerada como fármaco neuroprotector, aunque tales efectos siempre van a depender de la dosis (puede actuar como molécula prooxidante o antioxidante). En este trabajo el tratamiento con L-dopa o agonistas dopaminérgicos se asoció con el aumento significativo en el CN-DNAmt en pacientes con EP. En contraste, Chen y colaboradores (2020) evaluando 725 pacientes con EP y 744 controles, observaron una disminución importante en los niveles de CN-DNAmt a lo largo del tiempo en pacientes y un aumento en niveles de TBARS, un marcador de riesgo de estrés oxidativo. Los autores explican que hay una estrecha relación entre un menor CNV-DNAmt y una mayor dosis de dopamina administrada en pacientes jóvenes vs. controles, y una sutil baja en el CN-DNAmt en pacientes mayores. Debido a esto creemos que los agonistas dopaminérgicos tienen un efecto neuroprotector debido a la atenuación del estrés oxidativo, a dosis bajas o al inicio de la terapia dopaminérgica, ya que se ve un aumento significativo en el CN-DNAmt, pero después de 2 años de tratamiento, los procesos biológicos acordes y la terapia farmacológica ya no son suficientes para compensar esa pérdida mitocondrial y observamos una reducción en el número de copias DNAmt.

Además, a bajas concentraciones de levodopa inducen una regulación positiva del glutatión, así como de otras moléculas neuroprotectoras (Seong-Ho et al. 2009). Por otro lado, también se ha informado que la levodopa tiene potencial neurotóxico; por lo que se necesitaría hacer más investigación tomando en cuenta, el tipo de tratamiento y la posología, para confirmar estas hipótesis. Hasta ahora, los mecanismos más conocidos de toxicidad de este fármaco implican el estrés oxidativo y nitrosativo, el aumento de neurotoxinas, la oxidación de levodopa a

quinona y semiquinona, disfunción mitocondrial y daño del DNA genómico (Seong-Ho et al. 2009; Wilcox et al. 2006).

Este trabajo presenta varias limitaciones: la principal fue el tamaño de la muestra que se redujo considerablemente en T1 y T2, haciendo imposible el análisis de subgrupos o de alcanzar la significancia. Tampoco se tenía información de tratamientos concomitante de los pacientes con EP. Respecto a este último punto, existen fármacos que afectan CN-DNAmt; por ejemplo, la dapagliflozina que es hipoglucemiante, revierte la disminución del CN-DNAmt en hígado de ratones diabéticos (Belosludtseva et al. 2021).

En particular los pacientes con EP suelen presentar comorbilidades y estar en polifarmacia que incluye antidepresivos, antipsicóticos, anticonvulsivos, entre otros. Muchos de estos fármacos se han asociado con toxicidad en la cadena respiratoria mitocondrial, y probablemente podrían modular el CN-DNAmt (Hargreaves et al. 2016). Así mismo, existen factores ambientales (consumo de tabaco/alcohol, exposición a hidrocarburos aromáticos, benceno, entre otros), que en humanos y modelos de ratón han demostrado efectos en el CN-DNAmt (Rooney et al. 2015; Fetterman et al. 2013; Malik & Czajka, 2012).

## **8. Conclusiones**

En este trabajo, se encontró una diferencia significativa del CN-DNAmt entre pacientes con EP y controles pareados; sin embargo, al iniciar el tratamiento dopaminérgico se notó un aumento significativo en el contenido de DNAmt en los pacientes, que a los dos años ya no fue significativo. Debido al tamaño de muestra y la no inclusión de factores ambientales en el estudio no se pudo encontrar asociación del CN-DNAmt con otras variables clínicas, cognitivas o bioquímicas. Futuros estudios deberán verificar estos resultados; ya que, el GM-CSF mostró una significancia limítrofe y se le ha asociado con función mitocondrial.

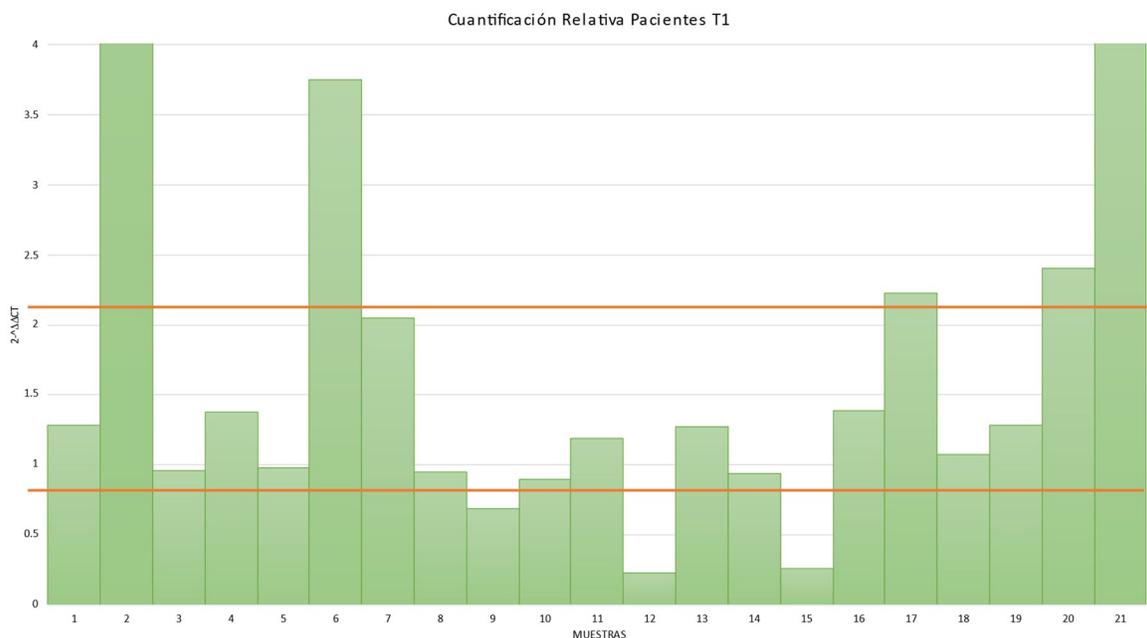
## 9. Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos, es recomendable ampliar la muestra de estudio y realizar un estudio longitudinal que incluya más factores ambientales y clínicos. Los resultados podrían complementarse con otros relojes biológicos como el epigenético y la longitud de telómeros para determinar relaciones entre el envejecimiento en la EP, su evolución, la respuesta al tratamiento, inflamación y respuesta inmunológica.

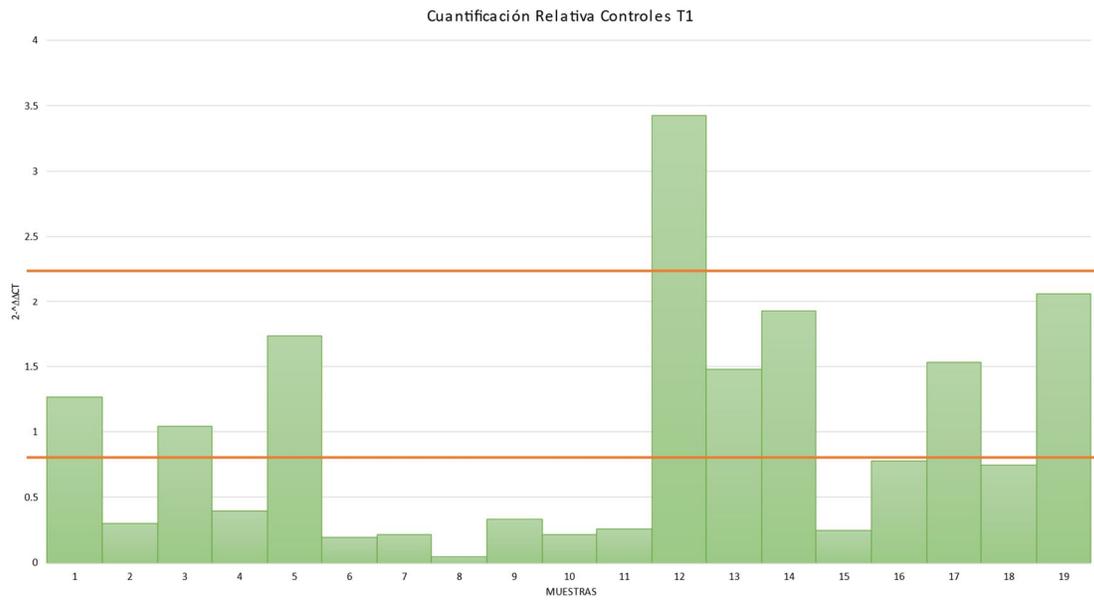
El uso de CN-DNAmt tiene potencial para convertirse en un futuro biomarcador de envejecimiento para pacientes con EP, ya que se ha probado que la toma de muestra y el análisis es reproducible, específico y sensible. Aunque los resultados obtenidos en esta muestra no fueron estadísticamente significativos, se observó una diferencia entre pacientes y controles en distintos tiempos de toma de muestra, lo que deberá confirmarse en estudios futuros.

