

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**COMPARACIÓN DEL PERFIL PROTEICO DEL PLASMA
SANGUÍNEO ENTRE INDIVIDUOS CONTROL Y PACIENTES
CON ENFERMEDAD DE PARKINSON MEDIANTE GELES
BIDIMENSIONALES**

POR

M.C. MARCOS JAIR GUERRERO MUÑOZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACION TERMINAL
EN MORFOLOGIA

FEBRERO 2009

El presente trabajo se llevó acabo en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL, Centro de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Monterrey y en el Laboratorio de Neurogenética del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS, bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y la codirección del Dr. Roberto Montes de Oca Luna y el Dr. Dr. Julio Sepúlveda Saavedra.

**COMPARACIÓN DEL PERFIL PROTEICO DEL PLASMA SANGUÍNEO
ENTRE INDIVIDUOS CONTROL Y PACIENTES CON ENFERMEDAD DE
PARKINSON MEDIANTE GELES BIDIMENSIONALES**

Aprobación de Tesis:

DRA. ODILA SAUCEDO CÁRDENAS
Director de Tesis

DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA
Co-Director de Tesis

DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
Co-Director de Tesis

DR. ARTURO CHÁVEZ REYES
Comisión de Tesis

DRA. RAQUEL G. BALLESTEROS ELIZONDO
Comisión de Tesis

DR. EN MED. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**COMPARACIÓN DEL PERFIL PROTEICO DEL PLASMA
SANGUÍNEO ENTRE INDIVIDUOS CONTROL Y PACIENTES
CON ENFERMEDAD DE PARKINSON MEDIANTE GELES
BIDIMENSIONALES**

Presentado por:

M.C. Marcos Jair Guerrero Muñoz

Este trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el Centro de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Monterrey y en el Laboratorio de Neurogenética del Centro de Investigaciones Biomédicas del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de del Dra. Odila Saucedo Cárdenas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Odila Saucedo Cárdenas por apoyarme incondicionalmente y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra por brindarme su apoyo.

Al Dr. Roberto Montes de Oca por sus consejos.

Al Dr. Arturo Chávez Reyes por su crítica constructiva.

A la Dra. Yolanda López Vidal y su grupo de investigación en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM por sus consejos y enseñanzas técnicas acerca de los geles bidimensionales.

Al Dr. Mario Alvarez y su grupo de investigación en el Centro de Biotecnología FEMSA en el ITESM Campus Monterrey por brindarnos su apoyo incondicional y permitirnos utilizar el equipo para hacer los geles bidimensionales así como el software necesario para el análisis de los mismos.

A todo el personal del Departamento de Histología que contribuyeron en mi formación y realización del presente trabajo.

A Iram, Claudio y Victor por ayudarme cuando más los necesitaba.

A mis compañeros de posgrado Lalo por su música de tambora, Adolfo por su música de exorcismo, el químico Ordoñez y Don Lencho por tener siempre un comentario, Arnulfo cerrando puertas por dentro en fiestas sorpresa, Julio por amenizar los pasteles de cumpleaños, Laura por llevarme frijoles con chorizo en mis cumple, Nelly, Marichu, Cecy por hacer del chisme un arte, dramático.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme crecer un poco más en mi vida.

A Diana quien ha sido mi inseparable amiga, novia y ahora esposa, quien ha estado a mi lado en los mejores y peores momentos de mi vida.

A mi familia: mi apá Juan Antonio, mi marre Rosa Elia, mi hermano el Tonono y su esposa Carmen, mis hermanas Erikia, Karlia y su esposo Humberto quienes me han brindado su apoyo, amor y cariño incondicional; a los adorados de la family: mis sobrinos Vitoyita, Humbertito y Danielito por desesperarme, pero también hacerme reír mucho, y a los nuevos integrantes de la familia, mis sobrinos Alonso y el angelito que viene en camino.

A mis abuelos, güelito †Chencho viejo, güelito †Chencho y güelito †Silvestre donde quiera que estén. A mis abuelas, tíos y primos, personas que recuerdo entrañablemente y no he tenido oportunidad de ver, pero que están presentes en mis pensamientos arrancándome siempre una sonrisa.

A mi nueva familia: mi suegros Santos y Lucila, mis cuñados Quique y su esposa Carmen, Chuy y su esposa Rocío quienes me han tratado de maravilla y me han hecho pasar momentos inolvidables, a los adorados de mi nueva familia: mis sobrinos Chuyin y Quiquin con los que juego fut, Anaid y Ana Lucía por hacerme reír mucho y voy a decir que no me han desesperado para quedar bien.

ÍNDICE

CONTENIDO

PÁGINA

LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
NOMENCLATURA	iii
RESÚMEN	iv

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes	4
1.1 Enfermedad de Parkinson	4
1.2 Alternativas terapéuticas en pacientes con EP	5
1.3 Diagnóstico de la Enfermedad de Parkinson	7
1.3.1 Diagnóstico Clínico	8
1.3.2 Análisis de Imágenes del Cerebro	9
1.3.2.1 SPECT y PET.	10
1.3.2.2 Centellografía cardiaca de la M-Yodo Bencilguanidina	11
1.3.2.3 Ultrasonido Transcraneal	12

1.4	Búsqueda de Biomarcadores en la enfermedad de Parkinson	14
1.4.1	Marcadores genéticos	14
1.4.2	Metales como marcadores séricos	15
1.4.3	Citocinas como marcadores de inflamación	16
1.4.4	Radicales libres	17
1.4.5	Inductores de apoptosis	18
1.5	La Proteómica en la identificación de biomarcadores	20
1.6	Justificación	23
1.7	Objetivos	24
1.7.1	Objetivo general	24
1.7.2	Objetivos específicos	25
1.8	Estrategia General	26

CAPÍTULO II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1	Material	27
2.1.1	Origen de los reactivos	27
2.1.2	Material biológico	27
2.2	Equipo	28
2.3	Metodología.	29
2.3.1	Recolección de muestras	29
2.3.2	Obtención del plasma	29
2.3.3	Geles bidimensionales	30
2.3.3.1	Isoelectroenfoque	30

2.3.3.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.	31
2.3.4 Análisis de imágenes con el software Image Master 2D Platinum 6.0	33

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1 Historial médico.	35
3.2 Análisis clínicos.	36
3.3 Geles bidimensionales.	38

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN 42

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones	45
5.2 Perspectivas	46

CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA 47

LISTA DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1 Alternativas Terapéuticas. 6

Tabla 2 Técnicas más utilizadas en el diagnóstico de la EP.11

Tabla 3 Biomarcadores de procesos involucrados en la EP. 21

Tabla 4. Historial clínico de pacientes con EP. 37

LISTA DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Subtipos de la EP.	5
Figura 2. Estrategia General.	26
Figura 3. Comparación de resultados de análisis clínicos de laboratorio entre el grupo de individuos control y pacientes con EP.	38
Figura 4. Geles bidimensionales de perfil proteico A y B de personas incluidas en el estudio.	40
Figura 5. Localización de proteína con clave 23666 en los 36 geles bidimensionales.	40
Figura 6. Comparación de células blancas de individuos control y pacientes con EP.	41

RESÚMEN

Marcos Jair Guerreño Muñoz
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Febrero de 2009

Título del estudio: Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

Número de páginas: 54

**Candidato para el grado de Doctor en
Ciencias con orientación terminal en
Morfología**

Área de estudio: Morfología

Objetivo y Método del estudio: La EP se caracteriza por la muerte progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNpc) en el cerebro medio. Estas células producen el neurotransmisor dopamina, responsable de transmitir las señales entre la sustancia negra y el cuerpo estriado, de tal manera que la ausencia de dopamina provoca que las neuronas del cuerpo estriado actúen sin control, incapacitando al paciente para dirigir o controlar sus movimientos voluntariamente, apareciendo signos clínicos como: movimientos lentos, rigidez, temblor de reposo e inestabilidad postural. En la actualidad el diagnóstico de la EP lo hace un especialista apoyándose en ciertos criterios clínicos y análisis de imágenes. Sin embargo, el diagnóstico definitivo de la EP solo puede confirmarse mediante la autopsia. Generalmente, cuando un paciente es diagnosticado con EP ya ha perdido aproximadamente el 50 por ciento de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio y la concentración de dopamina en el cuerpo estriado ha disminuido en un 80 por ciento, lo que sugiere que el resto de las neuronas también están afectadas y por lo tanto morirán a pesar de administrar terapia neuroprotectora. Debido a que no existe una prueba para el diagnóstico temprano de la EP que permita administrar el tratamiento adecuado para retrasar o detener la muerte de neuronas dopaminérgicas en una etapa temprana, nos hemos propuesto comparar los perfiles proteicos de pacientes con EP con individuos control mediante electroforesis en geles bidimensionales.

Contribuciones y conclusiones: Aunque no se encontraron diferencias entre el grupo EP e individuos control, se logró distinguir en el 66.67% un perfil proteico denominado A, donde se pueden observar 3 proteínas con PM aproximado de 21 kDa y pI de 5.7 y dos de 20 kDa con pI de 5.4 y 6.1 y el resto de los participantes carece de las proteínas mencionadas con anterioridad. Esto permite clasificar a los grupos de individuos de una manera más exacta para posteriores estudios.

Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Director de tesis

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El aumento del promedio de vida del hombre ha ocasionado un incremento en la aparición de enfermedades neurodegenerativas. Una de las más comunes es la Enfermedad de Parkinson, la cual ocupa el segundo lugar después de la enfermedad de Alzheimer y se ha confirmado en el 0.2% de los decesos en el mundo según la Organización Mundial de la Salud¹.

En países desarrollados como Estados Unidos de Norteamérica (EUA), anualmente se diagnostica a 50,000 norteamericanos, y se cree que existe más de medio millón de personas afectadas sin saberlo debido a que se encuentran en etapa temprana o preclínica. En México se ha estimado en base a datos obtenidos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez que existen al menos 500,000 pacientes en el país situando su prevalencia en un rango de 50 a 100 casos por cada 100,000 habitantes². Evidentemente existe un subregistro, ya que los pacientes de áreas rurales tienen poco acceso directo a centros de atención hospitalaria. Además, es casi imposible obtener un número exacto de casos porque muchas personas en las etapas iniciales de la enfermedad consideran que sus síntomas son resultado del envejecimiento normal y no buscan ayuda de un especialista. El impacto económico en la sociedad estimado por la Fundación Nacional de Parkinson en EUA asciende a \$5.6 billones de dólares anuales debido a un número elevado de consultas anuales derivadas de la cronicidad del padecimiento,

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

medicamentos, pagos al seguro social, gastos para cuidar a personas incapacitadas y pérdida de ingresos.

La EP, ya no es un problema de salud que afecte únicamente a población de la tercera edad. Actualmente se reportan casos entre los 26 y 40 años de edad a nivel mundial, dato que hemos confirmado en la población (120) de pacientes con EP en la región noreste de nuestro país. Además, la edad promedio de inicio de EP en nuestros pacientes es de 58 años con un rango de edad entre 26 y 83 años (datos no publicados).

La EP se caracteriza por la muerte progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNpc) en el cerebro medio. Estas células producen el neurotransmisor dopamina, responsable de transmitir las señales entre la sustancia negra y el cuerpo estriado, de tal manera que la ausencia de dopamina provoca que las neuronas del cuerpo estriado actúen sin control, incapacitando al paciente para dirigir o controlar sus movimientos voluntariamente, apareciendo signos clínicos como: movimientos lentos, rigidez, temblor de reposo e inestabilidad postural. En la actualidad el diagnóstico de la EP lo hace un especialista apoyándose en ciertos criterios clínicos y análisis de imágenes. Sin embargo, el diagnóstico definitivo de la EP solo puede confirmarse mediante la autopsia ya que los signos característicos pueden encontrarse en otras enfermedades agrupadas como parkinsonismos atípicos. Generalmente, cuando un paciente es diagnosticado con EP ya ha perdido aproximadamente el 50 por ciento de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio y la concentración de dopamina en el cuerpo estriado ha disminuido en un 80 por ciento, lo que sugiere que el resto de las neuronas también están afectadas y por lo tanto morirán a pesar de administrar terapia neuroprotectora. Debido a que no existe una prueba para el diagnóstico temprano de la EP que permita administrar el tratamiento adecuado para

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

retrasar o detener la muerte de neuronas dopaminérgicas, decidimos analizar el proteoma del plasma sanguíneo humano. En este trabajo comparamos el perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales con el fin de encontrar potenciales marcadores para un diagnóstico temprano de la EP.

NOMENCLATURA

°C	Grados centígrados
E2D	Electroforesis en geles bidimensionales
μM	Concentración micromolar
mM	Concentración milimolar
kDa	Kilodaltones
μg	Microgramo
μl	Microlitro
ml	Mililitro
ng	Nanogramos
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central

1. ANTECEDENTES

1.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson fue descrita en 1817 por James Parkinson con el nombre de *parálisis agitans*³. Se caracteriza por la muerte progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) en el cerebro medio⁴. Estas células producen el neurotransmisor dopamina, responsable de transmitir las señales entre la sustancia negra y el cuerpo estriado, de tal manera que la ausencia de dopamina provoca que las neuronas del cuerpo estriado actúen sin control incapacitando al paciente para dirigir o controlar sus movimientos voluntariamente. Entre los principales signos clínicos que aparecen se encuentran: la acinesia (dificultad para iniciar un movimiento), bradicinesia (movimientos lentos), la hipocinesia (reducción de la amplitud del movimiento) y temblor. La causa de muerte o deterioro neuronal se desconoce pero se sugiere una combinación de estrés oxidativo, toxinas ambientales, predisposición genética y envejecimiento acelerado⁵⁻⁹. Sin embargo, se ha demostrado un incremento en la prevalencia de la EP relacionado con la edad. El pico de incidencia de la EP ocurre entre los 60 y 69 años de edad y sólo entre el 4 y 7% de los casos comienzan antes de los 40 años, en cuyo caso se define como EP juvenil².

Se conocen 3 subtipos de EP: el idiopático, que inicia generalmente después de los 50 años, el idiopático de inicio temprano, que inicia antes de los 50 y el juvenil autosómico recesivo (EPJ-AR) que se presenta antes de los 40. En el tipo idiopático se ha descrito la presencia de inclusiones citoplasmáticas en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, llamados cuerpos de Lewy¹⁰. Estos, son inclusiones esféricas de 5-75 μm de diámetro, con un núcleo denso eosinofílico rodeado de un halo claro, cuyo principal componente es la

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

proteína α -sinucleína, la cual normalmente es soluble y, debido a una alteración en su estructura se agrega en fibrillas amiloides insolubles¹¹. En cambio, en la EPJ-AR estos cuerpos de Lewy no se encuentran.

1.2 ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS EN PACIENTES CON EP

A pesar de que la EP fue descrita hace 188 años, aún no existe un tratamiento efectivo para los individuos que la padecen. En los años 60's comenzó a utilizarse un precursor de la dopamina, la L-Dopa, el cual continúa siendo el tratamiento por elección¹². Su administración es efectiva para aliviar la bradicinesia, rigidez y tiene un efecto variable contra el temblor.



Figura 1. Subtipos de la EP. Se indican los 3 subtipos de la EP y se muestra una fotomicrografía de la sustancia negra del cerebro medio donde se observa una neurona con inclusiones citoplásmicas llamadas cuerpos de Lewy identificadas mediante inmunohistoquímica.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

Alternativas terapéuticas		
Tratamiento	Ventajas	Desventajas
L-DOPA	Alivia bradicinesia, rigidez	<ul style="list-style-type: none"> • Efecto temporal • Proceso neurodegenerativo continua
Estimulación en el núcleo subtalámico	Recuperación de estabilidad de movimientos	<ul style="list-style-type: none"> • Efecto temporal • Proceso neurodegenerativo continua
Transplante de tejido nervioso fetal	Regeneración de neuronas dopaminérgicas	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere de tejido nervioso de 6-8 fetos
Células madre	Regeneración de neuronas dopaminérgicas	<ul style="list-style-type: none"> • Porcentaje bajo de regeneración de neuronas dopaminérgicas

Tabla 1. Alternativas Terapéuticas. Se muestran los efectos benéficos y desventajas de distintos tipos de terapia.

Este medicamento es eficaz únicamente en el inicio y en la etapa media de la enfermedad, después de ello el efecto es contrario, aumentando algunas manifestaciones de la enfermedad, mientras que el proceso degenerativo continúa¹³. Otra alternativa terapéutica utilizada, es la estimulación del cerebro profundo (DBS, deep brain stimulation) en el núcleo subtalámico¹⁴, se realiza cuando el paciente está en un estado consciente, mediante electrodos con cirugías estereotáxicas. Este procedimiento permite que los pacientes recuperen temporalmente la estabilidad de movimientos, aunque el proceso neurodegenerativo continúa. Por ello se pensó en el uso de transplante del tejido nervioso de origen fetal. Sin embargo, en cada paciente se requiere tejido nervioso de 6 u 8 fetos, lo que trajo consigo problemas éticos¹⁵. Incluso se han

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

hecho transplantes de agregados celulares del cuerpo carotídeo, que producen catecolaminas, pero la supervivencia del implante fue muy corto¹⁶⁻¹⁷. Otra estrategia terapéutica y posiblemente la más prometedora, consiste en utilizar células madre para transplantar en pacientes que padezcan alguna enfermedad degenerativa, como es el caso de la EP. Esta estrategia se basa en la capacidad que tienen las células madre de diferenciarse a cualquier tipo celular, desde un fibroblasto hasta una neurona bajo estímulos específicos¹⁸⁻¹⁹.

1.3 DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

El diagnóstico definitivo de la EP solo puede confirmarse mediante el análisis anatomopatológico en la autopsia del paciente diagnosticado clínicamente. El diagnóstico en el paciente es complicado porque se basa en signos característicos que pueden encontrarse en otras enfermedades agrupadas como parkinsonismos atípicos: parálisis supranuclear progresiva (PSP), atrofia multisistémica (AMS), degeneración corticobasal (DCB), enfermedad de cuerpos de Lewy difusos (DLBD) y otras degeneraciones multisistémicas²⁰.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

1.3.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Actualmente el diagnóstico de la EP se establece por la clínica, apoyada por criterios diagnósticos del Banco Cerebral de la Sociedad de la Enfermedad de Parkinson del Reino Unido (UKPDSBB), la Escala Estadificadora Unificada de la Enfermedad de Parkinson (UPDRS), pruebas psicomotoras y métodos electrofisiológicos (EMG, EEG).

