



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PREVALENCIA DE ALTERACIONES ESTRUCTURALES EN EL GEN *PINK1* EN LA
ENFERMEDAD DE PARKINSON DE INICIO TEMPRANO (EP-ITE)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ISABEL MOSQUEDA TAPIA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARISOL LÓPEZ LÓPEZ

VOCAL: Profesor: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

SECRETARIO: Profesor: NANCY MONROY JARAMILLO

1er. SUPLENTE: Profesor: MARÍA BENITA LEONOR FERNÁNDEZ SALGADO

2° SUPLENTE: Profesor: TZVENTANKA DIMITROVA DINKOVA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE NEUROGENÉTICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y
NEUROCIRUGÍA. MANUEL VELASCO SUÁREZ**

ASESOR DEL TEMA: M. EN C. NANCY MONROY JARAMILLO

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. MARIA ELISA ALONSO VILATELA

SUSTENTANTE: ISABEL MOSQUEDA TAPIA

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM la máxima casa de estudios, en especial a la Facultad de Química que me dio la oportunidad de ser parte de ella y que en un momento fue mi segunda casa.

A la Dra. Ma. Elisa Alonso Vilatela por permitirme participar en el proyecto y por el apoyo brindado.

A la M, en C. Nancy Monroy Jaramillo, por su incondicional apoyo, enseñanza y asesoría.

Al jurado de esta tesis por su tiempo dedicado, sus valiosas observaciones y sugerencias.

DEDICATORIAS

A mis padres Juventina y Antonio, por su dedicación, apoyo, confianza y cariño. Ustedes mi ejemplo y mi orgullo, el motivo por el que hoy estoy aquí. Todo este trabajo ha sido posible gracias a ustedes.

A mis hermanos Eloy, Maribel, Cristina, Adriana y Gabriela, con quienes comparto la dicha de una hermosa familia. Gracias por sus consejos y motivación.

A Miguel G. mi niño, por la alegría que trajiste a mi vida y recordarme que hay esperanza.

A Armando por su gran cariño e incondicional apoyo para la culminación de este ciclo.

A la familia del labo Liz, Ed, Sirley, David, Allan, Pablo, Ingrid, Beto, y todos un placer compartir tantos momentos.

A mis amigos, familiares y profesores de quienes nunca dejo de aprender.

Y a todos aquellos que me acompañaron en algún momento de este gran camino, gracias.

Abreviaturas

aa	aminoácidos
AB	Applied Biosystems
ACD	anticoagulante citrato dextrosa
AD	Autosómico dominante
AR	Autosómico recesivo
BLGR	Amortiguador de lisis de glóbulos rojos
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CMNs	células mononucleares
CNV	variación en el número de copias
ddNTPs	didesoxinucleótidos trifosfato fluorescentes
del	delección
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dup	Duplicación
EP	Enfermedad de Parkinson
EP-ITE	Enfermedad de Parkinson e Inicio Temprano
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
hm	Homocigota
ht	Heterocigota
INNNMV	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez
LD	Levodopa
LRRK2	<i>por sus siglas en inglés leucine-rich repeat kinase 2</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation dependent Probe Amplification</i>
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
<i>PINK1</i>	PTEN inducida cinasa 1 putativa (<i>PINK1</i> ; <i>PTEN-Induced Putative Kinase 1</i>)
PPD	complejo formado por PARK2, PINK1 y DJ-1
QPCR	PCR cuantitativa
SDS	dodecil sulfato de sodio
SNP	polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, del inglés <i>single nucleotide polymorphisms</i>)
TBE	Tris base, Ácido bórico , EDTA

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	3
Marco teórico.....	6
Factores de riesgo.....	6
Tratamiento farmacológico de pacientes con EP.....	8
Genética de la enfermedad de Parkinson.....	10
Genes recesivos en EP-ITE.....	12
<i>Parkina (PARK2)</i>	13
<i>PINK1 (PARK6)</i>	15
<i>DJ-1 (PARK7)</i>	18
Alteraciones estructurales.....	20
PCR en tiempo real.....	23
Parkina, PINK1 y DJ-1 en la función mitocondrial.....	25
Planteamiento del problema	31
Hipótesis	32
Objetivo.....	32
Sujetos y Métodos	33
Resultados	46
Discusión	67
Conclusiones	74
Bibliografía.....	75

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, multifactorial e incurable que ocupa el segundo lugar en frecuencia después de la enfermedad de Alzheimer. El riesgo de la EP se incrementa con la edad y se presenta en 2% de mujeres y hombres mayores de 60 años. La EP es consecuencia de la degeneración de un grupo de células nerviosas ubicadas en el área del cerebro conocida como sustancia *nigra pars compacta*, las cuales son productoras de dopamina, que como mensajero químico transmite señales hacia el cuerpo estriado, el cual se encarga de controlar los movimientos musculares.

Clínicamente, la enfermedad se caracteriza por temblor de reposo, bradicinesia o acinesia (dificultad para iniciar movimientos), rigidez e inestabilidad postural. La edad de inicio promedio de la EP es a los 60 años y se considera de inicio tardío. Existen también casos de inicio temprano (EP-ITE), donde las manifestaciones clínicas se presentan antes de los 45 años y si los síntomas aparecen antes de los 20 años se denomina EP juvenil.

Aunque la mayoría de los casos de EP son por mutaciones (esporádicos), existe un 5-10% de formas heredadas que han aportado mucha información acerca de la etiopatogénesis de esta entidad. Se sabe que las mutaciones en los genes *PARK2*, *PINK1* y *DJ-1* son causa de la EP-ITE tanto de casos esporádicos como de casos Mendelianos con patrón de herencia autosómico recesivo (AR). Estudios recientes han demostrado que estos tres genes forman un complejo de E3 ligasa de ubiquitina designado como PPD (*PARK2*, *PINK1* y *DJ-1*) que participa en el sistema ubiquitina-proteasoma y es fundamental en el correcto mantenimiento de los niveles adecuados de las distintas proteínas celulares.

En el Departamento de Genética del Instituto nacional de Neurología y neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNNMVS) se cuenta con más de 180 casos de EP-ITE. En ellos se ha estudiado la prevalencia de mutaciones de secuencia y estructurales en el gen *PARK2*, y la secuencia de *PINK1*, de las cuales en este trabajo, se amplió la base con 45 nuevas muestras de recién captura y análisis de secuencia. Existen casos con una o ninguna mutación en los dos genes anteriores que podrían presentar alteración estructural (CNVs, variación en el número de copias) en *PINK1*. El gen *PINK1* (*PTEN induced kinase*) tiene 8 exones y su producto es una serína-treonina cinasa mitocondrial. Se cree que esta proteína protege a las células del estrés inducido por la disfunción mitocondrial, protección que es eliminada cuando se presentan mutaciones en el gen. Estas mutaciones explican 0-7% de las formas esporádicas y familiares AR de la EP-ITE. El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de alteraciones estructurales en este gen recesivo en pacientes mexicanos con EP-ITE. Se analizó la dosis génica de *PINK1* en 100 muestras de pacientes con EP-ITE mediante PCR en tiempo real usando un equipo STEP ONE, AB. En el análisis de secuencia se encontraron 2 mutaciones de predicción patogénica, ambas son deleciones de una citosina. Adicionalmente, se observaron nueve variaciones estructurales de las cuales el 66.6% corresponden a deleciones y el 33.4% a duplicaciones. Es el primer trabajo en México donde se reportan duplicaciones en el gen *PINK1*.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez en 1817 por el médico inglés James Parkinson. Pertenece al grupo de padecimientos que en conjunto reciben el nombre de “desórdenes del movimiento”. Clínicamente, la enfermedad se caracteriza por temblor de reposo, bradicinesia o acinesia (es decir, dificultad para iniciar movimientos), rigidez e inestabilidad postural. Estos síntomas de la EP se desarrollan cuando los niveles de dopamina en el cuerpo estriado de los pacientes caen por debajo de 70% del nivel saludable (Hung S, et al 2006). La característica patológica de la EP comprende la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra pars compacta* (SNC) y la presencia de inclusiones proteicas insolubles denominadas cuerpos de Lewy (LB), ubicados en cualquiera de los cuerpos celulares neuronales o procesos neuronales (figura1). El componente principal de LB es una versión mal plegada de la proteína alfa-sinucleína (α -syn) la cual se expresa altamente en cerebro, y participa en la señalización presináptica y tráfico en la membrana. También hay neuronas no dopaminérgicas afectadas en la enfermedad, lo que lleva a cambios neuronales más difundidos y un cuadro clínico complejo y heterogéneo (Vercin M, et al 2012).

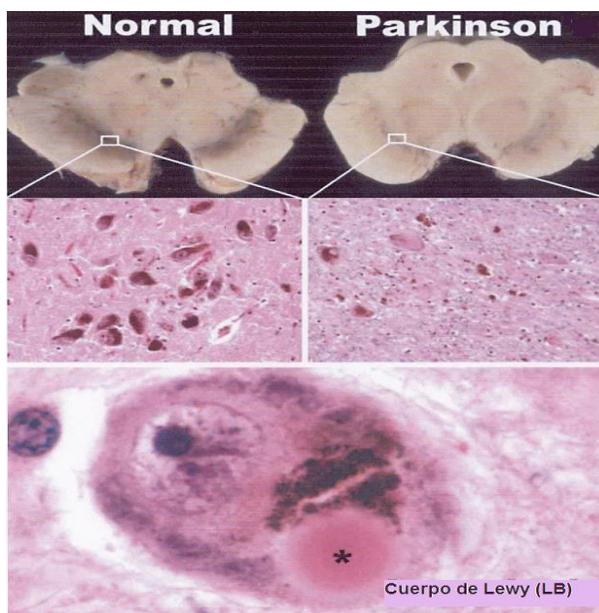


Figura 1. Apariencia de la sustancia *nigra pars compacta* (SNC), en un cerebro normal, y en un afectado con la EP. En el cerebro normal esta área se ve más oscura que en la del paciente con EP, debido a la pérdida de células dopaminérgicas. El área visto por microscopio y la representación de un cuerpo de Lewy. Tomado de Frank C, et al 2006.

En estudios epidemiológicos se ha demostrado de manera inequívoca que los individuos con síntomas comunes pero no específicos, como la disfunción autónoma incluyendo estreñimiento, disfunción eréctil o urinaria, y los síntomas neuropsiquiátricos como la depresión o hiposmia, trastornos de sueño y demencia están en mayor riesgo para desarrollar EP (Berq D, et al 2013; Khattab A, et al 2012; Ouwadamilola O, et al 2012).

La enfermedad de Parkinson tiene una evolución crónica y progresiva, y es consecuencia de la degeneración de un grupo de células nerviosas ubicadas en el área del cerebro conocida como sustancia *nigra pars compacta*. Estas células son productoras de una sustancia llamada dopamina, la cual cumple la función de un mensajero químico que transmite señales hacia otra parte del cerebro denominada cuerpo estriado, el cual se encarga de controlar los movimientos musculares finos e intencionados (Perandones C e Irisarri M 2010).

La EP es uno de los desórdenes neurodegenerativos más común, ocupa el segundo lugar en prevalencia sólo después de la enfermedad de Alzheimer, y afecta a aproximadamente del 1 al 2% de los individuos de más de 60 años y su prevalencia aumenta a aproximadamente 4% en los mayores de 85 años (Nuytemans K, et al 2010). Sin embargo, entre 5 y 10% de los enfermos presenta manifestaciones clínicas antes de los 45 años de edad y se conoce como enfermedad de Parkinson de Inicio temprano (EP-ITE). La enfermedad de Parkinson puede aparecer tanto en hombres como en mujeres, y no influye ni el nivel socioeconómico ni la situación geográfica, por lo que potencialmente puede manifestarse en cualquier persona y en cualquier parte del mundo (Drucker C 2011; Gasser T 2009). La EP causa una marcada disminución en la calidad de vida de los pacientes y supone altos costos a nivel social, familiar y económico. A nivel mundial se calcula que la EP afectó a unos 4,5 millones de personas mayores de 50 años en el 2005, y se estima que para el año 2030, esta cifra se habrá duplicado (Sundal C, et al 2012).

A pesar de la rareza general de las formas familiares de la EP, la identificación de los genes individuales vinculados a la enfermedad ha dado información crucial en los posibles mecanismos de neurodegeneración. La caracterización de las causas mendelianas de la EP ha ayudado a comprender la patogénesis de este trastorno, y a desentrañar los complejos mecanismos patogénicos como: la disfunción mitocondrial, el mal plegamiento de proteínas y el deterioro del sistema ubiquitina-proteosoma, participes en el proceso neurodegenerativo. Sin embargo, los caminos precisos que conllevan a la disfunción y degeneración dopaminérgicas son todavía muy inciertos.

Además, varias anormalidades celulares que pueden ser la base de la neurodegeneración en la enfermedad esporádica como la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, el estrés proteosómico, la neuroinflamación, y la agregación de proteínas, también se asocian con mutaciones en los genes familiares (*Vercin M, et al 2012*).

También con el fin de estudiar la patogénesis y progresión de la EP, y para probar posibles estrategias terapéuticas se han desarrollado varios modelos animales (*Ibañez P, et al 2006*). En la actualidad, se ha enfocado en la integración de las influencias genéticas, ambientales y relacionadas con la edad en los modelos más relevantes preclínicos con animales, que pueden reproducir la patología con alta fidelidad.

MARCO TEÓRICO

Factores de riesgo

Entre los factores de riesgo más comúnmente asociados con el desarrollo de la EP se encuentran la edad y el sexo masculino. El riesgo de enfermedad aumenta de una manera dependiente de la edad en todas las poblaciones estudiadas (Searles N, et al 2013). También se ha demostrado que la penetrancia de ciertas formas monogénicas de EP aumenta con la edad. Por ejemplo, la penetrancia de la mutación G2019S en *LRRK2* (cinasa 2 repetidos ricos en leucina, por sus siglas en inglés *leucine-rich repeat kinase 2*) es incompleta, pero se incrementa un 28% a los 59 años de edad y hasta 74% a los 79 años de edad (Horowitz M y Greenamyre J 2010).

Los hábitos de vida como la dieta también parecen ejercer una influencia sobre el riesgo de desarrollar EP. Hay numerosos informes de la asociación inversa entre consumo de tabaco dependiente de la dosis y la enfermedad. Aunque queda por determinar si esta protección es debido a un componente del tabaco o por una característica relacionada con los usuarios del tabaco; sin embargo, existen pruebas de que la nicotina altera diversos componentes de los sistemas dopaminérgicos y puede proteger contra la muerte de las células dopaminérgicas. De igual forma, el consumo de cafeína a partir de café y té, se asocia con una disminución en el riesgo de desarrollar enfermedad de Parkinson, de acuerdo con algunos estudios (Campdelaceu J 2012).

La investigación inicial sobre la relación entre los pesticidas y la EP se inició después de que varios jóvenes usuarios de drogas intravenosas residentes de la misma zona de California desarrollaron parkinsonismo de inicio agudo severo e irreversible. Se descubrió que se habían inyectado equivocadamente 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), una potente neurotoxina que atraviesa fácilmente la barrera hemato-encefálica debido a su liposolubilidad; en las células gliales es oxidado y convertido a través de la monoamino-oxidasa B, en 1-metil-4-fenil-piridina (MPP⁺) que es la neurotoxina activa. La MPP⁺ se concentra en la

mitocondria e inhibe el complejo I de la cadena respiratoria interfiriendo en la síntesis de ATP con el consiguiente fallo energético celular conduciendo así a la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas (*Tsuboi Y 2012*). Este trabajo proporcionó la primera prueba de que un factor ambiental, la toxina, puede producir parkinsonismo en humanos. Debido a los efectos de la MPTP en la inhibición de la función mitocondrial, esta proporcionó la primera pista de que el deterioro mitocondrial podría ser importante en la patogénesis de la EP. La toxina MPTP también proporcionó muchos modelos animales de EP a través de la interacción con el complejo I mitocondrial (*Tolleson C y Fang J 2013*). Ahora se han identificado herbicidas y pesticidas (por ejemplo, paraquat, rotenona, y maneb) y metales (manganeso y plomo) como factores que también contribuyen al desarrollo de la EP. Además, se ha observado una similitud estructural entre MPTP y el herbicida paraquat (aunque los estudios más recientes han demostrado que tienen diferentes mecanismos de toxicidad) que podría explicar su asociación con EP. Posteriores estudios epidemiológicos han encontrado una asociación entre el uso de pesticidas agrícolas y la muerte por enfermedad de Parkinson (*Horowitz M y Greenamyre 2010*). Asimismo se han descrito casos de EP que se asocian con la exposición industrial al tricloroetileno, disolvente común. Posteriormente se encontró que este compuesto provoca la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la región nigro-estriatal y la acumulación de α -syn. (*Weisskopf M, et al 2010*).

Estudios más recientes indican que las interacciones genético-ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Un ejemplo está relacionado con el citocromo P450 (CYP) 2D6, una de las superfamilias de enzimas CYP que metaboliza varios xenobióticos en el hígado, incluyendo los pesticidas organofosforados, el herbicida atrazina, y la MPTP. La actividad de *CYP2D6* está determinada genéticamente, los alelos *1 y *2 transmiten función normal, los alelos *3, *4, *5 dan como resultado una pérdida de la función, y el alelo *10 resulta en disminución de la actividad (*Tsuboi Y 2012*). Sin embargo, la

existencia de una relación entre un polimorfismo en *CYP2D6* y EP sigue siendo controvertida (Elbaz A, et al 2004).

Tratamiento farmacológico de pacientes con EP

Los enfoques terapéuticos tienen gran importancia en controlar los síntomas motores para mejorar la calidad de vida en pacientes con EP y sus cuidadores. El tratamiento del conjunto de síntomas con diversos fármacos provoca la aparición de efectos secundarios a corto y largo plazo. La expresión de los síntomas, la eficacia y la tolerabilidad de la terapia varían de un paciente a otro y se necesita de un régimen terapéutico individualizado.

La introducción de levodopa (LD) fue un avance farmacológico en el tratamiento de la EP y es esencial en un momento determinado en la vida de un paciente con EP. La LD es el compuesto más eficaz y se tolera mejor para el control de los síntomas motores en pacientes con EP. Inicialmente, la LD se administró en forma de infusión, a continuación, en forma oral, sin la inhibición de las enzimas que la degradan (Figura 1A). Más tarde la LD oral se combinó con el inhibidor de dopadecarboxilasa (DDI), reduciendo la degradación periférica de LD a la dopamina. Se prolongó la vida media plasmática de LD, lo que resultó una mejor eficacia del compuesto (Figura 1B). Los DDI tales como benserazida (BE) y carbidopa (CD) hacen que la LD no cruce la barrera hemato-encefálica por lo que su adición permite una reducción de cuatro a cinco veces la dosis oral de LD; además de disminuir los efectos secundarios periféricos como náuseas y vómitos (Müller T 2012).

Sin embargo, en el tratamiento con las terapias de reemplazamiento de dopamina, no se evita la neurodegeneración y el daño aumenta con el tiempo. Poco a poco la LD no sólo pierde su eficacia en el control del movimiento, sino que además provoca un incremento de los movimientos involuntarios. Todo esto se podría evitar si dispusiéramos de una terapia eficaz de cerebro-protección que evitara la

progresión degenerativa de la enfermedad. De aquí, la importancia de conocer la etiopatogénesis de la enfermedad para encontrar nuevos blancos terapéuticos.

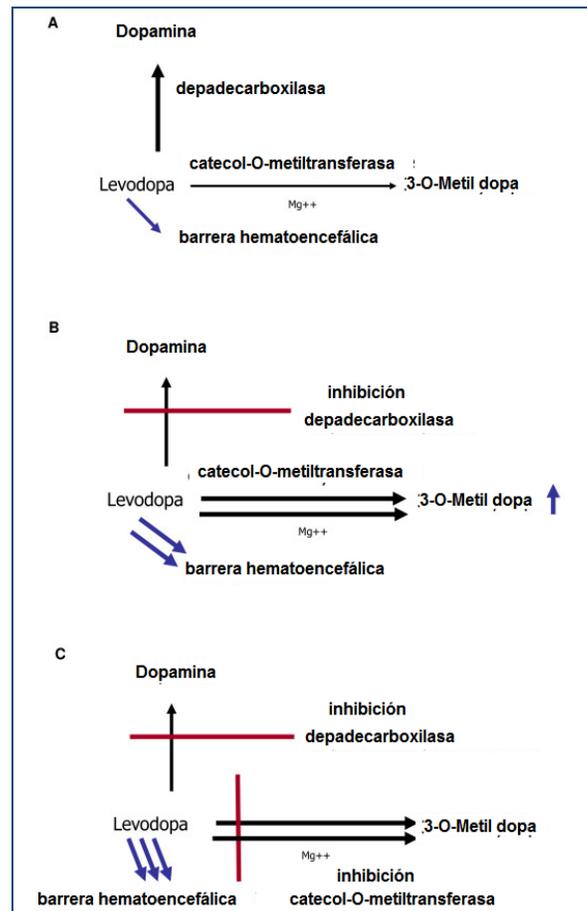


Figura 2. Tipos de degradación de LD sin (A) y con (B y C) la inhibición de las enzimas degradantes de LD. Tomado de Müller T 2012.

Hoy en día se sabe que la mayoría de los casos de EP se deben a una interacción de factores genéticos y medio ambientales. Y solo 5-10% de los casos de EP corresponden a las formas hereditarias. Muchos trabajos sugieren que la susceptibilidad genética juega un papel importante en la patogénesis de EP (Brooks J et al 2009).

Así se ha estudiado la heredabilidad en gemelos y se han realizado estudios de agregación familiar. Y de acuerdo a estos estudios, los individuos con un pariente de primer grado con EP presentan un riesgo de desarrollar la enfermedad de 2 a 14 veces mayor (de inicio tardío o temprano, respectivamente) que aquellos sin antecedentes familiares (Myrhe R, et al 2008). En un estudio de pacientes mexicanos con EP se encontró que en los casos de inicio temprano (ITE), existe un componente de susceptibilidad genético importante (Alonso ME, et al. (1986) Can J Neurol Sci **13**; 3: 248-51). Por lo tanto, la etiología de la EP es multifactorial, lo cual probablemente aplica para la mayoría de los casos de causa desconocida, aparentemente esporádicos de la EP (Cookson M et al 2012).

La comprensión de la patogénesis de la EP ha tenido avances significativos en las últimas décadas y ha sido posible gracias a la identificación de genes que participan en las formas familiares.

Genética de la enfermedad de Parkinson

Aunque la mayoría de los casos son esporádicos, actualmente se sabe que el 5-10% de los pacientes presentan una forma monogénica de la enfermedad. Se han descrito hasta la fecha, al menos, 13 *loci* y 9 genes responsables de la EP hereditaria (Tabla 1). Entre los más estudiados encontramos aquellos con herencia autosómica dominante: *PARK1*, *PARK4/α-sinucleína*, *PARK5/UCHL1*, *PARK8/LRRK2*, *PARK11/GIGYF2* y *PARK13/ Omi/Htra2*. Los genes involucrados en la producción de EP con patrón de transmisión autosómico recesivo son: *PARK2/parkina*, *PARK6/PINK1* y *PARK7/DJ-1* (Perendones C 2010 y Ibañez P et al 2006).