## 10. Material complementario

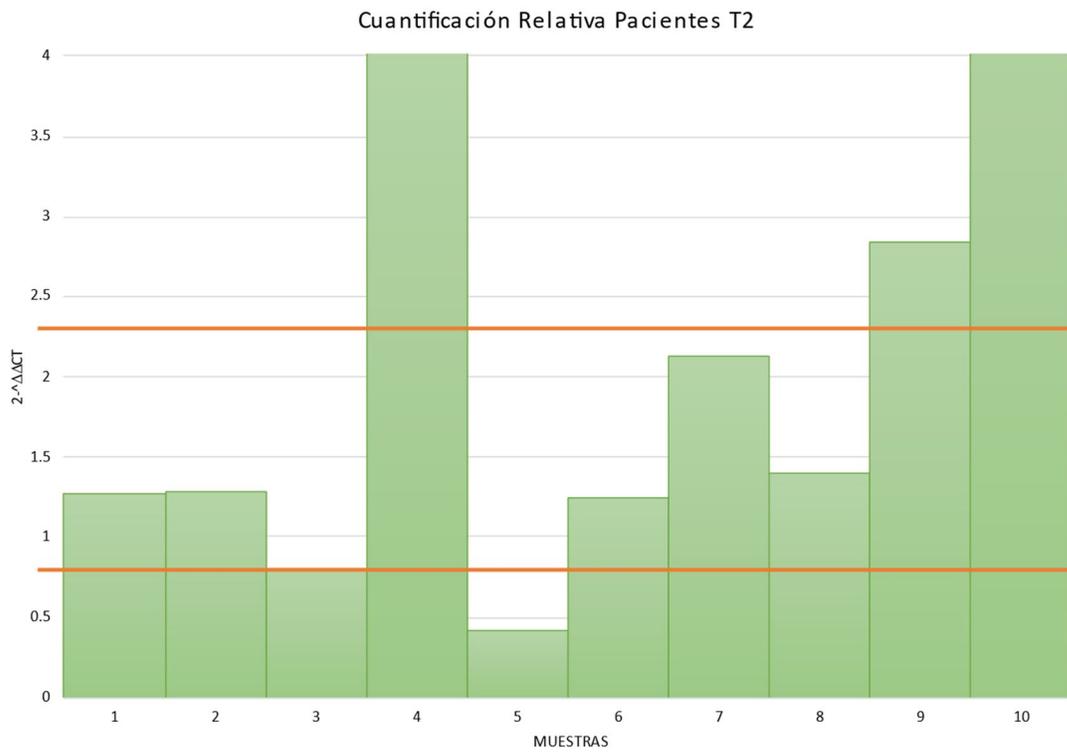
A)



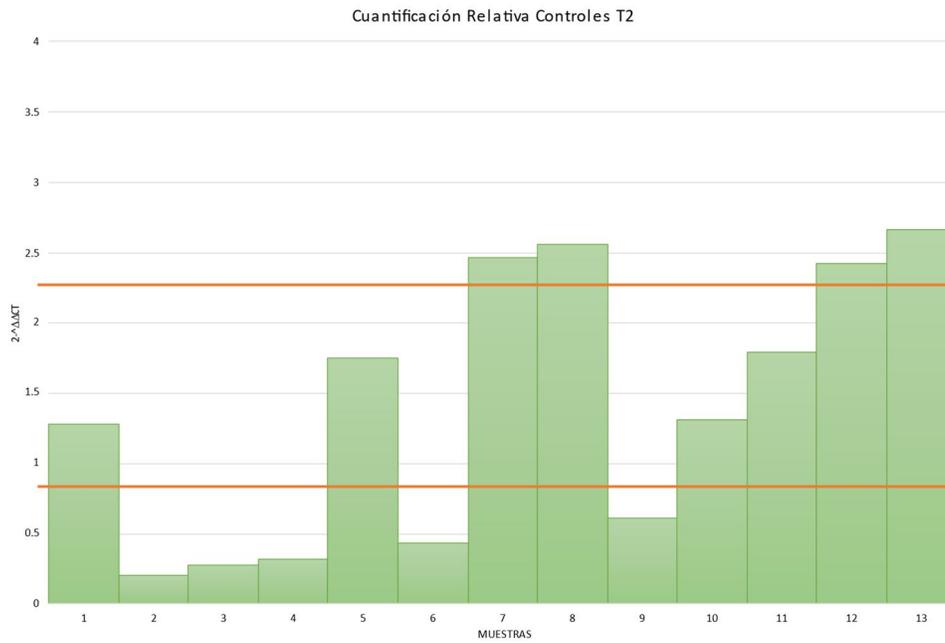
B)



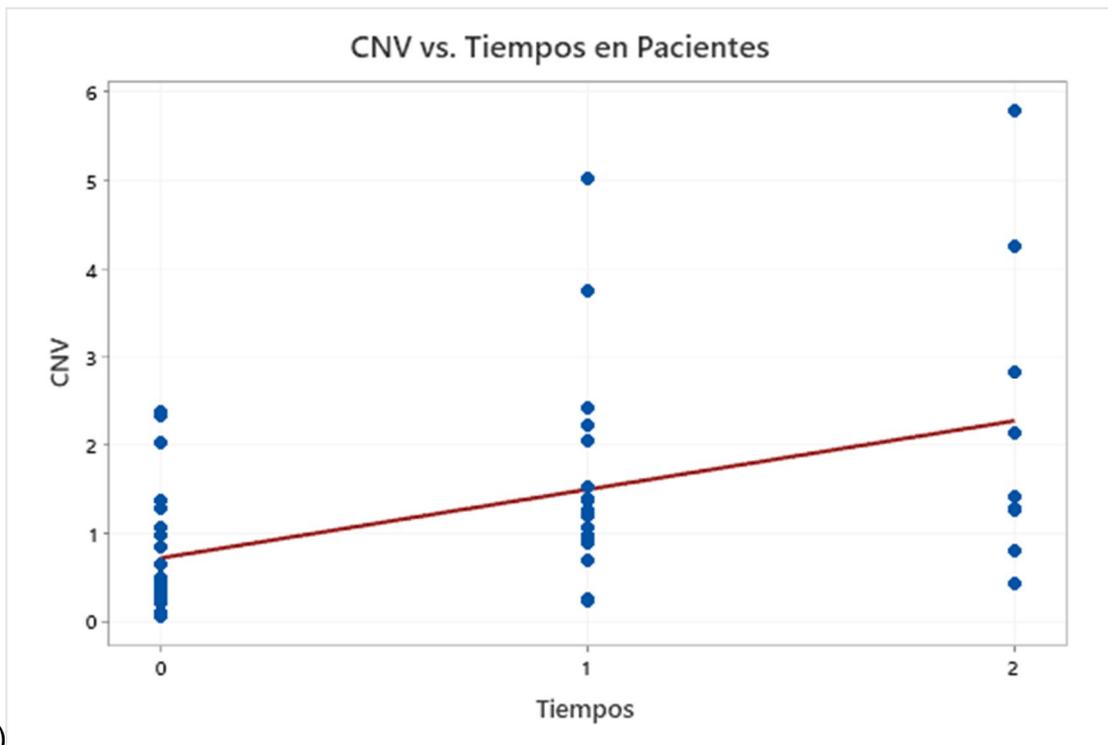
C)



D)



**Figura 22.** Gráfica de cuantificación relativa del tiempo cero de pacientes con EP y controles donde se estudia el gen MT-ND3. Muestra 1 corresponde al control sano y las líneas naranjas al intervalo de dosis normal (0.85-2.35). **A)** Pacientes con EP en tiempo 1. **B)** Controles en tiempo 1. **C)** Pacientes con EP en tiempo 2. **D)** controles en tiempo 2.



