



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

### **Detección de polimorfismos de riesgo y mutaciones en el gen SNCA en pacientes mexicanos con enfermedad de Parkinson**

**TESIS QUE PARA QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

**P R E S E N T A**

**DAVID JOSÉ DÁVILA ORTIZ DE MONTELLANO**

**TUTORA: Dra. en C. Petra Yescas Gómez.**  
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,  
Odontológicas y de la Salud.

Miembros del comité tutorial:

**Dra. Ma. Elisa Alonso Vilatela.**

**Dra. Beatriz Camarena Medellín.**

**Dra. Alessandra Carnevale Cantoni.**

**Dra. Ana Fresán Orellana.**

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

México, D. F. Junio 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## Dedicatoria

## **Agradecimientos**

Se reconoce el apoyo indispensable brindado por el Departamento de Genética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” así como el apoyo económico brindado por CONACyT (CONACyT SALUD-2010-01-140190) para la realización del presente estudio.

# Índice de contenido

Resumen.....	6
Abstract.....	7
Antecedentes.....	8
Definición.....	8
Diagnóstico.....	11
Epidemiología.....	12
Etiología.....	12
Planteamiento del Problema.....	22
Pregunta de Investigación.....	23
Justificación .....	23
Hipótesis.....	23
Objetivos.....	24
Aspectos Éticos y de Bioseguridad.....	24
Consideraciones Económicas.....	24
Material y Métodos.....	25
Diseño.....	25
Población y Muestra.....	25
Población blanco.....	25
Muestreo.....	25
Cálculo del Tamaño de Muestra.....	25
Criterios de inclusión.....	26
Grupo control.....	26
Grupo de casos esporádicos.....	27
Grupo de casos familiares.....	27
Criterios de Exclusión.....	28
Criterios de Eliminación .....	28
Información Clínica.....	28
Métodos moleculares.....	30
Extracción de DNA.....	30
Cuantificación de DNA.....	32
Genotipificación de polimorfismos.....	32
Genotipificación de mutaciones.....	33
Análisis Estadístico .....	37
Resultados:.....	38
a) Características sociodemográficas de los grupos control y de pacientes con EPE.....	38
b) Frecuencias genotípicas y alélicas en los grupos control y pacientes con EPE.....	40
c) Distribución de mutaciones puntuales de <i>SNCA</i> .....	47
Discusión.....	49
Conclusiones.....	52
Bibliografía.....	54

ANEXOS.....	61
ANEXO 1: Criterios Diagnósticos de Enfermedad de Parkinson .....	62
ANEXO 2: Cartas de Consentimiento Informado.....	64
ANEXO 3 Hoja de recolección de información de Pacientes de EP.....	69
ANEXO 4: Glosario de términos y abreviaturas.....	72
ANEXO 5: Productividad científica y divulgación.....	75

#### Tablas

Tabla 1. Formas monogénicas de la EP.....	14
Tabla 2. Asociación reportada de SNPs de <i>SNCA</i> con la EPE. ....	19
Tabla 3. Definición operacional y conceptual de variables .....	29
Tabla 4: Comparación entre grupos de las variables de riesgo socio-económicas.....	39
Tabla 5: Comparación entre grupos de las frecuencias genotípicas.....	42
Tabla 6: Comparación entre grupos de las frecuencias alélicas.....	43
Tabla 7. Análisis de riesgo individual de los factores significativas para EPE.....	44
Tabla 8. Regresión logística de los factores de riesgo para EP. Primer paso .....	44
Tabla 9. Regresión logística de los factores de riesgo para EP. Segundo paso .....	45
Tabla 10. Regresión logística de los factores de riesgo para EP. Tercer paso .....	45
Tabla 11. Regresión logística de los factores de riesgo para EP. Cuarto paso .....	46
Tabla 12. Riesgos acumulados en los factores identificados EP .....	46
Tabla 13: Características clínicas y socio-demográficas en casos de EPAD.....	48
Tabla 14: Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs de riesgo de <i>SNCA</i> .....	49

#### Figuras

Figura 1. Micrografía de la sustancia negra de enfermedad de Parkinson. ....	9
Figura 2. Fórmula química sintetizada de la dopamina.....	10
Figura 3. Locus de <i>SNCA</i> localiado en 4q21.3-q22.1 del cromosoma 4.....	17
Figura 4. Localización de la $\alpha$ – sinucleína.....	18
Figura 5. Organización del gen <i>SNCA</i> y la proteína $\alpha$ -sinucleína.....	20
Figura 6. Resultados de discriminación alélica en tiempo real.....	40
Figura 7. PCR y RFLPs de los exones 1 y 2 del gen <i>SNCA</i> .....	47

## Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP), es una enfermedad neurodegenerativa común en el adulto, afecta entre 4.1-4.6 millones de personas. En México se ha estimado una incidencia de 40-50 casos por cada 100,000 habitantes/año y en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía representa la cuarta causa de atención médica. El diagnóstico clínico se establece mediante los “Criterios Diagnósticos del Banco de Cerebros de la Asociación de Enfermedad de Parkinson del Reino Unido” (*UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Clinical Diagnostic Criteria*). Se han identificado diferentes factores ambientales de riesgo para la EP y presenta una heredabilidad del 34-40%. Mediante estudios de asociación genómica y ligamiento se han identificado 18 *loci* relacionados a la EP, en 8 de ellos se encuentran genes cuyas mutaciones causan EP hereditaria autosómica dominante (EPAD) o recesiva (EPAR); que en conjunto representan 10% de los casos. El primer gen identificado causante de EPAD fue  $\alpha$  – sinucleína (*SNCA*), previamente ligado a los *loci* PARK1 (mutaciones puntuales) y PARK4 (duplicaciones y triplicaciones) en el cromosoma 4; aunque es una causa rara de EPAD y EP esporádico (EPE), sus polimorfismos de nucleótido sencillo (SNPs) han sido relacionados como factores de riesgo. El presente estudio no identificó las mutaciones puntuales conocidas de *SNCA* , pero demuestra la participación del SNP rs356219 como factor de riesgo individual para desarrollar EPE, por lo que deberá estudiarse su aplicación como apoyo para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson en la población mexicana.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson; *SNCA*,  $\alpha$ -sinucleína, rs356219.

## Abstract

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disease in adults, affects 4.1-4.6 million people. In Mexico it has been estimated an incidence of 40-50 cases per 100,000 inhabitants / year and at the National Institute of Neurology and Neurosurgery represents the fourth leading cause of medical care. The clinical diagnosis is established by the UK Parkinson's Disease Society Brain Clinical Diagnostic Criteria Bank. They have identified different environmental risk factors for PD, none of them is considered a causal factor and has a heritability of 34-40%. Genome-wide association and linkage studies have identified 18 *loci* associated with PD, in 8 of them are genes whose mutations cause autosomic dominant PD (EPAD) or recessive (PDAR), which together account for 10% of cases. The first gene identified as direct cause of EPAD was  $\alpha$  - synuclein (*SNCA*), previously linked to the locus PARK1 (mutations) and PARK4 (duplication and triplications) on chromosome 4, although it is a rare cause of EPAD or sporadic PD (EPD), their single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been related as risk factors. This study did not identify any known mutations of *SNCA*, but demonstrates the involvement of SNP rs356219 as a risk factor for developing EPE and it's should be studied their application to support the diagnosis of Parkinson's disease in the Mexican population.

Keywords: Parkinson's disease, *SNCA* , alpha - synuclein , rs356219.



## Antecedentes

### Definición

La enfermedad de Parkinson (EP) (OMIM #168600(1); CIE10:G20(2)) es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes de inicio en el adulto(3). Descrita por primera vez por James Parkinson en 1817, fue considerada, durante el siglo XIX, como una combinación de temblor, rigidez y lentitud en los movimientos(4) y en estados más avanzados de la enfermedad, alteraciones cognitivas y del estado de ánimo(5). El síntoma inicial más frecuente es el temblor de reposo que se caracteriza por tener una frecuencia de 4 a 6 Hz y aunque es el más visible, no es el más discapacitante(6).

En el siglo XX, la definición clínica de EP se tornó insuficiente, debido al reconocimiento de combinaciones similares de síntomas y signos en otras enfermedades, incluidas infecciones del sistema nervioso central (SNC) como en la encefalitis letárgica; intoxicación por químicos (como el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina ó MPTP); traumatismos (encefalopatía pugilística) y otras enfermedades neurodegenerativas, como la parálisis supranuclear progresiva (PSP; OMIM #601104(7)) y la atrofia múltiple de sistemas (AMS OMIM %146500 (8)). Es por esto que se denomina como “Parkinsonismo” a todos los estados clínicos caracterizados por temblor, debilidad muscular y bradicinesia, siendo la EP la patología más frecuente de este grupo de enfermedades (9).

Mediante el uso de estudios anatomopatológicos y microscopía óptica fue posible identificar la presencia de inclusiones eosinófilas, redondeadas y con un halo pálido en las neuronas de la sustancia negra, descritos por Fredrich Lewy, y haciendo estos “cuerpos de Lewy”(10) (Figura 1) junto con la pérdida de 70 – 80 % de las neuronas de los núcleos de la base, particularmente de la *pars compacta* de la sustancia negra(11), el estándar de oro del diagnóstico de la EP y hace posible diferenciar múltiples patologías neurodegenerativas, sin embargo no es posible realizarlos antes del fallecimiento del paciente.

El constituyente protéico principal de los Cuerpos de Lewy es la proteína  $\alpha$  – sinucleína, aunque también contiene sinifilina, cadenas de neurofilamentos, ubiquitina, ubiquitin carboxilo-terminal hidrolasa y proteína Tau asociada a microtúbulos(11, 12).

En 1991 Rajput y colaboradores (13) describieron pacientes que presentaban ovillos neurofibrilares en la sustancia negra en lugar de cuerpos de Lewy (14).

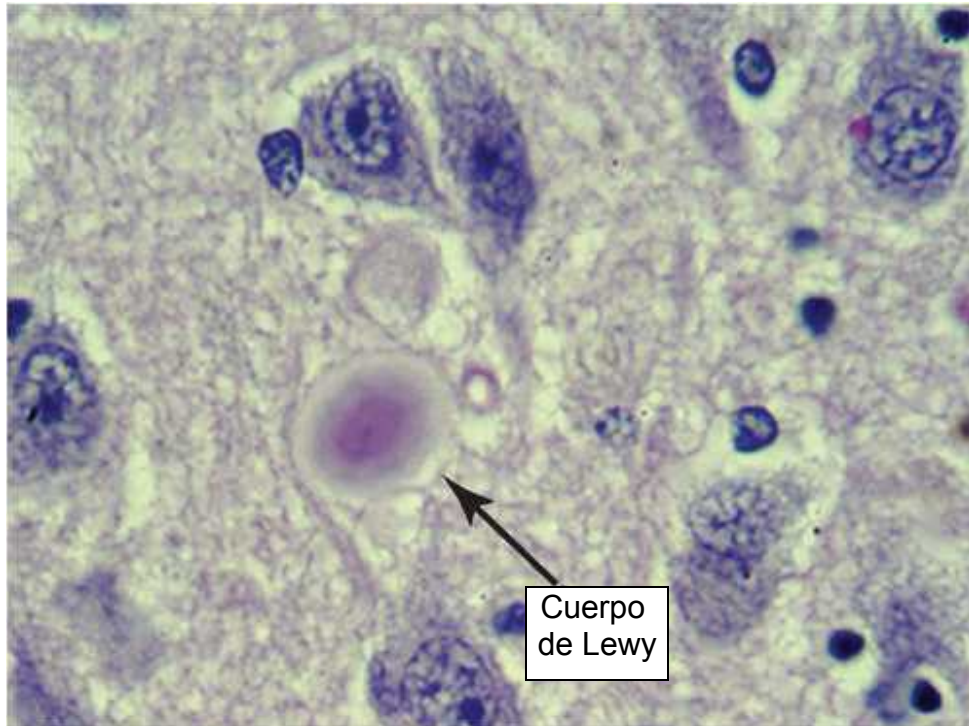


Figura 1. Micrografía de la sustancia negra obtenida de la necropsia de un paciente con diagnóstico de enfermedad de Parkinson.

Micrografía que muestra las inclusiones eosinófilas denominadas “Cuerpos de Lewy” (Tomado de Mouradian M y colaboradores, 2012)(14).

Correlacionando estos resultados con otros estudios similares, se acepta que puede existir hasta un 18 % de casos en los que clínicamente se diagnostica EP pero sin este rasgo histopatológico(15), así mismo, se han observado cuerpos de Lewy en cerebros de individuos neurológicamente sanos y en varios pacientes con enfermedades neurodegenerativas clínicamente distintas a la EP, como la enfermedad de Hallervorden Spatz (Neurodegeneración asociada a deficiencia de pantotenato cinasa; OMIM #234200 (16)) la panencefalitis subaguda esclerosante (OMIM 260470 (17))(18).

Esta heterogeneidad fenotípica señala a la pérdida neuronal en la sustancia negra y no a los cuerpos de Lewy, como la causa del cuadro clínico en los pacientes con EP(13), considerándolos como un evento fisiopatológico importante en su desarrollo y ocasionados probablemente por mecanismos de sobrevivencia o bien generados previo a la muerte neuronal(15).

Es por estos hallazgos que se considera a la EP como un cuadro clínico caracterizado por la presencia de la triada clásica de temblor, rigidez y bradicinecia. El inicio es lento y generalmente asimétrico, la progresión es inexorable y con respuesta sostenida a dopaminomiméticos. Los cuerpos de Lewy son un hallazgo frecuente en la zona compacta de la sustancia negra, donde predomina la pérdida neuronal, especialmente a nivel ventrolateral, lo que lleva a la disminución de dopamina (Figura 2) en el núcleo estriado con un gradiente rostrocaudal (14).

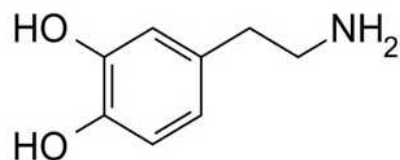


Figura 2. Fórmula química sintetizada de la dopamina.

## **Diagnóstico**

Actualmente el diagnóstico clínico de la EP se establece tomando como síntomas cardinales la bradicinesia, inestabilidad postural y rigidez (19) y mediante los “Criterios Diagnósticos del Banco de Cerebros de la Asociación de Enfermedad de Parkinson del Reino Unido” (*UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Clinical Diagnostic Criteria*) (20), que tienen una sensibilidad general del 82 % entre médicos generales y hasta 91.1 % de sensibilidad y un valor predictivo positivo de 98.6 % al ser empleados por médicos neurólogos especializados en movimientos anormales(21)(ANEXO 1).

De manera retrospectiva, la histopatología de sistema nervioso en necropsias puede ayudar a confirmar el diagnóstico de EP(14, 22) .

La presencia de otros signos neurológicos como alteraciones autonómicas, alteraciones cerebelares, parálisis de la mirada y signos piramidales suelen excluir el diagnóstico(20, 21).

La Escala unificada de Evaluación de la EP versión 3. (UPDRS V3.0, Unified Parkinson's Disease Rating Scale MDS-UPDRS)(23) es el sistema que se emplea de forma rutinaria para evaluar el curso longitudinal de la EP. La validación del MDS UPDRS(23, 24) en el idioma español inició en el 2009 y durante el 2010 se inició la fase III en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS) con el objetivo de verificar la eficacia de dicha escala en la población mexicana(6).

Para determinar los estadios de la EP se emplea la escala de Hoehn y Yahr(25) de acuerdo a las características de los síntomas, extensión de la afectación y discapacidad física ocasionada con una rango que va desde 0 a 5.

Generalmente los individuos que inician con la EP antes de los 20 años de edad son considerados con EP de inicio juvenil, aquellos con inicio de la sintomatología antes de los 45 años de edad son considerados de inicio temprano y finalmente aquellos que inician posteriormente son considerados de inicio tardío. Cabe señalar que en los casos juveniles y tempranos se les atribuye mayor componente genético en su etiología. (9, 11)

## ***Epidemiología***

A nivel mundial, la EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa en frecuencia (26), y se ha estimado que la incidencia de esta enfermedad en mayores de 60 años es de 13.4 por 100,000 habitantes cada año en Estados Unidos(6). La prevalencia de la EP en la población general es considerada del 0.3 % y cerca del 2 % en personas mayores de 60 años, aunque varía notablemente entre los distintos grupos étnicos y entre las regiones geográficas(3).

En oriente, particularmente en China, la prevalencia se considera relativamente baja (14.6 – 44/100,000 habitantes), mientras que la prevalencia más elevada se encuentra en países cuya principal actividad económica es la agricultura, como Australia (414/100,000 habitantes) y Argentina (656.8/100,000 habitantes). En Europa, distintos países muestran prevalencias intermedias similares, como Portugal (105/100,000 habitantes) y España (220/100,000 habitantes)(3).

Se ha calculado que en el mundo afecta actualmente entre 4.1 a 4.6 millones de personas mayores de 50 años(6, 27, 28) . En México la prevalencia de la EP se desconoce, sin embargo se ha estimado una incidencia de entre 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes/año. En el INNNMVS es la cuarta causa de consulta y se considera que a nivel nacional pudiera afectar a por lo menos 140,000 personas(27-29).

## ***Etiología***

Aunque se han identificado diferentes factores en la etiología de la EP, ninguno de ellos ha sido identificado como factor causal(30). La exposición crónica a pesticidas (en especial organofosforados y/o inhibidores de la acetilcolinesterasa), herbicidas y un bajo nivel educativo, aunque se han relacionado, no han mostrado una asociación significativa, mientras que la historia personal de traumatismos craneoencefálicos parece altamente relacionada con la enfermedad (OR 6.23 IC 95% 2.58 – 15.07)(3, 30).

En un metanálisis realizado por Priyadarshi(31) y colaboradores en 2001, evaluando 22 estudios de casos y controles sobre factores de riesgo ambiental para el desarrollo de la EP, se observó que el estilo de vida rural presentaba un OR combinado de 1.56 (IC 95% 1.17-2.07), siendo crítico (OR 4.9; IC 95% 1.4 – 18.2) cuando la exposición era mayor a 40

años. Así mismo el consumo de agua de pozo presentó un OR combinado de 1.26 (IC 95% 0.96 – 1.64) con mayor asociación (OR 3.28 IC 95% 0.93 – 11.51) cuando la duración de la exposición es superior a un año. La residencia en granjas o exposición a animales de corral demostró un OR combinado de 1.42 (IC 95% 1.05 – 1.91) que aumenta (OR 5.2 IC 95% 1.6 – 17.7) cuando se presentaba por más de 20 años. La exposición a pesticidas mostró un OR combinado de 1.85 (IC 95% 1.31 – 2.60) con un pico (OR 5.81 IC 95% 1.99 – 16.97) cuando es superior a 10 años, sin embargo, el estilo de vida rural, la residencia y contacto con animales de granja y la exposición a pesticidas, se encuentran altamente relacionadas y el agua de pozo, es un factor muy variable dependiente de la zona geográfica y puede actuar como vehículo de neurotóxicos debido a contaminación del manto freático (11, 31).

El uso de multivitamínicos y antioxidantes, si bien no se ha observado protejan contra la enfermedad, si se han asociado con un inicio más tardío y la mayoría de los estudios encuentran en el tabaquismo un efecto protector(3, 30).

Como factor de comorbilidad, se ha observado una alta prevalencia de trastorno depresivo mayor entre los pacientes con EP (47%) tanto concomitante a la enfermedad como hasta 22 años previos al inicio de los síntomas parkinsonianos, con un OR de 3.01 (IC 95% 1.32 – 6.88)(30).

Las nuevas tecnologías en biología molecular en el caso de la EP han sido excepcionalmente productivas en el estudio de esta enfermedad, permitiendo identificar varios genes relacionados con las formas familiares hereditarias de ésta, sin embargo solo abarca una pequeña proporción (<10%), ya que mas del 90 % de los casos corresponden a enfermedad de Parkinson esporádica (EPE) (32)

Estos avances han proporcionado importante información que nos permite entender hasta cierto punto la etiología de la EPE, aunque muchos aspectos continúan siendo en realidad desconocidos , la evidencia apunta a un modelo etiológico multifactorial, donde la enfermedad resulta de la interacción de factores ambientales que actúan sobre la susceptibilidad genética del individuo(3, 6, 19, 30).

La importancia de los factores hereditarios en la EP fue sospechada desde el siglo pasado, propiciando estudios con el objetivo de conocer su heredabilidad (proporción del fenotipo que se debe a la variación genética)(29) estimándose entre el 34 y 40 % (33).

Mediante estudios de agregación familiar, Shino y colaboradores en el 2010

observaron que la incidencia acumulada de la EPE es significativamente mayor entre los familiares de pacientes con EPE en comparación con los familiares de controles sanos (2.0% v.s. 0.7%, con un riesgo relativo de 3.4 con un IC 95% 1.9-5.9 P=0.001) y es mas alto en poblaciones hispanas (3,7% vs 0,4%; RR= 8,5, IC 95%:1.0 – 68.9). Los individuos con familiares en primer grado con EPE tienen entre 1.5 y 9.5 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad (OR 6.08 IC 95% 2.35 – 15.69). El temblor esencial familiar también representa un importante factor de riesgo (OR 3.97 IC 95% 1.17 – 13.50)(30, 33, 34).

