

**DETECCION DE MUTACIONES EN EL GEN PARK2 EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON DE
INICIO TEMPRANO EN POBLACION COLOMBIANA**

Sergio Andrés Castañeda Garzón. Bact.

Director Proyecto: Magda Carolina Sánchez

Grupo de Investigación en Ciencias Básicas Médicas

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESPECIALIZACION EN EPIDEMIOLOGIA
BOGOTA D.C.**

2014

**DETECCION DE MUTACIONES EN EL GEN PARK2 EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON DE
INICIO TEMPRANO EN POBLACION COLOMBIANA.**

Sergio Andrés Castañeda Garzón. Bact.

Programa de Postgrado

Especialización en Epidemiología

Grupo de Investigación en Ciencias Básicas Médicas

Line de Investigación en Biología Molecular

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESPECIALIZACION EN EPIDEMIOLOGIA

BOGOTA D.C.

2014

TABLA DE CONTENIDO

Resumen

1. INTRODUCCION.....	8
1.1. Generalidades.....	8
1.2. Problema.....	9
1.3. Justificación.....	10
2. PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	11
3. MARCO TEORICO.....	12
3.1. Generalidades.....	12
3.2. Sintomatología y Diagnostico.....	13
3.3. Epidemiología.....	13
3.3.1. Incidencia.....	14
3.3.2. Prevalencia.....	14
3.4. Mecanismos Fisiopatologicos Involucrados en la Enfermedad de Parkinson.....	14
3.4.1. Metabolismo de la Dopamina.....	15
3.4.2. Estrés Oxidativo.....	17
3.4.3. Los cuerpos de Lewy y la Vía Proteosomica de la Ubiquitina (VPU).....	17
3.4.4. Mecanismos participantes en la formación de los cuerpos de Lewy.....	17
3.4.5. Mutaciones en los genes PARK2 y PARK5 y la función de la alfa-sinucleína.....	17
3.4.6. Diversos mecanismos convergen en el desarrollo de la EP.....	19
3.5. Genética y la Enfermedad de Parkinson.....	20
3.5.1. PARK2: Gen.....	21
3.5.2. Parkina.....	21
3.5.3. Mutaciones en el gen PARK2 y Enfermedad de Parkinson de Inicio Temprano.....	21
3.5.4. El sistema ubiquitin-proteosoma.....	22
3.5.4.1. Ubiquitina.....	23
3.5.4.2. Proteólisis.....	25
3.5.4.3. Vía de la ubiquitinación-proteosoma y control del ciclo celular.....	28
3.5.4.4. Alteraciones en la Vía Ubiquitina-Proteosoma y Enfermedad.....	31

4. METODOLOGIA.....	33
4.1. Diseño.....	33
4.2. Hipótesis.....	33
4.3. Población y Muestra.....	33
4.4. Criterios de Inclusión/Exclusión.....	33
4.4.1. Criterios de Inclusión.....	33
4.4.2. Criterios de Exclusión.....	34
4.5. Métodos.....	34
4.5.1. Fuentes de Información.....	34
4.5.2. Técnicas de Recolección.....	35
4.5.2.1. Extracción de Sangre.....	35
4.5.2.2. Extracción de DNA.....	35
4.5.2.3. Primers.....	35
4.5.2.4. Estandarización de PCR.....	35
4.5.2.5. PCR.....	36
4.5.2.6. Secuenciación.....	37
4.5.2.7. Análisis de las Secuencias.....	37
4.6. Variables.....	37
4.7. Control de Sesgos y de Errores.....	38
4.8. Plan de Análisis.....	38
4.9. Aspectos Éticos.....	38
5. RESULTADOS.....	39
6. CONCLUSIONES.....	43
7. BIBLIOGRAFIA.....	46

Anexos

Consentimiento Informado.....	49
-------------------------------	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Loci y Genes Asociados con EP.....	20
Tabla 2. Tabla Operacional de Variables.....	37
Tabla 3. Datos Demográficos de muestra de Pacientes y Controles analizadas.....	40
Tabla 4. Tabla de contingencia 2x2.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Generación de estrés oxidativo por el metabolismo de la dopamina, y su participación en el proceso neurodegenerativo.....	15
Figura 2. Alfa-sinucleína y el almacenaje intravesicular de la dopamina	16
Figura 3. Degradación de la alfa-sinucleína por la vía proteosómica de ubiquitina.....	19
Figura 4. Una molécula de ubiquitina se adenila en presencia del enzima E1 y ATP.....	24
Figura 5. Formas de la ubiquitina ligasa E3. A) Dominio HECT. B) Dominio RING finger.....	25
Figura 6. Mecanismo de la vía ubiquitina proteosoma donde se muestra en la E3 ligasa los sitios de reconocimiento del N-terminal de la proteína y el sitio catalítico ligasa.....	26
Figura 7. Distintas representaciones del proteosoma 26S.....	27
Figura 8. La célula usa las ciclinas y las degrada para regular las distintas fases del ciclo celular.....	29
Figura 9. Control de la transición G1/S por el SCF, que promueve la degradación del inhibidor de las G1-CDK, la proteína p27.....	30
Figura 10. Estandarización de PCR. Gel de agarosa. Exones 3 (427 pb) y 4 (261 pb) respectivamente.....	39
Figura 11. Mutación G>A de tipo homocigoto, que provoca el cambio en el aminoácido Ala>Thr.....	40
Figura 12. Mutación G>A de tipo homocigoto, que provoca el cambio en el aminoácido Ser>Asn.....	41
Figura 13. Mutación G>A. Cambio sinónimo.....	42
Figura 14. Mutaciones comunes gen PARK2 (Mutación Ser167Asn).....	43

DETECCION DE MUTACIONES EN EL GEN PARK2 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON DE INICIO TEMPRANO EN POBLACION COLOMBIANA.

Resumen

Introducción: La Enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817, es el segundo desorden neurodegenerativo más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer. Los síntomas aparecen por una deficiencia de dopamina causada por la degeneración y pérdida de las neuronas dopaminérgicas en diversas regiones del cerebro, principalmente la *sustancia nigra*. Se sabe actualmente que existen factores genéticos involucrados en el desarrollo de la enfermedad, principalmente en la EP de inicio temprano. Uno de los genes, que según diversos reportes ha sido frecuentemente implicado con el desarrollo de la enfermedad es el gen PARK2 o PRKN que codifica para la proteína Parkina, una proteína de 465 aminoácidos. Se conoce que la proteína Parkina tiene función de ligasa de las proteínas ubiquitinadas; las mutaciones que se han podido identificar en Parkina llevan a la pérdida de su función, reduciendo su capacidad de regular la degradación de sustratos.

Metodología: Se realizó un estudio observacional descriptivo de tipo *cross sectional*. Para ello se evaluaron 29 pacientes diagnosticados con EP de inicio temprano (anterior a los 40 años de edad) y de 21 individuos sanos que se utilizaron como control. Se tomó una muestra de sangre periférica a los pacientes y controles, y se procedió a realizar la extracción de DNA. Posteriormente se estandarizaron las condiciones para la técnica de PCR para la amplificación de los exones 3, 4, y 5 en cada individuo. Todos los productos amplificados se sometieron a secuenciación automática para evaluar posibles mutaciones y polimorfismos en la población de estudio.

Palabras Claves: Enfermedad de Parkinson, PARK2, parkina, PCR, Secuenciación.

1. INTRODUCCION

1.1. GENERALIDADES

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817 (1), es el segundo desorden neurodegenerativo más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer y la más corriente causa de Parkinsonismo. Afecta aproximadamente el 1% de la población mayor de 50 años (2).

Es una alteración del movimiento caracterizada por bradiquinesia, temblor e inestabilidad postural (1). Los síntomas aparecen por una deficiencia de dopamina causada por la degeneración y pérdida de las neuronas dopaminérgicas en diversas regiones del cerebro, principalmente la sustancia nigra, pero afectando también el locus cerúleo y los ganglios basales (2). La EP puede definirse a nivel estructural por la pérdida neuronal de la *sustancia nigra pars compacta* (SNc) y la presencia de cuerpos de Lewy en las neuronas todavía presentes. A nivel macroscópico, el cerebro parkinsoniano muestra principalmente depigmentación de la SNc y del locus ceruleus. A nivel microscópico, la pérdida en la SNc es de al menos un 50% con respecto al cerebro normal. Los cuerpos de Lewy son parte de los hallazgos histopatológicos más relevantes de la EP, sin embargo no se presentan en todos los tipos de la enfermedad. La muerte neuronal se acompaña de la aparición de inclusiones citoplasmáticas de inclusiones eosinofílicas llamadas cuerpos de Lewy, compuestas de varias proteínas incluyendo α -sinucleína, ubiquitina, parkin, neurofilamentos, etc. (3)

Por varios años se creyó que la causa primaria de la enfermedad eran factores ambientales como infecciones virales y neurotoxinas (MPTP, metil-fenil-tetrahidropiridina). Se sabe actualmente que existen además factores genéticos involucrados en el desarrollo de la enfermedad, principalmente en la EP de inicio temprano. Se han identificado mutaciones en más de 10 genes, algunos conocidos como loci de Parkinson (PARK) y otros genes asociados con la enfermedad, lo cual resalta la importancia etiológica de los factores genéticos.

Varios de los genes identificados hasta el momento interactúan en los mecanismos patogénicos de la EP. Uno de estos genes, que según diversos reportes ha sido implicado con mayor frecuencia en el desarrollo de la enfermedad es el gen PARK2 o PRKN codifica para la proteína Parkina una proteína de 465 aminoácidos (4). El gen PARK2 contiene 12 exones y tiene una longitud de aproximadamente 1,38 Mb (Locus 6q26).

Se conoce que la proteína parkina tiene función de ligasa de las proteínas ubiquitinadas y que las mutaciones en parkina llevan a la pérdida de función, reduciendo su capacidad de regular la degradación de sustratos. También se ha observado que una forma O-glicosilada de la α -sinucleína es ubiquitinada por parkina, sugiriendo que la pérdida de función de esta última lleva a la acumulación de α -sinucleína (4).

Los pacientes con EP de inicio temprano frecuentemente presentan mutaciones en el gen PARK2. Estudios realizados en familias de origen europeo han permitido observar diversos tipos de mutaciones en este gen como deleciones y duplicaciones de exones. Estos estudios han sugerido también que aproximadamente el 50% de los casos de Parkinson de inicio temprano son debido a mutaciones en el gen PARK2, ya que han sido identificadas con mayor frecuencia mutaciones en este gen en estos individuos (4). Igualmente estudios realizados en familias colombianas demostraron la presencia de mutaciones en PARK2 en pacientes con EP (5). El único dato sobre estos genes en Colombia se tiene gracias a un estudio realizado por el grupo de neurociencias de la Universidad de Antioquia (5), en el cual se identificó la mutación C255delA, en el exón 2 de PARK2 (Parkina), después de realizar el estudio familiar y molecular en una gran familia de origen caucano al suroccidente del país, con una historia familiar de consanguinidad entre los padres y una descendencia de 10 hijos de los cuales 4 fueron afectados por PD de inicio temprano, confirmando una herencia autosómica recesiva de acuerdo con el árbol genealógico y las pruebas moleculares (5).

1.2. PROBLEMA

La EP es una enfermedad de baja prevalencia en la población en general, y que a pesar de los estudios realizados, no posee una terapia 100% efectiva en la totalidad de los pacientes. Igualmente el diagnóstico de la enfermedad se basa en un criterio puramente clínico, siendo muchas veces subdiagnosticado y por lo tanto detectado en una etapa avanzada de la enfermedad. El conocimiento genético de la enfermedad en nuestra población, al menos en sus formas hereditarias y de inicio temprano, permitirá desarrollar nuevas alternativas terapéuticas y diagnósticas que harán posible un seguimiento temprano del paciente y con ello obtener una mejor calidad de vida en el paciente afectado por EP.

Actualmente, los estudios genéticos realizados en nuestra población se limitan a pacientes circunscritos dentro de un grupo familiar específico (5), y por lo tanto es necesario evaluar la posible presencia de mutaciones en el gen PARK2 en individuos diagnosticados con EP de inicio temprano o con historia familiar, para así establecer la frecuencia y la asociación entre estas mutaciones y el desarrollo de la enfermedad en nuestra población, como una primera aproximación a las causas genéticas de la EP en la población colombiana, que permitirán determinar si el comportamiento de esta población es semejante al reportado por la literatura en otras partes del mundo. La identificación de estas mutaciones en el gen PARK2 en una muestra de pacientes contribuirá al desarrollo de nuevas metodologías diagnósticas, a través de biología molecular, en personas susceptibles (factor hereditario), para que como se dijo anteriormente, a partir de un diagnóstico temprano se pueda evitar el progreso de la enfermedad y con ello contribuir a una mejoría en la calidad de vida de estos pacientes.

1.3. JUSTIFICACION

Por las razones anteriormente expuestas, con este proyecto piloto se busca profundizar sobre la EP en nuestro país e identificar posibles mutaciones en los exones 3, 4, y 5 del gen PARK2 (PARKIN) en una muestra de pacientes diagnosticados con EP de inicio temprano, ya que según algunos reportes mundiales este gen presenta las frecuencias más altas. Para tal efecto se busca mediante el uso de técnicas moleculares como extracción de ADN, PCR y secuenciación automática determinar en nuestros pacientes de la población colombiana los hallazgos reportados por la literatura mundial, debido a las diferencias poblacionales que presenta nuestra población mestiza al compararse con otras poblaciones, diferencias que ya han podido evidenciarse en estudios previos con otras enfermedades (2).

Este estudio es un proyecto piloto que pretende determinar la presencia de las mutaciones del gen PARK2 en pacientes con EP de inicio temprano o con historia familiar de nuestra población, que permitirá, a partir de sus resultados, estructurar un estudio que pueda ejecutarse a nivel nacional, con el fin de determinar el perfil genético de la población con EP respecto a las mutaciones identificadas en este gen, y con ello proporcionar información que contribuirá en el entendimiento epidemiológico y genético de la EP de inicio temprano e igualmente en el desarrollo e implementación de nuevas metodologías diagnósticas de esta enfermedad, adecuadas a las características de nuestra población.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Existen mutaciones en los exones 3,4 y 5 en el gen PARK2 en una muestra de pacientes diagnosticados con Enfermedad de Parkinson de inicio temprano, o con historia familiar de la población colombiana?