A)

B)

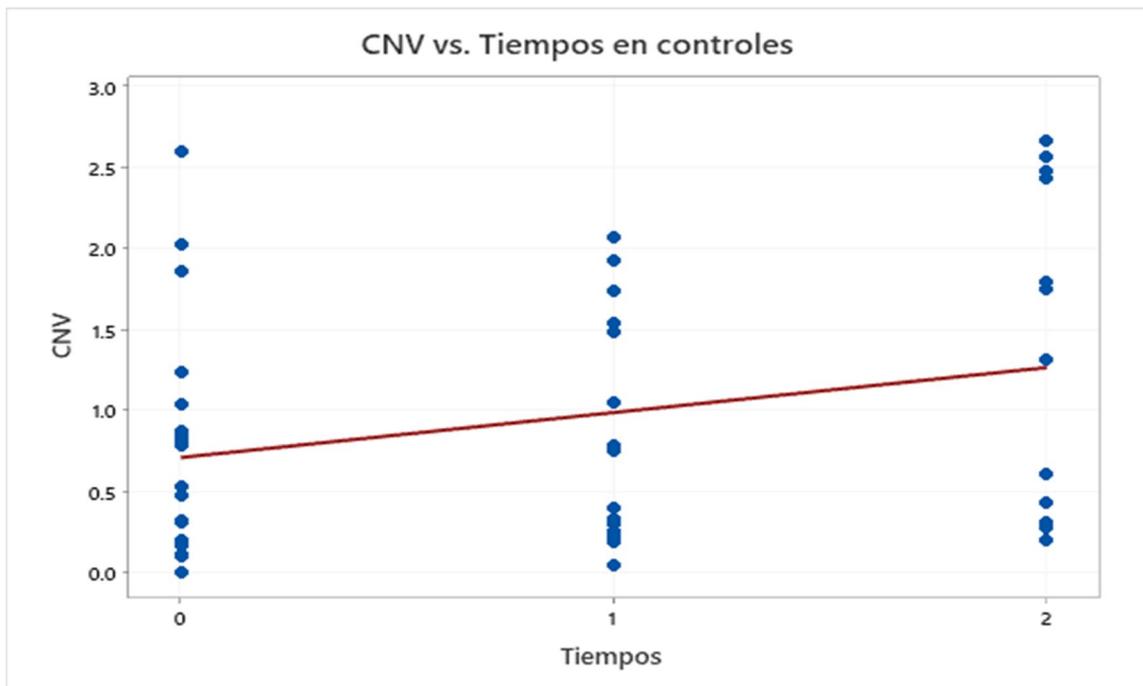
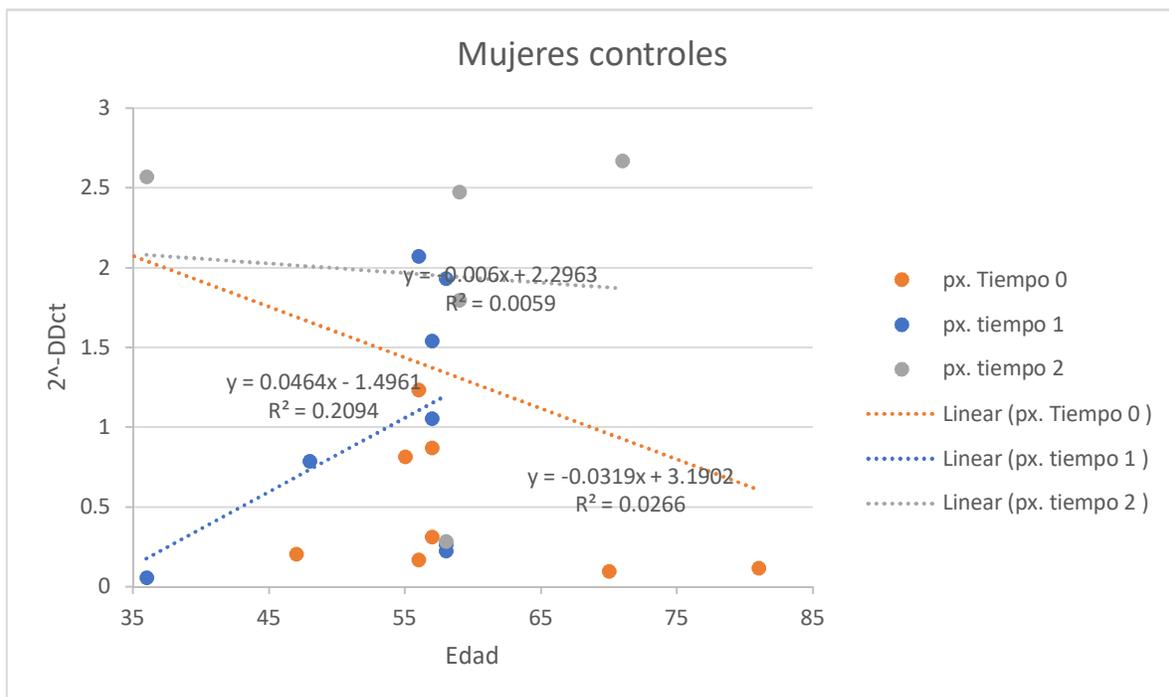
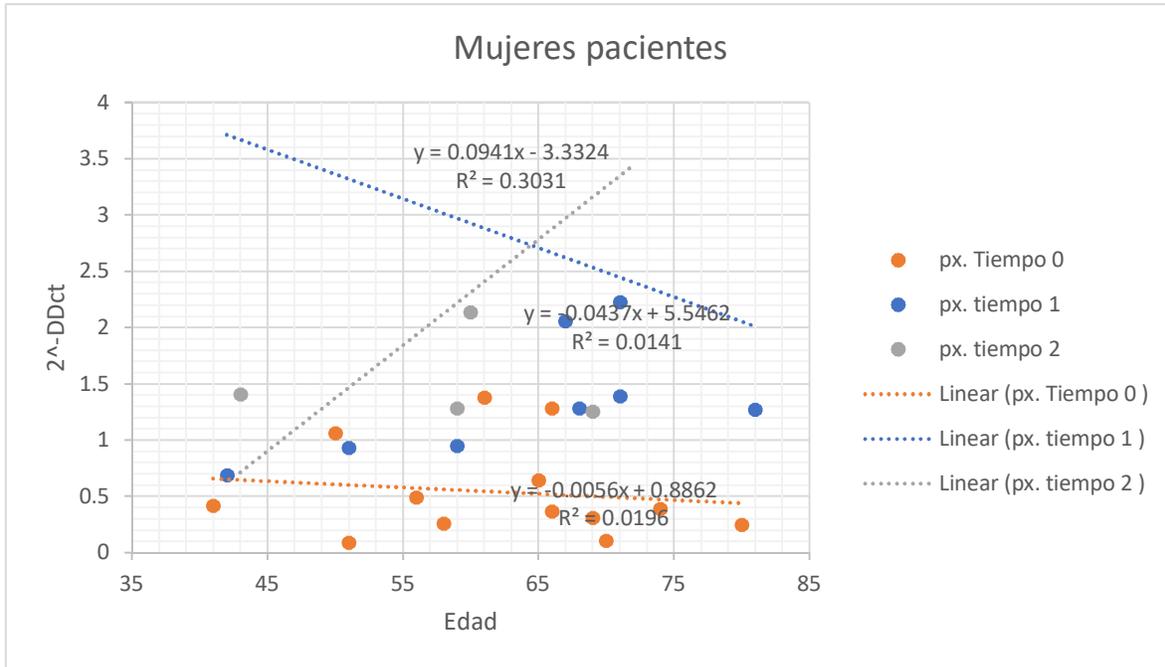


