



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

**ALTERACIONES EN EL GEN DE ALFA SINUCLEÍNA (SNCA) ASOCIADAS  
A LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.**

***TESIS***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**HERNANDEZ AVILA MARISOL**

**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2015**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Marisol López López

**VOCAL:** Francisco Javier Plasencia de la Parra

**SECRETARIO:** Nancy Monroy Jaramillo

**1er. SUPLENTE:** Samuel Canizales Quinteros

**2º SUPLENTE:** Martha Patricia Coello Coutiño

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

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

**ASESOR DEL TEMA:**

Dra. en C. Nancy Monroy Jaramillo

**SUSTENTANTE:**

Marisol Hernández Avila

## Tabla de contenido

Resumen.....	1
1.0 Introducción.....	3
1.1.0 Antecedentes.....	3
1.1.1 Definición.....	3
1.1.2 Clasificación de la enfermedad de Parkinson.....	5
1.1.3 Epidemiología enfermedad de Parkinson.....	5
1.1.4 Diagnóstico de la enfermedad de Parkinson.....	6
1.1.5 Tratamiento de enfermedad de Parkinson.....	7
1.1.6 Deterioro cognoscitivo leve en la enfermedad de Parkinson .....	8
1.1.7 Deterioro cognoscitivo mayor en la enfermedad de Parkinson.....	11
1.1.8 Genética de la enfermedad de Parkinson.....	14
1.1.9 <i>PARK1/PARK4</i> ( $\alpha$ -sinucleína).....	15
1.1.9.1 Mutaciones en <i>SNCA</i> .....	18
1.1.9.2 Alteraciones en la dosis génica de <i>SNCA</i> .....	20
1.1.9.3 Polimorfismos como de riesgo para el desarrollo de Enfermedad de Parkinson... ..	21
1.1.9.4 <i>SNCA</i> y deterioro de la cognición en la enfermedad de Parkinson.....	24
1.1.10 Otros genes asociados al deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson .....	25
1.2.0 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.....	27
1.2.1 Amplificación de sondas dependientes de ligando .....	28
2.0 Planteamiento del problema.....	31
3.0 Justificación del problema.....	32
4.0 Hipótesis.....	33
5.0 Objetivos.....	34
5.1 Objetivo secundarios.....	34
6.0 Sujetos y Métodos.....	35
6.1 Pacientes.....	35
6.1.1 Criterios de inclusión para pacientes .....	35

6.1.2 Criterios de inclusión para controles.....	35
6.1.3 Criterios de exclusión para pacientes.....	36
6.1.4 Criterios de exclusión para controles.....	36
6.2 Características de los pacientes.....	36
6.3 Tipos de muestra .....	37
6.3.1 Extracción de DNA genómico.....	37
6.4 Cuantificación de DNA.....	38
6.5.0 Genotipificación de tres mutaciones puntuales de <i>SNCA</i> .....	38
6.5.1 Mutación <i>p.A30P</i> .....	41
6.5.2 Mutación <i>p.E46K</i> .....	41
6.5.3 Mutación <i>p.A53T</i> .....	42
6.6.0 Calculo de dosis génica.....	42
6.6.1 Confirmación por amplificación de sondas dependientes de ligando.....	43
6.7.0 Genotipificación de polimorfismos de <i>SNCA</i> .....	45
7.0 Resultados.....	47
7.1 Mutaciones puntuales.....	47
7.2 Alteración de la dosis de <i>SNCA</i> .....	52
7.3 Polimorfismos de un solo nucleótido de <i>SNCA</i> .....	56
8.0 <b>Discusión</b> .....	73
8.1 Mutaciones puntuales para <i>SNCA</i> .....	73
8.2 Alteración de la dosis de <i>SNCA</i> .....	75
8.3 Polimorfismos de un solo nucleótido y su asociación con Enfermedad de Parkinson y deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson .....	76
9.0 Conclusiones.....	79
10.0 Perspectivas.....	81
11.0 Bibliografía.....	82
 Anexo 1.....	 91
Anexo2.....	92
Anexo 3.....	93
Anexo 4.....	94

## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno progresivo del sistema nervioso que afecta varias regiones del cerebro, especialmente el área de la sustancia negra que controla el equilibrio y el movimiento. La EP es el principal trastorno del movimiento y ocupa el cuarto motivo de consulta del Instituto Nacional de Neurología (INNNMVS). El primer síntoma de la EP es temblor en reposo; otros síntomas son rigidez, lentitud de movimientos (bradicinesia) o una incapacidad para moverse (acinesia), con equilibrio y coordinación dañados. La EP también afecta las emociones y la cognición de los pacientes. Algunos individuos afectados desarrollan problemas psiquiátricos como la depresión, alucinaciones visuales y 24-31% de los pacientes desarrolla demencia. Generalmente, la EP que comienza después de los 50 años se considera de inicio tardío. La condición se describe como EP de inicio temprano si los signos y los síntomas comienzan antes de los 50 años de edad. El diagnóstico clínico de la EP sólo se confirma en el análisis histopatológico *postmortem*. Como en la mayoría de las enfermedades complejas, la EP es el resultado de una interacción de factores ambientales y genéticos. La mayoría de los casos son esporádicos y ocurre en personas sin antecedentes familiares de la EP. 5-10% de los casos de EP se consideran formas familiares y son causados por mutaciones en diferentes genes: ***LRRK2, PARK2, PARK7, PINK1, SNCA, ATP13A2, UCHL1, VPS35***.

El deterioro cognitivo es un síntoma de la EP, que cuando es severo se refiere como demencia asociada a EP. Las alteraciones en ***SNCA*** son el principal factor de riesgo asociado a deterioro cognitivo en la EP. Aunque la mayoría de los pacientes son esporádicos, se han descrito algunos casos familiares con alteraciones de dosis ***SNCA***. En éstos, se muestra un fenotipo más agresivo en

individuos homocigotos en comparación con los heterocigotos para esta alteración. También cursan con deterioro cognitivo severo y en el análisis *posmortem* de algunos de estos casos, se ha descrito la aparición de inclusiones citoplasmáticas de alfa sinucleína (cuerpos de Lewy). La alfa sinucleína es una proteína nuclear y sináptica que tiene varias funciones relacionadas con el transporte y la señalización celular. En el presente trabajo se analizaron las principales mutaciones de secuencia p.A30P, p.E46K y p.A53T se analizaron por PCR-RFLP para las 62 muestras de pacientes con EP, divididas en: pacientes con EP sin deterioro cognitivo (N=16), pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL) (N=11) y pacientes con EP con deterioro cognitivo mayor (DCM) (N=35). Estas tres mutaciones no fueron encontradas en los tres grupos de estudio; en el caso de las mutaciones estructurales se encontró un pacientes con dosis génica alterada y con diferentes grados de deterioro cognitivo, las alteraciones en la dosis génica se analizaron mediante PCR-TR y se confirmaron mediante MLPA. Los cinco polimorfismos de riesgo de **SNCA**: rs7684318, rs356219, rs356203, rs356220 y rs2736990 fueron genotipificados con PCR-TR y se encontró que la combinación de alelos GTTAC confiere una posible disminución en el riesgo para la EP con deterioro cognitivo mientras que la combinación de alelos GTTA confiere un posible aumento en el riesgo para EP con deterioro cognitivo. Adicionalmente, la combinación de alelos TTAC mostró asociación ( $p= 2.38 \times 10^{-11}$ ) con una disminución para EP, y se encontró que la combinación de alelo TCAC se asoció a una mayor susceptibilidad para EP y a EP con deterioro cognitivo ( $p=523 \times 10^{-10}$ ).

## **1.0 Introducción**

### **1.1 Antecedentes**

#### **1.1.1 Definición**

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita en 1817 por James Parkinson en su trabajo *An Enssay on Shaky Palsy*, el cual constaba de 66 páginas divididas en 5 capítulos donde se describía principalmente el temblor involuntario.

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer. Desde su descripción original, esta enfermedad ha sido definida por sus características motoras que incluyen bradicinesia (lentitud de movimientos), acinesia (una incapacidad para moverse), temblor, inestabilidad postural y dificultad en la marcha. Fue hasta 50 años después que Jean Marie Charcot destacó algunos otros síntomas además de los ya mencionados con antelación por Parkinson; por lo que ahora se entiende a la EP como un complejo de síntomas motores y no motores (Tabla 1). Estos síntomas no motores de la EP han tomado gran relevancia pues inician por lo menos cinco años antes de la aparición de los síntomas motores (Chaudhuri, et al; 2006).

Los criterios clínicos con frecuencia utilizados son los desarrollados por el Banco de Cerebros del Reino Unido por Hughes y Lees en 1992 y se centran en la presencia de síntomas motores como rigidez, temblor e inestabilidad postural conocida como la triada básica de la EP. El reconocimiento de la disfunción no motora de la EP ha dejado latente la posibilidad de un diagnóstico temprano o incluso subclínico, es decir previo a la aparición de los signos motores clásicos (Cervantes-Arriaga; 2014).

El diagnóstico definitivo de la EP se realiza *postmortem*, mediante la comprobación histopatológica de la presencia de los cuerpos de Lewy, depósitos intracelulares, constituidos principalmente de alfa-sinucleína



(Schapira, et al; 2014). Esto evidentemente no es de utilidad en la práctica diaria frente al paciente.

La EP afecta varias regiones del cerebro, especialmente el área de la sustancia negra que controla el equilibrio y el movimiento. A menudo, el primer síntoma de la EP es temblor, especialmente cuando el cuerpo está en reposo.

Típicamente, el temblor comienza en un lado del cuerpo, por lo general en una mano y también puede afectar otras extremidades. Otros síntomas característicos de la EP incluyen rigidez o agarrotamiento de las extremidades y el tronco, bradicinesia o acinesia, y el equilibrio y coordinación dañados (Coby, et al; 2011). Estos síntomas empeoran lentamente con el tiempo. En la EP también se puede ver afectadas las emociones y la capacidad de pensamiento (cognición). Algunos individuos afectados desarrollan problemas psiquiátricos como la depresión y alucinaciones visuales. Los pacientes también tienen un riesgo mayor de desarrollar demencia o deterioro cognitivo mayor (**DCM**) (Chaudhuri, et al; 2006).

**Tabla 1.** Síntomas no motores en pacientes con enfermedad de Parkinson

Síntomas neuropsiquiátricos	Desórdenes del sueño	Síntomas autonómicos
Depresión, apatía y ansiedad	Movimiento ocular rápido (MOR)	Nicturia
Anosmia	Excesiva somnolencia en el día	Trastornos de vejiga
Déficit de atención	Sueños muy vívidos	Ojos secos
Ataque de pánico	Insomnio	Disfunción sexual
<b>Delirium</b>	Trastornos respiratorios durante el sueño	Transpiración excesiva
Confusión		Hipersexualidad
Conducta obsesiva		Hipotensión ortostática

### **1.1.2 Clasificación de la enfermedad de Parkinson**

Existen diversas clasificaciones para la EP ya sea por edad de inicio, respuesta al tratamiento o por antecedentes familiares. La edad de inicio promedio de la EP es a los 60 años de edad, sin embargo existen casos juveniles y de inicio temprano. La edad de inicio en la EP corresponde a la edad en que aparecen los síntomas clínicos de la enfermedad, ésta puede clasificarse como EP de inicio tardío y de inicio temprano. La enfermedad que comienza después de los 50 años se llama EP de inicio tardío. La condición se describe como EP de inicio temprano, si los signos y los síntomas comienzan antes de los 50 años de edad (Alcalay RN et al; 2010). Adicionalmente, la EP puede presentarse antes de los 20 años considerándose EP juvenil (Lohmann, et al; 2009).

Se ha descrito que algunos pacientes pueden presentar sutiles alteraciones cognitivas desde etapas tempranas, conocidas como deterioro cognitivo leve **(DCL)**. Por lo que también se subdivide en EP acompañada de demencia o sin ella, en la actualidad se propone una subdivisión para los pacientes con EP con DCL (Boll, et al; 2014 y Bocanegra, et al; 2014).

### **1.1.3 Epidemiología de la enfermedad de Parkinson**

La prevalencia de la EP se ha estimado que es del 1% al 2% en personas mayores a 60 años a nivel mundial; algunos estudios reportan una mayor prevalencia en hombres que en mujeres (Cervantes-Arriaga, et al; 2014 y Secretaria de Salud; 2010).

A nivel mundial se presentan 150 a 200 casos de EP por 100,000 habitantes cada año. En México se tiene un estimado de 50 por cada 100,000 habitantes que puede padecerla y es la cuarta causa de consulta en el INNN MVS (Secretaria de Salud; 2010).

#### **1.1.4 Diagnóstico de la enfermedad Parkinson**

Debido a la falta de biomarcadores o hallazgos de neuroimagen específicos, el diagnóstico de la EP se basa en los criterios clínicos descritos, principalmente síntomas motores y la ausencia de otro daño neurológico (toxinas o infecciones).

Hoehn y Yahr (HyY) en 1967, propusieron una escala que más tarde fue modificada por Marttila y Rinne (1976). Esta escala evalúa marcha, postura, impedimento de movimiento, así como dependencia de un tercero. En la escala HyY el valor 0 representa no afectado o sin síntomas, y el 5 corresponde al estadio más grave con invalidez y dependencia hacia otra persona. A nivel mundial también se utiliza la escala unificada para la evaluación de EP (UPDRS) (Goetz, et al; 2004).

Existen tres niveles de confianza en el diagnóstico de EP: posible, probable y definitiva; éste último requiere confirmación histopatológica.

En 1985, Schoenberg y colaboradores propusieron los términos EP probable y posible en base a criterios de exclusión adicionales, tales como síndrome parkinsoniano inducido por fármacos, o síntomas debido a otras enfermedades. Calne y colaboradores (1992) añadieron el término parkinsonismo idiopático como categoría clínicamente definida que requiere tres de los cuatro síntomas cardinales. Dentro de estos criterios internacionales, existe un gran número de criterios de exclusión diagnóstica para la EP como criterios de apoyo, así mismo se considera la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento con levodopa (Wirdefeldt, et al; 2011).

### **1.1.5 Tratamiento de la enfermedad de Parkinson**

La levodopa (L-dopa) sigue siendo el tratamiento angular en la EP, un precursor de la dopamina que atraviesa la barrera hematoencefálica. La L-dopa es metabolizada a dopamina y catecolaminas a nivel periférico por la enzima descarboxilasa de la levodopa, lo que produce efectos secundarios sistémicos. Por este motivo todos los preparados actuales de levodopa añaden un inhibidor de la descarboxilasa periférica, DCAA. Este inhibidor no atraviesa la barrera hematoencefálica y actúa sobre la levodopa extracerebral (Guía Práctica Clínica, Secretaria de Salud, 2010).

Los agonistas dopaminérgicos (no puros, derivados del ergotamina) estimulan directamente los receptores postsinápticos de dopamina y también a otro tipo de neuroreceptores (serotonérgicos y noradrenérgicos). El ropinirol y pramipexol son dos agonistas dopaminérgicos no ergolínicos (Guía terapéutica de la sociedad catalana neurología, 2009 y Guía Práctica Clínica, Secretaria de Salud, 2010).

Otros medicamentos disponibles en la clínica para el tratamiento de la EP son los inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT). Esta enzima está presente en todo el organismo y convierte la levodopa en 3-O-metildopa (3-OMD). La 3-OMD no puede convertirse en dopamina y por lo tanto, la levodopa es desperdiciada. Cuando los inhibidores de la COMT se administran conjuntamente con levodopa y un inhibidor de la DCAA, incrementan la vida media y biodisponibilidad de levodopa, sin afectar a sus concentraciones máximas. Otros fármacos para el tratamiento de la EP son los inhibidores de la monoamino oxidasa B (MAOB). La isoforma MAOB predomina en el cerebro humano, descompone la dopamina en ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético y ácido homovanílico, lo que estimula la liberación de dopamina e inhibe la captación de dopamina neuronal (Fernández, et al; 2007).

Ciertos pacientes con EP pueden ser candidatos a cirugía para su tratamiento. Las principales técnicas quirúrgicas para ello son: la palidotomía, la estimulación cerebral profunda y el trasplante de células de la sustancia negra fetales (experimental). Estos procedimientos se deben realizar por equipos multidisciplinarios en centros clínicos especializados en la EP, con experiencia en cirugía estereotáxica y neurofisiología (Guía Terapéutica de la Sociedad Catalana de Neurología, 2009).

### **1.1.6 Deterioro cognoscitivo leve en la enfermedad de Parkinson**

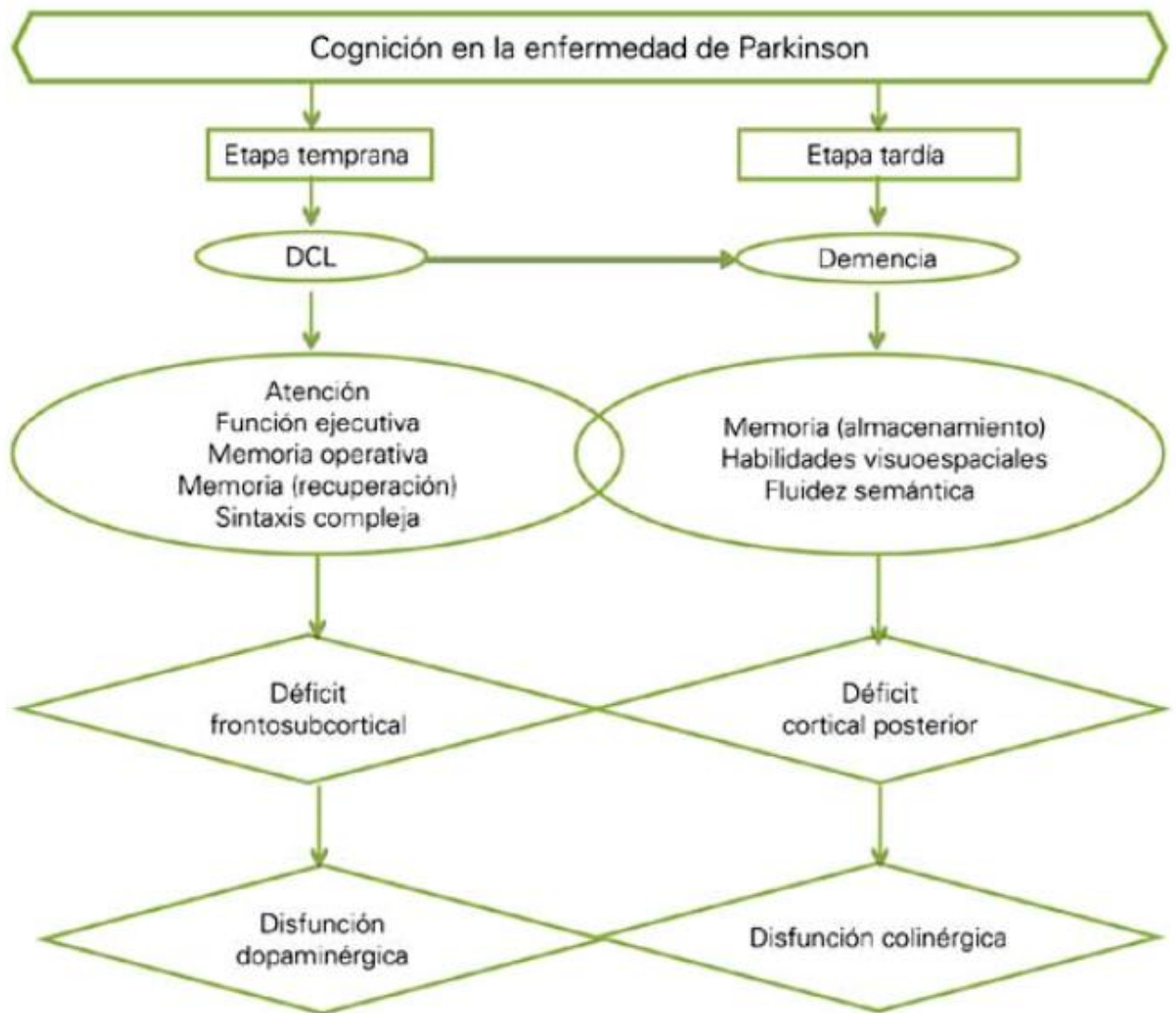
En ausencia de demencia franca, el **DCL** se denomina cuando los síntomas requeridos para formular el diagnóstico son pocos o ninguno. Tal que, los síntomas no dan lugar sino a un ligero deterioro de la actividad social o laboral. El DCL es frecuente en la EP, incluso entre aquellos pacientes de diagnóstico reciente como se puede observar en la Figura 1. El DCL cursa con alteraciones en las funciones ejecutivas, la atención, las habilidades visuo-espaciales y la memoria; mientras que el lenguaje y las praxias permanecen relativamente intactos (Mamikoyan, et al; 2009).

En los pacientes con EP existe una discrepancia en el rendimiento cognitivo, donde hay un deterioro en las medidas de memoria. La identificación de DCL en la EP es importante, ya que predice el deterioro cognitivo a futuro y eventualmente puede ser un objetivo para la intervención farmacológica para prevenir o retrasar el desarrollo de DCM (Bocanegra, et al; 2014).

En los pacientes con EP es importante realizar el examen cognitivo de rutina mediante una evaluación sensible. Al respecto, el Mini Examen del Estado Mental (**MMSE**) Anexo 1 sigue siendo el "estándar de oro" y el instrumento para la medida de la cognición global. Se tiene como máximo en la prueba un total de 30 puntos y abarca las áreas de orientación en espacio-tiempo, lenguaje, abstracción, atención y memoria (Folstein, et al; 1975 y Pistacchi, et

al; 2015). El MMSE en el EP es ampliamente utilizado a nivel mundial; sin embargo, el uso de este examen en nuestra población ha sido cuestionado debido a que evalúa principalmente la memoria y habilidades de lenguaje (Mamikonyan, et al, 2010). En el caso de DCL no es lo suficientemente sensible para detectar muchos de los casos, debido a que sus principales limitaciones son la influencia de la edad del paciente y su nivel cultural sobre la puntuación, un punto de corte muy rígido, la presencia de efecto techo en sujetos con un deterioro cognitivo avanzado y un efecto suelo en aquellos con deterioro leve, e inexistencia de estudios poblacionales en la EP en los que se haya validado el MMSE (Toribio-Díaz, et al; 2015).

Por lo anterior, en el INNNMVS se validó el *Montreal Cognitive Assessment (MoCA)* (Anexo 2) como prueba adicional al MMSE o prueba única para evaluar cognición en pacientes mexicanos con EP. El MoCA es un instrumento que permite evaluar memoria, dominios habituales de la cognición y una serie de funciones ejecutivas como abstracción, capacidad visuo-constructiva y fluidez verbal. En el caso de esta prueba se toma como puntaje normal: 27-30 puntos, siendo 30 el máximo a obtener en la prueba. Un puntaje de 25 a 26 se considera DCL, mientras que un puntaje menor a 24 refiere un deterioro cognoscitivo mayor (Boll et al, 2014 y Pistacchi, et al 2015).



**Figura 1.** Perfil cognitivo de pacientes con EP. Cognición en la EP y las funciones alteradas en estos pacientes (Modificada de Bocanegra et al, 2014).

Por otro lado, de acuerdo con el manual diagnóstico y estadístico de enfermedades mentales quinta edición (DSM-V) podemos obtener los criterios para el diagnóstico de DCL cuando hay evidencias de un declive cognitivo moderado comparado con el nivel previo de rendimiento en uno o más dominios cognitivos (atención compleja, función ejecutiva, aprendizaje y

memoria, lenguaje, habilidad perceptual motora o cognición social) que esté basado principalmente en:

1. Preocupación en el propio individuo, en un informante que le conoce o en el clínico, porque ha habido un declive significativo en una función cognitiva y trastornos neurocognitivos.
2. Un deterioro modesto del rendimiento cognitivo, preferentemente documentado por una prueba neuropsicológica estandarizada o, en su defecto, por otra evaluación clínica cuantitativa (DSM-V; 2014).

En el DCL no se interfiere en la capacidad de independencia en las actividades cotidianas; por ejemplo, el paciente conserva las actividades instrumentales complejas de la vida diaria, como pagar facturas o seguir los tratamientos, pero necesita hacer un mayor esfuerzo o recurre a estrategias de compensación o de adaptación (Bocanegra, et al; 2014 y DMS-V; 2014).