Los criterios diagnósticos del UKPDSBB se dividen en 3 fases:

FASE I. Diagnóstico del Síndrome Parkinsoniano.

FASE II. Criterios de exclusión para el diagnóstico de la EP.

FASE III. Criterios de apoyo del diagnóstico de la EP.

La UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale) incluye las siguientes etapas analíticas:

- I. Actividades cognoscitivas
- II. Actividades de la vida diaria
- III. Exámen motor
- IV. Complicaciones del tratamiento
- V. Escalas adicionales

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

Tomando en cuenta los anteriores criterios, el valor predictivo del diagnóstico clínico de un parkinsonismo atípico resulta inferior al de la EP tipo idiopática^{21,22}. La sensibilidad para detectar pacientes por esta metodología en centros altamente especializados es del 91% aproximadamente, sin embargo el diagnóstico es establecido cuando del 60% al 70% de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra se encuentran degeneradas y el contenido de dopamina en el cuerpo estriado ha disminuido en un 80%. Lo anterior sugiere que el resto de las neuronas también están alteradas y por lo tanto parece poco probable que la terapia pueda influenciar el curso de la enfermedad en una etapa tan avanzada de la neurodegeneración. Además, estudios recientes sugieren que este desorden se caracteriza por una fase asintomática probablemente de años o décadas, en donde la degeneración neuronal ocurre antes de que aparezcan los primeros síntomas²³⁻²⁹. Es por eso, que el mayor reto de la investigación clínica es mejorar la detección temprana de la EP. A partir de esta imperante necesidad, han surgido dos estrategias para el diagnóstico temprano de la EP.

1.3.2 ANÁLISIS DE IMÁGENES DEL CEREBRO

Esta estrategia consiste en obtener imágenes del cerebro por ultrasonido o con la radioactividad liberada de radiofármacos administrados al individuo. A

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

continuación se describen las técnicas comprendidas en este grupo y el potencial para diagnosticar en pacientes en etapa preclínica de la EP.

1.3.2.1 SPECT y PET

El análisis de imágenes por Tomografía Computarizada por Emisión de fotones (SPECT cerebral) o Tomografía por Emisión de Positrones (PET cerebral) ha sido utilizado para dar seguimiento a la disminución de la función neurotransmisora, examinar la actividad metabólica y monitorear el flujo sanguíneo en las regiones del cerebro. En estas técnicas, se utilizan sustancias marcadas con isótopos radioactivos llamadas radioligandos. Estas, poseen características similares a los compuestos metabolizados en determinado proceso biológico. Los radioligandos son administrados al paciente y posteriormente se obtienen las imágenes computarizadas del cerebro. Este tipo de técnicas diagnostican pacientes con pérdida neuronal superior al 50%, pero muestran una variación significativa entre individuos normales³⁰⁻³². Además, los métodos de medicina nuclear, no son apropiados para estudios poblacionales de identificación de personas con riesgo de desarrollar la EP. Ya que exponen a personas saludables a la radiación, los equipos son costosos y solo se encuentran en ciertos laboratorios, haciéndolos inaccesibles al público en general.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

1.3.2.2 CENTELLOGRAFÍA CARDIACA DE LA M-YODO BENCILGUANIDINA (MIBG)

Muchos pacientes con EP se quejan de síntomas relacionados con disfunción del sistema nervioso autónomo (SNA). Los síntomas más comunes son irritabilidad de la vejiga, sudor o constipación, antes de desarrollar signos característicos extrapiramidales. Además, se ha observado formación difusa de cuerpos de Lewy en el SNA incluyendo nervios entéricos y plexo cardiaco.

Diagnóstico	
Tipo	Características
Anatomopatológico	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis posmortem • Prueba confirmatoria de la enfermedad de Parkinson
Clínico	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidad del 91% • Bajo costo • Diagnóstico en etapa sintomática
Imágenes	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizan radioligandos • Costo elevado • Diagnóstico diferencial • Diagnóstico en etapa sintomática

Tabla 2. Técnicas más utilizadas en el diagnóstico de la EP.

Basándose en estos hallazgos, algunos investigadores empezaron a estudiar el sistema nervioso autónomo para encontrar alguna relación con la EP.

MIBG es un análogo de noradrenalina que es transportado al interior de las neuronas simpáticas y puede actuar como trazador de neuronas catecolaminérgicas cuando esta marcado con yodo radioactivo y detectado por centellografía. La técnica de centellografía permite evaluar el funcionamiento de las neuronas adrenérgicas. En la EP, la absorción de MIBG por neuronas simpáticas postganglionares se reduce en la etapa temprana de la enfermedad en casi todos los pacientes con un puntaje de severidad clínica superior o igual al de Hoehn y Yahr II. Un estudio de imágenes por esta técnica logró identificar pacientes diagnosticados con EP con una sensibilidad del 89.7% y pudo diferenciarlos de pacientes con atrofia sistemática múltiple con un 94.6%³³. Las desventajas de esta técnica son las mismas de PET cerebral y SPECT cerebral, además de que existe la posibilidad de confundirse con otras enfermedades.

1.3.2.3 ULTRASONIDO TRANSCRANEAL

La sonografía transcraneal permite detectar el parénquima del cerebro. En la EP aumenta la ecogenicidad bilateralmente, mientras en desórdenes neurológicos no extrapiramidales con frecuencia se mantiene normal, aunque en aproximadamente el 30% de los casos el análisis no pudo distinguir estos dos grupos³⁴.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

La significancia patológica de este aumento no esta claro, pero se ha relacionado con los niveles de hierro y ferritina. Un aumento en los niveles de hierro puede aumentar la producción de las especies reactivas de oxígeno y exponiendo a la célula a estrés oxidativo. Existe evidencia que sugiere que esta técnica puede detectar pacientes asintomáticos. Por ejemplo, una alta ecogenicidad en la sustancia negra ha sido observada en individuos asintomáticos correlacionados con una reducción en la absorción de ^{18}F -dopa en el putamen usando PET³⁵, y pacientes psiquiátricos con alta ecogenicidad desarrollaron peores signos extrapiramidales y síntomas neurolépticos comparados a los individuos con baja ecogenicidad³⁶. Además, dos estudios clínicos sugieren la existencia de una relación entre la alta ecogenicidad de la sustancia negra y la alteración de las neuronas de esta región. Primero, ancianos sin un diagnóstico de la EP pero con una hiperecogenicidad de la sustancia negra, mostraron una mayor frecuencia y una mayor severidad en la lentitud de movimiento e hipocinesia que los sujetos de la misma edad con una ecogenicidad normal. Segundo, pacientes psiquiátricos con hiperecogenicidad en la sustancia negra desarrollaron signos y síntomas parkinsonianos más severos que los que tenían baja ecogenicidad³⁷.

1. 4 BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Los biomarcadores son sustancias utilizadas como indicadores de procesos biológicos normales, patológicos y progreso de la enfermedad. Generalmente, estos son identificados en algunos de los componentes de sangre periférica, lo cual permite evaluarlos de una manera fácil y económica. Debido a que la etiología de la EP se desconoce, los biomarcadores que han sido identificados solo son característicos de procesos involucrados en la neurodegeneración.

1.4.1 MARCADORES GENÉTICOS

Dentro de esta categoría se encuentran mutaciones en el gen α -sinucleína^{38,39}. Posteriormente se identificaron mutaciones en los genes: parkin^{37,38}, ubiquitin carboxy-terminal hidrolasa³⁹, nurr1⁴⁰, dj-1⁴¹, pink1⁴² y en los loci: 2p13, 12p11.2-q13, 1p32, 1p35-p36)⁴³⁻⁴⁶. Sin embargo, las mutaciones en estos genes se han restringido a cierto tipo de poblaciones. Por ejemplo, mutaciones en el gen parkin han sido asociadas al parkinsonismo familiar de inicio temprano y parkinsonismo juvenil aislado^{45,46}. Mientras, que las mutaciones en

el gen α -sinucleína se encuentran en personas con historia familiar indicativa de herencia autosómica dominante de elevada penetrancia ⁴⁷.

1.4.2 METALES COMO MARCADORES SÉRICOS

Observaciones neuroquímicas han sugerido un rol importante de los metales en la EP. Metales como Cu, Fe y Mn pueden actuar como agentes pro-oxidantes mediante la catálisis de reacciones de radicales libres, provocando así, daño severo en las células del cerebro⁴⁸⁻⁵¹. Así, la exposición laboral a Mn produce efectos similares a la EP⁵²⁻⁵³, mientras que la exposición a altas concentraciones de Al produce daños en el cerebro⁵⁴. El silicón, como ácido silícico, parece tener un efecto protector debido a que secuestra el Al biodisponible⁵⁵. Por otro lado poco es conocido acerca de la importancia de Ca y Mg en este tipo de desorden. Un estudio describió un desbalance en el contenido de estos dos metales en diferentes partes del cerebro humano de pacientes con EP⁵⁶.