Figura 23. Gráfica de dispersión representado los tres tiempos. A) Controles. B) Pacientes

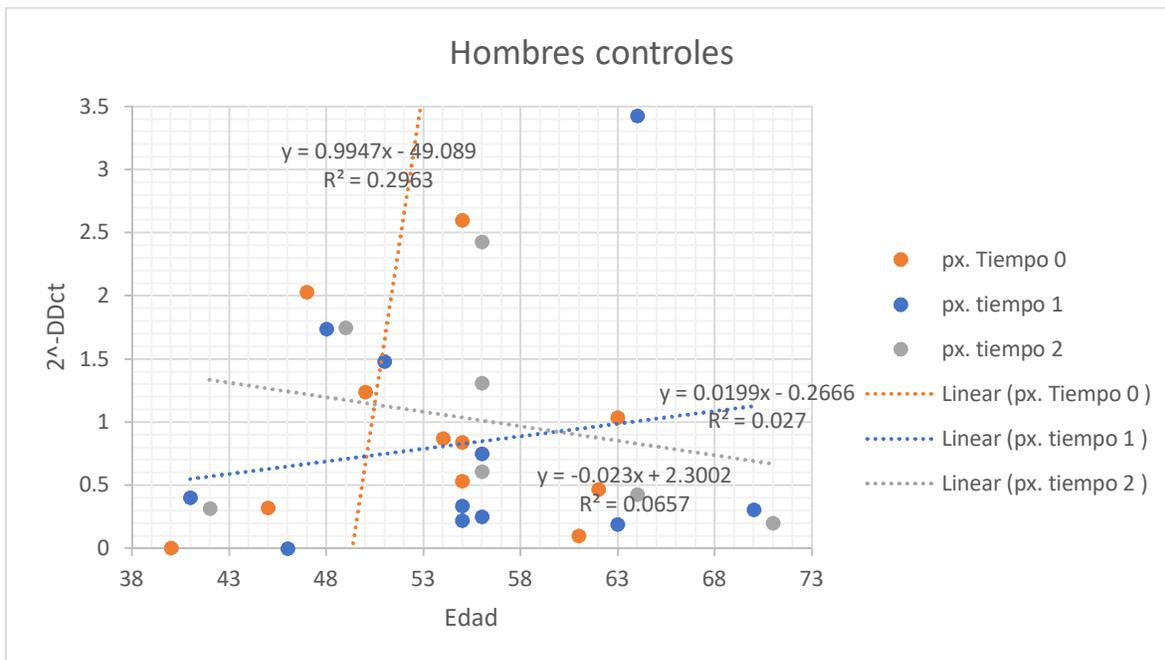
A)



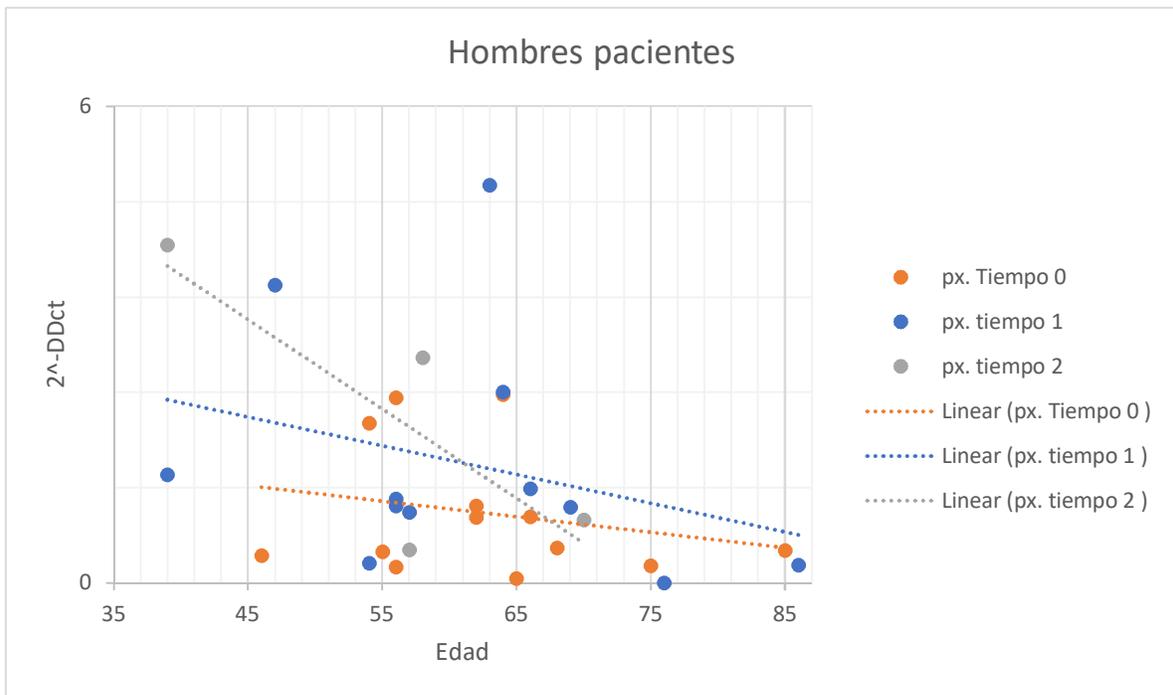
B)



C)

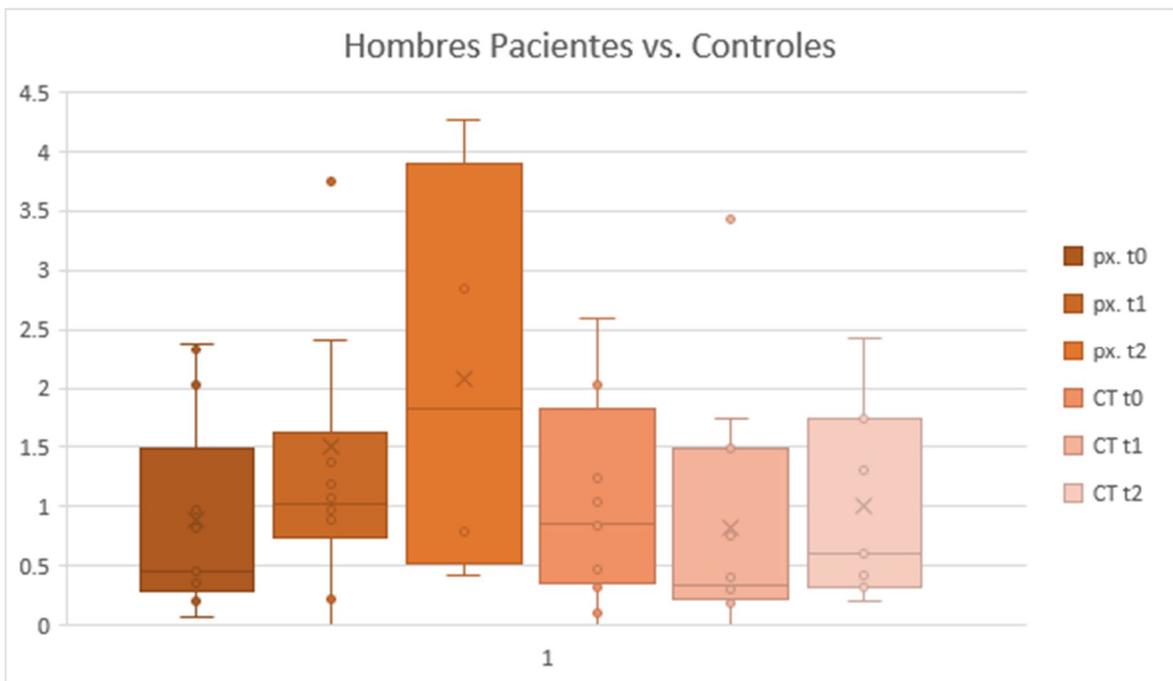


D)