### **1.1.7 Deterioro cognoscitivo mayor en la enfermedad de Parkinson**

La demencia o deterioro cognitivo mayor se define como un síndrome adquirido, caracterizado por una pérdida en las habilidades cognitivas, cambios emocionales o de personalidad que son lo suficientemente graves para interferir con el funcionamiento social y ocupacional. Al DCM se le denota como un padecimiento grave ya que se detectan varios síntomas que exceden los requeridos para formular el diagnóstico, o distintos síntomas que son particularmente graves, o los síntomas dan lugar a un notable deterioro de la actividad social o laboral (Bocanegra, et al ; 2014 y DMS-V; 2014).

En la actualidad, se conocen múltiples etiologías que subyacen a la demencia y, dependiendo de éstas, se define la reversibilidad o no del cuadro clínico. Los criterios diagnósticos propuestos en la clasificación internacional de las enfermedades, en su décima revisión (**CIE-10**), y en el manual diagnóstico y



estadístico de las enfermedades mentales, en su cuarta edición revisada **(DSM-IV-TR)**, incluyen la pérdida de la memoria como uno de los criterios necesarios para el diagnóstico de DCM (Gratwicke, et al; 2015). En lo que respecta a la demencia por EP (dEP), los criterios propuestos por la CIE-10 y el DSM-IV-TR no se adaptan al cuadro clínico neuropsicológico que manifiestan los pacientes. En las dos clasificaciones (CIE10 y DSM-IV), la dEP aparece **dentro del apartado 'demencia debida a otras enfermedades médicas' y 'demencia en enfermedades clasificadas en otro lugar', respectivamente. Los** criterios formulados contemplan la presencia de demencia, incluida la alteración de la memoria, pero no especifican otras características cognitivas y de comportamiento que puedan orientar el diagnóstico diferencial. Como se verá más adelante, la dEP aparece tardíamente en el curso de la EP y se caracteriza, principalmente, por alteraciones de tipo frontal acompañadas de déficit en la fluidez, en las habilidades visuoespaciales y visuoperceptuales, y en la memoria; no obstante, es importante resaltar que las alteraciones amnésicas en los pacientes con dEP son menos frecuentes y de menor gravedad cuando se comparan con otro tipo de demencias. A pesar de que la mayoría de los estudios continúa aplicando los criterios del DSM-IV, en los últimos años se han establecido criterios bien definidos y ajustados a las características clínicas de estos pacientes, que pueden ser útiles en los ámbitos clínico, terapéutico y de investigación (Gratwicke, et al; 2015 y DSM IV-R, 1995).

La prevalencia de la dEP se estima dentro del rango de 24-31%, en una revisión de Aarsland y colaboradores donde estudiaron 1767 pacientes con EP europeos, asiáticos y norteamericanos (Aarsland, et al; 2005). Sin embargo, no quedó clara la exclusión de pacientes con demencia por cuerpos de Lewy, lo cual pudo alterar los resultados (Williams-Gray, et al; 2007). En la literatura, la mayoría de los estudios de prevalencia de la dEP han utilizado puntos de corte por debajo del valor de 24 en el MMSE o criterios del DSM-IV para el diagnóstico de demencia (Pistacchi, et al; 2015).

De acuerdo con los criterios del DSM-IV, la demencia asociada a la enfermedad de Parkinson se caracteriza por enlentecimiento motor y cognoscitivo, disfunción de la capacidad de ejecución y deterioro de la memoria de evocación. El deterioro de las funciones cognoscitivas en los individuos con EP se exacerba frecuentemente con la depresión. En la exploración física se encuentran hallazgos característicos, como son signos anormales de la actividad motora, temblor en reposo, enlentecimiento y pobreza de movimientos, o rigidez muscular y pérdida de movimientos asociados (Bocanegra, et al; 2014 y DSM IV-R; 1995).

En la autopsia de cerebros de la mayoría de los pacientes con EP, el análisis histopatológico *posmortem* evidencia la pérdida neuronal y la presencia de los cuerpos de Lewy en la sustancia negra. Existen numerosos síndromes que pueden presentarse con demencia relacionados con la EP como la demencia por cuerpos Lewy. Esta entidad cursa con todos los síntomas de DCM y hay presencia de cuerpos de Lewy lo cual resulta en el daño, principalmente de las neuronas colinérgicas y dopaminérgicas que disminuyen los niveles de neurotransmisores (acetilcolina y dopamina) y por lo tanto afecta la capacidad de las neuronas para comunicarse entre sí causando disminución de la atención, la memoria y el aprendizaje de nuevas habilidades (Pervin, et al; 2015).

En el caso del DSM-V, se considera trastorno neurocognitivo mayor si se cumplen los criterios siguientes:

1. Cuando no hay evidencia de una etiología mixta; es decir, ausencia de cualquier otra enfermedad neurodegenerativa o cerebrovascular, otra enfermedad neurológica, mental o sistémica, o cualquier otra afección con probabilidades de contribuir al declive cognitivo.
2. La enfermedad de Parkinson precede claramente al inicio del trastorno neurocognitivo.

### **1.1.8 Genética de la enfermedad Parkinson**

Como en la mayoría de las enfermedades comunes, se sabe que la EP es el resultado de una compleja interacción del ambiente, la genética y el envejecimiento. La mayoría de los casos de EP son esporádicos o idiopáticos, y no presentan antecedentes familiares de la enfermedad. En 10-15% se observa agregación familiar y sólo 5-10% de los casos presenta un patrón de herencia mendeliano: autosómico dominante o autosómico recesivo (Romo-Gutiérrez et al 2014).

Los estudios de las pasadas dos décadas han permitido identificar los *loci* responsables en los pacientes con EP familiar (Bekris et al; 2011). Las formas familiares de la EP pueden ser causadas por mutaciones en diferentes genes: *LRRK2, PARK2, PARK7, PINK1, SNCA, ATP13A2, UCHL1* (Tabla 2).

En 1997, el primer gen inequívocamente vinculado a EP (*SNCA, locus PARK1/4*) fue descubierto a través de análisis de ligamiento en una gran familia italiana (la familia Contursi) en el que la enfermedad segregaba en una forma autosómica dominante (Polymeropoulos et al 1997).

Diversos estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han mostrado asociación entre algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de *SNCA* y *GBA* y la EP. Así mismo, estos GWAS han aportado información de diversos SNP en genes asociados a EP y que participan en la cognición (Xu, et al; 2014).

**Tabla 2.** Genes asociados a la enfermedad de Parkinson

<b>Designación</b>	<b>Gen</b>	<b>Locus</b>	<b>Herencia</b>
<b>PARK1/4</b>	<i>SNCA</i>	4q21	AD
<b>PARK3</b>	-----	2p13	AD
<b>PARK5</b>	<i>UCHL1</i>	4p14	AD
<b>PARK8</b>	<i>LRRK1</i>	12q12	AD
<b>PARK2</b>	<i>PARK2</i>	6q25.2-q27	AR
<b>PARK6</b>	<i>PINK1</i>	1p35-36	AR
<b>PARK7</b>	<i>DJ-1</i>	1p36	AR
<b>PARK9</b>	<i>ATP13A2</i>	1p36	AR
<b>PARK14</b>	<i>PLA2G6</i>	22q13.1	AR
<b>PARK10</b>	-----	1p32	----
<b>PARK11</b>	<i>GIGYF2</i>	2q36-37	AD
<b>PARK12</b>	-----	Xq21-q25	Ligado al X
<b>PARK15</b>	<i>FBX07</i>	22q11.2-qter	AR
<b>PARK 16</b>	-----	1q32	AD
<b>PARK 17</b>	<i>VPS35</i>	16q11.2	AD
<b>PARK 18</b>	<i>EIF4G1</i>	3q27.1	AD

AD: Autosómico Dominante, AR: Autosómico Recesivo (Tabla modificada de Coppédé, et al; 2012 y OMIM).

### **1.1.9 PARK1/PARK4 (SNCA o gen de la $\alpha$ -sinucleína)**

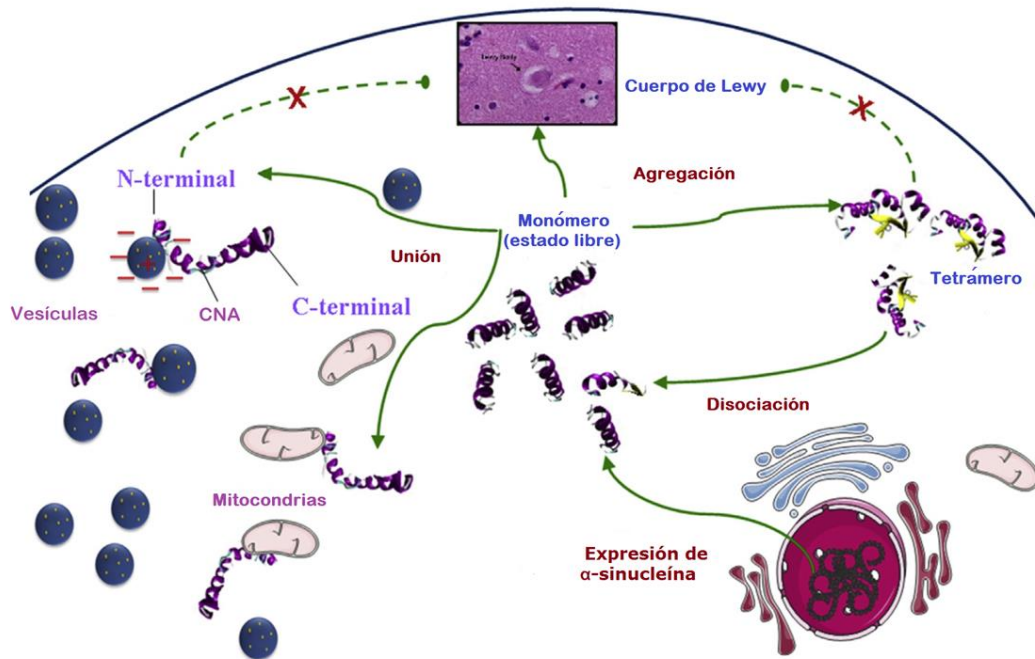
*SNCA* es el gen que codifica para la proteína alfa-sinucleína, SNCA. Este gen se considera el *locus* PARK1/PARK4, se localiza en 4q21 y está compuesto por seis exones abarcando una región de 3041 pb. *SNCA* puede generar trece

isoformas por *splicing* alternativo que van desde 67-140 aminoácidos; además tiene 55 ortólogos y dos parálogos (Ensembl).

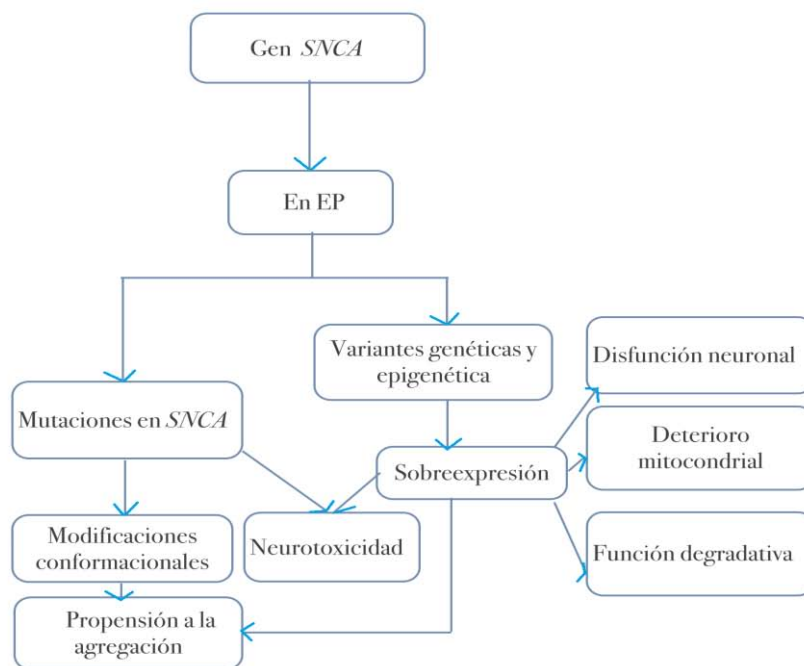
La isoforma más larga y común de la proteína SNCA es de 14 kDa y posee un dominio N-**terminal**  $\alpha$ -helicoidal anfipático que se asocia con microdominios de membrana conocidos como balsas-lipídicas. En su dominio C-terminal contiene una región para la inhibición de la agregación proteica (Bekris et al; 2011). La SNCA normal se encuentra generalmente en el citosol, el núcleo, la membrana de las mitocondrias y asociada en el retículo endoplásmico o como proteína libre, también se encuentra unida a fosfolípidos de membrana particularmente los de vesículas presinápticas.

El estado de la proteína al unirse a membrana da lugar a un cambio conformacional de SNCA previniendo futuras agregaciones. Por otro lado, existe un equilibrio entre el monómero y el tetrámero meta-estable de la proteína. Se sabe que el monómero es propenso a la agregación y a la formación de los cuerpos de Lewy, mientras que el tetrámero impide la agregación ver Figura 2 (Xu, et al; 2015).

La función de la alfa sinucleína aún no está bien aclarada, pero varios estudios sugieren que interviene en la liberación de vesículas presinápticas (Spillantini, 2000). Otros estudios asocian las alteraciones de SNCA con el daño a la mitocondria y el aumento de las especies reactivas de oxígeno (Figura 3) (Xu, et al; 2015).



**Figura 2.** Relación de la SNCA y las sinucleopatías. Se muestran los sitios de unión de SNCA, así como el equilibrio entre los monómeros libres y los tetrámeros de SNCA y la vía para su agregación (Modificado de Xu, et al; 2015).



**Figura 3.** Diagrama de las alteraciones de SNCA y sus efectos (Modificado de Xu, et al; 2015).

En el gen **SNCA** se han identificado mutaciones puntuales y alteraciones de dosis causantes de EP AD, así como varios polimorfismos asociados con riesgo incrementado para desarrollo de la EP. A continuación, se detalla esta información.

### **1.1.9.1 Mutaciones en SNCA**

A la fecha se han identificado seis mutaciones diferentes en **SNCA** causantes de EP AD: p.A30P, p.E46K, p.H50Q, p.G51D, p.A53T/E, siendo las más frecuentes p.A30P, p.E46K y p.A53T. No sólo hay descritas mutaciones en la secuencia génica, sino que también se encuentran favorecidas las duplicaciones y triplicaciones del gen (Xu, et al; 2015).

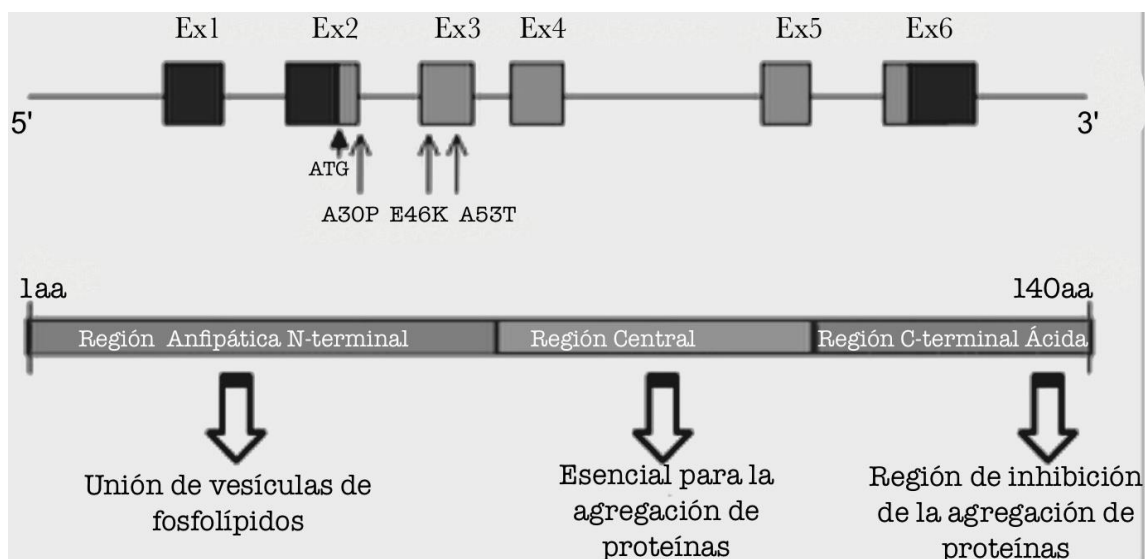
En los pacientes con las mutaciones p.A30P, p.E46K y p.A53T se exhibe la tríada temblor, rigidez y bradicinesia, característica de EP clásica, así como la evidencia patológica de cuerpos de Lewy, así mismo se ha comprobado *in vitro* que la proteína sufre un daño conformacional.

La conversión de G → C en la posición 88 en la secuencia de nucleótidos ocasiona un cambio en el aminoácido de la posición 30 de alanina a prolina (p.A30P), originalmente esta mutación se encontró en una familia alemana (Krüger, et al; 1998). Esta mutación causa alteración en la estructura proteica **al provocar una disminución en las estructuras β**-plegada en la zona N-terminal y un aumento de las mismas en el extremo C-terminal (Wise-Scira, et al; 2013).

La mutación de sentido erróneo p.E46K se encuentra en el exón 3 del gen y provoca un cambio en la posición 188 de G → A que resulta en el cambio del residuo 46 de ácido glutámico a lisina (Wise-Scira; 2013). Al sustituir un aminoácido dicarboxílico por un aminoácido básico en un área mucho más conservada de la proteína, se altera la función de la misma (Zarranz, et al;

2004). Esta mutación se ha observado en pacientes con demencia por cuerpos de Lewy y en EP, y se aisló inicialmente en una familia española (Pimentel MM, et al; 2015).

La transición en la posición 209 G → A en el exón 3 de **SNCA** causa una sustitución de alanina a treonina en la posición 53 de la proteína (p.A53T), que se asocia con un aumento en la formación de fibrillas de SNCA en comparación con la proteína silvestre (Puschmann, et al; 2009). Esta mutación se identificó en familias italianas y griegas (Vaughan et al, 1998). En la Figura 4 podemos observar la ubicación de las tres diferentes mutaciones en los diferentes exones de la proteína SNCA.



**Figura 4.** Representación esquemática del gen **SNCA** (parte superior) y la estructura de la proteína de 140 aminoácidos (Figura inferior). Se muestran los seis exones y dominios funcionales de SNCA. En el gen se muestran tres de las mutaciones identificadas hasta la fecha. ATG indica el comienzo de la región codificante (gris). Ex: exón; aa: aminoácido (Modificado de Bekris et al; 2011).

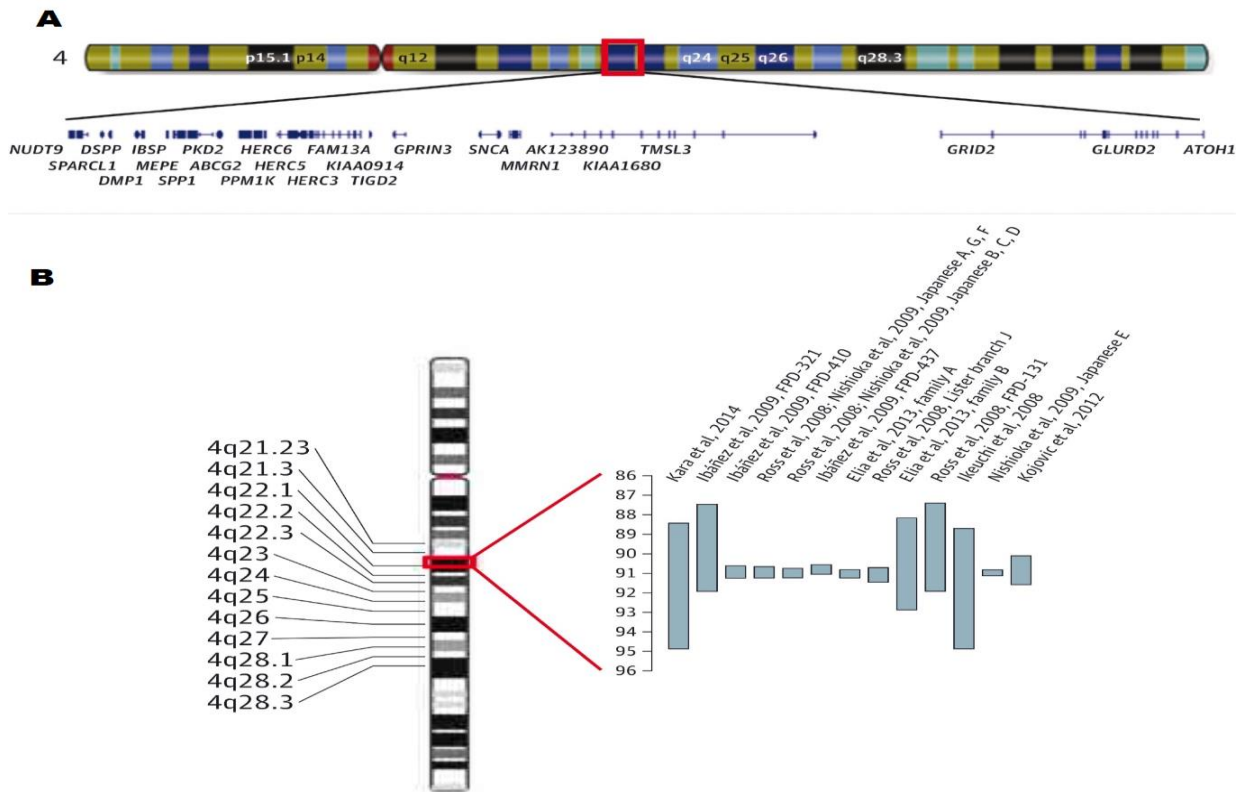


### 1.1.9.2 Alteración en la dosis génica de **SNCA**

Aunque son un evento relativamente raro, en la literatura ya se han descrito varias familias con EP de inicio temprano y herencia AD con multiplicaciones (duplicaciones y triplicaciones) de la región cromosómica que incluye a **SNCA**, y que segregan con la enfermedad. En las revisiones de diferentes autores se puede encontrar que a medida que el número de copias de este gen aumenta, el deterioro neuronal también se incrementa, y el inicio de la EP es temprano; la triplicación de la región completa de **SNCA** da como resultado cuatro copias funcionales del **SNCA** y el doble de sobreexpresión del *mRNA* de **SNCA** y proteína así como fenotipo penetrante de EP con deterioro cognitivo y disfunción autonómica. Del mismo modo, la duplicación de **SNCA** resulta en una elevación de 1,5 veces de la expresión de **SNCA** y un inicio ligeramente tardío de EP hereditaria que se caracteriza por una tasa de penetrancia inferior y un fenotipo más moderado que el resultante de la triplicación de este gen (Linnertz, et al; 2009 y Kara, et al; 2014).

Por otro lado, se han reportado niveles elevados del transcrito de **SNCA** en los tejidos del cerebro medio y en la sustancia negra así como en las neuronas dopaminérgicas en cerebros *postmortem* de pacientes con EP en comparación con controles (Ibáñez et al; 2009). Estas observaciones ponen de relieve la importancia de los niveles de dosificación y de expresión de **SNCA** en la patogénesis de la EP. Dentro de las duplicaciones hay una variación de tamaño que va desde 0.2-41Mb, incluyendo de 2-150 genes dentro de la región duplicada (Figura 5A y 5B) (Kara, et al; 2014).

Un probable mecanismo de origen de estas multiplicaciones es la recombinación homóloga no alélica que provoca la multiplicación de este *locus* gracias a la mediación de repetidos de bajo número de copias (LCR) (Ross et al; 2008).



**Figura 5A y 5B.** Tamaño y genes que componen la duplicación de *SNCA*. **A.** ideograma de la región multiplicada en el cromosoma cuatro, con la posición de los genes más comúnmente alterados y vecinos a *SNCA*. **B.** se observa el tamaño de las regiones multiplicadas de 4q reportadas en la literatura (Modificado de Kara et al; 2014).

### 1.1.9.3 Polimorfismos de *SNCA* como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad Parkinson

Está bien documentado por los estudios de asociación de genoma completo que los **SNP** de *SNCA* se asocian con un riesgo incrementado para desarrollo de EP esporádica (Nalls, et al; 2014 y Edwards, et al; 2010). A pesar de que muchos investigadores han intentado validar un haplotipo para la enfermedad,

se ha llegado a la conclusión de que la frecuencia y número de haplotipos de **SNCA** varía de población en población. Para evaluar la asociación entre estos SNP y la EP, se han realizado series de meta-análisis utilizando diferentes protocolos donde se sugiere que el gen **SNCA** puede estar asociado con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson esporádica (EEP).