Entre el 6.8 y 16 % de los pacientes con EPE tienen historia familiar y algunos de esos casos son resultado de mutaciones en un gen específico causal de EP de herencia autosómica dominante (EPAD) o de EP de herencia autosómica recesiva (EPAR) (14). En general estos pacientes presentan EP de inicio juvenil o temprano y no suele encontrarse otro dato clínico específico que ayude a distinguir los casos familiares (que presentan herencia mendeliana) de los esporádicos (que no corresponden a modelos de herencia mendeliana ni pueden atribuirse a un gen casual específico) (30).

Mediante estudios de asociación genómica y ligamiento se han identificado 18 loci (35) relacionados con la EP, sin embargo, la participación de cada uno de éstos en su etiología es controversial(3), de estos, 10 *loci* presentan un mecanismo de herencia monogénica y dentro de ellos se han identificado 8 genes causantes directos de la EP(9), (Tabla 1).

**Tabla 1. Formas monogénicas de la EP.(9)**

Nombre del <i>Locus</i>	Gen	<i>Locus</i>
Formas autosómicas dominantes (EPAD)		
PARK1 / PARK4	<i>SNCA</i>	4q21
PARK3	—	2p13
PARK5	<i>UCHL1</i>	4p14
PARK8	<i>LRRK2</i>	12q12
Formas autosómicas recesivas (EPAR)		
PARK2	<i>PARK2</i>	6q25.2-q27
PARK6	<i>PINK1</i>	1p36
PARK7	<i>DJ-1</i>	1p36
PARK9	<i>ATP13A2</i>	1p36
PARK14	<i>PLA2G6</i>	22q13.1

El gen mutado más frecuentemente implicado a nivel mundial en la EPAD es *LRRK2*, presente en el 5 al 6 % de los casos familiares de EPAD y 1 a 2 % de los casos de EPE, sin embargo, en un estudio realizado en este Instituto por Yescas P. y colaboradores en 2010, encontró una frecuencia mucho menor, lo que sugiere que la etiología de la EPAD en nuestra población sea distinta a lo reportado(36).

Las mutaciones en los genes causales de la EPAD o EPAR ocurren en una pequeña proporción de pacientes (<10%), pero hay cada vez más evidencia que las variaciones normales de éstos (polimorfismos, o cambios en la secuencia genética que no determinan enfermedad y se encuentran presentes en por lo menos el 1 % de la población sana), desempeñan un papel importante en los casos de EPE(37), por lo que se le considera como una enfermedad compleja, donde los polimorfismos de nucleótido sencillo (SNPs), otros polimorfismos como microsatélites (STR's) y variantes en número de copia (CNV's) confieren riesgo, directo o indirecto, para desarrollar la enfermedad. En los últimos años, los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han confirmado los *loci* asociados a enfermedades complejas como factores de riesgo, entre estas, la EPE(38).

Hasta el momento se han descrito más de 10 millones SNPs en el genoma humano, principalmente en poblaciones caucásicas (Estados Unidos, Canadá e Inglaterra), asiáticas (China y Japón) y africana (Nigeria), englobadas en el proyecto HapMap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) (39) y junto con los CNV's y STR's constituyen una herramienta indispensable para los estudios de asociación en enfermedades complejas en cada población(40).

Los resultados obtenidos mediante un meta-análisis sobre bases de datos de GWAS, realizado por el consorcio internacional de la EP, que incluyó 5333 casos y 12019 controles de poblaciones caucásicas americanas y europeas, demostró asociación con 18 *loci* en la EPE, de los cuales 11 (*SNCA*, *MAPT*, *HLA-DRB5*, *BST1*, *GAK*, *LRRK2*, *ACMSD*, *STK39*, *MCCC1/LAMP3*, *SYT11* y *CCDC62/HIP1R*) representaron un riesgo combinado atribuible del 60.3 % (IC 95% 43.7 – 69.3) para desarrollar EPE(35).

En tejido cerebral postmortem de pacientes con EP, se han encontrado niveles elevados de lípidos peroxidados, hierro y proteínas nitradas(41, 42) y varios de los genes relacionados en la EP, se encuentran en gran parte involucrados en distintos procesos metabólicos comunes en las enfermedades neurodegenerativas, incluidos la agregación protéica por disfunción en la vía de ubiquitina – proteosoma, disfunción mitocondrial y estrés



oxidativo(37), , lo que sugiere una disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial, similar a lo encontrado en otras enfermedades neurodegenerativas como la Demencia Frontotemporal (DFT; OMIM #600274(43)) y enfermedad de Alzheimer (EA; OMIM #104300(44)) señalando un mecanismo patológico común en varias de estas enfermedades, que concluye con el daño específico neurona(45). La causa de que las neuronas dopaminérgicas sean alteradas de manera específica en la EP aún no es del todo comprendida (3).

El descubrimiento de la proteína  $\alpha$  – sinucleína como el principal componente de los cuerpos de Lewy, la centró como un factor importante en el desarrollo de la EPE(46-48).

En pacientes con EP se han identificado varias proteínas con alteraciones en su plegamiento, principalmente la  $\alpha$  – sinucleína(49, 50), que se sospechan debidas a nitroaminación y fosforilación del aminoácido serina en la posición 29 en los cuerpos de Lewy y se ha sugerido que ocasionan inhibición mitocondrial y como resultado la generación de radicales libres, resultan en la producción de los agregados de  $\alpha$  – sinucleína e inician mecanismos proapoptóticos(51, 52).

Es por esto que el primer gen identificado relacionado a EP fue el de  $\alpha$  – sinucleína (*SNCA*) en 1995, localizado por ligamiento en el cromosoma 4q21(37, 53, 54).

Este gen presenta 7 exones, los exones 1a y 1b son eliminados por modificaciones cotranscripcionales y los exones 3 y 5 sufren corte y empalme alternativo, generando 4 isoformas de  $\alpha$  – sinucleína, de 140, 126, 112 y 98 aa respectivamente(55). (Figura 3)

Se postula que la  $\alpha$  – sinucleína y la  $\beta$  – sinucleína inhiben la selectividad de la fosforilación en el receptor D2, regulando la liberación y transporte de dopamina. También se infiere que  $\alpha$  – sinucleína induce la fibrilación de la proteína Tau asociada a microtúbulos y reduce la respuesta neuronal protectora a varios estímulos apoptóticos al disminuir la activación de la caspasa 3(56).

Otra función que se ha atribuido a la  $\alpha$  – sinucleína es la participación en tráfico de vesículas y liberación o recaptura de neurotransmisores en la hendidura sináptica. (Figura 4).

La proteína  $\alpha$  – sinucleína presenta diversos dominios, entre los que se encuentra el "componente no A-beta de la placa amiloide de la enfermedad de Alzheimer" (dominio NAC) que está implicado en la formación de fibrillas. La región hidrófoba central forma el núcleo de los filamentos y cuerpos de Lewy. El extremo C-terminal puede regular la agregación y determinar el diámetro de los filamentos(57). Postraduccionalmente es fosforilada,

principalmente en los residuos de serina por caseína quinasa tipo 1 (CK1) en residuos distintos de los fosforilados por otras cinasas. La fosforilación de Ser-129 es específica en los cuerpos de Lewy. In vitro, la fosforilación en Ser-129 promueve la formación de fibrillas insolubles. La fosforilación en Tyr-125 ocurre por una vía de proteína tirosina quinasa tipo 2 beta dependiente de estrés osmótico (PTK2B-dependiente de estrés osmótico) (58-60).

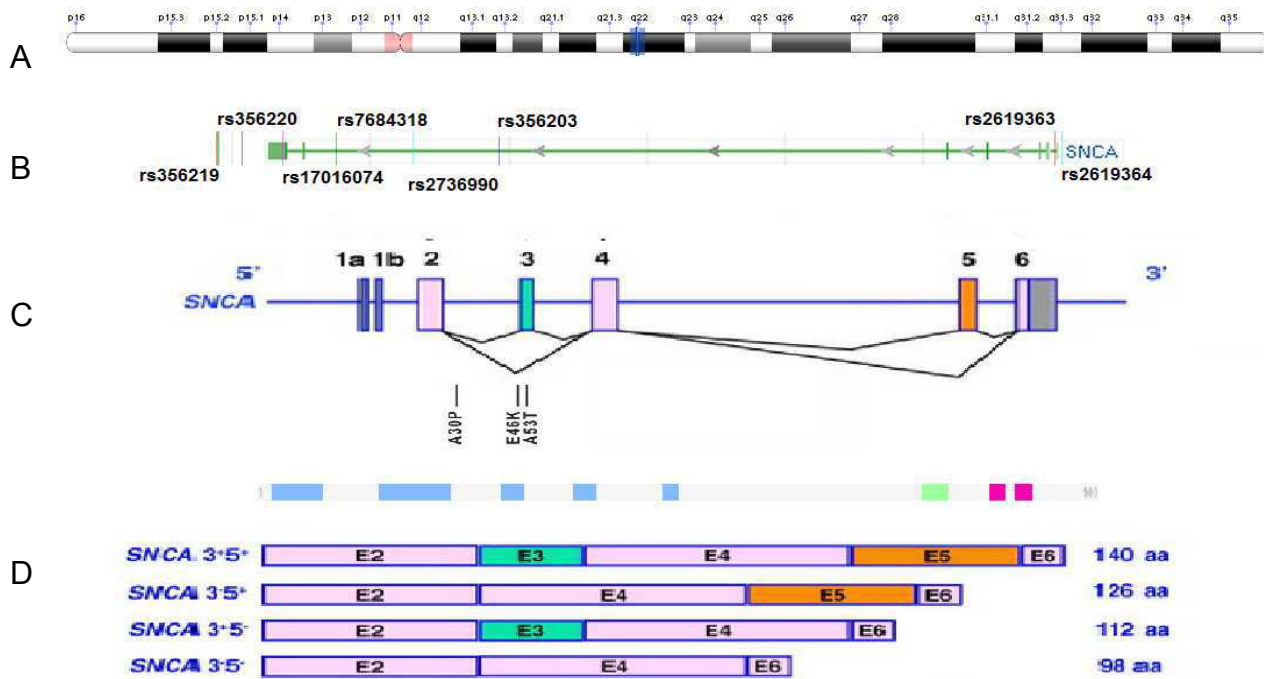


Figura 3. Locus de *SNCA* localizado en 4q21.3-q22.1 del cromosoma 4

El locus de *SNCA* localizado en 4q21.3-q22.1 del cromosoma 4, abarca 114,135 pb, desde la posición 86,396,384 de pTer hasta 86,510,518 (línea azul de ideograma de cromosoma 4) (A). El transcrito primario y los polimorfismos analizados se muestran en la segunda figura (B). Posteriormente se muestran los sitios de splicing alternativo y las mutaciones puntuales se muestran en la región inferior (C). Finalmente se muestran las distintas isoformas de la proteína  $\alpha$ -sinucleína (D) (Modificado de <http://www.genecards.org>. Weizmann Institute of Science. 2012.)(55).

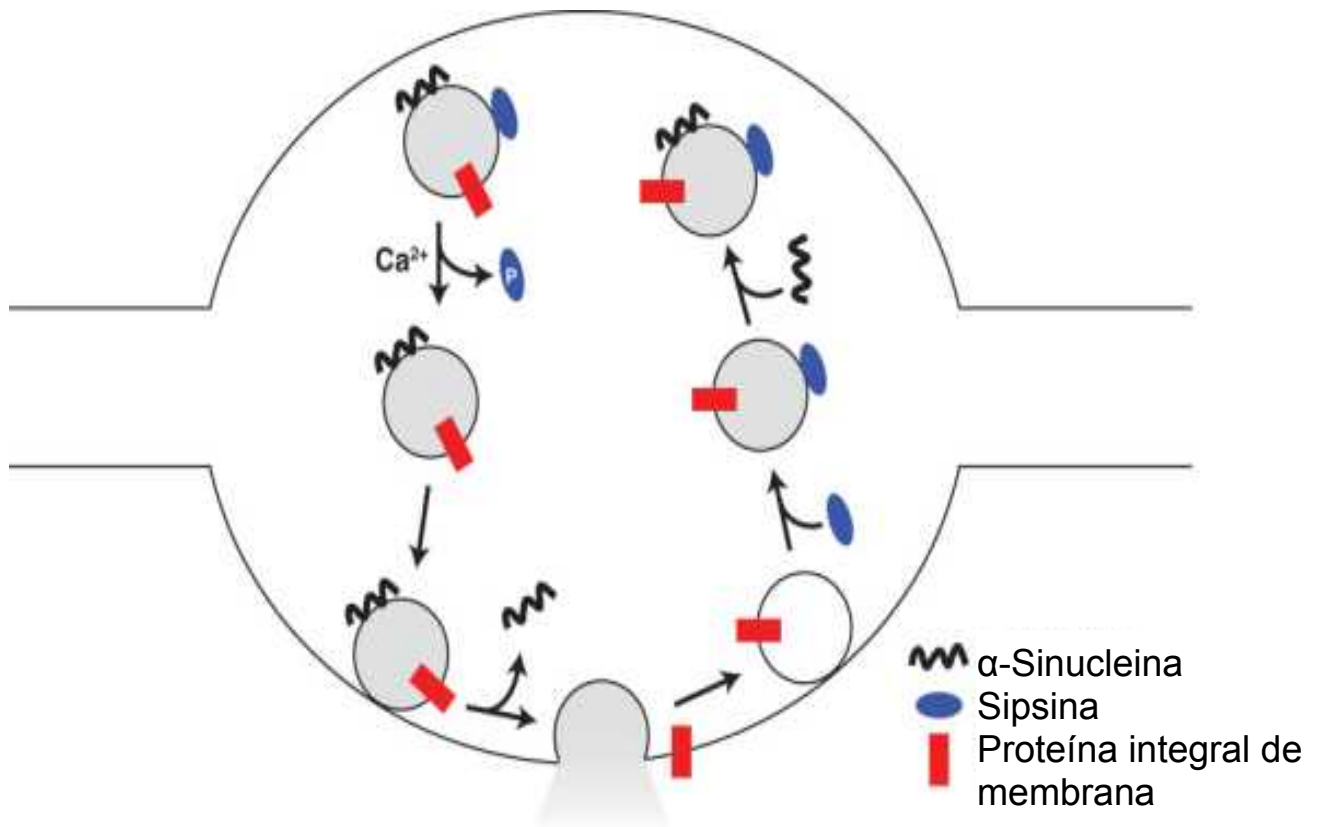


Figura 4. Localización de la  $\alpha$  – sinucleína en relación a la liberación de neurotransmisores.

Asociación de la  $\alpha$  – sinucleína a la vesícula sináptica hasta su fusión con la membrana plasmática y su función en la formación de nuevas vesículas sinápticas. (tomado de Fortin, DL y colaboradores 2010)(56, 61)

Hasta el momento se han identificado 3 mutaciones puntuales en *SNCA*: p.A53T, p.A30P y p.E46K, que corresponden al locus PARK1 reportado en casos de EPAD(4, 62-64); las duplicaciones y triplicaciones, también patológicas, del gen *SNCA* ocasionan un corrimiento del ligamiento hacia el locus PARK 4 y se han reportado tanto en casos de EPAD como en casos de EPE(65), también se han reportado otras variaciones, aunque se presumen deletereas, como la mutación H50Q la evidencia es aún incompleta(63, 66-68).

Los hallazgos reportados en distintas poblaciones han sugerido que las mutaciones en este gen son una causa poco frecuente de EPAD, entre el 2 y 1% de los casos (69).

Varios polimorfismos, entre ellos un dinucleótido repetido (D4S3481 localizado ~10kb de la región 3' no traducida del promotor) conocido como Rep1-263 que se ha asociado con mayor frecuencia a un riesgo aumentado de padecer EPE(69)

Otros polimorfismos de nucleótido sencillo (SNPs) como: rs2619364, rs2619363, rs2736990, rs7684318, rs356219 y rs356220 (Tabla 2) han tomado mayor importancia y se han postulado como factores de riesgo para desarrollar EPE principalmente en poblaciones caucásicas y asiáticas, los cuáles han mostrado resultados consistentes en estudios de asociación genómica (38, 70) (Figura 5).

**Tabla 2. Asociación reportada de SNPs de *SNCA* con la EPE.(71)**

Polimorfismo	Valor de P	OR (IC 95%)	n	Población
Rs2619364 (72, 73)	0.02	1.45 (1.01 – 2.11)	236	Noruega
rs2619363(72)	0.02	1.45 (1.01 – 2.10)	236	Noruega
rs2736990(74)	0.01	1.30 (1.18 – 1.43)	NR	Noruega, Alemana
Rs7684318 (74),(48)	<0.05	1.54 (1.35 - 1.75)	175	Noruega, Alemana, Japonesa
Rs17016074 (70, 75)	No Reportado	Aumento de expresión de <i>SNCA</i> significativa en ensayos <i>in vitro</i>	NA	Estudio in vitro
rs356219(72)	0.02	1.40 (1.06 – 1.85)	236	Noruega
rs356220(48)	<0.001	1.48 (1.25 – 1.74)	175	Japonesa
rs356203(48)	<0.05	1.48 (1.25 – 1.74)	175	Japonesa

NR: No reportado. NA: No aplicable.

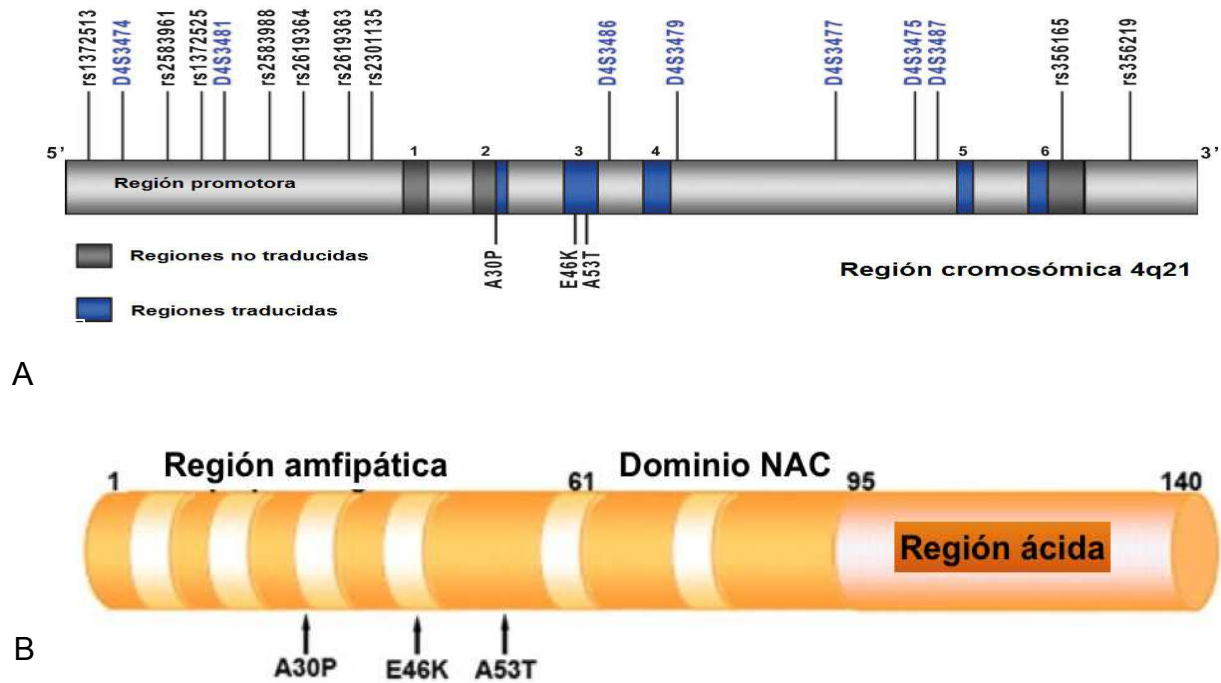


Figura 5. Organización del gen *SNCA* y la proteína  $\alpha$ -sinucleína.

(A) En la región superior de la figura azul se muestran algunos de los polimorfismos asociados a EPE y en la región inferior se muestran las mutaciones puntuales conocidas que ocasionan EPAD; (B) abajo se muestra la proteína con sus 6 exones y 13 dominios, su región anfipática, el dominio NAC y la región ácida, de la misma forma se muestra el sitio en la proteína que ocupan las mutaciones descritas hasta la fecha (Modificado de de Myhre R, y cols 2008)(56, 72).

Se conoce que las formas alteradas (mutantes y polimórficas) de  $\alpha$ -sinucleína provocan un desequilibrio en la homeostasis, que resulta en la polimerización aberrante de fibrillas, asociadas con varias enfermedades neurodegenerativas denominadas sinucleinopatías (49). Los agregados fibrilares de  $\alpha$  – sinucleína, representan el principal componente no A-beta de la placa amiloide en la enfermedad de Alzheimer, y un componente importante de las inclusiones de cuerpos de Lewy (55, 74).