Los análisis detallados de estos genes han identificado una variedad de mutaciones que producen la enfermedad, incluyendo mutaciones puntuales,

deleciones y duplicaciones de exones, así como la totalidad duplicaciones de genes y triplicaciones. Estos hallazgos sugieren que la CNV (variaciones en el número de copias), un término que incluye duplicaciones o deleciones en el exón o gen, son un mecanismo importante que contribuye a la enfermedad PD patogénesis (*Pankratz N, et al 2011*).

Tabla 1. Genes y *loci* vinculados a la enfermedad de Parkinson familiar o hereditaria. Tomado y modificado de *Micheli (2006)* y *Houlden H. (2012)*.

Locus	Gen símbolo	Ubicación cromosómica	Proteína	Patrón de transmisión *	Cuerpos de Lewy
PARK1	SNCA	4q22.1	α -sinucleína	AD	SÍ
PARK2	PARK2	6q25.2-q27	Parkina	AR	>NO
PARK3	PARK3	2p13	Desconocida	AD	SI
PARK4	SNCA	4p15	α -sinucleína	AD	SI
PARK5	UCHL1	4p14	UCH-L1	AD	¿?
PARK6	PINK1	1p36.12	PINK1	AR	SÍ
PARK7	DJ-1	1p36.23	DJ1	AD	¿?
PARK8	LRRK2	12q12	Dardarina	AD	NO
PARK9	ATP13A2	1p36.13	Desconocida	AR	¿?
PARK10		1p32	Desconocida	¿?	¿?
PARK11	GIGYF2	2q37.1	Desconocida	AD	¿?
PARK14	PLA2G6	22q13.1	Fosfolipasa A2, grupo IV	AR	¿?
PARK15	FBX07	22q12.3	F-box proteína 7	AR	¿?
PARK17	VPS41	7p14	Proteína vacuolar	AR	¿?

- AD: autosómico dominante; AR: autosómico recesiva

Genes recesivos en EP-ITE

Es necesario resaltar que la edad es el factor de riesgo más prominente para desarrollar la EP. Sin embargo, se han reportado casos de enfermedad de Parkinson de inicio temprano en formas familiares y esporádicas. Las formas familiares de EP-ITE presentan un patrón de herencia autosómico recesivo y son causadas por mutaciones en los genes *PARK2*, *PINK1* y *DJ-1*. La prevalencia de mutaciones en estos genes varía en los diferentes estudios. En Tablas 2 y 3 se presentan algunos datos de frecuencias de mutaciones de los 5 genes más estudiados.

Tabla 2. Frecuencias relativas de mutaciones dependientes del origen étnico y la historia familiar. Tomado de *Nuytemans K, et al 2010*.

Origen étnico		SNCA (%)		LRRK2 (%)		PARK2 (%)			PINK1 (%)		PARK7 (%)	
		Clásico	CNV	Clásico	CNV	Clásico	mixto	CNV	Clásico	CNV	Clásico	CNV
Caucásico	F	4.13	2.07	67.36	0	10.12	3.51	7.44	3.93	0.21	0.83	0.41
	S	0.99	0.33	52.48	0	18.15	2.97	11.88	10.89	0.33	0.99	0.66
Asiático	F	1.01	8.08	9.09	0	9010	9010	42.42	17.17	0	3.03	0
	S	0	3.13	10.42	0	28.13	1.04	38.54	17.71	1.04	0	0
Árabe	F	0	0	88.61	0	1.27	1.27	3.80	3.80	1.27	0	0
	S	0	0	97.06	0	1.47	0	0.74	0	0	0.74	0
Latinoamericano	F	0	0	57.14	0	14.29	4.76	23.81	0	0	0	0
	S	0	0	41.67	0	41.67	0	8.33	0	8.33	0	0
Judíos Ashkenazi	F	0	0	100.00	0	0	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	98.04	0	0	0	0	0	0	1.96	0

(%) Número de portadores la de mutación / número total de portadores de mutaciones relacionadas .Cada fila de esta tabla es igual a 100%. CNV: variación en el número de copias.

Tabla 3. Estimación de incidencia por mutaciones en genes conocidos en EP.

Mutación en gen	EP familiar (%)	EP esporádico (%)
Parkina	20-30	5-10
<i>PINK1</i>	1-7	< 0.5
<i>DJ1</i>	1-2	0-1
<i>LRRK2</i>	5-10	2

Modificado de Baylor College of Medicine. Houston, Texas, Department of Neurology. Parkinson's Disease Research Laboratory.

a) Parkina (*PARK2*)

El gen de la parkina fue caracterizado por *Kitada et al.* 1998. Este gen codifica para parkina, una proteína de 465 aminoácidos que presenta un dominio de ubiquitina en el extremo amino terminal y una estructura RING1-(IBR)-RING2 en el extremo carboxilo terminal. Esta característica estructural une la proteína parkina con el sistema ubiquitina-proteosoma ligasa E3 (*Myhre R, et al* 2008).

Es uno de los genes más largos del genoma humano mide 1,4 Mb. Se localiza en el cromosoma 6q25.2-q27, en una región genómica altamente inestable. Las mutaciones puntuales y los cambios estructurales en los exones de parkina son las causas genéticas más comunes en la EP-ITE y explican ≈18% de los casos esporádicos y 50% de los casos familiares (*Brooks J, et al* 2009).

Las mutaciones en *parkina* explican la mayoría de los casos de aparición temprana de enfermedad de Parkinson familiar, y más de 100 mutaciones diferentes han sido identificadas en este gen. Las mutaciones puntuales y deleciones se presentan en cualquier combinación; de manera homocigota,

heterocigota compuesta o heterocigota simple. Las mutaciones heterocigotas simples son difíciles de interpretar en términos de causalidad. También hay informes de que algunos polimorfismos de nucleótido único (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphisms*) en *parkina* pueden contribuir a algunos casos de EP esporádica. Clínicamente, las mutaciones en *parkina* se asocian a la EP con un inicio más temprano (en los años 30), una buena respuesta a LD y un curso benigno. En contraste con la típica EP, los casos de *parkina* por lo general, no presentan cuerpos de Lewy en la sustancia negra (aunque se han reportado casos en pacientes heterocigotos) (Horowitz M y Greenamyre J 2009).

Desde su descubrimiento, varios estudios han informado frecuencias altas de mutaciones en un solo alelo así como pequeños y largos cambios estructurales han sido identificados en *PARK2* como responsables del 10% de EP-ITE, dependiendo de la población analizada. Las mutaciones heterocigotas en este gen son frecuentemente identificadas lo que sugiere que éstas puede ser un factor de riesgo para la EP (Toft M, et al 2007). La asociación no está clara ya que algunas de las variantes también pueden encontrarse en controles con frecuencias similares.

Clínicamente los fenotipos homocigotos y heterocigotos en *PARK2* son indistinguibles, con lenta repuesta de LD y más adelante complicaciones locomotoras (Houlden H, et al 2012).

La pérdida de función de *parkina* puede contribuir a la etiología de la EP ya sea mediante la interrupción de la función normal del sistema ubiquitina-proteosoma en la depuración de agregados de proteínas o mediante la desactivación de un mecanismo mitocondrial protector mediada por la función de señalización de *parkina*, contribuyendo a la consecuente disfunción mitocondrial (Horowitz M y Greenamyre J 2010).

b) *PINK1* (PARK6)

Valente et al. (2004) determinaron que codifica para una proteína mitocondrial de 581 aminoácidos. PTEN inducida cinasa 1 putativa (*PINK1*; PTEN-Induced Putative Kinase 1), es altamente homóloga a la cinasa de residuos de serina-treonina de la familia de calcio/calmodulina y tiene un dominio de cinasa altamente conservado (Valente E, et al 2004). El gen se localiza en el cromosoma 1p36.12, posee 8 exones y mide 18Kb.

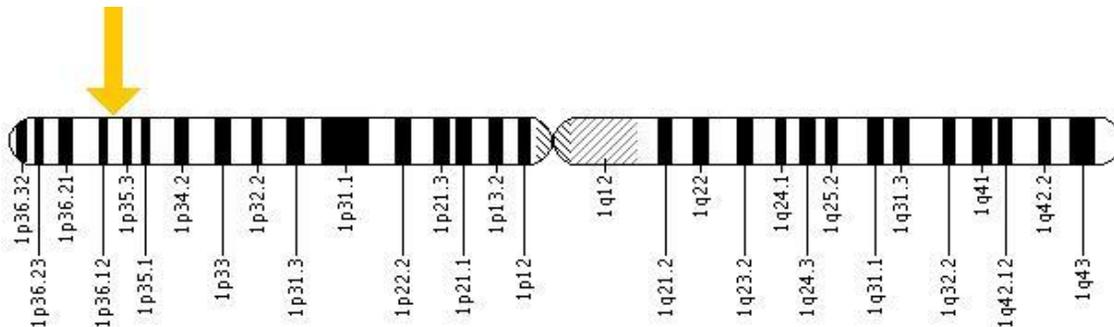


Figura 3. El gen *PINK1* se localiza en el brazo corto (p) del de cromosoma 1 en la posición 36. Abarca de la posición nucleotídica 20.959.947 a 20.978.003 en el cromosoma 1 (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PINK1>).

Las mutaciones en este gen conducen a una disfunción mitocondrial, dañando a las neuronas por la tensión inducida por la apoptosis (Brooks J, et al 2009; Groen L, et al 2004; Ibañez P, et al 2006). Las mutaciones en *PINK1* causan una forma rara de parkinsonismo autosómico recesivo que es tanto clínica como neuropatológicamente similar al parkinsonismo debido a mutaciones en parkina. La mayoría de las mutaciones se producen dentro o cerca del dominio de cinasa y en consecuencia interrumpen la actividad de la proteína, lo que sugiere que la pérdida de la actividad cinasa juega un papel crucial en la patogénesis de la EP (Horowitz M y Greenamyre J 2010; Saera S, et al 2013).

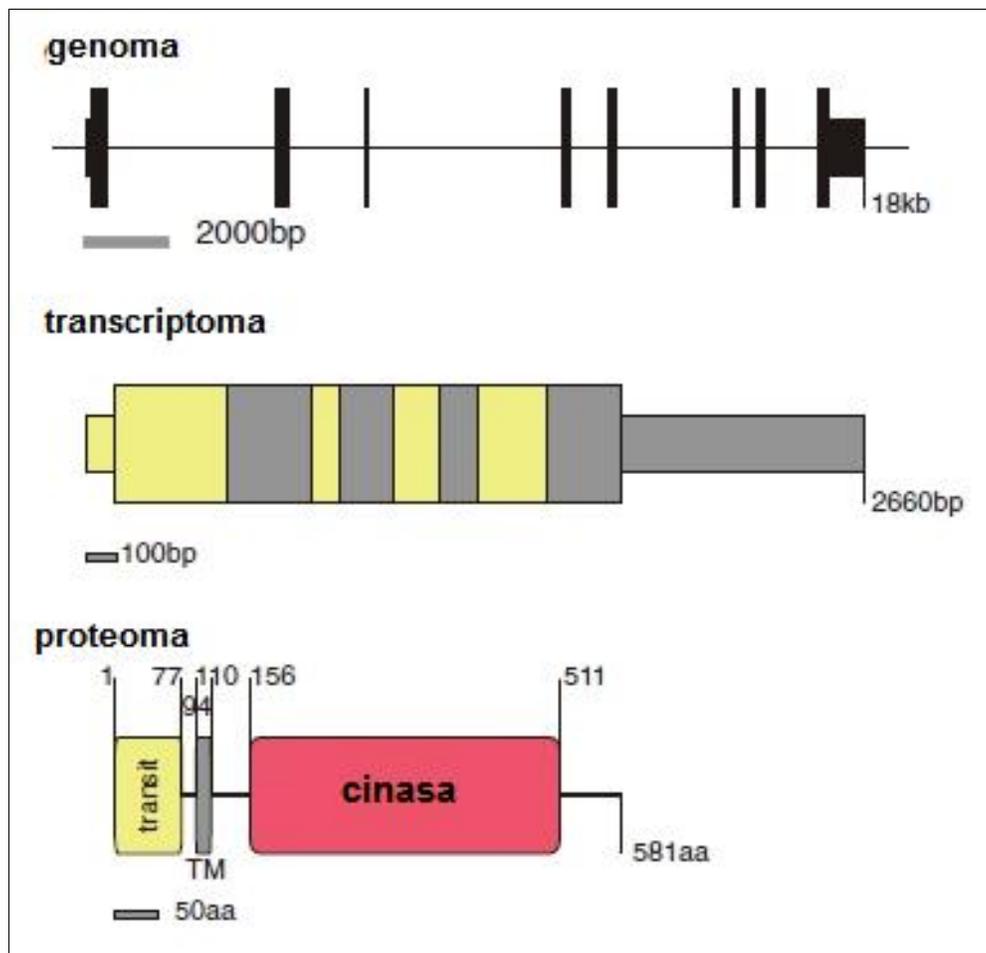


Figura 4. Representación de PINK1 a nivel genómico, de transcriptoma y exhibiendo los dominios funcionales de la proteína; una secuencia de dirección mitocondrial (transito) en color amarillo, un dominio transmembrana (TM) de color gris y de rojo el dominio cinasa. Tomado *Nuytemans K. et al 2010*.

Las primeras mutaciones en *PINK1* fueron identificadas en tres familias afectadas de EP-ITE, consanguíneas de Sicilia, Italia y de España. Actualmente se han encontrado mutaciones en este gen en familias procedentes de varias poblaciones europeas y asiáticas, haciendo a *PINK1* el segundo gen más común conocido después de parkina en causar EP-ITE. La frecuencia de mutaciones en este gen varía entre 1 y 9% dependiendo del grupo étnico. Sin embargo, también se han identificado mutaciones en pacientes con EP esporádica, incluyendo mutaciones heterocigotas de patogénesis desconocida. Es necesario resaltar que hay

evidencias de que los portadores de mutaciones heterocigotas de *PINK1* podrían tener un mayor riesgo de desarrollar parkinsonismo (*Brooks J, et al 2009; Toft M et al 2007; Ibañez P, et al 2006; Houlden H y Singleton A 2012*). Aunque aún no está claro hasta qué punto una sola mutación en *PINK1* es un factor de riesgo para el desarrollo de EP.

En un reciente estudio se ha llevado a cabo exámenes neuropatológicos en tejido de cerebro de un paciente, el cual presentaba mutaciones heterocigotas en *PINK1*, encontradas en una larga familia española. El paciente estaba bajo tratamiento con LD, y presentó síntomas psiquiátricos, en el análisis post-mórtem se reveló pérdida neuronal en la sustancia *nigra pars compacta*, cuerpos de Lewy y neuritas aberrantes en los núcleos del tronco cerebral. Estas características fueron similares con la EP idiopática o de causa desconocida (*Houlden H y Singleton A 2012*).

Estudios subsecuentes en moscas revelan que la presencia de mutaciones en *PINK1* en *Drosophila* comparte muchas características con la EP en humanos, incluyendo la deficiencia motora, la pérdida neuronal y las anomalías mitocondriales, por lo que ha sido un modelo de estudio muy importante. Otro trabajo en *Drosophila* sugiere que *PINK1* participa en la regulación de la dinámica mitocondrial (*Kondopalli, et al 2012*).

Es necesario resaltar que los pacientes con EP debidos a mutaciones en *PINK1* muestran la aparición temprana de la enfermedad por lo que se considera en EP-ITE. Sus fenotipos clínicos también son algo diferentes de las de los pacientes de EP esporádicos y de aparición tardía. En la EP-ITE hay buena respuesta al tratamiento con LD, disfonía al inicio de síntomas y menor deterioro cognitivo. Exactamente la contribución que tienen las mutaciones en *PINK1* para causar los síntomas clínicos por mutaciones se desconoce (*Hung S, et al 2006*).

La proteína *PINK1* tiene una región auto-reguladora en el C-terminal, un dominio catalítico; un dominio de cinasa de residuos de serina-treonina altamente conservado y un péptido de direccionamiento mitocondrial N-terminal (Figura 3).

PINK1 tiene dos isoformas con masa molecular de 66 kDa y 55 kDa, detectadas en extractos de cerebro humano. Ambas isoformas se localizan en las membranas mitocondriales interna y externa. (*Beilina et al.*, 2005).

La función de la proteína PINK1 todavía no se ha determinado, pero su ubicación en la mitocondria sugiere que puede fosforilar a las proteínas mitocondriales y en respuesta al estrés celular proteger contra la disfunción mitocondrial. Se ha observado mayor nivel de expresión en corazón, músculo esquelético y los testículos. PINK1 es la primera proteína que se vincula directamente con anomalías mitocondriales a un fenotipo de EP (*Silvestri L, et al 2005*).

Recientemente se ha demostrado que PINK1 interactúa genéticamente con parkina en sistemas organismos modelo *Drosophila*, donde las mutaciones que causan pérdida de función en estas proteínas, dan como resultado mitocondrias hinchadas y degeneradas (*Exner N, et al 2007*). También la interacción entre estas dos proteínas es apoyada en estudios celulares, por ejemplo en células HeLa donde la despolarización mitocondrial y morfología anormal son apreciables, indicando que las dos proteínas actúan en una vía en común (*Yang Y, et al 2006*; *Xiong H, et al 2009*).

c) DJ-1 (PARK7)

En el 2003 *Bonifati V* identificó a *DJ-1* también conocido como PARK7, fue identificado como un *locus* para el desarrollo de la EP-ITE de forma autosómica recesiva. *DJ-1* codifica para un producto de 189 aa que pertenece a la familia de proteínas peptidasas C56. El gen se encuentra en el cromosoma 1 en el *locus* 1p36.23, con una longitud de 1088pb y tiene 7 exones.

Las deleciones o mutaciones de sentido erróneo en este gen conducen a la pérdida de función. Estas mutaciones se identificaron por primera vez en italianos y en otras familias europeas (*Bonifati V, et al 2003*).

No obstante, las mutaciones en *DJ-1* son raras, presentándose en 1-2% de los casos con EP-ITE. En un estudio, las mutaciones en los genes *PINK1* y *DJ-1* representaron el 6.9% y el 3.4%, respectivamente (Ji-Fen G, et al 2008). Clínicamente, no hay diferencias obvias entre los pacientes con diferentes mutaciones en *DJ-1*, y son indistinguibles de los pacientes con mutaciones en *parkina* y *PINK1*, por lo que no se puede juzgar completamente el genotipo mediante el fenotipo clínico (Kim S, et al 2012).

DJ-1 es una proteína citoprotectora ubicua sensible a procesos redox. *DJ-1* posee diversas funciones como regulador transcripcional, chaperona molecular, y proteína de unión a ARN. Bioquímicamente *DJ-1* es fácilmente oxidante en respuesta a demasiados estímulos oxidativos, las isoformas ácidas de *DJ-1* se acumulan en los cerebros de los pacientes con EP idiopática y la enfermedad de Alzheimer (Kim S, 2012).

A pesar de estas incertidumbres, *DJ-1* representa la tercera proteína participe en la disfunción "mitocondrial" (después de *parkina* y *PINK1*) cuya pérdida de función da como resultado un síndrome parkinsoniano, contribuyendo así a reforzar el concepto de que la disfunción mitocondrial es fundamental para la patogénesis de la EP (Horowitz M y Greenamyre J 2010). *DJ-1* también puede funcionar como una chaperona sensible a redox, como un sensor para el estrés oxidativo por ser sensible a H_2O_2 , y así proteger a las neuronas contra el estrés oxidativo y la muerte celular (Gaser T 2009). Asimismo se planteó la hipótesis adicional de que *DJ-1* podría ser parte de un complejo de ligasa E3 de ubiquitina junto con *parkina* y *PINK1* (Nuytemans K, et al 2010).

Variaciones estructurales

La diversidad en el genoma humano es muy amplia, desde variaciones microscópicas a nivel de cromosomas individuales hasta variaciones a nivel de la secuencia del DNA. Estas últimas incluyen más de 10 millones de polimorfismos de nucleótido sencillo o SNP, en la página electrónica de NCBI (*National Center for Biotechnology Information* www.ncbi.nlm.nih.gov) se encuentra la base de datos de SNP denominada dbSNP. Los polimorfismos genéticos son cambios en la secuencia del DNA que están presentes con una frecuencia > 1% de manera natural en una población.

La primera ola de información, a partir del análisis del genoma humano, reveló que los SNPs son la principal fuente de variación genética y fenotípica humana. Sin embargo, con la llegada de las tecnologías para la exploración del genoma se ha descubierto lo que llamamos “variación o alteración estructural” en el genoma humano. Esto comprende variantes microscópicas y submicroscópicas. La variación estructural visible al microscopio incluye heteromorfismos y rearrreglos cromosómicos balanceados (translocaciones, inversiones, entre otros) que pueden tener tamaños mayores a 3 Mb. Mientras que las variaciones submicroscópicas van de menos de 3Mb hasta 1 kb en longitud (*Feuk L, et al 2006*).

Las variaciones estructurales submicroscópicas comprenden inserciones / deleciones (indel) de nucleótidos y variaciones en el número de copias (CNV, por sus siglas en inglés *copy-number variation*). En estas últimas se incluyen rearrreglos exónicos, inserciones, deleciones y duplicaciones (*Speicher M, et al 2010*). En este trabajo se analizaron las variaciones estructurales a nivel submicroscópico o CNVs (deleciones y duplicaciones) en los ocho exones del gen *PINK1*.

En general, el DNA del genoma humano tiene una copia heredada de cada progenitor de cada par de cromosomas homólogos (figura 5). Las CNV corresponden a segmentos de DNA, repetidos en número de copias, de 1kb a varias megabases de longitud que contienen secuencias codificantes y no

codificantes. Las CNV constituyen al menos 12% del genoma humano y contribuyen más a la diversidad genómica entre los individuos que los SNP. Las CNV pueden ser heredadas o pueden haber ocurrido *de novo* en la persona cuyo genoma está siendo examinado. Algunas CNV pueden no causar problemas médicos, pero aquéllas que incluyen regiones codificantes pueden asociarse con enfermedades monogénicas o dando susceptibilidad o resistencia a enfermedades complejas. Ahora bien, cuando las CNV alteran el número de copias de un gen éstas ocasionan cambios en la dosis génica. La alteración en la dosis génica puede ser de ganancia de función como consecuencia de la duplicación o multiplicación de uno o varios exones e incluso de gen (es) completo (s) en la región que abarca la CNV; en contraste, los eventos de deleción producen una pérdida de función.

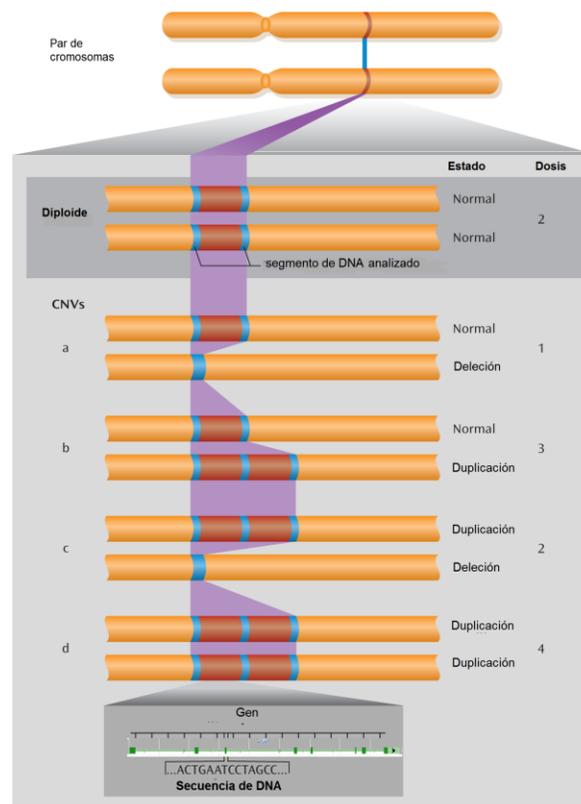


Figura 5. Ejemplo donde se ilustra un par de cromosomas homólogos en estado normal y con variación en el número de copias (CNVs). Tomado y modificado de Basset A, et al 2010.