Cu, Mn y Zn juegan un rol importante en el balance oxidativo debido a su participación en la actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa⁵⁷. Muchos estudios han mostrado un aumento en los depósitos de Fe en la sustancia negra de pacientes con EP⁵⁷. Un análisis de los niveles de estos metales en fluidos biológicos de pacientes con EP, mostró un marcado

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

aumento de Fe y Zn en sangre completa y Si en orina, mientras que los niveles en suero de Cu, Mg y Al fueron significativamente inferiores en suero. Además, los niveles de Ca en líquido cefalorraquídeo, sangre completa, suero y orina fueron superiores⁵⁸.

1.4.3 CITOCINAS COMO MARCADORES DE INFLAMACIÓN

La microglia son monocitos que se originan en la médula ósea y que entran al SNC durante la embriogénesis y funcionan de manera similar a los macrófagos periféricos. Estas células son las principales responsables del mecanismo de defensa. La activación de la microglia y la remoción fagocítica de cuerpos apoptóticos, células dañadas y microorganismos extraños en el SNC juegan un papel importante en el desarrollo de la homeostasis del tejido cerebral y en el mecanismo de defensa. Bajo condiciones normales la microglia muestra una morfología ramificada y se encuentra en arresto celular, sin embargo pequeños cambios en su microambiente o debido a cambios patológicos, hacen que se transformen a un estado activo mostrando una morfología ameboide. La activación de la microglia puede ser inducida por proteínas del SNC modificadas patogénicamente, antígenos de agentes infecciosos, proteínas priónicas o por una compleja combinación de biomoléculas incluyendo ATP, cAMP, interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 e interleucina-10. La microglia activada libera moléculas proinflamatorias como IL-

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

1 β , el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y óxido nítrico, cuya sobreproducción puede ser neurotóxica. Niveles elevados de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL6 fueron encontradas en líquido cefalorraquídeo y en el cuerpo estriado de cadáveres de pacientes que tenían EP lo que sugiere la presencia de un proceso inflamatorio⁵⁹⁻⁶¹.

1.4.4 RADICALES LIBRES

El papel patogénico del estrés oxidativo en la EP esta basado en numerosos estudios que muestran marcadores de daño oxidativo. El daño oxidativo en las neuronas está ligado a la muerte celular provocada por el fenómeno de excitotoxicidad, caracterizado por la acumulación excesiva de glutamato en el medio extracelular. Se ha observado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) o defectos en el metabolismo energético de la mitocondria causan un aumento en la concentración de glutamato en el medio extracelular que sobreestimulan a sus receptores. ROS incluye radicales libres oxígeno, peróxido de hidrógeno, oxígeno singulete, óxido nítrico y peroxinitrito. Estas, son capaces de producir daño mediante la destrucción de lípidos, rompimiento del DNA, producción de derivados carbonil proteicos y la formación de nitrotirosina. Las neuronas dopaminérgicas son particularmente susceptibles a

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

este proceso debido a que oxidan la dopamina y tienen un alto contenido de hierro, el cual es un sustrato importante en la reacción oxidativa⁶².

Potenciales biomarcadores como radicales superóxido y malondialdehído, la relación redox de coenzima Q10 y el compuesto 8-hidroxi-guanosina resultante de la oxidación del RNA, se encuentran en mayor cantidad en muestras de sangre de pacientes con EP³⁵. Otro biomarcador potencial, el cual es producto de la oxidación del DNA por el peróxido de hidrógeno o radicales hidroxilo, es el 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG). Se ha observado un aumento en los niveles de este compuesto en la sustancia negra, líquido cefalorraquídeo, suero y orina de pacientes con EP⁶³. Sin embargo estas sustancias no son características de la EP.

1.4.5 INDUCTORES DE APOPTOSIS

Apoptosis es el proceso de muerte celular que involucra la activación de una serie de mecanismos que provocan que la célula no pierda la integridad de su membrana, y esta se mantiene hasta que las células son eliminadas por fagocitosis. Diferentes señales pueden iniciar apoptosis en las neuronas. La señal más estudiada es la ausencia de factor neurotrófico, el cual puede

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

desencadenar el proceso de apoptosis durante el desarrollo del SNC y posiblemente en los desordenes neurodegenerativos. Otros procesos que pueden inducir apoptosis son el fenómeno de excitotoxicidad y estrés oxidativo.

En la sustancia negra de pacientes con EP se ha detectado apoptosis y un aumento en los niveles de moléculas involucradas en el proceso⁶⁴. En linfocitos de sangre periférica de pacientes con EP, los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2, caspasa 3, identificada como el mayor efector de la cascada apoptótica y superóxido dismutasa Cu/Zn, involucrada en la detoxificación de aniones superóxido, aumentaron con respecto a los individuos normales⁶⁵.

Como puede observarse, no se han identificado biomarcadores que tengan que ver con la etiología de la enfermedad y por lo tanto nos permitan hacer un diagnóstico certero. El estudio de los genes y su expresión a nivel de ARNm ha proporcionado poca información acerca de la enfermedad ya que solo se han detectado algunas mutaciones de genes involucrados en el proceso neurodegenerativo. Estas mutaciones se restringen a poblaciones con parkinsonismo familiar de inicio temprano y parkinsonismo juvenil aislado y solo representan aproximadamente el 5% del total de los casos con EP. Hasta ahora, no se han identificado biomarcadores involucrados en la etiología de la EP, por lo tanto solo permiten determinar procesos involucrados en la patología

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

pero no son específicos de la misma. Debido a lo anterior es necesario encontrar biomarcadores específicos de la EP. Sin embargo, la búsqueda debe hacerse mediante técnicas que permitan analizar comparativamente una gran cantidad de sustancias para seleccionar los potenciales biomarcadores. Un grupo de técnicas que permite analizar una gran cantidad de compuestos químicos es la proteómica.

1.5 LA PROTEÓMICA EN LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES

La Proteómica analiza cualitativa y cuantitativamente la composición proteica de una muestra biológica. Las proteínas son un blanco excelente para observar cambios en el patrón metabólico de los organismos vivos ya que están involucradas en la mayoría de los procesos biológicos. Aunque su naturaleza química es similar, las proteínas desempeñan una gran diversidad de funciones y continuamente varían sus niveles hasta en diez órdenes de magnitud en respuesta a estímulos externos o internos.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

El análisis del proteoma puede hacerse mediante la separación de proteínas por técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), isoelectroenfoque (IEF), cromatografía de líquidos y chips de afinidad o la separación de péptidos por cromatografía de afinidad. Finalmente, en el caso de separación de las proteínas es necesario digerir con tripsina y generar los péptidos que serán analizados en el espectrómetro de masas en tándem y determinar su secuencia aminoacídica.

Biomarcadores			
<i>Muestra</i>	<i>Contaminantes ambientales</i>	<i>Estrés oxidativo</i>	<i>Apoptosis</i>
<i>Sangre</i>	↑ Fe ↑ Zn ↑ Ca	↑ Radicales superóxido ↑ Radicales malondialdehído ↑ Relación redox CoQ10 ↑ 8 hidroxiguanosina ↑ 8 hidroxidesoxiguanosina	
<i>Suero</i>	↓ Cu ↓ Mg ↓ Al ↑ Ca	↑ 8 hidroxidesoxiguanosina	
<i>Linfocitos</i>			↑ Bcl-2 ↑ Caspasa 3 ↑ Superóxido dismutasa

Tabla 3. Biomarcadores de procesos involucrados en la EP.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

La proteómica ha demostrado ser eficiente en la identificación de posibles biomarcadores específicos para diferentes enfermedades. En la investigación clínica, adquiere gran relevancia debido a que facilita el desarrollo de métodos diagnósticos no invasivos mediante la identificación de biomarcadores en plasma o células sanguíneas. El plasma es una excelente muestra para el diagnóstico debido a la expresión y liberación de proteínas al torrente sanguíneo en respuesta a estados fisiológicos como el síndrome respiratorio agudo⁷², cáncer de páncreas⁷³, artritis reumatoide⁷⁴, enfermedad de Alzheimer⁷⁵ y esclerosis múltiple⁷⁶, entre otros.

Hasta la fecha, no se han identificado biomarcadores específicos de la EP en sangre periférica o alguno de sus componentes, pero si se han aplicado estas técnicas para el análisis posmortem de tejido de la sustancia negra de humanos afectados con EP⁷⁸. Es por esto que en el presente proyecto, proponemos la aplicación de la proteómica para la búsqueda de nuevos probables biomarcadores de la enfermedad de Parkinson.