Esta proteína es un componente importante en los cuerpos de Lewy, tanto en casos familiares como esporádicos(76), sus variaciones genéticas han sido ampliamente estudiadas, por estudios de asociación del genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés) y confirmando por meta-análisis(77), comprobando su participación como un importante factor de riesgo para el desarrollo de EPE(40).

La población mexicana, que incluye 60 grupos étnicos y una compleja historia de mestizaje amerindia, europea y en menor medida de ascendencia africana, no se encuentra representada adecuadamente en el HapMap(39, 78) u otras bases de datos similares. Es necesaria la identificación de polimorfismos y las frecuencias propias en cada población para entonces aplicar este conocimiento al estudio de las enfermedades complejas, esfuerzo que actualmente se está realizando.

Es por este mestizaje que suele realizarse la distinción entre población “mexicana” (mestizo mexicanos; definido como hijo de padres nacidos en México, por lo menos 3 de los abuelos nacidos en México, y como máximo un abuelo de origen español) y población indígena.

En el caso de la población mexicana, los polimorfismos el gen *MAPT*(79), las mutaciones heterocigotas en el gen de *GBA* (80)(que en estado homocigoto causan la enfermedad de Gaucher tipos perinatal, I, II, III y IIIC (OMIM #608013 (81), OMIM #230800 (82), OMIM #230900(83), OMIM #231000(84), OMIM #231005(85) respectivamente (86)), los fenotipos metabolizadores lentos de *CYP2D6*(87), los polimorfismos del gen *NAT* y el alelo  $\epsilon$ 4 de *APOE*(88), ya han sido investigadas por el grupo de trabajo de Neurogenética de este Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS), como factores de riesgo para el desarrollo de EPE mostrando asociación positiva con la enfermedad. En el caso de *MAPT* no se logró encontrar una asociación (79), mientras que la mutación p.L444P en *GBA* mostró asociación con EPE de inicio temprano (86).

EL conocimiento de que las variaciones genéticas consideradas normales generan diferencias en la susceptibilidad, fenotipo y evolución de distintos padecimientos complejos o multifactoriales(69), ha permitido señalar genes candidatos y establecer hipótesis fisiopatológicas y causales sobre la EP(38).

Con los avances y aplicaciones de nuevas tecnologías genómicas y computacionales, es razonable pensar que las líneas de investigación de asociación genética en enfermedades complejas, darán resultados en términos de una medicina personalizada, diagnóstica y terapéutica, en un futuro cercano, por lo que es necesario establecer el comportamiento y distribución de las variaciones genéticas en nuestra población así como su asociación con la EPE y la EPAD(38).

### **Planteamiento del Problema**

La EP es una condición clínica frecuente y altamente incapacitante, que ocupa la cuarta causa de consulta en el INNNMVS. Su etiología se considera multifactorial, la gran mayoría de los casos son esporádicos (EPE), aunque se desconoce en gran medida la participación de los factores genéticos que la integran, por lo que el esclarecimiento de estos puede ayudar en su comprensión etiológica y de los mecanismos patológicos y así, las futuras investigaciones estarán encaminadas a mejorar el diagnóstico temprano, la prevención y manejo de esta enfermedad.

La población mexicana, que incluye 60 grupos étnicos y una compleja historia de mestizaje amerindia, europea y en menor medida de ascendencia africana, no se encuentra representada adecuadamente en el HapMap(39, 40) o en otras bases de datos similares, por lo que es necesario la identificación de estos polimorfismos y sus frecuencias para entonces aplicar este conocimiento al estudio de los factores genéticos de las enfermedades complejas como la EPE en nuestra población.

En los estudios de asociación genética, el conocimiento de las variaciones o polimorfismos genéticos (como los polimorfismos de nucleótido sencillo o SNPs, los repetidos cortos o STR's y las variaciones en número de copias o CNV's) y su frecuencia son un requisito en cada población en particular.

Debido a que los estudios que han asociados polimorfismos de *SNCA* con la EPE se han realizado en otras poblaciones, la frecuencia y distribución de estos polimorfismos en la

población mexicana y su relación con la EPE, como factores de riesgo o protectores, son desconocidos.

### ***Pregunta de Investigación***

¿Existe una relación de los SNPs rs2619364, rs2619363, rs2736990, rs7684318, rs17016074, rs356219, rs356220 y rs356203 del gen *SNCA* con la EPE en población mexicana?

### **Justificación**

La distribución de las variaciones genéticas a lo largo del gen *SNCA* en la población mexicana y su asociación con la EPE, donde se desconoce un gen causal, brindará información necesaria para continuar con investigaciones encaminadas a esclarecer la fisiopatología y mejorar el diagnóstico en nuestra población.

De manera paralela es necesario poder ofrecer un panel diagnóstico de mutaciones a los pacientes con EPAD y EPAR, incluido el gen de *SNCA*, permitiendo realizar un diagnóstico preciso para brindar asesoramiento genético de certeza a los pacientes y sus familiares en riesgo.

### **Hipótesis**

1. Los SNPs rs2736990, rs7684318, rs356220, rs2619364, rs2619363, rs17016074, rs356219 y rs356203 se encontrarán asociados en pacientes con EPE de la población mexicana.

2. Las mutaciones A53T, A30P y E46K en *SNCA* explicarán un pequeño porcentaje de los casos de EPAD en pacientes mexicanos.



## **Objetivos**

1. Comparar la frecuencia de los SNPs de riesgo rs2619364, rs2619363, rs2736990, rs7684318, rs17016074, rs356219, rs356220 y rs356203 del gen *SNCA* entre una muestra de controles de población mexicana sana y una muestra de pacientes con EPE.

2. Determinar la presencia de las mutaciones A53T, A30P y E46K en el gen *SNCA* en una muestra de pacientes mexicanos con EP de herencia autosómica dominante (EPAD).

## **Aspectos Éticos y de Bioseguridad**

Durante la planeación y realización de este estudio se ha mantenido estricto apego a la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial(89).

Todos los participantes, tanto casos como controles, han firmado carta de consentimiento informado correspondiente a su grupo de estudio de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud, capítulo I, artículo 17; fracción II: Investigación con riesgo mínimo(90).

Este estudio se realizó previa revisión y autorización por los comités de Investigación y Bioética del INNNMVS y los participantes declaran que no presentan conflicto de intereses con el presente estudio.

## **Consideraciones Económicas**

Actualmente el Departamento de Genética del INNNMVS cuenta con los recursos técnicos (equipos especializados), personal capacitado, apoyo económico (CONACyT SALUD-2010-01-140190) así como la colaboración con la Clínica de Movimientos Anormales para identificar a los pacientes que cumplen con los criterios diagnósticos propuestos por el Banco de Cerebros de la UK Parkinson's Disease Society modificados y realizar la evaluación clínica y molecular.

## Material y Métodos

### Diseño

Observacional, Transversal, Comparativo de casos y controles.

### Población y Muestra

Población blanco: Pacientes con diagnóstico clínico establecido de EP.

Población elegible: Pacientes mexicanos con diagnóstico clínico establecido de EP que acudan al INNNMVS.

Población participante: Muestras de DNA de pacientes y controles contenidas en el acopio de DNA de la línea de investigación “Estudio Molecular de Enfermedad de Parkinson” de pacientes y controles del Departamento de Neurogenética y Biología Molecular del INNNMVS y que cumplan con los criterios de inclusión.

### Muestreo:

### Cálculo del Tamaño de Muestra

Para determinar el tamaño de muestra necesario para un estudio de casos y controles, se empleo la fórmula de Fleiss con corrección continua (Fórmula 2), con una frecuencia promedio de los SNPs de 4 por ciento, empleando una seguridad de 95 %, poder de 80 %, un OR teórico de 3.0, y una relación de casos y controles 1:2.

$$n_{1cc} = \frac{n_1}{4} \left[ 1 + \sqrt{1 + 2 \frac{(r+1)}{n_1 |p_2 - p_1|}} \right]$$

n1=Número de casos

r= Relación controles:casos 2:1

p1=Proporción de casos con exposición

p2=Proporción de controles con exposición

Fórmula 2: Cálculo del tamaño de muestra estudio de casos y controles(92)

De acuerdo al cálculo anterior se consideraron necesarias, 172 pacientes mexicanos con diagnóstico de EPE establecido por un neurólogo experto en movimientos anormales de acuerdo a los criterios clínicos del banco de cerebros del Reino Unido, obtenidos del acopio de DNA de pacientes con EP (representando 344 alelos) y 344 sujetos mexicanos sanos, obtenidos del acopio de DNA de controles (correspondiendo a 688 alelos).

De forma independiente, se incluyeron para el análisis de mutaciones puntuales en *SNCA* un total de 86 muestras de pacientes con EPAD sin mutación detectada en *LRRK2*, ya que es la causa más frecuente de EPAD seguida de *SNCA* (36).

Fueron seleccionadas de manera aleatorizada simple 172 muestras del acopio de DNA de pacientes con EP y 344 muestras del acopio de controles de sujetos mexicanos sanos, pertenecientes a la línea de investigación “Estudio Molecular de Enfermedad de Parkinson” del Departamento de Neurogenética y Biología Molecular del INNNMVS de acuerdo al cálculo de tamaño de muestra y según los siguientes criterios de inclusión:

**Criterios de inclusión:**

**Grupo control:**

1. DNA de sujetos de cualquier género
2. Mayores de 18 años.
3. Sin manifestaciones ni antecedentes de enfermedades neurodegenerativas en primero o segundo grado.
4. Que hayan aceptado mediante consentimiento informado participar como controles sanos en el acopio de muestras control de individuos sanos para el estudio de enfermedades neurodegenerativas del Departamento de Neurogenética y Biología Molecular del INNNMVS (ANEXO 2)

### **Grupo de casos esporádicos:**

1. DNA de pacientes con diagnóstico clínico de EP realizada por un neurólogo experto en movimientos anormales y de acuerdo a los criterios diagnósticos propuestos por el Banco de Cerebros de la UK Parkinson's Disease Society modificados. (Anexo 1)
2. Sujetos que presenten puntuación en la escala MDS-UPDRS y Clasificación de Hoehn y Yahr que soporten los criterios diagnóstico de la enfermedad de Parkinson. (Anexos 2)
3. Cualquier género.
4. Sin antecedentes familiares en primer o segundo grado de EP o que se desconozcan los mismos.
5. Que hayan aceptado mediante consentimiento informado participar como pacientes en la línea de investigación "Estudio Molecular de la Enfermedad de Párkinson" del Departamento de Neurogenética y Biología Molecular del INNNMVS.

### **Grupo de casos familiares:**

1. Selección secuencial no aleatorizada de DNA de pacientes con diagnóstico de EP realizada por un neurólogo experto en movimientos anormales de acuerdo a los criterios diagnósticos del Banco de Cerebros de la UK Parkinson's Disease Society modificados. (Aexo 1)
2. Sujetos que presenten puntuación en la escala MDS-UPDRS y Clasificación de Hoehn y Yahr que soporten los criterios diagnóstico de la enfermedad de Parkinson. (Anexo 1)
3. Cualquier género.
4. Con antecedentes familiares de EPAD.
5. Que hayan aceptado mediante consentimiento informado participar como pacientes en la línea de investigación "Estudio Molecular de la Enfermedad de Párkinson" del Departamento de Neurogenética y Biología Molecular del INNNMVS.
6. Que se haya descartado mutación en *LRRK2* como causa de la EPAD.

## **Criterios de Exclusión**

1. Muestras del acopio de DNA del Departamento de Neurogenética y Biología Molecular del INNNMVS de pacientes o controles que no cuenten con la información necesaria para su análisis.
2. Muestras del acopio de DNA del Departamento de Neurogenética y Biología Molecular del INNNMVS de pacientes que no cumplan con los criterios diagnósticos del Banco de Cerebros de la UK Parkinson's Disease Society modificados

## **Criterios de Eliminación**

1. Retiro del consentimiento informado por parte de los sujetos control o pacientes a quienes pertenece la muestra de DNA.
2. Muestra del acopio de DNA de la línea de investigación "Estudio Molecular de Enfermedad de Parkinson" del Departamento de Neurogenética y Biología Molecular del INNNMVS que sean insuficientes o que no cumpla con los estándares de calidad para su genotipificación.

## **Información Clínica**

Fueron consultadas las variables demográficas de interés recopiladas en la base de datos del acopio de DNA, mediante entrevista directa y revisión de expediente clínico de los pacientes, vaciando la información en hojas de captura específicamente diseñadas (ANEXO 3) los resultados de la genotipificación han sido obtenidos mediante técnicas estandarizadas de biología molecular en el laboratorio de Genética y Biología Molecular del INNNMVS. La definición conceptual y operacional de las variables se muestran en el Tabla 3.

**Tabla 3. Definición operacional y conceptual de variables**

Variable	Definición C: Conceptual Op: Operacional	Tipo de variable
Género	C: Género al que pertenece el sujeto Op: Masculino (0) Femenino(1)	Catagórico Dicotómica
Grupo	C: Grupo de estudio al que pertenece la muestra: Op: Control (0); Caso esporádico (1); Caso familiar (2)	Catagórica
Edad de Inicio	C: Edad a la que inicia el padecimiento en los pacientes con EP o edad al momento de ingreso al estudio para los controles Op: Edad en años cumplidos al momento de la toma de muestra	Numérica continua
Tabaquismo	C: Consumo habitual de tabaco de por lo menos 10 cajetilla al año por 5 años Op: Positivo (1) Negativo(0)	Catagórica Dicotómica
Alcoholismo	C: Consumo habitual de alcohol, por lo menos una vez por semana llegando al estado de embriaguez Op: Positivo (1) Negativo (2)	Catagórica Dicotómica
Exposición a neurotóxicos	C: Exposición habitual (por lo menos un año) a pesticidas, insecticidas o solventes orgánicos previo al inicio de los síntomas o al inicio del presente estudio Op: Positivo (1) Negativo (0)	Catagórica Dicotómica
Traumatismo Craneoencefálico	C: Trauma directo al cráneo seguido de pérdida de estado de alerta, náusea/vómito y/o Diplopia por lo menos en una ocasión en los 5 años previos al presente estudio o inicio de los síntomas Op: Positivo (1) Negativo(2)	Catagórica Dicotómica
rs2619364	C. Polimorfismo de nucleótido sencillo GGACC[A/G]GAGCA Op: Polimorfismo A G; A/A (0) A/G (1) G/G (2)	Catagórica
rs2619363	C: Polimorfismo de nucleótido sencillo TCAGC[G/T]CCTGC OP: Polimorfismo G T; G/G (0) G/T (1) T/T (2)	Catagórica
rs2736990	C: Polimorfismo de nucleótido sencillo ATACA[C/T]CTTCT OP: Polimorfismo C T; C/C (0) C/T (1) T/T (2)	Catagórica
rs7684318	C: Polimorfismo de nucleótido sencillo TATCT[C/T]ATATC OP: Polimorfismo C T; C/C (0) C/T (1) T/T (2)	Catagórica
rs17016074	C: Polimorfismo de nucleótido sencillo ACATC[A/G]CAAAA Op: Polimorfismo A G; A/A (0) A/G (1) G/G (2)	Catagórica

**Tabla 3. Definición operacional y conceptual de variables**

rs356219	C: Polimorfismo de nucleótido sencillo TAGAC[A/G]TGGAA Op. Polimorfismo A G; A/A (0) A/G (1) G/G (2)	Catagórica
rs356220	C: Polimorfismo de nucleótido sencillo AGTGG[C/T]TTTT Op. Polimorfismo C T; C/C (0) C/T (1) T/T (2)	Catagórica
rs356203	C: Polimorfismo de nucleótido sencillo GATTA[A/G]ATAGT Op. Polimorfismo A G; A/A (0) A/G (1) G/G (2)	Catagórica
A53T	C. Sustitución de Alanina (A) por Treonina (T) en el residuo 53 de $\alpha$ – sinucleína. g.15148G>A Op. A (0) T (1)	Catagórica Dicotómica
A30P	C. Sustitución de Alanina (A) por Prolina (P) en el residuo 30 de $\alpha$ – sinucleína. g.7717G>C Op. A (0) P (1)	Catagórica Dicotómica
E46K	C. Sustitución de Ac Glutámico (E) por Lisina (K) en el residuo 46 de $\alpha$ – sinucleína. g.15127G>A Op. E (0) K (1)	Catagórica Dicotómica

## Métodos

### Extracción de DNA

A un volumen de la sangre obtenida, se le agregaron tres volúmenes de una solución amortiguadora de lisis de glóbulos rojos (BLGR por sus siglas en inglés, compuesto por  $\text{NH}_4\text{CL}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , ácido etilendiaminotetraacético o EDTA a pH 7.3) en un tubo para centrífuga. Esta mezcla se homogenizó por inversión y se centrifugó a 3'000 rpm durante 6 minutos. Los componentes del BLGR generan un choque osmótico a las membranas de los eritrocitos produciendo su ruptura.

Después de la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se trabajó con el botón o *pellet* de las células mononucleares (CMNs). Las células fueron resuspendidas con 1mL de solución BLGR y se centrifugaron a 3'000 rpm/2 minutos. Este paso se repitió hasta obtener un botón blanco, después de decantar el sobrenadante.

Se agregó 570  $\mu\text{L}$  de una solución de cloruro de sodio,  $\text{NaCl}$  [5mM] al botón de CMNs y se dejó en agitación por dos minutos. A esta mezcla, se adicionó 40  $\mu\text{L}$  del detergente dodecil sulfato de sodio, (SDS) [10 % v/v], se homogenizó la mezcla y después se le agregó 200  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{NaCl}$  [7M]. La mezcla anterior se centrifugó a 11'500 rpm durante 20 minutos a 4°C.

La primera solución de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) genera un cambio en la carga de en las proteínas de la membrana citoplasmática atrapando a las moléculas de agua que rodean a éstas, para que posteriormente puedan precipitar. El SDS al ser un tensoactivo iónico, ocasiona la formación de micelas generando que se disuelvan las membranas lipídicas, y finalmente el  $\text{NaCl}$  saturado favorece la precipitación de las proteínas nucleares. Después de centrifugar se obtuvo un precipitado salino y proteico en el fondo del tubo y un sobrenadante viscoso. El sobrenadante, que contiene el DNA se transfirió a un tubo limpio.

Al sobrenadante se le realizó una extracción orgánica con una mezcla de alcohol isoamílico-cloroformo, se agitó la mezcla y posteriormente se centrifugó a 14'000 rpm durante 15 minutos. La fase orgánica (que contiene de restos celulares) se separó de la fase acuosa que contiene el DNA (que es soluble en agua). Después de centrifugar se retiró cuidadosamente la fase acuosa, y se traspasó a otro tubo con 600  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto, se agitó vigorosamente para precipitar el DNA, se volvió a centrifugar a 14'000 rpm durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante para quedarse solo con el botón y rehidratar con etanol al 70% y se volvió a centrifugar de la misma forma.

Posterior al tratamiento con etanol al 70%, éste se decantó y el botón que se encontró en el tubo se secó a vacío con temperatura de 30-60° C, y finalmente una vez seco el botón de DNA se resuspendió en 100-300  $\mu\text{L}$  de agua estéril y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 1 hora o toda la noche a 60°C.



Después de la incubación, se cuantificó el DNA por espectrofotometría a 260 nm, y de acuerdo a la concentración, las muestras se diluyeron a una concentración final de 100 ng/ µL. Con ésta concentración de las muestras se procedió a la siguiente etapa del proceso, PCR.

### **Cuantificación de DNA**

Se calibró el equipo NanoDrop 2000c Thermo Scientific® con un blanco de agua bidestilada:

1. Se tomó 1µl de la muestra de DNA y se colocó sobre el lector del equipo NanoDrop 2000c Thermo Scientific®.
- 2 Se Midió la densidad óptica (DO) y la absorción a 260 nm ( $A_{260}$ ).
- 3 Para analizar la pureza de la muestra, se tomó una segunda lectura a  $A_{280}$  nm.

La relación de DO a  $A_{260}$ nm / DO a  $A_{280}$ nm se considera optima de 1.8 (rango 1.6 a 2) la absorción (A) es mayoritariamente debida a ácidos nucleicos. Si es menor a 1,6, indica la presencia de contaminantes y es recomendable una re-extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol o isopropanol.

La concentración de DNA a  $A_{260} = 1.0$  equivale a una concentración de 50 ng/µl de DNA de cadena doble por ml de agua.

Para calcular la concentración de la muestra:

$$[\text{DNA}] = (50 \text{ mg / ml}) / (A_{260}) (\text{factor de dilución})$$

El factor de dilución es el volumen final de la dilución dividido entre la cantidad alícuotada para la dilución)

$$[\text{DNA total}] = [\text{DNA}] \times \text{volumen eluído en ml.}$$

### **Genotipificación de polimorfismos**

El análisis genético de los polimorfismos se realizó mediante PCR en tiempo real para discriminación alélica de SNPs mediante sondas TaqMan® para genotipificación marcadas con fluorescencia (VIC para el alelo silvestre y FAM para el alelo de riesgo) en un equipo SetpOne® *Applied biosystem* (72, 75, 76) según lo reportado previamente por Kay DM y

cols(76) para los SNPs rs2619364 (Assay ID C\_3113461\_10), rs2619363 (Assay ID C\_16036895\_10), rs2736990 (Assay ID C\_3208948\_10), rs7684318 (Assay ID C\_2950951\_10), rs17016074 (Assay ID\_32615669\_10), rs356219 (Assay ID C\_1020193\_10), rs356220 (Assay ID C\_1020192\_10) y rs356203 (Assay ID C\_3208955\_10) de acuerdo al software y especificaciones estandarizadas por el proveedor *Applied biosystem*(71,76, 93).