3. MARCO TEORICO

3.1. GENERALIDADES

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez en 1817 por el médico londinense James Parkinson, quien lo describió textualmente como una condición que consiste en: “*movimientos temblorosos involuntarios, con disminución de la potencia muscular en la movilidad pasiva y activa, con propensión a encorvar el tronco hacia adelante y de pasar de caminar a correr; los sentidos y el intelecto no sufren mayor daño*” (1). En este momento la enfermedad no representaba un gran problema epidemiológico, razón por la cual la magnitud y trascendencia de esta publicación no fue la esperada, de hecho, en el prologo del ensayo publicado como “Parálisis Agitante”, en el que se realizó la descripción inicial de la enfermedad, el médico James Parkinson resalto que lo publicado se refería a “sugerencias precipitadas”, aclarando así que no se trataba de un análisis integral, igualmente que su investigación no se había hecho de a partir de análisis anatómicos exhaustivos y que dicha descripción era una aproximación a la enfermedad (6). Sin embargo, la importancia de dicho evento, a pesar de ser una descripción parcial de la enfermedad, fue el hecho de relacionar varios síntomas aislados con una sola patología que posteriormente sería clarificada (6). Años después, Jean-Martin Charcot, padre de la neurología clínica, fue quien a finales del siglo XIX denominó a la “parálisis agitante” enfermedad de Parkinson, en honor de quien primero la describió (6).

La enfermedad de Parkinson (EP) es conocido actualmente como un trastorno neurodegenerativo, que se manifiesta sintomáticamente con una combinación que puede ser variable entre un paciente y otro, de temblor, rigidez, bradicinesia acompañada de alteraciones en la marcha y la postura (7). La característica patológica de esta enfermedad es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas (productoras del neurotransmisor dopamina) que se localizan principalmente en la *substancia nigra pars compacta* (SNpc), aunque pueden verse afectadas otras partes del cerebro como el *locus cerúleos* y los ganglios basales (5,7). Las células dopaminérgicas se encargan de liberar la dopamina en sus terminales axónicas en el cuerpo estriado y forman parte del sistema extrapiramidal de regulación motora, razón por la cual, la pérdida cuantitativa y funcional de estas neuronas conlleva a los trastornos del movimiento característicos de la EP anteriormente nombrados (7).

Se desconoce cuál es la causa de la EP pero se sabe que existen diversos factores que se encuentran involucrados en el desarrollo de la enfermedad, que incluyen toxinas ambientales, alteraciones genéticas, o simplemente asociado a un proceso neurodegenerativo (7).

Se considera que en la EP según su momento de aparición puede diferenciarse un EP de inicio temprano, EOPD (por la sigla en inglés de *early onset Parkinson disease*), que se manifiesta generalmente en pacientes por debajo de los 45 años (5). En este tipo de EP se han encontrado diversas

asociaciones con alteraciones de tipo genético, en donde se han logrado identificar diversas mutaciones en genes posiblemente responsables del desarrollo de la enfermedad (8).

3.2. SINTOMATOLOGIA Y DIAGNOSTICO

La EP se caracteriza clínicamente por su inicio focal, afectando principalmente una extremidad, con formas de presentación diversas. Entre éstas destacan el temblor de reposo, la lentitud en la realización de actividades manuales cotidianas, tales como escribir; arrastrar una pierna al andar y, con menor frecuencia, disminución de la expresión facial, hipofonía, disartria, espasmos distónicos de una extremidad, síntomas sensitivos como dolor o parestesias en un miembro o trastornos del estado de ánimo. El proceso neurodegenerativo que caracteriza a la enfermedad de Parkinson progresa lentamente. Se ha calculado un empeoramiento en unos cinco puntos de por año en la Escala Unificada de valoración clínica de esta enfermedad (UPDRS=Unified Parkinson Disease Rating Scale) (9). Sin embargo, las presentaciones de la enfermedad en los pacientes pueden variar entre uno y otro, y por lo tanto el diagnóstico de la EP se reduce a la pericia y experiencia clínica del médico evaluador, siendo por ello el diagnóstico de la enfermedad fundamentalmente clínico. Adicional a los síntomas ya nombrados otro de los puntos cardinales fundamentales para el diagnóstico de la enfermedad es la respuesta del paciente a la levodopa, que sigue siendo el tratamiento de elección, a pesar de que en gran medida genera complicaciones pos terapéuticas (9,10).

3.3. EPIDEMIOLOGIA

Existe un problema en el análisis epidemiológico de la enfermedad que radica en el hecho de que se considera una enfermedad epidemiológicamente subestimada, por el hecho de ser, como se dijo anteriormente, una patología diagnosticada a partir del cuadro clínico del paciente (6).

Los estudios epidemiológicos de la EP no están normalizados en su metodología, por lo que resulta difícil comparar los resultados de las distintas áreas geográficas. Se realizan de forma esporádica y sin seguir una sistemática común en los diferentes países y se extienden a ámbitos regionales limitados (6,11).

La EP es un trastorno neurodegenerativo, le sigue en frecuencia a la enfermedad de Alzheimer, que afecta alrededor de 1% de la población mayor de 60 años. Su prevalencia aumenta considerablemente con el envejecimiento, llegando a cerca de un 20% a los 90 años. Estimaciones recientes de la Organización Mundial de la Salud calculan en cerca de 25 millones las personas afectadas por EP en el mundo para el año 2030 (11).

3.3.1. Incidencia

La EP es una enfermedad que afecta a cualquier grupo étnico y a ambos sexos indistintamente, aunque existe cierta predilección por los varones. Afecta mayoritariamente a individuos de raza blanca respecto a los de raza negra (6). Se han realizado diversos estudios en los cuales se ha establecido la incidencia de la EP en diferentes poblaciones (6, 11).

Bower y colaboradores realizaron una investigación en la comunidad de Olmsted, Minnesota, Estados Unidos, en la que se estimaron los nuevos casos a lo largo de 15 años, y encontraron una incidencia de 10.8/100,000 personas por año y frecuencia mayor entre hombres que en mujeres (6).

Kuopio y su equipo, en un estudio realizado en el sur de Finlandia, observaron una incidencia de 17.2/100,000 para la población general (6).

3.3.2. Prevalencia

La prevalencia de la enfermedad de Parkinson en la población general se estima en 0.3%, aunque entre personas con 65 a 90 años se incrementa hasta 3% (6).

Sólo 10% de todos los pacientes con la enfermedad la manifiestan antes de los 40 años. Esta variedad, EOPD, representa características importantes, ya que es aquella en la que se ha podido identificar un componente genético no totalmente clarificado, pero en la que se sabe que existe una posible particularidad genética que llevara a nuevas orientaciones en todos los aspectos de la enfermedad, incluyendo en el análisis epidemiológico (6).

Existen pocos estudios de prevalencia de EP en la población latinoamericana. En un estudio en la población de Antioquia, Colombia, se reporta una prevalencia de EP general de 30,7/100 000 y en mayores de 50 años de 176,4/100 000 (12). En otro estudio puerta a puerta realizado en la población chilena se reporta una prevalencia de 190/100 000 habitantes (13).

En el estudio neuroepidemiológico realizado en Colombia en el año 2003, se estableció la prevalencia de diferentes enfermedades neurodegenerativas, y se encontró para la Enfermedad de Parkinson una prevalencia de 4,7% (14,15).

3.4. MECANISMOS FISIOPATOLOGICOS INVOLUCRADOS EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON (7).

La característica fisiopatológica de la EP es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas a nivel de la sustancia nigra, responsable de la síntesis de dopamina. Las causas de la enfermedad aun no son claras y se sabe que existen variedad de factores asociados a su desarrollo, como lo son ciertas toxinas ambientales y algunas mutaciones genéticas específicas. Existen

diversos mecanismos fisiopatológicos estudiados que son básicos para el daño y posterior pérdida de las neuronas dopaminérgicas, pero que finalmente confluyen en el deterioro de las neuronas de la sustancia nigra y posterior muerte neuronal (7).

3.4.1. Metabolismo de la Dopamina

En condiciones normales, las neuronas dopaminérgicas están expuestas a un estrés oxidativo por el mismo metabolismo de la dopamina, que tiene como resultado la producción de diversas moléculas que actúan como neurotoxinas endógenas (9).

A nivel del citoplasma existen diferentes enzimas que pueden provocar reacciones químicas sobre la dopamina (Figura 1) que liberan grandes cantidades de moléculas oxidantes perjudiciales para las neuronas (7,9).

FIGURA 1. Metabolismo de la Dopamina

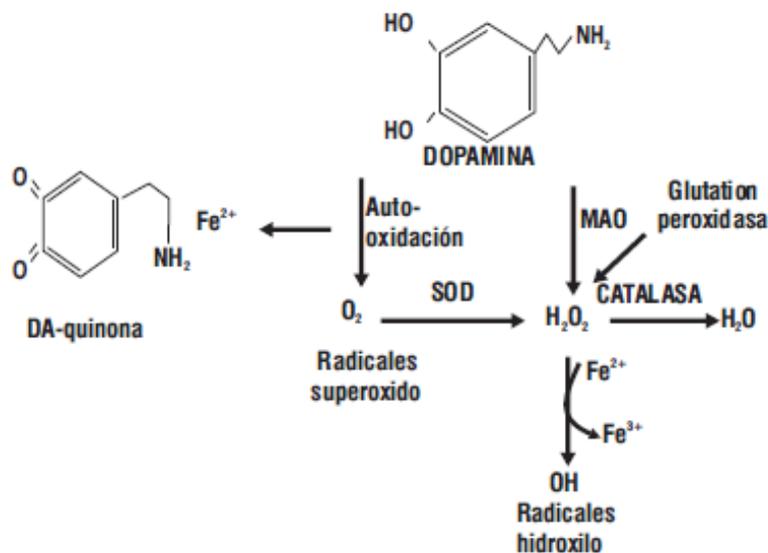


FIGURA 1. Generación de estrés oxidativo por el metabolismo de la dopamina, y su participación en el proceso neurodegenerativo. En las neuronas dopaminérgicas el metabolismo de la DA puede ocurrir espontáneamente por auto-oxidación o puede ser catalizada por la monoaminoxidasa (MAO), ambas reacciones generan peróxido de hidrogeno (H_2O_2). El H_2O_2 por sí sólo no daña a la neurona, aunque induce citotoxicidad al formar radicales libres hidroxilo. A su vez, la DA-quinona y los radicales súperoxido también son citotóxicos.

Tomado de: Gómez-Chavarrín y cols. *Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson*. Arch Neurocién (Mex). Vol. 17, No. 1: 25-33; 2012

Entre las más importantes en la generada por la enzima monoamino oxidasa (MAO), que desamina la dopamina generando moléculas de DOPAC (ácido 3,4-hidroxifenilacetico) y H_2O_2 (peróxido de hidrogeno), este último es

relativamente inofensivo, sin embargo en presencia de hierro se genera una reacción en la que se liberan radicales oxidrilo (OH) que son altamente citotóxicos. Cabe resaltar que a nivel de la sustancia nigra la concentración de hierro es mucho mayor que en otras regiones del cerebro, razón por la que puede facilitarse el desarrollo de la EP si esta última reacción entre H₂O₂ y Fe²⁺ se encuentra exacerbada. La liberación de radicales reactivos de oxígeno afecta directamente la función de las proteínas asociadas al DNA y de algunos lípidos de la neurona. El daño a nivel de los lípidos provoca alteraciones estructurales y funcionales a nivel membranar, modificando su permeabilidad, contribuyendo de esta forma también en el aumento de la citotoxicidad (7).

Por estos motivos es fundamental que la dopamina sea inocua para la neurona, y esto se logra a través de su almacenamiento en las vesículas sinápticas (Figura 2) ya que en estas por su pH bajo y la ausencia de MAO no se generan dichas reacciones metabólicas perjudiciales para las neuronas, manteniendo así la homeostasis celular regulando el proceso oxidativo (7).

FIGURA 2: Almacenaje Intravesicular de la Dopamina

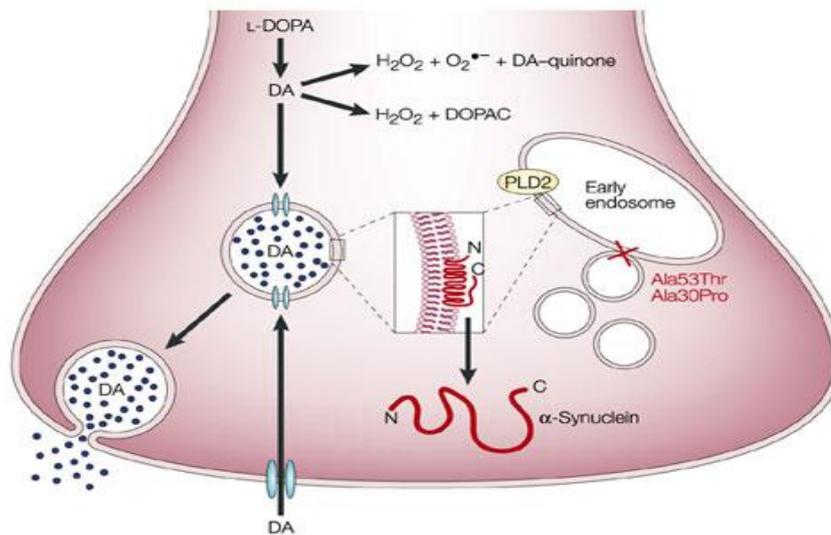


FIGURA 2. alfa-sinucleína y el almacenaje intravesicular de la dopamina. Esquema de una terminal presináptica de una neurona dopaminérgica, en la que es posible observar la función de la alfa-sinucleína en el almacenaje de la dopamina (DA). Una vez sintetizada, la DA es secuestrada en las vesículas. En los casos en los que es deficiente el secuestro, la DA se oxida y forma en el citoplasma peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radicales súperoxido (O₂⁻) y DA-quinona, que son productos altamente citotóxicos. El 50% de la alfa-sinucleína se encuentra asociada a la membrana presináptica, y el resto se une a la membrana fosfolipídica de las vesículas donde modifica su estructura secundaria en alfa-hélice.

Tomado de: Gómez-Chavarrín y cols. Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson. Arch Neurocién (Mex). Vol. 17, No. 1: 25-33; 2012

3.4.2. Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo es una condición perjudicial para las neuronas dopaminérgicas y resulta de la presencia de radicales reactivos de oxígeno que como se vio anteriormente se generan por el metabolismo de la dopamina (7,9).

Existen diferentes mecanismos utilizados por las células para controlar dichos procesos oxidativos. Estos sistemas antioxidantes pueden verse alterados por el proceso normal de envejecimiento o por algún tipo de patología en las que estos mecanismos se ven perjudicados (7,9).

Uno de los mecanismos comúnmente afectados es el regulado por el glutatión. El glutatión es un co-sustrato que junto con la peroxidasa y la catalasa regula la detoxificación del peróxido de hidrógeno. En el proceso normal de envejecimiento esta actividad se encuentra reducida ya que el glutatión se encuentra marcadamente disminuido en los pacientes con EP y por lo tanto la disminuida e inadecuada eliminación del H₂O₂ y de radicales reactivos de oxígeno aumenta el daño oxidativo a nivel del DNA, lípidos y proteínas. Además de ello algunas anomalías genéticas y la exposición a toxinas ambientales puede contribuir en este deterioro, y específicamente el de las neuronas dopaminérgicas (7).