Los datos más recientes apoyan que la dosis génica juega un papel importante en la patogénesis de la EP. Por ejemplo, para la dosis génica del gen *SNCA* hay una mayor frecuencia de multiplicaciones, en donde la triplicación conduce a una progresión más rápida y un inicio más temprano de la EP que en la duplicación, por lo que se observa una correlación entre las CNVs y la severidad de la EP (Nuytemans K, et al 2010).

En otro trabajo han demostrado que alteraciones en la dosis génica de *PARK2*, es un factor causal de la enfermedad de Parkinson familiar y se asocian con una edad de inicio más temprana. Estos datos sugieren un mecanismo general en el que las CNVs aún en estado heterocigoto pueden jugar un papel como factor de riesgo, aumentando la probabilidad de que un individuo desarrolle la EP (Pankratz N, et al 2009).

El estudio de variaciones estructurales en *PINK1* se ha realizado en varias regiones (Tabla 3), reportando distintas frecuencias de CNVs para diferentes poblaciones: judíos 0%, 0.21% en caucásicos, 1.27% en árabes, 1.4% en asiáticos; en latinoamericanos 8.33% (Nuytemans K, et al 2010); en brasileños solo se ha reportado un paciente con una deleción en el exón uno (Vasconcelos M, et al 2012), y en población china no se han documentado variaciones estructurales en *PINK1* (Ji-Feng G, et al 2008). En México, se desconoce la prevalencia de CNVs para *PINK1* y es el objetivo del presente trabajo.

PCR en tiempo real

El método de elección para la determinación de la dosis génica es la cuantificación relativa mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (QPCR). Éste, es un método confiable, reproducible, sensible y altamente específico para la cuantificación de DNA, ya que la generación del amplicón se puede observar conforme la amplificación progresa, eliminando así el análisis post PCR. La detección de la reacción se lleva a cabo por la medición de fluorescencia en cada ciclo de amplificación. La cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo es proporcional a la cantidad de número de copias del producto de amplificación generado (*Edwards K 2004, Applied Biosystems 2008*).

Se emplean diversos agentes detectores o reporteros para la PCR en tiempo real, en los cuales la fluorescencia generada es directamente proporcional al número de copias obtenidas en cada ciclo de la PCR. Las diferentes químicas empleadas para este ensayo son agentes intercalantes como *SYBR Green*, y las sondas *TaqMan*. Una sonda *TaqMan* es un oligonucleótidos, cuya secuencia es complementaria a la región central del amplicón. En el extremo 5' presenta una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un apagador. Como las sondas tienen una temperatura de desnaturalización mayor (T_m) que los cebadores flanqueantes de la región de interés, esto hace que durante la etapa de alineación, la sonda se une primero a la secuencia específica y posteriormente hibridan los cebadores. De tal forma que cuando la DNA polimerasa se une al extremo 3' del cebador, se inicia la elongación de la secuencia; pero en su paso se encuentra con la sonda y la degrada debido a su actividad de exonucleasa 5' - 3'. La sonda al ser degradada, libera al reportero del apagador y la fluorescencia emitida es detectada por el sistema (Figura 6). Entonces dado que la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sonda degradada, y ésta a su vez es proporcional a la cantidad de templado generado, este sistema permite visualizar el incremento del amplicón de la PCR (*Bustin S y Nolan T 2004*). En este trabajo, se emplearon sondas *TaqMan*, una para cada exón del gen *PINK1*.

Para este tipo de cuantificación es necesario incluir una referencia de dosis constitutiva monocopia, en este estudio se empleó la *RNasaP*. Así el valor obtenido del gen de interés, se divide entre el valor obtenido para el gen constitutivo, asegurando que las variaciones observadas en dosis se deban realmente a la dosis o número de copias de la secuencia de interés, y no a la cantidad variable de la muestra añadida.

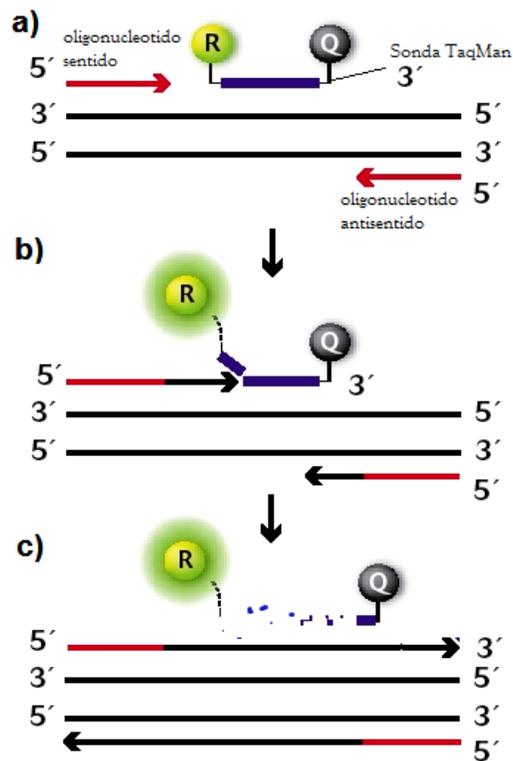


Figura 6. Detección de la amplificación de DNA por sondas *TaqMan*. **a)** sonda *TaqMan* apagada y unida a la secuencia específica e inicia la polimerización, **b)** la sonda es degradada por la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa, hasta que el reportero es desprendido del apagador y entonces emite la fluorescencia, **c)** La polimerización de la secuencia termina, y el apagador de la sonda es liberado. Tomado de *Applied Biosystems* 2008.

Las alteraciones en la dosis génica también pueden determinarse por otros métodos como son: MLPA (*Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*), FISH (*Fluorescent In situ Hybridization*) y CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) (*Dua J, et al* 2013; *Bustin S y Nolan T* 2004; *Van O y Schouten J* 2011).

Parkina, PINK1 y DJ-1 en la disfunción mitocondrial

Las mutaciones en *parkina*, *PINK1*, y *DJ-1* están individualmente vinculadas a formas familiares de la EP-ITE. Aunque las mutaciones en estos genes conducen al mismo estado de enfermedad, las relaciones funcionales entre ellos y cómo sus respectivas enfermedades asociadas a mutaciones causan la enfermedad de Parkinson son en gran medida desconocidos.

En el contexto de investigación, el conocimiento del tipo y localización de las mutaciones patológicas en un gen específico de la EP, puede revelar valiosas indicaciones de los dominios funcionales críticos de las proteínas y los mecanismos de interacción intermoleculares.

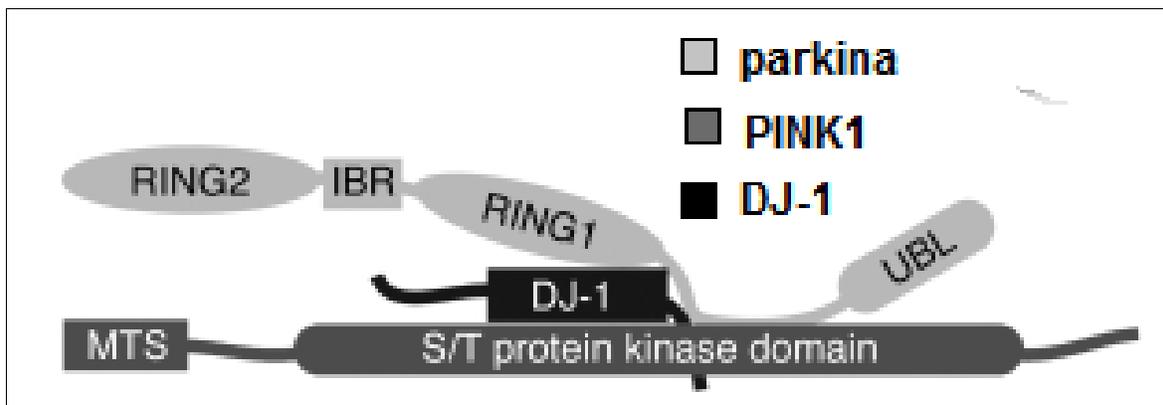
La identificación de estas proteínas, ha permitido caracterizar múltiples vías involucradas en la etiología de la EP: la disfunción del sistema ubiquitina-proteosoma que genera el procesamiento de las proteínas mal plegadas, la disfunción mitocondrial o la disfunción de la autofagia mediada por lisosomas y el incremento del estrés oxidativo. Cada una de ellas revela un poco más acerca de la compleja matriz de interacciones entre los factores genéticos, los factores ambientales y las funciones celulares responsables de la patogénesis de la EP.

Estudios recientes han demostrado que estos tres productos génicos forman un complejo de ligasa de ubiquitina E3 designado como PPD (PARK2, PINK1 y DJ-1) cuya función es promover la degradación de sustratos de parkina mal plegados (Figura 7). En el complejo PPD, parkina es una proteína con dedos RING de unión a E2, mientras que PINK1 y DJ-1 actúan como componentes de regulación (*Xiong H. et al* 2009). Al parecer, PINK1 mantiene elevada la actividad de ligasa E3 de PARK2 y regula la ubiquitinación proteica fosforilando ya sea sustratos o componentes del complejo. La participación de DJ-1 en este complejo es estabilizar a PINK1; consistente con este dato es la identificación de mutaciones digénicas de PINK1 y DJ-1 asociadas a casos familiares de EP-ITE. A la luz de

esto, parece evidente que las combinaciones digénicas de mutaciones heterocigóticas en *PARK2* y *PINK1* podrían ser suficientes para causar la enfermedad, ya que podrían aumentar otro efecto patogénico por pérdida concomitante parcial de la función de dos enzimas importantes, activas en la misma vía (*Tang B, et al 2006*).

Se ha descrito que PINK1 se encuentra en la membrana mitocondrial externa del citoplasma. Parkina es una ligasa E3 de ubiquitina que se recluta en las mitocondrias después de la pérdida de polarización de la membrana mitocondrial. DJ-1 es relocada a la mitocondria en condiciones de estrés oxidativo (*Jean T, et al 2011*). Por otro lado, las mutaciones en *PARK7* contribuyen a la muerte neuronal debido a la pérdida de la actividad antioxidante de DJ-1 y a un posterior aumento de estrés oxidativo celular (*Kim S, et al 2012*).

Hay estudios donde, se demuestra que Parkina, PINK1 y DJ1 forman un complejo denominado PPD, para promover la ubiquitinación y degradación de sustratos de Parkina, y Sinfilina-1 en células de neuroblastoma y lisados de cerebro humano (*Xiong H, et al 2011*).



Tomado de Hui Xiong, et al (2009).

Figura 7. Esquema de la interacción entre los componentes del complejo PPD: IBR, entre los anillos RING; MTS, secuencia diana mitocondrial; UBL, la ligasa de ubiquitina.

Se sabe que PINK1 además de su función de protección contra la disfunción mitocondrial y la apoptosis, también regula la dinámica mitocondrial en conjunto con la proteína parkina. Los datos recientes muestran que parkina mitocondrial promueve la degradación autofágica de las mitocondrias disfuncionales y PINK1 puede tener un papel indirecto en la activación de la mitofagia (*Michiorri S, et al 2010*).

La mayoría de los pacientes con EP tienen inclusiones intraneuronales en forma de cuerpos de Lewy. Dada la presencia de parkina en los cuerpos de Lewy y la supuesta función de parkina como una ligasa E3, gran parte del trabajo inicial de parkina se centró en su papel potencial en la regulación de la degradación de proteínas a través del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS). La ubiquitinación se logra mediante la unión covalente del polipéptido ubiquitina (Ub) a un residuo de lisina en un sustrato de proteína específica y requiere la acción secuencial de una enzima de activación E1, una enzima de conjugación E2 y una ligasa E3. Estos vínculos son más a menudo a la lisina 48 (K48) o del polipéptido lisina 63 (K63) (*Han L y Ming G 2009*).

Parkina se localiza en gran medida en el citosol, aunque se puede encontrar dentro de las mitocondrias o con la membrana mitocondrial externa. Mientras tanto, PINK1 se ha encontrado dentro de la mitocondria en células *in vivo*. El mecanismo por el cual interactúan Parkina y PINK1 sobre las mitocondrias es un misterio. Curiosamente, un estudio reciente sugiere que PINK1 puede estar anclada en la membrana mitocondrial externa, proporcionando una ruta posible para la interacción PINK1/Parkina (*Han L y Ming G 2009*).

Trabajos recientes en células de mamíferos ofrecen enlaces adicionales entre las dos isoformas de PINK1; PINK1-L (~64KDa) y PINK1-S (~52KDa) y las mitocondrias, sugiriendo que el reclutamiento de PINK1 a la membrana mitocondrial es a través de su secuencia N-terminal y en una mitocondria sana PINK1 es proteolizada por PARL (*presenilin-associated rhomboid-like protein*) una

proteasa intermembranal donde el residuo pequeño rápidamente se degrada en el citoplasma y parkina no es reclutada a la mitocondria lo que mantiene la homeostasis (Shon E y Przedborski S 2011). Pero cuando la mitocondria es dañada la membrana se despolariza por un decremento en el potencial de membrana, el cual puede ser inducido por EROs (especies reactivas de oxígeno), lo que hace que PINK1 se relocalice en el exterior de la membrana, donde ya no es accesible a PARL lo que impide la proteólisis de PINK1 y con esto el fragmento pequeño no es liberado, ocasionando la acumulación de PINK1 en la mitocondria. Parkina es reclutada a la mitocondria y con su dominio E3 realiza la poliubiquitinación de la mitofusina (Mfn) en K63, formando un complejo proteico, el cual es degradado vía proteosoma, y desprovveyendo a la mitocondria de mitofusina por lo que la mitocondria ya no puede ser fusionada con otra mitocondria sana. De esta manera, la mitocondria etiquetada se vuelve blanco para la degradación, vía mitofagia. Por lo anterior, se dice que PINK1 controla la morfología mitocondrial. (Kaiwajiri et al 2011).

Kondopalli C, et al 2012, sugieren que las mutaciones con pérdida de función en *PINK1* darían lugar a la supresión de la ligasa E3 y reducción de la ubiquitinación de los blancos de parkina.

También se ha visto que la deficiencia de PINK1 en la mitocondria ocasiona sobrecarga de calcio, lo que promueve la formación de EROs tanto en la mitocondria como en el citosol. Esto a su vez, causa inhibición del transporte de glucosa, problemas con la entrega de sustratos a la cadena respiratoria, dañando la respiración mitocondrial (Wilhelmus M, et al 2012; Ishihara L, et al 2008).

Ahora se sabe que parkina, *PINK1* y *DJ-1* participan en el mantenimiento de la función mitocondrial y poseen propiedades neuroprotectoras, limitando el daño oxidativo (Ishihara L, et al 2008). Estos recientes estudios demuestran la importancia de la disfunción mitocondrial, asociada al estrés oxidativo y la alteración en el funcionamiento del UPS en formas familiares y esporádicas de la EP (Cookson M, 2012). Es evidente que existen relaciones entre estos genes, con

una sola vía que une *PINK1* y parkina y una relación paralela con *DJ-1* (Hung C, et al 2012). Los mecanismos mencionados en la figura 5 son comunes en los desórdenes neurológicos, en particular Alzheimer (EA) , EP y esclerosis múltiple (SM), y es posible que ocurran en las etapas tempranas de la enfermedad (Wilhelmus M, et al 2012).

El estudio genético de formas heredadas de EP ha llevado al descubrimiento de mutaciones en genes involucrados en la función mitocondrial o con propiedades antioxidantes, incluyendo a Parkina, *PINK1* y *DJ1* (Cookson M, 2012; Schon E and Przedborski S, 2011).

En el futuro, el delineamiento de las funciones de todos los genes asociados a la EP permitirá no sólo conocer el origen de cada caso de este trastorno, sino también predecir las manifestaciones clínicas vinculadas a él e identificar nuevas dianas terapéuticas.

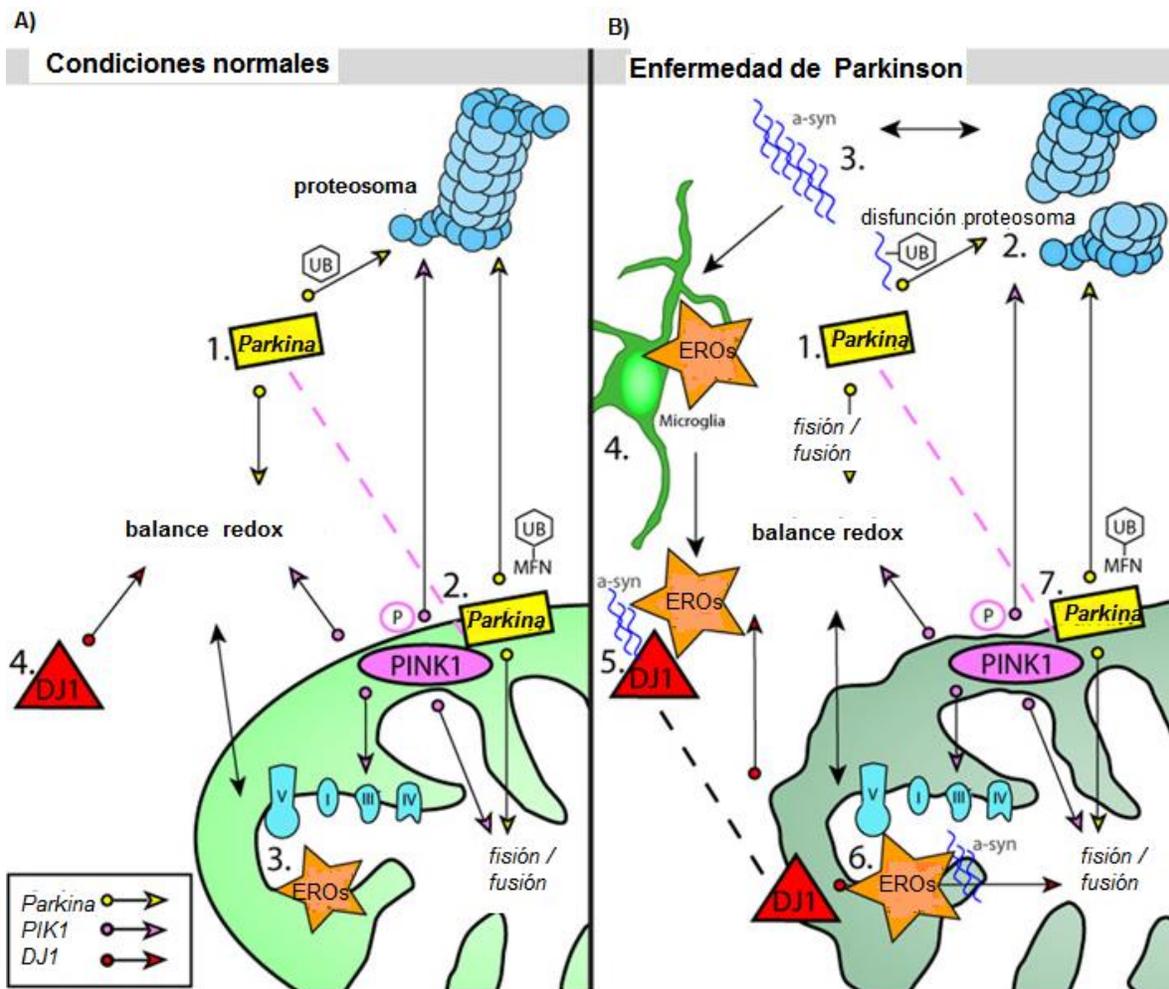


Figura 8. Implicación de parkina, PINK1 y DJ 1 en procesos críticos que subyacen a las enfermedades neurodegenerativas. **1. Mal plegamiento de las proteínas.** La agregación aberrante de proteínas es una característica común de la EP, con la consecuente eliminación de proteínas mal plegadas y agregadas, vía sistema de la ubiquitina-proteosoma. Parkina dirige a las proteínas mal plegadas etiquetadas al sistema ubiquitina-proteosoma (flecha amarilla). PINK1 puede manipular la eliminación de proteínas mediante la interacción con chaperonas y el proteosoma directamente (flecha rosa). DJ-1 también promueve la eliminación de proteínas (flecha roja). **2. La fisión/fusión.** Fisión y fusión mantienen una población mitocondrial saludable. Parkina y DJ1 son atraídos a la membrana mitocondrial interna en respuesta al estrés mitocondrial (líneas de puntos). En la membrana mitocondrial interna; parkina, PINK1 y DJ-1 están implicados en el proceso de fisión y de fusión, ya sea directamente o mediante la formación de un complejo. **3. Equilibrio redox.** Parkina y PINK1 reducen la cantidad de ROS producidos en la cadena respiratoria mitocondrial. PINK1 restaura el equilibrio redox modulando la homeostasis del calcio, mientras parkina está físicamente asociada con él las vías de reparación de DNAm, lo que protege las células contra el estrés oxidativo. Y DJ-1 protege a las células contra las EROs (flecha roja). Tomado de *Wilhelmus M, et al 2012.*

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez se estudian diferentes enfermedades neurodegenerativas, incluyendo a la EP. Para ello se han recopilado más de 180 muestras de DNA de pacientes con EP-ITE. En un trabajo previo se identificaron 55 casos que presentaban cero o una (0-1) alteración para secuencia o dosis del gen *PARK2* y secuencia de *PINK1*. Posteriormente, se estudiaron 45 nuevos casos de EP-ITE que tampoco mostraron alteración en *PARK2*. En éstos últimos se desconocía la secuencia de *PINK1*. Por lo anterior, se planteó continuar el análisis de secuencia en estos casos de reciente captación para así ampliar la base muestras con cero o una mutación en *PARK2* y *PINK1* en 100 casos.

En la literatura no existen datos de prevalencia de alteraciones estructurales de *PINK1* en los pacientes con EP-ITE de la población mexicana por lo que es necesario investigarlo e identificar el genotipo que presentan.

HIPÓTESIS

En algunos casos de EP-ITE en población mexicana, se presentarán alteraciones estructurales en el gen *PINK1*.

OBJETIVO

Determinar la prevalencia de alteraciones estructurales en el gen recesivo *PINK1* en una muestra de pacientes mexicanos con EP-ITE.

- Secuenciar los 8 exones de *PINK1* de 45 pacientes con EP-ITE por la técnica de secuenciación de Sanger.
- Identificar y analizar las variantes mediante el uso de herramientas de bioinformática.
- Determinar la dosis génica de los 8 exones de *PINK1* mediante PCR en tiempo real, en 100 pacientes con EP-ITE.

SUJETOS Y MÉTODOS

Muestra

Los pacientes incluidos en este trabajo fueron diagnosticados con EP-ITE por al menos dos neurólogos especialistas en desórdenes del movimiento del INNNMVS. Todos los pacientes aceptaron participar en el estudio y firmaron una carta de consentimiento informado. El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ética del Instituto.