Se empleó la siguiente mezcla de trabajo para reacción de discriminación alélica con reactivos de *Applied biosystem*®:

Master Mix®	2.5µL
Sonda TaqMan®	0.25µL
H2O DD	1.7510/µL
DNA [10nm/µL]	1.2µL
Volumen Total:	5µL

Las condiciones de amplificación por PCR en tiempo real para discriminación alélica de SNPs mediante sondas TaqMan® se realizó como sigue:

Temperatura inicial: 60°C x10 segundos  
Desnaturalización inicial: 95°C x10 minutos  
40 ciclos:  
Desnaturalización: 95°C x15 segundos  
Extensión: 60°C x1 Minuto  
Extensión final: 60°C x30 segundos

### **Genotipificación de mutaciones**

PCR punto final y restricción enzimática para mutaciones puntuales

Los casos de EPAD fueron analizados mediante técnica de PCR y RFLPs (restricción enzimática de segmentos de longitud variable) del gen *SNCA* para descartar las mutaciones puntuales conocidas A53T, A30P y E46K(4, 62, 64)

La secuencia parcial del gen de  $\alpha$  – sinucleína y el lugar donde se localizan las mutaciones puntuales (Exón 2 y 3) se representan a continuación (Gene ID: 6622):

A

p. A30P C>G

2581 tcaAAGTGTA TTTTATGTTT TCCagtggtgg tgtaaaggaa ttcattagcc atggatgtat  
 2641 tcatgaaagg actttcaaag gccaaaggagg gagttgtggc tgctgctgag aaaaccaaac  
 2701 aggggtgtggc agaagcaGcca ggaaagacaa aagaggggtgt tctctatgta ggtaggtaaa  
 2761 ccccaaagt cagttTGGTG CTTGTTTCATG AGTGATGGGT TAGGATAATC AATACTCTAA

B

p. E46K G>A ; p. A53T G>A

10021 aagattgaga tttttaaatt agttgtattg aaaactaGCT AATCAGCAAT TTAAGGCTAG  
 10081 cttgagactt atgtcttgaa tttgtttttg taggctcaa aaccaagAcag ggagtgggtgc  
 10141 atgggtgtgAGc aacaggtaag ctccattgtg cttatatcca aagatgatat ttaaagtatc  
 10201 tagtgattag tgtggcccag tattcaagat tcctatgaaa ttgtaaaaca atcaCTGAGC  
 10261 ATTCTAAGAA CATATCagtc ttattgaaac tgaattcttt ataaagtatt tttaaatagg

En A se muestra la secuencia de DNA, oligonucleótdos y sustitución de la mutación p.A30P y en B se muestra la secuencia de DNA, oligonucleótdos y sustitución de las mutaciones p. E46K y p. A53T. La reacción en cadena de la polimeraza (PCR) se realizó empleando la secuencia de oligonucleótidos mostrada arriba (secuencia en mayúsculas y marcada en gris). Las mutaciones se muestran marcadas con fondo negro (la base marcada en negro dentro de la secuencia corresponde al alelo silvestre y sobre ella se muestra el cambio de base en mayúsculas, identificando la mutación).

La Mezcla de reacción de PCR se realizó de la siguiente manera:

Master Mix®	20µL
Primer F[10nm/µL]	2µL
Primer R[10nm/µL]	2µL
H <sub>2</sub> O DD	24µL
DNA [100 ng/ µL]	2µL
Volúmen total:	50µL

Para la reacción de PCR se empleó el siguiente protocolo en equipo termociclador Axigen Maxigen®:

Desnaturalización inicial: 94°C x10 minutos

35 ciclos:

Desnaturalización: 94°C x30 segundos

Alineación: 50°C x30 segundos

Extensión: 74°C x30 segundos

Extensión final: 74°C x10 minutos

Conservando los productos de PCR a 4°C

Para corroborar la amplificación de la reacción, los productos de PCR fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se mezclaron 5 µl de producto de PCR y 1 µl de "amortiguador de carga", la muestra se colocó en un pocillo del gel, el marcador de peso molecular de DNA V Roche Applied Science® se colocó en el primer pozillo (Mezcla de fragmentos preparada por escisión del ADN de pBR322 con Hae III) para identificar los amplicones obtenidos.

Posteriormente se realizó corte enzimático de los productos de PCR de acuerdo a los siguientes protocolos:

#### Mutación p. A30P

Enzima Mval (la mutación crea un sitio de corte enzimático\* produciendo un fragmento de 136 pb y otro de 56 pb. El alelo normal presenta 192 pb)

\*5'...C C↓W G G...3  
3'...G G W↑C C...5'

- 10µl de la reacción de PCR
- 18µl de agua bidestilada libre de nucleasas
- 2µl de amortiguador 10X (33 mM Tris-acetato (pH 7.9 at 37°C), 10 mM acetato de magnesio, 66 mM acetato de potasio, 0.1 mg/ml BSA).
- 1µl Mval (10 u/µl)
- Se mezcló y centrifugó por un segundo
- Se incubó a 37°C por 1-16 horas.

### Mutación p. A53T

Enzima Tsp45I (La mutación crea un sitio de corte enzimático\* produciendo un fragmento de 127 pb y otro de 92 pb, el alelo normal presenta una longitud de 219 pb)

\*5'...↓G T S A C ...3'

3'... C A S T G↑...5'

- 10µl de la reacción de PCR
- 18µl de agua bidestilada libre de nucleasas
- 2µl de amortiguador 10X (33 mM Tris-acetato (pH 7.9 at 37°C), 10 mM acetato de magnesio, 66 mM acetato de potasio, 0.1 mg/ml BSA).
- 1µl Tsp45I (10 u/µl)
- Se mezcló y centrifugó por un segundo
- Se incubó a 37°C por 1 a 16 horas.

### Mutación p. E46K

Enzima Styl (La mutación abole el sitio de corte enzimático\* produciendo un fragmento de 219 pb, el alelo normal presenta un fragmento de 149 pb y otro de 70 pb).

\*5'...C↓C W W G G...3'

\*3'...G G W W C↑C...5'

- 10µl de la reacción de PCR
- 17µl de agua bidestilada libre de nucleasas
- 2µl de amortiguador 10X (33 mM Tris-acetato (pH 7.9 at 37°C), 10 mM acetato de magnesio, 66 mM acetato de potasio, 0.1 mg/ml BSA).
- 1µl Tsp45I (10 u/µl)
- Se mezcló y centrifugó por un segundo
- Se incubó a 37°C por 1-16 horas.

Preparación de gel de acrilamida:

Para realizar los geles de acrilamida se limpian bien las placas de vidrio con etanol 95 por ciento, y se colocan los espaciadores de 0.8 mm entre ellos, sujetando los extremos con pinzas. Se mezclan 10 µl de la solución de acrilamida 6% en amortiguador TBE (Tris, ácido bórico, EDTA, pH8) con 10µl de TEMED y 100µl de APS. Se agita brevemente la mezcla y se coloca entre los dos vidrios mediante capilaridad.

Rápidamente se coloca el peine de 0.8 mm en el extremo, y se deja polimerizar por aproximadamente 20 minutos.

Una vez polimerizado, se limpia bien y se coloca en la cámara de electroforesis, a la cual se le agrega amortiguador TBE 1X.

Electroforesis:

Los productos de digestión enzimática en cada caso fueron resueltos en geles de acrilamida al 6 por ciento a 300 volts por 4 hrs y teñidos mediante inmersión en solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) por 3 a 5 minutos y analizados en el sistema de fotodocumentación Gel-DOC™ XR+ (Biorad).

### **Análisis Estadístico**

Se estableció el equilibrio de Hardy-Weinberg (Fórmula 3) para cada SNP mediante prueba de  $\chi^2$  de acuerdo a las frecuencias obtenidas en el grupo de controles.

$$1 = p^2 + 2pq + q^2$$

Donde p es la frecuencia del alelo A siempre que  $0 \leq p \leq 1$   
q es la frecuencia del alelo a siempre que  $0 \leq q \leq 1$   
p<sup>2</sup> Frecuencia del genotipo A|A (homocigotos A)  
q<sup>2</sup> Frecuencia del genotipo a|a (homocigotos a)  
2pq Frecuencia del genotipo A|a (Heterocigotos)

Fórmula 3. Equilibrio de Hardy-Weinberg

De acuerdo a los datos obtenidos en los grupos control y de pacientes con EPE fueron analizados con el paquete estadístico SPSS 20 (Statistics Package for Social Sciences®) empleando estadística descriptiva para establecer la frecuencia de las variables socio-demográficas y las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs debido a que solo dos SNPs cumplieron con las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg, se decidió incluir todos los polimorfismos en el análisis de asociación para la EPE mediante  $\chi^2$  y regresión logística binaria con el método “introducir” como principales métodos de análisis estadístico. En el grupo de pacientes con EPAD se realizó estadística descriptiva y asociación mediante  $\chi^2$  de las variables socio-demográficas comparándolas con el grupo control.

## **Resultados:**

### ***a) Características socio-demográficas encontradas en los grupos control y pacientes con EPE***

De las 516 muestras incluidas para el análisis de casos y controles, 172 correspondieron a casos de EPE y 344 controles sanos al momento del estudio.

En el grupo de controles sanos se encontró una edad promedio de 54 años (18-93 años; DE 16), de los cuales 19 % (n=122) pertenecían al género masculino, 45 % (n=150) presentaron tabaquismo, 19 % (n=62) alcoholismo, 12 % (n=39) antecedente de traumatismo craneoencefálico y 10 % (n=33) exposición a neurotóxicos.

En el grupo de casos de EPE, fué conformado por 172 muestras, con una edad promedio de 51 años (18-76 años; DE 16), de los cuales 65 % (n=112) pertenecían al género masculino, 40 % (n=68) presentaron tabaquismo, 24 % (n=41) alcoholismo, 20 % (n=34) antecedente de traumatismo craneoencefálico, 22 % (n=37) exposición a neurotóxicos y 5 % (n=9) demencia. Las comparaciones de las variables de interés se muestran en la tablas 4.

Dentro de estos datos se observa que las variables alcoholismo y tabaquismo no presentaron diferencias entre los controles y los pacientes. El reducido grupo de pacientes con inicio juvenil no permitió continuar su análisis, por lo que no se consideró para los cálculo de riesgo y el modelo de regresión logística. Sin embargó la estratificación entre edad de inicio temprana (menor a 45 años) y tardía (mayor a 45 años) presentó interés para el análisis posterior de riesgo.

**Tabla 4: Comparación entre grupos de las variables de riesgo socio-económicas**

	Controles		Pacientes		$\chi^2$	p
	n	%	n	%		
<b>Género</b>						
Masculino	222	64.53	112	40.67	40.67	<0.001
Femenino	122	35.47	60	12.23		
<b>Grupo de edad</b>						
Juvenil	10	2.91	2	1.16	12.26*	0.002
Temprano	62	18.02	56	31.56		
Tardío	269	77.91	114	66.28		
<b>Tabaquismo</b>						
Positivo	151	43.90	68	39.53	0.892	0.198
Negativo	193	56.10	104	60.47		
<b>Alcoholismo</b>						
Positivo	63	18.31	41	23.84	2.174	0.088
Negativo	281	81.69	131	76.16		
<b>TCE</b>						
Positivo	39	11.34	34	19.77	6.709	0.008
Negativo	305	88.66	138	80.23		
<b>Exposición a Neurotóxicos</b>						
Positivo	33	9.59	37	21.51	13.892	<0.001
Negativo	311	90.41	135	78.49		
<b>Total</b>	<b>344</b>	<b>100</b>	<b>172</b>	<b>100</b>		

\*Una o más casillas presentan menos de 5 casos.



## b) Frecuencias genotípicas y alélicas en los grupos control y pacientes con EPE

La discriminación alélica se realizó mediante PCR en tiempo real para discriminación alélica de SNPs mediante sondas TaqMan® marcadas con fluorescencia en un equipo SetpOne® Applied biosystem(72, 95). según lo reportado previamente por Kay DM y colaboradores(76).

Los resultados obtenidos se ejemplifican en la figura 6.

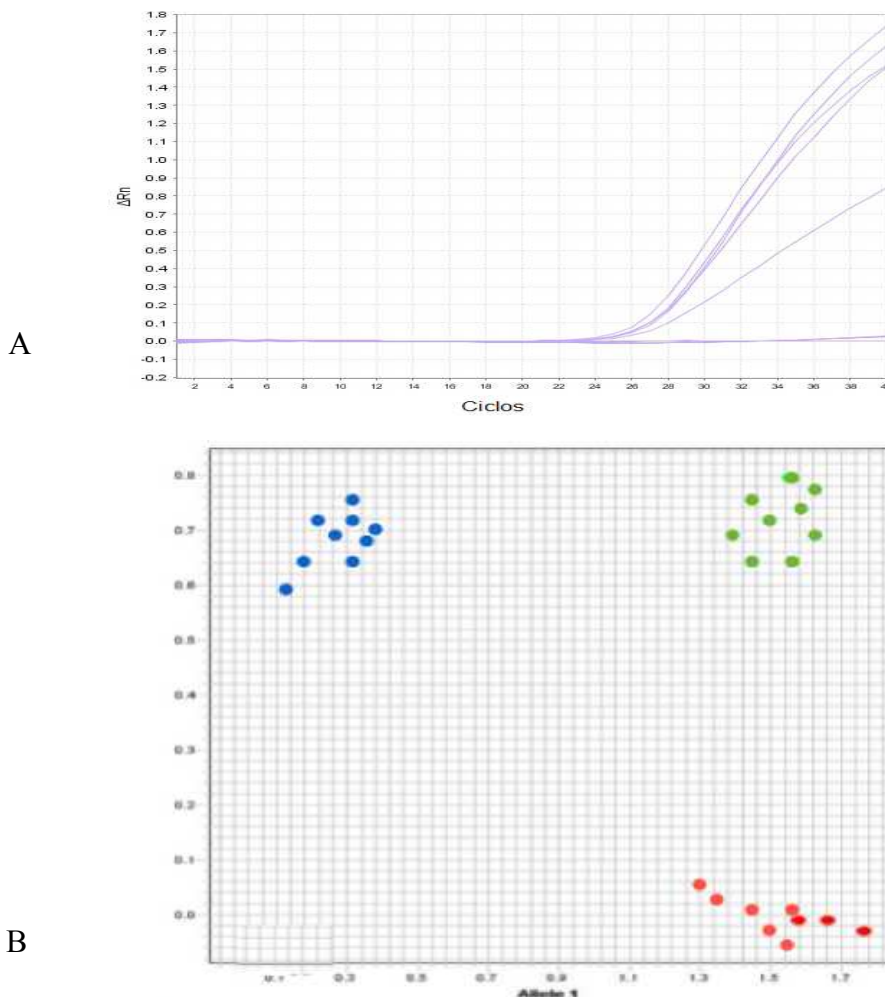


Figura 6. Resultados de discriminación alélica en tiempo real

Se realizó mediante tiempo real con sondas TaqMan® marcadas con fluorescencia en un equipo SetpOne® Applied biosystem. En la primera figura (A) se muestra un ejemplo de la gráfica de amplificación en tiempo real; Se observa que la fluorescencia inicia ascenso a partir del ciclo 25, en la figura (B) se muestra la gráfica de distribución cartesiana de discriminación alélica: en rojo se observan los homocigotos silvestres, en verde los heterocigotos y en azul los homocigotos de riesgo. Este procedimiento se realizó para cada SNP seleccionado tanto en los grupos de controles sanos y grupo de pacientes con EPE.

Se realizó la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg para cada polimorfismo, encontrando sólo en equilibrio el SNP rs2619364, sin embargo, a pesar de el sesgo de selección que pudo introducirse, se realizó el análisis estadístico incluyendo todos polimorfismos seleccionados.

La comparación de los resultados de frecuencias genotípicas (Tabla 5) y alélicas (Tabla 6) entre los grupos control y pacientes con EPE se muestran a continuación.

Dentro de los datos obtenidos se observa que al comparar entre casos y controles las variables alcoholismo, tabaquismo, y las frecuencias genotípicas de los SNPs rs17016074, y rs2619364 no presentaron diferencias entre los controles sanos y los pacientes (Tablas 4 y 5) y la frecuencia alélica de los SNPs rs2619363 y rs2619364 no presentaron diferencias entre grupos (Tabla 6); en cuanto a la división por grupos de edad, el reducido grupo de pacientes con inicio juvenil no permitió continuar su análisis, por lo que no se consideró para los cálculos de riesgo y el modelo de regresión logística.

Para el análisis de riesgo individual de las variables socio-económicas y alelos de riesgo (genero masculino, TCE, exposición a neurotóxicos, alelo G de rs356219, alelo T de rs356220, alelo G de rs356203, alelo T de rs7684318 y alelo T de rs2736990) se realizaron análisis de regresión logística para determinar el porcentaje de variabilidad explicada por los dichos datos mediante SPSS versión 20 (Tabla 7)

Considerando que los casos de inicio juvenil y temprano son considerados con un mayor componente genético que los casos de inicio tardío se analizó la distribución de los SNPs de riesgo en el grupo de pacientes con EPE de acuerdo a la edad de inicio, menor de 45 años y mayor de 45 años, encontrando que el polimorfismo rs7684318, presenta diferencias entre ambos grupos; el 81% (n=40) de los paciente con EPE de inicio juvenil y temprano (menor a 45 años) son portadores del alelo rs7684318 T, mientras que solo el 64.8% (n=70) de los pacientes con inicio tardío portan dicho alelo, ( $\chi^2=4.706$ ;  $p=0.03$ ).

**Tabla 5: Comparación entre grupos de las frecuencias genotípicas de los SNPs seleccionados.**

SNP	Controles		Pacientes		$\chi^2$	p
	n	%	n	%		
<b>rs356219</b>						
Homocigoto silvestre [A/A]	135	39.244	17	9.884	50.445	<0.001
Heterocigoto [A/G]	119	34.593	75	43.605		
Homocigoto de riesgo [G/G]	90	26.163	80	46.512		
<b>rs356220</b>						
Homocigoto silvestre [C/C]	90	26.16	24	13.953	19.427	<0.001
Heterocigoto [C/T]	151	43.9	65	37.791		
Homocigoto de riesgo [T/T]	103	29.94	83	48.256		
<b>rs356203</b>						
Homocigoto silvestre [A/A]	115	33.430	77	44.767	7.937	0.019
Heterocigoto [A/G]	149	43.314	69	40.116		
Homocigoto de riesgo [G/G]	80	23.256	26	15.116		
<b>rs17016074</b>						
Homocigoto silvestre [A/A]	0	0	0	0	0.147*	0.702
Heterocigoto [A/G]	10	2.90	4	2.30		
Homocigoto de riesgo [G/G]	334	97.1	168	97.3		
<b>rs7684318</b>						
Homocigoto silvestre [C/C]	71	20.64	53	30.81	6.511	0.039
Heterocigoto [C/T]	50	43.6	66	38.37		
Homocigoto de riesgo [T/T]	123	35.76	53	30.81		
<b>rs2736990</b>						
Homocigoto silvestre [C/C]	94	27.326	18	10.465	32.043	<0.001
Heterocigoto [C/T]	150	43.605	65	37.791		
Homocigoto de riesgo [T/T]	100	29.070	89	51.744		
<b>rs2619363</b>						
Homocigoto silvestre [G/G]	248	72.10	124	33.30	9.478	0.009
Heterocigoto [G/T]	44	12.80	35	20.3		
Homocigoto de riesgo [T/T]	52	15.1	13	7.6		
<b>rs2619364</b>						
Homocigoto silvestre [A/A]	253	73.547	123	71.512	3.599	0.165
Heterocigoto [A/G]	81	23.547	38	22.093		
Homocigoto de riesgo [G/G]	10	2.907	11	6.395		
Total	344	100	172	100		

\* Una o más casillas presentan menos de 5 casos.

**Tabla 6: Comparación entre grupos de las frecuencias alélicas de los SNPs seleccionados**

SNP	Controles		Pacientes		$\chi^2$	p
	n	%	n	%		
<b>rs356219</b>						
A	135	39.24	17	9.88	47.568	<0.001
G	209	60.76	155	90.12		
<b>rs356220</b>						
C	90	26.16	24	13.95	9.931	0.001
T	254	73.84	148	86.05		
<b>rs356203</b>						
A	115	33.43	77	44.77	6.308	0.008
G	229	66.57	95	55.23		
<b>rs7684318</b>						
C	71	20.64	53	30.81	6.502	0.008
T	273	79.36	119	69.19		
<b>rs17016074</b>						
A	10	2.9	4	2.3	0.147*	0.702
G	334	97.10	168	97.70		
<b>rs2736990</b>						
C	94	27.33	18		19.181	<0.001
T	259	72.67	154			
<b>rs2619363</b>						
G	284	72.10	124	72.10	0.000	1.000
T	96	27.90	48	27.90		
<b>rs2619364</b>						
A	253	73.55	123	71.51	0.240	0.348
G	91	26.45	49	28.49		
Total	344	100	172	100		

\*Una o más casillas presentan menos de 5 casos.