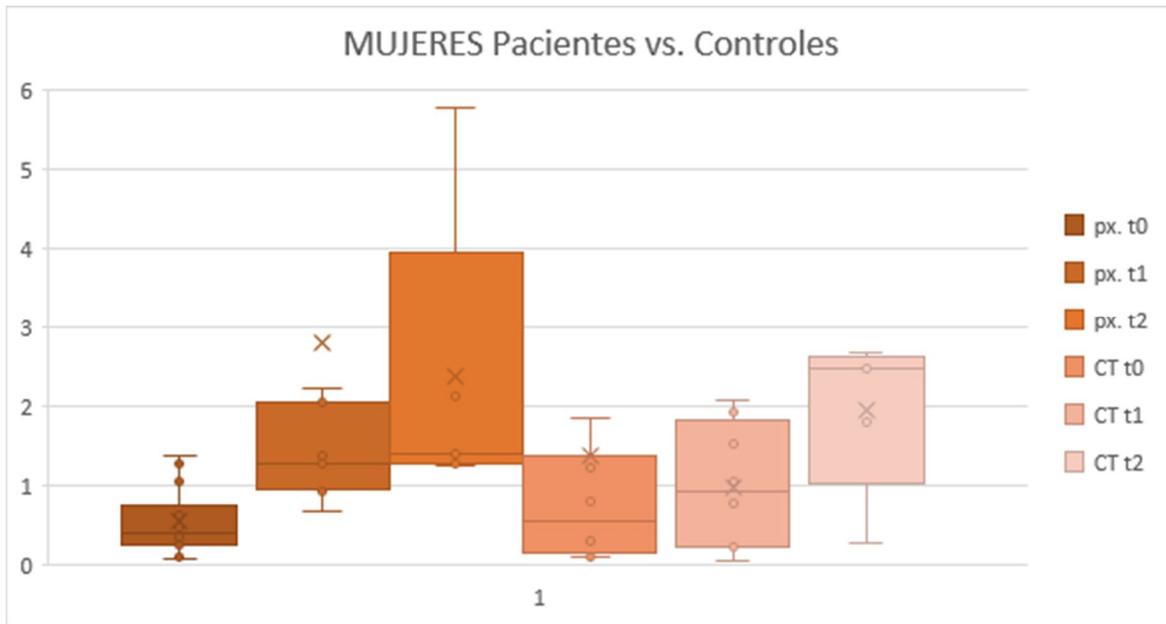


**Figura 24.** Gráfica de dispersión con regresión lineal de edad contra CN-DNAmt ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) **A)** Mujeres sanas. **B)** Mujeres pacientes EP. **C)** Hombres sanos. **D)** Hombres pacientes con EP.

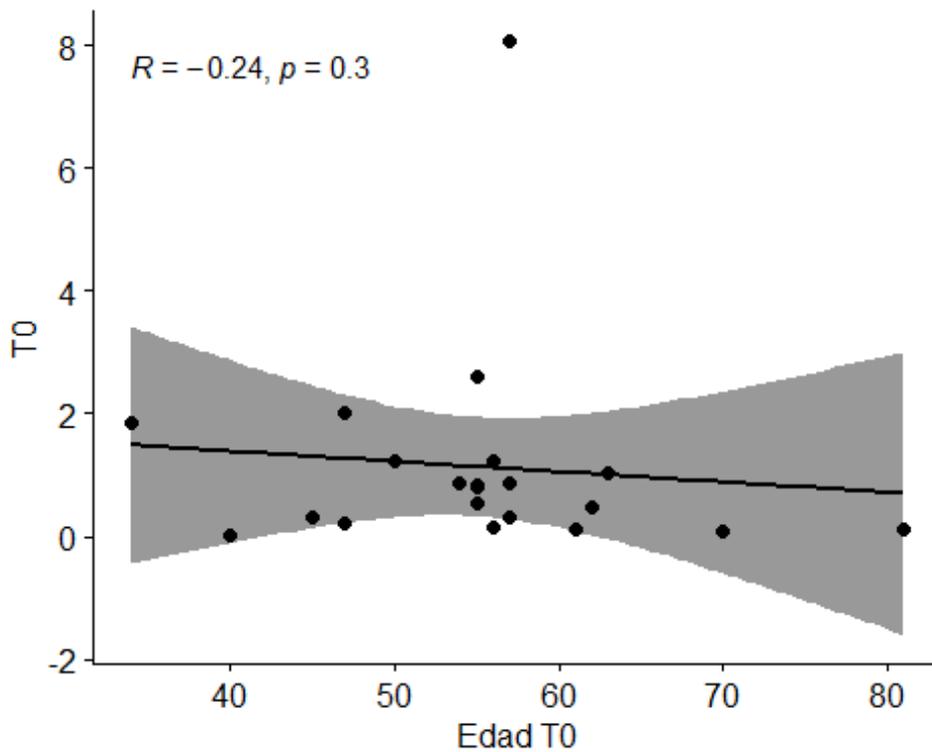
A)



B)



**Figura 25.** Gráfica de dosis relativa de *MT-ND3/TH* (número relativo de copias de DNAm<sub>t</sub> con respecto a DNA nuclear) en los tres tiempos en pacientes y controles con sus respectivas desviaciones estándar. **A)** Pacientes vs. controles hombres. **B)** Pacientes vs. controles mujeres



**Figura 26.** Diagrama de dispersión de los datos en tiempo cero de controles, n=22.

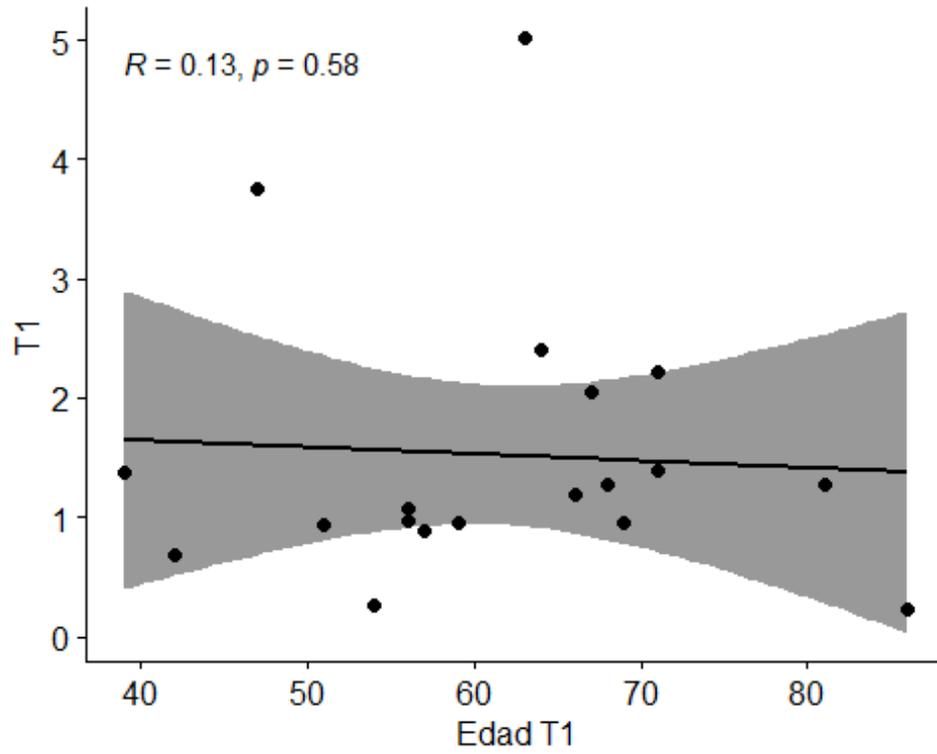


Figura 27. Diagrama de dispersión de los datos en tiempo 1 de pacientes con EP, n=20.