De cada muestra de paciente se registraron los datos de: nombre completo, número de registro del INNNMVS, médico tratante, genetista que lo refiere, fecha de nacimiento, antecedentes heredo-familiares, incluyendo árbol genealógico, edad de inicio de la EP, fecha de toma de muestra y volumen total de muestra de sangre periférica enviada al Laboratorio de Genética.

Tabla 4. Características generales de los pacientes con EP-ITE para el análisis de secuencia de *PINK1*.

PACIENTES	Número	Edad promedio	Con antecedentes familiares	Sin antecedentes familiares
FEMENINO	18	35.3	6	11
MASCULINO	27	36.2	9	16
Se desconoce	0	3	0	3
TOTAL	45	35.8	15	30

Preservación de células mononucleares y plasma

Se trabajaron muestras de DNA genómico obtenido a partir de sangre periférica, de pacientes con EP-ITE. A los individuos participantes se les tomaron tres tubos de 12mL de muestra de sangre periférica en tubos *Vacutainer*® con ACD como anticoagulante. Dos de los tubos se usaron para la preservación de las células mononucleares (CMNs) y el tercer tubo se empleó para la extracción de DNA y separación de 1mL de plasma, como se explica a continuación.

Para la separación de plasma, un tubo de sangre se centrifugó a 3000rpm por cinco minutos. Esto con el fin de separar el plasma del resto de los componentes de la sangre (cuerpos formes; plaquetas, glóbulos rojos y blancos). Esto sucede por densidad, el plasma es poco denso, queda en la parte superior del tubo por contener más del 90% de agua. Se tomó una alícuota de 1mL en un tubo de 1.5 mL previamente etiquetado y se guardó a -70°C para su preservación.

Para la preservación de CMNs, por cada 3 mL de sangre periférica se adicionaron 9 mL de una solución amortiguadora de lisis de glóbulos rojos, BLGR (cloruro de amonio 0.155M, Bicarbonato de potasio 10mM y EDTA 0.1mM como quelante de iones metálicos que inactiva nucleasas). Esta mezcla se homogenizó para favorecer el rompimiento de los glóbulos rojos, se centrifugó a 3000rpm por 6 minutos. El botón obtenido se resuspendió con 1mL de BLGR y se transfirió a un tubo de 1.5mL. Nuevamente, la mezcla se centrifugó a 3000rpm durante 2 minutos y se hizo un lavado más con BLGR para obtener un botón blanco, libre de eritrocitos. A esta reacción se le añadieron 500µL de solución amortiguadora de fosfatos, PBS 1X y se homogenizó por pipeteo. Después a esta mezcla, se añadieron 600µL de una solución preservadora *RNA later* (Ambion) que contiene inhibidores de nucleasas y proteasas. Finalmente, esta solución se mantuvo 24h a 4°C para facilitar su penetración en las células y posteriormente se guardaron a -70°C hasta su uso.

Extracción de DNA

Se realizó la extracción de DNA de 45 pacientes con EP-ITE a partir de sangre periférica colectada en tubos Vacutainer® con ACD como anticoagulante por método salino que se describe a continuación:

Se transfirieron 3mL de sangre periférica a un tubo cónico de 15mL, previamente etiquetado, y a éste se les adicionaron 9mL de BLGR. La mezcla se homogenizó por inversión durante un 10 minutos para la lisis de los glóbulos rojos, se centrifugó a 3000rpm durante 6 minutos.

Se decantó el sobrenadante de la mezcla anterior, y al botón obtenido se le agregó 1mL de BLGR para resuspender. Esta solución se trasladó a un tubo de 1.5 mL, se centrifugó a 3000 rpm por 2 minutos.

Al botón blanco se le agregaron 570µL de NaCl [5mM] y se agitó la mezcla por 2 minutos, enseguida se agregaron 40µL del detergente catiónico SDS (dodecil sulfato de sodio) al 10% v/v. Se agitó por 5 minutos esta solución, después se agregaron 200µL NaCl [7M] saturado y se agitó el tubo por 10 minutos. Se centrifugó a 11500rpm durante 20 minutos a 4°C. Las moléculas de sal se unen con el agua dejando a las proteínas una pobre interacción con el agua, hasta llegar al punto de que no exista suficiente agua presente para mantener a las proteínas en solución por lo que precipitan.

Al sobrenadante de esta mezcla, se le realizó una extracción orgánica, añadiendo 600 µL de la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (49:1 v/v) y se agitó vigorosamente, el tubo se centrifugó a 14000rpm durante 15minutos. Se obtuvo la fase acuosa que es la fase en donde se encuentra el DNA, y se colocó en un tubo de 1.5 mL. A esta fase acuosa, se le agregaron 600µL de etanol absoluto, para precipitar el DNA. La mezcla en cuestión se centrifugó a 14000rpm durante 20 minutos. Se recuperó la fase acuosa y a ésta se le agregaron 600µL de etanol al 70% para hidratar al DNA. Nuevamente se realizó centrifugación selectiva para

separar el DNA a 14000rpm/20min. La solución se decantó y el botón se secó al vacío por 20 minutos a 30°C. Finalmente, el DNA seco se resuspendió en 100 o 300µL de agua inyectable, libre de nucleasas y se incubó en un *termomixer* durante 1 hora a 60°C a 950rpm para su total homogenización.

Se comprobó la integridad del DNA por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador TBE 1X [Tris base 0.435M, ácido bórico 0.44M, EDTA 0.5M, pH 8]. Posteriormente, el DNA se cuantificó en un espectrofotómetro de baja retención Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*) y de acuerdo a su concentración, se prepararon las diluciones de trabajo a [100 ng/µL].

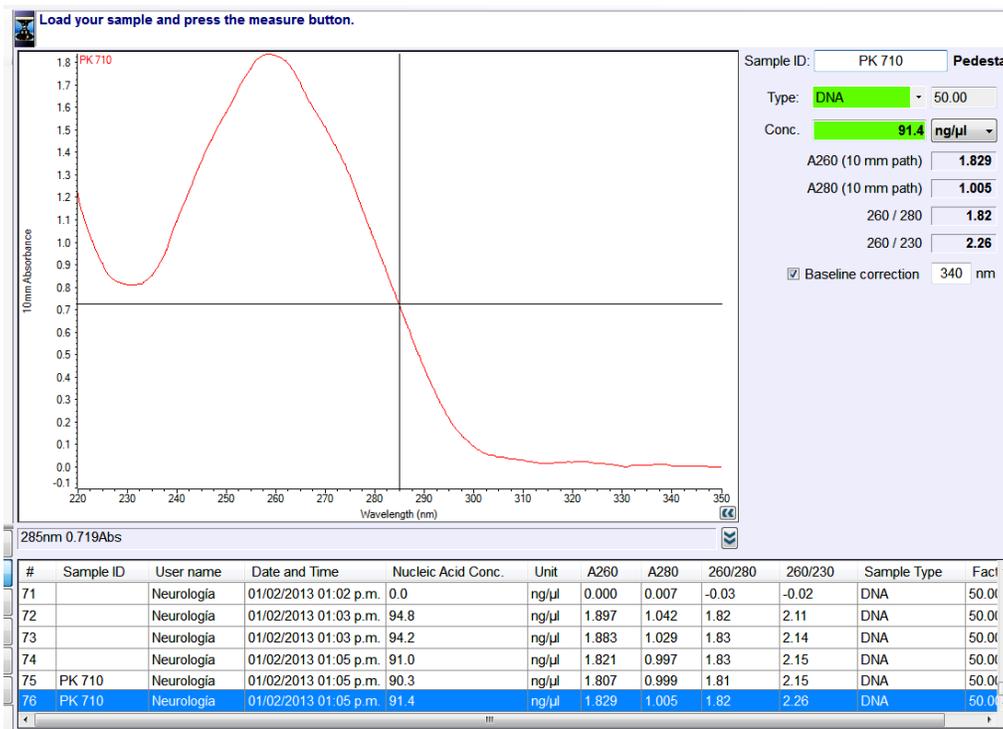


Figura 9. Representación gráfica de la cuantificación de muestras de DNA en equipo NANODROP 2000.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó PCR de punto final de 45 muestras con EP-ITE para cada uno de los ocho exones del gen *PINK1* empleando: 3µL de DNA a 100ng/µL, 12.5 µL de *master mix Green Taq®* PROMEGA, 1 µL de cada oligonucleótido [10µM] (tabla 2) y agua cbp. 25 µL. Para la PCR del exón 1, por su alto contenido en GC, requirió adición de 3µL de dimetil sulfóxido (DMSO) como co-solvente y además se utilizó un programa de PCR-*Touchdown* debido a las distintas temperaturas de alineamiento que presentan el oligonucleótidos sentido (Tm:53°C) y anti-sentido (Tm:63°C). Para los exones restantes se utilizó un programa de PCR convencional.

Tabla 5. Secuencias (5´ - 3´) de los cebadores empleados para los exones del gen *PINK1* y el tamaño del amplicón en pares de bases.

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño de Amplicón pb
1	5´GGGAAAGTCACTGCTAGAGGC 3´	5´ÁATAGATGAGCTTTAAGGACCCTC 3´	730
2	5´GTGGGGTTTCTGACCTCTCA 3´	5´GGCACCTTTCCTGTGGATAA 3´	550
3	5´TACAGGCAGGGCTTACAAGG 3´	5´GCTGAGGACATAAGTGATGGA 3´	250
4	5´GTGTTGGTGTGGCCTTAGGT 3´	5´TGACCCTGTTCTCCAAAAC 3´	373
5	5´ACGTATTGGGAGTCGTGAT 3´	5´CCTGAAGAGTCAGTCCTAAATGC 3´	299
6	5´TGCTGGTGGCTTTAGTAGGG 3´	5´ACAAGGCATCGAGTCTCCTG 3´	293
7	5´CTCAAGCTCTGGGTTCCCTTG 3´	5´CCCAAACCTGACCTTCACCTC 3´	435
8	5´GGGTAGAAGAATTGGGTTG 3´	5´AGTTCTTCCATTTGCCAAGC 3´	529

Purificación de la reacción de PCR

Los amplicones obtenidos mediante PCR de punto final se purificaron a partir del gel de agarosa. Para ello se emplearon dos paquetes comerciales: *Wizard* de Promega y *Pure Link®* de Invitrogen. Esto se hizo para eliminar restos de oligonucleótidos, dNTPs, y productos inespecíficos de la reacción. Los productos purificados se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con amortiguador TBE 1x para corroborar porcentaje de recuperación del producto limpio.

Reacción de Secuenciación

Para la secuenciación de los ocho exones de *PINK1* de las 45 muestras de EP-ITE, se empleó el método de Sanger. La reacción de secuencia se preparó con 3µL del amplicón purificado, 2µL de amortiguador de secuenciación 5X (AB), 1.5µL del kit v3.1 *BigDye terminator ready reaction mix* (AB), 0.5µL de oligonucleótido sentido o antisentido [10µM] y H₂O libre de nucleasas para un volumen de 10µL de reacción. La reacción de secuenciación se basó en el programa mostrado en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de la reacción de secuenciación.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1 ciclo de Desnaturalización inicial	96	0:30
25 ciclos de Desnaturalización	95	0:30
Alineamiento	50	0:10
Elongación	60	4:00
1 ciclo de Elongación final	72	1:00
	4	∞

Purificación de la reacción de secuenciación

Se prepararon columnas de *Sephadex*® con 0.05g de la resina de poro medio, a la cual se le agregaron 800µL de agua para hidratarla, eliminando todas las burbujas que pudieron formarse. Se dejaron hidratar por 1 hora como mínimo. Después las columnas se colocaron en un colector, se centrifugaron a 3000rpm durante 2 minutos, para drenar de 200 a 250µL de exceso de agua. Finalmente, la columna se colocó en un tubo de 1.5mL y a ésta se le agregaron 20µL de la reacción de secuenciación en el centro de la columna sin tocar el gel. La columna se centrifugó a 3000rpm por 2 minutos para eliminar el exceso de ddNTPs (didesoxinucleótidos trifosfato fluorescentes) y demás reactivos sobrantes. Algunas muestras se purificaron mediante precipitación alcohólica con una mezcla de EDTA, etanol al 100% v/v y etanol al 70% v/v.

Por último, la reacción de secuenciación limpia, contenida en el tubo de 1.5mL, se secó al vacío a temperatura ambiente. La muestra se resuspendió con 15µL de formamida desionizada. Esta muestra se transfirió a una placa de 96 pozos y se desnaturalizó a 95°C por 5 minutos. Los productos en la placa se separaron mediante electroforesis capilar en un secuenciador automatizado AB3130 (*Applied Biosystems*).

Las secuencias obtenidas se compararon en dos diferentes bases de datos públicas: *NCBI* y *Ensembl* (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index). Los manejadores de secuencias para su análisis fueron *Sequencing Analysis* v5.3 de AB y *Sequencher* v5.0 de *GeneCodes*. Las variantes genéticas identificadas (de secuencia y estructurales) en esta muestra de EP-ITE, también se consultaron en la base de datos específica para la enfermedad de Parkinson (<http://www.molgen.ua.ac.be/PDmutDB>).

Dosis Génica

El análisis de dosis del gen *PINK1* de 100 pacientes con EP-ITE se realizó mediante PCR en tiempo real en un equipo *STEP ONE* (Applied Biosystems). Las muestras analizadas fueron aquellas que en estudios previos de mutaciones de secuencia y estructurales en el gen *PARK2* y solo de secuencia en *PINK1* presentaron una o ninguna mutación.

Tabla 7. Características de los pacientes con EP-ITE que cumplieron el criterio para analizar la dosis génica.

PACIENTES	Número	Edad promedio	Con antecedentes familiares	Sin antecedentes familiares
FEMENINO	38	35,1	9	29
MASCULINO	62	37,8	18	39
Se desconoce	0	3	0	5
TOTAL	100	36,8	27	73

Para la determinación de dosis génica se emplearon dos sondas: una específica para cada exón del gen *PINK1* (marcada con FAM) y otra para el gen constitutivo *RNasaP* de copia única para la cuantificación de DNA total (marcada con VIC). Dado que cada sonda está marcada con diferente fluorocromo, se amplificaron en un ensayo dúplex.

La mezcla de reacción de QPCR consistió en 50 ng de DNA genómico, 2µl de 2x *TaqMan® PCR Universal Master Mix* (Applied Biosystems), 0.6µL de cebadores [10µnM], 0.3 µL de la sonda de prueba [5 µM] y 0.25µL de la sonda de *RNAasaP* [5 µM] y cbp para 5 µL de H₂O libre de nucleasas. En el caso de la amplificación del exón uno se empleó el doble de concentración de cebadores y de sonda de prueba. Cada muestra se realizó por triplicado y se comparó con controles (individuos sanos) para cada exón de *PINK1*.

Las condiciones de PCR en tiempo real fueron las siguientes: 95°C durante 10 min (1 ciclo), 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 min (40 ciclos).

Los cálculos se hicieron considerando las eficiencias de reacción similares para ambos genes, curva estándar de ambos genes y se empleó el método comparativo $\Delta\Delta_{CT}$.

Los cálculos se hicieron tomando en consideración la fase geométrica según la cinética de amplificación de la reacción de PCR, ya que durante esta fase es posible predecir la cinética de amplificación, obteniendo la siguiente ecuación:

$$P = T * (1 + E)^n$$

P= Cantidad de producto generado a n ciclos

T = cantidad de templado inicial

E= eficiencia de amplificación

n= número de ciclos

Y como en esta fase la eficiencia de amplificación es 100% ya que todos los reactivos se encuentran en abundancia, la ecuación se reduce a:

$$P = T * 2^n$$

Así es posible que aún en muestras que tienen distintas concentraciones iniciales de templado puedan tener el mismo número de copias al final de la reacción.

El fundamento para calcular la cantidad de DNA radica en el ciclo umbral de detección Ct (*threshold cycle*), el cual es un número fraccional que indica el número de ciclos que le tomó a cada muestra generar cantidad suficiente de fluorescencia para alcanzar dicho umbral. El valor de Ct es directamente proporcional a la cantidad inicial del templado *Applied Biosystems, 2008*.

El método comparativo $\Delta\Delta_{CT}$ obtiene el Δ_{CT} (Ct blanco – Ct control endógeno) para cada uno de los puntos, y se aplica directamente la fórmula $2^{-\Delta\Delta_{CT}}$.

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen } PINK1 - Ct \text{ gen } RNasaP$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra de interés} - \Delta Ct \text{ muestra control}$$

Ejemplo de cálculo

En la figura 10 se observan algunos resultados de dosis génica obtenidos con el método comparativo $\Delta\Delta Ct$. Donde la muestra seis (sample 6CT) es el control por lo que la cuantificación relativa (RQ) tiene valor de "1" y la muestra cinco corresponde a un paciente con EP-ITE.

Así para cada ensayo se tiene el valor de C_t (en muestra 5) tanto del gen *PINK1* ($C_t = 21.57$) y el de *RNasaP* ($C_t = 22.136$), nuestro control endógeno.

$$\Delta Ct = 21.57 \text{ gen } PINK1 - 22.136 \text{ Ct gen } RNasaP = -0.566$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra de interés} - \Delta Ct \text{ control}$$

$$\Delta\Delta Ct = -0.801 - (-0.801) = 0 \quad \text{para la muestra 6 CT control}$$

$$\Delta\Delta Ct = -0.566 - (-0.801) = 0.235 \quad \text{para la muestra 5 de paciente}$$

Cálculo de RQ

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-0} = 1 \quad \text{para la muestra 6 CT control}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-0.235} = 0.85 \quad \text{para muestra 5 de paciente}$$

Adicionalmente, el programa del equipo calcula el promedio de la RQ \pm la desviación estándar de las tres réplicas de cada muestra (RQ mínima y máxima).

Experiment: EXON PINK1 VARIO... Type: Comparative Ct ($\Delta\Delta C_T$) Reagents: TaqMan® Reagents

> View Technical Replicates View Biological Groups

Show In Table ▾

#	Omit	Sample	Target	Ct Mean	ΔC_T Mean	ΔC_T SE	$\Delta\Delta C_T$	RQ	RQ Min	RQ Max
1	<input type="checkbox"/>	Sample 1	EXON PINK1	23.243	-0.623	0.022	0.178	0.884	0.829	0.942
2	<input type="checkbox"/>	Sample 1	RNasaP	23.866						
3	<input type="checkbox"/>	Sample 2	EXON PINK1	21.396	-0.611	0.016	0.19	0.877	0.836	0.92
4	<input type="checkbox"/>	Sample 2	RNasaP	22.007						
5	<input type="checkbox"/>	Sample 3CT	EXON PINK1	20.916	-0.593	0.011	0.208	0.866	0.837	0.895
6	<input type="checkbox"/>	Sample 3CT	RNasaP	21.509						
7	<input type="checkbox"/>	Sample 4	EXON PINK1	23.596	-0.655	0.025	0.147	0.903	0.84	0.972
8	<input type="checkbox"/>	Sample 4	RNasaP	24.25						
9	<input type="checkbox"/>	Sample 5	EXON PINK1	21.57	-0.566	0.053	0.235	0.85	0.725	0.996
10	<input type="checkbox"/>	Sample 5	RNasaP	22.136						
11	<input type="checkbox"/>	Sample 6CT	EXON PINK1	20.981	-0.801	0.021	0	1	0.94	1.064
12	<input type="checkbox"/>	Sample 6CT	RNasaP	21.782						

Figura 10. Ejemplo de los resultados de dosis génica obtenidos por el método comparativo $\Delta\Delta C_T$ empleando el programa versión 2.2 del equipo STEP ONE.

El criterio para saber si se presentaba una delección o duplicación se resume en la tabla 8.

En el ejemplo de la muestra 5, el valor de RQ es de 0.849 y de acuerdo con la tabla 8 cae en el rango de dosis normal, por lo que se infiere que esta muestra no presenta delección ni duplicación del exón analizado de *PINK1*.

Tabla 8. Rangos de dosis génica normal y alteraciones homocigotas / heterocigotas.

Rango	Criterio de dosis génica
0 -0.3	Delección homocigota (del hm)
0.31-0.65	Delección heterocigota (del ht)
0.7-1.3	Normal
1.45-1.75	Duplicación heterocigota (dup ht)
1.76-2	Duplicación homocigota (dup hm)

Tomado de Toft M, Myhre R, Pielsticker L, *et al.* 2007

Las muestras que presentaron delección (del) o duplicación (dup) se confirmaron en un segundo análisis en una reacción de 20 μ L. Cada muestra se realizó por triplicado.

En la Figura 11 se muestra un gráfico de dosis génica calculada por el método comparativo $\Delta\Delta C_T$ del programa del equipo STEP ONE versión 2.2. Se muestra el control que da valor de dosis de uno, una muestra que presenta una delección heterocigota con un valor de dosis de 0.4 y una muestra con una duplicación homocigota exónica con valor de dosis de 2.