Se ha demostrado que el SNP rs356219 en la región 3´ UTR del gen sirve para regular los niveles de **SNCA** en el cerebro, la sangre y el plasma (Pan, et al; 2012) por lo que es uno de los principales SNP candidatos a estudio. Se han realizado estudios en poblaciones suecas, estadounidenses y japoneses con este SNP (Pan, et al; 2012 y Li, et al; 2013) y se sugiere que podría tener un mayor riesgo de susceptibilidad para la EP.

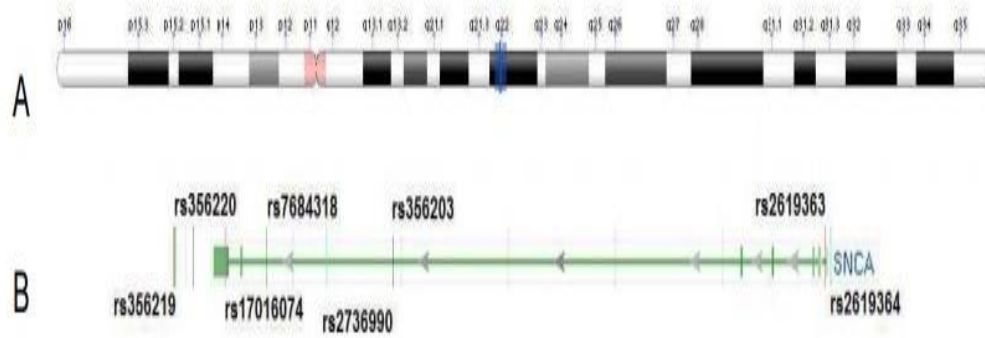
Un estudio de casos y controles ha mostrado relaciones significativas entre los SNP de **SNCA** rs356219, rs356220, rs2736990, rs7684318 y la EEP en Alemania, Noruega, los EEUU, España, China y Japón (Miyake, et al; 2012).

También otro estudio de frecuencias de SNP de **SNCA** en pacientes mestizo mexicanos con EP y controles mostró asociación positiva entre los SNP rs356203, rs356220, rs2736990 y rs7684318 y la EP (Figura 6) (Dávila, et al; 2015, manuscrito en preparación).

También se ha descrito en la literatura que rs2736990 y rs356220 aumentan el riesgo para la EP tanto en población caucásica y asiática. El rs2736990 se encuentra dentro del intrón 4 de **SNCA** mientras que el rs356220 se localiza dentro de la región 3´ (Guo, 2014).

En las bases de datos internacionales de estudios de asociación Pdgene o DBSNP, estos SNP de **SNCA** muestran un *odds ratio* (OR)<sup>1</sup> de riesgo incrementado para EEP (Tabla 3), esto podría deberse a que están implicados en la regulación postranscripcional del DNA y además de que la región 3´UTR donde se encuentran es una región muy conservada del gen de SNCA (Cardo, et al; 2012).

Contrariamente, se ha identificado al rs356186 como el único SNP de protección en la enfermedad de Parkinson (Han, et al; 2015).



**Figura 6.** Ubicación de los SNP de *SNCA* asociados a riesgo incrementado para enfermedad de Parkinson. **A.** Ideograma del gen *SNCA*, **B.** Se muestran algunos polimorfismos de *SNCA* (Modificado de Dávila; 2014).

**Tabla 3.** Valor OR de los diferentes SNP de *SNCA* estudiados en diferentes poblaciones en relación con EP (modificado de Pdgene y DBSNP de NCBI).

SNP	Alelo	OR	Población de estudio
<b>rs7684318</b>	C>T	1.37(1.29-1.46)	Alemanes, franceses, ingleses, holandeses, estadounidenses.
<b>rs2736990</b>	C>T	1.30(1.18-1.43)	Alemanes y noruegos.
<b>rs356203</b>	A>G	1.48 (1.25-1.74)	Japoneses.
<b>rs356219</b>	A>G	1.32 (1.28-1.36)	Alemanes, franceses, ingleses, holandeses, estadounidenses.
<b>rs356220</b>	C>T	1.48 (1.25-1.74)	Japoneses.

OR, *odds ratio* o razón de momios = 1 exposición no afecta las probabilidades de resultados; OR > 1 exposición asociada con mayores probabilidades de resultados; O < 1 exposición asociada con menor probabilidad de resultados.

#### **1.1.9.4 SNCA y deterioro de la cognición en la enfermedad de Parkinson**

Debido a que el deterioro cognitivo es un problema frecuente e incapacitante en la EP, además de que resulta complejo su estudio y es difícil de tratarlo, se han propuesto diversos marcadores genéticos para la detección de pacientes susceptibles a deterioro cognitivo, uno de los principales genes candidato es el

gen **SNCA** (Mata, et al; 2014). Aunque las multiplicaciones del gen **SNCA** se consideran raras en la EP; éstas, a menudo se acompañan de un inicio temprano de la enfermedad y presencia de demencia. La demencia en el caso de las duplicaciones aparece alrededor de los 5.7 años de evolución de la EP; mientras que en los pacientes con triplicación de **SNCA** se estima que aparece a los 5.8 años. En relación a los síntomas de los pacientes portadores de las mutaciones puntuales de **SNCA** (p.A30P, p.A53T y p.E46K), la mayoría presenta síntomas psiquiátricos y deterioro en la cognición (Shin, et al; 2010). En el caso de polimorfismos de **SNCA** se sabe que conllevan un riesgo incrementado para desarrollo de la EP, pero no se conoce aún a ciencia cierta, si estas variantes predisponen a desarrollar deterioro cognitivo temprano en la evolución clínica de los pacientes (Kéri, et al; 2007).

Uno de los posibles mecanismos asociados a la cognición con SNCA se debe a que se encuentra presente en la regulación de la liberación de dopamina en el sistema mesolímbico de la dopamina, incluyendo el cuerpo estriado ventral y el núcleo *accumbens*. La neurotransmisión dopaminérgica en el sistema de recompensa del cerebro afecta el aprendizaje de refuerzo y los pacientes con EP, que han agotado la dopamina en los ganglios basales, muestran déficits en tareas que incluyen ciertos tipos de retroalimentación y en el aprendizaje (Kéri, et al; 2007) .

#### **1.1.10 Otros genes asociados al deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson**

Actualmente se han identificado variantes de diferentes genes que influyen en la tasa de deterioro cognitivo o que se asocian con patrones de deterioro cognitivos tempranos en la EP. Esto resulta interesante ya que su estudio podría proporcionar una mejor comprensión de esta característica de DCL y DCM en la EP. La evidencia disponible sugiere que al menos algunos polimorfismos de los genes que codifican para la apolipoproteína E (APOE) y la

proteína Tau asociada a los microtúbulos (*MAPT*), podrían desempeñar un papel en la determinación de la susceptibilidad al deterioro cognitivo en la EP (Mata, et al; 2014 y Romo-Gutiérrez, et al; 2015). El ***APOE* alelo  $\epsilon 4$**  es un factor de riesgo bien establecido para la enfermedad de Alzheimer y también está asociada con la cognición ligeramente reducida en adultos. Así mismo se ha descrito la asociación del **alelo  $\epsilon 4$**  de ***APOE*** con un inicio más temprano de DCM o deterioro cognitivo de evolución más rápida en pacientes con EP (López, et al; 2007; Mata, et al; 2014).

El haplotipo H1 de ***MAPT*** es un factor de riesgo bien conocido para varios trastornos neurodegenerativos, incluyendo a la EP. También se ha descrito que el haplotipo H1 de ***MAPT*** es un factor de riesgo para la demencia en la EP (Setó-Salvia, et al; 2011).

También en la lista de genes implicados en cognición y EP, se incluye al gen ***COMT***. Esta es una de las principales enzimas implicadas en la degradación de catecolaminas, incluyendo dopamina. Principalmente, el SNP de ***COMT*** que produce un cambio en la posición del aminoácido 158 de metionina a valina (Met158Val) ha demostrado cambios en la actividad de la enzima. Los portadores del alelo de valina presentan un aumento de la actividad de la enzima en comparación con la variante metionina; que a su vez, pueden ser responsable de alteraciones en la cognición (Mollenhauer, et al; 2014).

Se ha demostrado que las mutaciones heterocigotas en el gen de la glucocerebrosidasa (*GBA*) son un factor riesgo para EP, los pacientes con EP con mutaciones ***GBA*** pueden ser más propensos a deterioro cognitivo que los pacientes con EP sin mutaciones de ***GBA*** (Mollenhauer, et al; 2014 y Romo-Gutiérrez, et al; 2015).

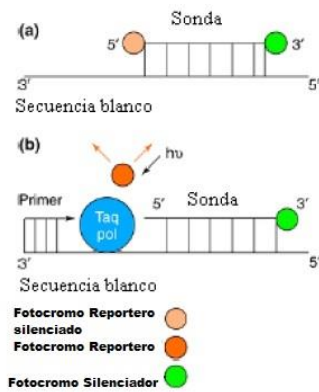
En este trabajo para el diagnóstico de las alteraciones asociadas a ***SNCA*** empleamos la técnicas de PCR en tiempo real (para confirmar alteraciones de dosis génica y para discriminación alélicas de SNP) y el MLPA (para análisis de dosis y dos mutaciones puntuales frecuentes), que a continuación detallo.

## 1.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR TR)

En este trabajo para la PCR-TR empleamos la química de sondas de hidrólisis tipo *TaqMan*®. El diseño de estas sondas incluye un agente reportero fluorescente y un **apagador en sus extremos 5' y 3', respectivamente**. El apagador impide la emisión del reportero hasta el momento de la amplificación cuando la sonda hibrida con la secuencia de interés y la actividad exonucleasa de la *Taq* DNA polimerasa hidroliza la sonda y libera al reportero, permitiendo la emisión de la señal fluorescente (Figura 7). Esta actividad se va registrando a lo largo de la PCR en las curvas de amplificación.

Los datos de la PCR-TR son caracterizados en el momento en el que la amplificación de un producto de PCR se detecta después de un número fijo de ciclos. Cuanto más alto es el número de copias del blanco, más pronto se observa el aumento significativo en la fluorescencia. Al inicio de la PCR, hay un pequeño cambio en señal de fluorescencia, esto define la línea de fondo para el diagrama de la amplificación. Un aumento en fluorescencia sobre la línea de fondo indica la detección del producto acumulado de PCR. Durante el avance de la reacción se adquieren los datos cuando la amplificación está todavía en la fase exponencial. Esto está determinado por la identificación del número de ciclos al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto al ruido de fondo. Este número de ciclos se llama ciclo umbral (Ct, ***threshold cycle***) el cual está determinado en la fase exponencial de la reacción el Ct es lo que se va utilizar posteriormente para el cálculo de la dosis génica mediante el método **comparativo  $\Delta\Delta CT$**  (Manual de PCR Tiempo Real *Applied Biosystems*, 2012).





**Figura 7.** Representación de la PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis (Modificado de Cortazar, et al; 2004).

### 1.2.1 Amplificación de sondas dependientes de ligando (MLPA)

MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) es una técnica de detección de mutaciones estructurales (deleciones, duplicaciones y multiplicaciones) y de algunas mutaciones de secuencia; en este caso, con un panel comercial que incluye sondas para los principales genes asociadas a la EP.

En este trabajo se utilizó el panel comercial P051 de MRC-HOLLAND que incluye sondas para los siguientes *loci* PARK: *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ1*, *LRRK2* y *ATP13A2* (Tabla 4).

MLPA es una reacción de sondas múltiples dependientes de ligando, cada sonda es específica para una secuencia diferente de ADN y permite obtener el número de copias relativo para la secuencia de interés. Cada sonda está **compuesta por dos medias sondas (5' y 3')** las cuales constan de una secuencia específica para el blanco de interés y una secuencia complementaria a un cebador universal (**extremos 5'**) el cual permite la amplificación de todas las sondas simultáneamente.

Una de las medias sondas también contiene una secuencia espaciadora que permite la diferenciación durante la electroforesis mediante un tamaño único para cada sonda amplificada. La reacción de MLPA se puede dividir en cinco pasos:

(1) Desnaturalización de DNA e hibridación con las sondas. Las dos medias sondas son capaces de reconocer la secuencia blanco específica y solo cuando se obtiene una complementariedad absoluta después de la hibridación ambas medias sondas pueden ser ligadas y amplificadas. La PCR utiliza solo un par de cebadores universales, donde el oligonucleótidos sentido va marcado con fluorescencia (FAM).

El número de sondas ligadas y amplificadas nos da una medida del número de secuencias blanco en la muestra. La separación de los productos de PCR marcados con fluorescencia se realiza mediante electroforesis capilar en condiciones desnaturalizantes. La altura de cada amplicón debido a la fluorescencia (o área bajo la curva) cuantifica la cantidad de producto de PCR, después de la normalización con sondas de genes de copia única y comparada con muestras de DNA de varios controles. De esta última comparación se obtiene la cantidad relativa de secuencia blanco en la muestra analizada. También nos permite ver mutaciones puntuales a pesar de que esta técnica principalmente un método que identificación de mutaciones estructurales por excelencia y no es adecuado para detectar mutaciones puntuales desconocidas. Sin embargo, el MLPA es capaz de discriminar mutaciones puntuales conocidas, como el caso de la mutación de interés para este trabajo p.A30P que se encuentra dentro del panel comercial ya que solo se lleva a cabo la ligación con la secuencia blanco, sí es el complemento inverso perfecto de la secuencia de la sonda, resultando en una disminución de la señal en el caso de que una secuencia de DNA y la sonda no coincidan.

**Tabla 4.** Composición de panel comercial P051 de MLPA.

<b>P051</b>
<i>PINK1</i> Exón 1,2,3,4,5,6,7,8
<i>SNCA</i> Exón 2a, 3 A30P, 4, 5, 6 7b
<i>PARK2</i> Exón 1,2,3,4r,5r,6,7,8,9,10,11,12
<i>LRRK2</i> Exón 41 G2019S
<i>PARK7 (DJ1)</i> Exón 1b, 3 ( <i>TNFRSF9</i> ), 3, 5, 7
<i>ATP13A2</i> Exón 2, 9

## **2.0 Planteamiento del problema**

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente y la cuarta causa de consulta en el INNNMVS. El diagnóstico clínico de esta entidad sólo se confirma en el análisis histopatológico *postmortem* de los cerebros de los pacientes ya que no existen biomarcadores que nos ayuden al diagnóstico temprano de la EP. Así mismo, hasta la fecha no hay un biomarcador que apoye en el reconocimiento temprano del deterioro cognitivo leve en la EP, ya que con el tiempo, la EP en estos pacientes tienen una mayor probabilidad de presentar deterioro cognitivo mayor comparado con los que sólo presentan EP sin DCL. Urge identificar nuevos marcadores de DCL que faciliten una intervención temprana modificando estilo de vida y terapéutica en estos pacientes para retrasar, en lo posible, la presencia de un DCM y mejorar su calidad de vida.

### **3.0 Justificación del problema**

A lo largo de la caracterización clínica de la EP se ha remarcado la importancia de los síntomas motores, ya que son estos los que clínicamente llevan al diagnóstico, dejando de lado los síntomas no motores que aparecen primero en la EP. Tal es el caso del deterioro cognitivo leve que aparece en un inicio de la enfermedad y puede derivar en un deterioro cognitivo mayor hasta en un 80% de los pacientes con EP, incrementando considerablemente los costos de salud. Por ello es importante encontrar un método de diagnóstico del DCL para un mejor abordaje en la clínica de los pacientes. En este trabajo se buscó abordar el estudio completo del gen de SNCA como un marcador predictivo candidato de deterioro en la cognición de pacientes con EP.

## **4.0 Hipótesis**

Las alteraciones en el gen de la alfa sinucleína se asociarán con deterioro cognitivo en algunos casos con EP.

## **5.0 Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

Determinar la prevalencia de todo tipo de alteraciones (secuencia, dosis y SNP de riesgo) del gen *SNCA* en 62 muestras de pacientes con enfermedad de Parkinson esporádica y su asociación con deterioro cognitivo.

#### **5.1.1 Objetivos secundarios**

Realizar la correlación clínica entre el deterioro cognitivo en los pacientes y el tipo de la alteración (polimorfismo o mutación de secuencia/dosis) en *SNCA*.

## **6.0 Sujetos y Métodos**

## **6.1 Pacientes**

Se evaluaron 62 pacientes con diagnóstico clínico de EP no relacionados con diferentes grados de deterioro cognitivo (clasificados en tres grupos, ver más adelante) y que se encontraran dentro del protocolo de cognición y EP del INNN. Adicionalmente se incluyeron 170 controles para los estudios de comparación.

### **6.1.1 Criterios de inclusión para pacientes**

Pacientes mestizo mexicanos\*\* con diagnóstico clínico de EP que aceptaran participar en el protocolo de investigación, ambos géneros, con la escala de cognición MoCA o MMSE aplicadas en el Instituto y que firmaran carta de consentimiento informado (Anexo 3).

### **6.1.2 Criterios de inclusión para controles**

Personas mestizo mexicanas, ambos géneros, clínicamente sanas sin antecedentes de enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas, que aceptaran participar en el protocolo de investigación y firmarán carta de consentimiento informado (Anexo 4). Los controles incluidos en el presente trabajo fueron pareados por edad (+/- 5 años) y género con los pacientes y provienen de un estudio anterior para EP (Dávila; 2014). Es importante aclarar que los datos de frecuencias de los SNP de **SNCA** en población mexicana ya se tenían, junto con otros factores epidemiológicos que no se usaron en este trabajo.



### **6.1.3 Criterios de exclusión de pacientes**

Pacientes que fueran de nacionalidad extranjera, que no contaran con alguna escala de evaluación de cognición (MMSE o MoCA), que no hubiese muestra disponible de DNA o que no aceptaran participar voluntariamente en el protocolo.

### **6.1.4 Criterios de exclusión de controles**

Personas que fueran de nacionalidad extranjera, que no hubiese muestra disponible, que presentasen antecedentes de enfermedades neurodegenerativas o neuropsiquiátricas, así como aquellas que no aceptaran participar voluntariamente en el protocolo.

## **6.2 Características de los pacientes**

Género: 43.5% mujeres y 56.5% varones.

Se dividieron en 3 grupos:

- Pacientes con EP sin deterioro cognoscitivo con 27-30 puntos en el MoCA (N=16).
- Pacientes con EP con DCL con 25-26 en el MoCA (N=11).
- Pacientes con EP con DCM <24 puntos en el MoCA (N=35).

Cada grupo de pacientes fue evaluado por médicos neurólogos especialistas en desórdenes del movimiento. Adicionalmente se les dio seguimiento de 18 meses y las pruebas neuropsicológicas se aplicaron un total de tres veces, cada 6 meses.

Definición de mestizo mexicano (MM): Para poder ser considerado mestizo, un donador debía haber nacido en el estado de reclutamiento, y lo mismo se pide de sus dos padres y cuatro abuelos. Se trata de un criterio operacional ampliamente usado por antropólogos del periodo indigenista. Así mismo, se checan los apellidos (López-Beltrán C., et al; 2013).

### **6.3 Tipo de muestra**

Las muestras de DNA de pacientes y controles se obtuvieron de sangre periférica por venopunción recolectada en tubos *Vacutainer™* con citrato de sodio como anticoagulante. Todas las muestras se manejaron de manera confidencial de acuerdo a los principios éticos internacionales y fueron codificadas para su manejo posterior.

#### **6.3.1 Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica**

Por cada volumen de sangre periférica se le agregan 3 volúmenes de amortiguador de lisis de glóbulos rojos (BLGR) ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,155 mM,  $\text{KHCO}_3$  10mM, EDTA 0,1mM a pH=7,4). Esta reacción se agita en un tubo cónico de 15mL, después se centrifuga 3000rpm/6min para lisar las células rojas mediante un choque osmótico y obtener el mayor número de células blancas limpias. Después se le agrega 570  $\mu\text{L}$  de NaCl 5mM, se agita por 2 minutos, esta solución se agrega para provocar la ruptura de las membranas. Se agregan 40 $\mu\text{L}$  de SDS 10% v/v (provoca la formación de micelas lipídicas) y se agita durante 5 minutos más para agregarle 200 $\mu\text{L}$  de NaCl 7M (precipita proteínas). Se agita por 10 minutos y se centrifuga a 11500rpm/20min, dejando el DNA en solución.

El sobrenadante se pasa a un tubo con 600 $\mu\text{L}$  de cloroformo-isoamílico (49:1 v/v) y se centrifuga a 14000rpm/15min, en este paso se retiran todos los

componentes orgánicos remanentes de la muestra. Posteriormente se pasa el sobrenadante de la capa superior a otro tubo limpio con 600  $\mu$ L de etanol absoluto con lo cual el DNA precipita y se retiran la mayoría de las sales restantes al retirar el sobrenadante después de centrifugar a 14000rpm/15min, el botón es lavado con alcohol etílico al 70% como paso adicional de limpieza de sales. Se seca la muestra con vacío y el DNA se resuspende con agua libre de nucleasas.

#### **6.4 Cuantificación de DNA**

1. Se utilizó un equipo NanoDrop200 (*Spectrophotometer Thermo Scientific*).
2. Se cuantificó 1 $\mu$ L de cada una de las muestras de DNA, previa homogenización por 15 minutos a 37°C a 850rpm (*Thermomixer confort*, Eppendorf).
3. Se midió la absorbancia (A) de la muestra a tres longitudes de onda a 260nm, 280nm y a 230nm.
4. Se evaluaron dos cocientes. Para la relación A260/280 se espera que la lectura se encuentre en el rango de 1.8 -2.0; ya que si es menor podría haber contaminación por proteínas. La relación A260/230 deseable es de 1.8-2, ya que en caso contrario indica contaminación por carbohidratos, fenol o EDTA.

#### **6.5 Genotipificación de tres mutaciones puntuales en SNCA**

En este trabajo sólo genotipificamos las tres mutaciones con patogenicidad probada experimentalmente.

Se amplificó la región de interés mediante PCR de punto final y después se procedió a la restricción enzimática para la identificación de cada mutación como se puede observar en las Figuras 8 y 9. La mezcla de reactivos requerida para amplificar cada exón se encuentran en la Tabla 5, mientras que en la

Tabla 6 podemos observar el programa que se utilizó en el termociclador. Los oligonucleótidos empleados y las enzimas de restricción para el tamizaje de las mutaciones por PCR-RFLP fueron previamente publicadas (Krüger, et al; 1998, Chan, et al; 2000 y Dávila, et al; 2012).

```

2581 caaagtgtat tttatgtttt ccagtgtggt gtaaaggaat tcattagcca tggatgtatt
2641 catgaaagga ctttcaaagg ccaaggaggg agttgtggct gctgctgaga aaaccaaaca
2701 ggggtgtggca gaagcaCcag gaaagacaaa agagggtggt ctctatgtag gtaggtaaac
2761 cccaaatgtc agtttgggtgc ttgttcatga gtgatggggtt aggataatca atactctaaa

```

**Figura 8.** Secuencia parcial del exón 2 de *SNCA* (NM\_001146055). Se muestra la secuencia de los oligonucleótidos en color azul y en rosa el nucleótido que cambia para la mutación p.A30P.

```

10021 agattgagat ttttaaatta gttgtattga aaactagcta atcagcaatt taaggctagc
10081 ttgagactta tgtcttgaat ttgtttttgt aggctccaaa accaagAgagg gagtggtgca
10141 tgggtgtgAca acaggtgaagc tccattgtgc ttatatccaa agatgatatt taaagtatct
10201 agtgattagt gtggcccagt attcaagatt cctatgaaat tgtaaaacaa tcaActgagca
10261 ttctaagaac atatcAagtct tattgaaact gaattcttta taaagtattt ttaaataagg

```

**Figura 9.** Secuencia parcial del exón 3 de *SNCA*. Se muestra en azul la secuencia de oligonucleótidos y en rosa el nucleótido que cambia con la mutación p.E46K mientras que en verde se señala el que cambia para p.A53T.