**Tabla 7. Análisis de riesgo individual de los factores significativas para EPE**

Variable	$\beta$	D.S. $\beta$	Exp ( $\beta$ )	95% I. C. ( $\beta$ )	p
Género Masculino	1.206	0.196	3.330	1.179-3.217	<0.000
TCE	0.666	0.256	1.947	1.566-4.352	0.009
Exposición a neurotóxicos	0.969	0.261	2.611	3.375-10.049	<0.000
Alelo G de rs356219	1.726	0.287	5.824	1.319-3.542	<0.000
Alelo T de rs356220	0.771	0.252	2.162	1.319-3.542	0.002
Alelo G de rs356203	-0.494	0.191	0.610	0.419-0.888	0.010
Alelo T de rs7684318	-0.505	0.213	0.604	0.398-0.915	0.443
Alelo T de rs2736990	1.158	0.277	3.183	1.850-4.478	<0.001

$\beta$ : estadístico de la R cuadrado de Nagelkerke  
D.S  $\beta$  Desviación estándar  
Exp ( $\beta$ ): OR  
95% I. C. ( $\beta$ ): Intervalo de confianza  
p: significancia estadística

De acuerdo a lo anterior, el alelo T del SNP rs76843, no presenta riesgo individual para EPE, por lo que fue eliminado del análisis y se corroboró que las otras variables seleccionadas para la regresión logística son significativas y aptas para realizar el primer modelo de regresión logística (Tabla 8)

**Tabla 8. Regresión logística de los factores de riesgo para EP. Primer paso**

Variable	$\beta$	D.S $\beta$	Exp ( $\beta$ )	95% I. C. ( $\beta$ )	p
Género Masculino	1.397	0.220	4.018	2.610-6.160	<0.001
TCE	0.726	0.308	2.068	1.130-3.782	0.018
Exposición a neurotóxicos	1.303	0.321	3.680	1.963-6.899	<0.001
Alelo G de rs356219	2.225	0.396	9.254	4.260-20.102	<0.001
Alelo T de rs356220	-0.962	0.406	0.382	0.172-0.847	0.018
Alelo G de rs356203	-0.219	0.237	0.804	0.505-1.279	0.357
Alelo T de rs2736990	0.869	0.371	2.385	1.152-4.940	0.019

$\beta$ : estadístico de la R cuadrado de Nagelkerke  
D.S  $\beta$  Desviación estándar  
Exp ( $\beta$ ): OR  
95% I. C. ( $\beta$ ): Intervalo de confianza  
p: significancia estadística  
R<sup>2</sup>=56.7%

Este primer modelo es capaz de explicar el 56.7% de la varianza, pero debido al valor de  $p$  y los IC encontrados, el alelo G del SNP rs356203 fue eliminado del modelo de regresión logística en el siguiente paso (Tabla 9).

**Tabla 9. Regresión logística de los factores de riesgo para EP. Segundo paso**

Variable	$\beta$	D.S $\beta$	Exp ( $\beta$ )	95% I. C. ( $\beta$ )	p
Género Masculino	1.397	0.220	4.042	2.627-6.218	<0.001
TCE	0.743	0.307	2.102	1.152-3.835	0.015
Exposición a neurotóxicos	1.333	0.318	3.794	2.034-7.076	<0.001
Alelo G de rs356219	2.247	0.394	9.458	2.372-20.461	<0.001
Alelo T de rs356220	-0.902	0.403	0.406	0.184-0.894	0.025
Alelo T de rs2736990	0.877	0.371	2.405	1.161-4.979	0.018

$\beta$ : estadístico de la R cuadrado de Nagelkerke  
D.S  $\beta$  Desviación estándar  
Exp ( $\beta$ ): OR  
95% I. C. ( $\beta$ ): Intervalo de confianza  
p: significancia estadística  
 $R^2=67.3\%$

En este modelo todas las variables presentan diferencias entre los grupos y se encuentran dentro de los intervalos de confianza necesarios, explicando el 67.3% de la varianza, sin embargo el alelo T del SNP rs356220 presenta un mínimo efecto protector (9%), por lo que fue eliminado del modelo de riesgo en el siguiente paso. (Tabla 10)

**Tabla 10. Regresión logística de los factores de riesgo para EP. Tercer paso**

Variable	$\beta$	D.S $\beta$	Exp ( $\beta$ )	95% I. C. ( $\beta$ )	p
Género Masculino	1.392	0.219	4.023	2.621-6.177	<0.001
TCE	0.749	0.306	2.114	1.160-3.854	0.014
Exposición a neurotóxicos	1.303	0.325	3.679	1.978-6.846	<0.001
Alelo G de rs356219	1.822	0.325	6.184	3.272-11.685	<0.001
Alelo T de rs2736990	0.564	0.337	1.757	0.907-3.403	0.095

$\beta$ : estadístico de la R cuadrado de Nagelkerke  
D.S  $\beta$  Desviación estándar  
Exp ( $\beta$ ): OR  
95% I. C. ( $\beta$ ): Intervalo de confianza  
p: significancia estadística  
 $R^2=46.8\%$

Al eliminar el alelo T del SNP rs356220 del modelo, el alelo T del SNP rs2736990 pierde significancia, por lo que se procede a realizar un cuarto paso eliminando esta variable. (Tabla 11)

**Tabla 11. Regresión logística de los factores de riesgo para EP. Cuarto paso**

Variable	$\beta$	D.S $\beta$	Exp ( $\beta$ )	95% I. C. ( $\beta$ )	p
Género Masculino	1.417	0.218	4.127	2.693-6.322	<0.001
TCE	0.744	0.305	2.105	1.158-3.824	0.015
Exposición a neurotóxicos	1.223	0.310	3.397	1.851-6.234	<0.001
Alelo G de rs356219	2.026	0.307	7.582	4.157-13.826	<0.001

$\beta$ : estadístico de la R cuadrado de Nagelkerke  
D.S  $\beta$  Desviación estándar  
Exp ( $\beta$ ): OR  
95% I. C. ( $\beta$ ): Intervalo de confianza  
p: significancia estadística  
 $R^2=47.4$

En este último modelo todas las variables cumplen con las condiciones necesarias y explica el 47.4 % de la varianza. Se observa que el alelo G del SNP rs356219 confiere el mayor riesgo, sin embargo su IC es amplio.

Posteriormente se analizaron los riesgos acumulados para estas variables (género masculino, TCE, exposición a neurotóxicos y el alelo G del SNP rs356219) (Tabla 12).

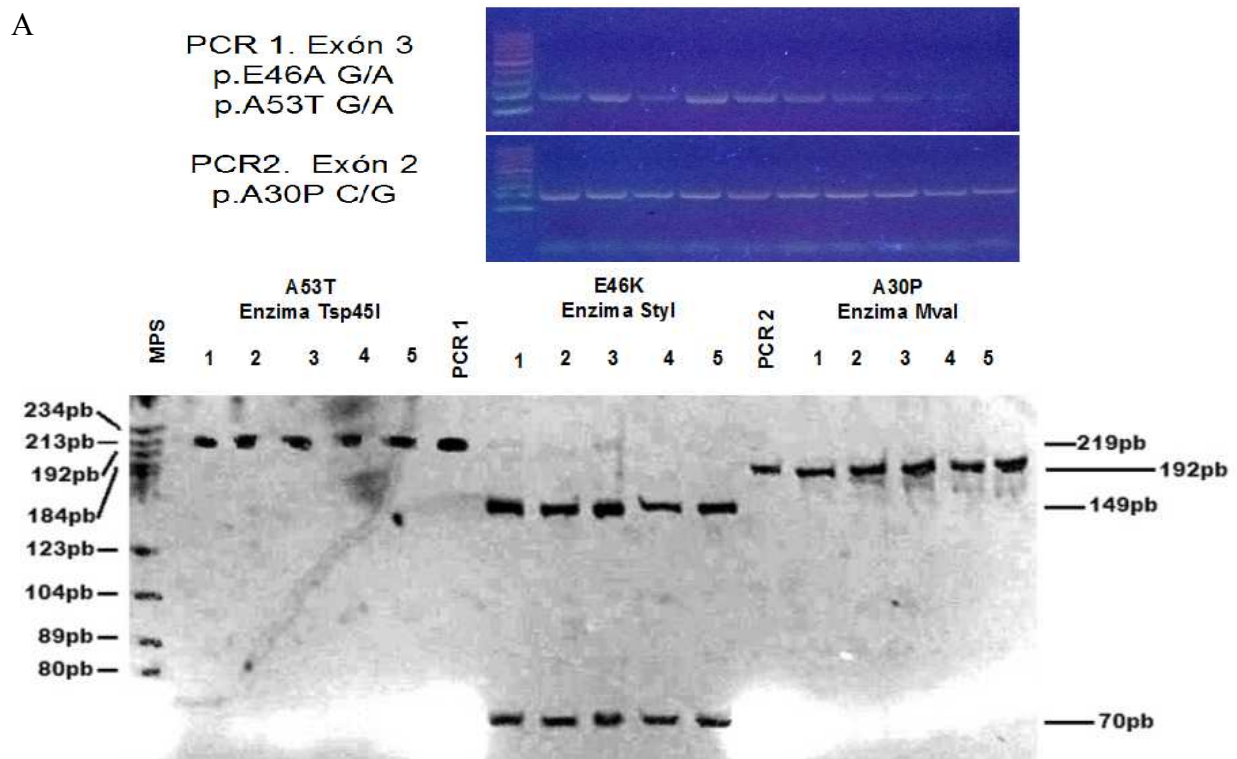
**Tabla 12. Riesgos acumulados en los factores identificados EP**

GM	TCE	EN	rs356219 (G)	$\beta$	D.S $\beta$	Exp ( $\beta$ )	95% I. C. ( $\beta$ )	p
x	x			1.598	0.413	4.945	2.200-11.113	<0.001
x		x		1.540	0.416	4.667	2.064-10.552	<0.001
x			x	1.651	0.204	5.214	3.497-7.774	<0.001
	x	x		0.996	0.414	2.708	1.202-6.099	0.016
	x		x	1.200	0.308	3.319	1.816-6.064	<0.001
		x	x	1.622	0.329	5.065	2.659-9.649	0.021
x	x	x		1.431	0.620	4.184	1.242-38.412	<0.001
x	x		x	2.394	0.640	10.962	3.128-38.412	<0.001
		x	x	1.862	0.585	6.432	2.043-20.261	0.001
x	x	x	x	21.940	16408.711	3377x10 <sup>-6</sup>	0	0.999

$\beta$ : estadístico de la R cuadrado de Nagelkerke; D.S  $\beta$  Desviación estándar; Exp ( $\beta$ ): OR; 95% I. C. ( $\beta$ ): Intervalo de confianza; p: significancia estadística; GM: Género Masculino; TCE: Traumatismo craneoencefálico; EN: Exposición a Neurotóxicos

**c) Distribución de mutaciones puntuales de SNCA en la muestra de casos con herencia sugestiva autosómica dominante (EPAD)**

De 86 pacientes con EPAD, en quienes previamente se descartó mutación en el gen *LRRK2* se realizó la búsqueda de las tres mutaciones puntuales (p.E46A, p.A53T y p.A30P), conocidas en *SNCA*, mediante PCR y RFLP's, sin encontrar ningún paciente con alguna de estas mutaciones.(Figura 7).



MPS: Marcador de Peso Molecular de DNA V Roche Applied Science

A53T: Mutación: El alelo silvestre presenta 219 pares de bases, mientras que la mutación crea un sitio de corte que genera un fragmento 127 pb y otro de 92 pb.

E46K: El alelo silvestre presenta restricción generando un fragmento de 149 pb y otro de 70 pb, la mutación abole el sitio de restricción.

A30P: El alelo silvestre presenta 129 pb mientras que la mutación crea un sitio de restricción generando un fragmento de 136 pb y otro de 56 pb

**Figura 7. PCR y RFLPs de los exones 1 y 2 del gen *SNCA***

(A) Gele de agarosa: carril 1 se observa el marcador de peso molecular, en los carriles 2 – 11 se observan los productos de PCR del exón 3 de 219pb (PCR1) y del exón 2 de 192pb (PCR2) La discriminación alélica mediante RFLPs de las mutaciones puntuales p.A53T, p.E46K y p.A30 P (B) en los exones 2 y 3 se observan resueltas mediante gel de acrilamida al 6 % respectivamente; no muestran mutación según los métodos descritos por Zarranz JJ, Krüger R y Polymeropoulos, M y colaboradores.(4, 62, 64)



Las características socio-demográficas de los pacientes con EPAD de acuerdo a la edad de inicio se muestran en la Tabla 13.

Ninguna variable mostró diferencia en cuanto al género, edad de inicio o años de evolución entre los grupos de casos de EPE, casos de EPAD o controles.

**Tabla 13: Características clínicas y socio-demográficas en casos de EPAD(96)**

Tipo de Inicio	Género	Edad de Inicio*	Edad Actual**	Años de evolución***
Juvenil	Masculino	0 (0%)	NA	NA
	Femenino	2 (2.3%)	13.50	25.98
Temprano	Masculino	22 (25.6%)	39.00	47.75
	Femenino	12 (14.0%)	36.92	50.35
	Total	34 (39.5%)	38.26	48.66
Tardío	Masculino	29 (33.7%)	59.69	70.79
	Femenino	21 (24.4%)	60.33	73.03
Total		86 (100%)	50.3	61.55

\*Promedio de edad de inicio, \*\*edad al momento del estudio y años de evolución desde el diagnóstico.

## Discusión

El objetivo del presente estudio fue el comparar la frecuencia de los SNPs de riesgo rs2619364, rs2619363, rs2736990, rs7684318, rs17016074, rs356219, rs356220 y rs356203 del gen *SNCA* entre una muestra de población mexicana sana y una muestra de pacientes con EPE, factores de riesgo ya conocidos para disminuir el sesgo causado por los factores ambientales.

Las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs356219 son muy semejantes a lo reportado en población caucásica, mientras que para los SNPs rs356203, rs356220, rs17016074, rs2736990 sus frecuencias se encontraron similares a lo reportado tanto en las poblaciones asiáticas. Los SNPs rs261963 y rs2619364 presentan una distribución distinta a otras poblaciones reportadas(39, 71, 91, 97, 98), probablemente reflejo del mestizaje en nuestra población (Tabla 14).

**Tabla 14: Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs de riesgo de *SNCA* en distintas poblaciones(91) y el presente estudio (\*) (39, 71, 91, 97, 98).**

	Genotipos			Alelos		n
	A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	A (%)	G (%)	
<b>rs356219</b>						
Caucásicos	31.7	51.7	16.7	57.5	42.5	120
Asiáticos	37.8	56.8	5.4	37.8	71	90
Afroamericanos	5.2	41.4	53.4	25.9	74.1	116
<b>Mestizos Mexicanos*</b>	<b>28.8</b>	<b>48.2</b>	<b>23</b>	<b>53</b>	<b>47</b>	<b>170</b>
<b>rs356220</b>						
Caucásicos	34.5	50.4	15.1	59.7	40.3	226
Asiáticos	16.3	51.2	32.6	41.9	58.1	172
Afroamericanos	2.7	37.2	60.1	21.2	78.8	226
<b>Mestizos Mexicanos*</b>	<b>27</b>	<b>47</b>	<b>26</b>	<b>50.6</b>	<b>40.4</b>	<b>170</b>
<b>rs356203</b>						
Caucásicos	25	60	15	55	45	40
Asiáticos	37.5	50	12.5	62.5	37.5	48
Afroamericanos	16.7	33.3	50	33.3	66.7	24
Hispano-Americanos	36.4	50	13.6	61.4	38.6	44
<b>Mestizos Mexicanos*</b>	<b>27.1</b>	<b>52.4</b>	<b>20.5</b>	<b>53.2</b>	<b>46.8</b>	<b>170</b>

**Tabla 14: Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs de riesgo de SNCA en distintas poblaciones(91) y el presente estudio (\*) (39, 71, 91, 97, 98). Continuación**

	Genotipos			Alelos		n
	A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	A (%)	G (%)	
rs17016074	A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	A (%)	G (%)	n
Caucásicos	0	0	100	0	100	120
Asiáticos	0	0	100	0	100	88
Afroamericanos	0	25	75	12.5	87.5	120
Hispano-Americanos	0	0	100	0	100	42
<b>Mestizos Mexicanos*</b>	<b>0</b>	<b>3.52</b>	<b>96.5</b>	<b>2</b>	<b>98</b>	<b>170</b>
rs7684318	C/C (%)	C/T (%)	T/T (%)	C (%)	T (%)	n
Caucásicos	0	4.8	95.2	2.4	97.6	42
Asiáticos	35	50	15	60	40	40
Afroamericanos	13	56.5	30.4	41.3	58.7	46
<b>Mestizos Mexicanos*</b>	<b>18.24</b>	<b>42.94</b>	<b>38.82</b>	<b>39.7</b>	<b>60.3</b>	<b>170</b>
rs2736990	C/C (%)	C/T (%)	T/T %	C (%)	T (%)	n
Caucásicos	20.8	50	29.2	45.8	54.2	226
Asiáticos	37.8	51.1	11.1	63.3	36.7	90
Afroamericanos	73.3	26.7	0	86.7	13.3	120
<b>Mestizos Mexicanos*</b>	<b>31</b>	<b>46</b>	<b>23</b>	<b>54.2</b>	<b>45.8</b>	<b>170</b>
rs2619363	C/C (%)	C/T (%)	T/T (%)	C (%)	T (%)	n
Caucásicos	0	100	0	50	50	30
Asiáticos	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Afroamericanos	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>Mestizos Mexicanos*</b>	<b>74.7</b>	<b>18.3</b>	<b>7</b>	<b>84</b>	<b>16</b>	<b>170</b>
rs2619364	A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	A (%)	G (%)	n
Caucásicos	50	50	0	75	25	30
Asiáticos	100	0	0	100	0	90
Afroamericanos	93.3	6.7	0	96.7	3.3	120
<b>Mestizos Mexicanos*</b>	<b>71.7</b>	<b>25.3</b>	<b>3</b>	<b>84.4</b>	<b>15.6</b>	<b>170</b>

Al comparar las variables consideradas anteriormente, se observaron diferencias entre los grupos de pacientes y controles en cuanto al género, TCE, exposición a neurotóxicos y los SNPs de riesgo rs356219, rs356220, rs356203 y rs2736990, aunque sólo el SNP rs356220 se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg. Las demás variables consideradas no mostraron diferencias entre grupos. Cabe señalar que ninguna de las variables estudiadas representa un factor causal o determinante para el diagnóstico o desarrollo de la EPE, pero de manera aislada pudieran ser factores a considerar en su diagnóstico.

Al examinar el modelo de regresión logística, se observa que aquellas combinaciones que incluyen el alelo G de rs356219 confieren el mayor riesgo.

De la misma manera, la combinación de los factores ambientales sin contar el alelo G de rs356219, muestran un riesgo considerable (OR 4.184 IC 95% 1.242-38.412) aunque el intervalo de confianza es muy amplio, al igual que la combinación de los factores de riesgo género masculino, TCE y el alelo G de rs356219 (OR 10.96 IC 95% 3.128-38.412). El riesgo conferido por la exposición a neurotóxicos y el alelo G de rs356219 (OR 5.065 IC 95% 2.659-9.659) es muy similar al conferido por la combinación de género masculino y la presencia del alelo G de rs356219 (OR 5.214 IC 95% 3.497-7.774) con intervalos de confianza cercanos entre sí.

El SNP rs356219 encuentra localizado en la región 5' reguladora de la transcripción y procesamiento postraduccional del gen de *SNCA* por lo que puede inferirse que la presencia alelo G del SNP rs356219 alterara la tasa de transcripción o traducción de dicho gen, aumentando la concentración del transcrito primario y de la proteína, o bien se relaciona con la interacción del RNA mensajero de  $\alpha$ -sinucleína con otras moléculas, posiblemente implicadas en la patogénesis de la EP.(77, 99, 100)

Se observa que el SNP rs356219 en población mexicana se encuentra relacionado, sólo o en combinación con factores ambientales como el género masculino, TCE, y la exposición a neurotóxicos, para el desarrollo de la EPE.

Existen reportes que relacionan el SNP rs356219 (99) se encuentra relacionado como factor modificador de la edad de inicio de la EPE en poblaciones japonesas(101) chinas(102), e interaccionará con distintos factores genéticos como mutaciones *LRRK2*(103) y

polimorfismos en *MAPT*(104) tanto en poblaciones caucásicas y asiáticas para el riesgo de desarrollar EPE (99, 100).