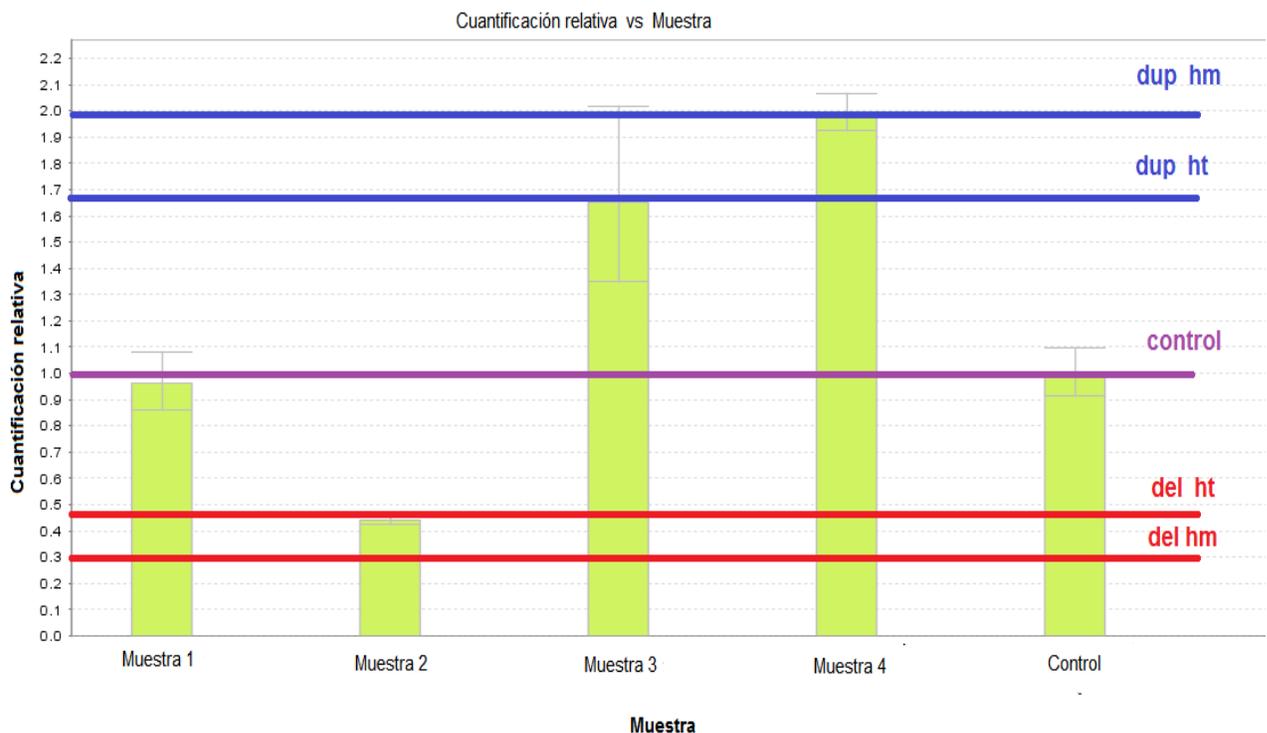
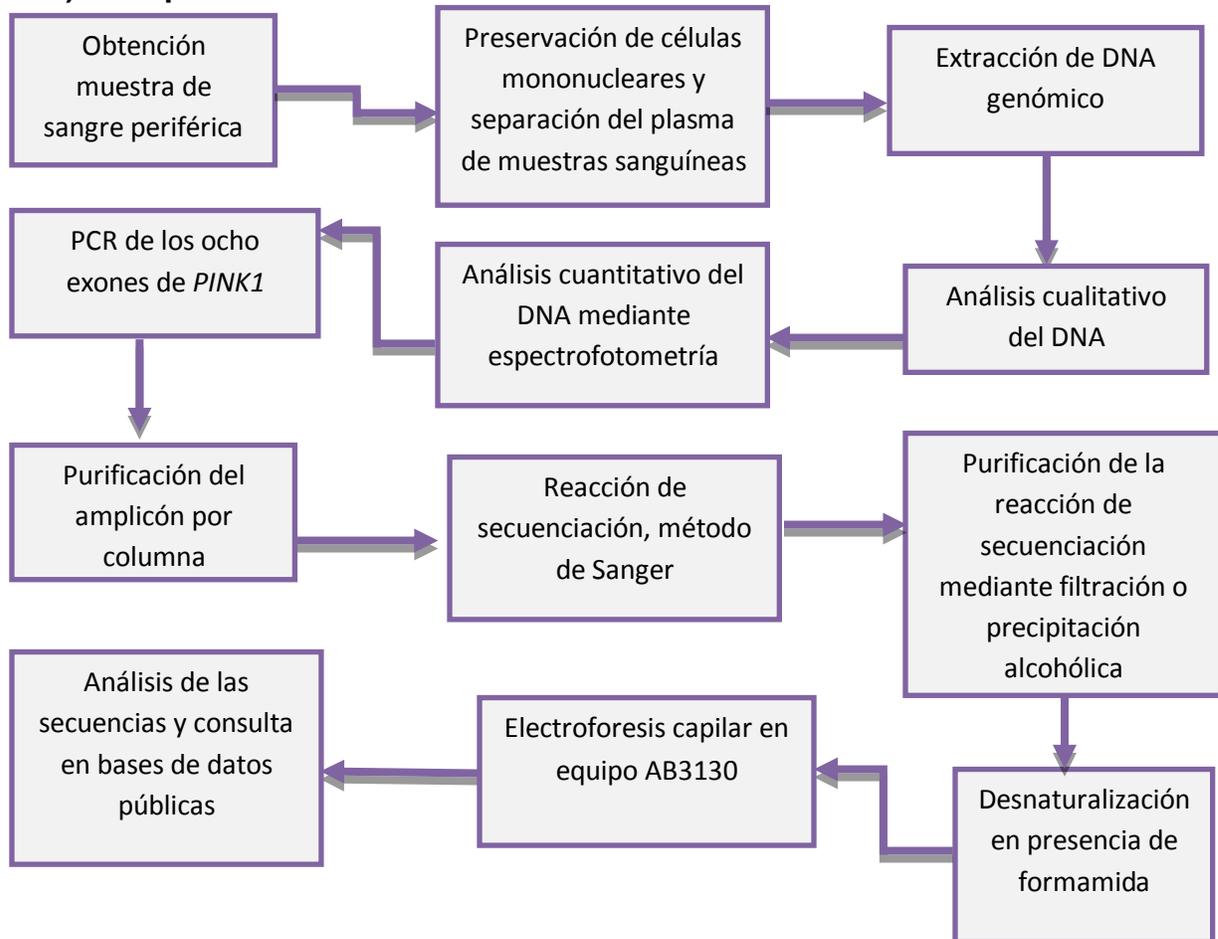


Figura 11. Gráfico para la representación del cálculo de dosis génica en cuatro muestras (1-4) y un control, empleando el método comparativo $\Delta\Delta C_T$. Dup: duplicación, del: delección, hm: homocigota, ht: heterocigota.

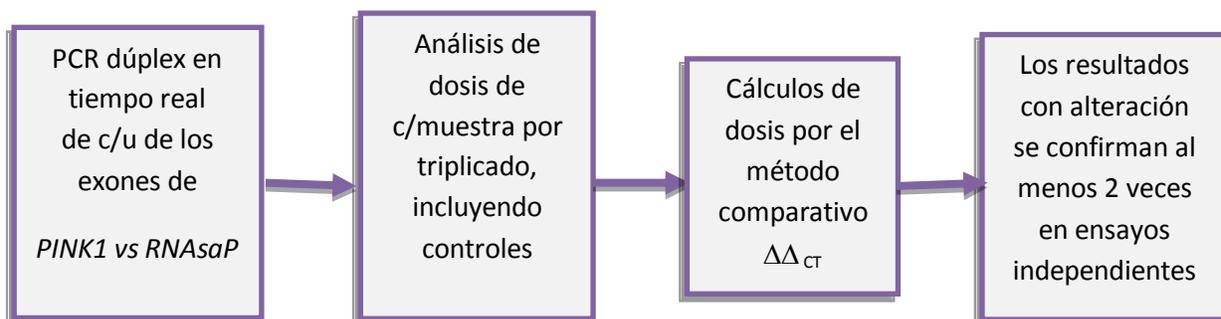
DIAGRAMAS DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA:

a) Búsqueda de alteraciones de secuencia en *PINK1*



Todas las muestras que en el proceso del inciso a) resultaron con 0-1 mutación continuaron el proceso del inciso siguiente.

b) Búsqueda de alteraciones de dosis en *PINK1*



RESULTADOS

Se obtuvieron los productos de la PCR para los ocho exones del gen *PINK1*, a partir de las condiciones de reacción especificadas en la metodología. En la figura 12 se muestra una imagen representativa de los productos de PCR de los exones 3 y 4 de *PINK1* de 19 pacientes. Los productos fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%p/v en amortiguador TBE 1X y visualizados con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta. En el primer carril de la izquierda se muestra el marcador de pesos moleculares, la segunda banda de abajo arriba de este marcador corresponde a 246pb. Los siguientes 15 carriles corresponden a la PCR del exón 3; y los últimos 4 carriles corresponden a la PCR del exón 4 del gen *PINK1*. Los productos de PCR para el exón 3 tienen un peso molecular de 250pb que corresponden con la segunda banda del marcador, mientras que los productos de PCR para el exón 4 tienen un tamaño de 373pb por lo que se ven por encima de la segunda banda del marcador. En la electroforesis la migración de partículas es por cargas y por tamaño; tal que, primero migran los productos de menor tamaño, seguidos por los de tamaño medio y así sucesivamente.

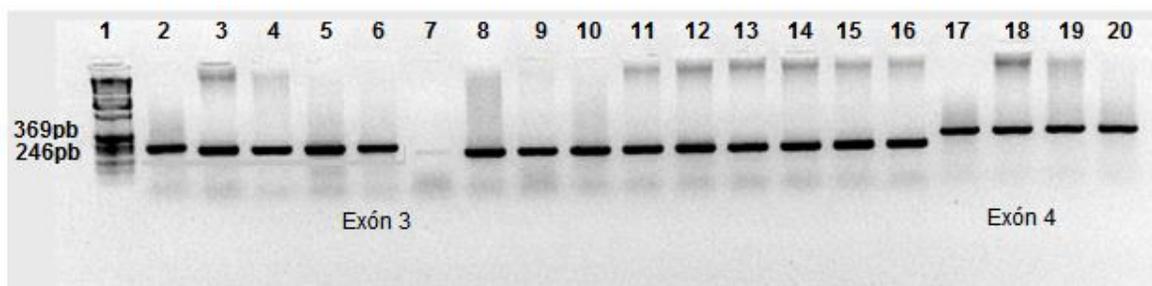


Figura 12. Electroforesis de productos de PCR de los exones 3 y 4 de *PINK1* de pacientes con EP-ITE, en gel de agarosa al 1.5%p/v en amortiguador TBE 1x. Primer carril de la izquierda: marcador de pesos moleculares. Carriles 2 a 16, amplificación de exón 3 y del carril 17 a 20 exón 4 de *PINK1* de muestras de pacientes con EP-ITE.

Todas las muestras que amplificaron en la PCR y fueron visualizadas en el gel de agarosa (en este ejemplo todas excepto la muestra del carril 7), se purificaron para eliminar los posibles residuos de oligonucleótidos y DNA no amplificado, los cuales pueden afectar a la reacción de secuenciación. Así siguiendo con el ejemplo para los exones 3 y 4, se volvió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%p/v en TBE 1x, pero esta vez solo se cargo en cada carril 1.5µL del purificado de cada PCR. Este gel se observa en la figura 13 donde nuevamente en el carril uno se colocó marcador de pesos moleculares y en el resto de los carriles los productos purificados de la PCR de los exones 3 y 4.

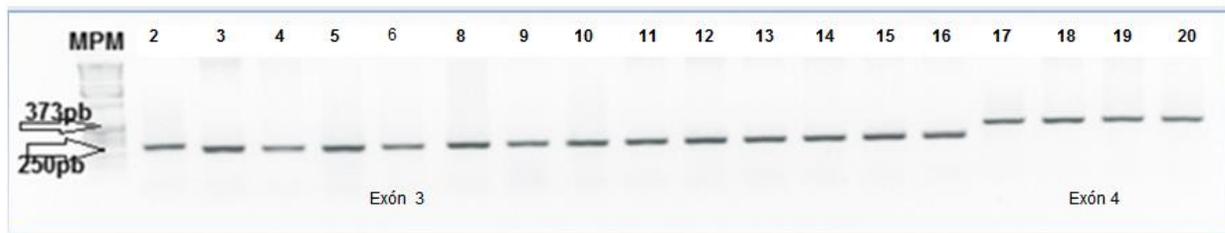


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x. Verificación de los productos purificados de PCR para los exones 3 y 4 de *PINK1*.

Secuenciación

Se obtuvieron las reacciones de secuenciación por el método de Sanger, de los productos purificados de la PCR de los 8 exones del gen *PINK1*, para los 45 pacientes de EP-ITE. Las secuencias de los ocho exones (no mostrados) se separaron por electroforesis capilar en un equipo AB3130. Este equipo cuenta con un láser y un sistema de detección de fluorescencia y traducción de la señal (cámara CCD) y presenta los resultados de secuenciación en un electroferograma. Un ejemplo de un electroferograma obtenido, se muestra en la figura 13 donde se visualiza un segmento de veintitrés bases de la secuencia de DNA del exón 2 de *PINK1*. En el electroferograma observamos el orden de las bases, las cuales presentan diferente color: adenina (A) en color verde, timina (T) en rojo, citosina (C) en azul y guanina (G) en negro.

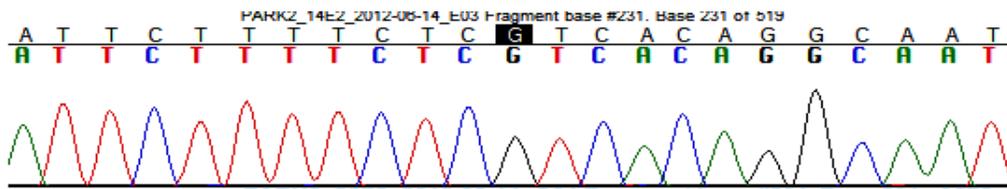


Figura13. Ejemplo de electroferograma de una secuencia parcial del exón 2 de *PINK1*.

Las secuencias se analizaron mediante los programas *Sequencing Analysis* v5.3 de AB y *Sequencher* v5.0 de *GeneCodes*. Las variantes genéticas identificadas en los 45 pacientes de cada exón del gen *PINK1* se muestran en la tabla 9. Los exones uno, cinco, siete y ocho si presentaron variaciones genéticas, en los exones restantes no se encontró variación alguna. En la primera columna de la tabla 9 se enumeran los 8 exones del gen.

Tabla 9. Variantes de secuencia encontradas en los ocho exones de *PINK1* en pacientes con EP-ITE (N= 45).

Exón	rs (dbSNP)	Variante exónica	Residuo proteico	Número de pacientes		Patogenicidad	Dominio proteico	Referencias
				hm	ht			
1	rs45530340	g.5283 C>T	Leu63Leu	2	6	NO	Tránsito	Valente EM, 2004, Groen JL, 2004, Schlitter AM, 2005
	NR	g.5367 delC	Gly91GlyfsX 14	1	0	SÍ	Tránsito	
2	-	-	-	-	-			
3	-	-	-	-	-			
4	-	-	-	-	-			
5	rs3738136	g.2097211 1G>A	Ala340Thr	0	7	NO	Cinasa	Valente EM, 2004, Groen JL, 2004, Clarimón J, 2006, Tan EK, 2006, Wang F, 2006
6	-	-	-	-	-			
7	NR	g.20618 delC	Ala443Alafs X38	0	1	SÍ	Cinasa	
8	rs10434224	g.22053 A>C	Asn521Thr	6	12	NO	C-terminal	Valente EM, 2004, Rohé CF, 2004, Groen JL, 2004, Schlitter AM, 2005, Clarimón J, 2006, Tan EK, 2006, Myhre R, 2008, Godeiro-Junior C, 2009

(NR: no reportado, hm: homocigoto, ht: heterocigoto, --: No se observó ninguna variante en estos exones). Base de datos específica para la enfermedad de Parkinson (<http://www.molgen.ua.ac.be/PDmutDB>) (Nuyteman K 2010)

En la segunda el registro asignado (rs de *referente sequence*) si ya ha sido reportada por la base de datos pública de SNP denominada dbSNP encontrada en la página electrónica de NCBI (*National Center for Biotechnology Information* www.ncbi.nlm.nih.gov). En este trabajo, identificamos dos variantes que no han sido reportadas previamente (NR); una de ellas se localiza en el exón uno y la otra, en el exón siete.

En la tercera columna se presenta la variante exónica encontrada en cada exón con la nomenclatura de acuerdo a HVG (por sus siglas en inglés, *human genome variation society*, <http://www.hgvs.org/mutnomen/>) donde la “g” indica que es a nivel de DNA genómico, la posición en bases donde se encuentra y el cambio de base que ocurre. Por ejemplo, para la variante g.5283 C>T indica que el cambio ocurre en la posición 5283 del gen y el cambio es una citosina por una timina. Un cambio similar ocurre en los exones 5 y 8. Pero en los exones 1 y 7 no hay cambio de base, sino una delección de una citosina.

La siguiente columna indica el residuo proteico afectado por la variante exónica. Donde el cambio de una base o en su caso la delección de una base, genera un nuevo codón que puede codificar para el mismo aminoácido tratándose de una variante sinónima, tal es el caso de Leu63Leu (Leucina- Leucina), donde el cambio de aminoácido es en la posición 63. En las imágenes de la figura 14 se muestra el electroferograma representativo de estas variantes sinónimas, Leu63Leu el cambio de base (indicado por una flecha) citosina por timina (C>T), y sus tres genotipos: en inciso a) la variante homocigota (TT) y b) en la heterocigota CT, las cuales con el cambio de base generan un nuevo codón -CUU-, y en c) el genotipo silvestre -CUC-, ambos codones codifican para leucina.

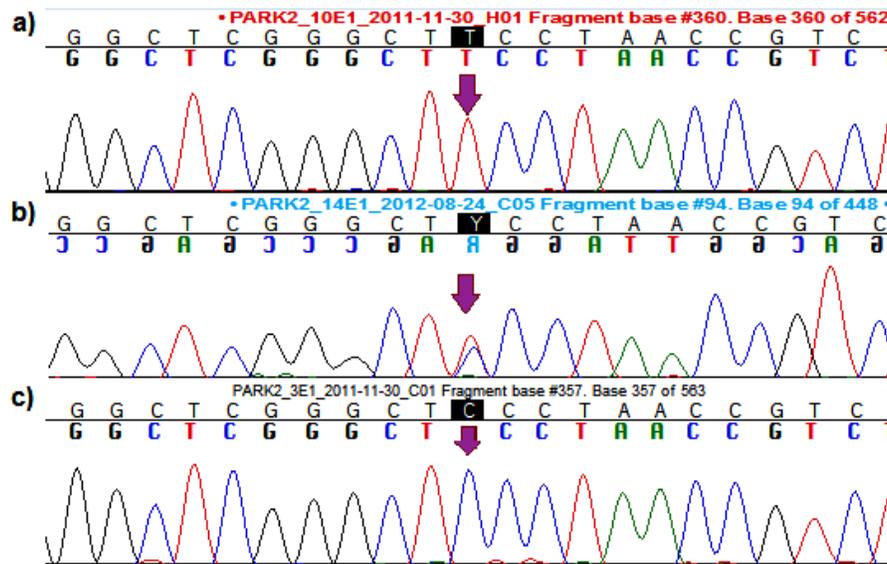


Figura 14. Electroferograma representativo de la secuencia parcial de exón 1 de *PINK1*. Se muestran los genotipos del polimorfismo Leu63Leu. a) Homocigoto TT, b) heterocigoto CT y c) homocigoto silvestre CC.

También en las variantes exónicas p.Gly91GlyfsX y p.Ala443AlafsX38 el codón resultante de la deleción codifica para el mismo aminoácido, en la posición 91 y 443 respectivamente pero como se genera un corrimiento de marco de lectura y un codón de paro a 14 y 38 posiciones, respectivamente, es evidente que hay un cambio de aminoácido después de este codón.

En la figura 15 I) se observa un electroferograma representativo de la secuencia parcial del exón uno con la variante p.Gly91GlyfsX14, en inciso a) se indica con una flecha en donde se presentó la deleción homocigota de una citosina y es comparada con la secuencia silvestre (b). Esta misma figura en II) ejemplifica en a) la secuencia silvestre con el codón – GGC- que codifica para glicina y en inciso b) el nuevo codón generado a partir de la deleción de la cual genera el codón – GGT- que también codifica para glicina. Sin embargo, la deleción de la citosina genera un corrimiento de marco de lectura por lo que se genera un codón de paro prematuro, a 14 aminoácidos después del sitio de la deleción.

Al igual que en la figura pasada, en la figura 16 en I) se muestra la secuencia parcial de la variante p.Ala443AlafsX38 con la deleción de una citosina en estado heterocigoto encontrada en un paciente. La cual genera un codón de paro prematuro a 38 aminoácidos después del sitio de la deleción (mostrado en Fig. 15-II) y por lo tanto un corrimiento del marco de lectura. Esta misma deleción también fue identificada previamente en el grupo de trabajo (Márquez D. 2011) en 2 pacientes de un caso familiar con EP-ITE y ahora en un tercer caso no relacionado y sin antecedentes familiares.

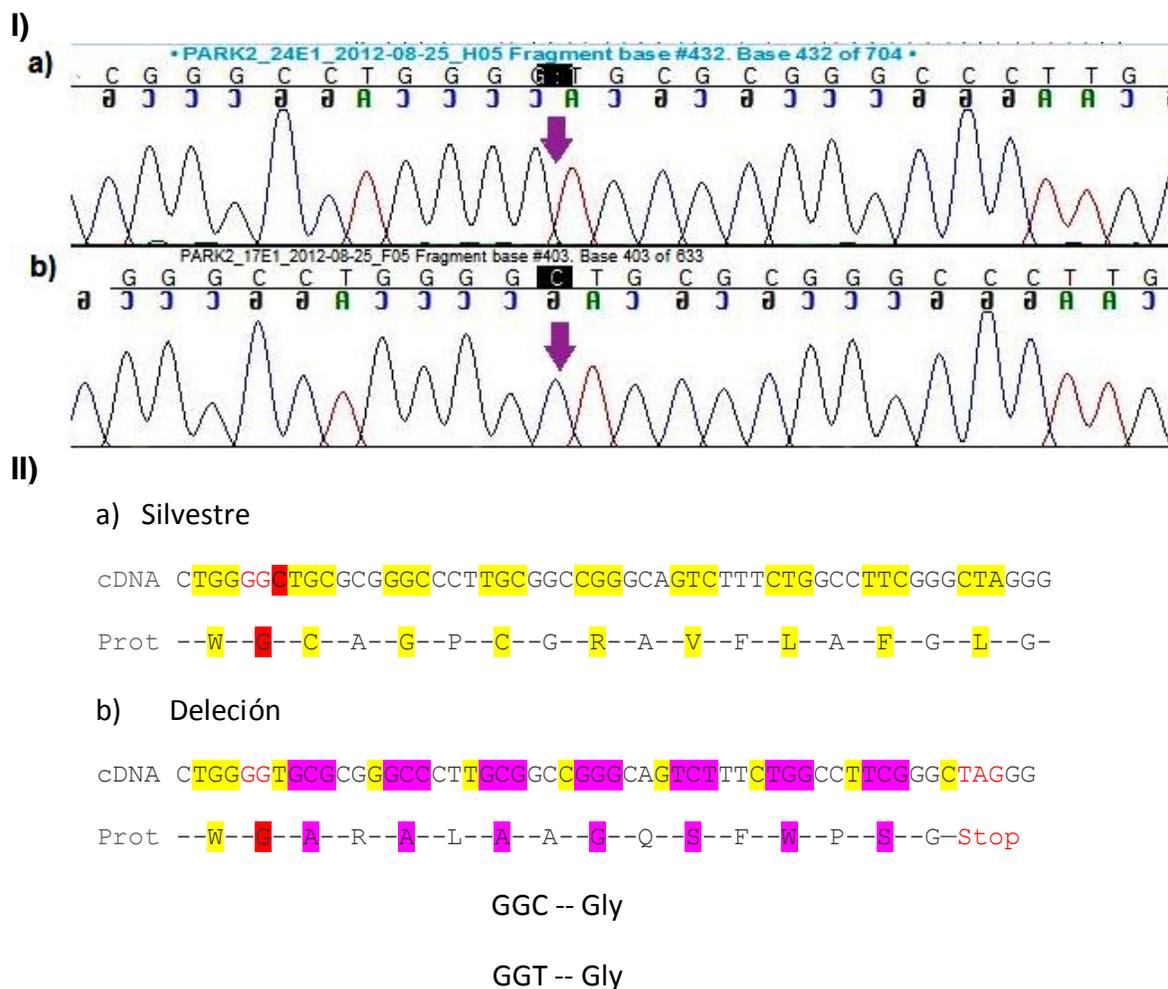


Figura 15. Electroferograma secuencia parcial del exón 1 de *PINK1*. Se muestra I) la mutación Gly91GlyfsX14 causada por la deleción de una citosina, en la posición de Glicina 91; a) deleción homocigota, b) secuencia silvestre. II) Se muestra el corrimiento de marco de lectura y la generación de un codón de paro prematuro a 14 aminoácidos del corrimiento.