**Tabla 5.** Reactivos y volúmenes para reacción de PCR de punto final para los exones 2 y 3 de *SNCA*.

Reactivo	Volumen (uL)
<i>Master Mix (Kappa2G Fast ReadyMix)</i>	12.5
Oligonucleótido sentido [10uM]	1
Oligonucleótido antisentido [10uM]	1
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas cbp 25uL	9.5
DNA (50ng/ μL)	1

**Tabla 6.** Programa de amplificación para el exón 2 y el exón 3 de *SNCA*, respectivamente.

Pasos del programa	Exón 2	Exón 3
Ciclos	35	35
Desnaturalización inicial	95 C por 3min	95 °C por 3min
Desnaturalización	95C por15s	95°C por15s
Alineación	54C por 15s	56°C por15s
Extensión	72 C por 1s	72 °C por1s
Extensión final	72C por 1min	72°C por 1min

La amplificación de los productos de PCR se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. En cada separación electroforética se empleó marcador de pesos moleculares de 100pb, *DNA V (Roche Applied Sciences)* en uno de los pocillos y las muestras amplificadas en proporción 5: 1 (muestra y colorante de carga).

Cada amplicón se visualizó en luz UV (fotodocumentador *Gel Doc™ X*, BIO-RAD, programa *Image Lab*). Si el amplicón correspondía al tamaño deseado, se procedía al corte enzimático para las mutaciones correspondientes.

### 6.5.1 Mutación p.A30P

Se utilizó la enzima de restricción *MvaI* de la marca *Thermo Scientific*<sup>™</sup> la cual crea un sitio de corte que produce dos fragmentos uno de 139pb y el otro de 56pb en presencia de la mutación (Krüger, et al; 1998). Abajo se observa la secuencia de corte de la enzima *MvaI*. La mezcla de reacción que se utilizó fue la que se muestra en la Tabla 7. Para verificar la acción de la endonucleasa, se incluyó un control de secuencia positiva de corte de la enzima. Este control correspondió a una secuencia parcial del exón 4 de *PSEN1* (371pb) que se amplificó bajo las condiciones reportadas en la literatura (Cruts et al; 1998) y se procedió a llevar la restricción enzimática según las condiciones de la Tabla 7, creando sitios de corte a 222pb, 131pb y 18 pb.

5' C C ↓ W G G 3'  
3' G G W ↑ C C 5'

**Tabla 7.** Reacción para digestión de PCR del exón 2 de *SNCA*.

Reactivo	Cantidad
Producto de PCR *	18 µL
Amortiguador Tango	2µL
Enzima** (10 U/µL)	1µL

\*Exón 2 o exón 3, \*\**MvaI* para la mutación *p.A30P*, *StyI* para p.E46K y *Tsp45I* para p.A53T.

### 6.5.2 Mutación p.E46K

Se utilizó la enzima de restricción *StyI* (*Eco130I*) (*Thermo Scientific*<sup>™</sup>) en las proporciones señaladas en la Tabla 7 para llevar a cabo la digestión enzimática. Esta enzima, en muestras con genotipo silvestre crea un sitio de

corte produciendo dos fragmentos 149 y 70pb (Dávila, et al; 2012), abajo podemos observar la secuencia que reconoce la enzima en la secuencia para realizar el corte enzimático.

```
5' C ↓ C W W G G 3'
3' G G W W C ↑ C 5'
```

### 6.5.3 Mutación p.A53T

Se utilizó la enzima de restricción *Tsp45I* (Thermo Scientific™), que reconoce una secuencia específica para realizar el corte enzimático esta secuencia se puede observar abajo. En las muestras con alelo mutante crea un sitio de corte produciendo dos fragmentos 91 y 128 pb, respectivamente (Chan, et al; 2000). La mezcla de reacción que se utilizó fue la que se muestra en la Tabla 7. Para verificar el buen funcionamiento de la enzima, se incluyeron controles positivos para la restricción enzimática con el exón 4 de *PSEN1* (371pb) el cual se amplificó bajo las condiciones reportadas en la literatura (Cruts et al; 1998) y se procedió a llevar la restricción enzimática según las condiciones de la tabla 7, creando sitios de corte a 247pb y 124pb.

```
5' ↓ G T S A C 3'
3' C A S T G ↑ 5'
```

### 6.6 Cálculo de la dosis génica para cada exón del gen *SNCA*

La dosis génica se determinó mediante PCR-TR, empleando el gen *RNasaP* como control por ser un gen de copia única. El cálculo se determinó por el método comparativo  $\Delta\Delta CT$  el cual compara los resultados de dosis entre el gen diana (*SNCA*) y el endógeno (*RNasaP*) para la muestra problema y un control respectivamente, y después compara los resultados entre paciente y control

(Manual PCR Tiempo Real Applied Biosystems). El equipo de PCR en tiempo real empleado fue **Step One** (AB) y el paquete comercial empleado para la PCR fue de la marca **KAPA Biosystems**.

Cada muestra de DNA se analizó por triplicado y se utilizaron controles sanos en cada corrida. La mezcla de reacción para la PCR TR se observa en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Reactivos y volúmenes de reacción para cuantificación relativa de la dosis de cada exón de **SNCA** mediante PCR-TR.

Reactivo	Cantidad por reacción (µL)
<b>Master Mix Fast QPCR (Kappa Biosystems)</b>	5
Oligonucleótidos y sonda <b>RNasaP</b> marcada con VIC	0.5
Oligonucleótidos y sonda de un exón de <b>SNCA</b> marcada con FAM	0.5
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	3
DNA (50ng/ µL)	1
Volumen total de reacción	10

### 6.6.1 Confirmación de alteraciones de dosis de **SNCA** por amplificación de sondas dependientes de ligando

La reacción de MLPA se realizó según las especificaciones del protocolo publicado por el fabricante (MRC-Holland, 2011), modificando los volúmenes de reactivo (Tabla 9), el programa de amplificación está en la Tabla 10.



**Tabla 9.** Reactivos y volúmenes para cada uno de los pasos de la reacción de MLPA.

<b>Reacción de Hibridación</b>	
Reactivo	Volumen (µL)
DNA (50ng/µL)	5
Amortiguador	0.75
<i>Master Mix, MRC Holland</i>	0.75
<b>Reacción de Ligación</b>	
Amortiguador A	1.5
Amortiguador B	1.5
Ligasa	0.5
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	12.5
<b>Reacción de PCR</b>	
Polimerasa	0.25
Mezcla de PCR	1
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	3.75

**Tabla 10.** Programa de amplificación para MLPA.

<b>Programa termociclador</b>	
<b>Desnaturalización de ADN</b>	
Temperatura	Tiempo
98° C	5 minutos
25 ° C	10 minutos
<b>Hibridación</b>	
95° C	1 minuto
60° C	16-20 horas
Reacción de ligación	
54 ° C	10 minutos
54 ° C	15 minutos
98° C	5 minutos
20 ° C	10 minutos
<b>Reacción PCR (*35 ciclos)</b>	
*95 ° C	30 segundos
*60° C	30 segundos
*72 ° C	60 segundos
72 ° C	20 minutos
15° C	10 minutos

## **6.7 Genotipificación de polimorfismos de SNCA**

El análisis de los polimorfismos se llevó a cabo mediante PCR-TR por discriminación alélica usando sondas tipo TaqMan® marcadas con fluorescencia (VIC para los alelos silvestres y FAM para los alelos mutantes). Para realizar las reacciones de genotipificación se empleó la mezcla de reacción de la Tabla 11.

**Tabla 11.** Reacción de PCR-TR empleada en la genotipificación de SNP de *SNCA*

Reactivo	Cantidad por reacción (µL)
<i>Master Mix Fast QPCR (Kappa Biosystems)</i>	2.5
Oligonucleótidos y Sonda <i>TaqMan</i> *	0.20
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	1.3
DNA (50ng/ µL)	1
Volumen total	5

\*rs2736990 C\_3208948\_10, rs7684318 C\_2950951\_10, rs356219 C\_1020193\_10, rs356220 C\_1020192\_10, rs356203 C\_3208950\_10, marca AB.

Las condiciones de PCR-TR para la discriminación alélica fueron las que se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Programa de amplificación en tiempo real para discriminación alélica.

Etapas del programa	Temperatura y tiempo
Temperatura inicial	60°C por 10 segundos
Desnaturalización inicial*	95°C por 10 minutos
Desnaturalización*	95° por 15 segundos
Extensión*	60°C por 1 minutos
Extensión final	60°C por 30 segundos

\*Estos pasos se repitieron por 45 ciclos.

Cada placa se selló con un adhesivo óptico y se centrifugó a 3000 rpm por 1 min. La placa se colocó en el equipo STEP ONE y se corrió con el programa de amplificación correspondiente.

Con los resultados obtenidos de la genotipificación de los SNP de *SNCA* se realizaron diferentes análisis estadísticos: (1) Cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg; (2) Se empleó el programa *Haploview* 4.2 para determinar el

desequilibrio de ligamiento; (3) Se realizó la construcción de haplotipos con los SNP estudiados para los diferentes grupos; y (4) Cuando hubo diferencia estadísticamente significativa entre grupos, se calculó el *odds ratio (OR)* con ayuda del software EpiInfo v.70.

## 7.0 Resultados

### 7.1 Mutaciones puntuales.

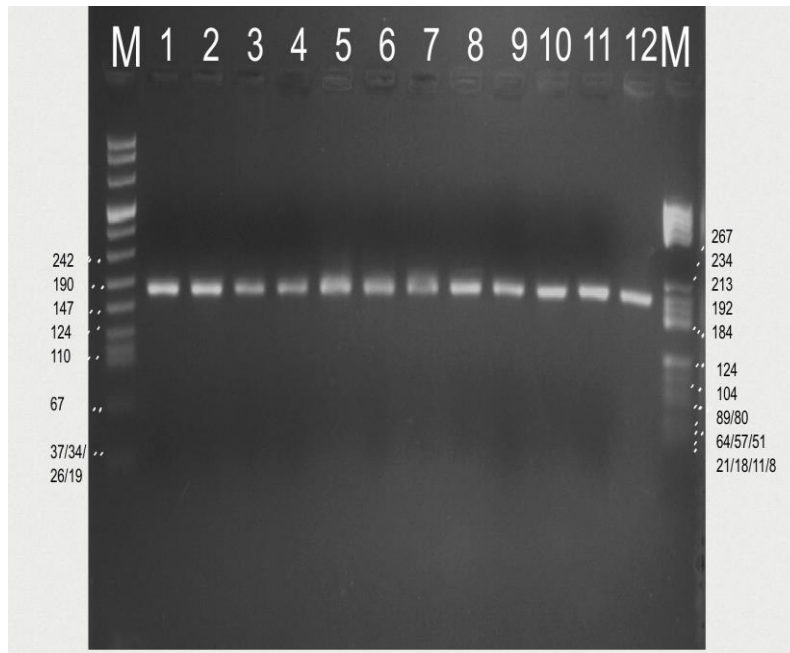
Se tamizaron las tres principales mutaciones puntuales de los exones 2 y 3 del gen *SNCA* (Figuras 10 y 11).

En relación a la presencia de la mutación p.A30P, todas las muestras de pacientes resultaron con genotipo silvestre. La Figura 12 muestra una imagen representativa de los resultados obtenidos para la mutación p.A30P no hay restricción enzimática ya que todas las bandas de los carriles 1 al 7 son de igual tamaño que el producto no digerido del carril 8 (192pb), los marcadores de peso molecular se encuentran en los carriles de ambos extremos del gel. El resultado que esperábamos para la mutación heterocigota eran tres bandas de 192, 136 y 56pb (Krüger, et al; 1998). El control positivo de la restricción enzimática (Figura 15) se realizó utilizando el exón 4 de PSEN1 (371pb) (Cruts et al; 1998) y se puede observar 2 fragmentos en el carril 1 que corresponde a 222 y 131 pb respectivamente, no se alcanza a distinguir el fragmento de 18 pb, en el carril 2 está el producto no digerido.

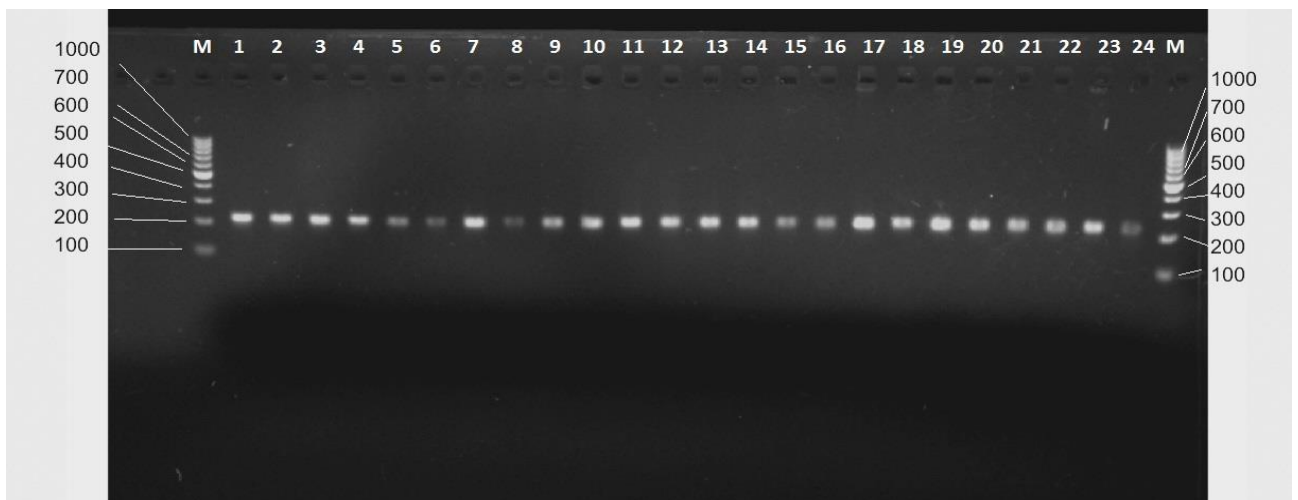
Todas las muestras analizadas para la mutación p.E46K mostraron genotipo silvestre. En la Figura 13 se observa la digestión del exón 3 de *SNCA* con la enzima *StyI*. El primero y último carriles corresponden a los marcadores de pesos moleculares DNA VIII y DNA V (Roche), respectivamente. Los carriles 1 al 6 corresponden a los productos digeridos con la enzima *StyI*, el carril 7 contiene al amplicón no digerido de 219 pb. En este caso, los fragmentos con

genotipo silvestre fueron restringidos dando dos productos de 149 pb y 70pb (Dávila, et al; 2012).

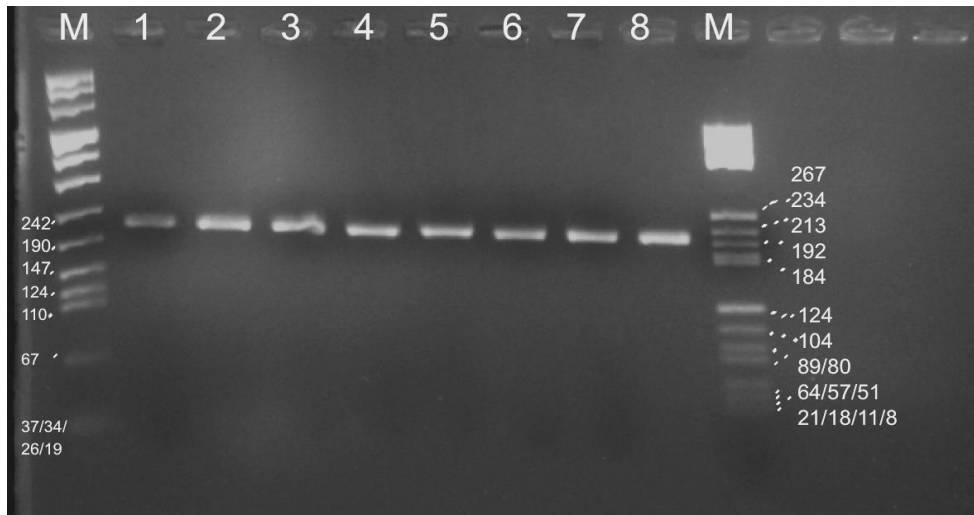
En el caso de mutación p.A53T, todas las muestras resultaron también con genotipo silvestre. La Figura 14 corresponde a la separación electroforética para verificar la mutación p.A53T, nuevamente vemos en los extremos de la imagen a los marcadores de peso molecular DNA VIII y DNA V de Roche, respectivamente. En los carriles 1 al 23 se muestran los productos digeridos por la enzima *Tps45I*; en el carril 24 el producto no restringido de 219 pb. En este caso como el genotipo silvestre no provoca la restricción enzimática no tenemos que ver el corte por lo cual se ve al cabo de la digestión una banda a los 219pb. En caso de que se tuviese un mutante se esperarían tres bandas una a 219 y otras dos 128pb y 91pb ya que es una mutación heterocigota (Chan, et al; 2000). El control positivo de la restricción enzimática (Figura 16) se realizó utilizando el exón 4 de *PSEN1* (371pb) (Cruts et al; 1998) y se puede observar 2 fragmentos en el carril 1 que corresponde a 247 y 124 pb respectivamente en el carril 2 está el producto no digerido.



**Figura 10.** Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para la resolución de la amplificación del exón 2 de *SNCA* (192 pb). Los carriles 1-12 corresponden a muestras de pacientes con EP. En los extremos, se incluye el marcador de pesos moleculares DNA VIII y DNA V (Roche), respectivamente.



**Figura 11.** Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para la resolución de la amplificación del exón 3 de *SNCA* (219pb). Los carriles 1-24 corresponden a muestras de pacientes con EP. En los extremos, se incluye el marcador de pesos moleculares *Gender 100 pb DNA Ladder*.



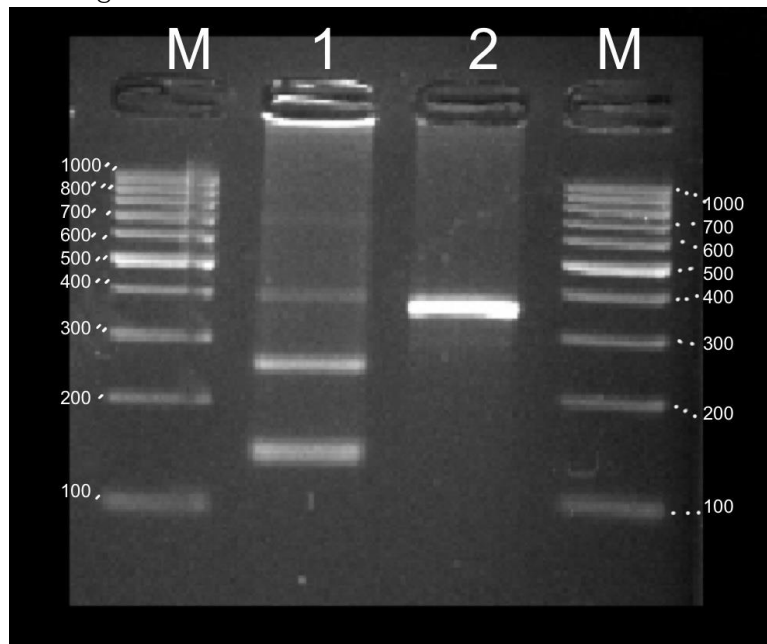
**Figura 12.** Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para la resolución de la digestión con la enzima *MvaI* para el exón 2 de *SNCA*. Los carriles 1-7 corresponden a muestras de pacientes con EP con genotipo silvestre. Carril 8, amplicón no digerido (192pb). En los extremos, se incluye el marcador de pesos moleculares DNA VIII Roche (izquierda) y DNA V Roche (derecha).



**Figura 13.** Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa al 4% para la resolución de la digestión con la enzima *StyI* del exón 2 de *SNCA*. Los carriles 1-6 corresponden a muestras de pacientes con EP con genotipo silvestre (149 y 70pb), en el carril 7 se incluyó producto de PCR sin digerir (219pb). En los extremos, se incluye el marcador de pesos moleculares DNA VIII Roche (izquierda) y DNA V Roche (a la derecha).

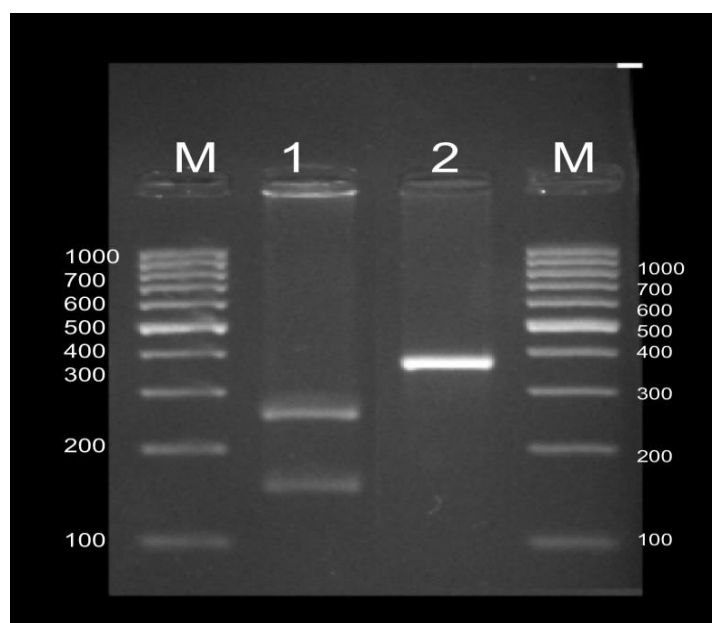


**Figura 14.** Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa al 4% para la resolución de la digestión enzimática del exón 3 de *SNCA* con la enzima *Tps45I*. Los carriles 1-23 corresponden a muestras de pacientes con EP con genotipo silvestre para la mutación (219pb), el carril 24 es un producto de PCR no digerido. En los extremos se incluye el marcador de peso molecular *Gender 100 pbDNA Ladder* Invitrogen.



**Figura 15.** Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa al 4% para la resolución de la digestión enzimática del exón 4 de *PSEN1* con la enzima *MvaI* como control positivo para la restricción con la endonucleasa. En el carril 1 se muestra la digestión enzimática para el control CT632 (222 y 131 pb), el carril 2 es un producto de PCR no digerido (371pb). En los extremos se incluye el marcador de peso molecular *Gender 100 pbDNA Ladder* Invitrogen.





**Figura 16.** Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa al 4% para la resolución de la digestión enzimática del exón 4 de *PSEN1* con la enzima *Tps45I* como secuencia control positiva para corte por la endonucleasa. En el carril 1 se muestra la digestión enzimática para el control CT632 (247 y 124 pb), el carril 2 es un producto de PCR no digerido (371pb). En los extremos se incluye el marcador de peso molecular *Gender 100 pbDNA Ladder* Invitrogen.

## 7.2 Alteraciones de dosis de *SNCA*

De los 62 pacientes con EP analizados para alteraciones estructurales de *SNCA*, se identificaron tres muestras que tenían alteración en la dosis génica. Esto se evaluó mediante PCR-TR como se puede observar en la Figura 17 para la muestra PK181. En la Tabla 13 se resumen los resultados para las muestras que se identificaron con alteración y los resultados para la dosis de cada exón de *SNCA*. Estas alteraciones estructurales fueron confirmadas por MLPA, empleando un control sin alteraciones de dosis en ninguno de los exones de *SNCA* (Figura 19). La Figura 18, muestra los resultados confirmatorios de MLPA. La Tabla 14 resume las alteraciones estructurales de *SNCA* y los datos clínicos de cada paciente.