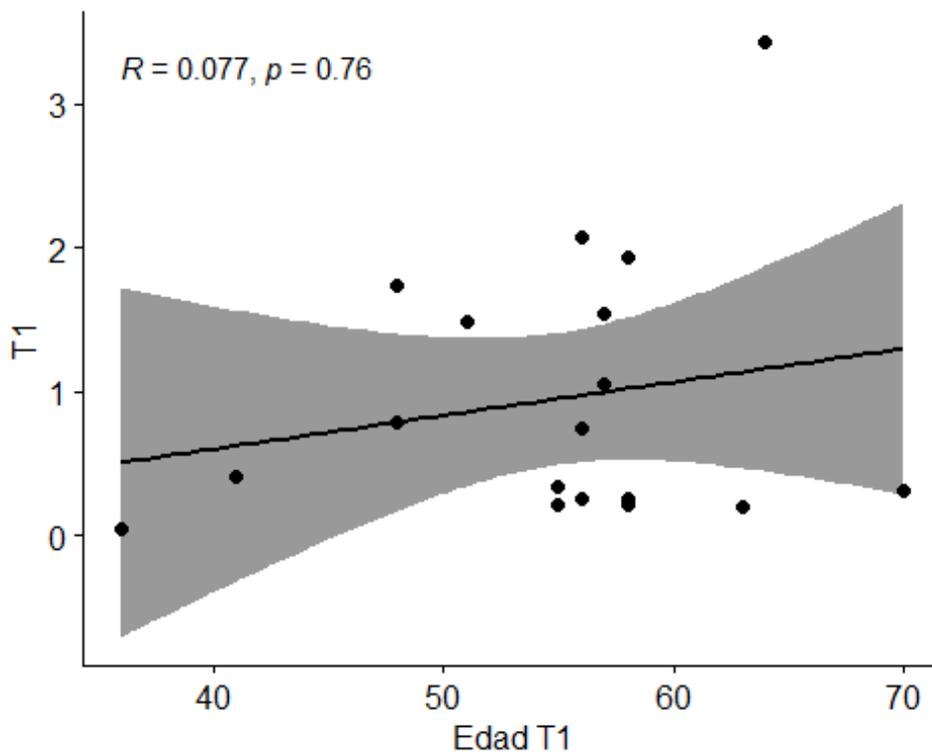


Figura 25. Diagrama de dispersión de los datos en tiempo 1 de controles, n=18.

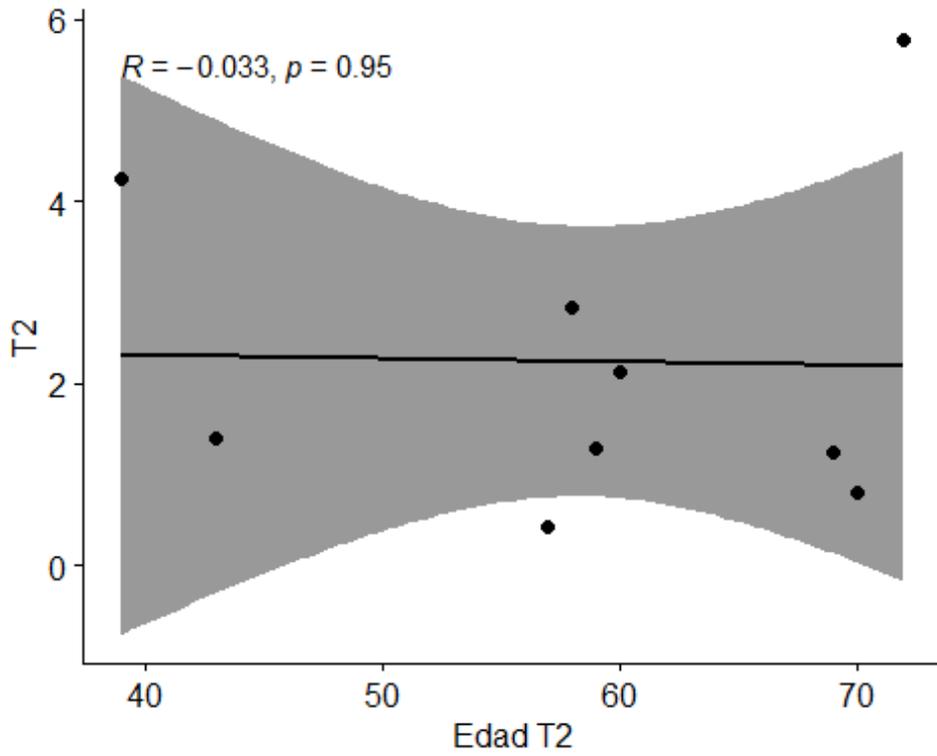


Figura 29. Diagrama de dispersión de los datos en tiempo 2 con pacientes con EP, n=9.