3.4.3. Los cuerpos de Lewy y la Vía Proteosómica de la Ubiquitina (VPU)

Los cuerpos de Lewy son inclusiones eosinófilas que se encuentran entre las células de la sustancia nigra en pacientes con EP, sin embargo se han encontrado este tipo de inclusiones en otras enfermedades de carácter neurodegenerativo. El componente más importante de los cuerpos de Lewy son los filamentos de alfa-sinucleína (7). Se ha identificado que alteraciones en ciertos genes son responsables de alteraciones directas en la conformación de la alfa-sinucleína, e igualmente alteraciones en el proceso de eliminación de esta proteína alterada a través del sistema VPU.

Se han identificado diversos genes asociados al desarrollo de la EP y tres de ellos están implicados en la formación de cuerpos de Lewy: PARK1, PARK2 y PARK5 (7). PARK1 responsable de la codificación de la proteína alfa-sinucleína, PARK2, ligasa de la Ubiquitina E3, participa en la degradación de proteínas dañadas o mal plegadas en la vía proteosómica de la ubiquitina VPU y PARK5, participa en la VPU durante el reciclado de moléculas de ubiquitina (7).

3.4.4. Mecanismos participantes en la formación de los cuerpos de Lewy

Los cuerpos de Lewy contienen filamentos de alfa-sinucleína, sin embargo presentan algunas otras proteínas como ubiquitina, subunidades de proteosoma y neurofilamentos (5,7). En condiciones normales la proteína alfa-sinucleína se encuentra en forma no plegada, cuando se da un aumento en su concentración se forman placas beta denominadas protofibrillas, que después se precipitan formando fibras en el interior de los cuerpos de Lewy (7).

Mutaciones en el gen PARK1 aumentan la tendencia de la alfa sinucleína para formar protofibrillas, que son citotóxicas para la célula (7).

Las modificaciones estructurales de la alfa-sinucleína provocan también alteraciones a nivel de la integridad de la membrana de las vesículas sinápticas en donde hace parte de su constitución, estas alteraciones provocan la formación de poros a través de los cuales la dopamina puede regresar al citoplasma y sufrir los procesos de oxidación anteriormente descritos, perjudiciales para la neurona (7).

3.4.5. Mutaciones en los genes PARK2 y PARK5 y la función de la alfa-sinucleína

Como se dijo anteriormente las proteínas productos de los genes PARK2 y PARK5 están involucradas en la vía de ubiquitinación de las proteínas VPU o proteosoma. En condiciones normales las proteínas con algún tipo de alteración, por ejemplo proteínas mal plegadas o dañadas por resultado del estrés oxidativo son degradadas por el proteosoma. Los monómeros de ubiquitina son activados por la enzima E1, posteriormente esta ubiquitina activa es conjugada con E2. La parkina en este caso, codificada por el gen PARK2, que tiene como función ligasa E3, une el complejo ubiquitina+E2 a la proteína mal plegada de alfa sinucleína, y es llevada al proteosoma, donde es degradada. Posteriormente la ubiquitina ya utilizada es reciclada por UCHL1 para estar nuevamente disponible en el siguiente proceso (Figura 3) (7).

Cuando existen mutaciones en los genes involucrados en el proceso de eliminación de la alfa-sinucleína y de otras proteínas alteradas, estas se acumulan en el citoplasma y se tornan tóxicas para la neurona. Igualmente se han encontrado algunas otras funciones que pueden verse perjudicadas por las alteraciones en estos genes. Por ejemplo se ha determinado que la parkina interviene en el funcionamiento y la regulación de las vesículas sinápticas por lo cual su alteración funcional generara daños en el almacenamiento de la dopamina, desencadenando el aumento del estrés Oxidativo y el daño y posterior muerte celular (7).

FIGURA 3. Degradación de la alfa-sinucleína

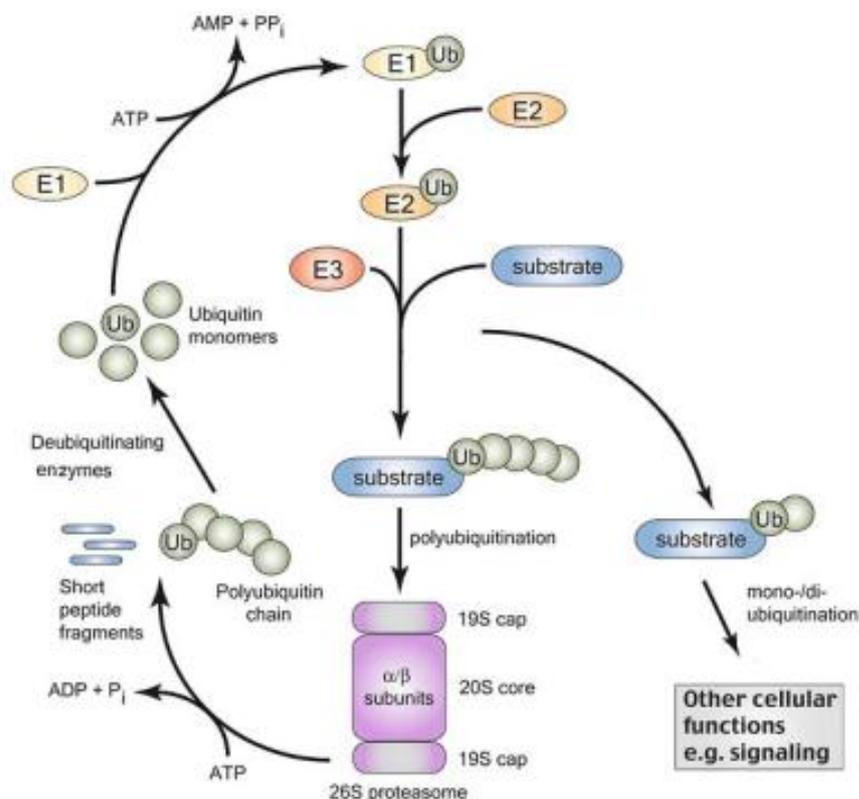


FIGURA 3. Degradación de la alfa-sinucleína por la vía proteosómica de ubiquitina. Esta vía regula la concentración de las proteínas intracelulares mediante un proceso cíclico, en donde múltiples moléculas de ubiquitina activadas se conjugan con una proteína, y una vez dentro del proteosoma 26s, la proteína será desdoblada en péptidos y cadenas de ubiquitina, para ser nuevamente activadas y reiniciar su unión a otras proteínas que requieren ser degradadas. En la EP es posible que existan deficiencias en varios componentes de esta vía, que pueden ser: proteínas dañadas, mal plegadas o mutantes (ej: alfa-sinucleína), en la ubiquitina ligasa (E3) y en la ubiquitina C-terminal hidrolasa (UCHL1), estas alteraciones son componentes importantes en el desarrollo de los procesos neurodegenerativos, e indican que el deterioro en la eliminación adecuada de las proteínas dañadas es determinante para el desarrollo y progreso de la enfermedad.

Tomado de: Sara Peres de Morais. Juvenile Parkinson disease caused by parkin mutations: large deletions and pathogenic mechanisms. Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nova de Lisboa. Noviembre de 2011.

3.4.6. Diversos mecanismos convergen en el desarrollo de la EP

La EP es, como se ha visto, una enfermedad en la que convergen diversos factores que permiten el desarrollo de la misma. Aunque existen causas externas como toxinas ambientales, causas propias de la célula como el aumento de toxinas endógenas por neurodegeneración asociada con la edad o por alteraciones genéticas que provocan fallas en diversos mecanismos, no se ha podido determinar con total claridad todos aquellos mecanismos que intervienen en la aparición y desarrollo de la enfermedad. Actualmente se conoce que en la EOPD existe un gran componente genético y por ello es uno de las causalidades más estudiadas, ya que en la EP de inicio esporádico asociada con la edad, los mecanismos que facilitan el desarrollo de esta patología son aun más difíciles de establecer (7, 8,9).

3.5. GENETICA Y LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Desde el punto de vista genético, la EP es una enfermedad compleja y multifactorial ya que contribuyen factores genéticos y ambientales (8). Hasta ahora, las causas genéticas han podido explicar hasta 10% de todos los casos de EP. Al ser la EP una enfermedad genéticamente heterogénea y de herencia compleja el riesgo para cualquier persona a desarrollar EP es de 1% a 2%. Cuando hay antecedentes familiares para esta enfermedad el riesgo acumulado para desarrollar EP es de 3% a 7% lo que demuestra la importancia del componente genético de este variante de la EP (8).

Se han identificado mutaciones y polimorfismos en más de 10 genes relacionados con la EP ya sea como causales o genes de susceptibilidad para la enfermedad. Seis de estos genes (PARK1, PARK2, PARK5, PARK6, PARK7 y PARK8) han sido fuertemente establecidos como causales o como factores de susceptibilidad para la EP (8).

TABLA 1. Loci y genes asociados con EP

Locus	Localización cromosómica	Patrón de herencia	Proteína	Presunta función	Referencia
PARK1	4q21	AD	α -sinucleína	NC	Polymeropoulos y cols. 1997 (54)
PARK2	6q25.2-27	AR	parkina	E3 ubiquitina ligasa	Kitada y cols. 1998 (23)
PARK3	2p13	AD	NC	NC	Gasser y cols. 1998 (13)
PARK5	4p14	AD	UCH-L1	Ubiquitina C-terminal hidrolasa	Leroy y cols. 1998 (30)
PARK6	1p36	AR	PINK1	Protein-quinasa mitocondrial	Valente y cols. 2001 (69)
PARK7	1p36	AR	DJ-1	Chaperona, respuesta a estrés oxidativo	Van Duijn y cols. 2001 (70)
PARK8	12p11.2	AD	dardarina	LRRK2 Protein-quinasa	Paisan-Ruiz y cols. 2004 (45)
PARK10	1p32	AD	NC	NC	Hicks y cols. 2002 (19)
PARK11	2q36	AD	NC	NC	Pankratz y cols. 2002 (46)

TABLA 1. Modificado de Morris HR, 2005 (42). Muestra los loci relacionados con EP familiar. AD, autosómico dominante, AR, autosómico recesivo. NC, no conocida. PARK4 fue excluido ya que corresponde a la triplicación del gen de PARK1. PARK9 fue excluido ya que se encontró que no era un locus de Enfermedad de Parkinson.

Tomado de: Vidrio Morgado y cols. *FACTORES GENÉTICOS INVOLUCRADOS EN LA SUSCEPTIBILIDAD PARA DESARROLLAR ENFERMEDAD DE PARKINSON*. Salud Mental, Vol. 30, No. 1, enero-febrero 2007

3.5.1. PARK2: Gen

El locus de PARK2 fue mapeado en 1997 en el cromosoma 6q25.2-q27. El gen PARK2 contiene 12 exones y se extiende por aproximadamente 1,38 Mb (16).

3.5.2. Parkina

PARK2 codifica para la proteína parkina de 465 aminoácidos y de peso molecular 51,652 daltons. Esta proteína es expresada de forma ubicua, pero se encuentra principalmente a nivel del cerebro en la sustancia nigra. A nivel celular se encuentra predominantemente a nivel del citoplasma, las vesículas sinápticas, aparato de Golgi y membrana mitocondrial.

La parkina participa fundamentalmente en las sinapsis y su principal función es de ubiquitin ligasa, importante en la vía de degradación proteín-ubiquitina, como se trató anteriormente (7, 8,17).

Los pacientes con EP de inicio temprano frecuentemente presentan mutaciones en el gen PARK2 (15). Estudios realizados en familias de origen europeo han permitido observar diversos tipos de mutaciones en este gen como deleciones y duplicaciones de exones por ejemplo. Estos estudios han sugerido también que aproximadamente el 50% de los casos de Parkinson de inicio temprano son debido a mutaciones en el gen PARK2, siendo identificadas con mayor frecuencia mutaciones en este gen en estos individuos (4). Se han identificado más de 100 mutaciones en este gen. También se han reportado polimorfismos como S167N, R366W y V380L asociados a un riesgo elevado de presentar EP esporádico.

Igualmente estudios realizados en familias colombianas demostraron la presencia de mutaciones de este gen en pacientes con EP (5). El único dato sobre estos genes en Colombia se tiene gracias a un estudio realizado por el grupo de neurociencias de la Universidad de Antioquia (5), en el cual se identificó la mutación C255delA, en el exón 2 de PARK2 (Parkin), después de realizar el estudio familiar y molecular en una gran familia de origen caucano al suroccidente del país, con una historia familiar de consanguinidad entre los padres y una descendencia de 10 hijos de los cuales 4 fueron afectados por PD de inicio temprano, confirmando una herencia autosómica recesiva de acuerdo con el árbol genealógico y las pruebas moleculares (5).

3.5.3. Mutaciones en el gen PARK2 y Enfermedad de Parkinson de Inicio Temprano

Se han identificado diversas mutaciones en PARK2. En un estudio europeo se pudo determinar la presencia de mutaciones en este gen en un 50% de los casos familiares de EOPD y en un 10% de los casos esporádicos de EP (4, 8,16).

Todo tipo de mutaciones se han descrito en pacientes con EP, tales como mutaciones puntuales que resultan en cambios de aminoácidos, deleciones e inserciones de nucleótidos. Estas mutaciones se presentan de forma autosómica recesiva principalmente (aunque se han encontrado casos de herencia autosómica dominante), tanto en estado heterocigoto como homocigoto, que provocan las alteraciones estructurales y funcionales de la proteína parkina (16).

El cuadro clínico de los pacientes con EP en los cuales existe una mutación en el gen PARK2 no son diferenciables, con formas esporádicas de EP, excepto por la edad de aparición (16).

Se han identificado más de 100 mutaciones en el gen PARK2. Las mutaciones se han identificado principalmente en los exones 2, 3, 4, 5 y 7 en diversos estudios en población, europea y asiática fundamentalmente (5, 8, 16,17, 19).

3.5.4. El sistema ubiquitin-proteosoma

La vía de la ubiquitina-proteosoma es el principal mecanismo en la célula para el catabolismo proteico, interviniendo de manera directa en el funcionamiento y recambio de muchas proteínas reguladoras. Esta vía participa en la regulación de procesos celulares fundamentales, tales como: control del ciclo celular, reparación del DNA, oncogénesis, catabolismo de proteínas anormales, modulación de la respuesta inmune e inflamatoria, modulación de receptores de superficie y canales iónicos, procesamiento de antígenos, biogénesis de los ribosomas, transcripción, infección vírica, degeneración neural y muscular, diferenciación celular, respuesta al estrés, etc. (13, 20)

La degradación de una proteína por el sistema de la ubiquitina implica dos etapas sucesivas: 1) conjugación covalente de múltiples residuos de ubiquitina a una proteína, y 2) degradación de la proteína ubiquitinada por el complejo proteosoma de 26S, con la liberación de trozos de la proteína y de ubiquitina libre reutilizable. Para asegurar la eliminación eficiente de una cierta proteína en un determinado momento, tanto la conjugación de la ubiquitina como la degradación de los sustratos ubiquitinados han de estar estrictamente regulados (20).