**Tabla 13.** Resultados de PCR TR y MLPA para muestra con dosis génica alterada de *SNCA* de pacientes con EP

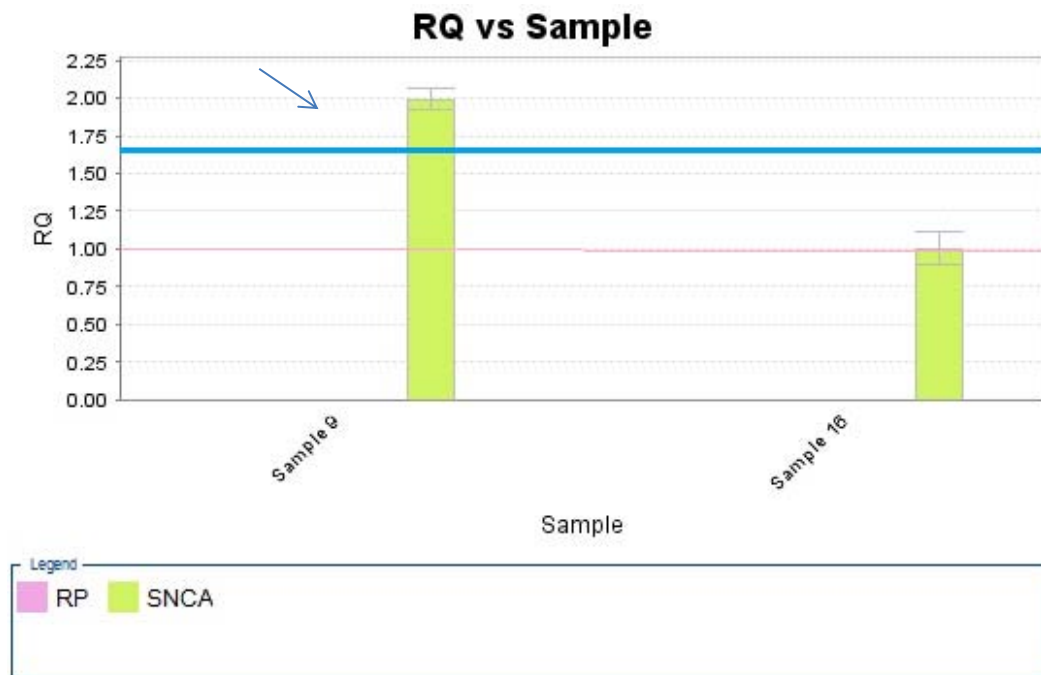
Muestra	Técnica	Exón 2	Exón 3	Exón 4	Exón 5	Exón 6	Exón 7	p.A30P
PK181	<b>PCR TR</b>	<b>1.86**</b>	<b>1.54**</b>	<b>1.31**</b>	<b>1.41**</b>	<b>1.82**</b>	<b>1.9**</b>	<b>NA</b>
	<b>MLPA</b>	<b>1.46**</b>	NA	<b>1.79**</b>	<b>1.92**</b>	<b>2.02**</b>	<b>1.41**</b>	<b>Silvestre</b>

\*\* Dosis génica alterada. NA=No aplica.

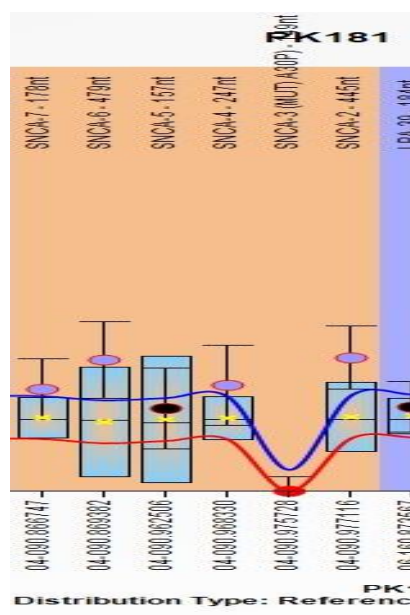
**Tabla 14.** Resumen de resultados y datos clínicos por paciente con alteración estructural de *SNCA*.

Muestra	Alteración estructural	H y Y	MoCA	Edad de inicio (años)
PK181	Duplicación homocigota 2-7	4	15	46

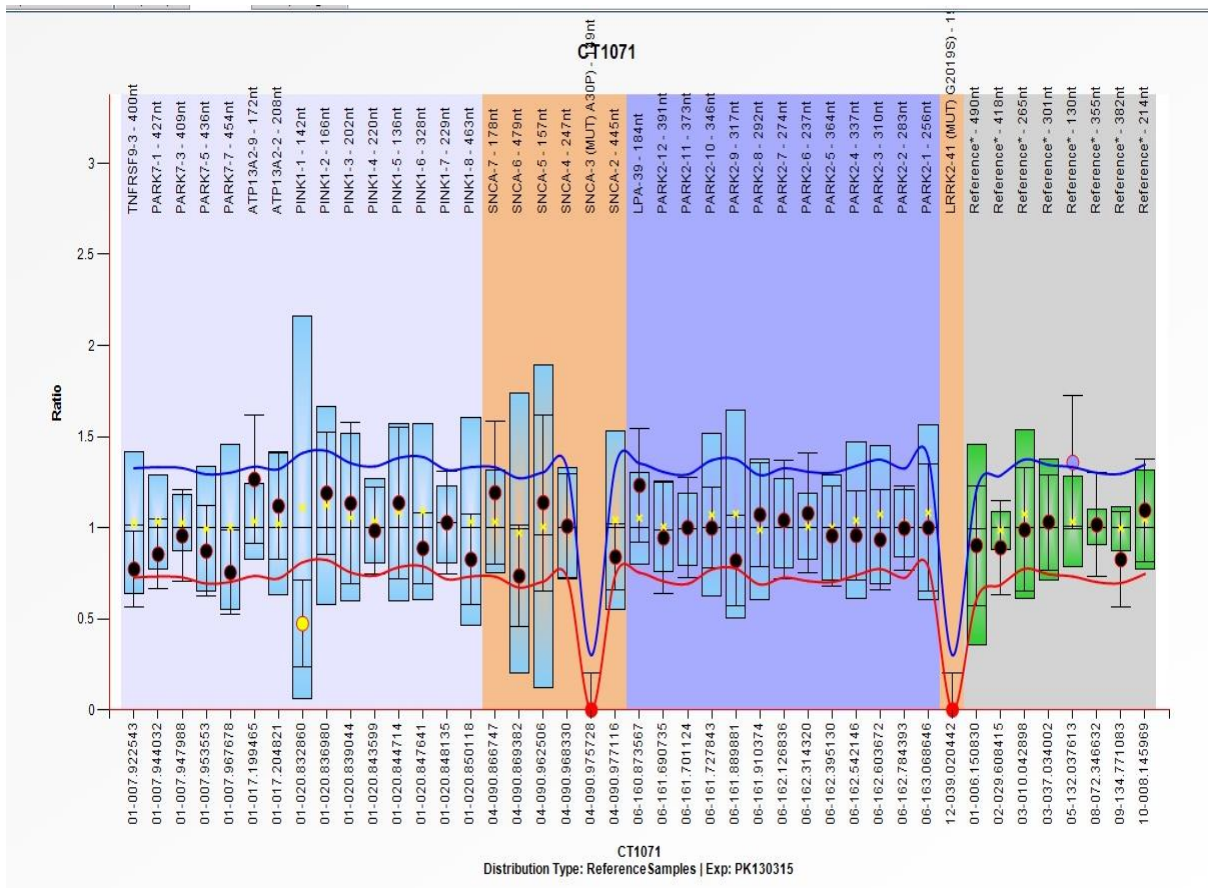
\*La muestra era de muy mala calidad.



**Figura 17.** Gráfico de cuantificación relativa para **SNCA** exón 2 de la muestra PK181. Se muestra la gráfica de cuantificación relativa para el exón 2. La línea azul que marca el límite para duplicación homocigota y la segunda en color rosa que marca la comparación con el blanco, La flecha nos indica la dosis para la muestra PK181.



**Figura 18.** Confirmación por MLPA muestra PK181. Se muestra el gráfico de MLPA para la confirmación de la duplicación de los exones 6, 5, 4 y 2 de **SNCA** para la muestra PK181.



**Figura 19.** MLPA de una muestra control, CT1071. En el eje de las X, se indica la dosis de genes *PARK* alternando colores, en el eje de las Y, se indica la dosis relativa (0.7-1.2 se considera normal).

Cabe mencionar que se tenían otras dos muestras con posible alteración de la dosis génica (PK190 y PK585), una de ellas la PK190 presentaba delección heterocigota de los exones 4-7 *SNCA*, lo cual no está reportado en la literatura. Debido a que la muestra era de mala calidad se procedió a repetir el análisis con muestra de reciente extracción, los resultados no pudieron confirmarse y la dosis fue normal.

Esto indica que el resultado de la dosis de *SNCA* en PK585 no es confiable y deberá repetirse en una muestra fresca, ya que también teníamos una muestra de baja calidad así como resultados inconsistentes. Por lo que los únicos resultados compatibles con alteración de dosis fueron los del caso PK181.

### 7.3 Polimorfismos de un solo nucleótido de *SNCA*

Mediante PCR-TR se genotipificaron las 62 muestras de pacientes con EP para los SNP rs356219, rs356220, rs7684318, rs35603 y rs2736990 de *SNCA*. En la Tabla 15 se muestran los genotipos para los pacientes con EP y cognición normal, en la Tabla 16 se muestran los genotipos para los pacientes con DCL y en la Tabla 17 se muestran los genotipos de los pacientes con EP y con DCM. En las Figuras 20 y 21 se pueden ver los gráficos de discriminación alélica para cada uno de los polimorfismos estudiados.

Primero, con los genotipos obtenidos se analizaron los haplotipos de los 62 pacientes con EP mediante el programa *Haploview* 4.2. En la Figura 22 se observan los gráficos con los valores de  $D'$  y  $R^2$ , valores que determinan si existe un desequilibrio de ligamiento (**DL**) entre los polimorfismos estudiados, así como la frecuencia de los 13 haplotipos encontrados. Se consideró que existía desequilibrio de ligamiento cuando se obtenían valores de  $D' > 70$  y  $R^2 > 40$  (Gabriel, et al; 2012).

Después se trabajó con los 170 controles MM, los resultados se muestran en la Figura 23. De manera interesante, se encontró que en este grupo existía un desequilibrio de ligamiento más bajo que para el grupo de pacientes.

Posteriormente se realizó el estudio de asociación de los cinco SNP con EP utilizando los grupos de controles y pacientes. En este análisis se observó que las frecuencias alélicas del rs356219 no se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg (HW), razón por la cual no fueron incluidos para el análisis de haplotipos. En la Figura 24 se muestran los gráficos de  $D'$  y  $R^2$  para los cuatro SNP restantes; en ellos se puede observar que no hay un desequilibrio de ligamiento ya que ninguno pasa de los 0.7 para  $D'$  y 0.4 para  $R^2$  (Gabriel, et al; 2012). En la Tabla 19 se observa que los SNP rs356220 (alelo T), rs7684318 (alelo C) y rs356203 (alelo A) se encuentran positivamente asociados con EP. Asimismo, se encontró que la combinación de los alelos TCAC se encuentra con

mayor frecuencia en el grupo de pacientes que en el de controles ( $p < 0.05$ , Tabla 20) para los SNP rs356220, rs7484318, rs356203 y rs2736990 de **SNCA**. También se realizó el estudio para evaluar si alguno de los polimorfismos estudiados se asocian con deterioro cognitivo de los pacientes con EP. En la Figura 25 se muestran las **frecuencias haplotípicas y los gráficos de  $D'$  y  $R^2$** , en este caso los SNP si se encontraron en equilibrio HW (Tabla 21) por lo que todos los polimorfismos pudieron ser incluidos en el análisis por haplotipos. En el estudio de asociación se consideraron a los pacientes con cognición normal como controles y pacientes con DCM fueron considerados como los casos. Se observó que ninguno de los polimorfismos (Tabla 22) o combinaciones alélicas (Tabla 23) se encontraron asociados con deterioro cognitivo en EP.

Para el siguiente estudio de asociación se agruparon los pacientes con cualquier grado de deterioro cognitivo y se compararon con aquellos que presentaron cognición normal. En la Figura 26 se observan las frecuencias haplotípicas así como los diagramas de  $D'$  y  $R^2$  para este grupo. En todos los casos, las frecuencias se encontraron en equilibrio de HW (Tabla 24). En los estudios de asociación por SNP (Tabla 25) y por haplotipo (Tabla 26) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Debido a que se observó que el SNP rs2736990 tenía valores de desequilibrio de ligamiento más bajos con los SNP rs356219, rs356220, rs7684318 y rs35603 se decidió realizar el estudio de haplotipos sin incluir el SNP rs2736990 (Figura 27). Por lo tanto, se formaron tetraplotipos con los SNP rs356219, rs356220, rs7484318 y rs356203. Nuevamente, no se encontró algún SNP asociado con deterioro cognitivo (Tabla 27). Sin embargo, el estudio por haplotipos demostró que la combinación de GTTA confería un riesgo disminuido para deterioro cognitivo en pacientes con EP (Tabla 28).

Considerando este análisis, se realizó el estudio entre los pacientes de deterioro cognitivo y el grupo de controles. En la Figura 28 se muestra la frecuencia de los haplotipos y los diagramas de  $D'$  y  $R^2$ . El SNP rs356219 no se encontraba en equilibrio de HW por lo cual se eliminó para la formación de

haplotipos (Tabla 29). Los valores de  $D'$  y  $R^2$  mostraron un DL bajo, por lo que no fue posible formar haplotipos, sino que se consideraron como combinación de alelos que portan los pacientes. En el estudio de asociación se encontró que los SNP rs356220, rs7484318 se encontraban asociados a la EP con deterioro cognitivo (Tabla 30), al igual que la combinación TCAC (Tabla 31). No obstante estos polimorfismos y el tetraplotipo ya se habían asociado inicialmente con EP.

En cuanto a los resultados para los diferentes SNP y combinaciones alélicas que mostraron diferencias significativas, podemos observar en la Tabla 32 el OR obtenido para los rs356203, rs356220, rs7484318 y para la combinación de los SNP rs356220, rs7484318, rs356203 y rs2736990: TCAC y TTAC al comparar pacientes con EP y controles sanos. Se observó que con excepción de la combinación de alelos TTAC que tiene una frecuencia de 0.17, todas los OR son mayor a uno, lo que sugiere que un aumento en el riesgo para EP.

En la Tabla 33 se observan las combinaciones GTTAC y GTTA, en este caso tenemos un valor por encima de uno y otro por debajo de uno, sin embargo debido a que ambos valores en el intervalo de confianza incluyen la unidad, se pierde la asociación, esto se puede atribuir al tamaño de muestra. En este caso cabe mencionar que al revisar los datos de los MoCA de los pacientes con deterioro cognitivo, aquellos que tenían la combinación alélica GTTA que confería riesgo para EP con deterioro de la cognición, mostraron puntajes en el MoCA más bajos ubicándose dentro del grupo DCM (**MoCA $\leq$ 24**), mientras que los pacientes con la combinación alélica GTTAC mostraban puntajes del **MoCA en su mayoría dentro del grupo de cognición normal (MoCA $\geq$ 27)**.

En la Tabla 34 tenemos el cálculo de OR para SNP rs356220, rs7484318 y la combinación TCAC, donde se puede observar que todos los casos poseen un valor de OR mayor a uno, el valor mayor fue el de la combinación TCAC, OR =7.15.

**Tabla 15.** Resultados por paciente de cada polimorfismo de *SNCA* estudiado para pacientes con EP y cognición normal.

Muestra	rs356219	rs356220	rs7684318	rs356203	rs2736990
PK338	G G	C T	C C	A A	C C
PK314	G G	T T	T T	A A	T T
PK116	A A	C C	T T	G A	T T
PK476	G A	C T	C T	G A	C T
PK299	G G	T T	T C	A A	C C
PK302	G A	T C	T C	G A	C C
PK186	G G	T T	T C	A A	C C
PK162	A A	T C	T C	G A	C C
PK58	G A	T T	T C	A A	C T
PK613	G G	T T	T C	A A	C C
PK599	G G	T T	C C	A A	C C
PK48	G A	T T	T C	A A	C C
PK604	G G	T T	T T	A A	C C
PK43	G G	T T	C C	A A	T T
PK527	G A	T C	T C	G A	C T
PK400	G A	T C	T C	G G	T T

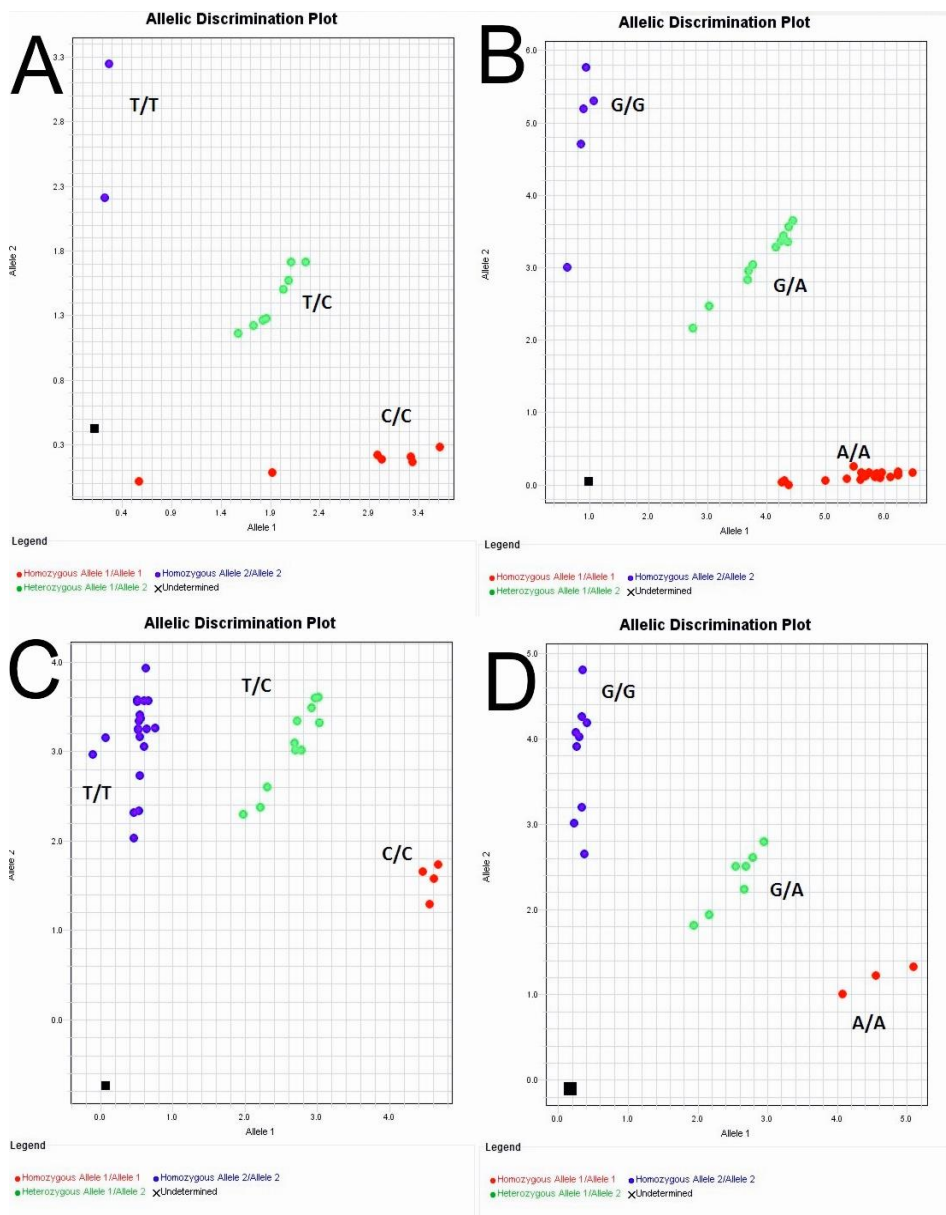
**Tabla 16.** Resultados por cada polimorfismo de *SNCA* estudiado para pacientes con EP y deterioro cognitivo leve.

Muestra	rs356219	rs356220	rs7684318	rs356203	rs2736990
PK38	G A	T C	T C	G A	C T
PK190	G G	T T	C C	A A	C C
PK82	A A	C C	T T	G G	T T
PK275	A A	T C	T C	G A	C T
PK585	A A	C C	T T	G G	C C
PK187	G G	T T	C C	A A	C C
PK522	A A	C C	T T	A A	C C
PK73	G A	C T	T T	G G	T T
PK308	G G	T T	C C	G G	T T
PK279	G A	C C	C T	A A	C T
PK379	G G	T T	C T	G A	T T

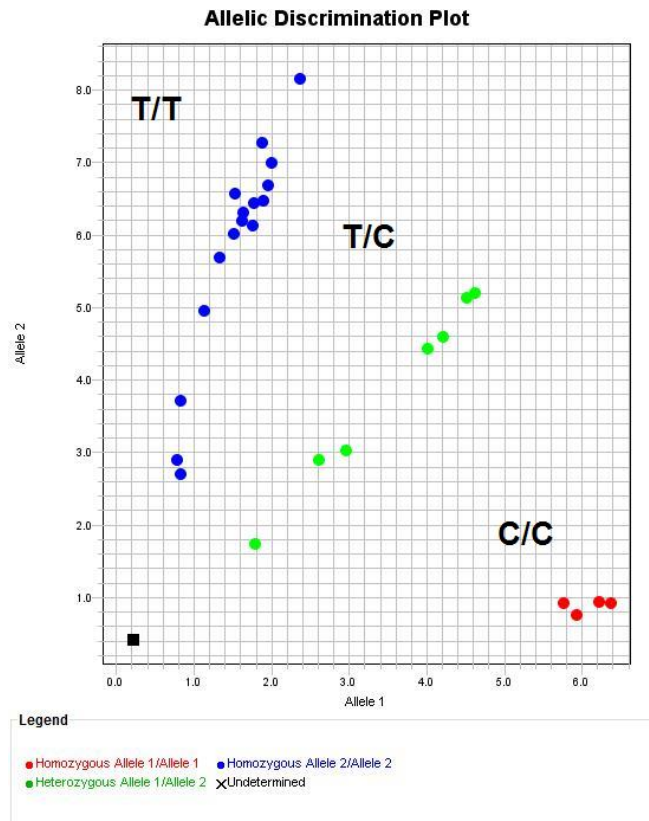


**Tabla 17.** Resultados de cada polimorfismo de *SNCA* para pacientes de EP y deterioro cognitivo mayor.

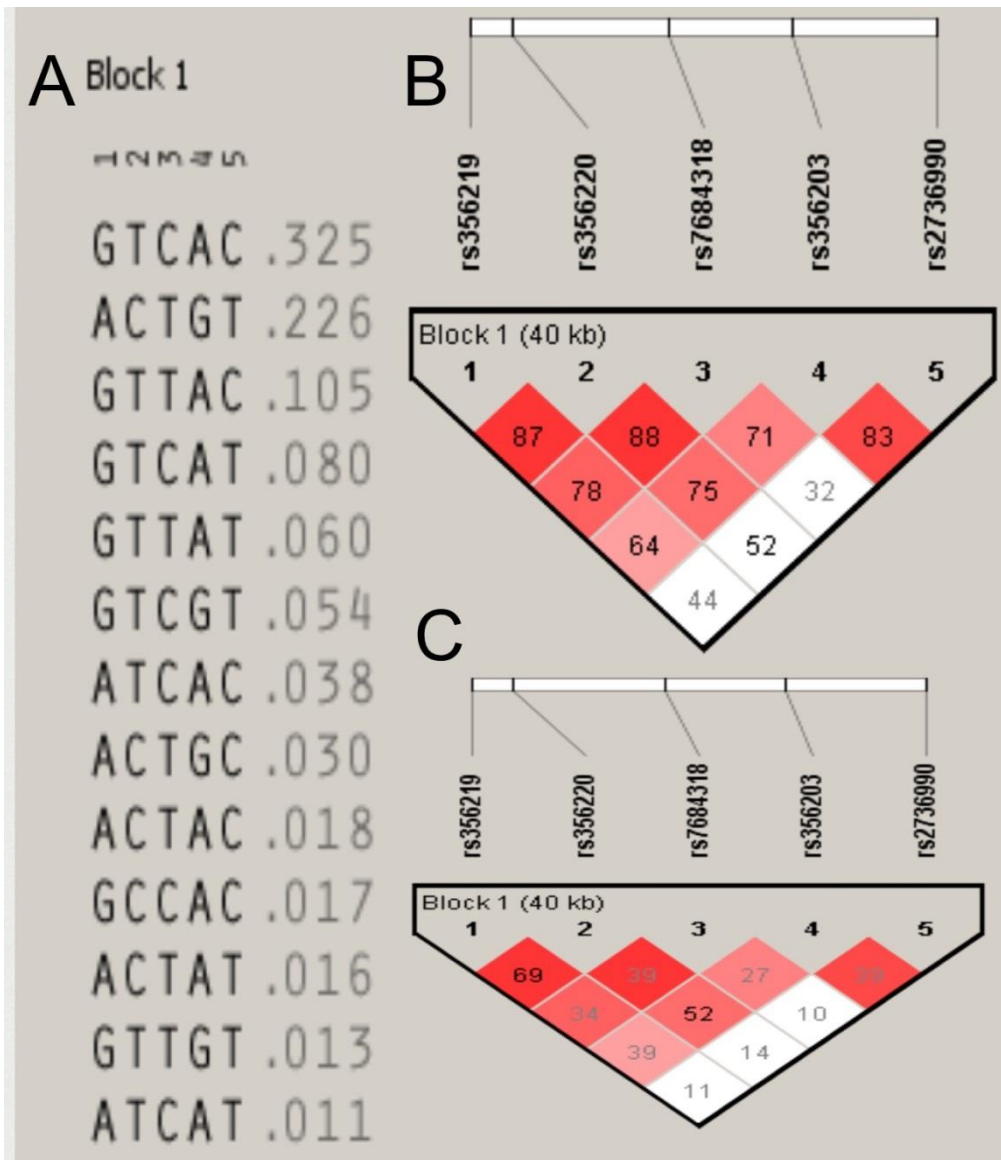
Muestra	rs356219	rs356220	rs7684318	rs356203	rs2736990
PK271	G G	T T	C C	A A	C C
PK181	G G	T T	C C	A A	C C
PK298	A A	C C	T T	G G	T T
PK8	G A	T C	T C	G A	C T
PK144	G G	T T	C C	A A	C C
PK69	G A	T C	T C	G A	C T
PK23	G G	T T	C C	A A	C C
PK559	G A	T C	T C	G A	C T
PK452	G G	T T	C C	A A	C C
PK285	G G	T T	C C	A A	C C
PK50	A A	C C	T T	G G	T T
PK87	G G	T T	T C	A A	C C
PK322	G G	T T	T T	A A	C C
PK49	G A	T T	C C	A A	C C
PK101	G G	T T	C C	A A	C T
PK143	G A	T C	T T	G A	C T
PK681	G A	T C	T C	G A	C T
PK154	A A	C C	T T	G G	T T
PK290	G A	T C	T C	G A	C T
PK293	G G	T T	C C	A A	T T
PK291	G A	C T	C T	G A	C T
PK551	G G	T T	C C	A A	T T
PK66	G A	C T	T T	G A	C T
PK128	G A	C T	T T	G A	C T
PK83	G A	C T	C T	G A	C T
PK75	G A	C T	T T	G A	C T
PK211	G A	C T	C T	G A	C T
PK93	G G	C T	C T	G A	C T
PK2	G A	T T	C C	A A	T T
PK653	G G	T T	T T	A A	T T
PK51	G G	T T	C C	A A	C C
PK474	G G	T T	C C	G G	T T
PK319	G G	T T	C T	A A	T T
PK312	G G	T T	C T	G A	T T
PK34	G A	C T	C T	G A	C T