Desafortunadamente, en este estudio el grupo de casos de EPAD no mostró ninguna mutación puntual reportada en *SNCA* al momento del estudio, A30P (c.88G>C), E46K (c.136G>A) y A53T (c.157A>T) (63, 66), aunque solo fueron los casos con probable EPAD negativos a mutaciones en *LRRK2*, principal causa de EPAD a nivel mundial. Debe notarse que las mutaciones causadas por CNV's en *SNCA* no fueron analizadas, aunque son causa conocida de EPE y EPAD (67, 105-107).

### **Conclusiones:**

1. En el presente estudio se demuestra la importante participación del SNP rs356219 como factor de riesgo para desarrollar EPE; solo o en combinación con otros factores de riesgo (el género masculino y la exposición a neurotóxicos), explican cerca del 50 % de la varianza entre los grupos, lo que lo postula como un importante factor de riesgo.
2. La utilidad de la genotipificación del SNP rs356219 como criterio diagnóstico o pronóstico, en el contexto de un paciente con síndrome rígido acinéptico que cumple con los criterios clínicos del acopio de cerebros del Reino Unido para la enfermedad de Parkinson, deberá ser explorada, tanto en casos esporádicos como hereditarios.
3. Para descartar mutaciones puntuales en *SNCA* en pacientes mexicanos deberá preferirse otras metodologías, como secuenciación automatizada de todo el marco de lectura asegurando que no existan nuevas mutaciones no reportadas previamente.
4. Considerando que solo se descartaron las mutaciones puntuales previamente conocidas en *SNCA* es necesario buscar mutaciones por duplicaciones o triplicaciones del mismo (CNV's) en los casos de EPAD y EPE e incluso, extender dicha búsqueda a nuevos marcadores de riesgo y mutaciones puntuales.

Para facilitar la comprensión de la presente tesis se anexa un glosario de términos moleculares y de abreviaturas (ANEXO 4). Los resultados parciales ya publicados como productividad científica de la presente tesis se encuentran en el ANEXO 5.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: #168600: 06/10/2013: World Wide Web URL: <http://omim.org/>.
2. O.M.S.: CIE-10. VI Enfermedades del Sistema Nervioso, VI3 Trastornos extrapiramidales y del movimiento. Décima Revisión de la Clasificación Internacional de las Enfermedades. Descripciones Clínicas y pautas para el diagnóstico. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 1992.
3. Benmoyal-Segal L, Soreq H. Gene-environment interactions in sporadic Parkinson's disease. *J Neurochem* 2006;97(6):1740-1755.
4. Polymeropoulos M, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, RL. N. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276(5321):2045-2047.
5. Pankratz ND, Nichols WC, Elsaesser VE, Pauciuolo MW, Marek DK, Halter CA, Wojcieszek J, Rudolph A, Pfeiffer RF, T; F, Investigators. PSG-P. Alpha-synuclein and familial Parkinson's disease. *Mov Disord* 2009;24(8):1125-1131.
6. Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención , México: Secretaría de Salud, 2010. Disponible en [www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html](http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html).
7. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number:#601104: 05/31/2012: World Wide Web URL: <http://omim.org/>.
8. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number:%146500: 04/01/2013: World Wide Web URL: <http://omim.org/>.
9. Pankratz ND, J W. Last Revision: July 9 2009. Parkinson Disease Overview In Gene Reviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2011. Aviable at <http://www.genetests.org>. Accessed January 2011.
10. Calne DB. A definition of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2005;11(Sup 1):s39-s40.
11. Jenner P, Morris HR, Robbins TW, Goedert M, Hardy J, Ben-Shlomo Y, Bolam P, Burn D, Hindle JV, D. B. Parkinson's disease - the debate on the clinical phenomenology, aetiology, pathology and pathogenesis. *J Parkinsons Dis* 2013(3):1-11.
12. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowsky JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha - synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;271:11588-11594.
13. Rajput A, Rozdilsky B, A R. Accuracy of clinical diagnosis in Parkinsonism - a prospective study. *Can J Neurol Sci* 1991;18:275-278.
14. Mouradian M. Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurology* 2002;58(2):179-185.
15. Hughes AJ, Daniel S, Ben-Shlomo Y, Lees A. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55(3):181-184.
16. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: #234200: 04/16/2013: World Wide Web URL: <http://omim.org/>.
17. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 260470: 06/28/2002: World Wide Web URL: <http://omim.org/>.
18. Calne D. The neuromythology of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2004;10(5):319-322.
19. Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:123-144.

20. Tolosa E, Wenning G, W. P. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006;5(1):75-86.
21. Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, AJ. L. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* 2002;125(Pt 4):861-870.
22. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Stewur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197-211.
23. Goetz CG, Fahn S, Martinez-Martin P, Poewe W, Sampaio C, Stebbins GT, Stern MB, Tilley BC, Dodel R, Dubois B, Holloway R, Jankovic J, Kulisevsky J, Lang AE, Lees A, Leurgans S, LeWitt PA, Nyenhuis D, Olanow CW, Rascol O, Schrag A, Teresi JA, Van Hilten JJ, N. L. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Process, format, and clinimetric testing plan. *Mov Disord* 2007;22(1):41-47.
24. Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, Stebbins GT, Fahn S, Martinez-Martin P, Poewe W, Sampaio C, Stern MB DR, Dubois B, Holloway R, Jankovic J, Kulisevsky J, Lang AE, Lees A, Leurgans S, LeWitt PA, Nyenhuis D, Olanow CW, Rascol O, Schrag A, Teresi JA, van Hilten JJ, N; L, Force. MDSUR. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord* 2008;23(15):2129-2170.
25. Hoehn M, Yahr M. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 2001;57(10 Suppl. 3):S11-S26.
26. Gasser T. Genetics of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 2005(18):363-369.
27. Comunicado 148: Enfermedad de Parkinson, padecimiento discapacitante. Dirección General de Comunicación Social Secretaría de Salud (SALUD) 2010.
28. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) Censo de Población y Vivienda 2010.
29. Ramírez-Jairo LJ, Ruíz-Sandoval JL, Jiménez-Gil FJ, Vargas-Frutos E, Gallegos-Arreola M, . Polimorfismo - 116 C-G del gen alfa sinucleína en pacientes con enfermedad de Parkinson. *Salud Pública de México* 2006;48(4):289-290.
30. Taylor CA, Saint-Hilaire MH, Cupples LA, Thomas CA, Burchard AE, Feldman RG, RH. M. Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: a New England-based case control study. *Am J Med Genet* 1999;88(6):742-749.
31. Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, SS. P. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res* 2001;86(2):122-127.
32. Morris H. Autosomal dominant Parkinson's disease and the route of new therapeutics. *Expert Rev Neurotherapeutics* 2007;7(6):649-656.
33. Shino MY, McGuire V, Van Den Eeden SK, Tanner CM, Popat R, Leimpeter A, Bernstein AL, LM. N. Familial aggregation of Parkinson's disease in a multiethnic community-based case-control study. *Mov Disord* 2010;25(15):2587-2594.
34. Marder K, Levy G, Louis ED, Mejia-Santana H, Cote L, Andrews H, Harris J, Waters C, Ford B, Frucht S, Fahn S, R. O. Familial aggregation of early- and late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;54(4):507-513.
35. International Parkinson Disease Genomics Consortium. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet* 2011; 377(9766):641-649.
36. Yescas P, López M, Monroy N, Boll MC, Rodríguez-Violante M, Rodríguez U, Ochoa A, ME. A. Low frequency of common LRRK2 mutations in Mexican patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2010;485(2):79-82.
37. Gasser T. Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007;22(Suppl 17):s343-s350.
38. Klein C, Ziegler A. From GWAS to clinical utility in Parkinson's disease. *Lancet* 2011;377(9766):613-614.
39. International HapMap Project. <http://hapmapncbinlmnihgov/>.
40. Consortium. TIH, Project. TIH. The first major publication from the HapMap group laying out the foundation of the



- project and describing its aims and objectives. *Nature* 2003;426:89-96.
41. Alam Z, Daniel S, Less A, Marsden D, Jenner P, P. H. A generalized increase in protein caryonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J Neurochem* 1997(69):1326-1329.
  42. Andersen J. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 2004;10(S):S18-S25.
  43. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: #600274: 04/04/2013: World Wide Web URL: <http://omim.org/>.
  44. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: #104300: 06/10/2013: World Wide Web URL: <http://omim.org/>.
  45. David DC, Hauptmann S, Scheerping I, Schuessels K, Keil U, Rizzu P, Dröse S, Brandt U, Muller WE, J. G. Proteomic and functional analysis reveal a mitochondrial dysfunction in P301L Tau Transgenic mice. *J Biol Chem* 2005;280:23802-23814.
  46. Olanow CW, Brundin P. Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder? *Mov Disord* 2013(28):31-40.
  47. Wakabayashi K. Cellular pathology of neurodegenerative disorders. *Rinsho Shinkeigaku* 2013(53):609-617.
  48. Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, T. T. Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2006;15(7):1151-1158.
  49. Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, PT. L. Acceleration of oligomerization, not fibrillation, is a shared property of both alpha - synuclein mutations linked to early - onset Parkinson's Disease: Implications for pathogenesis and Therapy. *Science* 2000;294:1346-1349.
  50. Lee SJ. Origins and effects of extracellular alpha - synuclein: Implications in Parkinson's Disease. *J Mol Neurosci* 2008;34:17-22.
  51. Schapira A. Disease modification in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2004;3:362-368.
  52. Hoglinger GU, Carrard G, Michel PO, Medja F, Lombes A, Ruberg M, Friguet B, EC. H. Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2003;86:1297-1307.
  53. Spillantini M, Divane A, Goedert M. Assignment of human alpha-synuclein (*SNCA*) and beta-synuclein (*SNCB*) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics* 1995;27(2):319-381.
  54. Gasser T. Mendelian forms of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792(7):587-596.
  55. Tomado de <http://www.genecards.org>. Weizmann Institute of Science 2012.
  56. Fortin DL, Nemani VM, Nakamura K, Edwards R. The behavior of alpha-synuclein in neurons. *Mov Disord* 2010;25(Suppl 1):s21-s6.
  57. Waxman E.A., Mazzulli J.R., B.I. G. Characterization of hydrophobic residue requirements for alpha-synuclein fibrillization. *Biochemistry* 2009(48):9427-9436.
  58. Okochi M., Walter J., Koyama A., Nakajo S., Baba M., Iwatsubo T., Meijer L., Kahle P.J., C H. Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2000(275):390-307.
  59. Pronin A.N., Morris A.J., Surguchov A., J.L. B. Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 2000(274):26515-26522.
  60. Bourdenx M. Phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein at Ser120 accelerates neurodegeneration. *Mov Disord* 2013(28):441.
  61. Fortin A, Verbeeck RK, Jansen FH. Comparative oral bioavailability of non-fixed and fixed combinations of artesunate and amodiaquine in healthy Indian male volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2011 Mar;67(3):267-275.
  62. Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC. The new mutation, E46K, of alpha - synuclein causes Parkinson and

- Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004;55:164-173.
63. Hoffman-Zacharska D, Kozirowski D, Ross OA, Milewski M, Poznański J, Jurek M, Wszolek ZK, Soto-Ortolaza A, Sławek J JP, Jamrozik Z, Potulska-Chromik A, Jasińska-Myga B, Opala G, Krygowska-Wajs A, Czyżewski K, Dickson DW, Bal J, A. F. Novel A18T and pA29S substitutions in  $\alpha$ -synuclein may be associated with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;28:811-813.
  64. Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, O. R. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998;18(2):106-108.
  65. Ibáñez P, Lesage S, Janin S, Lohmann E, Durif F, Destée A, Bonnet AM, Brefel-Courbon C, Heath S, Zelenika D, Agid Y, Dürr A, A. B, Group. FPsDGS. Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms. *Arch Neurol* 2009;66:102-108.
  66. Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, Weir D, Thompson C, Szu-Tu C, Trinh J, Aasly JO, Rajput A, Rajput AH, Jon Stoessl A, MJ. F. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013;28:811-813.
  67. Kasten M, C. K. The many faces of alpha-synuclein mutations. *Mov Disord* 2013(28):697-701.
  68. Bonifati V. Genetics of Parkinson's disease - state of the art, 2013. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;S1:S23-S8.
  69. Feuk L, Carson A, Scherer S. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006;7:85-97.
  70. Sotiriou S, Gibney G, Baxevanis AD, Nussbaum R. A single nucleotide polymorphism in the 3'UTR of the *SNCA* gene encoding alpha-synuclein is a new potential susceptibility locus for Parkinson disease. *Neurosci Lett* 2009;461:196-201.
  71. Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. (dbSNP Build ID: rs356219, rs356220, rs356203, rs17016074, rs7684318, rs2736990, rs2619363, rs2619364). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>.
  72. Myhre R, Toft M, Kachergus J, Hulihan MM, Aasly J, Klungland H, MJ. F. Multiple alpha-synuclein gene polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Norwegian population. *Acta Neurol Scand* 2008;118(5):320-327.
  73. Winkler S, Hagenah J, Lincoln S, Heckman M, Haugarvoll K, Lohmann-Hedrich K, Kostic V, Farrer M, C. K. alpha-Synuclein and Parkinson disease susceptibility. *Neurology* 2007;69(18):1745-1750.
  74. Edwards TL, Scott WK, Almonte C, Burt A, Powell EH, Beecham GW, Wang L, Züchner S, Konidari I, Wang G, Singer C, Nahab F, Scott B, Stajich JM, Pericak-Vance M, Haines J, Vance JM, Martin E. Genome-wide association study confirms SNPs in *SNCA* and the *MAPT* region as common risk factors for Parkinson disease. *Ann Hum Genet* 2010;74:97-109.
  75. Yu L, Xu P, He X, Hu F, Lin Z, Zhu M, Liu Z, He L, Xu Y. SNP rs7684318 of the alpha-synuclein gene is associated with Parkinson's disease in the Han Chinese population. *Brain Res* 2010;1346:262-265.
  76. Kay DM, Factor SA, Samii A, Higgins DS, Griffith A, Roberts JW, Leis BC, Nutt JG, Montimurro JS, Keefe RG, Atkins AJ, Yearout D, Zabetian CP, H. P. Genetic association between alpha-synuclein and idiopathic Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008;147B(7):1222-1230.
  77. Li NN, Mao XY, Chang XL, Zhao DM, Zhang JH, Liao Q, Yu WJ, Tan EK, Peng R. *SNCA* rs356219 variant increases risk of sporadic Parkinson's disease in ethnic Chinese. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2013 Jul;162(5):452-456.
  78. Paschou P, Lewis J, Javed A, Drineas P. Ancestry informative markers for fine-scale individual assignment to worldwide populations. *J Med Genet* 2010 Dec;47(12):835-847.
  79. Dávila-Ortiz de Montellano D, Yescas-Gómez P, Ochoa-Morales A, Alonso-Vilatela E. Determinación de la

- frecuencia del haplotipo H1/H2 de MAPT en población mexicana. Arch Neurocién (Mex) 2011;1(16):8-13.
80. González-Del Rincón Mde L, Monroy Jaramillo N, Suárez Martínez AI, Yescas Gómez P, Boll Woehrlen MC, López López M, ME. AV. The L444P GBA mutation is associated with early-onset Parkinson's disease in Mexican Mestizos. Clin Genet 2013;84(4):386-387.
  81. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number:#608013: 04/01/2013: World Wide Web URL: <http://omim.org/>.
  82. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number #230800: 04/01/2013: World Wide Web URL: <http://omim.org/>.
  83. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number #230900: 04/01/2013: World Wide Web URL: <http://omim.org/>.
  84. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number#231000: 04/01/2013: World Wide Web URL: <http://omim.org/>.
  85. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number #231005: 04/01/2013: World Wide Web URL: <http://omim.org/>.
  86. Estudio de genes de susceptibilidad para Enfermedad de Parkinson: Tamizaje y confirmación de mutaciones en el gen GBA y su correlación con polimorfismos y mutaciones encontradas en otros genes relacionados como PARK2. Alumno: María de Lourdes González del Rincón. Tesis de Especialidad en Neurogenética UNAM.
  87. Bajpai P, Sangar MC, Singh S, Tang W, Bansal S, Chowdhury G, Cheng Q, Fang JK, Martin MV, Guengerich FP, Avadhani NG. Metabolism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by mitochondrion-targeted cytochrome P450 2D6: implications in Parkinson disease. J Biol Chem 2013(288):4436-4451.
  88. López M, Guerrero J, Yescas P, Boll MC, Familiar I, Ochoa A, Rasmussen A, Alonso-Vilatela E. Apolipoprotein E4 is associated with Parkinson disease risk in a Mexican Mestizo population. Mov Disord 2007;22(3):417-420.
  89. 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964 y enmendada por la 29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975 35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983 41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989 48ª Asamblea General Somers West, Sudáfrica, octubre 1996 52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000 Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002 Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008
  90. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud 1984 (2012).
  91. The 1000 Genomes Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. Nature. 2012;491:56-65.
  92. Mateu E, Casal J. Tamaño de la muestra. Rev Epidem Med Prev 2003;1:8-14.
  93. Mata IF, Shi M, Agarwal P, Chung KA, Edwards KL, Factor SA, Galasko DR, Ginchina C, Griffith A, Higgins DS, Kay DM, Kim H, Leverenz JB, Quinn JF, Roberts JW, Samii A, Snapinn KW, Tsuang DW, Yearout D, Zhang J, Payami H, Zabetian C. SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. Arch Neurol 2010;67(11):1350-1356.
  94. Rodriguez S, Gaunt TR, Day I. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. American Journal of Epidemiology Advance Access 2009.
  95. Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Krüger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin MC, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, Hattori N, Kawakami H, Lambert JC, Lynch T, Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan EK, C; VB, Consortium. GEPsDG-P. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and

- Parkinson disease. *JAMA* 2006;296(6):661-670.
96. Dávila-Ortiz de Montellano D, Alonso M, Monroy N, Rodríguez-Violante M, López-López M, Yescas P. Detección de mutaciones puntuales en el gen de alfa-sinucleína en pacientes mexicanos con enfermedad de Parkinson y herencia autosómica dominante. *Arch Neurocién (Mex)* 2012;17(Supl-II):17-21.
  97. The International HapMap Consortium. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 467, 52-58. 2010.
  98. The International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449, 851-861. 2007.
  99. Brockmann K, Schulte C, Hauser AK, Lichtner P, Huber H, Maetzler W, Berg D, Gasser T. *SNCA*: Major genetic modifier of age at onset of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013 May 14.
  100. Mata IF, Yearout D, Alvarez V, Coto E, de Mena L, Ribacoba R, Lorenzo-Betancor O, Samaranch L, Pastor P, Cervantes S, Infante J, Garcia-Gorostiaga I, Sierra M, Combarros O, Snapinn KW, Edwards KL, Zabetian CP. Replication of *MAPT* and *SNCA*, but not *PARK16-18*, as susceptibility genes for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011 Apr;26(5):819-823.
  101. Miyake Y, Tanaka K, Fukushima W, Kiyohara C, Sasaki S, Tsuboi Y, Yamada T, Oeda T, Shimada H, Kawamura N, Sakae N, Fukuyama H, Hirota Y, M; N, Group FKPsDS. *SNCA* polymorphisms, smoking, and sporadic Parkinson's disease in Japanese. *Parkinsonism Relat Disord* 2012(18):557-561.
  102. Pan F, Dong H, Ding H, Ye M, Liu W, Wu Y, Zhang X, Chen Z, Luo Y, X. D. SNP rs356219 of the  $\alpha$ -synuclein (*SNCA*) gene is associated with Parkinson's disease in a Chinese Han population. *Parkinsonism Relat Disord* 2012( 18):632-634.
  103. Botta-Orfila T, Ezquerro M, Pastor P, Fernández-Santiago R, Pont-Sunyer C, Compta Y, Lorenzo-Betancor O, Samaranch L, Martí MJ, Valldeoriola F, Calopa M, Fernández M, Aguilar M, de Fabregas O, Hernández-Vara J, E. T. Age at onset in *LRRK2*-associated PD is modified by *SNCA* variants. *J Mol Neurosci* 2012(48):245-247.
  104. Wider C, Vilariño-Güell C, Heckman M, Jasinska-Myga B, Ortolaza-Soto A, Diehl N, Crook J, Cobb S, Bacon J, Aasly J, Gibson J, Lynch T, Uitti R, Wszolek Z, Farrer M, Ross O. *SNCA*, *MAPT*, and *GSK3B* in Parkinson disease: a gene-gene interaction study. *Eur J Neurol* 2010(18):876-881.
  105. Elia AE, Petrucci S, Fasano A, Guidi M, Valbonesi S, Bernardini L, Consoli F, Ferraris A, Albanese A, EM. V. Alpha-synuclein gene duplication: marked intrafamilial variability in two novel pedigrees. *Mov Disord* 2013(28):813-817.
  106. Angibaud S, Fertin G, Rusu I, Vialette S. A pseudo-boolean framework for computing rearrangement distances between genomes with duplicates. *J Comput Biol* 2007 May;14(4):379-393.
  107. Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizuno Y, N. H. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006(59):298-309.
  108. Gibb WR, AJ L, 1988. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988; 51:745-752.
  109. Malats N, Calafell F. Basic glossary on genetic epidemiology. *J Epidemiol Community Health* 2003;57:480-482.
  110. Calafell F, Malats N. Basic molecular genetics for epidemiologists. *J Epidemiol Community Health* 2003;57:398-400.