1.6 JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento se desconoce la causa que induce una mayor pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra durante el envejecimiento en los pacientes con la enfermedad de Parkinson (EP). Aún no existe tratamiento que pueda modificar el curso de la enfermedad mediante la protección neuronal o retraso de la muerte celular. Una causa probable por la cual los agentes neuroprotectores no han sido efectivos, es el hecho de que el proceso neurodegenerativo es muy avanzado cuando la EP se diagnostica clínicamente. Estudios recientes sugieren que este desorden se caracteriza por una fase asintomática probablemente de años o décadas, en donde la degeneración neuronal ocurre antes de que aparezcan los primeros síntomas. El contar con un sistema de detección de dicha etapa asintomática, permitiría iniciar un tratamiento neuroprotector con mejores resultados. Es decir, uno de los primordiales retos de la investigación clínica en esta área, es la detección de biomarcadores específicos que sirvan como indicadores de la presencia de un proceso neurodegenerativo como la EP. De allí, que la presente propuesta tenga como objetivo utilizar la proteómica para encontrar posibles biomarcadores que en un futuro permitan validarlos para elaborar una prueba diagnóstica temprana para la enfermedad de Parkinson.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar el perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con Enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Comparar los resultados de los análisis clínicos de pacientes con EP e individuos control.
- 2) Comparar el proteoma plasmático de pacientes con EP e individuos control.
- 3) Identificación de patrones proteicos entre los grupos de estudio.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

1.8 ESTRATEGIA GENERAL

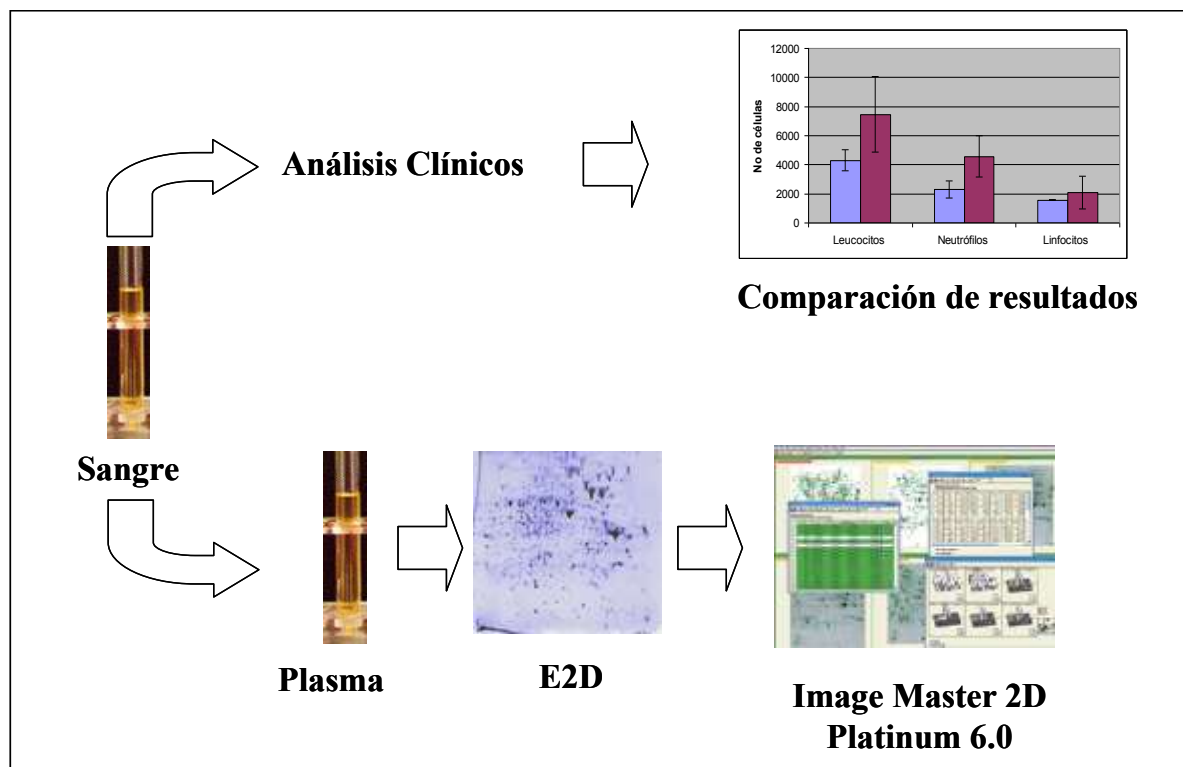


Figura 2 Estrategia General. Se muestran las etapas involucradas en el desarrollo de la investigación, las cuales consistieron en: a) Obtener sangre periférica por punción venosa de todos los participantes en el estudio, b) Análisis clínico de sangre, c) Comparación de resultados entre el grupo de individuos control y EP, d) Obtener plasma sanguíneo, e) Obtener perfiles proteicos mediante electroforesis en geles bidimensionales, f) Analizar comparativamente los geles bidimensionales entre el grupo de individuos control y EP.

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Origen de los reactivos

Los reactivos para la preparación de soluciones fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., Spectrum, Merck, JT Baker y Pierce.

2.1.2 Material biológico

Se utilizaron muestras de plasma aisladas a partir de sangre periférica de 6 pacientes diagnosticados clínicamente con EP de tipo esporádica que asistieron a consulta en el Hospital Universitario “José Eleuterio González” y 6 individuos control.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

2.2 Equipo

Para la realización de este trabajo se utilizaron: placa de calentamiento con agitador magnético TROEMNER, potenciómetro Thermo Orion 410A, balanza analítica GR120, espectrofotómetro eppendorff Biophotometer, centrifugas refrigeradas Sorvall, Damon y Rotanta 460R, vortex marca Lab-line, Microcentrífuga Labnet, juego de micropipetas Gilson de 20, 200 y 1000 μ L, balanza analítica OHAUS, incubadora con agitación mecánica marca MRC, refrigeradores de -20°C marca TORREY y -70°C marca SO LOW. Todo el equipo necesario para realizar los geles bidimensionales como: cámara de isoelectroenfoque, fuentes de poder, cámaras de electroforesis vertical son de la marca Amersham Biosciences y se utilizó un fotodocumentador ChemiDoc XRS system marca Bio-Rad para la captura de imágenes. También se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta presión Waters 2695 modelo Alliance acoplado a un espectrómetro de masas MicroMass Q-ToF micro.

El equipo utilizado para el análisis de datos esta formado por computadoras HP y Toshiba. Los software utilizados para el desarrollo del presente trabajo fueron Microsoft Word 2003, procesadores gráficos Microsoft Power Point 2003, Microsoft Excel 2003, Adobe PhotoShop 7.0, Quantity One 1D Analysis, Image Master 2D Platinum 6.0, Ettan IPGphor 3 control, Protein Lynx Server 2.3.

2.3 METODOLOGÍA

2.3.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se obtuvo la autorización de los participantes mediante una carta de consentimiento informado. Los pacientes y controles fueron entrevistados para obtener información detallada del estilo de vida e historial médico personal. Posteriormente, se colectaron las muestras de sangre periférica para su análisis clínico en la clínica 5 del IMSS. Los pacientes con EP fueron diagnosticados clínicamente por un especialista en enfermedades neurodegenerativas del Hospital Universitario “José Eleuterio González” y los controles fueron participantes sanos sin antecedentes de alguna enfermedad crónica degenerativa.

2.3.2 OBTENCIÓN DE PLASMA

1. Se extrajo sangre periférica por punción venosa en tubos con EDTA.
2. Se centrifugaron a 1700 g por 10 min a una temperatura entre 2°C a 6°C.
3. Se separó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

4. El sobrenadante se centrifugó a 1700 g por 10 minutos para remover restos de plaquetas
5. Se separó nuevamente el sobrenadante y se colocó en otro tubo para congelarlo a -80°C.

2.3.3 GELES BIDIMENSIONALES

2.3.3.1 ISOELECTROENFOQUE

1. Se tomó el equivalente en plasma a 2.9 µg de colesterol y se mezcló con urea 7M, tiourea 2M, DTT 0.14 M, CHAPS al 4%, biolyte 3-10 y azul de bromofenol al 0.002%.
2. Se vació en el immobiline drystrip reswelling tray.
3. Se colocó la tirilla sobre el buffer que contiene la muestra y se cubrió con aceite.
4. Se dejó toda la noche aproximadamente de 16 a 17 horas.
5. Se retiró la tirilla del aceite.
6. Se colocó la tirilla sobre la placa de cerámica.
7. Se cubrió con aceite.
8. Se colocaron los electrodos sobre los papeles filtro y son asegurados.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

9. Se hizo el isoelectroenfoque utilizando los siguientes voltajes:

- a) 100 V hasta completar 100 Vh
- b) 200 V hasta completar 70 Vh
- c) 500 V hasta completar 500 Vh
- d) 1000 V hasta completar 800 Vh
- e) 4500 V hasta completar 11560 Vh
- f) 4500 V hasta completar 5970 Vh

2.3.3.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.

1. Los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se prepararon de acuerdo al método descrito por *Laemmli* en 1970.
2. Una vez terminada la corrida, a las tirillas se les quitó el exceso de aceite y se sumergieron por 15 min en urea 6 M, ditioneitol 0.065 M, tris-HCl 50 mM, glicerol 30%, dodecil sulfato de sodio al 2%, azul de bromofenol al 0.002%.
3. Se retira la solución y se sumergen por 15 min en urea 6 M, tris-HCl 50 mM, glicerol 30%, iodoacetamida 2.5%, dodecil sulfato de sodio al 2%,

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

azul de bromofenol al 0.002%.