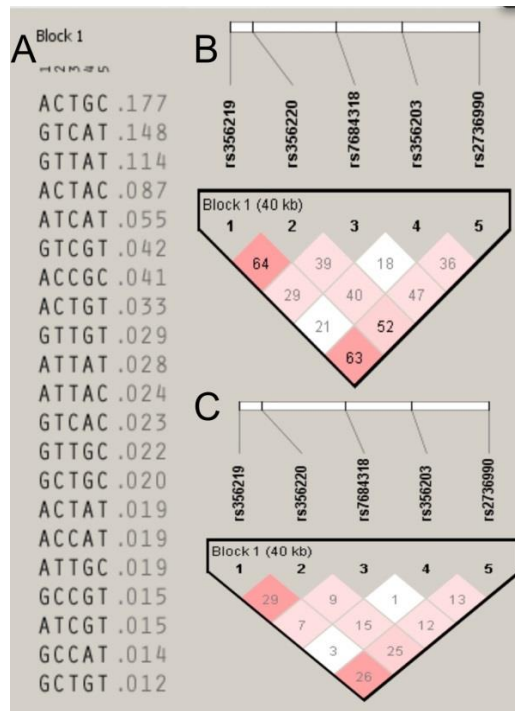
**Figura 20.** Gráficas de discriminación alélica para el polimorfismo rs7684318, rs356203, rs356220 y rs356219 (A-D, respectivamente). En color azul se muestra el genotipo homocigoto mutante; en verde, el heterocigoto; y en rojo, los homocigotos silvestres para cada polimorfismo analizado.



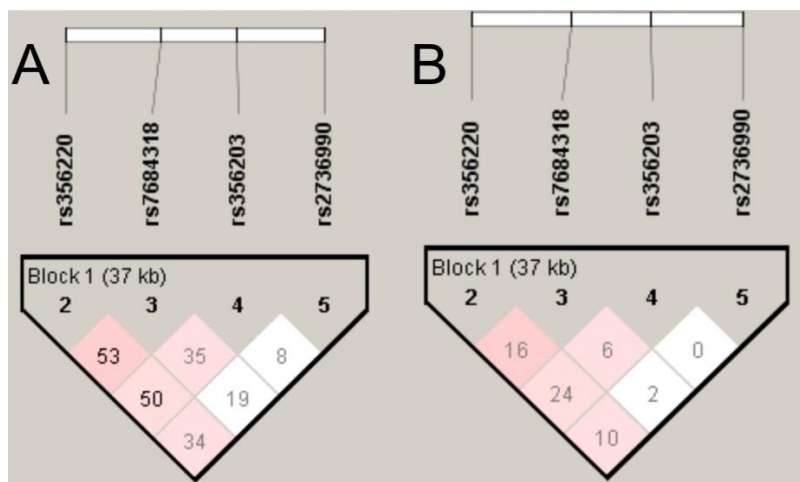
**Figura 21.** Gráfica de discriminación alélica para el polimorfismo rs2736990. En color azul se observa el genotipo homocigoto mutante; en verde, el heterocigoto; y en rojo, los homocigotos silvestres para este polimorfismo.



**Figura 22.** Formación de haplotipos y frecuencias haplotípicas en pacientes con EP, (A) Haplotipos y sus frecuencias obtenidas por el programa *Haploview*. (B) Gráfico con valores de  $D'$ . (C) gráfico de  $R^2$ . En color rojo se observan los polimorfismos con mayor desequilibrio de ligamiento (DL).



**Figura 23.** Formación de haplotipos y frecuencias haplotípicas en 170 control sanos. (A) Haplotipos y sus frecuencias obtenidas por el programa *Haploview*. (B) Gráfico con valores de  $D'$ . (C) gráfico de  $R^2$ . En color rojo se observan los polimorfismos con mayor desequilibrio de ligamiento (DL).



**Figura 24.** Gráficos de  $D'$  y  $R^2$  obtenidos del estudio de asociación de 62 pacientes con EP y 170 controles sanos. A Gráfico de  $D'$  en color se observan los polimorfismos con mayor DL en el estudio de asociación. B Gráfico de  $R^2$  en color se muestran los SNP con mayor DL en controles y pacientes.

**Tabla 18.** Frecuencias alélicas y valores de p para equilibrio de Hardy Weinberg de los polimorfismos estudiados.

#	Name	Position	ObsHET	PredHET	HWpval	%Geno	FamTrio	MendErr	MAF	Alleles
1	rs356219	89716450	0.375	0.5	2.0E-4	100.0	0	0	0.489	G:A
2	rs356220	89720189	0.431	0.488	0.0936	100.0	0	0	0.422	T:C
3	rs7684318	89733852	0.448	0.493	0.2024	100.0	0	0	0.44	T:C
4	rs356203	89744890	0.418	0.484	0.0474	100.0	0	0	0.412	A:G
5	rs2736990	89757390	0.457	0.498	0.2506	100.0	0	0	0.466	T:C

Name= nombre, Position=posición, ObsHET=Frecuencia observada de heterocigotos, PreHET=Frecuencia calculada de heterocigotos, HWpval= valor de p para el equilibrio de Hardy Weinberg, %Geno= porcentaje de genotipos incluidos, Fam Trio= tríos familiares incluidos, Men err= error mendeliano por marcador, MAF= Alelo de menor frecuencia, Alleles= alelos.

**Tabla 19.** Estudio de asociación de casos y controles por SNP.

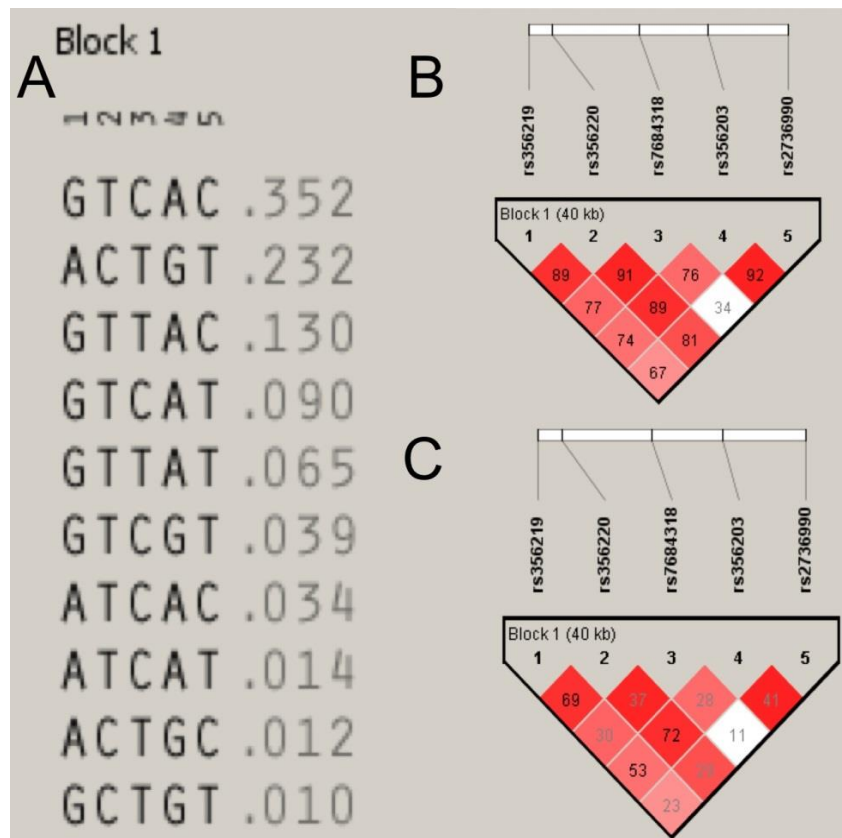
#	Name	Assoc Allele	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
2	rs356220	T	0.685, 0.538	8.075	0.0045
3	rs7684318	C	0.524, 0.409	4.909	0.0267
4	rs356203	A	0.669, 0.559	4.583	0.0323
5	rs2736990	C	0.532, 0.441	3.03	0.0818

Name=nombre, Assoc allele =alelo asociado, Case= frecuencia alélica en el grupo de casos, Control ratios=frecuencia alélica en el grupo de controles, Chi square = Valor de Chi cuadrada, p value=valor de p.

**Tabla 20.** Estudio de asociación de haplotipos para controles (n=170) y pacientes con EP (n=62).

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
<b>Haplotype Associations</b>				
<input type="checkbox"/> Block 1				
TCAT	0.180	0.165, 0.185	0.25	0.6169
CTGC	0.166	0.123, 0.182	2.279	0.1311
TTAT	0.122	0.089, 0.134	1.723	0.1893
TCAC	0.108	0.267, 0.050	44.63	2.3796E-11
CTGT	0.078	0.114, 0.065	2.948	0.086
CTAC	0.072	0.037, 0.084	3.069	0.0798
TCGT	0.061	0.060, 0.061	0.0010	0.9717
TTAC	0.047	0.083, 0.034	4.718	0.0299
CCGC	0.032	0.010, 0.039	2.528	0.1119
TTGT	0.029	0.019, 0.033	0.652	0.4195
CCAT	0.026	0.009, 0.033	2.05	0.1522
TTGC	0.024	0.002, 0.031	3.322	0.0684
CTAT	0.023	0.010, 0.028	1.24	0.2655
CCGT	0.015	0.003, 0.020	1.849	0.1739
CCAC	0.011	0.010, 0.011	0.01	0.9221

Haplotype=haplotipo, Freq=frecuencia, Case=caso, control=controles proporción, Chi square= valor de Chi cuadrada, p value= Valor de p.



**Figura 25.** Formación de haplotipos y frecuencias haplotípicas en pacientes con EP con DCM y EP con cognición normal, (A) Haplotipos y frecuencias obtenidas por el programa *Haploview*. (B) Gráfico con valores de  $D'$ . (C) gráfico de  $R^2$ . En color rojo se observan los polimorfismos con mayor desequilibrio de ligamiento (DL).

**Tabla 21.** Estudio de verificación de SNP para los pacientes con DCM vs. Pacientes con EP y cognición normal.

#	Name	Position	ObsHET	PredHET	HWpval	%Geno	FamTrio	MendErr	MAF	Alleles
1	rs356219	89716450	0.412	0.423	1.0	100.0	0	0	0.304	G:A
2	rs356220	89720189	0.392	0.398	1.0	100.0	0	0	0.275	T:C
3	rs7684318	89733852	0.451	0.497	0.6518	100.0	0	0	0.461	C:T
4	rs356203	89744890	0.392	0.415	0.8801	100.0	0	0	0.294	A:G
5	rs2736990	89757390	0.373	0.497	0.1124	100.0	0	0	0.461	C:T

Name= nombre, Position=posición, ObsHET=Frecuencia observada de heterocigotos, PreHET=Frecuencia calculada de heterocigotos, HWpval= valor de p para el equilibrio de Hardy Weinberg, %Geno= porcentaje de genotipos incluidos, Fam Trio= tríos familiares incluidos, Men err= error mendeliano por marcador, MAF= Alelo de menor frecuencia, Alleles= alelos.

**Tabla 22.** Estudio de asociación entre pacientes con EP y cognición normal vs. EP con DCM.

#	Name	Assoc Allele	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
1	rs356219	G	0.700, 0.688	0.016	0.8987
2	rs356220	C	0.286, 0.250	0.141	0.7076
3	rs7684318	C	0.557, 0.500	0.289	0.5911
4	rs356203	G	0.329, 0.219	1.276	0.2587
5	rs2736990	T	0.500, 0.375	1.381	0.2399

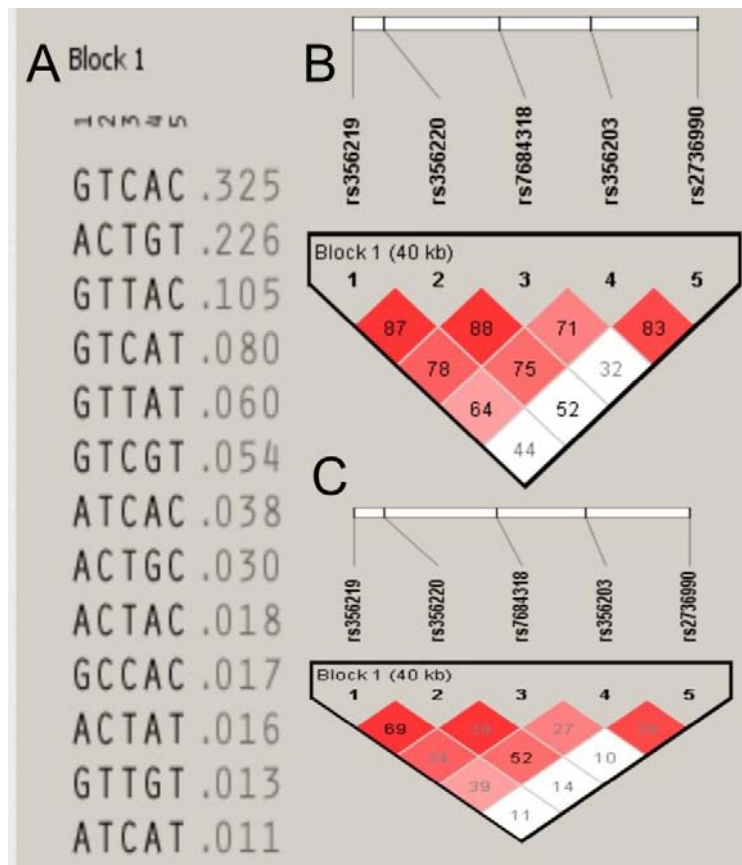
Name=nombre, Assoc allele =alelo asociado, Case= frecuencia alélica en el grupo de casos, Control ratios=frecuencia alélica en el grupo de controles, Chi square = valor de Chi cuadrada, p value=valor de p.

**Tabla 23.** Estudio de asociación de haplotipos para pacientes con EP y cognición normal (N=16) vs. EP con DCM (N=35).

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
<b>Haplotype Associations</b>				
[-] Block 1				
GTCAC	0.352	0.383, 0.282	0.989	0.32
ACTGT	0.232	0.268, 0.155	1.574	0.2096
GTTAC	0.130	0.098, 0.199	1.952	0.1624
GTCAT	0.090	0.102, 0.065	0.371	0.5423
GTTAT	0.065	0.059, 0.079	0.153	0.6953
GTCGT	0.039	0.043, 0.031	0.079	0.7793
ATCAC	0.034	0.015, 0.077	2.568	0.1091
ATCAT	0.014	0.014, 0.014	0.0	0.983
ACTGC	0.012	0.003, 0.033	1.538	0.215
GCTGT	0.010	0.015, 0.000	0.449	0.5027

Haplotype=haplotipo, Freq=frecuencia, Case=caso, control=controles proporción, Chi square= valor de Chi cuadrada, p value= Valor de p.





**Figura 26.** Formación de haplotipos y frecuencias haplotípicas en pacientes con EP y cognición normal, y los pacientes con EP con deterioro cognitivo. (A) Haplotipos y sus frecuencias obtenidas por el programa *Haploview*. (B) Gráfico con valores de  $D'$ . (C) gráfico de  $R^2$ . En color rojo se observan los polimorfismos con mayor desequilibrio de ligamiento (DL).

**Tabla 24.** Estudio de verificación de SNP entre los pacientes con EP y cognición normal vs. Pacientes con EP y deterioro cognitivo.

#	Name	Position	ObsHET	PredHET	HWpval	%Geno	FamTrio	MendErr	MAF	Alleles
1	rs356219	89716450	0.387	0.448	0.391	100.0	0	0	0.339	G:A
2	rs356220	89720189	0.371	0.431	0.38	100.0	0	0	0.315	T:C
3	rs7684318	89733852	0.435	0.499	0.4166	100.0	0	0	0.476	C:T
4	rs356203	89744890	0.371	0.443	0.2902	100.0	0	0	0.331	A:G
5	rs2736990	89757390	0.355	0.498	0.0367	100.0	0	0	0.468	C:T

Name= nombre, Position=posición, ObsHET=Frecuencia observada de heterocigotos, PreHET=Frecuencia calculada de heterocigotos, HWpval= valor de p para el equilibrio de Hardy Weinberg, %Geno= porcentaje de genotipos incluidos, Fam Trio= tríos familiares incluidos, Men err= error mendeliano por marcador, MAF= Alelo de menor frecuencia, Alleles= alelos.

**Tabla 25.** Estudio de asociación por SNP de *SNCA* de pacientes con EP cognición normal vs. EP con deterioro cognitivo.

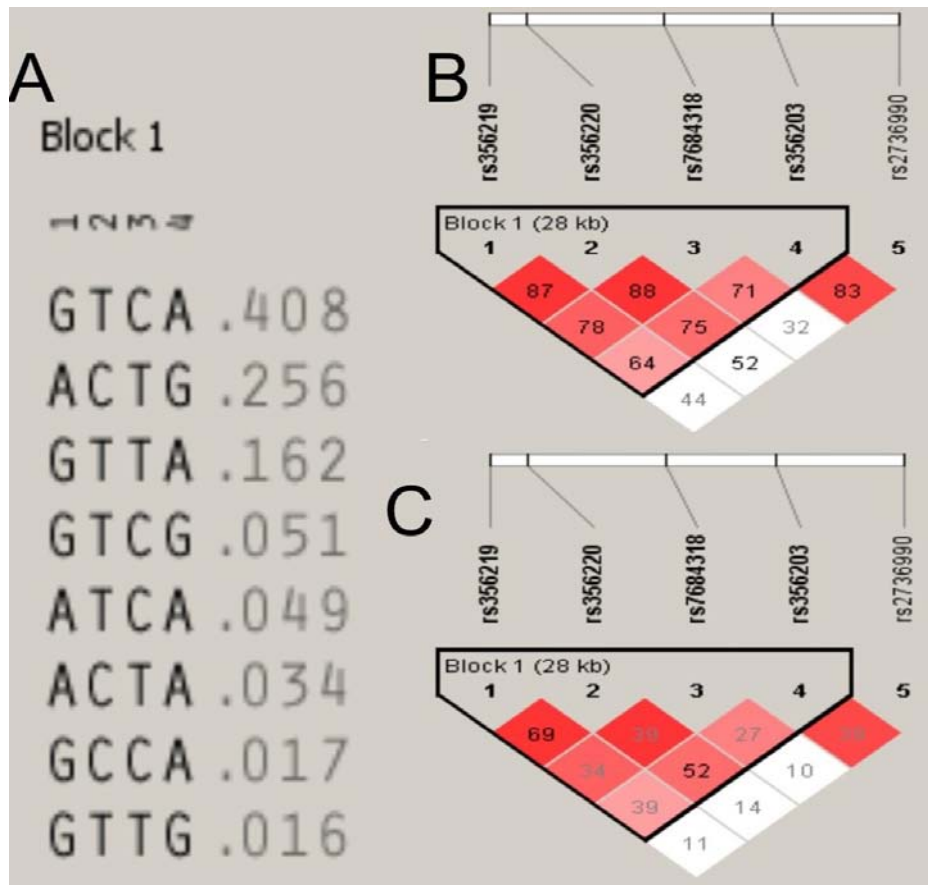
#	Name	Assoc Allele	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
1	rs356219	A	0.348, 0.312	0.132	0.7161
2	rs356220	C	0.337, 0.250	0.833	0.3615
3	rs7684318	C	0.533, 0.500	0.101	0.7504
4	rs356203	G	0.370, 0.219	2.44	0.1183
5	rs2736990	T	0.500, 0.375	1.49	0.2222

Name=nombre, Assoc allele =alelo asociado, Case= frecuencia alélica en el grupo de casos, Control ratios=frecuencia alélica en el grupo de controles, Chi square = Valor de Chi cuadrada, p value=valor de p.

**Tabla 26.** Estudio de asociación de haplotipos para pacientes con EP y cognición normal (N=16) vs. EP con deterioro cognitivo (N=46).

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
<b>Haplotype Associations</b>				
<input type="checkbox"/> Block 1				
GTCAC	0.325	0.342, 0.277	0.458	0.4988
ACTGT	0.226	0.252, 0.152	1.359	0.2437
GTTAC	0.105	0.073, 0.198	3.975	0.0462
GTCAT	0.080	0.085, 0.065	0.12	0.7288
GTTAT	0.060	0.052, 0.083	0.402	0.5258
GTCGT	0.054	0.061, 0.032	0.39	0.5324
ATCAC	0.038	0.022, 0.083	2.496	0.1141
ACTGC	0.030	0.029, 0.034	0.026	0.8731
ACTAC	0.018	0.023, 0.001	0.679	0.4099
GCCAC	0.017	0.012, 0.031	0.55	0.4584
ACTAT	0.016	0.011, 0.031	0.621	0.4305
GTTGT	0.013	0.017, 0.000	0.561	0.4537
ATCAT	0.011	0.011, 0.011	0.0010	0.9755

Haplotype=haplotipo, Freq=frecuencia, Case=caso, control=controles proporción, Chi square= valor de Chi cuadrada, p value= Valor de p.



**Figura 27.** Formación del tetraplotipo (rs356219, 35620, rs7684318 y rs356203) y frecuencias haplotípicas en pacientes con EP cognición normal y los pacientes con EP con deterioro cognitivo, (A) Haplotipos y sus frecuencias obtenidas por el programa *Haploview*. (B) Gráfico con valores de  $D'$ . (C) gráfico de  $R^2$ . En color rojo se observan los polimorfismos con mayor desequilibrio de ligamiento (DL).

**Tabla 27.** Estudio de asociación por SNP de *SNCA* con pacientes con EP y cognición normal vs. EP con deterioro cognitivo.