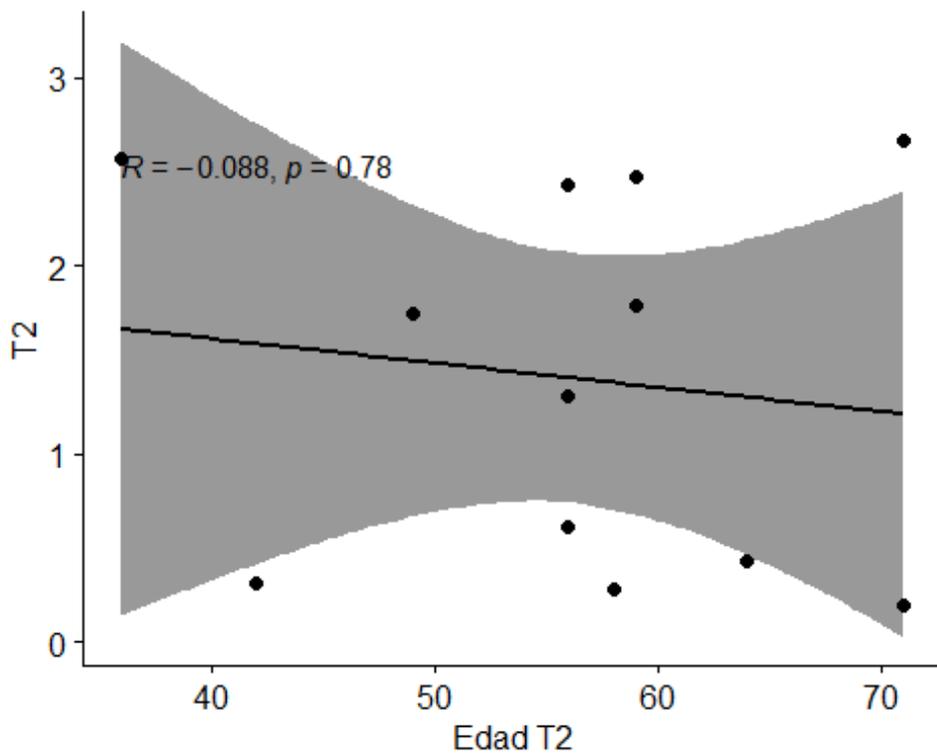


Figura 26. Diagrama de dispersión de los datos en tiempo 2 de controles, n=12

## 11. Referencias

- Alexeyev, M. (2009). Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species? *FEBS J*, 5768-5787.
- Applied Biosystems . (2010). Validación de ensayos de PCR en tiempo real . In A. Biosystems, *Curso teórico-práctico de PCR tiempo real* (pp. 202-23). Applied Biosystems & Ambion .
- Armstrong, M., & Okun, M. (2020). Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease. *Journal American Medical Association*, 323(6), 548-558. doi:10.1001/jama.201922360
- Belosludtsev, K., S Starinets, V., Belosludtsev, M., Mkheeva, I., Dubinin, M., & Belosludtseva, N. (2021). Chronic treatment with dapagliflozin protects against mitochondrial dysfunction in the liver of C57BL/6NCrl mice with high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mitochondrion*, 246-254. doi: 10.1016/j.mito.2021.06.008
- Bonekamp, N. A., Jiang, M., Motori, E., Garcia Villegas, R., Koolmeister, C. A., Mesaros, A., . . . & Larsson, N. (2021). High levels of TFAM repress mammalian mitochondrial DNA transcription in vivo. *Life science alliance*, e202101034. doi: 10.26508/lsa.202101034
- Cerri, S., Mus, L., & Blandini, F. (2019). Parkinson's Disease in Women and Men: What's the difference? *Journal of Parkinson's Disease*, 9, 501-515. doi:1.3233/JPD-191683
- Cervantes-Arriaga, A., Rodríguez-Violante, M., López-Ruiz, M., Estrada-Bellmann, I., Zuñiga-Ramírez, C., Otero-Cerdeira, E., . . . Martínez-Ramírez, D. (2013). Caracterización de la enfermedad de Parkinson en México: estudio ReMePARK. *Gaceta Médica de México*(149), 497-501.
- Chen, S. H., Kuo, C. W., Lin, T. K., Tsai, M. H., & Liou, C. W. (2020). Dopamine Therapy and the Regulation of Oxidative Stress and Mitochondrial DNA Copy

- Number in Patients with Parkinson's Disease. *Antioxidants (Basel Switzerland)*, 11, 1159. doi: 10.3390/antiox9111159
- Currais, A. (2015). Ageing and inflammation - A central role for mitochondria in brain health and disease. *Ageing Research Reviews*, 21, 30-42. doi:10.1016/j.arr.2015.02.001
- De Virgilio, A., Greco, A., Fabbrini, G., Inghilleri, M., & Rizzo Maria, I. (2016). Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation. *Autoimmunity Review*, 1-7. doi:dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2016.07.022
- Dib, B., Haijiang, L., Maidana, D., Tian, B., Miller, J., Bouzika, P., . . . Vavvas, D. (2015). Mitochondrial DNA has a pro-inflammatory role in AMD. *Biochim Biophys Acta*, 1853(11), 1-11. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.08.012
- Dölle, C. F. (2016). Defective mitochondrial DNA homeostasis in the substantia nigra in Parkinson disease. *Nature Communications*, 1-11.
- Elizono-Cárdenas, G. D.-C., & Martínez Rodríguez, H. R. (2011). Genética y la enfermedad de Parkinson: Revisión de actualidades. *Medicina Universitaria*, 13(51), 96-100.
- Escames, G., López, L. C., García, J. A., García-Corzo, L., Ortiz, F., & Acuña-Castroviejo, D. (2012). Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Human Genetics*, 131, 161-173. doi:10.1007/s00439-011-1057-y
- Favalli, E. G. (2020). GM-CSF in the treatment of COVID-19: a new conductor in the pathogenesis of cytokine storm? *The Lancet Rheumatology*, 2, 448-449. doi:10.1016/S2665-9913(20)30185-5
- Fazzini, F., Schöpf, B., Blatzer, M., Coassin, S., Hicks, A., Kronenberg, F., & Fendt, L. (2018). Plasmid-normalized quantification of relative mitochondrial DNA copy number. *Nature, Scientific reports*, 815347, 1-11. doi:10.1038/s41598-018-33684-5
- Fetterman, J., Pompilius, M., Westbrook, D., Uyeminami, D., & Brown, J. (2013). Developmental Exposure to Second-Hand Smoke Increases Adult

- Atherogenesis and Alters Mitochondrial DNA Copy Number and Deletions in apoE<sup>-/-</sup> Mice. *PLoS ONE*, 1-9.
- Filograna, R., Mennuni, M., Alsina, D., & Larsson, N.-G. (2020). Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? *FEBS Letters*, 595(8), 976-1002. doi:10.1002/1873-3468.14021
- Fries, G., Isabelle, B., Scaini, G., Wu, M.-j., Kazimi, I., Valvassori, S., . . . Quevedo, J. (2017). Accelerated epigenetic aging and mitochondrial DNA copy number in bipolar disorder. *Translational Psychiatry*, 1283. doi:10.1038/s41398-017-0048-8
- Giannoccaro, M. P., La Morgia, C., Rizzo, G., & Carelli, V. (2017). Mitochondrial DNA and Primary Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, 32(3), 346-363. doi:10.1002/mds.26966
- Gonçalves, V., Mendes-Silva, A., Koyama, E., Vieira, E., Kennedy, J., & Diniz, B. (2021). Increased levels of circulating cell-free mtDNA in plasma of late life depression subjects. *Journal of psychiatric research*, 25-29. doi:10.1016/j.jpsychires.2021.05.015
- Guyatt, A. L., Brennan, R. R., Burrows, K., Guthrie, P. A., & Ascione, R. (2019). A genome-wide association study of mitochondrial DNA copy number in two population-based cohorts. *Human Genomics*, 13:6, 1-17. doi:10.1186/S40246-018-0190-2
- Hargreaves, I., Al Shahrani, M., Wainwright, L., & Heales, S. (2016). Drug-Induced Mitochondrial Toxicity. *Drug Safety*, 1-14. doi:10.1007/s40264-016-0417-x
- Hayes, M. T. (2019). Parkinson's Disease and Parkinsonism. *The American Journal of Medicine*, 132(7), 802-806. doi:10.1016/j.amjmed.2019.03.001
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology*, 14(3156). doi:10.1186/gb-2013-14-10-r115

- INNNMVS, Gobierno de México. (2018, marzo 14). *Enfermedad de Parkinson*. Retrieved 2020, from <http://www.innn.salud.gob.mx/interna/medica/padecimientos/parkinson.html>
- Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores. (2019, Abril 11). *Parkinson, segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en personas mayores de 50 años*. Retrieved Febrero 11, 2010, from <https://www.gob.mx/inapam/es/articulos/parkinson-segunda-enfermedad-neurodegenerativa-mas-frecuente-en-personas-mayores-de-50-anos?idiom=es>
- Kang, I., Chu, C., & Kaufman, B. (2018). The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: Emerging evidence and mechanisms. *FEBS Letters*, 592(5), 793–811. doi:10.1002/1873-3468.12989
- Klein, C., & Westenberger, A. (2012). Genetics of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine*, 1-15. doi:10.1101/cshperspect.a008888
- Koh, S.-H., Kim, S. H., & Kim, H.-T. (2009). Role of glycogen synthase kinase-3 in L-DOPA-induced neurotoxicity. *Expert opinion drug metabolism toxicology*, 1359-1368.
- Kowalska, M., Piekut, T., Prendecki, M., Sodel, A., Kozubski, W., & Dorszewska, J. (2020). Mitochondrial and Nuclear DNA Oxidative Damage in Physiological and Pathological Aging. *DNA and Cell Biology*, 1410-1420.
- Li, J., Wang, P., Tracey, K., & Wang, H. (2021). Possible inhibition of GM-CSF production by SARS-CoV-2 spike-based vaccines. *Molecular Medicine*, 27. doi:10.1186/s10020-021-00313-3
- Lindqvist, D., Wolkowitz, O., Picard, M., Ohlsson, L., Bersani, F., Fernström, J., . . . Mellon, S. (2018). Circulating cell-free mitochondrial DNA, but not leukocyte mitochondrial DNA copy number, is elevated in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology*, 7, 1557-1564. doi:10.1038/s41386-017-0001-9