4. Posteriormente se tomaron las tirillas con pinzas para colocarlas en el gel polimerizado y se sello con agarosa fundida.
5. Se dejaron polimerizar por 5 min.
6. Se termina de armar la cámara de electroforesis y se inició la corrida a 8 Watts por 10 horas y posteriormente se subió 50 Watts dejando correr hasta que faltaran alrededor de 0.5 cm para que saliera el azul de bromofenol del gel.
7. Se detuvo la corrida y se sacaron los geles.
8. Se colocaron en una vasija con metanol al 50% y ácido acético al 10% y se incubaron por 30-60 min.
9. Se lavaron con agua destilada por 20 min, 2 veces.
10. Finalmente se agrega la solución de Coomassie coloidal y se dejó por 16-24 hrs en agitación.
11. Se retiró la solución de Coomassie coloidal.
12. Se agregó agua destilada se dejo en agitación para quitar el exceso de colorante.
13. Se repitió el paso anterior hasta que el gel se observara sin fondo azul.

2.3.4 Análisis de imágenes con el software Image Master 2D Platinum 6.0

1. Las imágenes de los geles fueron capturadas en un ChemiDoc XRS en el formato del aparato.
2. Posteriormente las imágenes en el formato SCN fueron convertidas a formato TIFF con el software Quantity One.
3. Se capturaron con el software Image Master 2D Platinum 6.0 y se indicó que eran imágenes de geles teñidos con azul de Coomassie.
4. Se detectaron las manchas automáticamente para cada gel.
5. Se verificó que las manchas fueron detectadas correctamente y en caso de no haber sido detectadas se adicionaron como manchas a la base de datos.
6. Una vez revisadas las replicas de cada persona se traslaparon los geles para determinar la manchas que aparecen en al menos 2 geles.
7. Se verificó que las manchas fueran traslapadas correctamente y en caso de no haber sido traslapadas se adicionaron como manchas traslapadas a la base de datos.
8. Se traslaparon los geles de todos los individuos control para determinar las manchas que se encuentran en todos los geles.
9. Se verificó que las manchas fueran traslapadas correctamente y en caso de no haber sido traslapadas se adicionaron como manchas traslapadas a la base de datos.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

10. Después se repitieron los pasos 8 y 9 para el grupo de EP.
11. Se comparan los geles entre los 2 grupos de estudio y se verifica que el traslape se haya hecho correctamente.
12. Finalmente, se le pidió al programa que haga un comparativo entre los 2 grupos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 HISTORIAL MÉDICO

Los datos clínicos obtenidos fueron colectados por el MCP Marco A. Morales Garza. En la tabla 1 se muestran datos de los pacientes incluidos en el presente estudio. Cuatro pacientes presentaron un tipo de EP de inicio tardío y dos de ellos de inicio temprano. Los primeros tres pacientes tienen menos de 5 años de padecer la EP mientras que los últimos 3 tienen 10 o más años. Se pudo observar que todos ellos estuvieron en contacto con sustancias químicas y pesticidas debido a su trabajo. El paciente 1 fumó por 15 años, el 2 y el 6 han utilizado marihuana.

Todos los pacientes presentan depresión en mayor o menor grado. Por otro lado los pacientes 2, 3, 5 y 6 tienen otras enfermedades y por lo tanto también consumen otros medicamentos que se indican en la Tabla 4.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

3.2 ANÁLISIS CLÍNICOS

Se colectaron las muestras de sangre por punción venosa de cada uno de los participantes en el estudio y el análisis sanguíneo se hizo en la clínica No 5 del IMSS. Una vez reportados los resultados se calculó el promedio y la desviación estándar de cada uno de los analitos reportados en el grupo de individuos control y pacientes con EP y se compararon los valores, sin embargo no se encontró diferencia significativa en alguno de los analitos (Figura 3).

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

Paciente	Número	1	2	3	4	5	6
	Edad	61	54	62	57	63	50
	Inicio de la EP	59	51	57	47	50	35
	Tiempo de padecimiento	2	3	5	10	13	15
	Traumatismo craneal	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Futbol soccer	Ninguno	Futbol soccer
Riesgos de trabajo	Químicos	Vapores de polietileno, NH ₃ ,	Insecticida	Pinturas de plomo	Negativo	Vapores de Plástico (15 años)	Asbesto, cemento
		Pigmentos y oxidos	Negativo	humo de soldadura	Negativo	Negativo	Negativo
	Pesticidas	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Toxicomanías	Fumar	15 años	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Drogas	Negativo	Marihuana	Negativo	Negativo	Negativo	Marihuana
Diagnóstico	EP	Inicio tardío	Inicio tardío	Inicio tardío	Inicio temprano	Inicio tardío	Inicio temprano
	Depresión	Menor	Moderada	Menor	Mayor	Menor	Menor
	Diabetes Limitrofe	Negativo	Negativo	Positiva Intolerancia a carbohidratos	Negativo	Negativo	Negativo
	Diabetes Mellitus 2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	Arritmia	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
	Vitiligo	Negativo	Positivo hace 10 años	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Hipertensión	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Tratamiento	Medicamento 1	Carbidopa	Lexapro	Carbidopa	Carbidopa	Propafenona	Carbidopa
	Medicamento 2	Levodopa	No tolera Levodopa	Levodopa	Levodopa	Levodopa	Levodopa
	Medicamento 3	Diazepam	Cifrol	Cortisonel		Diazepam	Biperideno
	Medicamento 4		Omeprazol	Metformina		Metobrolol	Glibenclamida
	Medicamento 5		Telormin			Cinarizina/ Naproxeno	Drovastatina

Tabla 4. Historial clínico de pacientes con EP.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

3.3 GELES BIDIMENSIONALES.

Una vez obtenidas las imágenes de los geles bidimensionales estas se analizaron mediante el software Image Master 2D Platinum 6.0. Sin embargo no se encontraron diferencias entre el grupo de individuos control y el de EP.

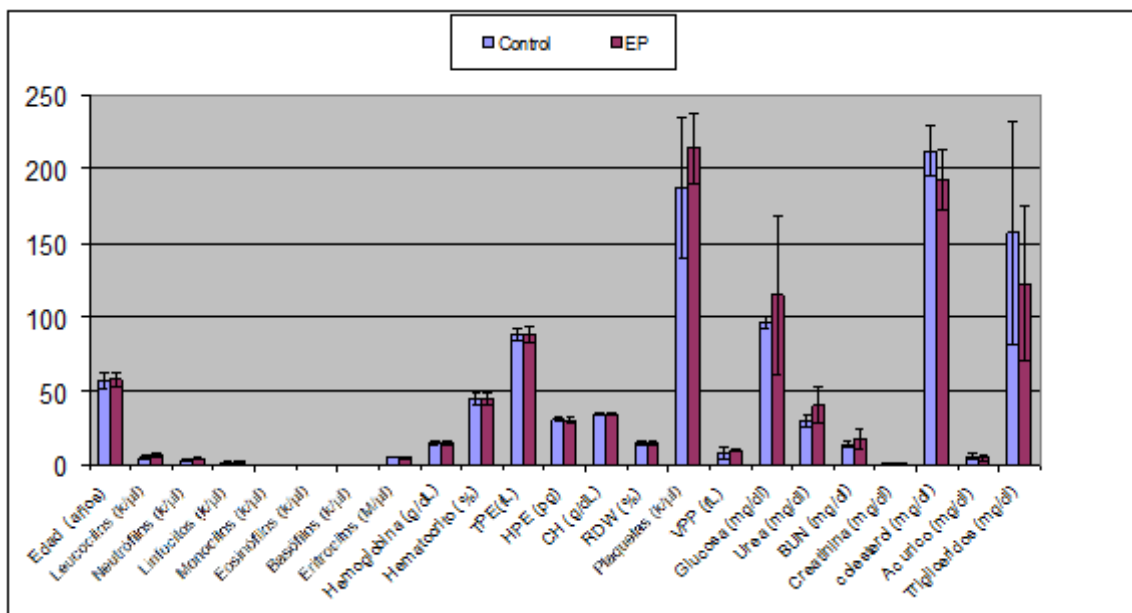


Figura 3. Comparación de resultados de análisis clínicos de laboratorio entre el grupo de individuos control y pacientes con EP. Las barras claras corresponden al grupo de individuos control mientras que las oscuras corresponden al grupo de EP.

Al comparar los doce proteomas se logró distinguir dos patrones de manchas proteicas. Un grupo comprende el 66.67% de los individuos (perfil proteico A) y se pueden observar 3 manchas encerradas en una elipse en la Figura 4. En el 33.33% restante (perfil proteico B) no están presentes. El tamaño de una de estas manchas diferenciales corresponde a un PM

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

aproximado de 21 kDa y un pl de 5.7 y el PM de las otras dos es de aproximadamente 20 kDa con un pl de 5.4 y 6.1. Estas manchas diferenciales no se correlacionan con la edad, historial o los resultados de los análisis clínicos. Posteriormente se analizó la presencia de cada una de estas manchas diferenciales en los 36 geles mediante la utilización del software Image Master 2D Platinum 6.0 (Figura 5).