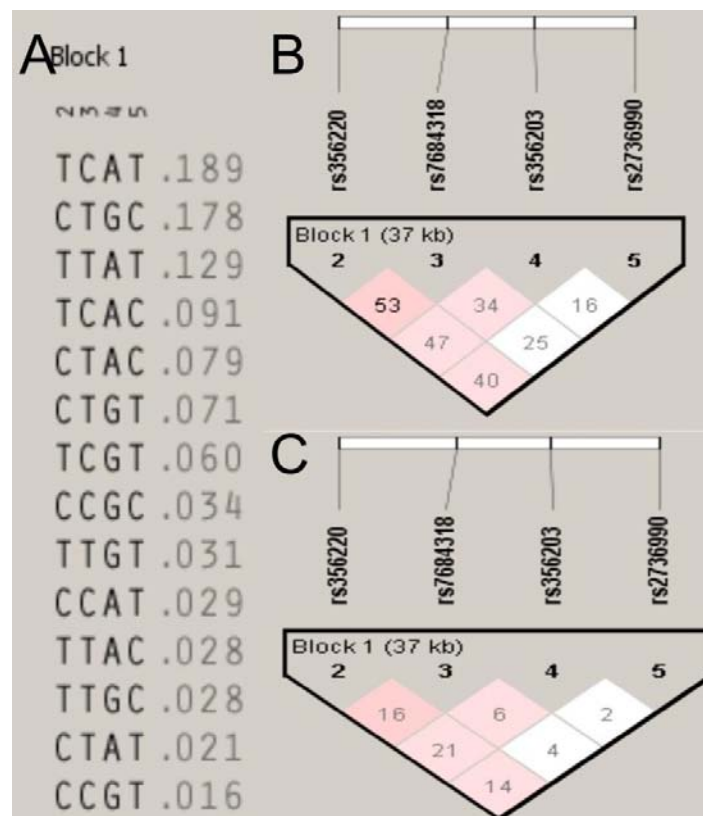
#	Name	Assoc Allele	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
1	rs356219	A	0.348, 0.312	0.132	0.7161
2	rs356220	C	0.337, 0.250	0.833	0.3615
3	rs7684318	C	0.533, 0.500	0.101	0.7504
4	rs356203	G	0.370, 0.219	2.44	0.1183
5	rs2736990	T	0.500, 0.375	1.49	0.2222

Name=nombre, Assoc allele =alelo asociado, Case= frecuencia alélica en el grupo de casos, Control ratios=frecuencia alélica en el grupo de controles, Chi square = Valor de Chi cuadrada, p value=valor de p.

**Tabla 28.** Estudio de asociación del tetraplotipo para pacientes con EP y sin deterioro cognitivo (n=16) vs. pacientes con EP y deterioro cognitivo (n=46).

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
<b>Haplotype Associations</b>				
Block 1				
GICA	0.408	0.431, 0.342	0.774	0.379
ACTG	0.256	0.280, 0.186	1.108	0.2925
GTTA	0.162	0.120, 0.281	4.547	0.033
GTCG	0.051	0.057, 0.033	0.294	0.5874
ATCA	0.049	0.033, 0.094	1.91	0.167
ACTA	0.034	0.035, 0.033	0.0030	0.9533
GCCA	0.017	0.012, 0.031	0.549	0.4589
GTTG	0.016	0.022, 0.000	0.717	0.3972

Haplotype=haplotipo, Freq=frecuencia, Case=caso, control=controles proporción, Chi square= valor de Chi cuadrada, p value= Valor de p.



**Figura 28.** Formación de haplotipos y frecuencias haplotípicas en pacientes con EP con deterioro cognitivo y controles sanos, (A) Haplotipos y sus frecuencias obtenidas por el programa *Haploview*. (B) Gráfico con valores de  $D'$ . (C) gráfico de  $R^2$ . En color rojo se observan los polimorfismos con mayor desequilibrio de ligamiento (DL).

**Tabla 29.** Estudio de verificación de SNP entre controles sanos y los pacientes con EP con deterioro cognitivo.

#	Name	Position	ObsHET	PredHET	HWpval	%Geno	FamTrio	MendErr	MAF	Alleles
1	rs356219	89716450	0.375	0.5	3.0E-4	100.0	0	0	0.498	A:G
2	rs356220	89720189	0.435	0.492	0.1132	100.0	0	0	0.435	T:C
3	rs7684318	89733852	0.435	0.492	0.1132	100.0	0	0	0.435	T:C
4	rs356203	89744890	0.426	0.489	0.073	100.0	0	0	0.426	A:G
5	rs2736990	89757390	0.472	0.496	0.5524	100.0	0	0	0.454	T:C

Name= nombre, Position=posición, ObsHET=Frecuencia observada de heterocigotos, PreHET=Frecuencia calculada de heterocigotos, HWpval= valor de p para el equilibrio de Hardy Weinberg, %Geno= porcentaje de genotipos incluidos, Fam Trio= tríos familiares incluidos, Men err= error mendeliano por marcador, MAF= Alelo de menor frecuencia, Alleles= alelos.

**Tabla 30.** Estudio de asociación de casos y controles por SNP.

#	Name	Assoc Allele	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
2	rs356220	T	0.663, 0.538	4.589	0.0322
3	rs7684318	C	0.533, 0.409	4.514	0.0336
4	rs356203	A	0.630, 0.559	1.519	0.2178
5	rs2736990	C	0.500, 0.441	1.011	0.3147

Name=nombre, Assoc allele =alelo asociado, Case= frecuencia alélica en el grupo de casos, Control ratios=frecuencia alélica en el grupo de controles, Chi square = Valor de Chi cuadrada, p value=valor de p.

**Tabla 31.** Estudio de asociación de haplotipos para controles sanos (N=170) y pacientes con EP y deterioro cognitivo (N=46).

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
<b>Haplotype Associations</b>				
Block 1				
TCAT	0.189	0.182, 0.191	0.034	0.8541
CTGC	0.178	0.144, 0.187	0.928	0.3353
TTAT	0.129	0.092, 0.139	1.447	0.229
TCAC	0.091	0.256, 0.046	38.589	5.2307E-10
CTAC	0.079	0.048, 0.087	1.531	0.216
CTGT	0.071	0.117, 0.058	3.832	0.0503
TCGT	0.060	0.068, 0.058	0.123	0.7257
CCGC	0.034	0.011, 0.040	1.834	0.1757
TTGT	0.031	0.025, 0.033	0.157	0.6917
CCAT	0.029	0.012, 0.033	1.161	0.2813
TTAC	0.028	0.037, 0.026	0.311	0.5772
TTGC	0.028	0.003, 0.035	2.715	0.0994
CTAT	0.021	0.002, 0.026	2.003	0.157
CCGT	0.016	0.001, 0.020	1.631	0.2016

Haplotype=haplotipo, Freq=frecuencia, Case=caso, control=controles proporción, Chi square= valor de Chi cuadrada, p value= Valor de p.

**Tabla 32.** Valores de OR para los SNP y haplotipos de *SNCA* entre pacientes con EP y controles sanos.

SNP o haplotipo	OR	IC 95%
rs356220	1.87	1.21-2.89
rs7684318	1.59	1.05-2.41
rs356203	1.6	1.04-2.46
TCAC	6.89	3.67-12.93
TTAC	0.17	0.09-0.34

**Tabla 33.** Valores de OR para la combinación de alelos entre pacientes con EP con deterioro cognitivo y sin deterioro cognitivo.

Combinación de alelos	OR	IC 95%
GTTAC	0.36	0.11-1.16
GTTA	2.04	0.43-9.73

**Tabla 34.** Valores de OR para los SNP y combinación de alelos entre pacientes con EP con deterioro cognitivo y controles sanos.

SNP o combinación de alelos	OR	IC 95%
rs356220	7.15	3.60-14.17
rs7684318	1.69	1.04-2.73
TCAC	1.65	1.04-2.62

## 8.0 Discusión

### 8.1 Mutaciones Puntuales para *SNCA*

Dentro de la muestra de estudio no se identificaron las mutaciones p.A30P, p.A53T y p.E46K mediante PCR-RFLP, ya que todos los pacientes presentaron genotipo silvestre. Esto puede deberse a que las mutaciones de *SNCA* (de secuencia y estructurales) no son muy frecuentes, pues de acuerdo con PDmutDB representan 13% a nivel mundial del total de mutaciones

relacionadas con EP. Adicionalmente, nuestros resultados son concordantes con los estudios realizados en población brasileña (Deng, et al; 2014), así como en un estudio previo de nuestro grupo de investigación, donde tampoco se encontraron estas mutaciones (Dávila et al; 2014). Sin embargo estas mutaciones fueron las que se incluyeron en el protocolo debido a que son las más frecuentes relacionadas con **SNCA** (*PDgeneDB* y Deng, et al; 2014).

En el caso de la mutación p.A30P, a nivel mundial sólo se ha identificado en una familia de origen alemán (Krüger, et al; 1998). Esta variante está asociada a un fenotipo de EP AD, vinculada a una mayor formación de oligómeros con respecto a la proteína silvestre y mayor neurotoxicidad debido a un mal plegamiento de la proteína (Wise-Scira, et al; 2013).

La mutación p.E46K se presenta en EP y demencia por cuerpos de Lewy, es autosómica dominante y se asocia con alucinaciones, generalmente visuales así como un deterioro cognitivo y hasta la fecha sólo se ha descrito en una familia española con múltiples afectados (Zarranz, et al; 2004 y *PDmutDB*).

La mutación p.A53T está documentada como una mutación patogénica asociada con el fenotipo de EP AD y de inicio temprano, ha sido descrita en 22 familias de orígenes distintos: griego, italiano, sueco y coreano (Puschmann, et al; 2009 y *PDmutDB*).

Las otras tres mutaciones puntuales descritas en **SNCA** no fueron abordadas en este trabajo debido a que se han reportado de manera aislada. En el caso de la mutación p.H50Q hay dos casos reportados en ingleses y canadienses. Para la mutación de p.G51D se han documentado sólo tres casos en población francesa y en el caso de la mutación p.A53E también están reportados tres casos de una sólo familia finlandesa (Deng, et al 2014; Pasanen, et al 2014 y *PDmutDB*).

## 8.2 Alteraciones en la dosis génica de *SNCA*

En la literatura se han descrito 35 familias con alteraciones de la dosis de *SNCA*; de éstas, 29 son duplicaciones y 6 triplicaciones ambas abarcan el gen completo (Elia, et al; 2013 y Kara, et al; 2014). Los pacientes con estas alteraciones presentan un fenotipo de EP de inicio temprano y deterioro cognitivo mayor y disturbios psiquiátricos (Elia, et al; 2013). En nuestros resultados (Tabla 13) para PCR TR observamos alta variabilidad en los resultados debido a la calidad de las muestras de DNA ya que PCR-TR es una técnica muy sensible (Manual de PCR en Tiempo Real, *Applied Biosystems*; 2012).

Para la muestra de PK181, la PCR TR dio duplicación de los exones 2-7 de *SNCA*. Esta duplicación homocigota de todo el gen concuerda con lo descrito en la literatura (Ibañez, et al; 2009). Cuando se realizó el MLPA de esta muestra (Tabla 15, Figuras 15 y 19) se verificó la duplicación homocigota de todo el gen de *SNCA*. Este paciente (PK181) cursaba con EP acompañado de DCM (MoCA con puntaje de 15). Otro dato que llama la atención para este paciente fue la escala modificada HyY que lo sitúa en la etapa 4, lo que nos dice que cursa una incapacidad grave, pero es capaz de caminar o permanecer de pie sin ayuda, además el paciente tuvo un inicio temprano de la EP (46 años) y 15 años de evolución de la enfermedad, con los síntomas motores particulares de la EP. Las características anteriores concuerdan con la literatura correspondiente a duplicaciones de *SNCA* (Kara, et al; 2014).

La cognición fue evaluada con el MoCA ya que esta prueba está estandarizada para pacientes mexicanos y se prefiere usar sobre el MMSE ya que no requiere un grado de escolaridad tan alto como en el MMSE, y adicionalmente el MoCA es más sensible para detectar DCL **debido a que no presenta efecto de “techo alto y de suelo”** (Cumming, et al; 2013 y Toribio-Díaz, et al; 2015). Estas



consideraciones son relevantes pues el paciente PK 181 contaba con sólo un año de escolaridad.

Este estudio de alteración en la dosis génica resulta importante en el seguimiento de pacientes con EP ya que se ha visto un rápido declive en la cognición en pacientes que la poseen y se podría buscar el tratamiento más conveniente para aplazar la aparición del DCM en este tipo de pacientes. El caso PK 181 con dosis génica alterada, muestra DCM, antecedentes heredo-familiares negativos y una EI temprano de la EP; estos hallazgos son concordantes con la literatura tanto para casos esporádicos como familiares de EP.

Adicionalmente, comparando nuestros resultados en población mestizo mexicana contra la población asiática, donde la frecuencia de duplicaciones es de 0.3% (2/687) para EP esporádica (Shin, et al; 2010), consideramos que nuestra prevalencia fue elevada del 1.6% (1/62), a pesar del tamaño reducido de nuestra muestra de estudio.

### **8.3 Polimorfismos de un solo nucleótido y su asociación con enfermedad de Parkinson y con el deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson**

Se genotipificaron los 62 pacientes con EP para los SNP rs356219, rs356220, rs2736990, rs7684318 y rs356203. En la Figura 22 se muestra el grado de desequilibrio de ligamiento para estos 62 pacientes con EP, donde todos mostraban un DL con  $D' > 0.7$  lo que indica que estas variantes genéticas se heredan en conjunto (Gabriel, et al; 2002), sin embargo, al realizar este mismo estudio incluyendo únicamente controles, no se encontraron los mismos valores de DL (Figura 23) esto posiblemente a que en población sana estos alelos no se están heredando juntos. Después se procedió a revisar los haplotipos y la frecuencia de los mismos para los 170 controles sanos y los 62 pacientes con EP donde como se puede ver en la Figura 24. Observamos un DL

menor para estos dos grupos, por lo cual no se pudieron construir haplotipos. En el análisis de asociación entre los SNP y la EP hubo una asociación entre los SNP: rs356220, rs764318 y el rs356220, los cuales mostraron valores de  $p=0.0045$  para el SNP rs356220,  $p=0.0267$  en el caso rs764318 y  $p=0.0323$ . En el caso del SNP rs356220, éste previamente estaba reportado en la literatura como SNP de riesgo para EP (Tabla 3) (Pankratz, et al; 2009). Debido a que no hubo un DL, no podemos decir que los alelos se están heredando en conjunto, sin embargo sí se encontró una diferencia significativa en la frecuencia de las combinaciones de alelos TCAC y TTAC de los polimorfismos rs356220, rs7684318, rs356203 y rs2736990 entre los pacientes y controles, por lo cual se puede considerar que los individuos portadores de esta combinación presentan un riesgo mayor de EP que los individuos que no la portan en la población mestizo mexicana. Estos resultados son valiosos ya que en la literatura no se había intentado ver la asociación de los cinco SNP estudiados en conjunto con la EP y solo se tienen trabajos de ellos por separado o con sólo cuatro de ellos (Miyake, et al; 2012 y Pankratz, et al; 2009). Al realizar el cálculo de las OR encontramos que los SNP rs356220, rs7684318 y rs356203 sí están asociados con la enfermedad aumentando el riesgo de presentar EP, al poseer este SNP, lo cual se esperaba debido a lo reportado previamente. Por otro lado la combinación para los SNP rs356220, rs7684318, rs35603 y rs2736990 (TCAC) presentó un  $OR=6.89$ , esta combinación aumenta el riesgo para desarrollo de la EP. Esta misma combinación se encontró para población mexicana en pacientes con EP y se reporta como de riesgo (Dávila et al; 2015, manuscrito en preparación). El caso contrario es para la combinación TTAC que mostró un  $OR=0.17$ , lo que sugiere a esta combinación como de riesgo menor para desarrollo de la EP. En el caso del grupo constituido por los pacientes con EP DCM y pacientes con EP sin deterioro cognitivo, no se encontró diferencia significativa en la frecuencia de los SNP entre pacientes EP con cognición normal y pacientes con EP con DCM. Al estudiar las frecuencias de los SNP y combinación de alelos de

los pacientes con EP sin deterioro cognitivo y pacientes con algún grado de deterioro cognitivo se encontró una combinación de alelos GTTAC que posee una menor frecuencia en casos que en controles lo que puede indicar una posible disminución en el riesgo de deterioro cognitivo en pacientes con EP que sean portadores de esta combinación para los SNP rs356219, rs356220, rs7684318, rs35603 y rs2736990. Para este grupo de pacientes también se formó un tetraplotipo considerando los primeros cuatro SNP que mantenían un DL, se observó que la frecuencia de la combinación GTTA posee diferencia significativa entre ambos grupos y que al igual que en el estudio de asociación incluyendo los 5 SNP, esta combinación tiene una mayor frecuencia en pacientes con EP y cognición normal que en pacientes con EP y deterioro cognitivo.

Como último grupo de comparación para el análisis estadístico se incluyeron a los pacientes de EP con algún grado de deterioro cognitivo y se compararon con los controles sanos. En este caso se encontraron asociados los SNP rs356220 y el rs7684318 que ya habían sido asociados en este trabajo con EP, y confirman lo reportado por otros grupos de trabajo (Pankratz y colaboradores; Dávila y colaboradores). Nuestros resultados de asociación de SNP de **SNCA** con EP y deterioro cognitivo justifican ampliar la muestra de pacientes. Esto sería importante para determinar si estos SNP se asocian sólo a riesgo incrementado de la enfermedad o también a deterioro cognitivo en la EP. Respecto a la combinación de alelos TCAC (SNP rs356220, rs7684318, rs356203 y rs2736990) se encontró una mayor frecuencia de la misma en el grupo de pacientes que en el de controles ( $p=5.2 \times 10^{-10}$ ) y mostró un OR= 7.15 aumentando el riesgo de deterioro cognitivo en EP. Sin embargo, tampoco es posible concluir que esta combinación de alelos se encuentre directamente relacionada con el aumento de riesgo de deterioro cognitivo en pacientes con EP ya que esta combinación de SNP se encontró asociada a EP en este trabajo. Además se confirmó la asociación presentada entre el SNP rs7684318 del intrón 4 en combinación con los SNP rs356220 o el rs356219 de

la zona 3' UTR de **SNCA** que aumentan el riesgo a EP (Yu, et al; 2010), esto se puede explicar ya que los SNP de la región 3' UTR están ligados a la expresión de **SNCA** a través de unión diferencial de microRNAs (miRNA). Los miRNAs son RNA pequeños (aproximadamente 19-23 nucleótidos de largo) no codificantes que se unen a la región 3' UTR de los mRNA y regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. A través de este proceso, los miRNA regulan muchos procesos celulares, y probablemente la desregulación de las vías de los miRNA podría asociarse al desarrollo de la EP (Cardo, et al; 2012). Algunos miRNA han sido implicados en la regulación postranscripcional de **SNCA** (Doxakis; 2010). Las variantes de DNA en las regiones 3'UTR de algunos genes, podrían crear o destruir los sitios diana de los miRNA, afectando la expresión génica. Esto podría explicar la asociación de los polimorfismos de esta región con el desarrollo de la EP (Cardo, et al; 2012).

## 9.0 Conclusiones

El presente trabajo es el primer estudio que analiza todos los tipos de alteraciones del gen de la alfa-sinucleína y su asociación con el deterioro cognitivo de la EP en pacientes mestizos mexicanos. En la muestra estudiada de pacientes con EP y deterioro cognitivo, no identificamos las tres mutaciones puntuales p.A30P, p.E46K y p.A53T. Sin embargo, no podemos descartar la presencia de otras mutaciones en el gen **SNCA** (afectando residuos 50 y 52, por ejemplo).

Se identificó un solo caso con duplicación homocigota del gen completo (PK181). El fenotipo de EP de inicio temprano y su asociación con DCM coincide con lo descrito en la literatura.

Con diferentes combinaciones, se realizó el análisis estadístico de los datos de SNP de **SNCA** que confieren riesgo incrementado para EP y su probable asociación con deterioro cognitivo en esta enfermedad. Los resultados sugieren que la combinación de los alelos GTTA (SNP: rs356219, rs356220, rs7684318

y rs35603) se asocia con riesgo disminuido para deterioro cognitivo en la EP; mientras que la combinación TCAC (SNP: rs356220, rs7684318, rs35603 y rs2736990) aumentaría el riesgo de EP y DC.

La presente investigación tiene varias limitantes; la principal de ellas fue el tamaño de muestra, la falta de la evaluación del MoCA en los controles, y el seguimiento de los pacientes por un tiempo más prolongado para ver la evolución de los casos con EP y DCL y EP sin DC, pues probablemente varios de estos casos puedan sufrir cambios en la cognición. Adicionalmente la cognición, al igual que la EP son procesos multifactoriales donde evidentemente falta evaluar la participación de factores ambientales asociados a ambos procesos.

De acuerdo con lo encontrado en este trabajo la frecuencia del 0% de las mutaciones puntuales p.A30P, p.A53T y p.E46K en población mestizo mexicana coincide con lo publicado para población brasileña, no así para la población caucásica europea donde se han reportado estas tres mutaciones, siendo en la población caucásica griega más frecuente la mutación p.A53T con una frecuencia del 0.27%; para la caucásica alemana, la frecuencia de la mutación p.A30P es de 0.5%, mientras que la mutación p.E46K solo se ha observado en una familia de origen español (PDMutDB, Deng, et al; 2010).

Las frecuencias y el tipo de alteraciones genéticas en **SNCA** varían dependiendo del origen de la población estudiada. Por ello, es muy importante investigarlas en nuestra población. En la actualidad la SNCA se sugiere como un biomarcador en DCL en la EP (Toribio-Díaz, et al; 2015); ya que se ha visto que hay un descenso en los niveles de SNCA en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EP y que éste se incrementa con el progreso de la enfermedad. Contrariamente se ha documentado un aumento de SNCA en pacientes con DC y los mecanismos no han sido dilucidados a la fecha. Finalmente, la SNCA está directamente implicada en la formación de los CL y por ello, se propone como un blanco terapéutico para la EP (Toribio-Díaz, et al; 2015).

## **10.0 Perspectivas**

Debe aumentarse el tamaño de la muestra y de los controles para confirmar los resultados obtenidos en este trabajo.

Estudiar las otras mutaciones puntuales de **SNCA** para determinar la participación de la alfa sinucleína en la cognición.

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación a largo plazo donde se evaluarán otros genes asociados a EP y deterioro cognitivo como: **GBA** (gen de la glucocerebrosidasa), **APOE** (gen de la Apolipoproteína E), **MAPT** (gen de la proteína Tau asociada a microtúbulos) y **COMT** (gen de la catecol-O-metil transferasa).

## 11.0 Bibliografía

- Alcalay R. N., Caccappolo E., Mejia-Santana H., Tang M. X., et al., *Frequency of known mutations in early-onset Parkinson disease: implication for genetic counseling: the Consortium on Risk for Early Onset Parkinson Disease study*. Arch Neurol. 2010, 67 : 1116-1122.
- Aarsland D., Zaccai J., Brayne C., *A Systematic Review of Prevalence Studies of Dementia in Parkinson's Disease*. Mov Disord. 2005, 20(10):1255-1263.
- Bocanegra Y., Trujillo-Orrego N., Pineda D., Demencia y deterioro cognitivo leve en la enfermedad de Parkinson: una revisión. Rev Neurol. 2014, 59(12):555-569.
- Boll M.C., Miranda G., Monroy N., Yescas P., et al., Detección de demencia y del deterioro cognoscitivo leve en la enfermedad de Parkinson. Arch Neurocienc. 2014, 19(II)15-21.
- Cardo L., Coto E., de Mena L., Díaz M., *A Search for SNCA 3' UTR Variants Identified SNP rs356165 as a Determinant of Disease Risk and Onset Age in Parkinson's Disease* .J Mol Neurosci .2012, 47: 425-430.
- Cervantes-Arriaga A., ¿Enfermedad de Parkinson o síndrome de Enfermedad de Parkinson? Arch Neurociencien (Mex). 2014, 19: 71-72.
- Chaudhuri K. R., Healy D. G, Schapira A. H.V., *Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management*. Lancet Neurol.2006, 5: 235-45.

Chan D. K. Y., Mellick G., Cai H., Wang X. L., et al., *The Synuclein gene and Parkinson Disease in Chinese Populati3n*. Arch Neurol. 2000, 57:501-503.

Copped3 F. *Genetics and Epigenetics of Parkinson's Disease*. The Scientific World Journal. 2012: 1-12.

Cortazar A., Silva P., M3todos F3sico-Qu3micos en Biotecnolog3a PCR, IBT, 2004. 18.

Cumming TB, Churilov L, Linden T, Bernhardt J., *Montreal Cognitive Assessment and Mini Mental State Examination are both valid cognitive tools in stroke*. Acta Neurol Scand. 2013, 128: 122-129.