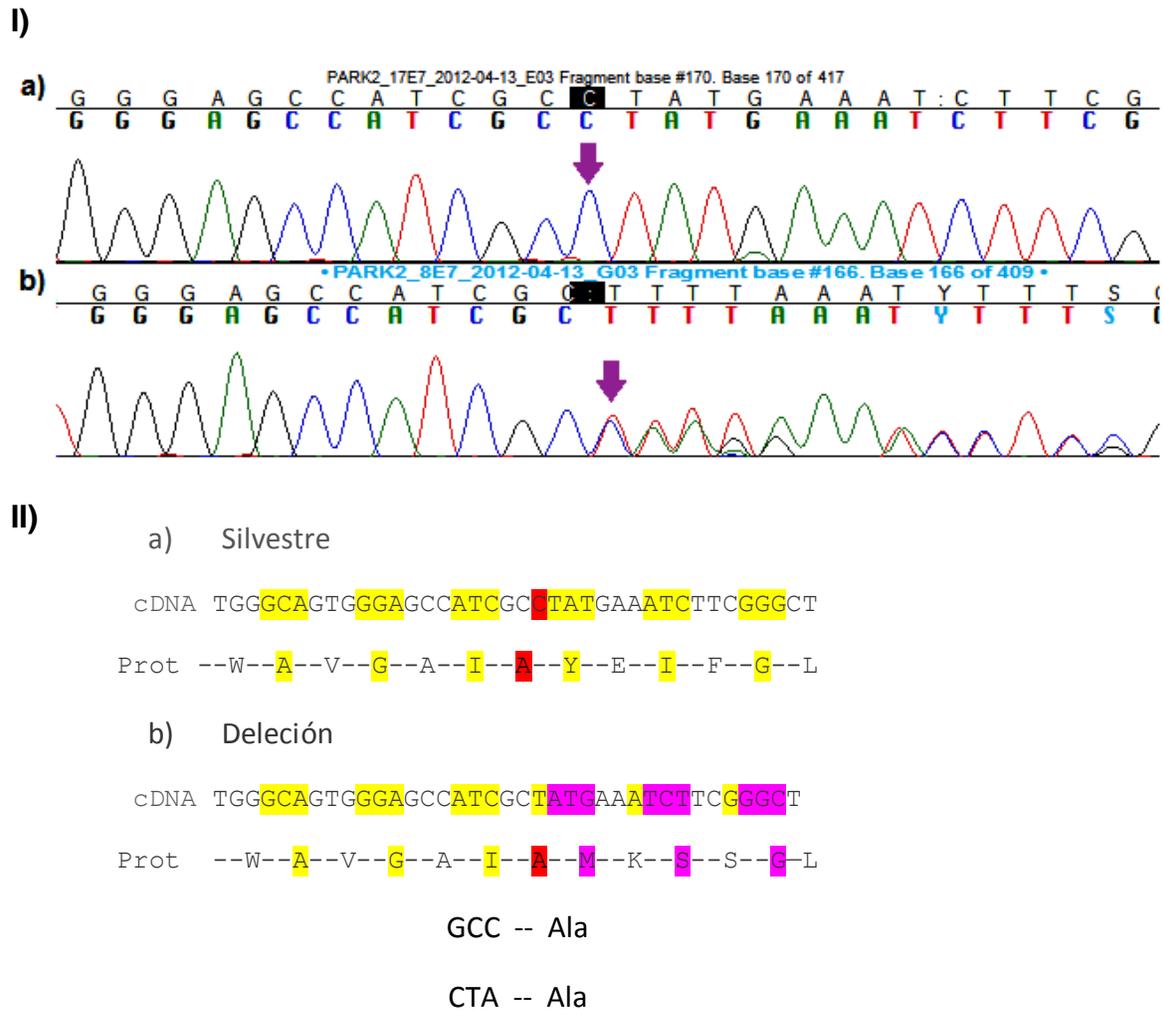


Figura 16. Secuencia parcial del exón 7 de *PINK1* donde se muestra I) la mutación g.1423delC, p.Ala443AlafsX38 causada por la delección de una citosina en la posición de Alanina 443; a) Secuencia silvestre, b) delección heterocigota. II) Se muestra el corrimiento en el marco de lectura generando un codón de paro 38 residuos después de la mutación.

Como las variantes Gly91GlyfsX en el exón uno y Ala443AlafsX38 en el exón siete de *PINK1* generan un codón de paro prematuro, y por lo tanto una proteína trunca, se determinó el tamaño de las proteínas empleando las herramientas de bioinformática *Expasy Translate* (<http://web.expasy.org/translate/>) y *Uniprot* (www.uniprot.org/uniprot/Q9BXM7). Los tamaños deducidos por estas herramientas muestran que el tamaño de la proteína silvestre es de 581aa. La proteína mutante, resultado de la variante Gly98GlyfsX es de 105aa, esta proteína es muy pequeña debido a que el codón de paro ocurrió muy cerca del sitio de la deleción en el exón uno. Y por último el tamaño de la proteína resultante de la secuencia con la mutación Ala443AlafsX38 es de 481aa (Figura 17).

a) Proteína Silvestre de PINK1.

10	20	30	40	50	60
MAVRQALGRG	LQLGRALLLR	FTGKPGRAYG	LGRP GPAAGC	VRGERPGWAA	GPGAEP RRVG
70	80	90	100	110	120
LGLPNRLRFF	RQSVAGLAAR	LQRQFVVRW	G CAGPCGRAV	FLAFGLGLGL	IEEKQAESRR
130	140	150	160	170	180
AVSACQEIQA	IFTQKSKPGP	DPLDTRRLQG	FRLEEYLIGQ	SIGKGC SAAV	YEATMPTLPQ
190	200	210	220	230	240
NLEVTKSTGL	LPGRGPGTSA	PGEGERAPG	APAFPLAIRM	MWNISAGSSS	EAILNTMSQE
250	260	270	280	290	300
LVPASRVALA	GEYGAVTYRK	SKRGPEQLAP	HPNIIRVLR	FTSSVPLLPG	ALVDYPDVLP
310	320	330	340	350	360
SRLHPEGLGH	GRTLFLVMKN	YPCTLRQYLC	VNTPSPRLAA	MMLLQLEGV	DHLVQQGIAH
370	380	390	400	410	420
RDLKSDNILV	ELDPDGC PWL	VIADFGCCLA	DESIGLQLPF	SSWYVDRGGN	GCLMAPEVST
430	440	450	460	470	480
ARPGPRAVID	YSKADAWAVG	A IYEIFGLV	NPFYQGKKAH	LESRSYQEAQ	LPALPESVPP
490	500	510	520	530	540
DVRQLVRALL	QREASKRPSA	RVAANVLHLS	LWGEHILALK	NLKLDKMVGW	LLQQSAATLL
550	560	570	<u>581aa</u>		
ANRLTEKCCV	ETKMKMLFLA	NLECEILCQA	ALLLCSWRAA	L	

b) Proteína mutante. Gly91GlyfsX14

MAVRQALGRG	LQLGRALLLR	FTGKPGRAYG	LGRP GPAAGC	VRGERPGWAA	GPGAEP RRVG
70	80	90	100	<u>105aa</u>	
LGLPNRLRFF	RQSVAGLAAR	LQRQFVVRW	G ARALAAQS	FWPSG*	

c) Proteína mutante. Ala443AlafsX38

10	20	30	40	50	60
MAVRQALGRG	LQLGRALLLR	FTGKPGRAYG	LGRP GPAAGC	VRGERPGWAA	GPGAEP RRVG
70	80	90	100	110	120
LGLPNRLRFF	RQSVAGLAAR	LQRQFVVRW	GCAGPCGRAV	FLAFGLGLGL	IEEKQAESRR
130	140	150	160	170	180
AVSACQEIQA	IFTQKSKPGP	DPLDTRRLQG	FRLEEYLIGQ	SIGKGC SAAV	YEATMPTLPQ
190	200	210	220	230	240
NLEVTKSTGL	LPGRGPGTSA	PGEGERAPG	APAFPLAIRM	MWNISAGSSS	EAILNTMSQE
250	260	270	280	290	300
LVPASRVALA	GEYGAVTYRK	SKRGPEQLAP	HPNIIRVLR	FTSSVPLLPG	ALVDYPDVLP
310	320	330	340	350	360
SRLHPEGLGH	GRTLFLVMKN	YPCTLRQYLC	VNTPSPRLAA	MMLLQLEGV	DHLVQQGIAH
370	380	390	400	410	420
RDLKSDNILV	ELDPDGC PWL	VIADFGCCLA	DESIGLQLPF	SSWYVDRGGN	GCLMAPEVST
430	440	450	460	470	480
ARPGPRAVID	YSKADAWAVG	A IMKSSGLS	IPSTARAREPTL	KAAATKRLSY	LHCLPSQCLQ
<u>481aa</u>					
T*					

Figura 17. Predicción de las secuencias proteicas mutantes de PINK1. En a) secuencia de la proteína silvestre, b) Proteína mutante resultante de la deleción homocigota p.Gly91GlyfsX14 y c) Proteína mutada por la deleción heterocigota p.Ala443AlafsX38.

En rojo se muestran los aminoácidos afectados por las mutaciones.

En ocasiones el cambio de una base en la secuencia de un gen, puede generar un codón que codifique para otro aminoácido diferente al silvestre. En este caso se trata de una variante no sinónima como la observada en este trabajo: Ala340Thr donde ocurrió el cambio de una alanina por una treonina en la posición 340 de la proteína PINK1. Otro caso similar fue la variante Asn521Thr; donde el cambio es de asparagina por treonina en el residuo 521 de la proteína. La figura 18 muestra el electroferograma de la variante Ala340Thr, donde se observa el cambio de base (indicada con flecha) de una guanina por una adenina. En el inciso (a): se muestra el genotipo heterocigoto GA que genera un nuevo codón –ACC– que codifica para treonina y en el inciso (b) se muestra el genotipo silvestre GG del codón original –GCC– el cual codifica para alanina.

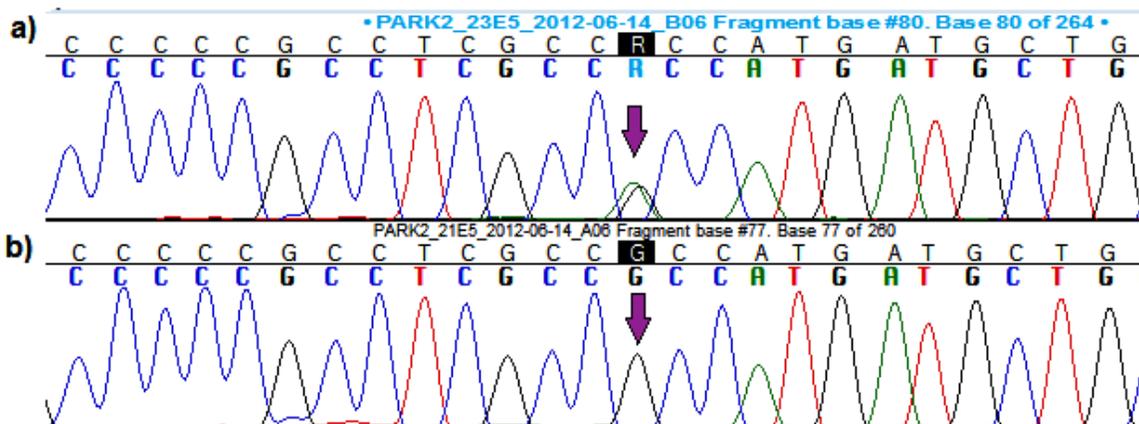


Figura 18. Electroferograma representativo del polimorfismo Ala340Thr encontrado en el exón 5 de *PINK1*. En a) genotipo heterocigoto GA, b) genotipo silvestre GG.

En la figura 19 se presentan los tres genotipos de la variante Asn521Thr, en: a) y b) la variante heterocigota y homocigota que generan el codón –ACU– que codifica para treonina (Thr), y en c) el genotipo silvestre con el codón –AAU– que codifica para asparagina (Asn).

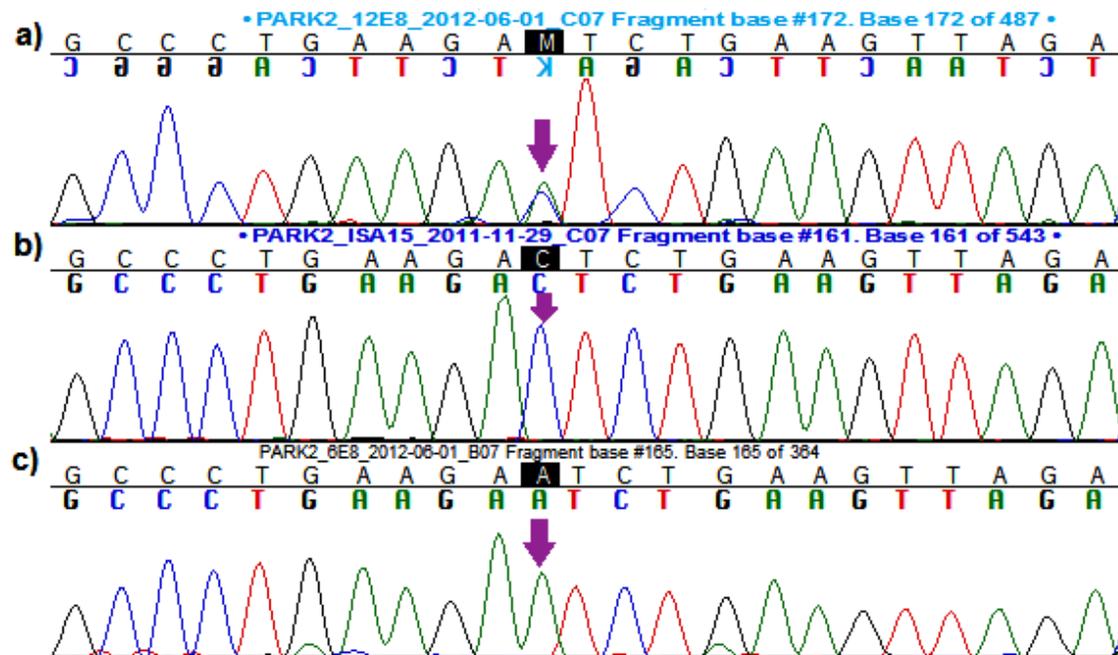


Figura 19. Electroferograma representativo de la secuencia parcial del exón 8 de *PINK1*. Se muestran los tres genotipos para la variante Asn521Thr .**a)** heterocigoto AC, **b)** homocigoto CC, y **c)** homocigoto AA silvestre.

La tabla 9 también indica el número de pacientes en estado homocigoto y heterocigoto que se encontraron para cada variante (columna cinco). En la variante Leu63Leu se observó en dos pacientes en estado homocigoto y seis en estado heterocigoto. Encontrando solo un paciente en estado homocigoto para Gly91GlyfsX14 y uno en estado heterocigoto para la variante Ala443AlafsX38, de igual forma para la variante Ala340Thr del exón 5 se encontró en siete pacientes en estado heterocigoto. Finalmente en el exón 8 la variante Asn521Thr fue la de mayor prevalencia, presentándose en dieciocho pacientes, seis en estado homocigoto y doce heterocigotos. Las variantes Leu63Leu, Ala340Thr y Asn521Thr se consideran polimorfismos ya que su frecuencia en controles en diferentes poblaciones es mayor a uno (<http://www.molgen.ua.ac.be/PDmutDB>).

De esta última variante Asn521Thr, nos llamó la atención su alta prevalencia en pacientes en este trabajo (N=45) y en un estudio previo del grupo de trabajo

(Marqu ez D. 2011), lo que nos hizo considerarlo como un posible marcador de riesgo para desarrollar EP-ITE en población mexicana. Por ello, se realizó un estudio en cincuenta controles sanos de nuestra población (Datos de reporte de Servicio Social de González P). En los controles se encontró la variante Asn521Thr sólo en estado heterocigoto, pero no en estado homocigoto. Por lo que la variante en estado homocigoto podría ser un posible marcador. Después se realizó el análisis estadístico de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variante con prueba de Chi cuadrada y la prueba estadística para obtener el riesgo relativo y OR (*odds ratio*) mostrado en la tabla 10, para lo cual se emplearon datos de controles y pacientes. Un OR con valor menor a uno, nos dice que se trata de un polimorfismo de protección; por el contrario un OR mayor a uno, nos indica que el polimorfismo es de riesgo y dicho polimorfismo se encontrará con mayor frecuencia en el grupo de pacientes en comparación con los controles. Nuestra OR calculada fue de 4.7, lo que sugiere que el polimorfismo Asn521Thr en estado homocigoto es de riesgo para el desarrollo de la EP.

Se obtuvo la comparación con la base de datos de PDGene (<http://www.pdgene.org/>) la cual incluye una lista exhaustiva de todos los genes y sus polimorfismos para estudiar su posible asociación con la EP. Esta base de datos incluye una meta-análisis de esta variante, donde la asociación es limítrofe con un OR 0.93 (0.85-1.01) y un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 10. Estudio de casos-controles para la frecuencia de la variante homocigota Asn521Thr.

Parámetro	Valor
OR	4.76923 (95% CI: 2.968 < OR < 7.664)
Riesgo relativo:	1.653333 (95% CI: 1.452 < RR < 1.883)

OR: odds ratio, OR > 1 el SNP es de riesgo, OR < 1 el SNP es de protección.

La columna seis de la tabla 9 indica la predicción de qué tan dañina puede ser un cambio no sinónimo en las propiedades de la proteína estudiada. Este valor de predicción de patogenicidad se obtuvo con la herramienta de bioinformática *PolyPhen* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/ppc>). *Polyphen* predice el posible impacto de una sustitución de aminoácido en la estructura y la función de una proteína humana usando consideraciones físicas y comparativas directas. El análisis de las variantes Leu63Leu, Ala340Thr y Asn521Thr mostró que no son perjudiciales al no presentar un impacto por la sustitución de los aminoácidos involucrados y por lo tanto no son patogénicas. A diferencia de las mutaciones Gly91GlyfsX14 y Ala443AlafsX38 las cuales son predecidas como patogénicas.

En la tabla 11 se mencionan las características de los pacientes que presentaron las mutaciones patogénicas causadas por la delección de una citosina. Ambos casos son de género masculino y sin antecedentes familiares; sin embargo, se observa que el paciente con la mutación Gly91GlyfsX14 inicia la EP a menor edad que el de la mutación Ala443AlafsX38, lo que podría sugerir que el tamaño de la proteína influye en la edad de inicio de la enfermedad.

Tabla 11. Características de los pacientes que presentaron mutaciones perjudiciales que afectan la función de la proteína.

Caso	PK	Mutación	Género	Edad	AF
1	394	Gly91GlyfsX14	M	19	(-)
2	512	Ala443AlafsX38	M	28	(-)

PK: número de paciente con EP, AF: antecedentes familiares, M: masculino.

En la columna siete de la tabla 9 se indica en qué dominio de la proteína PINK1 se encuentra la variante exónica. Las dos variantes exónicas en el exón 1 se encuentran en la región de tránsito, las variantes del exón cinco y siete, en el dominio de cinasa y la variante del exón ocho en la región carboxilo terminal de la proteína. Y por último en la última columna de la Tabla 7, se encuentran las referencias donde se han descrito estos SNPs, incluyendo la base de datos específica para la enfermedad de Parkinson (<http://www.molgen.ua.ac.be/PDmutDB>).

Variantes intrónicas

La localización de los oligonucleótidos en las uniones exón-Intrón del gen *PINK1*, permitió analizar aproximadamente 20 nucleótidos de secuencia intrónica, incluyendo el sitio donador (5') y aceptor (3') de *splicing*. La tabla 12 muestra las variantes intrónicas encontradas en las secuencias obtenidas de los pacientes. Se encontraron cuatro variantes que ya han sido reportadas y también analizadas por nuestro grupo de trabajo utilizando la herramienta *Human splince finder* (<http://www.umd.be/HSF/>) como no patogénicas por no alterar el proceso de *splicing* por (Márquez D. 2011).

Tabla 12. Polimorfismos intrónicos identificados en los pacientes con EP-ITE (N=45).

Intrón	Variante	Número de pacientes	
		homocigoto	heterocigoto
1	rs2298297, IVS1+3842C>G	1	3
	rs2298298, IVS1+3900A>G	22	11
5	rs3131713, g.20972048 G>A	13	10
3'UTR	rs686658, g.22274A>T	10	7

De la Figura 20 a la 23 se ilustran los genotipos de las variantes intrónicas encontradas en esta muestra, las cuales se reportan en la tabla 12.

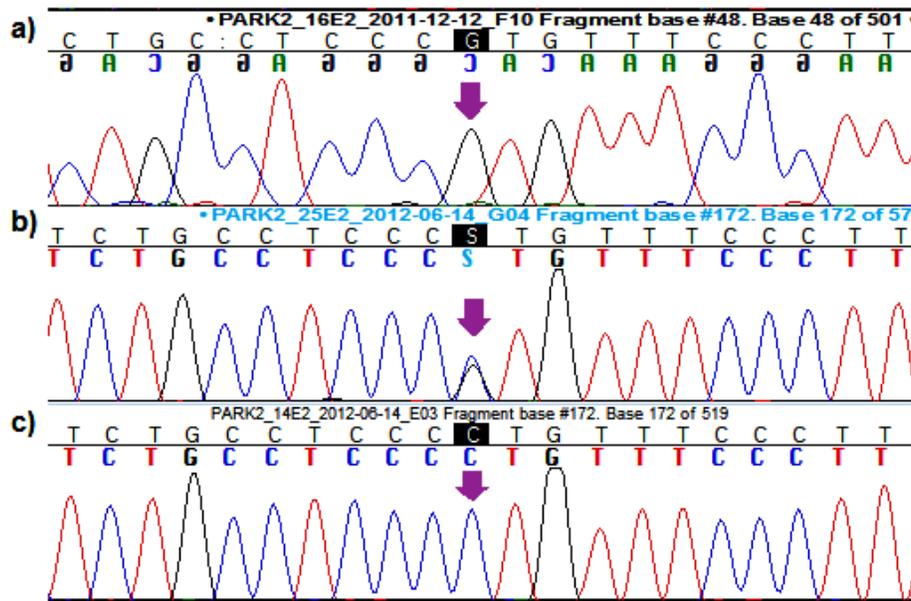


Figura 20. Electroferograma representativo secuencia intrónica, donde se muestran los genotipos de la variante rs2298297, IVS1+3842C>G. a) homocigoto GG, b) heterocigoto CG y c) silvestre CC.

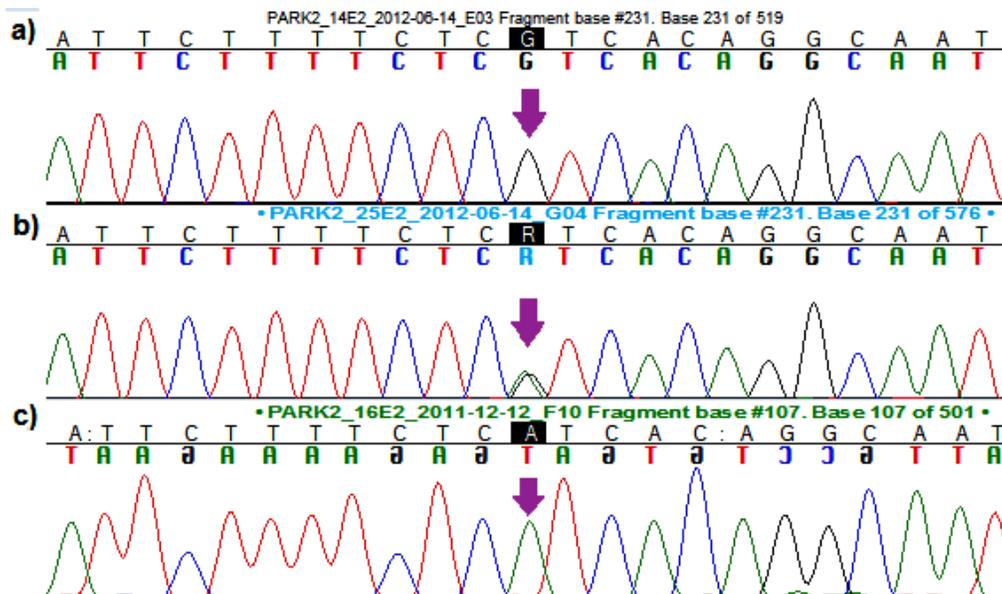


Figura 21. Electroferograma representativo de la secuencia intrónica, donde se muestran los tres genotipos para el polimorfismo rs2298298, IVS1+3900A>G. en a) homocigoto GG, b) heterocigoto AG y c) silvestre AA.