Posteriormente realizamos un análisis comparativo del perfil proteico, y de los resultados de los análisis clínicos entre el grupo control y el de Pacientes con EP que estaban incluidos en el grupo de perfil proteico A y otro análisis similar para el B. No encontramos diferencias dentro del perfil A. Mientras que en el grupo B, observamos una ligera diferencia en el número de neutrófilos y basófilos entre los grupos de estudio, ya que el número observado queda dentro de los valores normales. La cantidad observada de estos tipos celulares en el grupo de pacientes con EP fue de 4580 neutrófilos/ μ l \pm 1414 y 80 basófilos/ μ l \pm 8. Mientras que en el grupo control encontramos 2285 neutrófilos/ μ l \pm 587 y 47 basófilos/ μ l \pm 9 (Figura 6). Finalmente observamos que nuestro grupo de pacientes de perfil proteico B incluye dos pacientes que tienen en común la enfermedad Diabetes mellitus tipo 2 y son los pacientes con mayor tiempo de padecer la EP. La diferencia entre estos pacientes es el inicio de la EP, ya que en uno inició a los 50 años (EP de inicio tardía) mientras que en el otro inició a los 35 años (EP de inicio temprano).

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

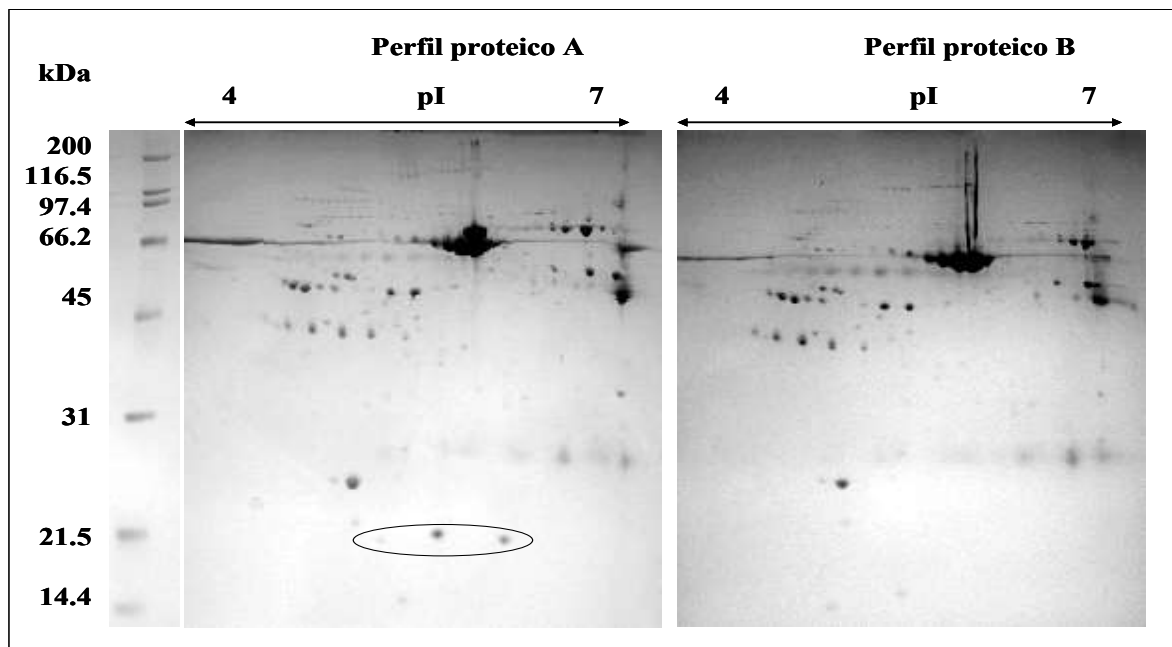


Figura 4. Geles bidimensionales de perfil proteico A y B de personas incluidas en el estudio. Se muestran geles bidimensionales representativos de cada grupo. En los geles se pueden observar manchas que corresponden a proteínas que se encuentran en un rango de punto isoeléctrico de 4 a 7. La segunda dimensión se hizo en SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de Coomassie coloidal.



Figura 5. Localización de proteína con clave 23666 en los 36 geles bidimensionales. En la figura se muestran pequeñas ventanas donde se observa la misma mancha en todos los geles con excepción de 6 geles en los individuos control y 6 geles del grupo de pacientes con EP.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

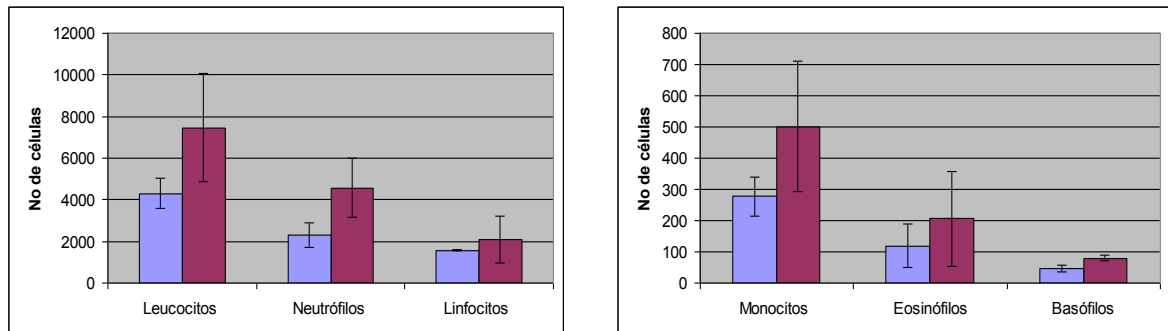


Figura 6. Comparación de células blancas de individuos control y pacientes con EP. Las barras en color gris claro corresponden al grupo control y las de gris oscuro al grupo EP.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

El análisis comparativo del proteoma sérico de individuos control y pacientes con EP demostró el aumento de 9 proteínas, 4 de ellas provienen del complemento C3b-cadena α y los factores H, Bb y la proteína amiloide pre-sérica, más sin embargo no son específicas para la EP⁷⁹. En nuestro estudio probablemente no se encontraron diferencias debido a que el plasma contiene la totalidad de las proteínas extracelulares de la sangre mientras que el suero carece de los factores de coagulación, es decir, dichos factores de coagulación presentes en el plasma no permiten observar las proteínas que están en menor cantidad. Otro aspecto a considerar es que utilizamos una técnica de tinción menos sensible como lo es el Azul de Coomassie coloidal el cual tiene un límite de detección de 30 ng de proteína mientras que el Sypro Ruby tiene un límite de detección de 0.25 ng⁸⁰, motivo por el cual detectamos una menor cantidad de proteínas en los geles bidimensionales, aunque ellos no reportan el número de proteínas que observan en los geles.

En nuestro estudio se encontraron dos tipos de perfiles proteicos. En el perfil proteico A se detectaron 3 proteínas con un PM aproximado de 21 KDa y dos proteínas de 20 KDa mientras en el perfil proteico B están ausentes. El punto isoeléctrico fue de 5.7, 5.4 y 6.1 respectivamente. El perfil proteico A que presenta las tres manchas en los geles representa el 66.67 % de los participantes mientras el resto de los participantes carece de estas tres proteínas (perfil proteico B).

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

En nuestro grupo control encontramos 4 individuos presentando el perfil A y 2 con el perfil B. De manera similar, en el grupo de pacientes con EP también encontramos 4 individuos con el perfil A y 2 con el perfil B, pero con la diferencia de que estos últimos 2 pacientes tienen Diabetes mellitus tipo 2. La observación de dos perfiles proteicos en los grupos de estudio (controles y pacientes con EP) y que ambos perfiles se encontraron en la misma proporción (4 controles y 4 pacientes con patrón A y 2 controles y 2 pacientes con patrón B), sugiere dos posibilidades: a) que existen diferentes tipos de poblaciones dentro de los dos grupos de estudio (controles y pacientes) o b) que el perfil proteico tipo B en el grupo control muestre un perfil proteico de personas con Diabetes mellitus tipo 2 sin presentar síntomas. Por tal motivo es importante identificar estas proteínas para encontrar si hay reportes de alguna correlación con EP y/o Diabetes Mellitus tipo 2.

Al buscar correlacionar estos 2 grupos con datos del historial clínico y/o resultados de análisis clínicos, no se encontró ninguna correlación.

Cuando se compararon los resultados de los análisis clínicos y los proteomas del grupo control con pacientes que tienen perfil proteico tipo A, no encontramos diferencias. Se hizo el mismo análisis comparativo entre controles y pacientes con perfil proteico B encontrando una mayor cantidad de neutrófilos (4580 células/ μ l \pm 1414) y basófilos (80 células/ μ l \pm 8) en el grupo de pacientes con EP que en el grupo control (neutrófilos=2285 células/ μ l \pm 587 y basófilos=47 células/ μ l \pm 9). Aunque existen diferencias entre los individuos control y pacientes con EP en el grupo de individuos con perfil proteico B en la cantidad de neutrófilos y basófilos estos se encuentran dentro de los valores normales de la población en México (neutrófilos= 2000-6900 células/ μ l y basófilos= 0-200 células/ μ l). Por otra parte son solo diferencias entre 2 individuos control y 2 pacientes con EP (además de presentar Diabetes mellitus tipo 2) por lo que es importante seguir incluyendo más personas en el estudio para ver si se comportan de la misma manera.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

La presente investigación es el primer comparativo de perfiles proteicos de plasma sanguíneo entre pacientes con EP e individuos control. Aunque no se encontraron diferencias entre los grupos, es necesario seguir evaluando perfiles proteicos de este tipo de muestra ya que las proteínas que se encuentran en mayor cantidad no nos permiten ver las de mediana y baja abundancia, por lo que es necesario estandarizar técnicas cromatográficas o de precipitación para el fraccionamiento del plasma hasta encontrar una fracción donde se observen una mayor cantidad de proteínas diferenciales. Otro aspecto importante en la parte experimental es trabajar con un pool de muestras de cada grupo ya que el análisis computacional de los geles bidimensionales consume mucho tiempo, así solamente se compararían 3 geles del grupo con EP y 3 geles del grupo control en lugar de 36 o más geles que equivaldrían a 6 pacientes con 6 controles.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES

1. Los resultados de los análisis clínicos entre el grupo control y EP no mostraron diferencias significativas.
2. El perfil proteico entre los grupos analizados, control y EP, no mostró diferencias significativas.
3. El grupo de pacientes con EP y el grupo control mostraron dos patrones proteicos.
4. Los pacientes que presentan uno de los patrones proteicos tienen en común diabetes mellitus tipo 2.