Cruts M., van Duijn C. M., Backhovens H., Van den Broeck M., et al., *Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and 2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease*. Hum Mol. 1998, 7(1): 43-51.

D3vila-Ortiz de Montellano D. J., Detecci3n de polimorfismos de riesgo y mutaciones en el gen **SNCA** en pacientes mexicanos con enfermedad de Parkinson / tesis que para obtener el grado de Maestr3a en Ciencias M3dicas, Facultad De Medicina, UNAM, 2014.

D3vila-Ortiz de Montellano D. J., Alonso- Vitela M. V., Monroy-Jaramillo N., L3pez-L3pez M., et al., Detecci3n de mutaciones puntuales en el gen de SNCA en pacientes mexicanos con enfermedad de Parkinson y herencia autos3mica dominante. Arch Neuroci3n (Mex). 2012, 17(II): 17-21.

Deng S. , Deng X., Yuan L., Song Z., *Genetic analysis of SNCA coding mutation in Chinese Han patients with Parkinson disease*. Acta Neurol Belg. 2014: 1-4.



Doxakis E., Post-transcriptional regulation of alpha-synuclein expression by mir-7 and mir-153. *J Biol Chem.*2010, 285: 12726–12734.

Edwards T.L, Scott WK, Almonte C, Burt A, et al., 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.

Farrer M., Kachergus J., Formo L., ***Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha- synuclein genomic multiplication.*** *Ann Neurol.* 2004 , 55: 174-179.

Fernandez H. H., Chen J. J., ***Monoamine Oxidase-B Inhibition in the Treatment of Parkinson's Disease.*** *Pharmacotherapy.* 2007, 27 (12 ):174S-185S.

Folstein M.F., Folstein S.E., McHugh P.R., ***Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician.*** *J Psychiatr Res,* 1975, 12: 189–198.

Goetz C.G., Poewe W., Rascol O., Sampaio C. ,et al.,***Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations.*** *Mov Disord.* 2004, 19(9): 1020-1028.

Guo X. Y., Chen Y.P., Song W., Zhao B., et al. SNCA ***variants rs2736990 and rs356220 as risk factors for Parkinson's disease but not for amyotrophic lateral sclerosis and multiple system atrophy in a Chinese population.*** *Neurobiol Aging.* 2014, 35(12): 2882e1-e6.

Han W., Liu Y., Mi Y., Zhao J. et al., ***Alpha-synuclein (SNCA) polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease: A meta-analysis.*** *Am J Med Genet Part B.* 2015, 168B:123–134.

Han W., Liu Y., Mi Y., Zhao J., et al., *Polymorphisms and Susceptibility to Parkinson's Disease: A Meta-Analysis*. *Am J Med Genet Part B*. 2015, 168 B: 123-134.

Ibáñez P., Lesage S., Janin S., Lohmann E., Durif F., et al., *Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms*. *Arch Neurol*. 2009, 66:102-108.

Kara E., Kiely A. P., Proukakis C., Giffin N., Love S., et al., *A 6.4 Mb duplication of the  $\alpha$ -synuclein Locus Causing Frontotemporal dementia and Parkinsonism*. *JAMA Neurol*. 2014, 71(9):1162-1171.

Kéri S., Nagy H., Myers C. E., Benedek G., et al., *Risk and protective haplotypes of the alpha-synuclein with Parkinson's disease differentially affect cognitive sequence learning*. *Genes Brain Behav*. 2008, 7(1):31-36.

Krüger R., Kuhn W., Müller T., Woitalla Dirk., et al., *A1a30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease*. *Nature Genet*. 1998, 18: 106-108.

Li N.N., Chang X. L., Zhao D. M., et al., *SNCA rs356219 variant increases risk of sporadic Parkinson's disease in ethnic Chinese*. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2013, 162B(5):452-456.

Linnertz C., Saucier L., Ge D., Kenneth D., *Genetic Regulation of  $\alpha$ -Synuclein mRNA Expression in Various Human Brain Tissues*. *PLoS One*. **2009**, 16; 4(10):e7480.

Lohmann E., Thobois S., Lesage S., Tezenas du Marcel S., et al., *A multidisciplinary study of patients with early-onset PD with and without parkin mutations*. *Neurology*.2009, 72: 110-116.

Lopez-Beltran C., Deister V. G., *Scientific approaches to the Mexican mestizo*. *Hist Cienc Saude Manguinhos*.2013, 20(2):391-410.

López M., Guerrero J., Yescas P., Boll M. C., *Apolipoprotein E epsilon4 allele is associated with Parkinson disease risk in a Mexican Mestizo population*. *Mov Disord*. 2007 22(3): 417-420.

Mamikonyan E., Morberg P.J., Siderowf A., Duda J. D., et al., *Mild cognitive impairment is common in Parkinson's disease patients with normal Minimental-State Examination (MMSE)*. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009, 15(3):226-231.

Mata I. F, Leverenz J.B, Weintraub D, Trojanowski J. Q. , Hurtig H. I., et al., *APOE, MAPT, and SNCA Genes and Cognitive Performance in Parkinson Disease*. *JAMA Neurol*. 2014, 71(11):1405-1412.

Mollenhauer B., Rochester L., Chen-Plotkin A., Brooks D., *What can biomarkers tell us about cognition in Parkinson's disease?* *Mov Disord*. 2014, 29(5):622-633.

Pankratz N., Lill C.M., Do C. B., *Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease*. *Nat Genet*.2014 Se, 46(9):989-993.

Pan F., Hairong D., Ding H., Ming Y., *SNP rs356219 of a-nynuclein (SNCA) gene associated with Parkinson's disease in a Chinese Han population*. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012, 18:632-634.

Pervin F., Edwards C. , Lippa CF., *Dementia With Lewy Body: Impacts of Surgery*. Am J Alzheimers Dis Other Demen. 2015,1-13.

Pasanen p., Myllykangas L., Siitonen M., Raunio A., *A Novel  $\alpha$ - synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology*. Neurobiol Aging. 2014, 35(9):2180.e1-2180.e15.

Pimentel M. M. G., Rodrigues F. C.,Leite M. A. A.,Campos M., *Parkinson disease: $\alpha$ -synuclein mutational screening and new clinical insight into the p.E46K mutation*. Parkinsonism Relat Disord. 2015, 21(6):586-589.

Pistacchi M., Gioulis M., Contin F., Sanson F., *Cognitive profiles in Mild Cognitive Impairment (MCI) patients associated with Parkinson's disease and cognitive disorders* .Ann Indian Acad Neurol. 2015 , 18(2): 200–205.

Polymeropoulos M., Lavedan., Leroy E., Ide S. E., *Mutation in the alpha synuclein gene identified in families with parkinson s disease* .Science . 1997, 276: 2045-2047

Puschmann A., Ross O.A., Vilariño-Güell C., Lincoln S.J., *A Swedish family with de novo alpha-synuclein A53T mutation: evidence for early dysfunction*. Parkinsonism Relat Disord. 2009 , 15(9):627-632.

Romo-Gutiérrez D., Yescas P., López-López M., Boll M.C., Factores genéticos asociados a la enfermedad de Parkinson (EP). Gat Med Mex. 2015, 151:110-118.

Schapira A. H. V., *Disease modification in Parkinson's disease*. Lancet Neurol. 2004, 3 (6):362-368.

Setó-Salvia N., Clarimón J., Pagonabarraga J., Jordi , et al. *Dementia risk in Parkinson disease: disentangling the role of MAPT haplotypes*. *Arch Neurol*. 2011;68:(3):359-364.

Shin C. W., Kim H.J., Park S. S. Kim S. Y., et al., *Two Parkinson's disease patients with alpha synuclein gene duplication and rapid cognitive decline*. *Mov Disord* . 2010, 25(7):957-959.

Spillantini M. G., Goedert M., *The  $\alpha$ -Synucleinopathies: Parkinson's Disease, Dementia with Lewy Bodies, and Multiple System Atrophy*. *Ann N Y Acad Sci*. 2000, 920:16-27.

Szumilas M., *Explaining Odds Ratios*. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010 , 19(3): 227–229.

Takeshi I, Akiyoshi K, Atsushi S, Kensaku K, et al., *Patients homozygous and heterozygous for SNCA duplication in a family with Parkinsonism and Dementia*. *Arch Neurol*. 2008, 65(4):514-519.

Toribio-Diaz M. E., Carod-Artal F. J., Subtipos de deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson y factores predictores de la conversión a demencia. *Rev Neurol*. 2015,61(1):14-24.

Vaughan J. R., Farrer M. J., Wszolek Z.,K., *Sequencing of the alpha-synuclein gene of Parkinson's disease fails to reveal any future mutations. The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's disease*. *Hum mol Genet.*, 1998, 55: 164-173.

Williams-Gray C. H., Foltynie T., Brayne C. E. G., Robbins T. W., et al., *Evolution of cognitive dysfunction in a incident Parkinson's disease cohort*. *Brain*. 2007, 130: 1787-1798.

Wirdefeldt K., Adami H.O., Cole P., Trichopoulos D., et al., *Epidemiology of Parkinson's disease: a review of the evidence*. Eur J. Epidemiol. 2011, 1:51-58.

Wise-Scira O., Aloglu A. K., Dunn A., Sakallioğlu I.T., et al., *Structures and Free Energy Landscapes of the Wild-Type and A30P Mutant-Type  $\alpha$ -Synuclein Proteins with Dynamics*. ACS Chem Neurosci. 2013, 20;4(3):486-97.

Wise-Scira O., Dun A., Aloglu A. K., Sakallioğlu I. T., et al, *Structures of the E46K Mutant-Type  $\alpha$ -Synuclein Protein and Impact of E46K Mutation on the Structures of the Wild-Type  $\alpha$ -Synuclein Protein*. ACS Chem Neurosci. 2013, 4:498-508.

Xu S., Chan P., *Interaction between Neuromelanin and Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease*. Biomolecules 2015, 5: 1122-1142.

Yu L., Xu P., He X., Hu F., et al., *SNP rs7684318 of the alpha-synuclein gene is associated with Parkinson's disease in the Han Chinese population*. Brain Res. 2010, 1346:262-265.

Zarranz J. J., Alegre J., Gómez-Esteban J. C., Lezcano E., *The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia*. Ann Neurol. 2004, 55(2):164-73.

Guía Práctica Clínica (GPC). Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención, Secretaría de Salud, 2010. 1-95.

Guía terapéutica de la Sociedad Catalana de Neurología. Enfermedad de Parkinson. Fundación de la Sociedad Catalana de Neurología 2009. 1-37.

Manual de Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos mentales IV-R (DMS IV-R), Editorial MASSON, Barcelona, 1995.

Manual de Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos mentales (DMS-V). Asociación Americana de Psiquiatría, Estados Unidos, 2014.

Manual PCR Tiempo Real. Life Technologies. 2012, 11-14.

<http://www.pdgene.org/view?gene=SNCA>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

<http://www.molgen.vib-ua.be/PDMutDB/>

### Mini Examen del Estado Mental (MMSE)

Nombre.....Edad.....  
Ocupación.....Escolaridad.....  
Examinado por.....Fecha.....

#### I. ORIENTACIÓN (0 – 10 puntos)

- Dígame el día (1).....fecha (1).....mes (1).....  
estación (1).....año (1).....
- Dígame en qué lugar estamos (1).....piso (1).....ciudad (1).....  
Región (1).....país (1).....

#### II. REPETICIÓN INMEDIATA (0 – 3 puntos)

"Le voy a nombrar tres palabras. Quiero que las repita después de mí. Trate de memorizarlas, pues se las voy a preguntar en un minuto más"

ARBOL – MESA – PERRO Número de repeticiones:..... (Máximo seis veces en total)

#### III. ATENCIÓN Y CÁLCULO (0 – 5 puntos)

- Contaremos hacia atrás restando 7, partiremos de 100 93 – 86 – 79 – 72 - 65
- Deletrear la palabra MUNDO al revés: O – D – N – U – M \*Anotar el mejor puntaje

#### IV. MEMORIA (0 – 3 puntos) • ¿Recuerda las tres palabras de antes? Por favor repítalas

#### V. LENGUAJE (0 – 9 puntos)

- Mostrar:

Un LÁPIZ (1).....y un RELOJ (1)..... (La persona debe nombrarlos)

- Repita esta frase: EN UN TRIGAL HABÍA CINCO PERROS (1).....
- Orden: "TOME ESTE PAPEL CON SU MANO DERECHA (1), DÓBLELO POR LA MITAD CON AMBAS MANOS (1) Y DÉJELO EN EL SUELO (1)".....
- Lea la siguiente frase y haga lo que se le pide:

#### (1) CIERRE LOS OJOS

- Escriba una frase a continuación: (1)



- Copie este dibujo (1)

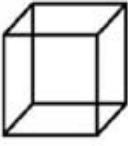
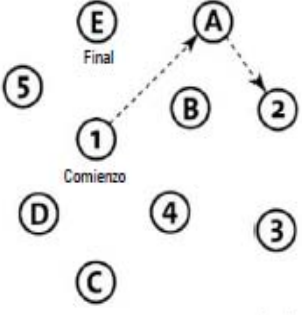
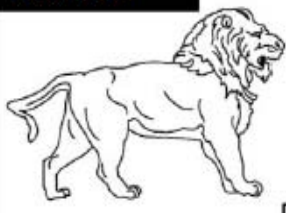
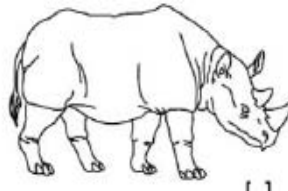
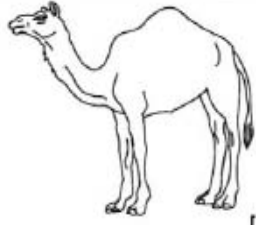
Puntuación máxima: 30



**MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA)**  
(EVALUACIÓN COGNITIVA MONTREAL)

NOMBRE:  
Nivel de estudios:  
Sexo:

Fecha de nacimiento:  
FECHA:

<b>VISUOESPACIAL / EJECUTIVA</b>		 Copiar el cubo <input type="checkbox"/>					Dibujar un reloj (Once y diez) (3 puntos)	Puntos	
		<input type="checkbox"/>					<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/5
<b>IDENTIFICACIÓN</b>		 <input type="checkbox"/>					 <input type="checkbox"/>	 <input type="checkbox"/>	___/3
<b>MEMORIA</b>	Lea la lista de palabras, el paciente debe repetirles. Haga dos intentos. Recuerdeselas 5 minutos más tarde.	ROSTRO	SEDA	IGLESIA	CLAVEL	ROJO	Sin puntos		
		1er intento							
		2º intento							
<b>ATENCIÓN</b>	Lea la serie de números (1 número/seg.) El paciente debe repetirla. <input type="checkbox"/> 2 1 8 5 4 El paciente debe repetirla a la inversa. <input type="checkbox"/> 7 4 2						___/2		
	Lea la serie de letras. El paciente debe dar un golpecito con la mano cada vez que se diga la letra A. No se asignan puntos si ≥ 2 errores.	<input type="checkbox"/> FBACMNAAJKLBAFAKDEAAAJAMOF AAB					___/1		
	Restar de 7 en 7 empezando desde 100. <input type="checkbox"/> 93 <input type="checkbox"/> 86 <input type="checkbox"/> 79 <input type="checkbox"/> 72 <input type="checkbox"/> 65						___/3		
	4 o 5 sustracciones correctas: 3 puntos, 2 o 3 correctas: 2 puntos, 1 correcta: 1 punto, 0 correctas: 0 puntos.								
<b>LENGUAJE</b>	Repetir: El gato se esconde bajo el sofá cuando los perros entran en la sala. <input type="checkbox"/> Espero que él le entregue el mensaje una vez que ella se lo pida. <input type="checkbox"/>						___/2		
	Fluidez del lenguaje. Decir el mayor número posible de palabras que comiencen por la letra "P" en 1 min. <input type="checkbox"/> _____ (N ≥ 11 palabras)						___/1		
<b>ABSTRACCIÓN</b>	Similitud entre p. ej. manzana-naranja = fruta <input type="checkbox"/> tren-bicicleta <input type="checkbox"/> reloj-regla						___/2		
<b>RECUERDO DIFERIDO</b>	Debe acordarse de las palabras SIN PISTAS	ROSTRO	SEDA	IGLESIA	CLAVEL	ROJO	Puntos por recuerdos SIN PISTAS únicamente		
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
Optativo	Pista de categoría								
	Pista elección múltiple								
<b>ORIENTACIÓN</b>	<input type="checkbox"/> Día del mes (fecha) <input type="checkbox"/> Mes <input type="checkbox"/> Año <input type="checkbox"/> Día de la semana <input type="checkbox"/> Lugar <input type="checkbox"/> Localidad						___/6		
© Z. Nasreddine MD Versión 07 noviembre 2004 <a href="http://www.mocatest.org">www.mocatest.org</a>		Normal ≥ 26 / 30			TOTAL <input type="checkbox"/> ___/30 Añadir 1 punto si tiene ≤ 12 años de estudios				



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA  
 MANUEL VELASCO SUÁREZ  
 LIC. SANITARIA 04 AM 0913012

DM-CI-EI/EP-1-2015

**CONSENTIMIENTO INFORMADO: "Estudio molecular de la enfermedad de Parkinson"**

NOMBRE DEL PACIENTE _____	FECHA _____	HORA _____
REGISTRO _____	FECHA EN LA QUE SE REALIZARÁ EL PROCEDIMIENTO _____	
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL _____		

Yo \_\_\_\_\_, en pleno uso de mis facultades mentales y en mi calidad de paciente, o representante legal de éste:

**DECLARO EN FORMA LIBRE Y VOLUNTARIA LO SIGUIENTE:**

- ✓ He sido invitado/a a participar el proyecto de investigación "Estudio molecular de la enfermedad de Parkinson (EP)".
- ✓ He sido invitado/a a participar en este estudio debido a que en el Instituto se me ha realizado el diagnóstico clínico de EP.
- ✓ He sido informado/a que si acepto participar en este estudio mi información y la de mi familia será confidencial y que nadie que no esté inscrito en el proyecto tiene acceso a la misma.
- ✓ He sido informado/a que mi muestra será rotulada con números con la finalidad de evitar mi identificación.
- ✓ He sido informado/a que el presente estudio tiene como propósito estudiar en pacientes con EP 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  $\alpha$ -sinucleína y LRRK2 causantes de la enfermedad en algunos pacientes mayores de 50 años. También se van a estudiar 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.
- ✓ He sido informado/a que para poder realizar este estudio, es necesario tener una consulta con un médico genetista que realizará mi historia familiar y elaborará mi árbol genealógico con la finalidad de determinar si existen otras personas en mi familia que padezcan o hayan padecido alguna enfermedad similar a la mía.
- ✓ He sido informado/a que es necesario que me tomen 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 es tomada sólo con fines de investigación genética y no será usada para determinar tratamiento.

Insurgentes Sur # 3877, Col. La Fama 14269, México, D.F. Tel. (55) 56063822  
[www.innss.salud.gob.mx](http://www.innss.salud.gob.mx)



**CONSENTIMIENTO INFORMADO: "Estudio molecular de la enfermedad de Parkinson"**

- ✓ He sido informado/a que si participo en este estudio no obtendré beneficio económico y mi condición no mejorará, por tanto no se me darán resultados a menos que el estudio muestre algo que afecte directamente mi estado de salud.
- ✓ He sido informado/a que los beneficios que surjan de esta investigación para la sociedad 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.
- ✓ He sido informado/a que mi participación en este estudio no tiene costo alguno ni recibiré remuneración económica.
- ✓ He sido informado/a que mi participación en este estudio es **VOLUNTARIA** y que si decido no participar, esto no afectará mi relación con el INNN. Si decido participar, soy libre de abandonar el estudio en cualquier momento sin que esto perjudique mi atención en el INNN.
- ✓ He sido informado/a que mi DNA puede ser usado para esta investigación y otras en las que se están analizando genes de la población mexicana, por tanto acepto que mi muestra sea usada en otros proyectos:      SI      NO
- ✓ He sido informado que si en el transcurso del estudio me surgen dudas o comentarios, puedo comunicarme con la Dra. Alejandra Camacho Molina, la Dra. Nancy Monroy Jaramillo, el Dr. David Dávila Ortiz de Montellano o la M. en C. Adriana Ochoa Morales en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía al teléfono 56 06 38 22 a las extensiones 3041, 1071 o 2018. También me puedo comunicar con el Comité de Ética en Investigación a la extensión 5027.
- ✓ Después de haber leído detenidamente este documento y que mis dudas han sido aclaradas satisfactoriamente acepto participar **VOLUNTARIAMENTE** en el presente proyecto de investigación.

Domicilio: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Correo electrónico: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOMBRE, FIRMA Y CÉDULA DEL MÉDICO

\_\_\_\_\_  
NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE O REPRESENTANTE LEGAL

\_\_\_\_\_  
NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

\_\_\_\_\_  
NOMBRE Y FIRMA TESTIGO



Carta de consentimiento informado para controles MM.

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

**DEPARTAMENTO DE NEUROGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

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

México D. F., a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 201\_\_.

1. He sido informado (a) que en el Departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este Instituto se están realizando estudio para determinar las variaciones en genes (que son las unidades de la herencia) en personas, aparentemente sanas, de la población mexicana.
2. Las variaciones que se van a estudiar están en los genes *SNCA*, *PARK2*, *PINK1* y *DJ-1*. Estos genes presentan variantes (polimorfismos) cuya frecuencia varía en diferentes poblaciones.
3. He sido informado (a) que para analizar estos genes es necesario que done una muestra de 20 ml de sangre periférica para que de ahí se extraiga el DNA que es el material hereditario y se estudie el gen antes mencionado.
4. He sido informado (a) que puedo sufrir enrojecimiento o ardor en la zona de punción.
5. He sido informado (a) que se me hará un árbol genealógico y se me preguntará acerca de las enfermedades que he padecido así como las de mi familia.
6. Toda la información obtenida será confidencial y estará disponible solo para los investigadores. Mi muestra será codificada con una combinación de letras y números para proteger mi identidad.
7. He sido informado (a) que mi participación en este estudio es **VOLUNTARIA** y no tiene costo alguno para mí, ni recibiré remuneración alguna.
8. He sido informado (a) que de acuerdo al artículo 103 Bis 4 capítulo único, título quinto Bis de la Ley General de Salud, si deseo conocer los resultados de los estudios que se realicen a mi muestra y si deseo participar en otros estudios que contribuyan a un diagnóstico y manejo adecuados, seré contactado por los investigadores.

He sido informado (a) de la garantía que tengo para recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a las dudas que surjan respecto a los asuntos relacionados con esta enfermedad. Para cualquier duda o aclaración puede dirigirse al departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este Instituto con la M. en C. Adriana Ochoa o comunicarse al Tel. 56 06 38 22 Ext. 2018.

**ANTECEDENTES**

Tabaquismo	Sí	No	Años _____	Cantidad promedio: _____
Alcohol	Sí	No	Años _____	Tipo de bebida _____
				Cantidad _____
Drogas	Sí	No	Tipo y frecuencia _____	
Sedentarismo	Sí	No		
Hipertensión	Sí	No	Años de evolución _____	
Diabetes Mellitus	Sí	No	Años de evolución _____	
Colesterol alto	Sí	No	Años de evolución _____	
Cardiopatía	Sí	No	Años de evolución _____	
Insuficiencia art.	Sí	No	Años de evolución _____	

Alergias a medicamentos:

Tipo \_\_\_\_\_ Medicamento \_\_\_\_\_

Otras (especificar) \_\_\_\_\_

### ANTECEDENTES FAMILIARES

ENFERMEDAD	SÍ	NO	FAMILIAR AFECTADO
EMBOLIA CEREBRAL			
COLESTEROL			
DIABETES			
PARKINSON			
PERDIDA DE MEMORIA			
EPILEPSIA			
CÁNCER			
Tipo de cáncer:			

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

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

**Nombre del participante:**

\_\_\_\_\_ **Género:** H M

**Firma** \_\_\_\_\_

**Teléfono** \_\_\_\_\_

**Correo electrónico** \_\_\_\_\_

**Dirección:**

\_\_\_\_\_

**Origen** \_\_\_\_\_ **Edad** \_\_\_\_\_

**Ocupación** \_\_\_\_\_

**Edo. Civil** \_\_\_\_\_ **Escolaridad** \_\_\_\_\_

**Testigo**

\_\_\_\_\_

**Testigo**

\_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_

**Firma** \_\_\_\_\_