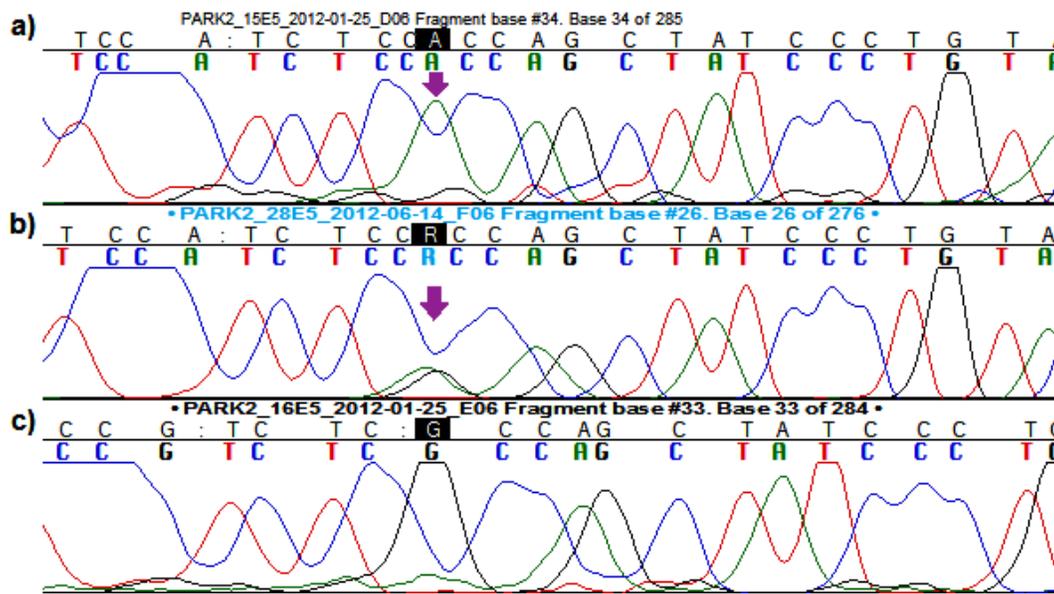


Figura 22. Electroferograma representativo de la secuencia intrónica, donde se muestran los tres genotipos para el polimorfismo rs3131713, g.20972048 G>A. en a) homocigoto AA, b) heterocigoto GA y c) silvestre GG.

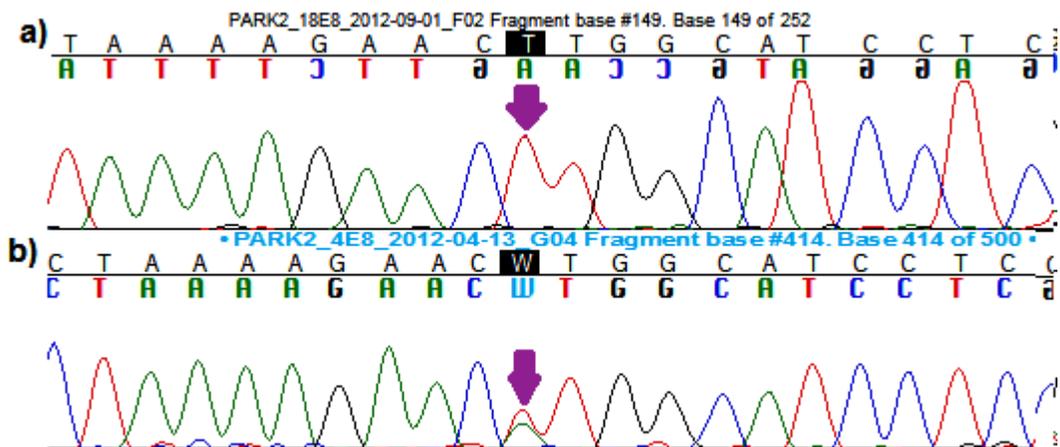


Figura 23. Electroferograma representativo de la secuencia intrónica. Se muestran los tres genotipos para el polimorfismo rs686658, g.22274 A>T. En a) homocigoto GG, b) heterocigoto AG.

Dosis génica

Se incluyeron 55 muestras de pacientes con EP-ITE de secuencias ya analizadas y las 45 muestras analizadas en este trabajo (N=100). La determinación de dosis génica se realizó mediante PCR en tiempo real en un equipo *STEP ONE* (*Applied Biosystems*). Obtuvimos las amplificaciones para todos los exones de *PINK1* (no mostradas), en la figura 24 se muestra un ejemplo de la amplificación para el exón 6 de *PINK1* y el control endógeno *RNasaP*. Donde ΔRn indica la intensidad de la emisión de la fluorescencia del reportero dividida entre la intensidad de la emisión de fluorescencia del gen de referencia.

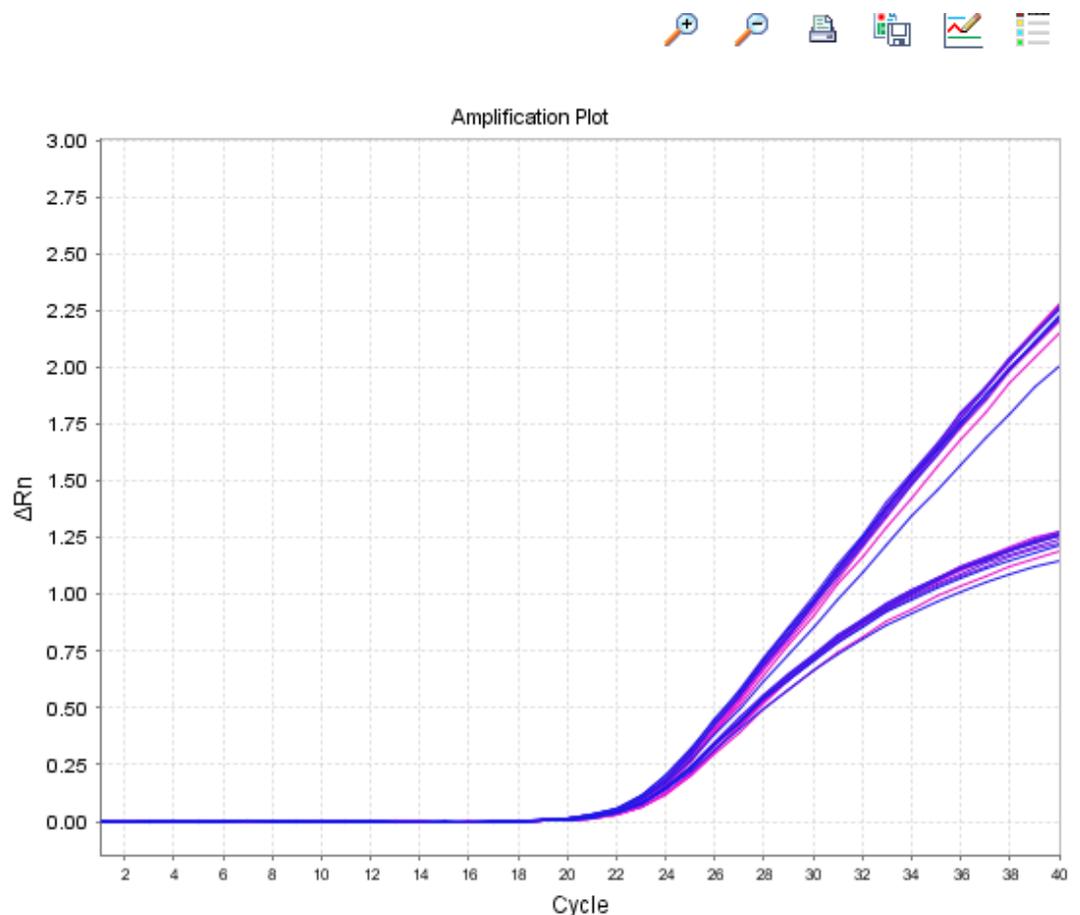


Figura 24. Gráfica representativa de amplificación. ΔRn vs ciclos del exón 6 de *PINK1*. *PINK1* (azul) y *RNasaP* (rosa).

Se analizó la dosis génica de los 8 exones del gen *PINK1* de 100 pacientes. La muestra estuvo constituida por 38 mujeres y 61 hombres, con una edad promedio de 36.8 años, de los cuales 27 casos presentaban antecedentes familiares positivos. La tabla 13 muestra las variaciones estructurales encontradas en el gen *PINK1*, de los 100 pacientes con EP-ITE. Se identificaron diferentes variaciones estructurales en nueve casos. Siete pacientes mostraron alteración de dosis en el exón 1; seis de éstos presentaron delección (heterocigota y homocigota) y un caso mostró una duplicación en estado homocigoto. La muestra PK220 presentó duplicación heterocigota; en los exones 2 y 5 (heterocigoto compuesto) y en la muestra PK57 se identificó una duplicación homocigota en el exón 7.

Tabla 13. Variaciones estructurales de los ocho exones de *PINK1*.

Núm caso	PK	Género	Edad	AF	EXÓN							
					1	2	3	4	5	6	7	8
1	8	F	40	NO	del ht	n	n	n	n	n	n	n
2	20	F	22	SI	del ht	n	n	n	n	n	n	n
3	57	M	31	NO	n	n	n	n	n	n	dup hm	n
4	220	M	34	NO	n	dup ht	n	n	dup ht	n	n	n
5	332	F	40	NO	del hm	n	n	n	n	n	n	n
6	363	F	33	SI	dup hm	n	n	n	n	n	n	n
7	472	M	42	NO	del ht	n	n	n	n	n	n	n
8	543	F	45	NO	del ht	n	n	n	n	n	n	n
9	635	F	20	SI	del ht	n	n	n	n	n	n	n

PK: registro de paciente con EP, F: femenino, M: masculino, AF: antecedentes familiares, del: delección, dup: duplicación, hm: homocigota, ht: heterocigota, n: normal

De los 100 pacientes analizados para dosis génica se encontró 9% de casos con variación estructural génica. De éstas, 66.7% correspondieron a deleciones y 33.3% a duplicaciones.

En la figura 25 se muestra un caso familiar de dos hermanas con EP-ITE caso 2 y 9 de la tabla 13 (casos II.1 y II.8 del árbol genealógico figura 25b), quienes presentaron una deleción heterocigota en el exón uno de *PINK1* con un valor de dosis génica de 0.62 que se compara con la dosis de un control que tiene un valor igual a uno (25a). El criterio para determinar la variante estructural se tomó de la tabla 8 descrita en la metodología. En el árbol genealógico de este caso familiar de EP-ITE, el caso índice está marcado con una flecha (individuo II.1), y a cada lado de las pacientes estudiadas, se indica la edad de inicio de la EP. En el árbol se observa que el individuo II.7 también está afectado por la EP, sin embargo no se contó con su muestra para su estudio.

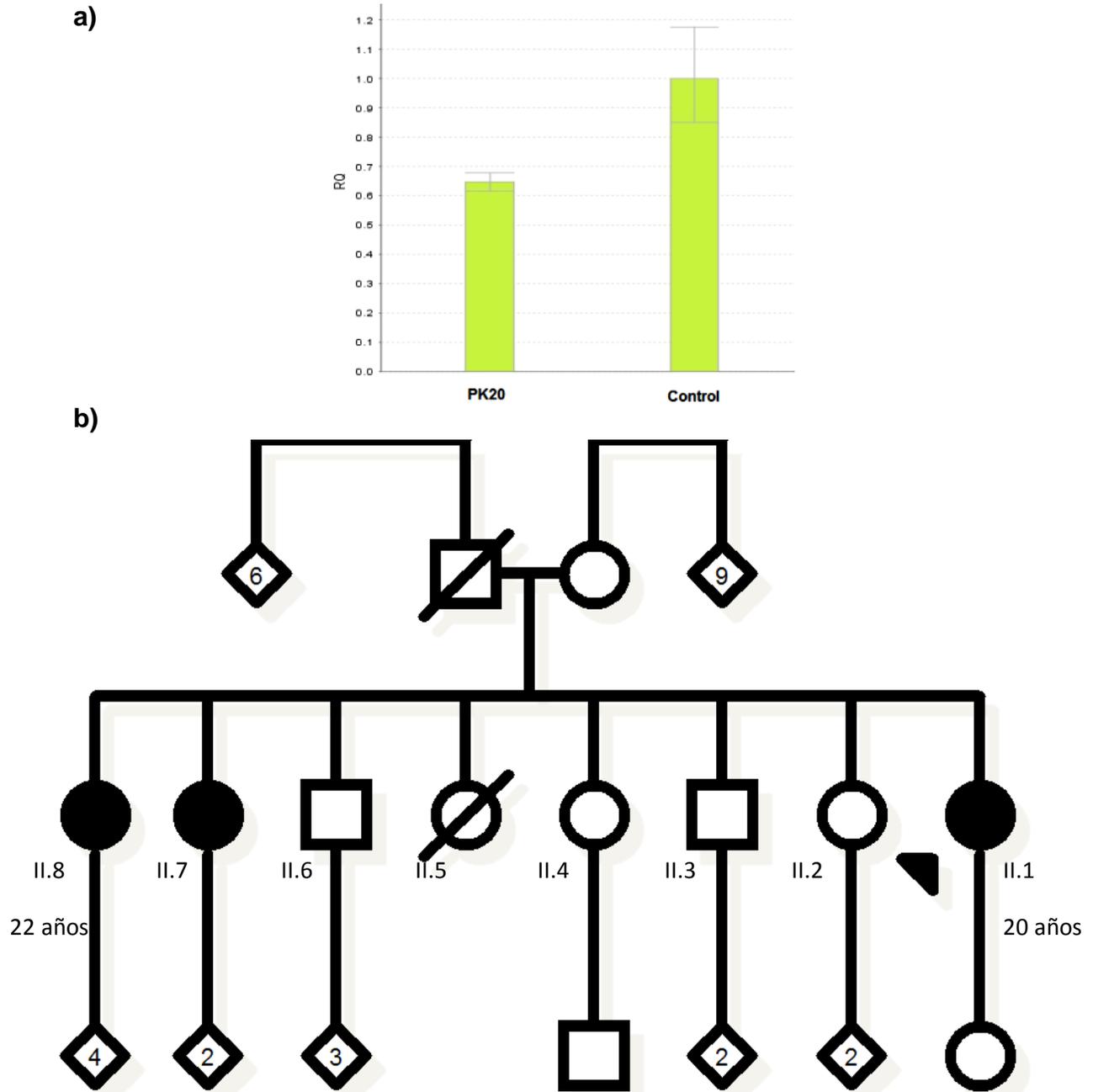


Figura 25. a) Dosis génica de deleción heterocigota del paciente PK20 y la dosis de un control. b) Genealogía familiar de los casos 2 y 9 que presenta la deleción heterocigota (individuos II.1 y II.8) y sus edades de inicio.

DISCUSIÓN

Hasta la fecha se han reportado 138 diferentes tipos de mutaciones en el gen *PINK1* como son: mutaciones puntuales, deleciones de uno o varios exones que provocan la terminación prematura en la traducción o bien deleciones que conservan el marco de lectura, inserciones o deleciones de uno o más pares de bases ocasionando mutaciones con cambio en el marco de lectura, y mutaciones en las regiones intrónicas que afecten el sitio donador de *splicing* (Tan E, et al 2006, Myhre R, et al 2008; PDmutDB). Este trabajo amplía el espectro de mutaciones de *PINK1* en la EP-ITE con la identificación de 2 nuevas mutaciones ambas deleciones de una citosina y 9 variaciones estructurales o CNVs del gen: 6 deleciones y 3 duplicaciones.

El interés de identificar la prevalencia de mutaciones y alteraciones estructurales (CNVs) en el gen *PINK1* de población mexicana es el de identificar posibles marcadores genéticos de la población, los cuales pueden ser factores de riesgo para el desarrollo de la EP, ya que se ha observado en muchos casos que el efecto de una determinada variación genética depende del grupo étnico del paciente. A modo de ejemplo Li C, et al encontraron la variante Gly2385Arg de gen *LRRK2* en población asiática incrementando la susceptibilidad de dos a tres veces de padecer EP en las poblaciones de China, Japón y Corea, sin embargo la variante no se ha encontrado en otras poblaciones como en la europea. En este trabajo se reportan mutaciones y CNVs que no han sido reportadas en ninguna otra región.

También es de interés saber el posible riesgo o efecto atribuible a las variantes encontradas. Xiong H, et al investigaron en células de neuroblastoma la ubiquitinación de Parkina en presencia de *PINK1* silvestre y una mutante patogénica de este, observando que la ubiquitinación se reduce notablemente con *PINK1* mutada y con ello la disfunción mitocondrial.

La base de datos de la EP (PDmutDB) reporta que la mayoría de las mutaciones caen en el dominio cinasa de la proteína PINK1 en un 71%, un 28% en C-terminal y solo 7% en el dominio tránsito. Entonces como la mayoría de las mutaciones asociada a la EP se asignan a las regiones conservadas del dominio catalítico cinasa de PINK1, es posible que la pérdida de actividad catalítica de este dominio sea la causa común de EP (Cookson M, 2012).

Hung S, et al emplearon sistemas de células de insecto infectadas con baculovirus para expresar la proteína recombinante que consiste en el dominio cinasa de PINK1 ya sea solo [PINK1 (CD)] o con el cola C-termina PINK1. [PINK1 (CD + T)], la introducción de las mutaciones asociada a la EP con patrón de herencia autosómica recesiva, Gly386Ala y Gly409Val reduce significativamente la actividad de cinasa PINK1 (KD). También demuestran que PINK1 (KD + T) es ~ 6 veces más activo que PINK1 (KD) por lo que se deduce que C-terminal tiene motivos que mejoran la actividad cinasa, en la selectividad de los sustratos. Dicho lo anterior se explica la afectación de las mutaciones predecidas como patogénica por la herramienta *Polyphen*: p.Gly91GlyfsX14 y p.Ala443AlafsX38.

La delección homocigota p.Gly91GlyfsX14 que se encontró en el exón 1 se identificó en un caso de 19 años de edad, sin antecedentes familiares, originario del estado de Oaxaca. Esta mutación no está reportada en las bases de datos. Sin embargo, en un trabajo anterior del grupo de trabajo (Márquez D. 2011), se reportó la delección en estado heterocigoto en otro caso esporádico no relacionado, proveniente del Estado de México. Esta delección no genera cambio de aminoácido, esto ocurre a partir del siguiente residuo, generando un nuevo marco de lectura con un codón de paro prematuro. Originando una proteína de 105 aa (figura 17 b), por lo que pierde todo el dominio de cinasa así como la región C-terminal, dejándola sin actividad catalítica.

Con respecto a la delección heterocigota p.Ala443AlafsX38 en el exón 7. La cual también conlleva a una proteína trunca de 481aa, perdiendo solo parte del dominio cinasa y toda la región C-terminal, lo que podría afectar el sitio catalítico y por lo

tanto no ejercer su actividad, causando así la disfunción mitocondrial (*Nuytemans K. et al* 2010). La edad de inicio de la EP del paciente con la mutación es de 28 años, no tiene antecedentes familiares y es originario del estado de Veracruz. De manera interesante, en el estudio previo del grupo de trabajo, esta mutación también se identificó en una familia de San Luis Potosí (*Márquez D* 2011). Sería importante realizar un estudio más amplio en familiares de este paciente. Desafortunadamente, las muestras de los progenitores de los pacientes no estuvieron disponibles para analizar la segregación.

Estas dos deleciones son consideradas patogénicas y representan el 2% de la pequeña muestra analizada (n=100), lo que coincide con la literatura puesto que estas mutaciones solo pueden explicar una pequeña fracción de la EP (*Puschmann A* 2011).

Llama la atención que ambas mutaciones fueron descritas en otros pacientes no relacionados y de diferente lugar de origen previamente estudiados por nuestro grupo. Además la edad de inicio es más temprana en la deleción homocigota del exón 1 que en la deleción heterocigota del exón 7, lo que explicaría que hay mayor efecto de una proteína trunca de menor tamaño que pierde todo el dominio cinasa a la de una de mayor tamaño que aún tiene parte del dominio catalítico (figura 17). Sería necesario realizar un estudio más detallado para determinar el origen de las mismas así como el mismo comportamiento con la edad de inicio de la EP-ITE.

La tabla 9 muestra los polimorfismos tipo SNP encontrados en los 8 exones del gen *PINK1* de los 45 pacientes con EP-ITE. Estos SNPs (Leu63Leu, Ala340Thr, Asn521Thr) ya han sido reportados y estudios funcionales en cultivos celulares han demostrado que no son patogénicos (*Valente E, et al*, 2004 <http://www.molgen.ua.ac.be/PDmutDB>). Sin embargo, se observó una gran prevalencia de la variante Asn521Thr, en estado homocigoto y heterocigoto (Figura 19). En la literatura se sugiere que esta variante puede funcionar como factor de riesgo e incrementar el riesgo de la EP, aunque es controversial por su variación en las distintas poblaciones (*Groen J*, 2004, *Clarimón J*, 2006). Por lo

anterior, el grupo de trabajo (datos servicio social *González P*) determinó la frecuencia de este polimorfismo en controles mayores de 50 años y que no padecían de algún desorden neurodegenerativo. El genotipo heterocigoto estuvo presente en pacientes y controles. De manera interesante, ningún control presentó el genotipo homocigoto de esta variante. Esto último llamó la atención y se pensó como posible factor de riesgo para la EP-ITE en población mexicana, por lo que se realizó un análisis estadístico, el cual al dar un valor de OR mayor a uno, sugiere que este genotipo podría influir en la susceptibilidad para el desarrollo de la EP-ITE; sin embargo, sería necesario ampliar el tamaño de muestra para confirmarlo (tabla 10).

Las variantes intrónicas aquí reportadas (tabla 12) ya fueron identificadas en estudios anteriores incluyendo nuestro grupo de trabajo (dbSNP www.ncbi.nlm.nih.gov ; Marquéz D, 2011), y mediante la herramienta de bioinformática *Human Splince finder* (estudio *in silico*) se analizaron los posibles cambios que afectan los sitios donadores y aceptores del proceso *splicing*, la variante no altera la función por lo que no tienen asociación con la EP-ITE.

En relación a las alteraciones estructurales, CNVs identificadas en los 100 pacientes, identificamos tanto deleciones como duplicaciones.

Las deleciones se encontraron en el exón 1 de *PINK1*, siendo las deleciones heterocigotas las de mayor prevalencia con 5 casos y solo un caso presentó deleción homocigota al presentar una dosis de cero, y un último caso presentó una duplicación homocigota. Sin embargo, no se ha reportado duplicación en dosis génica para este exón. Resulta interesante investigar cómo esta duplicación ejerce una disfunción en *PINK1* para generar la EP.