## **ANEXOS**

**ANEXO 1: Criterios Diagnósticos del Banco de Cerebros de la Asociación de  
Enfermedad de Parkinson del Reino Unido (108)**

## Diagnóstico de síndrome parkinsoniano

Se requieren la presencia de todos para el diagnóstico de enfermedad de Parkinson definida

1. Bradicinesia (lentitud del inicio de los movimientos voluntarios con reducción progresiva de la velocidad y amplitud de acciones repetitivas)
2. Y, al menos uno de los siguientes:
  - a) Rigidez muscular
  - b) Temblor de reposo de 46 Hz
  - c) Inestabilidad postural no causada por disfunción visual, vestibular, cerebelosa o propioceptiva

Criterios de exclusión de enfermedad de Parkinson

Se requieren la ausencia de todos para el diagnóstico de enfermedad de Parkinson definida

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. Historia de infartos cerebrales de repetición con progresión brusca de los rasgos parkinsonianos</li><li>2. Historia de traumatismos craneales de repetición</li><li>3. Historia de encefalitis diagnosticada</li><li>4. Crisis oculogiras</li><li>5. Tratamiento neuroléptico al inicio de los síntomas</li><li>6. Más de un familiar afectado</li><li>7. Remisión mantenida de los síntomas</li><li>8. Síntomas estrictamente unilaterales después de tres años de evolución</li><li>9. Parálisis supranuclear de la mirada</li><li>10. Signos cerebelosos</li><li>11. Afectación autonómica severa precoz</li><li>12. Demencia severa precoz con trastornos del lenguaje, memoria y praxias</li><li>13. Signo de Babinski</li><li>14. Presencia de tumores cerebrales o hidrocefalia comunicante en la tomografía</li></ol> | <ol style="list-style-type: none"><li>computada</li><li>15. Ausencia de respuesta a grandes dosis de levodopa (excluida la malabsorción)</li><li>16. Exposición a MPTP</li></ol> <p>Criterios predictivos positivos de enfermedad de Parkinson</p> <p>Se requieren tres o más para el diagnóstico de enfermedad de Parkinson definida</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Inicio unilateral</li><li>2. Temblor de reposo presente</li><li>3. Trastorno progresivo</li><li>4. Asimetría persistente, afectando más al lado inicial</li><li>5. Respuesta excelente a Levodopa</li><li>6. Corea severa inducida por Levodopa</li><li>7. Respuesta a la Ldopa durante cinco años o más</li><li>8. Curso clínico de 10 años o más</li></ol> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|



## **ANEXO 2: Cartas de Consentimiento Informado**



**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIURGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE NEUROGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**  
**Consentimiento para participar en la Investigación:**  
**“Análisis molecular en la enfermedad de Parkinson”**

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

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

**CONFIDENCIALIDAD**

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

**OBJETIVO DEL ESTUDIO**

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

**PROCEDIMIENTOS**

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

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

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

**BENEFICIOS PREVISTOS PARA LOS PACIENTES**

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

**OBLIGACIONES FINANCIERAS**

Su participación en este estudio no tiene costo alguno para usted, ni recibirá remuneración alguna por su participación

**ABANDONO DEL ESTUDIO**

Su muestra se almacenará y estudiará por tiempo indefinido, sin embargo, puede abandonar el estudio en el momento que lo desee, si lo solicita, su muestra será desechada aunque no se haya concluido su estudio.

**IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES**

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

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

Estoy de acuerdo en que se utilice ( )

No estoy de acuerdo en que se utilice ( )

Deseo conocer datos relevantes de mi muestra ( )

No deseo conocer datos relevantes de mi muestra ( )

**FIRMA DEL SUJETO DE INVESTIGACIÓN Y RESPONSABLE LEGAL**

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

NOMBRE DEL PACIENTE: \_\_\_\_\_ REG.: \_\_\_\_\_

FIRMA: \_\_\_\_\_ TELÉFONO \_\_\_\_\_

NOMBRE DEL RESPONSABLE LEGAL: \_\_\_\_\_

FIRMA: \_\_\_\_\_

Nombre y firma del 1er. Testigo \_\_\_\_\_

Nombre y firma del 2º testigo \_\_\_\_\_

**FIRMA DEL INVESTIGADOR**

Nombre del investigador que obtuvo el consentimiento: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre del investigador responsable del proyecto \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_



**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIURUGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE NEUROGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**  
**Consentimiento para participar en Investigación Genética**  
**de la enfermedad de Parkinson como control sano**

El departamento de Neurogenética y Biología Molecular dirigido por la Dra. Elisa Alonso, le invitan a participar en el protocolo de investigación “Estudio molecular de la enfermedad de Parkinson”.

Usted ha sido invitado (a) a participar en este estudio debido a que para poder realizarlo nos es indispensable contar con individuos **sin enfermedad de Parkinson**, como usted, y que nos permitan comparar los resultados obtenidos de los pacientes. Le pedimos que lea con detenimiento los rubros que a continuación presentamos.

**CONFIDENCIALIDAD**

Las personas que acepten participar en este estudio serán registradas por números con la finalidad de evitar su identificación. No se proporcionará información de usted a ninguna persona o institución que lo solicite sin su previo consentimiento por escrito.

**OBJETIVO DEL ESTUDIO**

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

**PROCEDIMIENTOS**

Para realizar esta investigación es necesario tomar una muestra de sangre periférica (20ml) para poder extraer el DNA (material hereditario), y en él poder estudiar los genes antes descritos. La muestra será tomada por personal capacitado y con material estéril. La sangre será tomada sólo con fines de investigación genética .

**BENEFICIOS PREVISTOS PARA LOS PARTICIPANTES**

Mediante este estudio no obtendrá beneficio económico y su condición de salud no se modificará como resultado de su participación en el.

**BENEFICIOS PREVISTOS PARA LA SOCIEDAD**

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

**OBLIGACIONES FINANCIERAS**

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

**ABANDONO DEL ESTUDIO**

Su participación en este estudio es **VOLUNTARIA**. Si decide participar, es libre de abandonar el estudio en cualquier momento.

**IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES**

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

Mi muestra podría servir para otras investigaciones genéticas de enfermedades neurológicas.  
Estoy de acuerdo en que se utilice ( )  
No estoy de acuerdo en que se utilice ( )  
Deseo conocer datos relevantes de mi muestra ( )  
No deseo conocer datos relevantes de mi muestra ( )

**FIRMA DEL SUJETO DE INVESTIGACIÓN Y RESPONSABLE LEGAL**  
**AL FIRMAR ESTA FORMA, ACEPTO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN LA**  
**INVESTIGACIÓN DESCRITA**

NOMBRE: \_\_\_\_\_

FIRMA: \_\_\_\_\_ TELÉFONO \_\_\_\_\_

NOMBRE DEL RESPONSABLE LEGAL: \_\_\_\_\_

FIRMA: \_\_\_\_\_

Nombre y firma del 1er. Testigo \_\_\_\_\_

Nombre y firma del 2º testigo \_\_\_\_\_

**FIRMA DEL INVESTIGADOR**

Nombre del investigador que obtuvo el consentimiento: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre del investigador responsable del proyecto \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

***ANEXO 3*** Hoja de recolección de información de Pacientes de EP.

PROTOCOLO DE AGREGACIÓN FAMILIAR DE ENFERMEDAD DE PARKINSON							
NOMBRE				REGISTRO		FECHA	
F Y LUG. NAC				EDAD		GÉNERO M F	
ORIGEN PADRES				GRUPO Y RH			
MUESTRA #				CONSENTIMIENTO INFORMADO			
REVISOR NEURO				REVISOR GENÉTICA			
SIGNO	(+)	(-)	ESPECIFICAR	SIGNO	(+)	(-)	ESPECIFICAR
APNP				PIRAMIDAL			
Tabaco				Hiperraflexia			
Alcohol				Babinski uni			
Drogas				Babinski bil			
Ocupación				Espasticidad			
Oc previa				Cuadriparesia			
Expo lab				Paraparesia			
Expo amb				Monoparesia			
				Clonus			
APP				Cerebelo			
Traumáticos				Med. espinal			
Quirúrgicos				N Motora inf			
Neoplásicos				N craneales			
Otros				N Periféricos			
				Visual			
PA				Distonía			
Forma de inicio				Corea			
Edad de inicio				Balismo			
Progresión				Funciones mentales			
Escala H-Y				Demencia			
Tratamiento(s)				Inatención			
Extrapiramidal				Alt Memoria			
Rigidez				Otros			
Temblor							
Bradicinesia							
Hipomimia Facial							
Mioclónías							

Árbol Genealógico	
IRM	
Otros estudios	
Estudios Moleculares	
<i>PARKINA</i>	N-acetil transferasa
<i>Parkina 2</i> S/A167	590 G>A
V/L380	282 C>T
<i>APO E</i>	481 C>T
<i>CYP2D6</i>	341 T>C
<i>LRRK2</i>	803 A>G
<i>PINK1</i>	
<i>SNCA</i>	
rs2736990	Duplicación
rs7684318	Triplicación
rs17016074	A53T
rs356219	A30P
rs356220	E46K
rs2619364	
rs2619363	



***ANEXO 4: Glosario de términos y abreviaturas***

## **Glosario de términos**

**Herencia:** Patrón que sigue la transmisión de un fenotipo o característica física, biológica o bioquímica (generalmente una enfermedad) de una generación a otra. (109)

**Herencia multifactorial (compleja):** Fenotipo resultante de la interacción de múltiples genes localizados en diferentes *loci* y factores ambientales.

**Herencia Autosómica Dominante:** Tipo de herencia en la que una copia de un gen anormal es suficiente para causar la enfermedad. El riesgo de heredarse para cada hijo de un afectado es del 50%. (109)

**Agregación familiar:** Tendencia de una enfermedad a agruparse en familias, generalmente tomada como evidencia de la existencia de un mecanismo etiológico genético o factores ambientales comunes a los miembros de la familia, o una combinación de ambos.<sup>70</sup>

**Herencia Autosómica Recesiva:** Tipo de herencia en la que ambas copias de un gen deben presentar alteraciones o mutaciones para manifestar la enfermedad. El riesgo de presentar la enfermedad en cada hijo de una pareja portadora es del 25%. (109)

**Gen:** Segmento de DNA que contiene los elementos necesarios para ser traducido a RNA y/o proteína; presenta una secuencia y función específica (107, 108)

**Mutación:** Cambio en la secuencia de DNA, resultado de un error en la reparación o duplicación del DNA, que ocasiona enfermedad. (110)

**Polimorfismo:** Variantes del genoma, dentro o fuera de un gen, que presenta formas alternativas no causantes directas de enfermedad, que se presentan en una población sana en por lo menos el 1% de los sujetos.

**Microsatélite (VNTR; STR):** Segmento de DNA que consiste en la repetición de 5 – 50 veces un motivo de 1 a 6 pb, generalmente muy variable entre poblaciones e individuos.(107)

**Polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP):** Variación en una secuencia de DNA por una sola base nitrogenada, generalmente silente (que no ocasiona cambio de aminoácido en la proteína) y que representa una forma alternativa de un gen.(109, 110)

**Locus (plural loci):** Segmento de DNA que presenta una localización precisa en una región cromosómica determinada.(109)

**Alelo:** Forma alternativa de un gen; cada una de las diferentes formas de un gen particular que varían una de otra por la presencia de polimorfismos o mutaciones. Cada ser humano presenta dos alelos de cada gen, cada uno localizado en un cromosoma homólogo.(109, 110)

**Heterogeneidad genética:** Proceso mediante el cuál un fenotipo puede ser ocasionado por diferentes *loci*. Una misma enfermedad puede ser causada por herencia monogénica, herencia multifactorial, alteraciones cromosómicas o factores ambientales aislados.(110)

**Genotipo:** Constitución genética de un organismo, que es modulada por el ambiente antes de ser expresada como fenotipo.(110)

**Equilibrio de Hardy-Weinberg:** Estado en el que las frecuencias de alelos y el genotipo no cambia de una generación a la siguiente en una población. Se requiere apareamiento al azar y la ausencia selección, mutación, migración y deriva genética.(28)(94)

### ***ANEXO 5: Productividad científica y divulgación***

1. Dávila-Ortiz de Montellano D, Alonso M, Monroy N, Rodríguez-Violante M, López-López M, Yescas P. Detección de mutaciones puntuales en el gen de alfa-sinucleína en pacientes mexicanos con enfermedad de Parkinson y herencia autosómica dominante. Arch Neurocién Mex. 2012; **17**(Supl-II): 17-21.
2. Dávila-Ortiz de Montellano D, Yescas P, Monroy N, Rodríguez-Violante M, Alonso M. Participación en la XXVII Reunión anual de Investigación. “Detección de mutaciones puntuales en *SNCA* en pacientes mexicanos con enfermedad de Parkinson de herencia autosómica dominante”. Presentación Oral. Mayo 2012.
3. Dávila-Ortiz de Montellano D, Yescas P, Monroy N, Rodríguez-Violante M, Alonso M. Participación en la XXVII Reunión anual de Investigación, “Determinación de polimorfismos de riesgo en el gen *SNCA* y factores ambientales en pacientes mexicanos con enfermedad de Parkinson”. Presentación en modalidad Oral. Mayo 2013
4. Dávila-Ortiz de Montellano D, Yescas P, Rodríguez-Violante M, Lozano-Romero A, Monroy-Jaramillo N, López-López M, Alonso-Vilatela M. III Congreso Latinoamericano de Genética Humana (RELAGH); XXXVIII Congreso Nacional de Genética Humana (AMGH) “Determinación de polimorfismos de riesgo en el gen *SNCA* y factores ambientales en pacientes mexicanos con enfermedad de Parkinson”. Presentación en modalidad cartel. Noviembre 2013
5. David J Dávila-Ortiz de Montellano, Petra Yescas-Gómez, Mayela Rodríguez-Violante, Ana Fresán, Nancy Monroy-Jaramillo, Elisa Alonso-Vilatela. SNPs of the *SNCA* gene are associated with sporadic Parkinson’s disease in Mexican Mestizos. EN PROCESO DE PUBLICACIÓN

## Detección de mutaciones puntuales en el gen de alfa-sinucleína en pacientes mexicanos con enfermedad de Parkinson y herencia autosómica dominante

David José Dávila-Ortiz de Montellano<sup>1</sup>, Ma. Elisa Alonso-Vilatela<sup>1</sup>, Nancy Monroy-Jaramillo<sup>1</sup>, Mayela Rodríguez-Violante<sup>2</sup>, Marisol López-López<sup>1</sup>, Petra Yescas-Gómez<sup>1</sup>

### RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes en el adulto. En México se ha estimado una incidencia de 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes/año, en el mundo afecta entre 4.1 a 4.6 millones de personas mayores de 50 años. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía es la cuarta causa de consulta anual. La etiología de la EP es esporádica en su gran mayoría. Sólo 10 % de los casos corresponden a formas hereditarias autosómicas dominantes o recesivas. El primer gen clonado causante de EP hereditaria autosómica dominante fue alfa-sinucleína (SNCA) en 1995, localizado en el *locus PARK1* en el cromosoma 4q21 donde se han encontrado sólo 3 mutaciones puntuales, se considera una causa rara de EP familiar. *Objetivo:* determinar frecuencia de mutaciones puntuales en el gen SNCA en pacientes mexicanos con EP dominante (EPAD). *Material y métodos:* se realizó un estudio transversal en 85 pacientes con EP dominante sin mutaciones en *LRRK2*, mediante análisis de RFLP's, en busca de mutaciones p.A53T, p.A30P y p. E46K en el gen de SNCA. *Resultados y conclusiones:* no se encontraron mutaciones A53T, A30P y E46K en el gen SNCA en 86 pacientes analizados, lo que puede indicar que son una causa muy rara de EP dominante también en la población mexicana. Para descartar la participación SNCA será necesario buscar duplicaciones y triplicaciones; así como, la secuenciación completa del gen.

**Palabras clave:** enfermedad de Parkinson, SNCA

p.A53T, p.A30P y p.E46K.

### DETECTION OF MUTATIONS IN THE ALPHA-SYNUCLEIN GENE IN MEXICAN PATIENTS WITH AUTOSOMAL DOMINANT PARKINSON'S DISEASE

### ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative diseases in adults. In Mexico has estimated an incidence of 40 to 50 cases per 100,000 inhabitants / year and in the world affects between 4.1 to 4.6 million people over 50 years. At the National Institute of Neurology and Neurosurgery is the fourth annual consultation cause The etiology of sporadic PD is unknown, has been estimated a heritability of 34% to 40%. Only 10% of cases are hereditary forms. The first cloned gene cause autosomal dominant hereditary PD was alpha - synuclein (SNCA) in 1995, previously located in the *locus PARK1* (3 mutations) on chromosome 4q21, although considered a rare cause of familial PD. *Objective:* to determine the frequency of mutations in the SNCA gene in Mexican patients with a family history suggestive

<sup>1</sup>Departamento de Neurogenética y Biología Molecular, <sup>2</sup>Clinica de Movimientos Anormales. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Correspondencia: Petra Yescas Gómez. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Insurgentes Sur # 3877. Col. La Fama. 14269 México, D.F. E.mail: yescasp@gmail.com



of autosomal dominant of PD (ADPD). *Material and methods:* a cross-sectional study in 85 EPAD patients without mutations in LRRK2, by analysis of RFLP's, looking for mutations A53T, A30P and E46K of SNCA. *Results and conclusions:* we found no mutations p.A53T, p.A30P and p.E46K in SNCA gene in 86 patients analyzed, which may indicate that they are a very rare cause of EPAD in the Mexican population. To rule out the involvement to SNCA it will be necessary look for duplications and triplications, and the complete sequencing of the gene.

**Key words:** Parkinson's disease, SNCA p.A53T, p.A30P and p.E46K

La enfermedad de Parkinson (EP; OMIM #168600; CIE 10: G20) es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes de inicio en el adulto<sup>1</sup>. Constituye la segunda enfermedad neurodegenerativa en frecuencia<sup>2</sup>, se ha estimado que su incidencia en sujetos mayores de 60 años es de 13.4 por 100,000 habitantes/año en Estados Unidos de Norteamérica<sup>1</sup>. La prevalencia de la EP en la población general es considerada del 0.3% y cerca del 2% en personas mayores de 60 años<sup>1</sup>, aunque varía notablemente entre distintos grupos étnicos y regiones geográficas<sup>3</sup>.

Se ha calculado que en el mundo afecta en la actualidad entre 4.1 a 4.6 millones de personas mayores de 50 años<sup>1,4,5</sup>. En México la prevalencia de la EP se desconoce; sin embargo, se ha estimado una incidencia de entre 40 a 50 casos por cada habitante/año. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, es la cuarta causa de consulta, se considera que a nivel nacional pudiera afectar por lo menos a 140,000 personas<sup>4,6</sup>.

La EP es un cuadro clínico caracterizado por presencia de la triada clásica de temblor, rigidez y bradicinesia. El inicio es lento y asimétrico, por lo general de inicio en la edad adulta, después de la sexta década de la vida. Su progresión es inexorable, con respuesta sostenida a dopaminomiméticos. La presencia de los cuerpos de Lewy son un hallazgo neuropatológico frecuente en la zona compacta de la sustancia negra, donde predomina la pérdida neuronal, en especial a nivel ventrolateral, lo que lleva a la disminución de dopamina en el núcleo estriado con un gradiente rostrocaudal<sup>7</sup>.

En la actualidad el diagnóstico clínico de la EP se establece tomando como síntomas cardinales la bradicinesia, inestabilidad postural y rigidez<sup>8</sup>, mediante los Criterios Diagnósticos del Banco de Cerebros de la Asociación de Enfermedad de Parkinson del Reino

Unido ( *UK Parkinson's Disease Society Brain Banc Clinical Diagnostic Criteria*)<sup>9</sup>, que tienen una sensibilidad general del 82% y hasta 91.1% de sensibilidad, con un valor predictivo positivo de 98.6% entre neurólogos especializados en movimientos anormales<sup>7,10,11</sup>.

Por lo general, los individuos que inician con la EP antes de los 20 años de edad, son considerados de inicio juvenil, con inicio de la sintomatología antes de los 50 años son considerados de inicio temprano y los que inician posterior a los 50 años son considerados de inicio tardío<sup>12</sup>.

Aunque se han identificado diferentes factores de riesgo en la etiología de la EP esporádica (EPE), ninguno de ellos ha sido identificado como factor causal<sup>3,13</sup>.

La importancia de los factores hereditarios fue sospechada desde el siglo pasado, propiciando estudios en gemelos y de adopción con el objetivo de conocer su heredabilidad (o porción del fenotipo que se debe a los factores genéticos)<sup>6</sup> estimándose entre el 34 y 40%<sup>14</sup>.