En el proceso de conjugación covalente de la ubiquitina con la proteína sustrato intervienen tres reacciones enzimáticas secuenciales que conllevan la unión del residuo glicocólico del terminal carboxilo de la ubiquitina con el grupo ϵ -amino de

un residuo de lisina (K) de la proteína sustrato. Una cadena de poliubiquitina se va elaborando sobre la proteína por adiciones de monómeros de la ubiquitina en sucesivas rondas de ubiquitinación. Estas moléculas de ubiquitina van añadiéndose a residuos específicos de lisina de la última ubiquitina de la cadena. Las proteínas unidas a la cadena de poliubiquitina son reconocidas por el proteosoma para su degradación proteolítica con el concomitante reciclado de monómeros de la ubiquitina por enzimas desubiquinantes (20).

3.5.4.1. Ubiquitina

Es una proteína con 76 aminoácidos y 8,6 kDa. Está formada por cinco láminas beta y una gran hélice alfa. Esta proteína se une a las proteínas que van a ser degradadas en un proceso denominado ubiquitinación. La ubiquitina actúa a modo de etiqueta para que la proteína pueda ser reconocida por el proteosoma para su degradación (20).

El proceso de conjugación de la ubiquitina, demostrado por Avram Hershko, es reminiscencia de la activación de los aminoácidos y ocurre en tres etapas: 1) En una reacción dependiente de ATP, el carboxilo terminal de la ubiquitina se conjuga mediante un enlace tioéster con el enzima activador de la ubiquitina E1. 2) La ubiquitina se transfiere a un grupo SH del enzima conjugador, transportador de ubiquitinas (E2). 3) La ubiquitina ligasa E3 transfiere la ubiquitina activada en E2 a un grupo ϵ amino de una lisina de una proteína sustrato formando un enlace isopeptídico. Al parecer E3 es clave en la selección de la proteína a degradar (13, 20).

El enlace covalente entre la ubiquitina y el sustrato proteico requiere la activación del grupo carboxilo terminal de la ubiquitina. En esta reacción, la ubiquitina se une al enzima activador de la ubiquitina (ubiquitin activating enzyme) E1, mediante un enlace tioéster de alta energía, entre el carboxilo terminal del residuo de glicocola y el residuo de cisteína del sitio activo del enzima E1 (E1-S-Ub). En esta reacción el enzima E1 hidroliza el ATP a AMP y PPi, con la intermediaria formación de un E1- ubiquitin adenilato (Figura 3). La ubiquitina así activada se transfiere entonces desde el enzima E1 a un miembro de una familia denominada proteína transportadora de ubiquitina (ubiquitin carrier protein) E2, formando un enlace tioéster similar al formado anteriormente con el enzima E1 (E2-S-Ub). La ubiquitina, de esta manera, puede ser transferida directamente desde el enzima E2 al sustrato proteico, al que se une mediante un enlace isopeptídico con el grupo ϵ de un residuo amino de lisina (K) del sustrato. Otras reacciones de conjugación requieren la intervención de un tercer enzima, la ubiquitina ligasa (E3). E3 se une a la proteína sustrato y también a E2 para formar un complejo E2-E3-sustrato. La formación y reconocimiento de dicho complejo tiene una alta especificidad de sustrato para la cascada de conjugación (20).

El enzima E1, activador de la ubiquitina, es esencial en la ubiquitinación y degradación proteica. Su inactivación a temperatura elevada causa la pérdida de un 80 por 100 de la proteólisis. Existe un solo E1, producto de un solo gen. El enzima E2 es la proteína transportadora de la ubiquitina. Existen 50 tipos

diversos, que son polipéptidos pequeños de unos 150 residuos que contienen en su sitio activo un residuo de cisteína, además de presentar una identidad elevada entre ellos. El enzima E3, ubiquitin-ligasa, es un polipéptido de 225 kDa, que reconoce el objetivo. E3 actúa a modo de puente de interacción entre E2 y el sustrato. Existen más de 100 tipos de E3 con especificidad para un solo sustrato. E3 se muestra en dos formas: con dominio HECT y con dominio RING finger, ambos poseen también dominios de enlace a E2 (Figura 4) (20).

FIGURA 4. Ubiquitina Y Conjugación

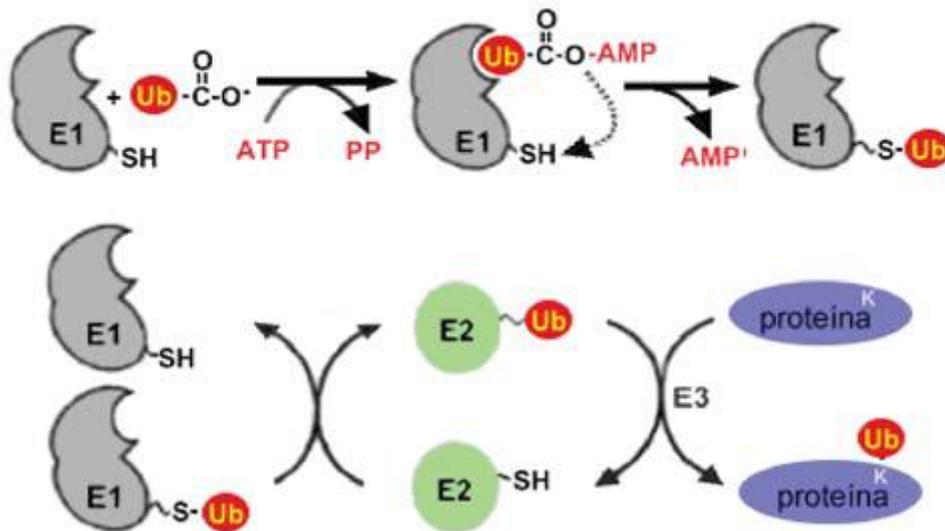


FIGURA 4. Una molécula de ubiquitina se adenila en presencia del enzima E1 y ATP. Posteriormente, la ubiquitina se une por su carboxilo terminal a un grupo SH de un residuo cisteína en E1, formando un enlace tioéster de alta energía y liberando AMP. La ubiquitina así activada se transfiere entonces desde el enzima E1 al enzima transportador E2, formando un enlace tioéster similar al formado anteriormente con el enzima E1. La ubiquitina se transfiere directamente al sustrato proteico mediante un enlace isopeptídico con el grupo ϵ de un residuo lisina (K) del sustrato. Otras reacciones de conjugación requieren la intervención de un tercer enzima, la ubiquitina ligasa (E3). E3 se une a la proteína sustrato y también a E2 para formar un complejo E2-E3-sustrato. La formación y reconocimiento de dicho complejo tiene una alta especificidad de sustrato para la cascada de conjugación.

Tomado de: MARÍA CASCALES ANGOSTO. *Vía de la ubiquitina-proteosoma. Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 45-82*

El dominio HECT de la ligasa E3 debe su denominación a *Homologous E6-AP C-terminus*, siendo E6-AP un factor celular que induce la poliubiquitinación de p53, requerida para la transformación mediada por el virus del papiloma humano. El dominio HECT consiste en una secuencia de 350 aminoácidos con una protuberancia helicoidal N-terminal de 100 aminoácidos como una mezcla separada de hélices α y láminas β , que incluye una cisteína cerca del N-terminal, directamente implicada en la transferencia de ubiquitina. Varios motivos WW actúan como sitios de unión de fosfoserina. Las ligasas HECT-E3 sirven como adaptadores para unir el sustrato a una E2 específica, formando un intermediario en el cual la ubiquitina se une a la cisteína conservada. El dominio RING finger de la ligasa E3 debe su denominación a: *Really Interesting*

New Gene. Contiene una estructura en doble bucle rica en cisteína formados por dos átomos de Zn. Este dominio actúa a modo de soporte donde se unen el enzima y el sustrato o subunidades juntas. Las ligasas RING finger E3 incluyen tanto las de cadena sencilla como los grandes complejos APC y SCF implicados en el ciclo celular. Una complicación adicional para estudios genómicos es que algunas las ligasas E3 son complejos de varias subunidades proteicas (20).

FIGURA 5. Formas de la Ligasa E3

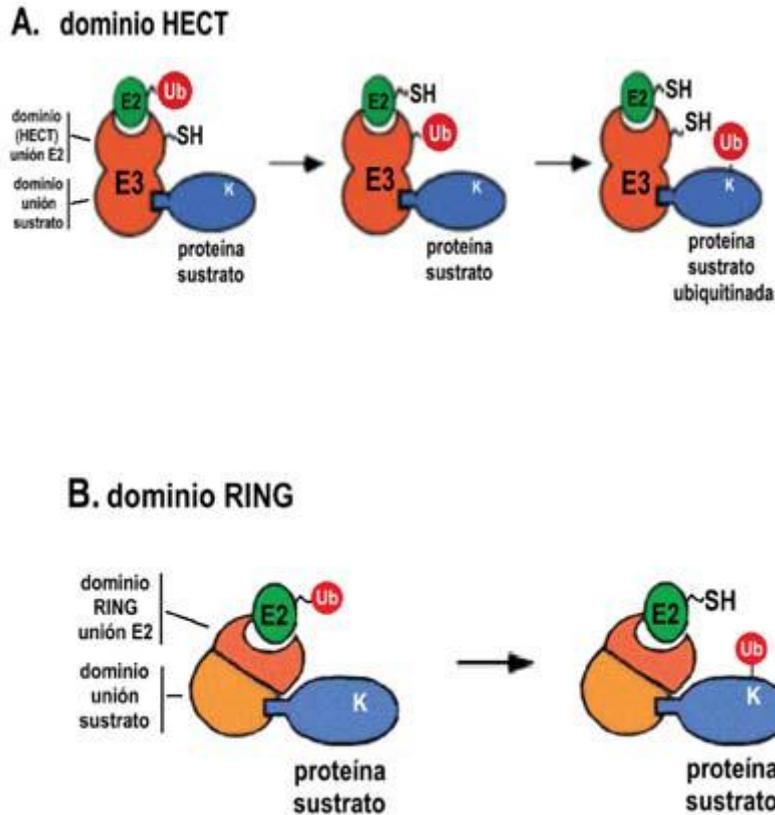


FIGURA 5. Formas de la ubiquitina ligasa E3. A) Dominio HECT. B) Dominio RING finger

Tomado de: MARÍA CASCALES ANGOSTO. *Vía de la ubiquitina-proteosoma. Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 45-82*

La diversidad de la maquinaria ubiquitina-proteosoma la proporciona las múltiples formas de E3 con capacidad para reconocer a un grupo específico de sustratos (Figura 5) (20). Una de las proteínas pertenecientes a la familia E3 es la proteína parkina.

3.5.4.2. Proteólisis

La ubiquitina al unirse a proteínas, éstas quedan marcadas para su destrucción. Para que este marcaje sea posible es preciso que la ubiquitina se active previamente en un proceso que consume energía. Dicho de otro modo: la ubiquitina es una etiqueta costosa que marca a las proteínas para que sean posteriormente destruidas. El otro protagonista del proceso es el proteosoma, una gran molécula de forma cilíndrica que reconoce y se une a las proteínas ubiquitinizadas y las destruye en su interior consumiendo también energía. Antes de que esto tenga lugar, las unidades de ubiquitina se liberan para ser reutilizadas (20).

FIGURA 6. Mecanismo Ubiquitina-Proteosoma

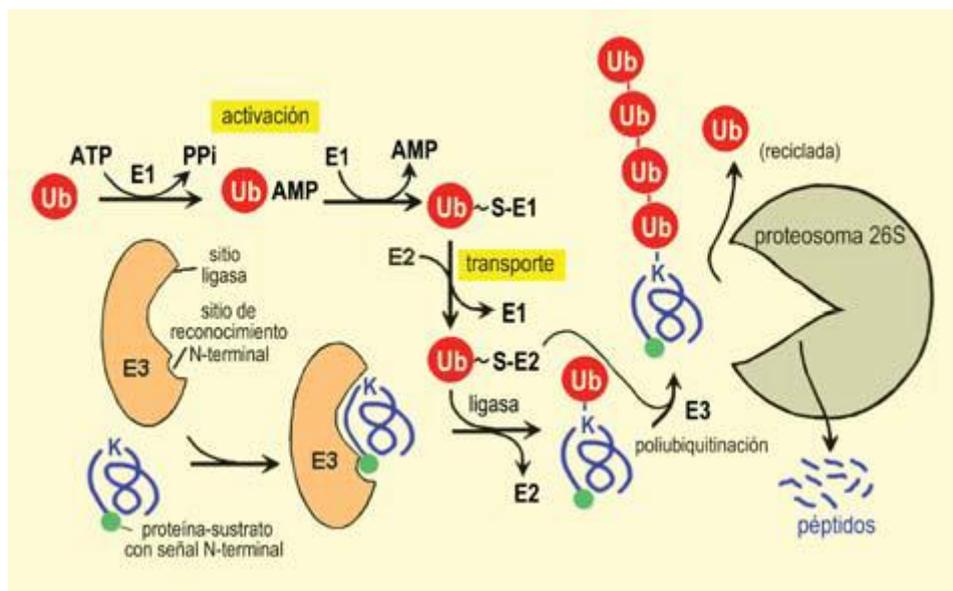


FIGURA 6. Mecanismo de la vía ubiquitina proteosoma donde se muestra en la E3 ligasa los sitios de reconocimiento del N-terminal de la proteína y el sitio catalítico ligasa.

Tomado de: MARÍA CASCALES ANGOSTO. *Vía de la ubiquitina-proteosoma. Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 45-82*

La proteólisis está mediada por proteasas dependientes de ATP, esenciales, intracelulares y ubicuas, denominadas proteosomas o proteasas multicatalíticas. Los proteosomas degradan una amplia variedad de proteínas citoplásmicas, nucleares y de membrana, que hayan sido marcadas para su degradación mediante la inserción de moléculas de ubiquitina. Los proteosomas de eucariotas son grandes complejos proteicos de alrededor de 2,500 kDa, con arquitectura modular (Figura 6). El proteosoma es una proteasa multimérica, que cataliza el paso final de la degradación de las proteínas intracelulares, vía de ubiquitina-proteosoma. El proteosoma existe en múltiples formas en las células eucariotas. En todas las isoformas se encuentra el núcleo catalítico (CP) conocido como proteosoma 20S. La hidrólisis del ATP

se requiere para el desplegamiento de la proteína que le permita la accesibilidad al núcleo catalítico (20). La forma del proteosoma que reconoce y degrada estas proteínas poliubiquitinadas es el proteosoma 26S. Este complejo multienzimático de 2.500 kDa de masa molecular está formado por el núcleo catalítico de 20S, antes mencionado y dos copias de un complejo regulador de 19S (Figura 7). El mecanismo general de degradación de las proteínas poliubiquitinadas es: 1) Reconocimiento y unión del sustrato poliubiquitinado por el receptor en el complejo 19S; 2) despliegue mecánico de la proteína sustrato, dependiente de ATP; 3) introducción de la proteína desplegada en el núcleo 20S después de haberse desprendido la cadena de poliubiquitina por acción de isopeptidasas; 4) rotura de la proteína en fragmentos de 8 a 9 residuos, y 5) salida de los péptidos por el extremo 19S opuesto (20).