5.2 PERSPECTIVAS

Se logró estandarizar las condiciones para la obtención de perfiles proteicos de plasma sanguíneo mediante geles bidimensionales. Esto permitirá seguir comparando más geles bidimensionales de las personas incluidas en el presente estudio para observar cambios conforme avanza la EP e ir creando una base de datos que permita la inclusión de personas de más de 50 años como en el presente estudio.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización mundial de la salud. Informe sobre la salud en el mundo 2004.
2. <http://www.salud.gob.mx/>
3. Parkinson, J. An essay on the shaking palsy, 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2002;14(2):223.
4. Gelb DJ, Oliver E, and Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol* 1999;56:33.
5. Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenoroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 1996; 274:1197.
6. Hornykiewicz O, Parkinson's disease and the adaptive capacity of the nigrostriatal dopamine system: Possible neurochemical mechanisms. *Adv. Neurol* 1993;60:140.
7. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD.. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's Disease. *J Neurochem* 1990;54:823.
8. Mizuno Y, Ikebe S, Hattori N, Nakagawa-Hattori Y, Mochizuki H, Tanaka M, Ozawa T. Role of mitochondria the etiology and pathogenesis of Parkinson's Disease. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271:265.
9. Sveinbjornsdottir S, Hicks AA, Jonsson T, Petursson H, Gugmundsson G, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K. Familial aggregation of parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med* 2000; 343:1765.
10. Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 1998;339:1044.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

11. Galvin JE, Lee VM, Schmidt ML, Tu PH, Iwatsubo T, Trojanowski JQ. Pathobiology of the Lewy body. *Adv Neurol* 1999;80:313.
12. Poewe W, Granata R. In *Movement Disorders. Neurological Principles and Practice*. Ed Watts R L, Koeller WC. 1997; 201.
13. Obeso JA, Olanow CW, Nutt JG. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2000; 23(supl 10): S2-S7.
14. Rodriguez-Oroz MC, Zamarbide I, Guridi J, Palmero MR, Obeso JA. Efficacy of deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease 4 years after surgery: double blind and open label evaluation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75(10):1382.
15. Björklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000;3:537.
16. Luquin MR, Montoro RJ, Guillen J, Saldise L, Insausti R, Del Rio J, Lopez-Barneo J. Recovery of chronic parkinsonian monkeys by autoransplants of carotid body cell aggregates into putamen. *Neuron* 1999;22:743.
17. Arjona V, Minguez-Castellanos A, Montoro RJ, Ortega A, Escamilla F, Toledo-Aral JJ, Pardal R, Mendez-Ferrer S, Martin JM, Perez M, Katati MJ, Valencia E, Garcia T, Lopez-Barneo J. Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery* 2004;54(4): 1035.
18. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86: 3828.
19. Lu D, Mahmood A, Wang L, Li YM, Chopp M. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* 2001;12:559.
20. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:181.
21. Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, Lees AJ. The accuracy of diagnosis of Parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* 2002;125:861.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

22. Becker G, Muller A, Braune S, Buttner T, Benecke R, Greulich W, Klein W, Mark G, Rieke J, Thumler R. Early diagnosis of Parkinson's disease. *J Neurol* 2002;249:40.
23. Riederer P, Wuketich S. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J Neural Transm* 1976;38(3-4):277.
24. Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51(6):745.
25. Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991;114:2283.
26. Koller WC. When does Parkinson's disease begin? *Neurology* 1992 ;42(4 Suppl 4):27.
27. Morrish PK, Sawle GV, Brooks DJ. An [18F]dopa-PET and clinical study of the rate of progression in Parkinson's disease. *Brain* 1996;119:585.
28. Vingerhoets FJ, Snow BJ, Lee CS, Schulzer M, Mak E, Calne DB. Longitudinal fluorodopa positron emission tomographic studies of the evolution of idiopathic parkinsonism. *Ann Neurol* 1994;36(5):759.
29. Hardie RJ. Measuring the rate of progression and estimating the preclinical period of Parkinson's disease with [18F] dopa PET. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;66(2):256.
30. Braune S. The role of cardiac metaiodobenzylguanidine uptake in the differential diagnosis of parkinsonian syndromes. *Clin Auton Res* 2001;11(6):351.
31. Berg D, Siefker C, Becker G. Echogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease and its relation to clinical findings. *J Neurol* 2001;248(8):684.
32. Berg D, Roggendorf W, Schroder U, Klein R, Tatschner T, Benz P, Tucha O, Preier M, Lange KW, Reiners K, Gerlach M, Becker G. Echogenicity of the substantia nigra: association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury. *Arch Neurol* 2002;59(6):999.
33. Berg D, Jabs B, Mershdorf U, Beckmann H, Becker G. Echogenicity of substantia nigra determined by transcranial ultrasound correlates with

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

- severity of parkinsonian symptoms induced by neuroleptic therapy. *Biol Psychiatry* 200.15;50(6):463.
34. Berg D, Siefker C, Ruprecht-Dorfler P, Becker G. Relationship of substantia nigra echogenicity and motor function in elderly subjects. *Neurology* 2001.9;56(1):13.
35. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E. Mutation in the a-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276: 2045.
36. Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's Disease. *Nature Genet* 1998;18:106.
37. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 608.
38. Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, Vaughan J, Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Denèfle P, Wood NW, Agid Y, Brice A. Association between early onset parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 2000; 342: 1560.
39. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 395:451.
40. Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, Vassilatis DK. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nature Genet* 2003; 33:85.
41. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003;299:256.
42. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapicola B, Auburger G, Wood NW. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*. 2004; 304:1158.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

43. Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznoi B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann RD. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nature Genet* 1998;18:262.
44. Farrer M, Gwinn-Hardy K, Muentner M, DeVrieze FW, Crook R, Perez-Tur J, Lincoln S, Maraganore D, Adler C, Newman S, MacElwee K, McCarthy P, Miller C, Waters C, Hardy J. A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor. *Hum Mol Genet* 1999; 8:81.
45. Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, Tanaka H, Ishikawa A, Nakagawa-Hattori Y, Yokochi M, Kobayashi T, Igarashi S, Takano H, Sanpei K, Koike R, Mori H, Kondo T, Mizutani Y, Schaffer AA, Yamamura Y, Nakamura S, Kuzuhara S, Tsuji S, Mizuno Y. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet* 1997;60:588.
46. Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, Conneally PM, Foroud T; Parkinson Study Group. Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37. *Am J Hum Genet.* 2003;72(4):1053.
47. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003;302(5646):841.
48. Halliwell B, Gutteridge JM, Blake D. Metal ions and oxygen radical reactions in human inflammatory joint disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985;311(1152):659.
49. Halliwell B, Gutteridge JM. Iron as a biological pro-oxidant. *ISI Atlas Sci Biochem* 1998;148.
50. Kienzl E, Jellinger K, Stachelberger H, Linert W. Iron as catalyst for oxidative stress in the pathogenesis of Parkinson's disease? *Life Sci* 1999;65(18-19):1973.
51. Montgomery EB Jr. Heavy metals and the etiology of Parkinson's disease and other movement disorders. *Toxicology* 1995;97(1-3):3.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

52. Verity MA. Manganese neurotoxicity: a mechanistic hypothesis. *Neurotoxicology* 1999;20(2-3):489.
53. Witholt R, Gwiazda RH, Smith DR. The neurobehavioral effects of subchronic manganese exposure in the presence and absence of pre-parkinsonism. *Neurotoxicol Teratol* 2000;22(6):851.
54. Iregren A, Sjogren B, Gustafsson K, Hagman M, Nylen L, Frech W, Andersson M, Ljunggren KG, Wennberg A. Effects on the nervous system in different groups of workers exposed to aluminium. *Occup Environ Med.* 2001;58(7):453.
55. Flaten TP. Geographical associations between aluminium in drinking water and death rates with dementia, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis in Norway. *Trace Elem Med* 1987;4:179.
56. Yasui M, Kihira T, Ota K. Calcium, magnesium and aluminum concentrations in Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 1992;13(3):593.
57. Hirsch EC, Brandel JP, Galle P, Javoy-Agid F, Agid Y. Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. *J Neurochem* 1991;56(2):446.
58. