

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

Sergio Andrés Castañeda Garzón

Bacteriólogo UCMC

Proyecto Esp. Epidemiología U Rosario

**GRUPO DE INVESTIGACION EN CIENCIAS BASICAS MEDICAS
UNIVERSIDAD DEL ROSARIO**

CONTENIDO

- Introducción
- Epidemiología
- Fisiopatología
- Genética
- Problema
- Pregunta
- Objetivos
- Metodología
- Resultados y Conclusiones

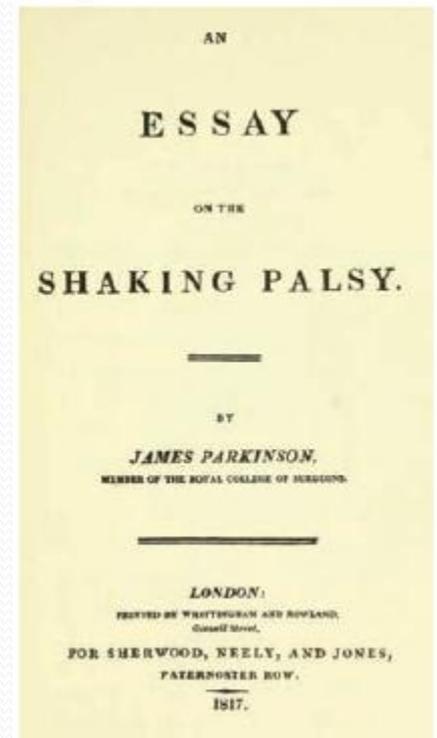


INTRODUCCION

ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez en 1817 por James Parkinson, 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.*

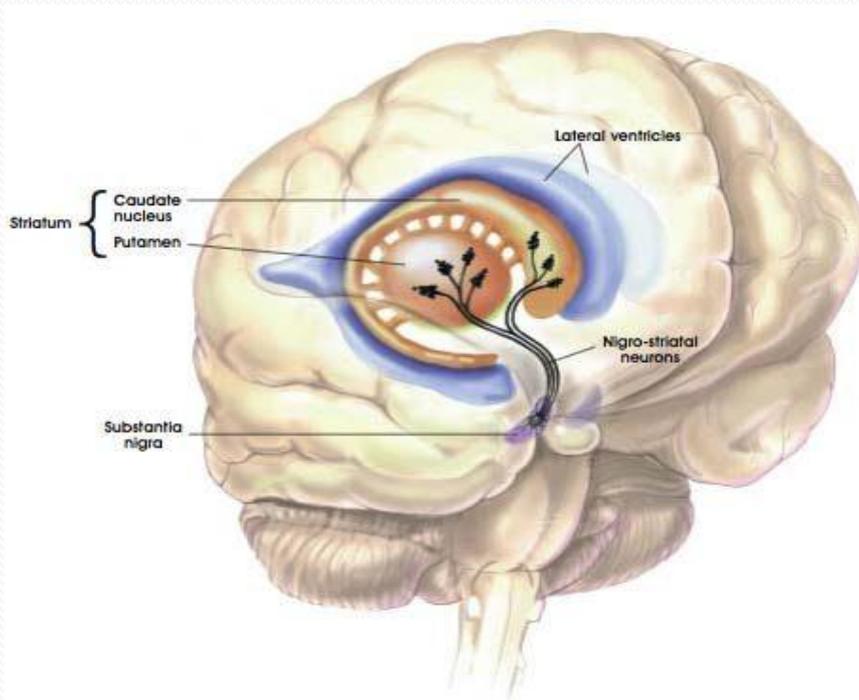
Parkinson J. An Essay on the Shaking Palsy. (2002) J Neuropsychiatry
Clin Neurosci. 14: 223-236



3. An Essay of the shaking palsy 1817.

ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) actualmente, se define como un desorden neurológico progresivo que surge como resultado de la pérdida de células dopaminérgicas en la parte compacta (*pars compacta*) de la sustancia negra, lo que condiciona una grave disminución de dopamina responsable del desarrollo de los síntomas motores de la enfermedad.



La pérdida de neuronas de la sustancia negra que se proyectan hacia el núcleo caudado y el putamen origina una depleción del neurotransmisor dopamina en esas áreas.

Cómo se origina la enfermedad

EN UNA PERSONA SANA

1 Las neuronas productoras de **dopamina** se hallan en la zona llamada **sustancia nigra**.

Sustancia nigra

DETALLE

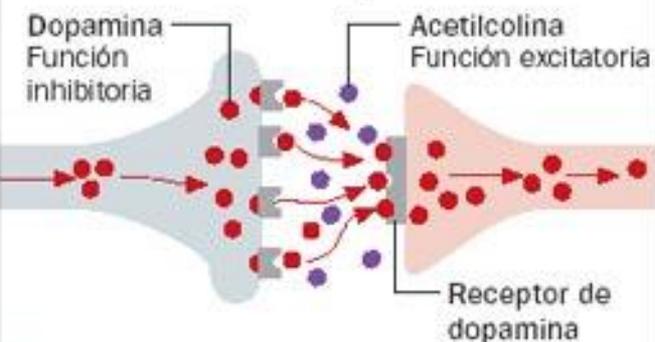
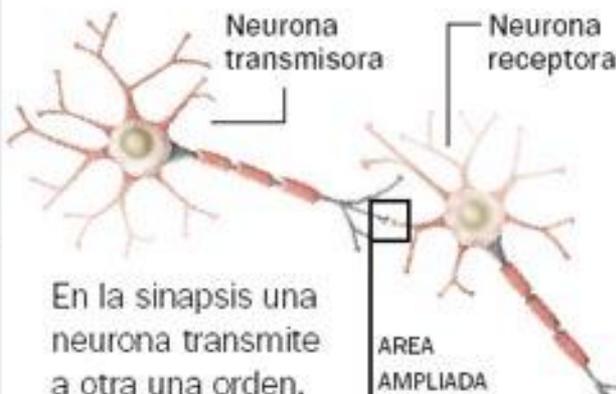
2 Estas neuronas transmiten la dopamina hasta las zonas del cerebro que controlan el movimiento y el equilibrio.

Cerebelo
Equilibrio y coordinación muscular

Médula espinal

Lóbulo frontal

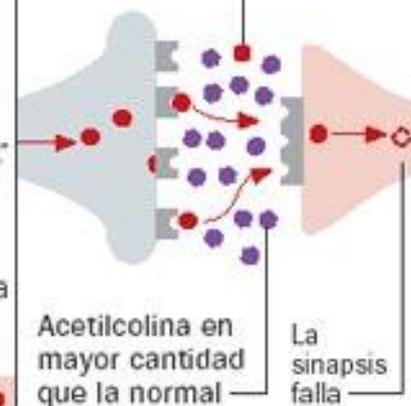
3 Las neuronas transmiten la dopamina a través de las **sinapsis**.



4 La dopamina, en equilibrio con la acetilcolina (otro neurotransmisor), controla el movimiento.

CON PARKINSON

Debido al deterioro de la sustancia nigra se produce una **baja del nivel del neurotransmisor dopamina**.



La alta concentración de acetilcolina produce un exceso de actividad que causa el mal de Parkinson.

ENFERMEDAD DE PARKINSON

El diagnóstico puede realizarse en aquellos individuos que presenten al menos 2 de 4 **signos cardinales** (*Criterios diagnósticos descritos por el Advisory Council of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke, N.I.H*)



Temblo en reposo.



Hipertonía Muscular (rigidez muscular).

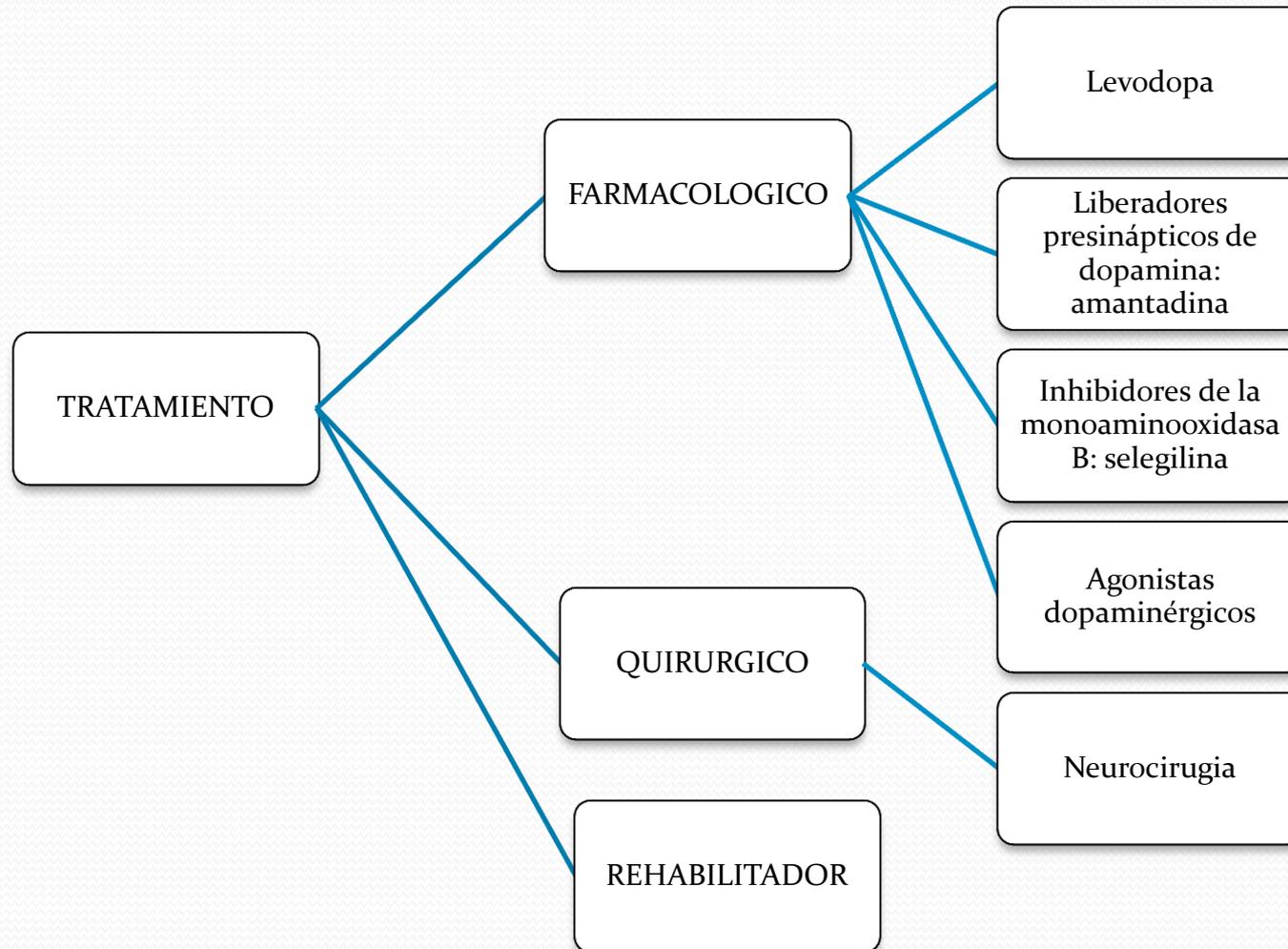


Bradicinesia (lentitud de los movimientos voluntarios).



Pérdida de reflejos posturales.

ENFERMEDAD DE PARKINSON





EPIDEMIOLOGIA

ENFERMEDAD DE PARKINSON



La EP el segundo desorden neurodegenerativo más frecuente, después de la enfermedad de Alzheimer.



1% a 3% de todas las personas mayores de 60 años padece EP



La incidencia general es de 13.4 por 100.000 personas

EPIDEMIOLOGIA EP

INCIDENCIA:

Se calcula que los casos nuevos de enfermedad de Parkinson en una población determinada pueden subestimarse por falta de pericia diagnóstica de los profesionales de la salud



Diagnostico
fundamentalmente clínico

Pruebas complementarias
(Histopatología)

EPIDEMIOLOGIA EP

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%.

Sólo 10% de todos los pacientes con la enfermedad la manifiestan antes de los 50 años

EPIDEMIOLOGIA EP

CUADRO 2. Número de casos y prevalencia de trastornos neurológicos según el estudio neuroepidemiológico nacional (EPINEURO), Colombia

Trastorno	Número de casos			Prevalencia ^c
	Total	Hombres	Mujeres	
Migraña	634	144	490	71,2 (IC95%: 65,5 a 76,8)
Trastornos del desarrollo neurológico ^a	63	38	25	46,1 (IC95%: 35,5 a 58,9)
Enfermedad cerebrovascular ^b	38	16	22	19,9 (IC95%: 14,3 a 27,4)
Demencia ^b	25	7	18	13,1 (IC95%: 8,5 a 19,3)
Epilepsia	92	31	61	10,3 (IC95%: 8,5 a 13,0)
Neuropatía periférica	76	30	46	8,5 (IC95%: 6,8 a 10,7)
Secuelas de traumatismo craneoencefálico	57	27	30	6,4 (IC95%: 5,0 a 7,8)
Enfermedad de Parkinson ^c	9	7	2	4,7 (IC95%: 2,2 a 8,9)

IC95%: intervalo de confianza de 95%.

^a Evaluada en menores de siete años.

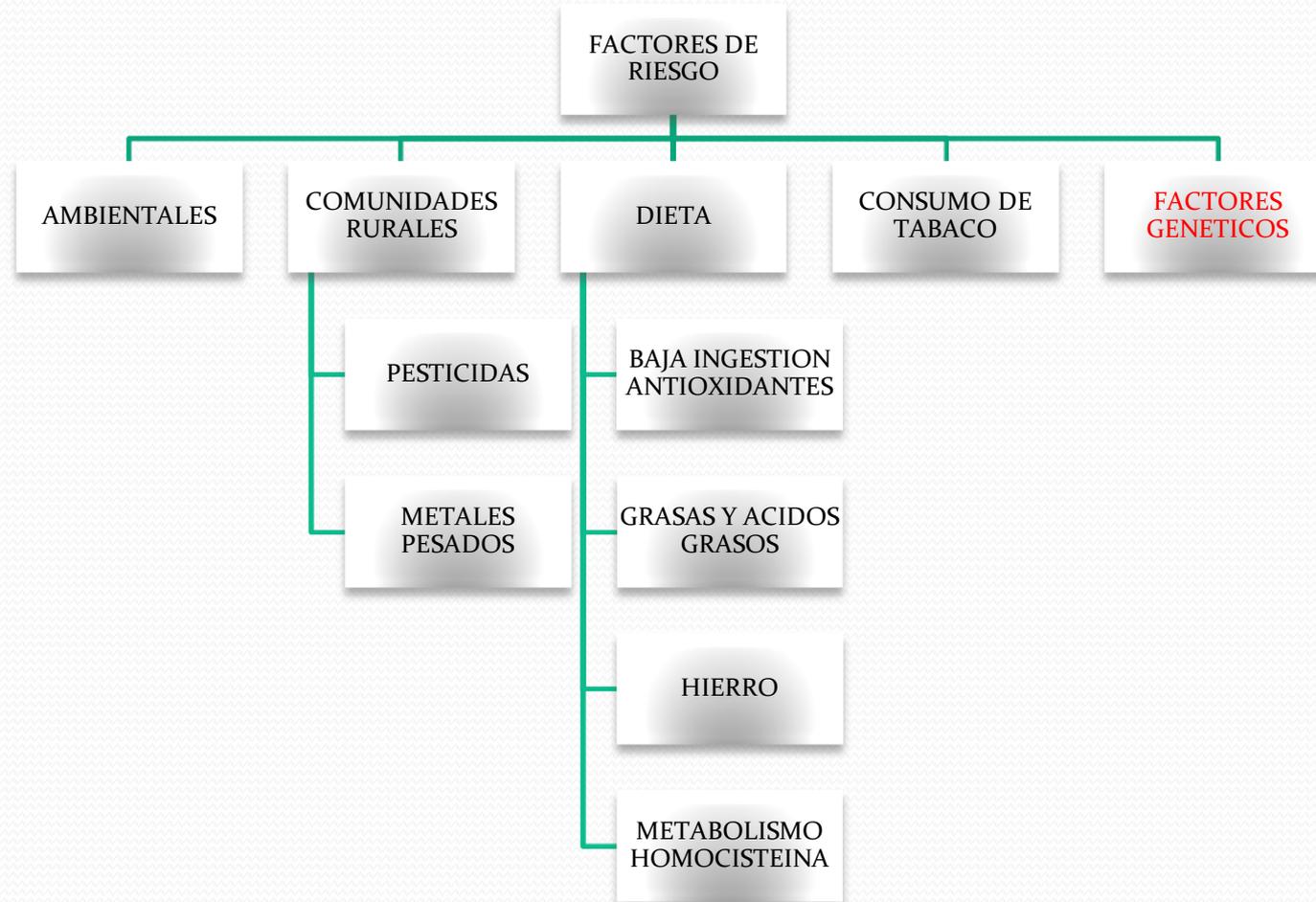
^b Evaluada en mayores de 50 años.

^c Prevalencia por 1 000 habitantes, ajustada por edad y sexo.

EPIDEMIOLOGIA EP

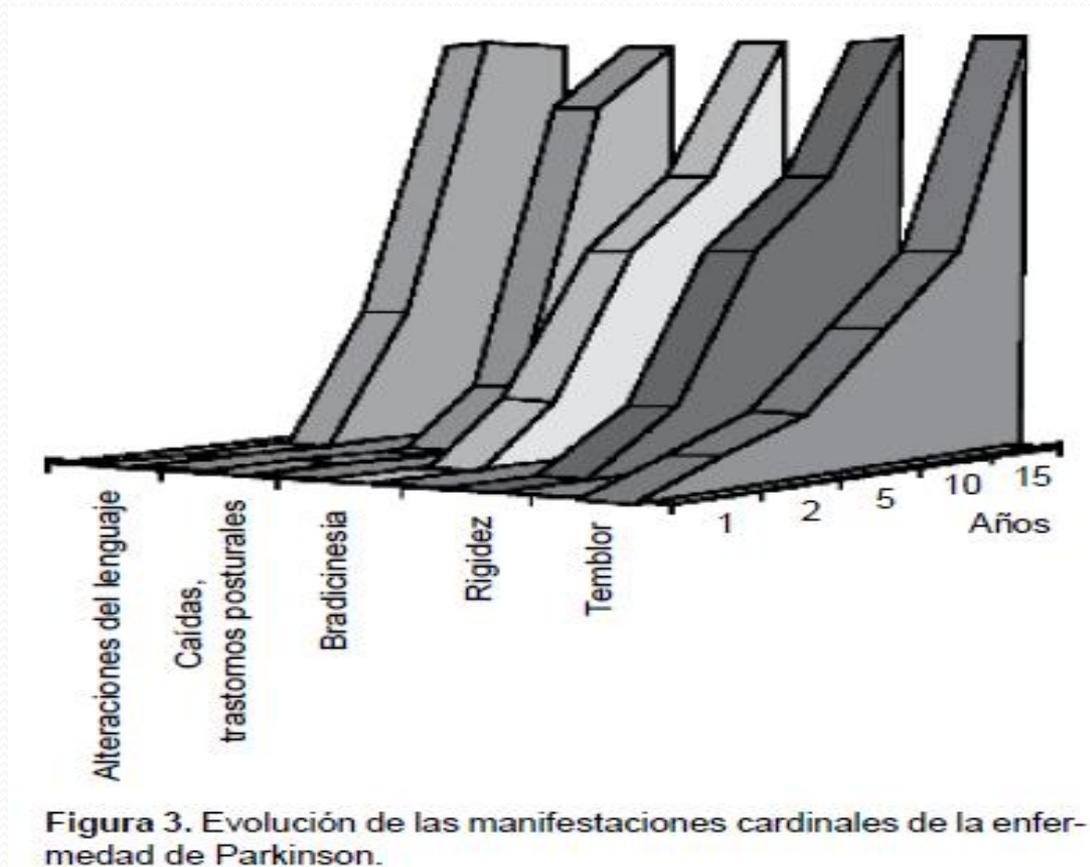
- ➔ La enfermedad de Parkinson afecta a todos los grupos étnicos y a uno y otro sexo, con ligera predilección por los varones.
- ➔ La incidencia es menor entre individuos de raza negra de Asia y África, en comparación con los de raza blanca, donde su frecuencia es claramente mayor.
- ➔ Si se compara la incidencia entre las personas de raza negra que residen en África y las de América, es menor en las primeras.

EPIDEMIOLOGIA EP



EPIDEMIOLOGIA EP

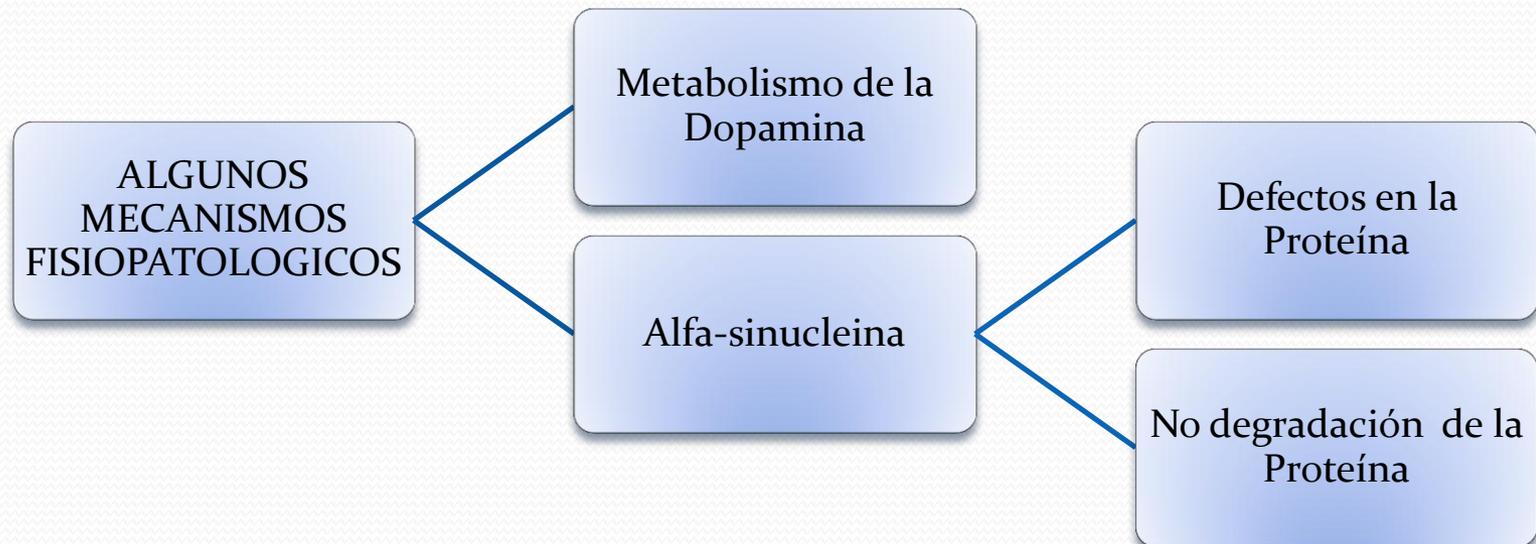
Evolución de la EP





FISIOPATOLOGIA

FISIOPATOLOGIA



METABOLISMO DE LA DOPAMINA

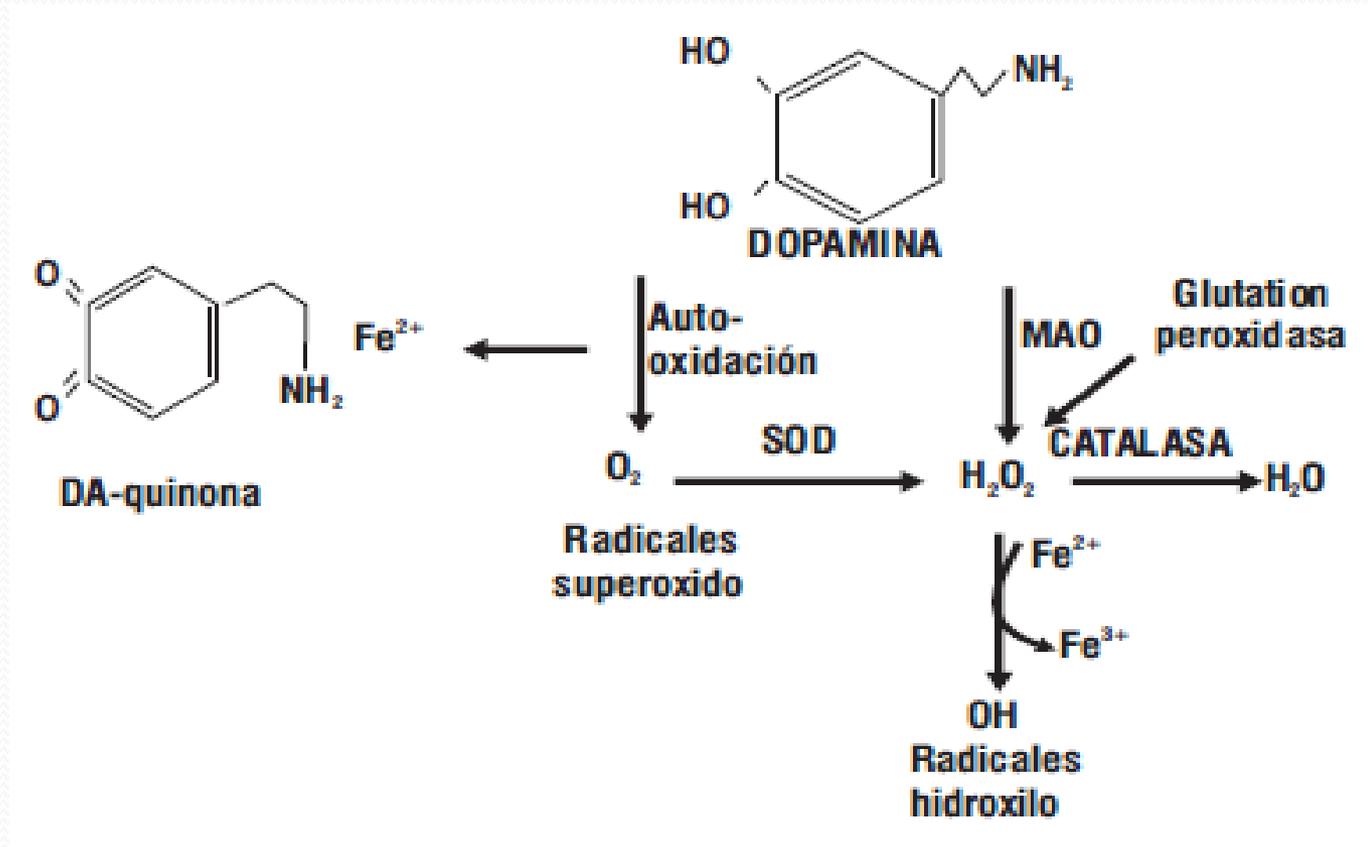


FIGURA 2: Almacenaje Intravesicular de la Dopamina

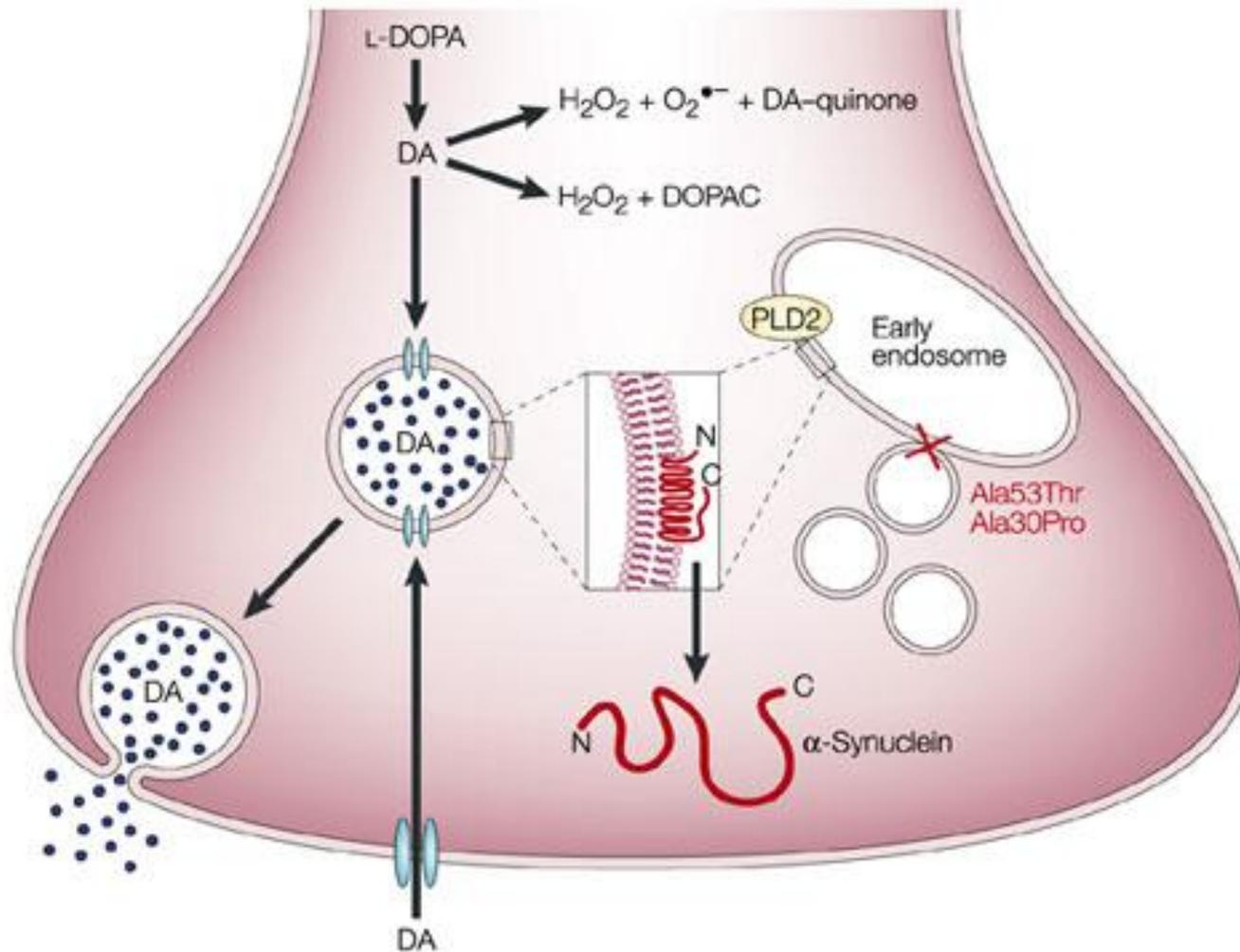
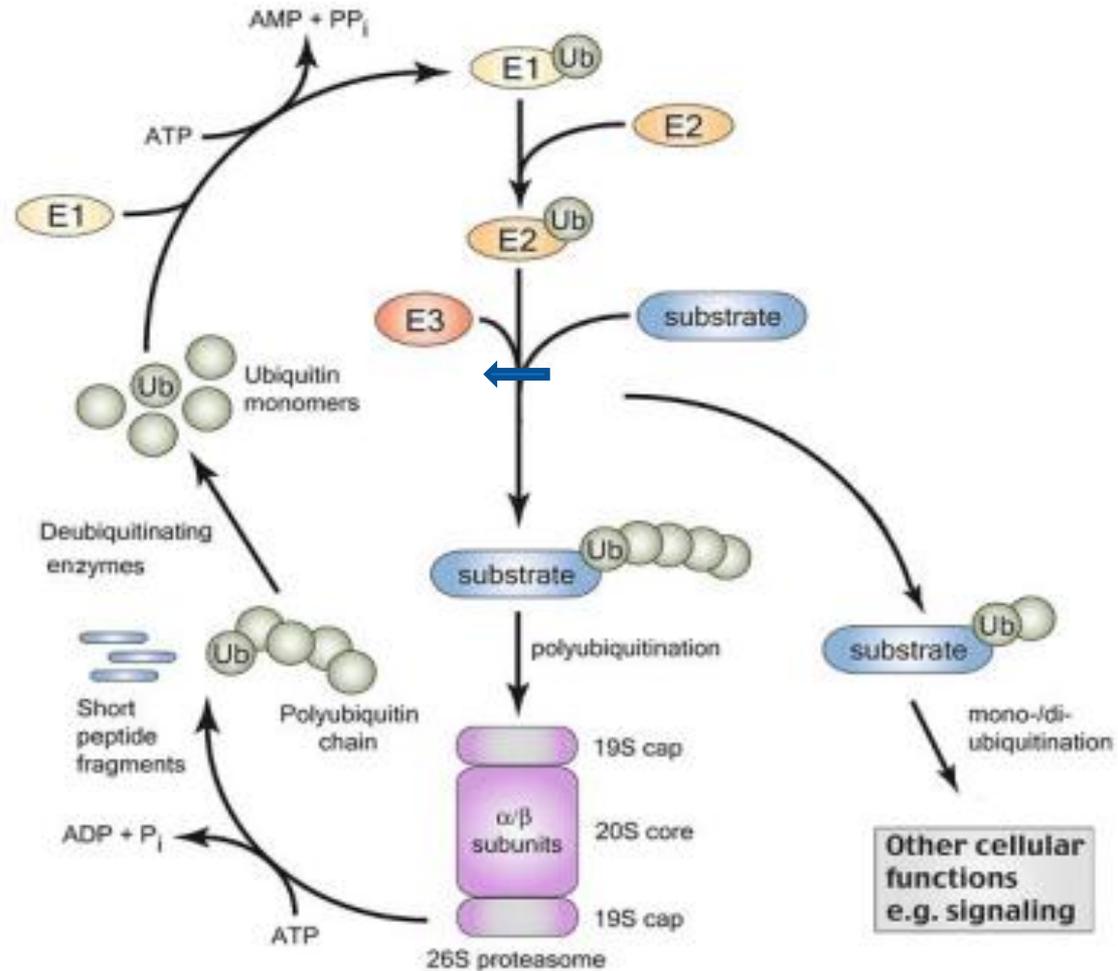


FIGURA 3. Degradación de la alfa-sinucleína



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



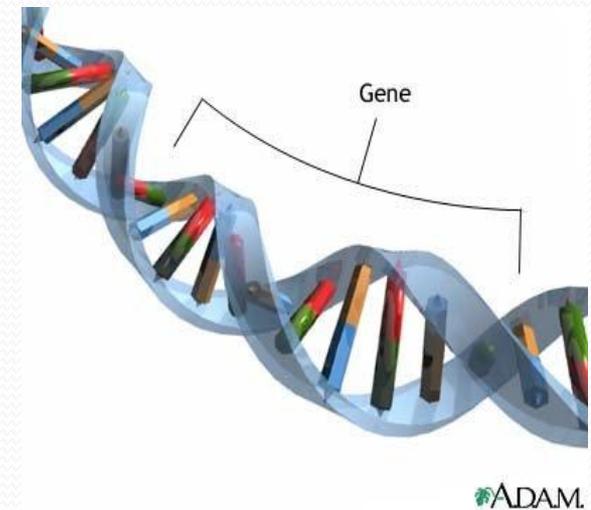
GENETICA

GENETICA EP

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.

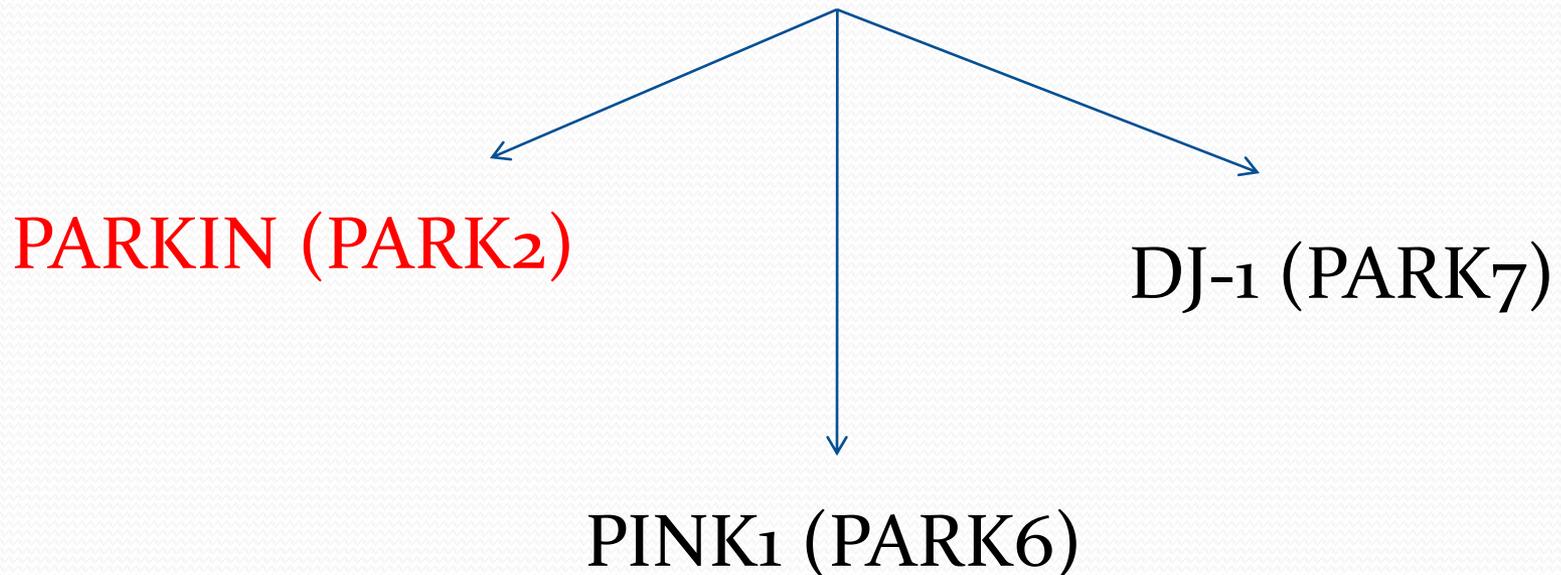


Seis de estos genes (PARK₁, PARK₂, PARK₅, PARK₆, PARK₇ y PARK₈) han sido fuertemente implicados como causales



GENETICA EP

Tres diferentes genes han sido reportados como asociados particularmente con Enfermedad de Parkinson de inicio temprano: (Leutenegger y col, 2006).



PARK2: Parkin

PARK2

Codifica la parkina, una proteína de 465 aminoácidos

Locus: 6q26

El gen PARK2 contiene 12 exones y se extiende por aproximadamente 1,38 Mb

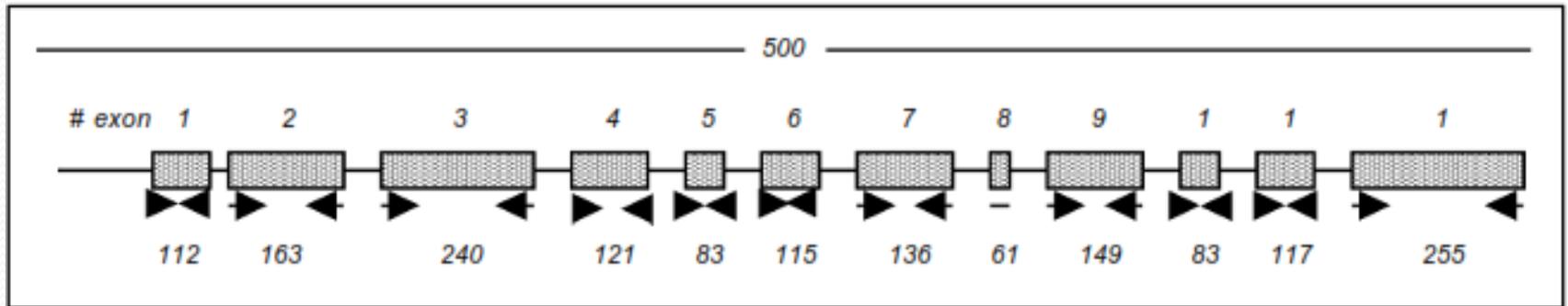


Figura 2. Estrategia para la amplificación de los exones del gen Parkin. Las flechas indican la ubicación de los oligonucleótidos. Los cuadros corresponden a los exones.

PARK2: Parkin

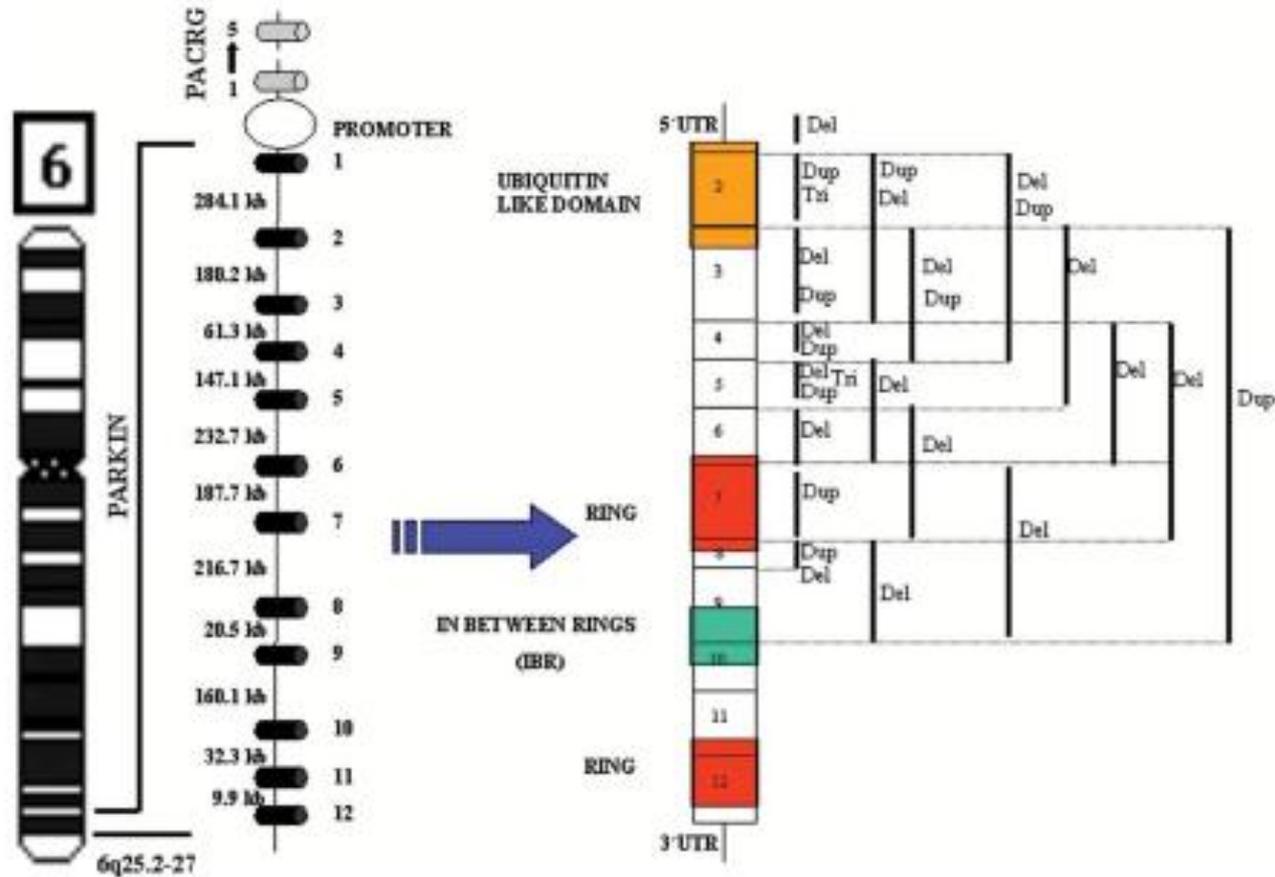


Figure 1. Schematic representation of the Parkin/PACRG locus. The chromosomal location is shown (left). Individual exons are shown (not to scale) with intron sizes indicated (middle). A model of the protein domain structure and location of known exon rearrangements is indicated (right).

PARK2: Parkin

La parkina se localiza de forma preferencial en las sinapsis y su principal función es de ubiquitin ligasa, importante en la vía de degradación proteín-ubiquitina.

B. dominio RING

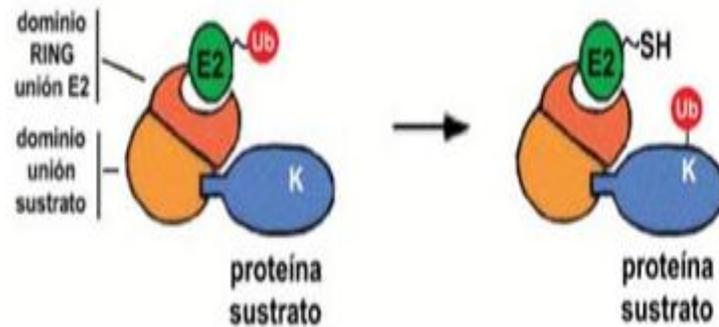
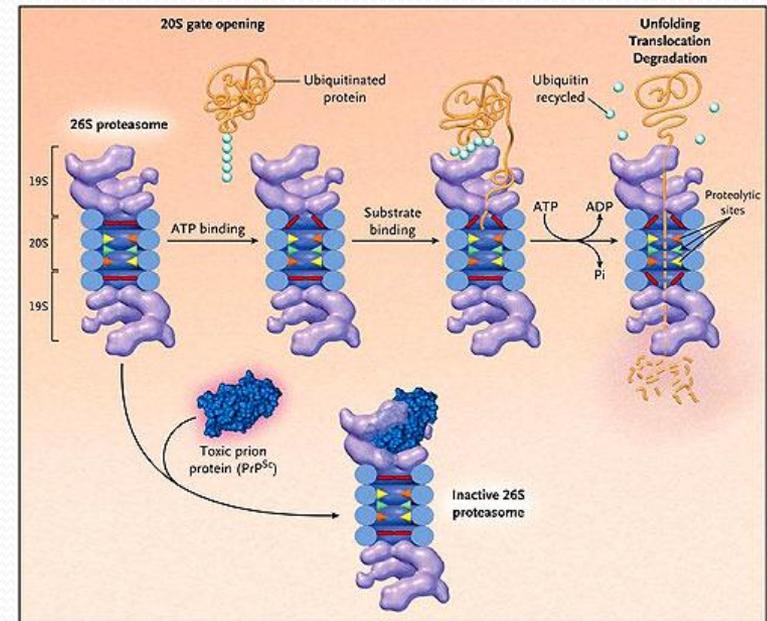
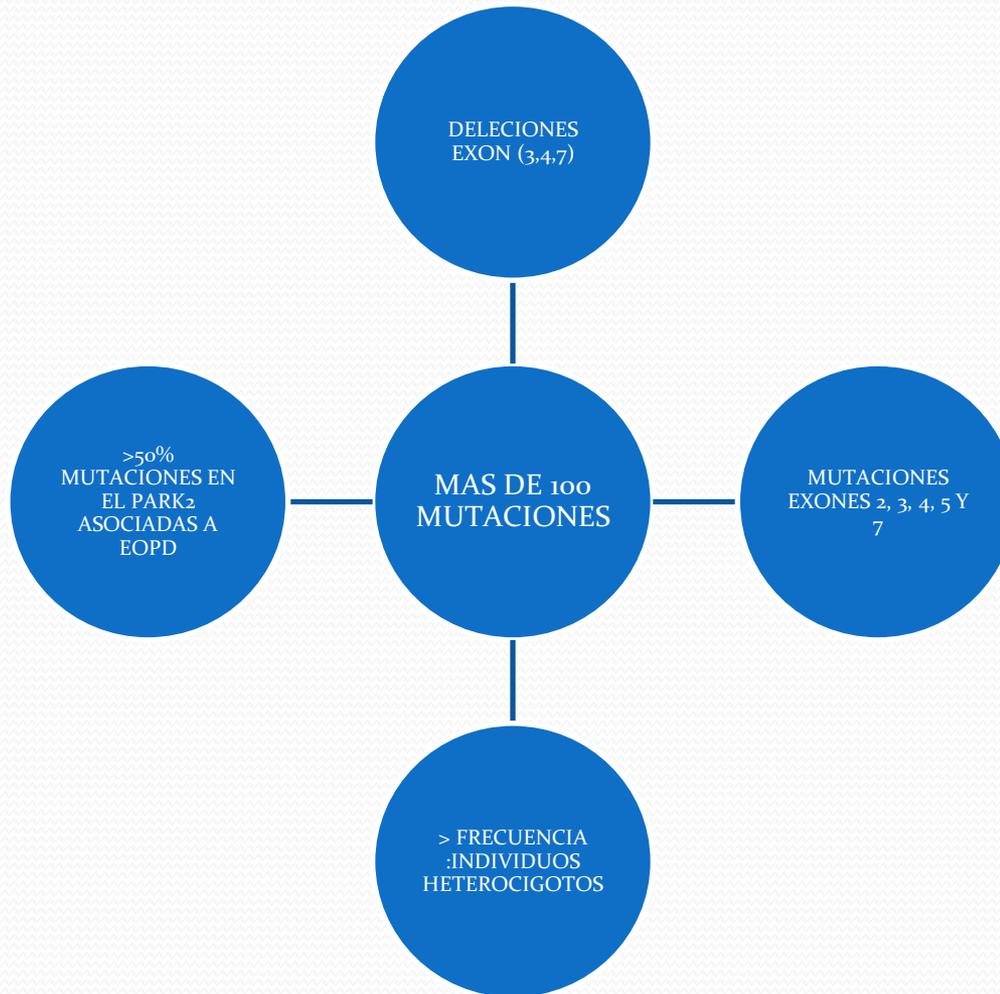


FIGURA 4. Formas de la ubiquitina ligasa E3. A) Dominio HECT. B) Dominio RING finger.



Fuente: <http://www.saval.cl/link.cgi/CienciayMedicina/ProgresosMedicos/10798>

PARK2: *Parkin*



GENETICA EP

Se han identificado más de 100 mutaciones en el gen PARK2. Las mutaciones se han identificado principalmente en los exones 3, 4 y 5 en diversos estudios en población, europea y asiática fundamentalmente.

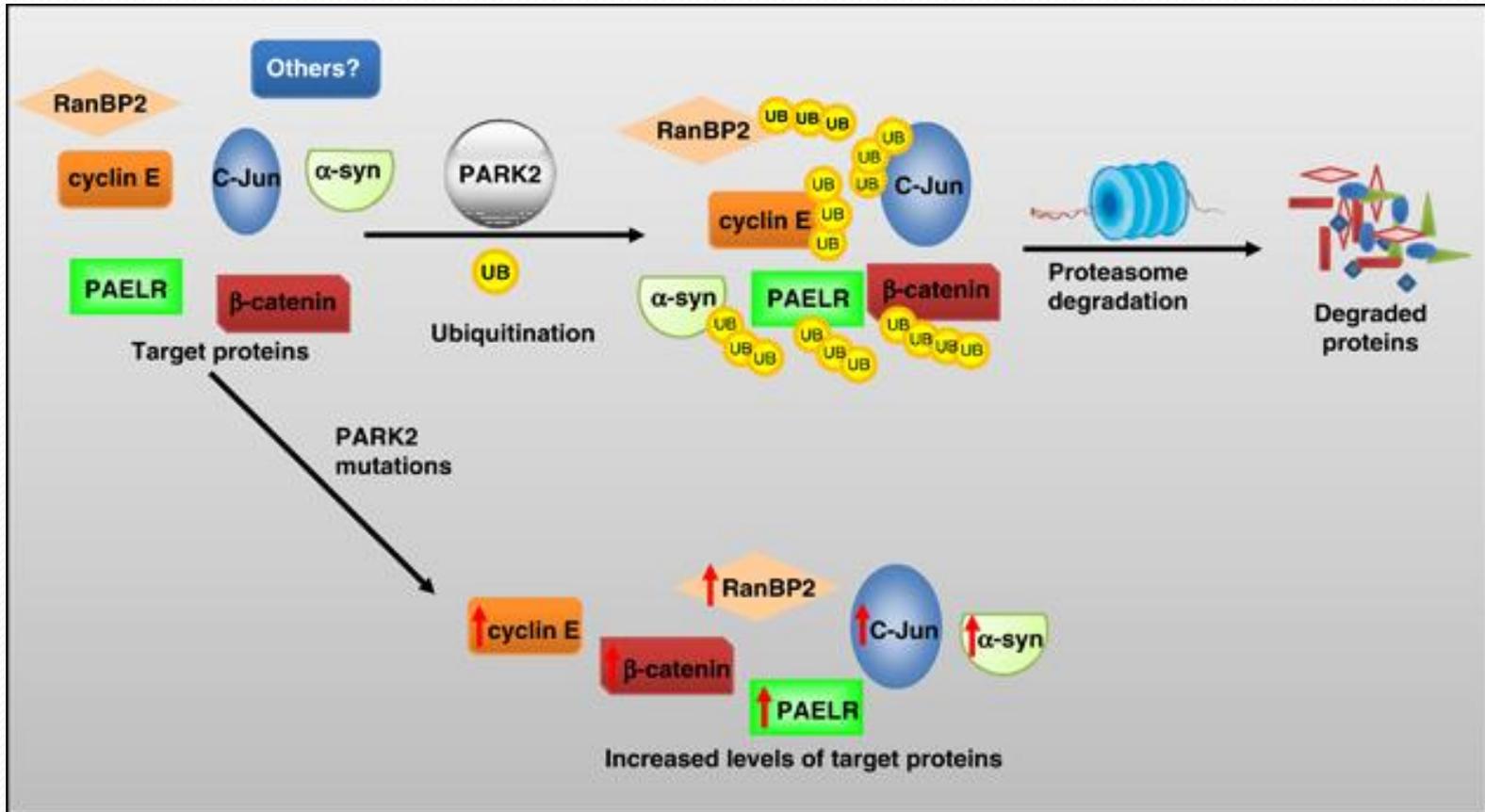
Pineda-Trujillo et al. Una mutación en el gen PARK2 causa enfermedad de Parkinson juvenil en una extensa familia colombiana. *Iatreia*, vol. 22, núm. 2, junio, 2009, pp. 122-131 Universidad de Antioquia Medellín, Colombia.

Elizondo-Cárdenas G. et al. Genética y la enfermedad de Parkinson: Revisión de actualidades . *Medicina Universitaria* 2011;13(51):96-100

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

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

Alteraciones en la Vía Ubiquitina Proteosoma y Enfermedad



PROBLEMA

- La EP es una enfermedad de baja prevalencia en la población en general, y a pesar de los estudios realizados, no posee una terapia 100% efectiva en la totalidad de los pacientes.
- 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

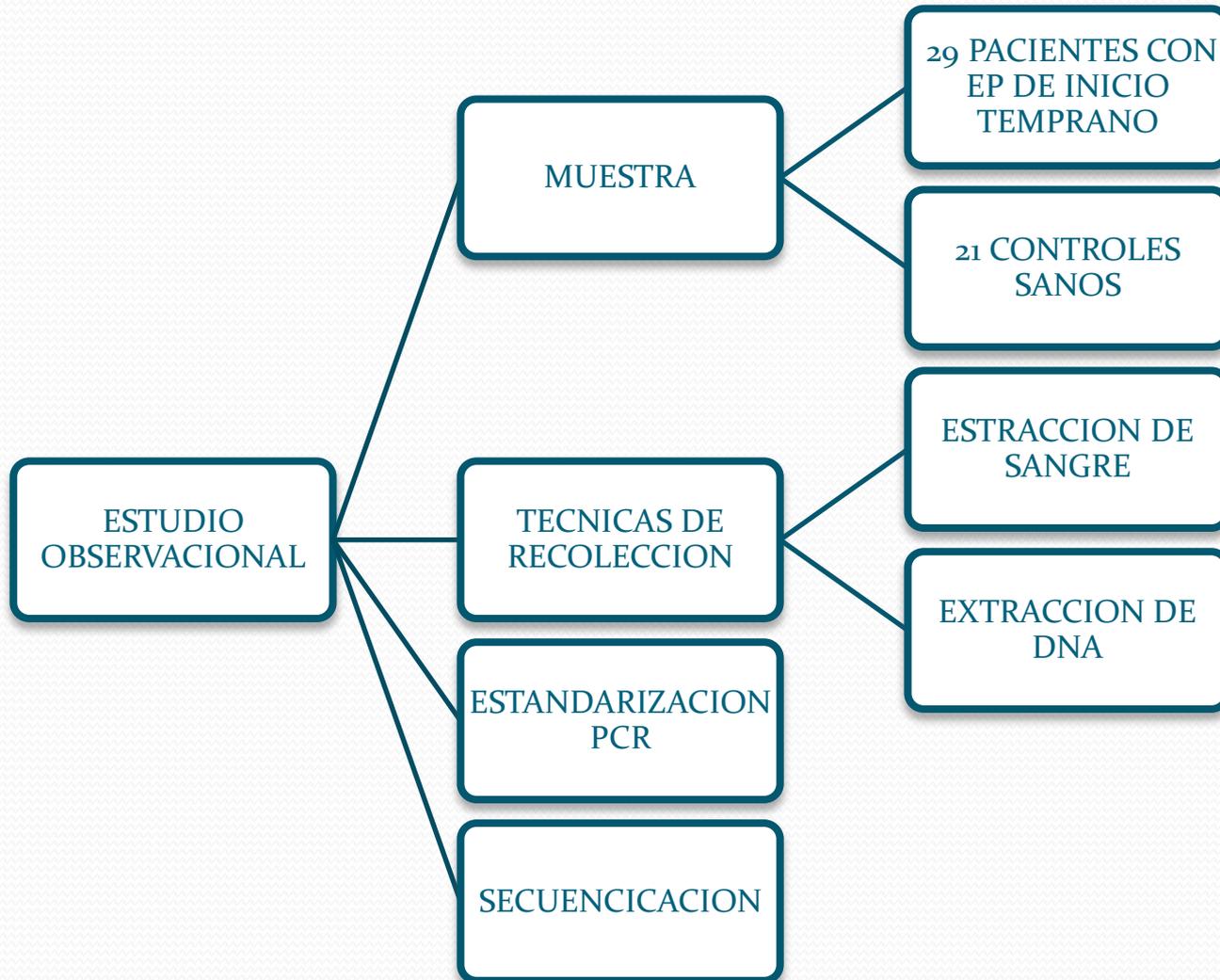
PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿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?



METODOLOGIA

METODOLOGIA



DISEÑO

Se realizó un estudio descriptivo observacional de tipo transversal. 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.

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 directamente relacionados con la susceptibilidad del sujeto a presentar la enfermedad, y por lo tanto existe una asociación entre el hallazgo de estas mutaciones y la enfermedad de Parkinson de inicio temprano.

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), fue de 29 pacientes con EP de inicio temprano o con historia familiar de la enfermedad y de 21 controles sanos

CRITERIOS DE INCLUSION

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 cumplieran con las siguientes características:

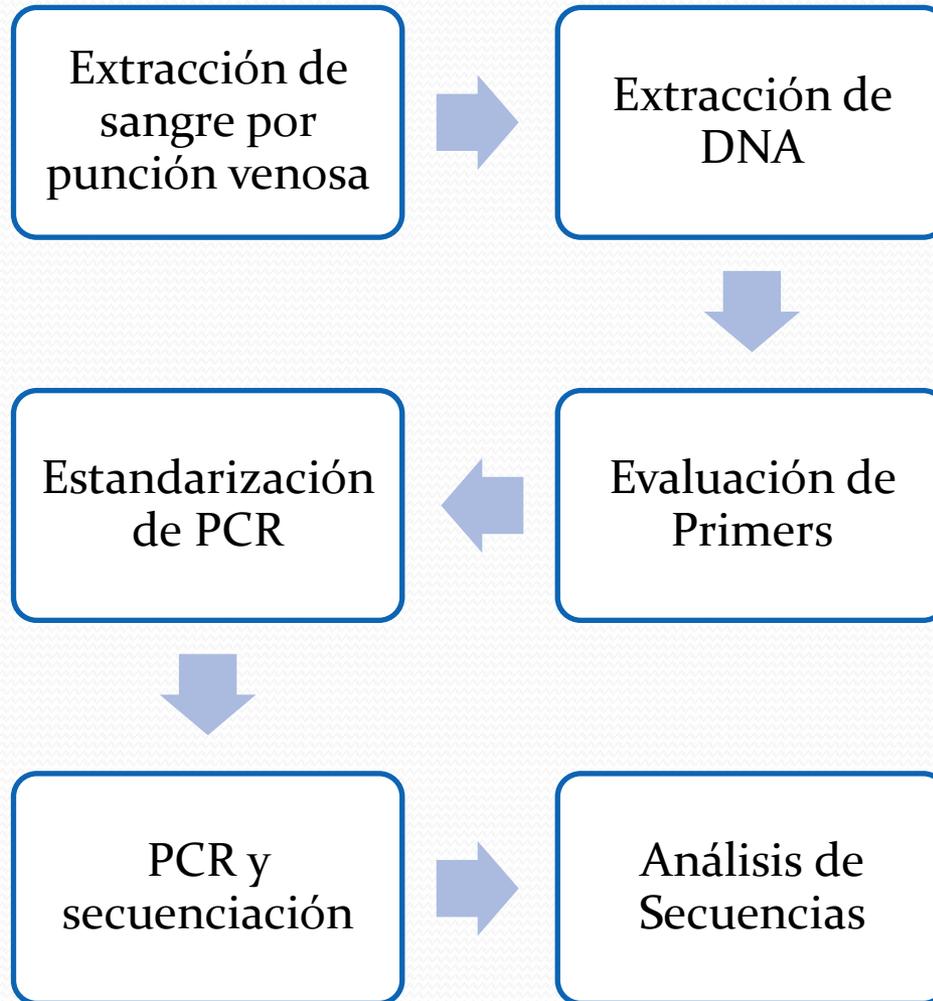
- Edad: Entre 18 y 50 años
- Sexo: Indistinto
- Individuos sin ningún antecedente familiar de Enfermedad de Parkinson o alguna otra enfermedad neurodegenerativa.
- Individuos que acepten su participación de forma voluntaria en el estudio.

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, para corroborar su diagnóstico de la enfermedad.

TECNICAS DE RECOLECCION



PLAN DE ANALISIS

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).

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 preservara la privacidad y la intimidad de los pacientes.

RESULTADOS

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)

RESULTADOS

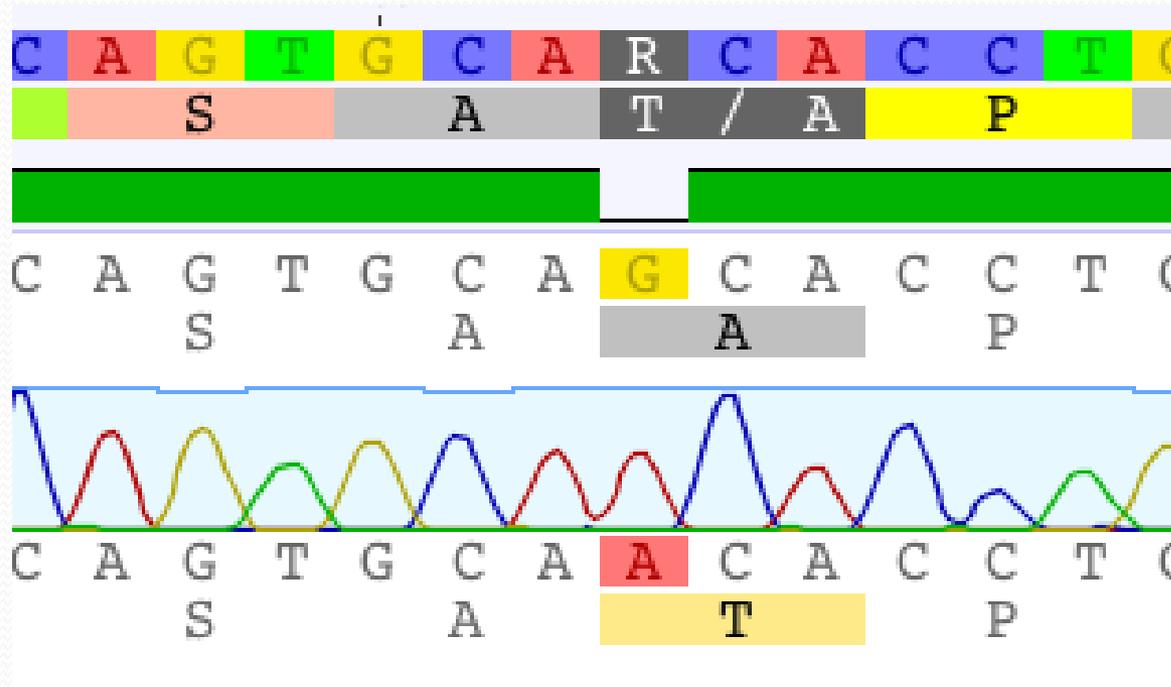
No se identificaron mutaciones ni polimorfismos en muestras de pacientes y controles, en los exones 3 y 5.

RESULTADOS

EXON 4

-Poio G>A Homocigoto

Cambio de aminoácido: Ala>Thr



RESULTADOS

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.

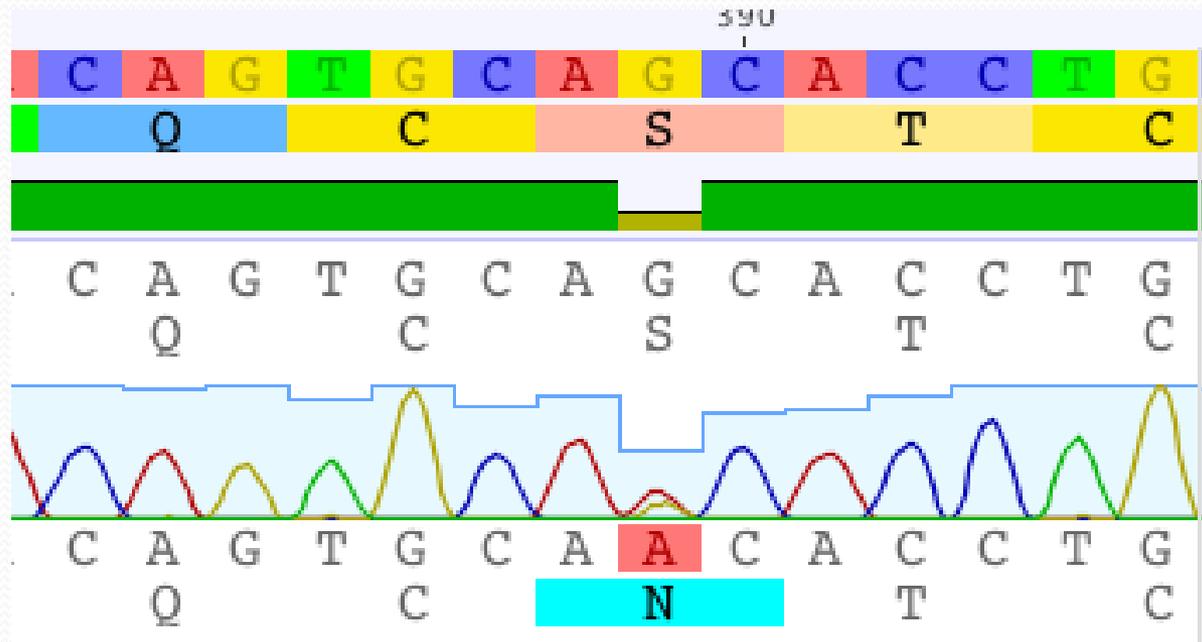
Después de la evaluación de bases de datos (Ensembl, NCBI) no se encontró esta variante como posiblemente asociada a manifestaciones fenotípicas patológicas relacionadas con la enfermedad. Puede ser un polimorfismo que no genera un efecto fisiopatológico involucrado en el desarrollo de la enfermedad o en el riesgo de padecer esta.

RESULTADOS

EXON 4

-P020 G>A Heterocigoto

Cambio de aminoácido: Ser167Asn



RESULTADOS

Esta mutación identificada, es una mutación de tipo heterocigota, en donde se presenta un cambio de aminoácido en la posición 167 . Este cambio ha sido reportado en diversos estudios en poblaciones europeas, asiáticas y americanas.

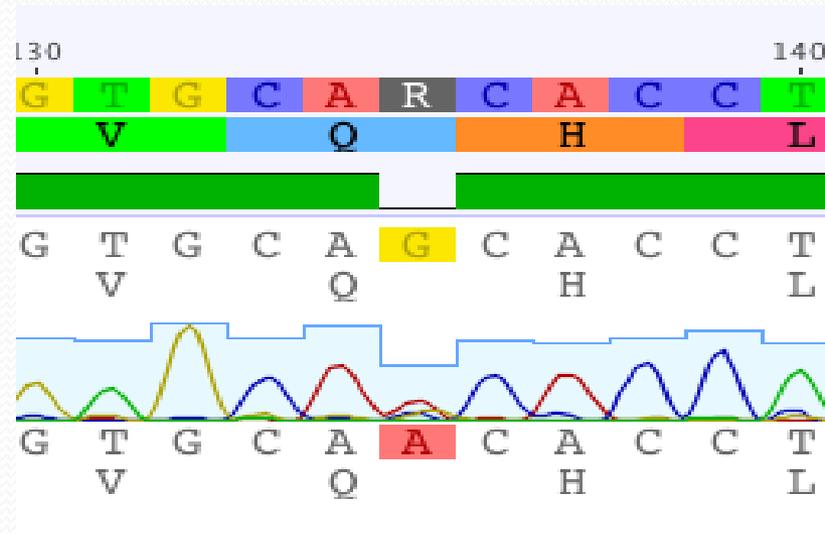
Se ha determinado que esta mutación puede provocar cambios en el tamaño y la estructura de la proteína, generalmente asociadas al plegamiento de la misma, que puede generar cambios en su funcionamiento, sin embargo no se ha identificado específicamente su efecto en la fisiopatología de la enfermedad, 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.

RESULTADOS

EXON 4

-Po23 G>A Heterocigoto

Cambio Sinónimo



RESULTADOS

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.

RESULTADOS

-Se han encontrado mutaciones en el EXON 4 previamente identificadas y reportadas en población europea, asiática y americana, no identificadas anteriormente en estudios realizados en población colombiana.

-En nuestra muestra se encontraron hasta el momento dos mutaciones que modifican la secuencia de aminoácidos de la proteína parkina y una mutación silenciosa o sinónima en uno de los controles que puede corresponder a un polimorfismo poblacional.

RESULTADOS

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

	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 $p = 0,62$



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La EP de inicio temprano es una patología que tiene una clara influencia genética, sin embargo el esclarecimiento de los mecanismos y alteraciones genéticas 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.

CONCLUSIONES

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

CONCLUSIONES

-Se han encontrado mutaciones en el EXON 4 previamente identificadas y reportadas en población europea, asiática y americana, no identificadas anteriormente en estudios realizados en población colombiana.

-En nuestra muestra se encontraron hasta el momento dos mutaciones que modifican la secuencia de aminoácidos de la proteína parkina y una mutación silenciosa o sinónima. Lo que representa el hallazgo de cambios en aproximadamente 10% de la muestra de pacientes analizada.

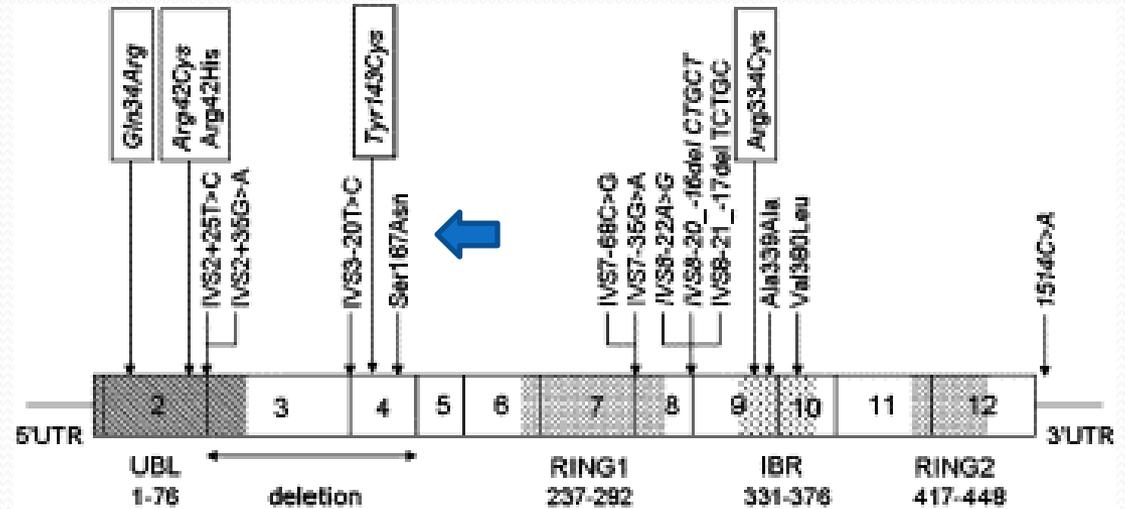
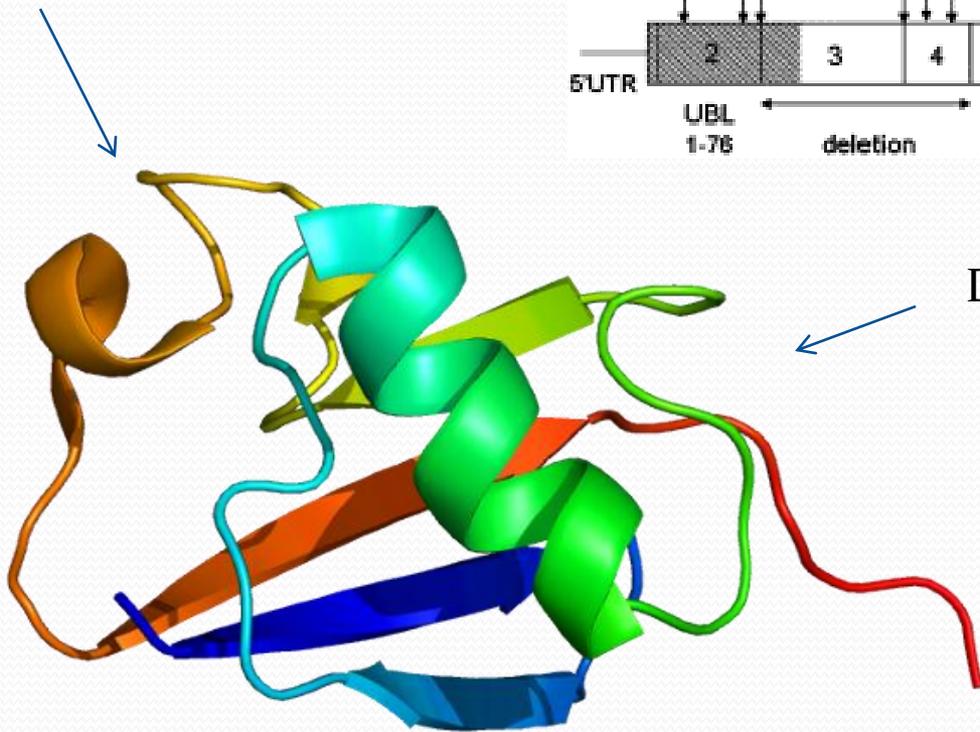
CONCLUSIONES

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.

CONCLUSIONES

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. 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.

Dominio
RING Unión
E2



Dominio Unión Sustrato

MUTACIONES HAN SIDO ASOCIADAS A ALTERACIONES EN EL PLEGAMIENTO DE LA PROTEINA

CONCLUSIONES

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 $p=0,62$).

CONCLUSIONES

- Mutaciones anteriormente identificadas se han asociado a alteraciones en el plegamiento de la proteína fundamentalmente. Sin embargo aun no se tiene claridad sobre las modificaciones funcionales que pueden provocar las mutaciones específicas.
- 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.

CONCLUSIONES

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.

CONCLUSIONES

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.

BIBLIOGRAFIA

Bekris et al. **Genetics of Parkinson Disease** J Geriatr Psychiatry Neurol. 2010 December ; 23(4):

John Hardy.. **Genetic Analysis of Pathways to Parkinson Disease** Published as: Neuron. 2010 October 21; 68(2): 201–206. 228–242

Elizondo-Cárdenas G. et al. Genética y la enfermedad de Parkinson: Revisión de actualidades . Medicina Universitaria 2011;13(51):96-100 .

Parkinson J. An Essay on the Shaking Palsy. (2002) J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 14: 223-236

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.

Jendroska K, Olasode BJ, Daniel SE, et al. Incidental Lewy body disease in black Africans. Lancet 1994;344(8926):882- 3.

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

Gustavo Pradilla A y cols. Estudio neuroepidemiológico nacional (EPINEURO) colombiano. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 14(2), 2003

Elizondo-Cárdenas G. et al. Genética y la enfermedad de Parkinson: Revisión de actualidades . Medicina Universitaria 2011;13(51):96-100

Xiromerisiou G, Dardiotis E, Tsimourtou V, et al. Genetic basis of Parkinson disease. *Neurosurg Focus* 2010;28:1-7.

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

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