FIGURA 7. Proteosoma 26S

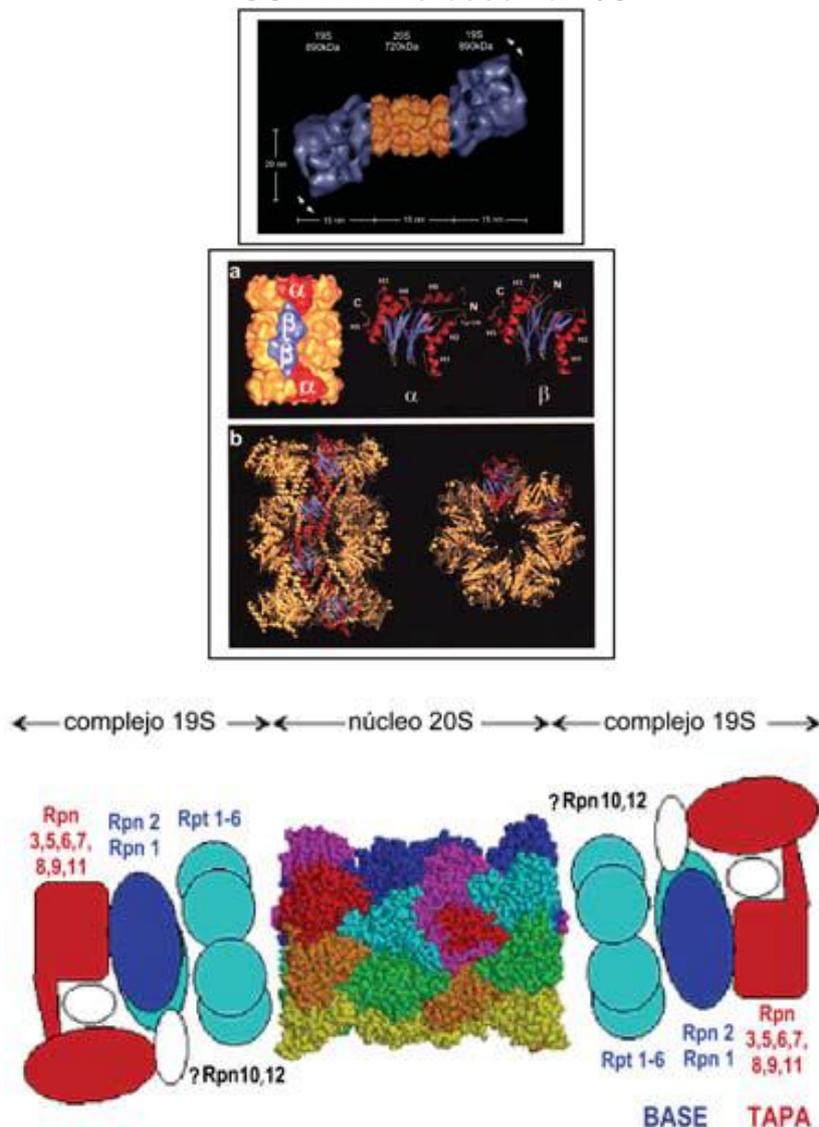


FIGURA 7. Distintas representaciones del proteosoma 26S.

Tomado de: MARÍA CASCALES ANGOSTO. *Vía de la ubiquitina-proteosoma. Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 45-82*

3.5.4.3. Vía de la ubiquitinación-proteosoma y control del ciclo celular

Uno de los descubrimientos más relevantes de la actualidad es el hecho de determinar que el ciclo celular se encuentra regulado por el sistema de proteólisis. Aunque este concepto es reciente, desde el descubrimiento de las ciclinas, se vislumbraba la existencia de acontecimientos proteolíticos que podían controlar las transiciones del ciclo celular. Entre las proteínas a degradar se incluyen la mayoría de las ciclinas, los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (ICDK), factores de replicación del DNA, las securinas, que inhiben la pérdida de la cohesión de las cromátidas hermanas después de la replicación del DNA y por supuesto el mismo factor de cohesión, cohesina. El control de la degradación proteica se encuentra a nivel de ubiquitinación, activación de ubiquitina ligasas, conjugación con moléculas ubiquitínicas, fosforilación de objetivos proteolíticos y activación de proteasas de la clase separina (20,21).

El control del ciclo celular se encuentra en el centro de muchos procesos biológicos y el descontrol en la proliferación celular conduce al cáncer. La división celular es desencadenada por la variación de las actividades de las quinasas dependientes de ciclina (CDK), las cuales, a su vez, están reguladas por la síntesis y degradación periódicas de las ciclinas, subunidades reguladoras de las CDK. La destrucción de las ciclinas mediante la vía ubiquitina-proteosoma inactiva las CDK y media la transición unidireccional de un ciclo celular al siguiente (20, 22). Además de las ciclinas existen también otros reguladores, tales como p27, p53, inhibidor de la anafase, Cdc20, una serie de quinasas y proteínas motoras relacionadas con la quinesina, etc., todas reguladas por la vía proteolítica de la ubiquitina proteosoma. Por tanto, el sistema ubiquitina-proteosoma controla, no sólo las actividades CDK, sino también la ejecución de muchos acontecimientos del ciclo celular más allá del circuito regulador de las CDK (20)

La progresión del ciclo celular está regulada por mecanismos de vigilancia o puntos de control que aseguran que la iniciación de un acontecimiento se acople con la finalización del acontecimiento anterior. Estos mecanismos de control aseguran la integridad del genoma y la fidelidad de la separación de los cromosomas mediante una ejecución ordenada de los acontecimientos (20). La inactivación de esos controles es la causa principal de la inestabilidad genómica (Figura 8).

Existen diversos puntos de control del ciclo celular: G1-S, G2-M y M-G1. La proteólisis dependiente de ubiquitina es crítica en dos importantes etapas del ciclo celular: G1-S y M-G1. Complejos ubiquitin ligasas actúan en cada una de estas etapas por un mecanismo diferente (20).

FIGURA 8. Ciclo celular y Sistema Ubiquitina

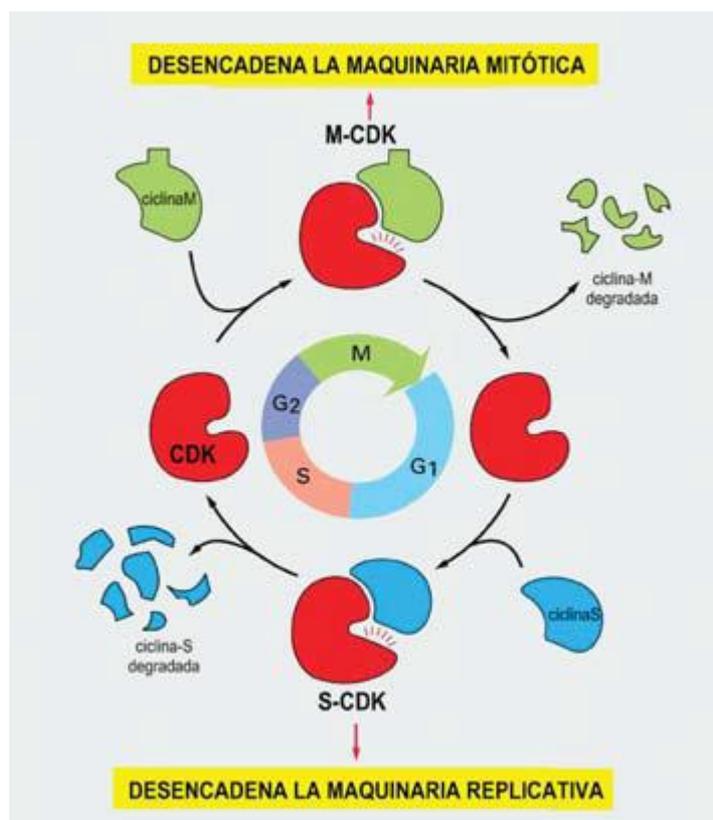


FIGURA 8. La célula usa las ciclinas y las degrada para regular las distintas fases del ciclo celular.

Tomado de: MARÍA CASCALES ANGOSTO. *Vía de la ubiquitina-proteosoma. Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 45-82*

La progresión G1-S requiere la acción de un complejo denominado SCF (Skp1, Culina y caja F). SCF reconoce proteínas fosforiladas en las secuencias PEST (Prolina, Glutamato/Aspartato, Serina Treonina), sitios comunes en proteínas que tienen un recambio rápido (vida media corta). La proteólisis dependiente de ubiquitina es importante para mantener la progresión del ciclo celular. El SCF poliubiquitina la ciclina D, previa fosforilación de dicha ciclina D por la misma CDK que ella activa y esta fosforilación la señala para ser ubiquitinada por SCF y posterior degradación por el proteosoma (20) (Figura 8).

La entrada en S requiere la degradación proteolítica de un inhibidor de la fase S denominado p27. Para ello, p27 tiene que ser fosforilada en su motivo PEST por la ciclina/CDK de G1, y así puede ser poliubiquitinada por SCF y degradada por el proteosoma. Una vez eliminado el inhibidor p27, la célula puede entrar en S. En la mitosis funcionan dos puntos de control, uno a la entrada de la mitosis G2-M y el otro en la transición metafase-anafase (20).

FIGURA 9. CONTROL DE TRANSICION G1-S POR SCF

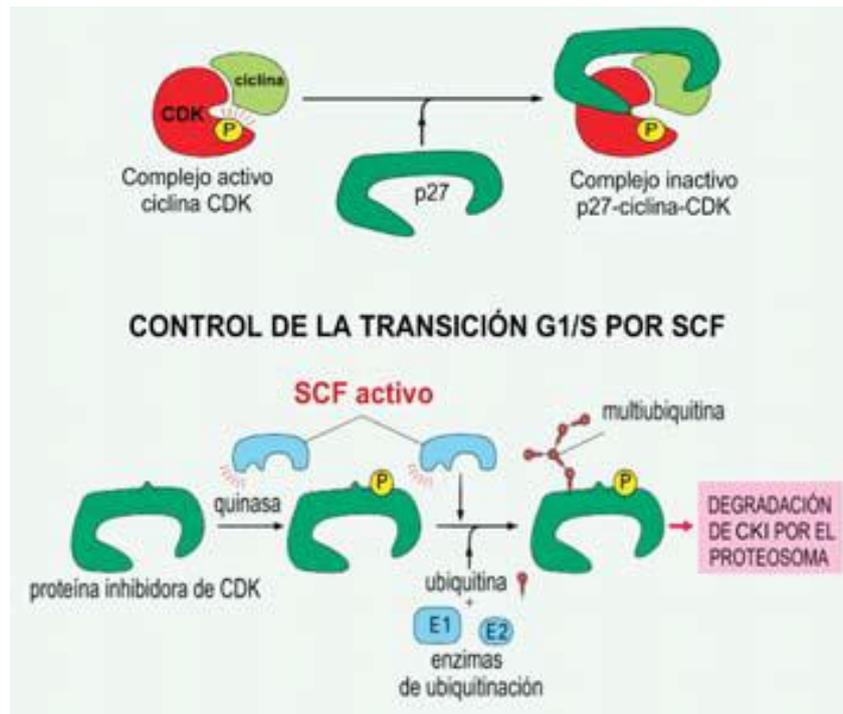


FIGURA 9. Control de la transición G1/S por el SCF, que promueve la degradación del inhibidor de las G1-CDK, la proteína p27.

Tomado de: MARÍA CASCALES ANGOSTO. *Vía de la ubiquitina-proteosoma. Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 45-82*

La mitosis es aquella fase del ciclo celular donde la célula sufre la división celular y la citoquinesis, distribuyendo el material genético igualmente entre las dos células hijas. APC (Anaphase Promoting Complex) es una ubiquitina ligasa E3 compleja, formada por 12 subunidades proteicas. Es un importante regulador de la mitosis que controla la transición metafase-anafase, el movimiento de los cromosomas en la anafase, salida de la mitosis y acoplamiento entre las fases S y M (20).

El punto de control de la metafase controla la inserción del huso mitótico a los cinetocoros y la tensión generada por la inserción del huso mitótico. En presencia de un solo cinetocoro no inserto, el control de la metafase frena la separación de las cromátidas hermanas y proporciona tiempo adicional para dicha inserción. De esta manera, el control de la metafase asegura la alta fidelidad de la separación de los cromosomas y previene la aneuploidia durante la mitosis (20).

El punto de control de G2/M funciona cuando una célula entra en mitosis. Vigila los acontecimientos dependientes de los microtubulos, tales como la separación de los centrosomas duplicados en G2, y retrasa la transición en presencia de alteración en los microtúbulos. Así, este punto de control

determina la duración de la entrada en mitosis y asegura una mitosis productiva (20).

Ambos puntos de control de la mitosis están regulados por APC (*Anaphase Promoting Complex*), el complejo promotor de la anafase, complejo ubiquitina ligasa, antes mencionado, importante para la transición metafase/anafase durante la mitosis. APC cataliza la ubiquitinación de las ciclinas de la fase M. La regulación de APC es complicada y está parcialmente regulada por fosforilación de las subunidades de APC. La fosforilación de APC por la ciclina/CDK mitótica activa APC para ubiquitinar las ciclinas mitóticas. Su especificidad de sustrato está controlada por diferentes subunidades que forman parte del complejo. Por ejemplo, la degradación de las ciclinas mitóticas se requiere para la iniciación de la separación de los cromosomas. Más tarde, en la telofase, APC comienza a degradar proteínas implicadas en la anafase. Una subunidad que proporciona especificidad para las ciclinas mitóticas se reemplaza por otra que confiere especificidad para las proteínas de la anafase.

En la transición metafase-anafase, la cohesión de las cromátidas hermanas está mediada por las cohesinas. La disolución de tal cohesión corresponde a una cisteína endopeptidasa, la separasa, que actúa sobre la cohesina rompiendo la unión con una de sus subunidades, la Scc1, con lo que queda inactiva. La inactivación de la cohesina permite la separación de las cromátidas y la transición a la anafase. Previamente, la separasa tuvo que dissociarse de su inhibidor, la securina, la cual se degrada por la vía ubiquitina-proteosoma, utilizando la APC, previamente activada por unión con Cdc20.

De esta manera se observa que la actividad SCF se regula por modificación de los sustratos, mientras que la actividad APC se regula por modificación del complejo APC. Estudios muy recientes han demostrado que el complejo APC, aparte de su papel en el control de la mitosis, es también importante previniendo la degradación de los sustratos del complejo SCF durante la fase G1, con la consiguiente entrada prematura en la fase S, la cual causaría inestabilidad genómica. Wei *et al.* (23) sugieren que APC puede tener actividad supresora de tumores mediante su inhibición de Skp2, cuyas elevadas concentraciones se relacionan con la desestabilización de p27 en cánceres humanos (20).

3.5.4.4. Alteraciones en la Vía Ubiquitina-Proteosoma y Enfermedad

En el sistema ubiquitin-proteosoma, una proteína sustrato sufre una modificación por la ubiquitina o por una proteína ubiquitínica. Esta modificación remodela la superficie de la proteína sustrato, afectando entre otras propiedades, su estabilidad, interacciones con otras proteínas, actividad y localización subcelular (20). En muchos casos las proteínas son modificadas por muchas ubiquitinas que generan una cadena ramificada de poliubiquitina. Para la mayor parte de las proteínas, estas modificaciones de la proteína conducen a su degradación por el proteosoma 26S. Además, dependiendo del carácter de la unión entre las ubiquitinas, las modificaciones pueden conducir a la activación de reguladores de la transcripción (20).

Modificaciones por monoubiquitinación puede marcar las proteínas para su degradación lisosómica. La conjugación de ubiquitina o proteínas ubiquitínicas puede servir también para producir una variedad de funciones no proteolíticas, tales como activación de enzimas, modulación de la dinámica de la membrana, o dirigir a las proteínas marcadas a su destino subcelular (20).

La ubiquitinación de las proteínas celulares es un mecanismo complejo y estrictamente controlado que selecciona de manera específica multitud de proteínas. Cualquier alteración o aberración que afecte este mecanismo tiene que influir en la patogénesis de muchas enfermedades, tales como ciertas malignidades, enfermedades neurológicas y patologías de los sistemas inmune e inflamatorio (24, 25).

El hecho de que estas modificaciones estén originadas por una cascada modular de enzimas con elevada especificidad hacia motivos estructurales definidos en las proteínas sustratos, hace que tengan que ser consideradas como modificaciones post-traduccionales que juegan importantes misiones en la regulación de un amplio espectro de procesos celulares: división celular, diferenciación, transducción de señales, transporte y control de calidad. No sorprende, por tanto, que las aberraciones en el sistema se hayan implicado en la patogénesis de muchas enfermedades, cáncer, enfermedades neurodegenerativas y patologías de la respuesta inflamatoria e inmune, entre ellas. Así, se han encontrado relacionadas como primera causa o consecuencia secundaria, en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas transmitidas por herencia o adquiridas. Recientes hallazgos indican que este sistema está involucrado en la patogénesis de enfermedades de Alzheimer (26), Parkinson, Huntington, de los priones y la esclerosis lateral amiotrófica (27). El conocimiento de los mecanismos que intervienen es importante para el desarrollo de nuevos medicamentos basados en estos mecanismos.

Las mutaciones en el gen de la parkina causa enfermedad de Parkinson juvenil autosómica recesiva. En casos de enfermedad de Parkinson esporádica, la parkina se acumula en los esferoides axonales y en algunos cuerpos de Lewy. Como la ubiquitina es el principal componente de los cuerpos de Lewy y los esferoides axonales, Choi *et al.* (28) decidieron investigar la relación entre la parkina y la ubiquitina. Los datos obtenidos por estos investigadores demostraron que la parkina era un sustrato de esta vía degradativa, y también que la parkina jugaba un papel en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson esporádica. Recientemente se descubrió que la parkina es una E3 ligasa, que regula por ubiquitinación proteínas del ciclo celular (como ciclina E). La mutación de la parkina lleva a la acumulación de ciclina E y esto lleva a la muerte neuronal por apoptosis (29).

4. METODOLOGIA

4.1. DISEÑO

Se realizó un estudio descriptivo observacional de tipo *cross sectional*. Este es un estudio piloto que se ejecutó para determinar de manera aproximada la frecuencia de las mutaciones existentes en los exones evaluados del gen PARK2 en pacientes con EP de inicio temprano. Se realizó el análisis molecular de las muestras de los pacientes afectados con EP así como también de los individuos sanos.

4.2. HIPOTESIS

En los pacientes con EP de inicio temprano o con un componente familiar existen mutaciones en los exones 3, 4 y 5 que pueden estar relacionadas con la susceptibilidad del sujeto a presentar la enfermedad, y por lo tanto establecer un componente genético asociado a un proceso fisiopatológico desencadenante de la EP de inicio temprano.

4.3. POBLACION Y MUESTRA

La población de estudio fueron sujetos diagnosticados con enfermedad de Parkinson de inicio temprano (inicio anterior a los 50 años de edad).

La muestra se obtuvo de pacientes diagnosticados con EP de que cumplieron los criterios de inclusión, contactados a través de la Liga de Parkinson de Bogotá principalmente y a través de otros medios informativos. La muestra inicialmente, por ser un estudio piloto (según Pallas y Villa) (30), fue de 50 individuos, 29 pacientes con EP de inicio temprano o con historia familiar de la enfermedad y de 21 controles sanos.

4.4. CRITERIOS DE INCLUSION/EXCLUSION

4.4.1. Criterios de Inclusión

Los pacientes fueron incluidos en la investigación cuando cumplieron con las siguientes condiciones:

- Individuos diagnosticados con EP de inicio anterior a los 50 años de edad (diagnostico de la enfermedad verificado con la historia clínica del paciente).
- Sexo indistinto
- Individuos que acepten su participación de forma voluntaria en el estudio.

En el estudio fueron incluidos en la investigación individuos sanos que cumplían con las siguientes características:

- Edad: Entre 18 y 50 años
- Sexo: Indistinto
- Individuos sin ningún antecedente familiar de Enfermedad de Parkinson o alguna otra enfermedad neurodegenerativa.
- Individuos que acepten su participación de forma voluntaria en el estudio.

4.4.2. Criterios de Exclusión

Los pacientes no fueron incluidos en la investigación si presentaban alguna de siguientes características:

- Individuos diagnosticados con alguna otra enfermedad neurodegenerativa como Alzheimer.
- Sujetos sin diagnostico diferencial de Parkinson, o en aquellos en los que no se haya aclarado la patología específica, antes de los 50 años de edad.

4.5. METODOS

4.5.1. FUENTES DE INFORMACION

Los sujetos que cumplieron con los criterios de inclusión y que fueron aptos en el estudio firmaron previamente un consentimiento informado en el que se especificaron las condiciones generales del proyecto y la forma en la que como unidad de análisis, participarían en el mismo.

Se dispuso de fuentes secundarias, en este caso las historias clínicas de los pacientes (en los casos en que fue posible), para corroborar su diagnostico de la enfermedad.

4.5.2. TECNICAS DE RECOLECCION

4.5.2.1. Extracción de Sangre

Se realizó toma de muestras de sangre periférica, previa firma de consentimiento informado, a los pacientes y a los individuos sanos, con sistema venoject. Fueron extraídos dos tubos con EDTA de 4mL a cada uno de los pacientes.

4.5.2.2. Extracción de DNA

Se realizó extracción de DNA con el uso de la técnica salina *Probe* y con el kit comercial *Corpogen DNA*. Fueron obtenidos dos viales de DNA por sujeto. Se evaluó la concentración de DNA extraído a partir de espectrofotometría y posteriormente se realizó PCR de cada una de las muestras de DNA para confirmar su adecuada extracción.

4.5.2.3. Primers

Para el gen PARK2 se utilizaron los primers referenciados por Kay y col, 2007 y West y col, 2002:

EXON 3 PRIMER F	F 5' CTTGCTCCCAAACAGAATT 3'
EXON 3 PRIMER R	R 5' AGGCCATGCTCCATGCAGACTGC 3'
EXON 4 PRIMER F	F 5' ACAAGCTTTTAAAGAGTTTCTTGT 3'
EXON 4 PRIMER R	R 5' AGGCAATGTGTTAGTACACA 3'
EXON 5 PRIMER F	F 5' ACATGTCTTAAGGAGTACATTT 3'
EXON 5 PRIMER R	R 5' TCTCTAATTTCTGGCAAACAGTG 3'

4.5.2.4. Estandarización de PCR

Se realizó la estandarización de la técnica de PCR para cada uno de los exones estudiados y posteriormente se sometieron todas las muestras, tanto de los pacientes como de los individuos sanos, a esta técnica con las condiciones óptimas. Se utilizaron reactivos de la casa comercial *Promega* y el termociclador *BIORAD T100*.

Las condiciones en lo referente a los reactivos para la amplificación cada exón después de la estandarización fueron las siguientes:

Reactivos:

Reactivos (uL)	EXON 3	EXON 4	EXON 5
dNTPs	1,5	1,5	2,0
Buffer	1,5	1,5	2,0
MgCl₂	2,5	2,0	3,0
Primer F	1,0	1,0	1,0
Primer R	1,0	1,0	1,0
DNA	1,0	1,0	2,0
Tag	0,1	0,1	0,1
Agua	9,4	9,9	6,9
TOTAL	18	18	18

Las condiciones en lo referente a las temperaturas de la PCR para la amplificación cada exón después de la estandarización fueron las siguientes:

Temperaturas PCR:

Temperaturas (°C) PCR	EXON 3 (427 pb)	EXON 4 (261 pb)	EXON 5 (227 pb)
Denaturacion Inicial	94x10min	94x10min	94x10min
Dentauracion	94x30seg	94x30seg	94x30seg
Anillamiento	57x30seg	54x30seg	55,7x30seg
Elongación	72x45seg	72x45seg	72x45seg
Elongacion Final	72x10min	72x10min	72x10min
Ciclos	30X	30X	30X

4.5.2.5. PCR

Se realizó la amplificación de los exones con las condiciones previamente descritas para cada uno de los exones, utilizando reactivos de la casa comercial *Promega* y el termociclador *BIORAD T100 Thermo Cyclers*.

4.5.2.6. Secuenciación

Obtenidos los productos amplificados por PCR se procedió a realizar la secuenciación de las muestras de los pacientes y los controles, para cada uno

de los exones estudiados. La secuenciación fue realizada por *ELIM Biopharmaceuticals, Inc. USA*. Para la secuenciación fueron amplificados los diferentes exones para cada uno de las muestras (pacientes y controles), y fueron enviados 20 uL del producto amplificado.

4.5.2.7. Análisis de las Secuencias

El análisis de las secuencias obtenidas se realizo con el software *Sequencher*.

4.6. VARIABLES

Variable Dependiente: Mutación en los exones 3, 4 y 5 del gen PARK2

Variable Independiente: Enfermedad de Parkinson de Inicio Temprano

Variables de Caracterización:

- Edad (Años)
- Genero (Masculino/Femenino)

Tabla 2. TABLA OPERACIONAL DE VARIABLES

GRUPO DE VARIABLES	VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	NOMBRE	INDICADOR	CODIGO	NIVEL DE MEDICION
CHARACTERIZACION	Edad	Cuantitativa	EDAD	Años	Edad en años	De razón
	Genero	Cualitativa	SEX	%	1.Femenino 2.Masculino	Nominal
RESULTADOS	Mutación en el exón 3	Cualitativa	MUTE3	%	0.No 1.Si	Nominal
	Mutación en el exón 4	Cualitativa	MUTE4	%	0.No 1.Si	Nominal
	Mutación en el exón 5	Cualitativa	MUTE5	%	0.No 1.Si	Nominal

4.7. CONTROL DE SEGOS Y ERRORES

La muestra será de 29 pacientes ya que es un proyecto piloto. Se tomaron muestras de 21 individuos sanos para comparación de resultados.

La evaluación de los pacientes, para confirmar el diagnóstico se realizó a partir de la verificación de las historias clínicas.

Los procesos de laboratorio se realizaron con base en protocolos establecidos. La técnica de amplificación PCR se estandarizó para cada uno de los exones para asegurar la confiabilidad y especificidad de los resultados.

4.8. PLAN DE ANÁLISIS

Se determinó la presencia de las mutaciones y/o polimorfismos en los exones evaluados del gen PARK2 en los individuos afectados por EP de inicio temprano, así como también se realizó el análisis de posibles cambios en los individuos sanos. Se realizó una estimación de riesgo con el cálculo del OR y se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar significancia estadística, utilizando el software estadístico EPIDAT 3,1 (2006).

4.9. ASPECTOS ETICOS

De acuerdo con la resolución 08430 de 1993 del ministerio de salud de Colombia (Actual Ministerio de Protección Social), el presente estudio fue catalogado como una investigación de riesgo mínimo, ya que se emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes, en este caso la extracción de sangre por punción venosa. Por esta razón se solicitará consentimiento informado y se preservará la privacidad y la intimidad de los pacientes.

5. RESULTADOS

Se realizó a estandarización de la PCR para cada uno de los exones.

Figura 10. Estandarización PCR exones 3 y 4

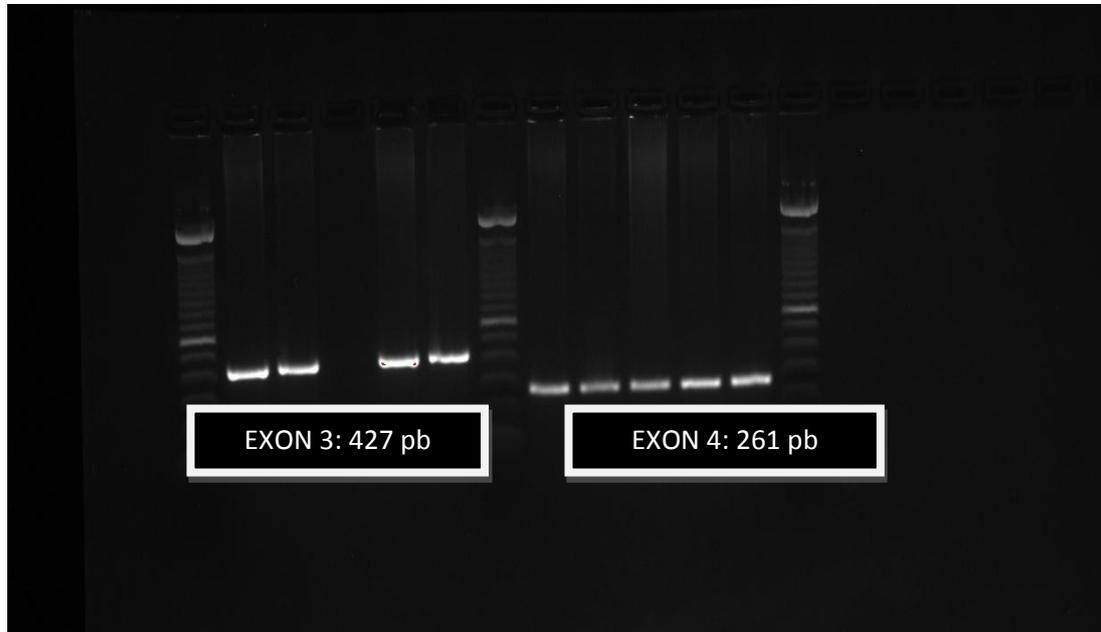


Figura 10. Estandarización de PCR. Gel de agarosa. Exones 3 (427 pb) y 4 (261 pb) respectivamente.

Se evaluaron 29 pacientes y 21 controles. Los pacientes fueron en 41,4% hombres y 58,6% mujeres y los controles estuvieron distribuidos en 42,9% hombres y 57,1% mujeres, siendo la edad de 44 años de edad (Tabla 3).

Tabla 3. Datos Demográficos de muestra de Pacientes y Controles analizadas

Pacientes	
Genero(F/M)	17/12
Controles	
Genero (F/M)	12/9
Edad en años	44 +/- 7,6 (39-50)

Se realizó el análisis de las secuencias obtenidas con el software *Sequencher* y se realizó la búsqueda y comparación de las secuencias con las bases de datos *Ensembl*.

No se encontraron mutaciones ni polimorfismos en los exones 3 y 5 del gen PARK2, ni en pacientes ni en controles.

En dos de los pacientes se encontraron mutaciones en el EXON 4 que generaron cambio en el aminoácido y en uno de los controles se encontró un cambio sinónimo que no provocó modificación en la estructura proteica.

En el paciente P010 después de evaluada las secuencias se encontró:

Figura 11. Mutación paciente P010

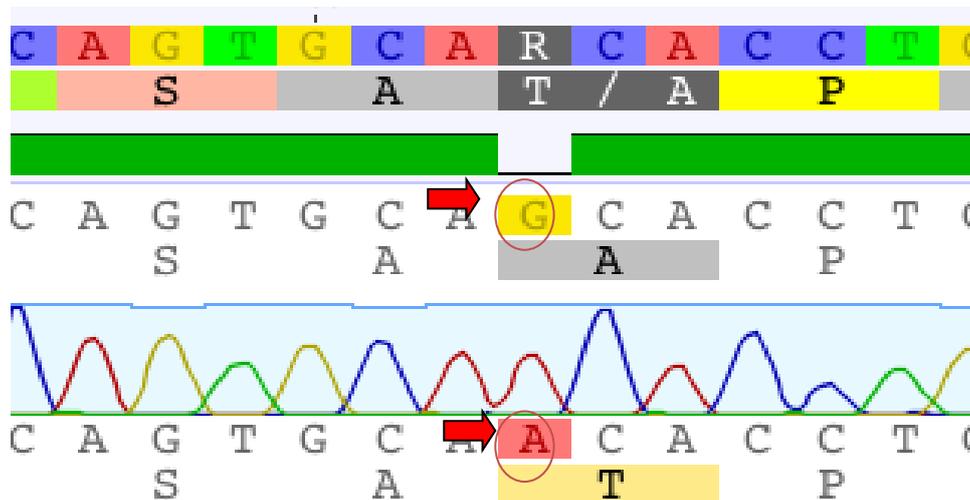


Figura 11. Mutación G>A de tipo homocigoto, que provoca el cambio en el aminoácido Ala46Thr.

La mutación provoca un cambio en el aminoácido Ala46Thr que provoca una modificación en la secuencia de aminoácidos pero sin cambios en la longitud de la proteína. Después de la evaluación de bases de datos (Ensembl, NCBI) no se encontró esta variante como posiblemente asociada a manifestaciones fenotípicas patológicas relacionadas con la enfermedad. Puede ser un polimorfismo que no genera un efecto fisiopatológico involucrado en el desarrollo de la enfermedad o en el riesgo de padecer esta.

En el paciente P020, se encontró una mutación de tipo heterocigoto reportada en la literatura en diversos estudios (31,32):

FIGURA 12. Mutación paciente P020

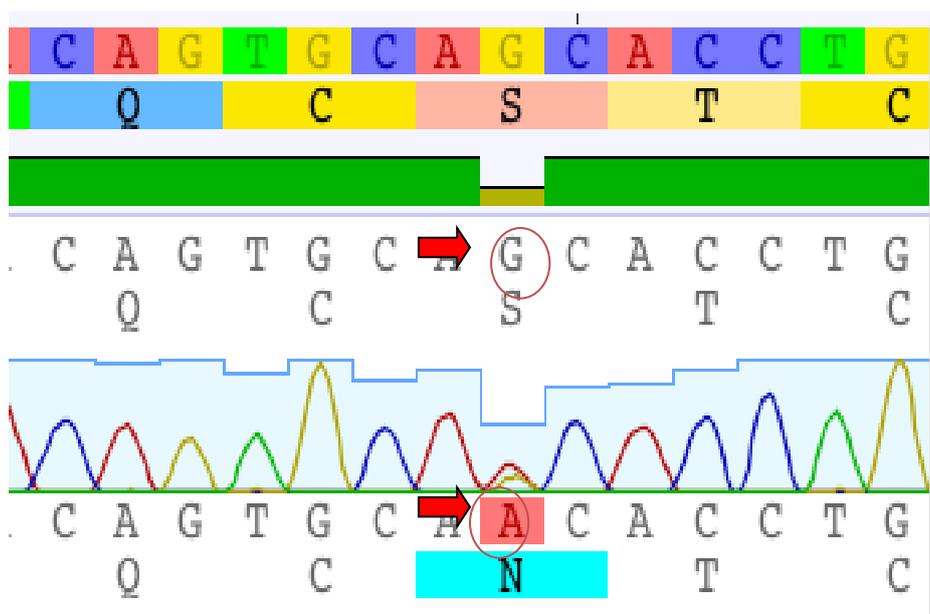


Figura 12. Mutación G>A de tipo homocigoto, que provoca el cambio en el aminoácido Ser167Asn.

Esta mutación identificada, es una mutación de tipo heterocigota, en donde se presenta un cambio de aminoácido en la posición 167 (31). Este cambio ha sido reportado en diversos estudios en poblaciones europeas, asiáticas y americanas (31,32). Se ha determinado que esta mutación puede provocar cambios en el tamaño y la estructura de la proteína, generalmente asociadas al plegamiento de la misma, que puede generar cambios en su funcionamiento, sin embargo no se ha identificado específicamente su efecto en la fisiopatología de la enfermedad, a pesar de ello, por su ubicación, se plantea que puede perjudicar de cierta manera la unión entre el dominio de unión al sustrato de la parkina y el sustrato específico. Esta mutación, es una mutación encontrada a nivel mundial y por lo tanto puede ser un posible biomarcador a tener en cuenta en el análisis diagnóstico de la EP.

Se identificó un cambio sinónimo en el paciente P023, que al parecer no representa ningún efecto en el desarrollo de la enfermedad.

FIGURA 13. Muestra P023

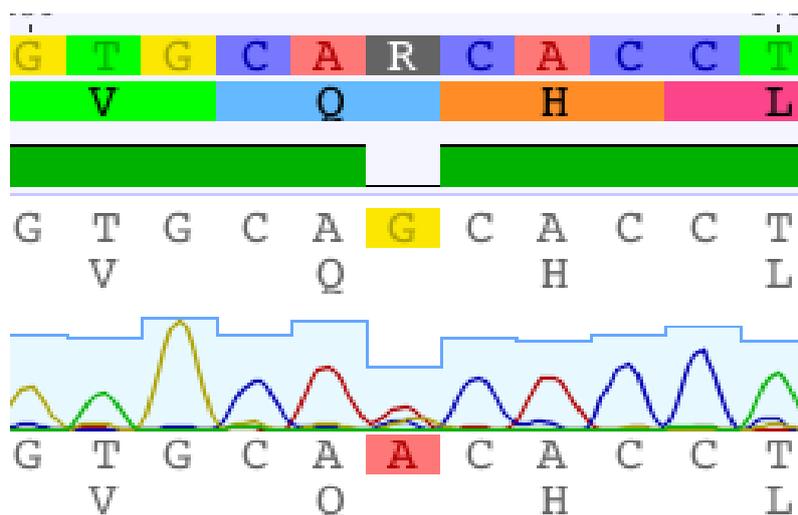


Figura 13. Mutación **G>A**. Cambio sinónimo.

Puede tratarse de un polimorfismo que no genera ninguna alteración funcional de la proteína y por lo tanto no está aparentemente involucrado en la aparición o desarrollo de la enfermedad.

Se realizó una estimación (por tratarse de un estudio transversal) de la posible asociación utilizando el cálculo de OR, y se aplicó un test exacto de Fisher para evaluar significancia con el software EPIDAT 3,1 (2006). El resultado mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos entre los casos y controles evaluados.

Tabla 4. Tabla de contingencia 2x2.

	MUTACION EXON	NORMAL	TOTAL
PACIENTES CON EP	2	27	29
INDIVIDUOS SANOS	1	20	21
TOTAL	3	47	50

OR = 1,48 IC 95% (0,12-17,49)

Prueba exacta de Fisher p = 0,62

6. CONCLUSIONES

La EP de inicio temprano es una patología que tiene una clara influencia genética, sin embargo el esclarecimiento de los mecanismos y alteraciones moleculares que llevan al entendimiento de la enfermedad aun se encuentran siendo analizados. Estudios en diferentes poblaciones del mundo han determinado ciertos genes que están asociados con el desarrollo de la enfermedad incluyendo el gen PARK2 o PRKN codifica para la proteína Parkina una proteína de 465 aminoácidos.

FIGURA 14. Mutaciones comunes gen PARK2 (Mutación Ser167Asn)

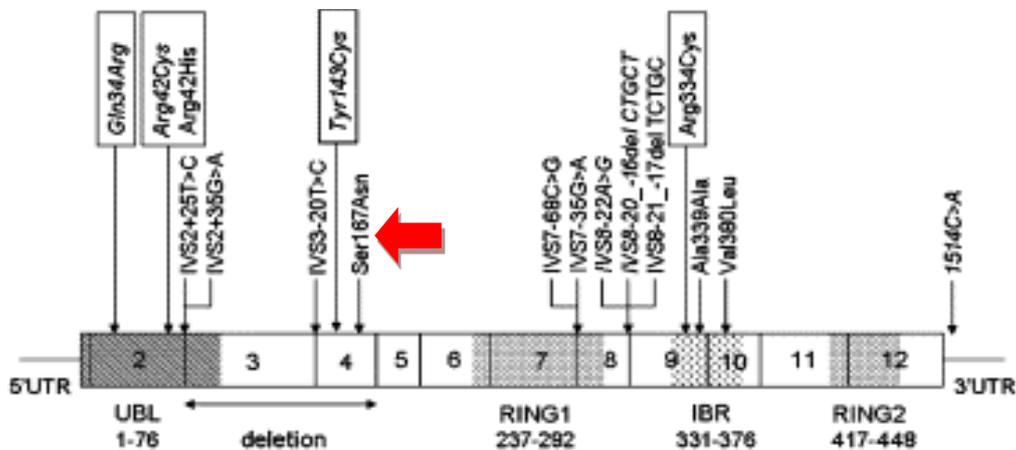


Figura 14. En la figura se observan algunas mutaciones identificadas en el gen PARK2. Se encuentra resaltada la mutación Ser167Asn identificada en uno de los pacientes del estudio, que está directamente asociada al dominio de unión al sustrato.

Tomado de: Biswas A, Maulik M, Das SK, et al. Parkin polymorphisms: risk for Parkinson's disease in Indian population. Clin Genet 2007;72:484-486.

Se conoce que la proteína parkina tiene función de ligasa de las proteínas ubiquitinadas y se sugiere que las mutaciones en parkina llevan a la pérdida de función, reduciendo su capacidad de regular la degradación de sustratos. También se ha observado que una forma O-glicosilada de la α -sinucleína es ubiquitinada por parkina, sugiriendo que la pérdida de función de esta última lleva a la acumulación de α -sinucleína.

Se han realizado numerosos estudios para determinar cuáles son los cambios genéticos característicos en las diferentes poblaciones. En Colombia, por ejemplo, se realizaron estudios familiares para conocer dentro de estas familias, cual era la mutación característica y qué tipo de herencia se presentaba en estas. Sin embargo es importante realizar un estudio en población Colombiana en donde pueda determinarse cuales son las mutaciones más frecuentes y de esta manera poder establecer un perfil epidemiológico y diagnóstico que facilite el manejo de los pacientes con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los mismos, así como también contribuir al entendimiento genético y fisiopatológico de la enfermedad, contribuyendo de esta manera al establecimiento de un perfil de biomarcadores que permitan el diagnóstico temprano de la enfermedad.

Este estudio se ejecutó como un estudio piloto con el fin de conseguir a partir de una muestra de 29 pacientes y 21 controles, establecer e identificar posibles mutaciones en pacientes con EP de inicio temprano.

En este estudio se lograron identificar tres cambios en la secuencia del gen en tres pacientes diferentes. En el primero de los pacientes se encontró un cambio en el aminoácido G>A, que genera la modificación del aminoácido Ala46Thr. La mutación provoca un cambio en el aminoácido Ala46Thr que ocasiona una modificación en la secuencia de aminoácidos pero sin cambios en la longitud de la proteína. Después de la evaluación de bases de datos (Ensembl, NCBI) no se encontró esta variante como posiblemente asociada a manifestaciones fenotípicas patológicas relacionadas con la enfermedad. Puede ser un polimorfismo que no genera un efecto fisiopatológico involucrado en el desarrollo de la enfermedad o en el riesgo de padecer esta. Este cambio ha sido previamente reportado, sin embargo no se ha logrado identificar su influencia en la fisiopatología de la EP de inicio temprano. A pesar de ello es importante destacar que se encuentra en estado homocigoto, y que provoca una modificación en la secuencia de aminoácidos pero sin cambios en la longitud de la proteína. Según las bases de datos evaluadas no está relacionada con ninguna manifestación fenotípica característica.

En otro de los pacientes se encontró una mutación G>A, que provoca un cambio Ser167Asn. Esta mutación ha sido reportada en diversos estudios, en población europea, asiática y americana (31,32). Se ha sugerido que este cambio en el aminoácido genera un importante cambio estructural y funcional de la proteína, básicamente asociado a alteraciones en el tamaño y plegamiento de la misma, motivo por el cual este cambio puede estar directamente involucrado en la aparición y desarrollo de la enfermedad en este paciente. Esta mutación se identificó en estado heterocigoto. El último cambio en la secuencia del gen identificado fue un cambio sinónimo que no genera ningún tipo de modificación estructural de la proteína.

Se estimó la posible asociación de riesgo entre la presencia de mutaciones en la manifestación de la enfermedad con el cálculo del OR, y utilizando el test exacto de Fisher sin embargo los resultados no fueron estadísticamente significativos (OR = 1,48 IC 95% (0,12-17,49). Prueba exacta de Fisher $p=0,62$).

Este se trata de un estudio piloto en el que se trabajó con una muestra de 50 individuos ya que tratándose de una enfermedad de tan baja prevalencia el número de individuos afectados con estas características es mínimo. A pesar de ello es totalmente comparable a estudios realizados en otras poblaciones en donde se evaluó un número similar de muestras.

Los resultados obtenidos en este estudio nos revelan que posiblemente existen características genéticas específicas en individuos que presentan la EP de inicio temprano en población colombiana. Igualmente nos muestra mutaciones identificadas en pacientes de la muestra evaluada, que no habían sido reportadas en estudios previos realizados en familias de nuestra población, lo que sugiere que es de vital importancia realizar un estudio de estas características a nivel nacional en donde se involucren grupos poblacionales específicos, y un tamaño de muestra mayor, para así determinar un perfil genético y epidemiológico que contribuya al entendimiento diagnóstico, fisiopatológico y paliativo de la EP de inicio temprano en pacientes colombianos.

Son necesarios estudios de expresión asociados a las mutaciones identificadas. La identificación de estas mutaciones permitirá a partir de estudios epidemiológicos, de asociación y causalidad, facilitar la implementación de paneles de detección de estas mutaciones, que permita realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad y posibles nuevas dianas terapéuticas.

En conclusión, se identificaron mutaciones, anteriormente no halladas en población colombiana, en pacientes colombianos con EP de inicio temprano. Estas mutaciones identificadas, pueden estar directamente relacionadas con las causas y desarrollo de la enfermedad. El estado en el que se presentaron, homocigoto y heterocigoto respectivamente, puede estar directamente relacionado con la severidad de las manifestaciones clínicas de los pacientes, para lo cual es indispensable ejecutar estudios analíticos que permitan evidenciar esta asociación. Estos conocimientos pueden contribuir en la ejecución de una investigación a nivel nacional que permita aumentar la cantidad de individuos evaluados, y con ello la identificación de estas u otras mutaciones en población colombiana.

1. BIBLIOGRAFIA

1. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clinical Neuropsychiatry* 2002;14: 223-236
2. Lazzarini AM, Myers RH, Zimmerman TR, Jr., Mark MH, Golbe LI, Sage JI, et al. A clinical genetic study of Parkinson's disease: evidence for dominant transmission. *Neurology* 1994; 44: 499-506
3. Pollanen MS, Dickson DW, Bergeron C. Pathology and biology of the Lewy body. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; 52: 183-191.ç
4. Bekris et al. The Genetics of Parkinson Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010 December ; 23(4): 228–242
5. Pineda-Trujillo et al. Una mutación en el gen PARK2 causa enfermedad de Parkinson juvenil en una extensa familia colombiana. *Iatreia*, vol. 22, núm. 2, junio, 2009, pp. 122-131 Universidad de Antioquia Medellín, Colombia.
6. Silvia García y cols. Perspectiva histórica y aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Parkinson. *Medicina Interna de México Volumen 24, Núm. 1, enero-febrero, 2008*
7. Gómez-Chavarín y cols. *Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson.* *Arch Neurocién (Mex).* Vol. 17, No. 1: 25-33; 2012
8. Elizondo-Cárdenas G. et al. Genética y la enfermedad de Parkinson: Revisión de actualidades . *Medicina Universitaria* 2011;13(51):96-100 .
9. JOSÉ A. OBESO M.C. RODRÍGUEZ-OROZ I. ZAMARBIDE ENFERMEDAD DE PARKINSON. PERSPECTIVAS. *Area de Neurociencias Clínica Universitaria y Facultad de Medicina Universidad de Navarra*
- 10 M. Rosario Luquin Tratamiento inicial de la enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol* 2010; 50 (Supl 1): S35-S36
11. WHO. Parkinson's disease. *Neurological disorders: public health challenges.* 2007. Savitt JM, Dawson VL, Dawson TM. *Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine.* *J Clin Invest,* 2006;116(7):1744-54.
12. Sánchez JL, Buriticá O, Pineda D, Uribe CS, Palacio LG. Prevalence of Parkinson's disease and parkinsonism in a Colombian population using the capture-recapture method. *Int J Neurosci.* 2004. 114(2):175-82
13. Chiofalo N, Kirschbaum A, Schoenberg B, Olivares O, Valenzuela B, Soto E, Alvarez G. Estudio epidemiológico de las enfermedades neurológicas en Santiago Metropolitano, Chile. *Rev. Chil. Neuro- Psiquiat* 1992;30:355-41.

14. Gustavo Pradilla A y cols. Estudio neuroepidemiológico nacional (EPINEURO) colombiano. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 14(2), 2003
15. De Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, et al. Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's Disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62(1):10-5.
16. Sara Peres de Morais. Juvenile Parkinson disease caused by parkin mutations: large deletions and pathogenic mechanisms. Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nova de Lisboa. Noviembre de 2011.
17. Biswas A, Maulik M, Das SK, et al. Parkin polymorphisms: risk for Parkinson's disease in Indian population. *Clin Genet* 2007;72:484-486.
18. Vidrio Morgado y cols. *FACTORES GENÉTICOS INVOLUCRADOS EN LA SUSCEPTIBILIDAD PARA DESARROLLAR ENFERMEDAD DE PARKINSON*. *Salud Mental*, Vol. 30, No. 1, enero-febrero 2007
19. Asakawa, S., Hattori, N., Shimizu, A., Shimizu, Y., Minoshima, S., Mizuno, Y., Shimizu, Y., Minoshima, S., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (2009): Analysis of eighteen deletion breakpoints in the parkin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389, 181-186
20. MARÍA CASCALES ANGOSTO. Vía de la ubiquitina-proteosoma. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.*, 2005, 71: 45-82
21. CLARKE, D. J. (2002). Proteolysis and the cell cycle. *Cell Cycle*, **1**, 233-234.
22. PETERS, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell*. **9**, 931-943.
23. WEI, W.; AYAD, N. G.; WAN, Y.; ZHANG, G. J.; KRISCHNER, M. W. & KAELIN, W. G. (2004). Degradation of the SCF component Skp2 in cell cycle phase G1 by the anaphase promoting complex. *Nature* **428**, 194-198.
24. CIECHANOVER, A. & IWAI, K. (2004). The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB Life* **56**, 193-201.
25. CIECHANOVER, A. (2003). The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases: a novel platform for mechanism-based drug targeting. *Biochem Soc Trans.* **31**, 74-81.
26. CASCALES, M. (1999). Oxidación y degradación de proteínas. En: Estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedad. *Instituto de España. Madrid*, pp. 91-123.

27. CIECHANOVER, A.; BRUNDIN, P. (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*. **40**, 427-446.
28. CHOI, P.; OSTREROVA-GOLTS, N.; SPARKMAN, D.; COCHRAN, E.; LEE, J. M.; WOLOZIN, B. (2000). Parkin is metabolized by the ubiquitin/proteasome system. *Neuroreport* **11**, 2635-2638.
29. MILLER, R. J.; WILSON, S. M. (2003). Neurological disease: UPS stops delivering! *Trends Pharmacol Sci*. **24**, 18-23.
30. Pallas y Villa. Métodos de Investigación Clínica y Epidemiológica. Elsevier. España. 2004
31. Sanyal y cols. Single Nucleotide Polymorphisms of PARKIN Gene in Ten Indian Populations. *Antrocom Online Journal of Anthropology* 2011, vol. 7. n. 1
- 32.. Deng, H., Le, W., Shahed, J., Xie, W., and Jankovic, J. (2008): Mutation analysis of the parkin and PINK1 genes in American Caucasian early-onset Parkinson disease families. - *Neurosci. Lett.* 430, 1822.

ANEXOS

1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

TITULO DEL PROYECTO

DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES PINK1, PARKIN Y DJ1 EN UNA MUESTRA DE PACIENTES INSTITUCIONALIZADOS CON ENFERMEDAD DE PARKINSON EN BOGOTÁ-COLOMBIA.

SITIO EN DONDE REALIZARÁ LA INVESTIGACIÓN?

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD – UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Le estamos invitando a participar en el estudio “Detección de mutaciones en los genes PINK1, PARKIN y DJ1 en una muestra de pacientes institucionalizados con Enfermedad de Parkinson en Bogotá-Colombia.”

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Ahondar en el conocimiento clínico y genético de la Enfermedad de Parkinson (PD) en una población colombiana institucionalizada mediante el establecimiento del mecanismo de herencia, los hallazgos clínicos y la identificación de mutaciones en los genes causantes de la enfermedad PINK1, PARKIN y DJ1.

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad degenerativa del cerebro, lentamente progresiva que causa movimientos lentos, rigidez de las extremidades y temblor de las manos que es más notorio cuando están en reposo (Klein y col, 2005). Esta enfermedad lleva el nombre del Neurólogo Inglés James Parkinson, quien la describió en 1817. Generalmente se manifiesta inicialmente con un temblor que aparece en una mano. Le acompaña lentitud en la ejecución de movimientos con esa mano y rigidez de la extremidad. En el transcurso de meses o años estos síntomas se pueden extender a la pierna del mismo lado, lo que se conoce como hemiparkinson o parkinson de la mitad del cuerpo o pueden comprometer las cuatro extremidades, el tronco y el cuello, lo que se llamaría Parkinson generalizado. Es típico de esta enfermedad la disminución de la expresión y la mímica de la cara, lo que se conoce como “cara de máscara”. También los pacientes pueden tener salivación excesiva y voz de tono bajo o apagada. Con el transcurso de la evolución de la enfermedad, las personas que la padecen tienen dificultades para pararse estando sentados, dificultades para empezar a caminar, se pegan al piso o tienen trastornos de los

reflejos del equilibrio lo que conlleva a caídas o dificultades para subir planos inclinados por la tendencia a irse hacia atrás (www.neurociencias.udea.edu.co).

La enfermedad de parkinson se presenta de forma esporádica, es decir sin antecedentes familiares conocidos en el 90 % de los casos y en el 10 % restante la enfermedad puede ser hereditaria, afectando tanto a hombres como a mujeres. En la forma esporádica la enfermedad es mas frecuente después de los 60 años mientras que en las formas hereditarias la edad de inicio de la enfermedad es más temprana (www.neurociencias.udea.edu.co).

El diagnóstico de esta enfermedad es realizado por personal médico, generalmente neurólogos, basado en los criterios clínicos de la enfermedad de parkinson y el paciente debe tener 2 de las 3 características principales de la enfermedad para concluir que es sospechoso de padecerla, dichos hallazgos son: temblor, rigidez y lentitud motora. En los casos de origen hereditario el diagnostico definitivo de la enfermedad se hace con pruebas genéticas confirmatorias.

PROCEDIMIENTO

1. Se incluirán en el proyecto pacientes con Enfermedad de Parkinson que cumplan con dos de los tres criterios de diagnóstico de la enfermedad: temblor, rigidez y lentitud motora, se realizará una revisión completa de los hallazgos clínicos descritos por su neurólogo tratante, se realizará un árbol genealógico a cada paciente y se procederá a la firma del consentimiento informado.
2. Se tomara una muestra de sangre periférica por veno-punción en el brazo para la posterior extracción del ADN por el método PROBE la cual podría eventualmente volver a solicitarse más adelante.
3. Se procederá a estandarizar la técnica de PCR para los exones de cada uno de los genes (PINK1, PARKIN y DJ1).
4. Una vez estandarizada la técnica de PCR se procesarán las muestras de los pacientes y posteriormente se enviarán a secuenciación.
5. Al final del trabajo se citarán nuevamente a los pacientes y se les entregará un informe de los resultados obtenidos.

RIESGOS E INCOMODIDADES: La participación en este estudio representa un riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias o efectos adversos estarán representadas exclusivamente por la toma de la muestra referida en el procedimiento, algunas molestias pueden ser: hematomas, enrojecimiento o sensibilidad al tacto en el lugar de donde se extrae la muestra, sin embargo, éstas serán transitorias.

BENEFICIOS ADICIONALES:

- Con la realización de este proyecto esperamos obtener datos estadísticamente significativos desde el punto de vista clínico y genético ya que en nuestro país se desconoce la genética de esta enfermedad en nuestra población.
- Esperamos también poder establecer una correlación entre la clínica y la herencia en cada caso, con el fin de establecer una comparación entre nuestros pacientes colombianos con Enfermedad de Parkinson y otras poblaciones ya descritas por la literatura mundial.
- Adicionalmente esperamos identificar un número considerable de mutaciones en los genes PINK1, PARKIN y DJ1 asociados con la PD y sus frecuencias que permitiría establecer un sondeo del comportamiento y variabilidad genética de nuestra población colombiana con Enfermedad de Parkinson, lo cual conduciría al desarrollo de un programa de diagnóstico molecular de la PD en Colombia.

MANEJO DE LA INFORMACIÓN

Los resultados que se obtengan de la investigación solo se entregaran en forma individual a cada uno de los participantes con la explicación respectiva por parte del médico genetista y en caso de la publicación de resultados de este estudio en una revista científica, la identidad de los participantes será preservada.

Declaración de Consentimiento Informado

Leí y he entendido la información sobre el estudio:” Detección de mutaciones en los genes PINK1, PARKIN y DJ1 en una muestra de pacientes institucionalizados con Enfermedad de Parkinson en Bogotá-Colombia” y tuve la oportunidad de hacer preguntas y de recibir respuestas satisfactorias para todas ellas.

Mi participación en este estudio es como **paciente control sano dentro del proyecto de investigación** y es totalmente voluntaria, puedo abandonarlo en cualquier momento y por cualquier razón:

AUTORIZO QUE MI MUESTRA DE ADN SEA ALMACENADA PARA FUTURAS INVESTIGACIONES SI _____ NO _____

DOY MI CONSENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA SER PARTE DE ESTE ESTUDIO CLINICO

Identificación _____

Nombre _____

Firma del Paciente

Identificación _____ Identificación _____

Nombre: _____ Nombre _____

Dirección _____ Dirección _____

Teléfono _____ Teléfono _____

Firma del testigo I

Firma Testigo II

Firma del Investigador
Magda Carolina Sánchez

Bogotá, DC, día _____, del mes de _____, del año _____.

En caso de cualquier inquietud sugerencia o deseo de salir del estudio usted se puede comunicar directamente con:

Sergio Andres Castañeda Garzon. Bact. Investigador.
3208093537-3204149117

Magda Carolina Sánchez Lic. Química MSc. Profesora Asistente
Cra. 24 No. 63C-69
3474570 Ext: 344

Dr. Alberto Vélez Presidente del Comité de Ética en Investigación, Escuela de
Medicina y Ciencias de la Salud

Teléfono 3474570 extensiones: 380 – 249.