Mediante estudios de agregación familiar, se ha observado que la incidencia acumulada de la EP es significativamente mayor entre los familiares de pacientes con EP en comparación con familiares de controles (2.0 vs 0.7%) con un riesgo relativo de 3.4 (IC 95% 1.9-5.9 p=0.001), el grado de agregación familiar es mayor entre los familiares en primer grado en poblaciones hispanas en comparación con controles (3.7 vs 0.4%; RR=8.5; IC95% 1.0-68.9). Los individuos con familiares en primer grado con EP tienen entre 1.5 y 9.5 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad (OR 6.08 IC 95% 2.35-15.69)<sup>13,15</sup>.

En un estudio realizado en el Instituto se encontró que alrededor del 23% de los pacientes mexicanos con EP evaluados presentaban historia familiar y hasta un 4% el antecedente de temblor esencial<sup>16</sup>.

Las nuevas tecnologías en biología molecular en el caso de la EP han sido excepcionalmente productivas en el estudio de esta enfermedad, permitiendo identificar varios genes relacionados con las formas familiares de esta; sin embargo, sólo abarca una pequeña proporción (10%), ya que más del 90% de los casos son de tipo esporádico<sup>3,17</sup>, la evidencia apunta hacia un modelo etiológico multifactorial, donde la enfermedad resulta de la interacción de factores ambientales que actúan sobre la susceptibilidad genética del individuo<sup>3,13</sup>.

Entre el 6.8 y 16% de los pacientes con EP tienen historia familiar positiva, y algunos de esos casos, son resultados de mutaciones en un gen específico<sup>7</sup>. En general, los pacientes que presentan EP con patrón de herencia autosómica recesiva (EPAR) muestran inicio juvenil o temprano, y aquellos que presentan herencia



dominante (EPAD) no muestran algún otro dato clínico específico que ayude a distinguir los casos de EPE.

Mediante estudios de asociación genómica y ligamiento se han identificado 10 *loci* relacionados con la EP; sin embargo, la participación de cada uno de éstos en la etiología de la EP es controversial en la mayoría de los casos<sup>3</sup>. De estos, 10 *loci* presentan un mecanismo de herencia consistente con transmisión monogénica o mendeliana y dentro de ellos se han identificados 8 genes causantes de la EPAR y EPAD (cuadro 1)<sup>12</sup>.

**Cuadro 1.** Formas monogénicas de la EP<sup>12</sup>.

Nombre del <i>locus</i>	Gen	<i>Locus</i>
Formas autosómicas dominantes		
PARK1/PARK4	SNCA	4q21
PARK3	---	2p1
PARK5	UCHL1	4p14
PARK8	LRRK2	12q12
Formas autosómicas recesivas		
PARK2	PARK2	6q25.2-q27
PARK6	PINK1	1p36
PARK7	DJ-1	1p36
PARK9	ATP13A2	1p36
PARK14	PLA2G6	22q13.1

El gen con más frecuencia implicado en la EPAD es *LRRK2*, alterado en el 5 al 6% de los casos y de 1 a 2% de los casos de EPE; sin embargo, en un estudio realizado en el Instituto, se encontró con una frecuencia mucho menor, implicando que la etiología de la EPAD en nuestra población puede ser distinta a lo reportado<sup>18</sup>.

El primer gen causante de EPAD fue la alfa-sinucleína (*SNCA*) en 1995, previamente localizado en los *loci* *PARK1* y *PARK4* en el cromosoma 4q21<sup>19,20</sup>, en familias italianas, alemanas y griegas. Hasta el momento sólo se han identificado 3 mutaciones puntuales en estas familias (p. A53T, p. A30P y p. E46K); así como, multiplicaciones (duplicaciones y triplicaciones) del gen<sup>21-23</sup>, estas últimas en casos raros de EPAD y EPE.

Los sujetos con mutación en el gen *SNCA* presentan EPAD de inicio típicamente entre los 35 y 45 años de edad, con progresión relativamente rápida, evolución a demencia y cuerpos de Lewy en la sustancia negra<sup>21,24</sup>.

Aunque las mutaciones (puntuales y multiplicaciones) en el gen *SNCA* se consideran raras<sup>25,26</sup>, casi

exclusivamente en familias italianas, griegas y alemanas, con EPAD y en algunos casos de EPE, su identificación<sup>27-29</sup> llevaron a la identificación de la proteína alfa-sinucleína como el principal componente de los cuerpos de Lewy<sup>29-31</sup>.

El gen *SNCA* es miembro de la familia de las sinucleínas<sup>20</sup>, está compuesto por 6 exones y codifica para la proteína alfa-sinucleína, de 140 aminoácidos que es ampliamente expresada en el sistema nervioso central (SNC) y en menor medida en el resto del cuerpo, excepto en el hígado<sup>24</sup>. Está caracterizada por 6 repetidos imperfectos de secuencias consenso KTEGV en el extremo N-terminal, una región no amiloide central y una región carboxilo terminal ácida<sup>20</sup>.

Se encuentra localizada principalmente en la región sináptica, presenta 3 isoformas y su función exacta es desconocida, aunque se sabe que, se relaciona con el tráfico de vesículas en el área presináptica mediante uniones no covalentes de las secuencias consenso KTEGV con proteínas integrales de membrana presinápticas para guiar la liberación de la dopamina a la hendidura sináptica<sup>32,33</sup>. Asimismo, se ha inferido que induce la fibrilación de la proteína tau asociada a microtúbulos *in vitro* y reduce la respuesta neuronal a varios estímulos apoptóticos al disminuir la actividad de la Caspasa 3<sup>33,34</sup>. Se conoce que las formas alteradas (mutantes y polimórficas) de alfa-sinucleína ocasionan un desequilibrio en su transcripción, resultando en la polimerización aberrante de fibrillas, evento común en las sinucleinopatías<sup>32</sup>.

## OBJETIVO

Determinar la presencia de las mutaciones puntuales reportadas en *SNCA* (p. A53T, p. E46K y p. A30P) en el gen *SNCA* en una muestra de pacientes mexicanos con EP, con antecedentes sugestivos de herencia autosómica dominante.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron de manera secuencial no aleatorizada 86 muestras de pacientes con EPAD, en que previamente se había descartado mutación en puntos calientes del gen de *LRRK2*, cuyo diagnóstico fue realizado por neurólogo experto en movimientos anormales de acuerdo a los criterios del Banco de Cerebros de la UK Parkinson Disease Society modificados. Este estudio fue aprobado por el Comité de Investigación de Instituto y participantes aceptaron bajo consentimiento informado participar en la línea de investigación Estudio Molecular de la Enfermedad de Parkinson del Departamento de Neurogenética y Biología Molecular del

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Las variables demográficas de interés fueron obtenidas de la base de datos del banco de DNA de la línea de investigación, entrevista directa con el paciente y expediente clínico.

Las mutaciones puntuales fueron genotípicas por polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's) mediante PCR de punto final de los exones 2 y 3 de *SNCA*, donde se localizan las mutaciones puntuales conocidas hasta la fecha, se realizó digestión de los productos de PCR con las enzimas Tsp45I para identificar la mutación p.A53T, StyI para la mutación p.E46K y MvaI para la mutación A30P localizadas en los exones 2 y 3 de *SNCA*<sup>20,27,35</sup>.

El estudio se realizó en 86 pacientes con EPAD y las variables de interés sociodemográficas obtenidas se presentan en el cuadro 2 de acuerdo al género y grupo por edad. Ninguna de las variables analizadas mostraron diferencias entre los grupos analizados.

**Cuadro 2:** Resultados análisis de características sociodemográficas en casos de EPAD.

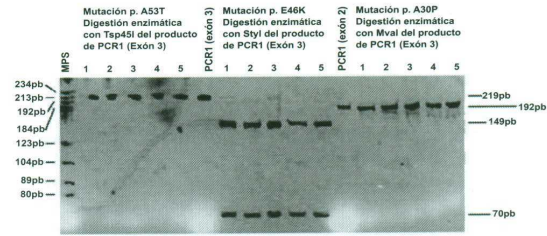
Tipo de Inicio	Género	Edad de Inicio*	Edad Actual*	Años de evolución*
Juvenil	Masculino	0 (0%)	NA	NA
	Femenino	2 (2.3%)	13.50	25.98
Temprano	Masculino	22 (25.6%)	39.00	47.75
	Femenino	12 (14.0%)	36.92	50.35
	Total	34 (39.5%)	38.26	48.66
Tardío	Masculino	29 (33.7%)	59.69	70.79
	Femenino	21 (24.4%)	60.33	73.03
	Total	50 (58.1%)	59.96	71.73
Total		86 (100%)	50.3	61.55

\*Media; NA: No aplica.

En la figura 1, se observan los resultados de la digestión enzimática de los productos de PCR de exones 3 (PCR 1 219pb) y 2 (PCR 2 192pb) para identificación de mutaciones empleando las enzimas de restricción Tsp45I para la mutación p.A53T, StyI para la mutación p. E46K y MvaI para la mutación A30P.

En ninguno de los 86 pacientes analizados se encontraron mutaciones puntuales conocidas en el gen de *SNCA* (p. A53T, p. E46K y p. A30P).

Este es el primer estudio que busca mutaciones puntuales conocidas en el gen *SNCA* en población mexicana. Nuestros resultados sugieren que las mutaciones puntuales conocidas en el gen *SNCA* son una causa rara de EPAD en la población mexicana, similar a lo reportado en otras poblaciones como la china y poblaciones caucásicas (norteamericanas<sup>26,36-38</sup> e inglesas<sup>26,36-38</sup>, contrario a lo reportado en familias italianas, griegas y alemanas en donde se han reportado estas mutaciones<sup>27,28,35</sup>.



**Figura 1.** Se muestra un gel de poliacrilamida al 6% donde se observan los distintos patrones de restricción enzimática de los productos de PCR de los exones 2 (192pb) y 3 (219pb) del gen *SNCA*. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (MPM) de DNA Roche-Applied Science V (pBR322 DNA digerido con HaeIII 85-587 pb). En los primeros carriles 1-5 se observa el producto de digestión enzimática del exón 3 (carril PCR1 de 219pb) en búsqueda de la mutación p.A53T (G/A), nótese que ningún producto muestra digestión (91pb/128pb), lo que denota ausencia de la mutación. En el segundo grupo de carriles 1-5 se observa el mismo producto de PCR del exón 3 (PCR 1), mostrando presencia de un fragmento de 149 pb y otro de 70 pb la presencia de digestión en lugar de la banda de 219 pb denota la ausencia de la mutación E46K (G/A), en el tercer grupo de carriles 1-5 se muestra el producto de PCR del exón 2 (carril PCR 2 exón 2) de 192pb, que no muestra restricción enzimática, lo que indica que la mutación A30P (C/G) no se encuentra presente (58 pb/134 pb).

Sin embargo, para descartar por completo la participación directa del gen *SNCA* en la patogénesis de la EPAD será necesario buscar duplicaciones y triplicaciones del gen, también consideradas causas raras de la EPAD y EPE, así como secuenciación completa del gen para identificar, no sólo nuevas mutaciones sino también identificar polimorfismos de riesgo de este gen y de esta manera conocer mejor su participación en la fisiopatología de la EP en nuestra población.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizada gracias al apoyo económico de CONACyT (SALUD-2010-01-140190).

## REFERENCIAS

1. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención, México: Secretaría de Salud, 2010. Disponible en [www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html](http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html).
2. Gasser T. Genetics of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 2005;363-9.
3. Benmoyal-Segal L, Soreq H. Gene-environment interactions in sporadic Parkinson's disease. *J Neurochem* 2006;97:1740-55.
4. Comunicado 148: enfermedad de Parkinson, padecimiento discapacitante. Dirección General de Comunicación Social Secretaría de Salud (SALUD) 2010.
5. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) Censo de Población y Vivienda 2010.
6. Ramírez-Jairo LJ, Ruíz-Sandoval JL, Jiménez-Gil FJ, Vargas-



- Frutos E, Gallegos-Arreola M. Polimorfismo - 116 C-G del gen alfa sinucleína en pacientes con enfermedad de Parkinson. *Sal Públ Méx* 2006;48:289-90.
7. Mouradian M. Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurol* 2002;58:179-85.
  8. Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:123-44.
  9. Tolosa E, Wenning G, W P. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006;5:75-86.
  10. Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, AJ. L. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* 2002;125:861-70.
  11. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Stewur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197-211.
  12. Pankratz ND, Wojcieszek J. Last Revision: July 9 2009. Parkinson Disease Overview In Gene Reviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2011. Aviable at <http://www.genetests.org>. Accessed January 2011.
  13. Taylor CA, Saint-Hilaire MH, Cupples LA. Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: a New England-based case control study. *Am J Med Genet* 1999;88:742-9.
  14. Shino MY, McGuire V, Van Den Eeden SK, et al. Familial aggregation of Parkinson's disease in a multiethnic community-based case-control study. *Mov Disord* 2010;25:2587-94.
  15. Marder K, Levy G, Louis ED. Familial aggregation of early- and late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;54:507-13.
  16. Alonso ME, Otero E, D'Regules R, HH. F. Parkinson's disease: a genetic study. *Can J Neurol Sci* 1986 13:248-51.
  17. Morris H. Autosomal dominant Parkinson's disease and the route of new therapeutics. *Expert Rev Neurotherapeutics* 2007;7:649-56.
  18. Yescas P, López M, Monroy N. Low frequency of common LRRK2 mutations in Mexican patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2010;485:79-82.
  19. Gasser T. Mendelian forms of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:587-96.
  20. Spillantini M, Divane A, Goedert M. Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics* 1995;27:319-81.
  21. Gasser B, Sauer M, Maurer M, Stadlmayr G, Mattanovich D. Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:6499-507.
  22. Ibáñez P, Lesage S, Janin S. Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms. *Arch Neurol* 2009;66:102-8.
  23. Theuns J, Van Broeckhoven C. alpha-Synuclein gene duplications in sporadic Parkinson disease. *Neurol* 2008;70:7-9.
  24. Sulzer D. Clues to how alpha-synuclein damages neurons in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2010;25:s27-s31.
  25. Lin JJ, Yueh KC, Chang DC, Lin SZ. Absence of G209A and G88C mutations in the alpha-synuclein gene of Parkinson's disease in a Chinese population. *Eur Neurol* 1999;42:217-20.
  26. Vaughan JR, Farrer MJ, Wszolek ZK. Sequencing of the alpha-synuclein gene in a large series of cases of familial Parkinson's disease fails to reveal any further mutations. The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease (GSPD). *Hum Mol Genet* 1998;7:751-3.
  27. Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004;55:164-73.
  28. Polymeropoulos M, Lavedan C, Leroy E. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276:2045-7.
  29. Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek Z. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* 1998;18: 262-5.
  30. Winkler S, Hagenah J, Lincoln S. alpha-Synuclein and Parkinson disease susceptibility. *Neurol* 2007;69:1745-50.
  31. Covy J, Giasson B. alpha-Synuclein, leucine-rich repeat kinase-2, and manganese in the pathogenesis of parkinson disease. *Neurotoxicol* 2011;32:622-9.
  32. Fortin DL, Nemani VM, Nakamura K, Edwards R. The behavior of alpha-synuclein in neurons. *Mov Disord* 2010;25:s21-s26.
  33. Ahn BH, Rhim H, Kim SY. Alpha-synuclein interacts with phospholipase D isozymes and inhibits pervanadate-induced phospholipase D activation in human embryonic kidney-293 cells. *J Biol Chem* 2002;277:12334-42.
  34. Gene Ontology Annotation (UniProtKB-GOA) Database. <http://www.ebi.ac.uk/GOA/>.
  35. Krüger R, Kuhn W, Müller T. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998;18:106-8.
  36. Farrer M, Wavrant-De Vrieze F, Crook R. Low frequency of alpha-synuclein mutations in familial Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998;43:394-7.
  37. Parsian A, Racette B, Zhang ZH. Mutation, sequence analysis, and association studies of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Neurol* 1998;51:1757-9.
  38. Lin JJ, Yueh KC, Chang DC, SZ L. Absence of G209A and G88C mutations in the alpha-synuclein gene of Parkinson's disease in a Chinese population. *Eur Neurol* 1999;42:217-20.



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ



Otorga la presente

# CONSTANCIA

A:

*David José Dávila Ortiz de Montellano, Petra Yescas Gómez, Nancy Monroy Jaramillo,  
Mayela Rodríguez Violante, y Ma. Elisa Alonso Vilatela*

Por su participación en la XXVII Reunión Anual de Investigación, llevada a cabo en la  
Ciudad de México durante los días 17 y 18 de mayo de 2012, con el trabajo:

*DETECCIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES EN EL GEN DE ALFA-SINUCLLEINA EN  
PACIENTES MEXICANOS CON ENFERMEDAD DE PARKINSON DE HERENCIA  
AUTOSÓMICA DOMINANTE*

México D.F., a 17 de mayo de 2012.

  
**DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ**  
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN

  
**S.E. MARTHA EVELIA LEGORRETA HERNÁNDEZ**  
COORDINADORA GENERAL



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ

Otorga la presente

**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



# CONSTANCIA

A:

*David José Dávila Ortiz de Montellano, Petra Yescas Gómez, Mayela Rodríguez  
Violante, Allan Lozano Romero, Nancy Monroy Jaramillo, Marisol López López, y  
María Elisa Alonso Vilatela*

Por su participación en la XXVIII Reunión Anual de Investigación, llevada a cabo en la  
Ciudad de México durante los días 23 y 24 de mayo de 2013, con el trabajo:

*DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS DE RIESGO EN EL GEN SNCA Y FACTORES  
AMBIENTALES EN PACIENTES MEXICANOS CON ENFERMEDAD DE PARKINSON*

México D.F., a 23 de mayo de 2013.

**DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ**  
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN

**S.E. MARTHA EVELIA EGORRETA HERNÁNDEZ**  
COORDINADORA GENERAL





**III CONGRESO  
LATINOAMERICANO  
DE GENÉTICA  
HUMANA (RELAGH)**



**XXXVIII CONGRESO  
NACIONAL DE  
GENÉTICA  
HUMANA (AMGH)**

LA RED LATINOAMERICANA DE GENÉTICA HUMANA Y  
LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE GENÉTICA HUMANA  
OTORGAN EL PRESENTE

## **RECONOCIMIENTO**

A: DAVID JOSE DÁVILA ORTIZ DE MONTELLANO, PETRA YESCAS GOMEZ, MAYELA RODRIGUEZ VIOLANTE, ALLAN LOZANO ROMERO, NANCY MONROY JARAMILLO, MARISOL LOPEZ LOPEZ Y MARIA ELISA ALONSO VILATELA

Por el trabajo: DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS DE RIESGO EN EL GEN SNCA Y FACTORES AMBIENTALES EN PACIENTES MEXICANOS CON ENFERMEDAD DE PARKINSON

por su participación con el trabajo libre en Modalidad CARTEL presentado durante el III Congreso Latinoamericano de Genética Humana y XXXVIII Congreso Nacional de Genética Humana

DR. LUIS EDUARDO FIGUEROA V.  
PRESIDENTE AMGH

DR. AUGUSTO ROJÁS MARTÍNEZ  
PRESIDENTE RELAGH

**RIVIERA MAYA, MÉXICO 2013**

SNPs of the *SNCA* gene are associated with sporadic Parkinson's disease in Mexican Mestizos.

David J Dávila-Ortiz de Montellano, MD(1), Petra Yescas-Gómez, PHD(1), Mayela Rodríguez-Violante, MD(2), Ana Fresán PhD (3), Nancy Monroy-Jaramillo, PHD(1) and Elisa Alonso-Vilatela,MD(1).

(1)Department of Genetics and Molecular Biology, National Institute of Neurology and Neurosurgery "Manuel Velasco Suárez", Mexico City, Mexico; (2) Abnormal Movements Clinic, National Institute of Neurology and Neurosurgery "Manuel Velasco Suárez", Mexico City, Mexico; (3) Clinical Research Division, National Institute of Psychiatry "Ramon de la Fuente Muñiz", Mexico City, Mexico.

#### Abstract

Sporadic Parkinson's disease is a neurodegenerative disease that occurs in up to 3% of adults over 75 years old. It affects between 4.1 to 4.6 million people worldwide. The incidence in Mexico is estimated in 40-50 cases per 100,000 inhabitants / year. At the National Institute of Neurology and Neurosurgery (Mexico) represents the fourth leading cause of healthcare. Parkinson's disease is considered a complex condition with a heritability of 34-40%. The first identified gene linked to Parkinson's disease was  $\alpha$  - synuclein (*SNCA*), although its mutations are a rare cause of inherited Parkinson's disease, its single nucleotide polymorphisms have been implicated as risk factors for developing this condition. We analyzed 171 patients clinically diagnosed with Parkinson's disease and 171 Mexican mestizo controls paired by age and gender, using qPCR assay for allele discrimination of SNPs rs356219, rs356220, rs356203 and rs2736990. The SNPs rs356220, rs356203 and rs2736990 seem to be associated to sporadic Parkinson's disease in our population. The present study is a good start for future aiming to determine effective biomarkers of SPD in Mexican mestizo population that may assist the diagnosis, treatment and prognosis of this worldwide growing disease

Keywords: *SNCA*, Parkinson's Disease, rs356219, rs356220, rs356203 and rs2736990.