Las duplicaciones ya se han descrito en los otros genes recesivos causantes de EP-ITE (*PARK2* y *DJ-1*) En general, las duplicaciones de exones en un gen multiexónico llevan a pérdida de función a través un proceso de *splicing* alterado, un corrimiento del marco de lectura o una traducción trunca por terminación prematura (*Djarmati A, et al 2004; Pankratz N, et al 2011*).

En el árbol genealógico de la Figura 25 se presenta el caso familiar de tres afectadas. Solo pudimos estudiar a dos de ellas (II.1 y II.8). Ambas hermanas presentaron delección heterocigota en el exón 1. El caso II.1 presentó las manifestaciones clínicas a los 20 años y el caso II.8 presentó manifestaciones leves a los 20 años. Tienen una tercera hermana (II.7) con EP y es de suponer que también presenta delección heterocigota, aunque es necesario confirmarlo.

Las delecciones y la duplicación en el exón uno se encuentran en el dominio de N-terminal mitocondrial de PINK1 lo que puede perturbar la translocación mitocondrial. PINK1 es reclutado a la mitocondria por el receptor TOM20 (translocasa de membrana externa), cuando la membrana mitocondrial se encuentra despolarizada, dejando hacia el citosol el extremo C-terminal del dominio cinasa de PINK1 (*Hung C, et al 2012*), pero esto depende del potencial de membrana mitocondrial, si PINK1 se incorpora a la membrana externa (OM) y forma complejo con TOM20 o se importa en la mitocondria por un canal contiguo formado por el complejo TOM y TIM23. Por lo que estas variaciones estructurales en el dominio N-terminal podrían afectar el reconocimiento al receptor TOM20, impidiendo su anclaje a la membrana externa mitocondrial y dar como resultado una disfunción mitocondrial. Esta situación atraería a parkina a la mitocondria para su reclutamiento; se cree que junto a PINK1 participan en la misma vía “río arriba” de la maquinaria de fisión/fusión mitocondrial (*Berger A, et al 2009; Weihofen A, et al 2009; Perier C and Vila M 2012*). De hecho, *Kawajiri et al 2011* y *Narendra D, et al 2008, 2009* se han demostrado que las mutaciones en ambos genes resultan en un aumento de la fisión mitocondrial en células de mamífero. Además, parkina ha demostrado ser reclutada a las mitocondrias disfuncionales, apuntando hacia un posible papel en la inducción de mitofagia ya que la mitocondria es desprovista de mitofusinas, haciendo que ya no pueda ser fusionada con otra sana, convirtiéndola en un blanco para la degradación vía mitofagia.

El caso 3 (PK 57) muestra una duplicación heterocigota en el exón 7 de *PINK1*, lo que supone una pérdida de función para causar la EP. Ahora bien, no sabemos

cuál es el tamaño de la región duplicada, puede ser todo el exón e incluso involucrar parte intrónica. Si pensamos que la alteración se encuentra en el sitio de cinasa, nuevamente hay pérdida del sitio catalítico. *Kondopalli et al*, sugirieron que las mutaciones con pérdida de función en *PINK1* darían lugar a la supresión de la ligasa E3 y reducción de la ubiquitinación de los blancos de parkina llevando así a la degradación vía proteosoma.

El caso 4 (muestra PK220) es interesante ya que presenta dos duplicaciones heterocigotas en el exón 2 y 5, por lo que hace pensar que en la segregación cada padre probablemente donó un alelo mutado, aunque sería necesario tomar muestras de sus progenitores para analizar la segregación. Y nuevamente las mutaciones están dentro del dominio cinasa, afectando su función.

De manera interesante, el 66.7% de los casos con variación estructural no tuvieron antecedentes familiares de la EP, por lo que se tratan de casos esporádicos. El 66.7% de las variaciones se presentaron en mujeres, dato que llama la atención pues existe una prevalencia mundial de EP mayor en los hombres (*Searles N, et al/2013*). En relación a la edad de inicio y la presencia de alteraciones en *PINK1*, se observó que las deleciones se presentaron en casos con edad de inicio alrededor de los 40 años (ninguno tiene antecedentes familiares); excepto en el caso 2 y 9 que presentaron edades de inicio de 20 y 22 años (siendo el caso familiar), y las duplicaciones se asociaron con edades de inicio alrededor de los 30 años. El tamaño de muestras positivas con alteración estructural en *PINK1* es pequeño, pero se observa una tendencia de una menor edad de inicio en presencia de duplicaciones y en el caso familiar de deleción heterocigota. Sería interesante ampliar la muestra y ver si se confirma esta tendencia para buscar una explicación biológica.

Los primeros estudios de mutaciones de *PINK1* se enfocaban exclusivamente en las mutaciones de secuencia. Debido a estos, la frecuencia de mutaciones podría estar subestimada ya que no existen muchos estudios de variaciones estructurales en el gen *PINK1*. En un estudio de pacientes brasileños, se reportó una deleción

heterocigota en el exón 1 (Vasconcelos K, 2012) o bien de exones completos como es el caso de Li Y, et al. (2005) que identificaron una delección homocigótica de los exones 6 a 8 del gen en un paciente Japonés. El caso de una familia sudanesa donde 3 hermanos presentaron delección homocigota de los exones 4-8 (Cazeneuve C, et al 2009). En población china donde se reporta una frecuencia de 3.1% deleciones de los exones 3-8 (Guo J, et al 2010).

En este trabajo se reporta una elevada frecuencia de alteraciones estructurales del gen *PINK1*. La frecuencia identificada coincide con lo descrito en la literatura, donde las mutaciones y alteraciones estructurales en este gen explican el 9% de los casos de EP-ITE (Nuytemans K, et al 2010). Y al igual que el trabajo de Pankratz N, et al apoya los datos que sugieren que las CNVs juegan un papel como factor de riesgo, para el desarrollo de EP.

En resumen, el cambio en la secuencia nucleotídica de un gen (SNP) o en su número de copias (CNV) puede conducir a cambios en su estructura, en la secuencia de sus aminoácidos o en el tamaño de la proteína resultante y en consecuencia, alterar su acción enzimática, su estabilidad o su capacidad de unión a otras moléculas.

Finalmente, es importante mencionar que los casos que no presentaron mutación o solo presentaron un alelo mutado de *PINK1*, son buenos candidatos para la búsqueda de mutaciones en otros genes recesivos, causantes de EP-ITE.

CONCLUSIONES

Se encontraron dos mutaciones nuevas p.Gly91GlyfsX14 en el exón 1 y en el exón 7 p.Ala443AlafsX38.

Se encontraron 9% de casos con variación estructural en el gen *PINK1* en 100 casos de EP-ITE.

Este es el primer estudio en México que describe duplicaciones en *PINK1* como causa de EP-ITE.

Las mutaciones de *PINK1* explican 11% de los casos EP-ITE en la muestra estudiada, similar a lo descrito en la literatura.

En aquellos casos con cero o una mutación en *PINK1* no puede descartarse la presencia de mutaciones en otro(s) gen(es) recesivo(s).

PERSPECTIVA

La continuidad de este estudio, permitirá la detección de un perfil de susceptibilidad y causal en la EP-ITE.

BIBLIOGRAFÍA

- Bassett A, Scherer S, and Brzustowicz L. 2010. Copy Number Variations in Schizophrenia: Critical Review and New Perspectives on Concepts of Genetics and Disease. *Am J Psychiatry*. 167(8): 899–914.
- Beilina A, Van Der B, Ahmad R, Kesavapany S, et al. 2005. Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive Parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(16): 5703–5708.
- Berger A, Cortese G, Amodeo K, Weihofen A, Letai A, LaVoie M. 2009. Parkin selectively alters the intrinsic threshold for mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet*. 18(22):4317-28.
- Berq D and Bandmann O. 2013. Biomarkers for PD: How can we approach complexity? *Neurology*. 80(7):608-9.
- Biosystems A. 2008. Use of Internal and External Standards or Reference RNA for Accurate Quantitation of RNA Levels. *Hand book*. Pág 31-34.
- Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra B, Meco G, Heutink P. 2003. DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci*. 24(3):159-60.
- Brooks Janet, Ding J, Simon-Sanchez J, Paisan-Ruiz C, Singleton AB, Scholz SW. 2009. Parkin and PINK1 mutations in early-onset Parkinson's disease: comprehensive screening in publicly available case-control cohorts. *J. Med. Genet*. 46(6):375-81.
- Bustin S and Nolan T. 2004. Analysis of mRNA Expression by RealTime PCR. In: Real-Time PCR; an Essential Guide. K.J.Edwards et al., editors. *Horizon Bioscience.Wymondham*, p. 125-184.
- Campdelacreu J. 2012. Enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer: factores de riesgo ambientales. *Neurología*. doi.org/10.1016/j.nrl.2012.04.001.

- Cazeneuve C, Sâh C, Ibrahim S, Mukhtar M, Kheir M, Leguern E, Brice A, Salih M. 2009. A new complex homozygous large rearrangement of the PINK1 gene in a Sudanese family with early onset Parkinson's disease. *Neurogenetics*. 10 (3): 265-70.
- Clarimón J, Eerola J, Hellström O, Peuralinna T, Tienari PJ, Singleton AB. 2006. Assessment of PINK1 (PARK6) polymorphisms in Finnish PD. *Neurobiol Aging* 27(6): 906-7.
- Cookson M. 2012. Parkinsonism Due to Mutations in PINK1, Parkin, and DJ-1 and Oxidative Stress and Mitochondrial Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2(9): doi: 10.1101/cshperspect. a009415.
- Deas E, Fareva H. and Wood W. 2009. PINK1 function in health and disease. *EMBO Mo Med*. 1(3): 152-165.
- Djarmati A, Hedrich K, Svetel M, Schäfer N, Juric V, Vukosavic S, Hering R, Riess O, Romac S, Klein C, Kostic. 2004. Detection of Parkin (PARK2) and DJ1 (PARK7) mutations in early-onset Parkinson disease: Parkin mutation frequency depends on ethnic origin of patients. *Hum Mutat*. 23(5):525-532.
- Drucker C. 2011. No todo lo que tiembla es Parkinson. *Ciencia*. 60(1): 60-67.
- Duan J, Zhang J, Deng H, Wang Y. 2013. CNV-TV: A robust method to discover copy number variation from short sequencing reads. *BMC Bioinformatics*. 14(1):150.
- Edwards J. 2004. Performing Real-Time PCR. In: Real-Time PCR; an Essential Guide. K.J.Edwards et al, editors. Horizon Bioscience.Wymondham. p. 71-84.
- Elbaz A, Levecque C, Clavel J, Vidal JS, Richard F, Amouyel P, Alépovitch A, Chartier-Harlin M, Tzourio C. 2004. CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure, and Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 55(3):430-434.
- Exner N, Tresk B, Paquet D, Holmstrom K, Shiesling C, Gispe T, Carballo C, Berg D, Hoepken H, Gasser T, et al. 2007. Loss of function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J. Neuroscience*. 27:12413-12418.

- Feuk L, Carson A, Scherer S. 2006. Structural variation in the human genome. *Nat. Rev. Genet.* 7: 85-97.
- Frank C, Pari G and John P. 2006. Approach to diagnosis of Parkinson. *Can Fam Physician*, 52 (7): 862-868.
- Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y, Kanao T, Sato S and Hattori N. 2012. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Sci Rep.* doi: 10.1038/srep01002.
- Gasser Thomas R. 2009. Mendelian forms of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1792(7):587-596.
- Groen J, Kawarai T, Toulina A, Rivoiro C, Salehi-Rad S, Sato C, Morgan A, Liang Y, Postuma RB, St George-Hyslop P, Lang AE, Rogaeva E. 2004. Genetic association study of PINK1 coding polymorphisms in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters.* 372(3):226–229.
- Guo J, Xiao B, Liao B, Zhang X, Nie L, Zhang YH, L Shen, Jiang H, K Xia, Pan Q, Yan X, Tang B. 2008. Mutation Analysis of Parkin, PINK1, DJ-1 and ATP13A2 Genes in Chinese Patients with Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism. *Movement Disorders.* 23(14): 2074–2093.
- Guo J, Zhang X, Nie L, Zhang H, Liao B, Li J, Wang L, Yan X, Tang B. 2010. Mutation analysis of Parkin, PINK1 and DJ-1 genes in Chinese patients with sporadic early onset parkinsonism. *J Neurol.* 257 (7):1170-1175.
- Han L and Ming G. 2009. Protein degradation in Parkinson disease revisited: it's complex. *J Clin Invest.* 119(3): 442–444.
- Horowitz M and Greenamyre J. 2010. Gene–Environment Interactions in Parkinson's disease: The Importance of Animal Modeling. *Clin Pharmacol Ther.* 88(4): 467–474.
- Houlden H and Singleton A. 2012. The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 124:325-338.

- Hung C, Kipros G, Ryan D et al. 2012. Analysis of the Regulatory and Catalytic Domains of PTEN-Induced Kinase-1 (PINK1). *Human Mutation*. 33 (10):1408-22.
- Hung S, Chou, et al. 2006. C-terminal truncation and Parkinson's disease-associated mutations down-regulate the protein serine/threonine kinase activity of PTEN-induced kinase-1. *Journal. Human Molecular Genetics*. 15(2):3251-3262.
- Ibáñez P, Lesage S, Lohmann E, et al. 2006. Mutational analysis of the PINK1 gene in early-onset parkinsonism in Europe and North Africa. *Brain*. 129 (3): 686-694.
- Ishihara L, Hulihan P, Kachergus J et al. 2008. PINK1 mutations and Parkinsonism. *Neurology*. 71(12):896-902.
- Jean T, McCoy M, et al. 2011. DJ1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. *Hum Mol Genet*. 20 (1): 40-50.
- Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Hattori N. 2011. Genetic mutations and functions of PINK1. *Trends Pharmacol Sci*. 32(10):573-80.
- Khattab A, Docherty S, Bagust J, Willington R, Thomas P. 2012. Subjective visual vertical perception and sense of smell in Parkinson disease. *J Rehabil Dev Res*. 2012 49(6):961-70.
- Kim S, Parque Y, Hwang I, Youdim M, Parque K, Oh Y. 2012. Nuclear translocation of DJ-1 during oxidative stress-induced neuronal cell death. *Free Radical Biology and Medicine*. 53(4):936–950.
- Kim S, Yun-Jong P, Young J. 2012. Proteomic analysis reveals a protective role for DJ-1 during 6-hydroxydopamine-induced cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 422(1): 8–14.
- Kondopalli C, Kazlauskait A, Zhang N, et al. 2012. PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating serine 65. *Open Biol*. 2012, 2: doi.org/10.1098/rsob.120080.j

- Li C, Ting Z, Qin X, Ying W, Li B, Guo Qiang L, et al. 2007. The prevalence of LRRK2 Gly2385Arg variant in Chinese Han population with Parkinson's disease. *Mov Disor*, 22: 2439-2443.
- Li Y, Tomiyama H, Sato K, Hatano Y, Yoshino H, Atsumi M, Kitaguchi M, Sasaki S, Kawaguchi S, Miyajima H, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. 2005. Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Neurology*. 64(11):1955-1957.
- López E y Torres N (coordinadoras). 2012. Aspectos moleculares del envejecimiento. 1ra. edición, México. *Secretaría de Salud. Instituto de geriatría*. Pág.71-80, 101-109 y 139-146.
- Marqués D. 2011. Identificación de mutaciones del gen *PINK1* en pacientes con la enfermedad de Parkinson de inicio temprano. Tesis de licenciatura. *UNAM, Facultad de Química*. pp 59.
- Micheli F. 2006. Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados, 2da edición. Buenos Aires: *medica Panamericana*. Pág.155-158
- Michiorri S, Gelmetti V, et al. 2010. The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy. *Cell Death Differ*. 17(6):962-74.
- Müller T. 2012. Drug therapy in patients with Parkinson's disease. *Translational Neurodegeneration*. 1(1): doi: 10.1186/2047-9158-1-10.
- Myhre R, Steinkjer S, Stormyr A, Nilsen G, Zayyad H, Horany K, Nusier M and Klungland H. 2008. Significance of the parkin and PINK1 gene in Jordanian families with incidences of young-onset and juvenile parkinsonism. *BMC Neurology*. 2008, 8(47) doi: 10.1186/1471-2377-8-47.
- Narendra D, Tanaka A, Suen D, Youle R. 2009. Parkin-induced mitophagy in the pathogenesis of Parkinson disease. *Autophagy*. 5(5):706-708.
- Narendra D, Tanaka A, Suen D, Youle R. 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*. 183(5):795-803.

- Nuytemans K, Theuns J, et al. 2010. Genetic Etiology of Parkinson Disease Associated with Mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 Genes: A Mutation Update. *Mutat Hum.* 31 (7): 763-780.
- Oluwadamilola O, Njideka O, Okubadejo U, et al. 2012. Frequency of cognitive impairment and depression in Parkinson's disease: A preliminary case-control study. *Niger Med J.* 53(2): 65–70.
- Pankratz N, Dumitriu A, Hetrick KN, Sun M, Latourelle J, et al. 2011. Copy Number Variation in Familial Parkinson Disease. *PLoS ONE.* 2011. 6(8): doi:10.1371/journal.pone.0020988.
- Pankratz N, Kissell D, Pauciulo M, Halter C, Rudolph A, Pfeiffer R, Marder K, Foroud T, Nichols W. 2009. Parkin dosage mutations have greater pathogenicity in familial PD than simple sequence mutations. *Neurology.* 73(4):279-86.
- Perandones C, Irisarri M. 2010. Aspectos diagnósticos en la enfermedad de Parkinson: ¿qué aportan los estudios genéticos? *Rev Neurol.* 50(1): 31-33.
- Perier C and Vila M. 2012. Mitochondrial Biology and Parkinson's disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi: 10.1101/cshperspect.a009332.
- Pridgeon J, Olzmann J, Chin L, Li L. 2007. PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biol.* 5(7): doi: 10.1371/journal.pbio.0050172.
- Puschmann A. 2011. Heredity in Parkinson's disease from rare mutations to common genetic risk factors. Doctoral dissertation. *LUND UNIVERSITY, Faculty Medicine, Clinical Science, Lund, Department of Geriatric Psychiatry,* pages 2011,174.
- Ramsey C, Giasson B. 2008. The E163K DJ-1 mutant shows specific antioxidant deficiency. *Brain Res.* 1239:1–11.
- Rüdiger H, Ulrich P, Carsten E, et al. 2012. The Bioenergetic Status Relates to Dopamine Neuron Loss in Familial PD with PINK1 Mutations. *PLoS ONE.* 2012, 7(12): doi:10.1371/journal.pone.0051308.

- Saera S, Seoyeon J, Jeehye P, et al. 2013. Characterization of phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase 1 (PINK1) mutations associated with Parkinson's disease in mammalian cells and *Drosophila*. *J Biol Chem*. doi/10.1074/jbc.M112.430801
- Sánchez J, Kilarski L, Nalls M, Martinez M, Schulte C, Holmans P. 2012. Cooperative Genome-Wide Analysis Shows Increased Homozygosity in Early Onset Parkinson's Disease. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0028787.
- Schon E and Przedborski. 2011. Mitochondria: The Next (Neurade) Generation. *Neuron*. 70:1033-1053.
- Searles N, Bammler T, Gallagher L, Farin F, Longstreth W , Franklin GM, Swanson PD, Checkoway H. 2013. Genotype and age at Parkinson disease diagnosis. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 4(1):61-69.
- Silvestri L, Caputo V, et al. 2005. Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Oxford Journal. Molecular Genetics*. 14(22):3477-3492.
- Speicher M, Antonarakis S and Motulsky A. Vogel and Motulsky's, 2010. Human Genetics Problems and Approaches. 4th edition, *Springer. Verlag Berlin Heidelberg*. págs. 83-92.
- Sundal C, Fujioka S, Uitti RJ, Wszolek ZK. 2012. Autosomal dominant Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012; 18 (1) : S7-S10.
- Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Takahashi K, Ariga H. 2004. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep*. 5(2):213–218.
- Tan E, Yew K, Chua E, Puvan K, Shen H, Lee E, Puong K, Zhao Y, Pavanni R, Wong M, Jamora D, de Silva D, Moe K, Woon F, Yuen Y, Tan L. 2006. PINK1 mutations in sporadic early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*.: 789-93.
- Tang B, Xiong H, Sun P, Zhang Y, Wang D, Hu Z, Zhu Z, Ma H, Pan Q, Xia J, Xia K, Zhang Z. 2006. Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 15(11):1816-25.

- Toft M, Myhre R, Pielsticker L, White L, Aasly J, Farrer M. 2007. PINK1 mutation heterozygosity and the risk of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 78(1):82–84.
- Tolleson C and Fang J. 2013. Advances in the mechanisms of Parkinson's disease. *Discov Med*. 15(80):61-6.
- Tsuboi Y. 2012. Environmental-Genetic Interactions in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Neurobiol Exp*. 21(3): 123-128.
- Valente E, Abou-Sleiman P, Caputo V, et al. 2004. Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1. *Science*. 304(5674):1158-1160.
- Van O and Schouten J. 2011. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®) for the detection of copy number variation in genomic s. *Methods Mol Biol*. 688:97-126.
- Varcin M, Bentea E, Mertens B, Haute C, Baekelandt V, Michotte Y and Sarre S. 2012. Oxidative stress in genetic mouse models of Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev*. doi: 10.1155/2012/624925.
- Vasconcelos M, Campos M, Lucia A, Hack D, Santos J, Barros C and Gongalves M. 2012. Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease: Analysis of SNCA, PARKIN, PINK1 and DJ-1 genes. *Disease Markers*. 32, 173–178.
- Weihofen A, Thomas K, Ostaszewski B, Cookson M, Selkoe D. 2009. Pink1 forms a multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry*. 48(9):2045-52.
- Weisskopf M, Knekt P, O'Reilly E, et al. 2010. Persistent organochlorine pesticides in serum and risk of Parkinson disease. *Neurology*. 74(13):1055-61.
- Wilhelmus M, Nijland P, Drukarch B, de Vries H and Horssen J. 2012. Involvement and interplay of Parkin, PINK1, and DJ1 in neurodegenerative and neuroinflammatory disorders. *Free Radic. Biol. Med*. 53(4):983-92.

- Xiong H, Wang D, Linan C, Choo Y, Hong Ma, Chengyua T, et al. 2009. Parkin, PINK1, and DJ-1 form an ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest.* 119(3): 650–660.
- Yang Y, Ghrke S, Imai Y, Huang Z, Ouyang Y, Wang J, Yang L, Beal M, Vogel H, Lu B. 2006. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of Drosophila Pink1 is rescued by Parkin. *P. National Academy of Sciences.* 103:10793-10798.
- Yusuke K, Shiori S, Hidenori I, and Kohsuke T. 2012. The Phosphorylation-Dependent Regulation of Mitochondrial Proteins in Stress Responses. *Journal of Signal Transduction.* doi: 10.1155/2012/931215.

Recursos electrónicos:

- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
- <http://www.molgen.ua.ac.be/PDmutDB>
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs35801418
- http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000188906;r=12:40590546-40763087;t=ENST00000298910
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
- <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PINK1>
- <http://web.expasy.org/translate/>
- <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9BXM7>
- <http://www.umd.be/HSF/>