- Longchamps, R., CA, C., CE, N., JA, S., J, L., ML, G., & E., G. (2019). Evaluation of mitochondrial DNA copy number estimation techniques. *BioRxiv*, 1-14. doi:10.1101/610238
- López-Novoa, J. M., & Rodríguez-Puyol, D. (1997). Mecanismos de envejecimiento celular. *Nefrología*, 16(3), 15-22.
- López-Otín, C., Blasco, M., Partridge, L., & Serrano, M. (2013). The Hallmarks of Aging. *Europe PMC Funders Group*, 153(6), 1194–1217. doi:doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
- Malik, A. &. (2012). Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Elsevier & Mitochondria Research Society*, 481-495. doi:10.1016/j.mito.2012.10.011
- Mengel-From, J., Thinggaard, M., Christine, D., Ohm, K., Christensen, K., & Christiansen, L. (2014). Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells declines with age and is associated with general health among elderly. *Hum Genet*, 133(9), 1149-1159. doi:10.1007/s00439-014-1458-9
- Merck KGaA. (2020). *Mitochondrial Dysfunction*. Retrieved Enero 2021, from [https://www.merckmillipore.com/MX/es/life-science-research/antibodies-assays/antibodies-overview/Research-Areas/neuroscience/Mitochondrial-Dysfunction/L5Cb.qB.jO8AAAFQwTV1gB59,nav?\\_ga=2.12400178.721798140.1612299081-176377159.1612299081&bd=1](https://www.merckmillipore.com/MX/es/life-science-research/antibodies-assays/antibodies-overview/Research-Areas/neuroscience/Mitochondrial-Dysfunction/L5Cb.qB.jO8AAAFQwTV1gB59,nav?_ga=2.12400178.721798140.1612299081-176377159.1612299081&bd=1)
- Min, J., Sakari, T., Motori, E., Li, X., Atanassov, I., Folz-Donahue, K., . . . Larsson, N.-G. (2017). Increased Total mtDNA Copy Number Cures Male Infertility Despite Unaltered mtDNA Mutation Load. 26(2), 429-436. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.07.003
- Nakahira, K., Kyung, S., Rogers, A., Gazourian, L., Youn, S., Massaro, A., . . . Rosas, I. (2013). Circulating mitochondrial DNA in patients in the ICU as a marker of mortality: derivation and validation. *PLoS Medicine*, e1001577. doi:10.1371/journal.pmed.1001577

- Pal, S. &. (2016). Epigenetics and aging. *Science Advances*, 2(7), e1600584. doi: 10.1126/sciadv.1600584
- Picillo, M., Nicoletti, A., Fetoni, V., Garavaglia, B., Barone, P., & Pellecchia, M. T. (2017). The relevance of gender in Parkinson's disease: a review. *Journal of Neurology*, 1-26. doi:10.01007/s00415-016-8384-9
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C., Halliday, G., Brundin, P., Volkman, J., . . . Lang, A. (2017). Parkinson disease. *Springer Nature Reviews*, 3(17013), 1-21. doi:doi:10.1038/nrdp.2017.13
- Pyle, A., Anugraha, H., Kurzawa-Akanbi, M., & Yarnall, A. (2016). Reduced mitochondrial DNA copy number is a biomarker of Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 38, 216.e7-216.e10. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.033
- Pyle, A., Brennan, R., Kurzawa-Akanbi, M., Yarnall, A., Thouin, A., Mollenhauer, B., . . . Hudson, G. (2015). Reduced cerebrospinal fluid mitochondrial DNA is a biomarker for early-stage Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 78, 1000-1004. doi:10.1002/ana.24515
- Raza, C., Anjum, R., & Shekeel, N. u. (2019). Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Elsevier, Life Sciences*, 226, 77-90. doi:10.1016/j.lfs.2019.03.057
- Refnetti, P., Warren, D., & Morgenthaler, S. &. (2017). Quantifying mitochondrial DNA copy number using robust regression to interpret real time PCR results. *BioMed Central*, 1-7. doi:10.1186/s13104-017-2913-1
- Reich, S. G. (2018). Parkinson Disease. *Medical Clinics of North America*, 1-11. doi:10.1016
- Revee, A., Meagher, M., Simcox, E., Hepplewhite, P., Jaros, E., & Turnbull, D. (2013). The impact of pathogenic mitochondrial DNA mutations on substantia nigra neurons. *The journal of neuroscience*, 10790-10801.

- Rooney, J., Ryde, I., Howlett, E., Colton, M., Germ, K., Mayer, G., . . . Meyer, J. (2015). PCR based determination of mitochondrial DNA copy number in multiple species. *Methods Mol Biol*, 23-38. doi:10.1007/978-1-4939-1875-1
- Ruiz-Heredia, Y., Ortiz-Ruiz, A., Mehmet K., S., Garrido, V., Rufian, L., Sanchez, R., . . . Yu-Tzu, T. (2021). Pathogenetic and Prognostic Implications of Increased Mitochondrial Content in Multiple Myeloma. *Cancers*, 13(3), 3189. doi:10.3390/cancers13133189
- Seong-Ho, K., Seung Hyun, K., & Hee-Tae, K. (2009). Role of glycogen synthase kinase-3 in L-DOPA-induced neurotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 5(11), 1359-1368. doi:10.1517/17425250903170663.
- Slawinska, N., & Krupa, R. (2021). Molecular Aspects of Senescence and Organismal Ageing—DNA Damage Response, Telomeres, Inflammation and Chromatin. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1-16. doi:10.3390/ijms22020590
- Sliter, D. A., Martinez, J., Hao, L., Chen, x., Sun , N., Fischer, T., . . . Youle, R. (2018). Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature*, 561(77222), 258-262. doi:doi:10.1038/s41586-018-0448-9
- Takahashi, P., Jenkins, G., Welkie, B., McDonnell, B., Evans, J., Cerhan, J., . . . Ryu, E. (2018). Association of mitochondrial DNA copy number with self-rated health status. *Dove Press Journal*, 11, 121-127. doi:10.2147/TAGC.S167640
- Tanaka, T., Kobunai, T., Yamamoto, Y., Muromo, K., Otani, K., Yasuda, K. N., . . . Watanebe, T. (2017). Increased Copy Number Variation of mtDNA in an Array-based Digital PCR Assay Predicts Ulcerative Colitis-associated Colorectal Cancer. *in vivo*, 31, 713-718. doi:10.21873/invivo.11119
- Trinei, M., Berniakovich, I., Pelicci, P., & Giorgio, M. (2006). Mitochondrial DNA copy number is regulated by cellular proliferation: A role for Ras and p66Shc. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757, 624-630. doi:10.1016/j.bbabi.2006.05.029

- Trist, B., Hare, D., & Double, K. (2019). Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's Disease. *Aging Cell*, 1-23. doi:10.1111/acer.13031
- Tyrkaa, A., Carpentera, L., Kaob, H.-T., Portonb, B., Philip, N., Ridouta, S., & Ridouta, K. &. (2015). Association of Telomere Length and Mitochondrial DNA Copy Number in a Community Sample of Healthy Adults. *Experimental Gerontology*, 66, 17-20. doi:10.1016/j.exger.2015.04.002
- U. S. National Library of Medicine. (2020, Enero 21). *Genetics Home Reference*. Retrieved from Mitochondrial DNA: <https://ghr.nlm.nih.gov/mitochondrial-dna>
- Van Laar, A., & Jain, S. (2014). Non Motor Symptoms of Parkinson Disease: Update on the Diagnosis and Treatment. *Nacional Intitutes of Health*, 10 (4), 185-194.
- Wessendarp, M., Watanabe-Chailland, M., Liu, S., Stankiewicz, T., Ma, Y., Kasam, R., . . . Arumugam, P. (2022). Role of GM-CSF in regulating metabolism and mitochondrial functions critical to macrophage proliferation. *Elsevier B.V*, 85-101. doi:10.1016/j.mito.2021.10.009
- Wilcox, R., Churchyard, A., Dahl, H., Hutchison, W., Kirby, D., & Thyagarajan, D. (2007). Levodopa Response in Parkinsonism with multiple mitochondrial DNA deletions. *Official Journal of the movement disorder society*, 1020-1023. doi:10.1002/mds.21416.
- Zhang, R., Wang, y., Ye, K., Picard, M., & Gu, Z. (2017). Independent impacts of aging on mitochondrial DNA quantity and quality in humans. *BMC Genomics*, 2-14.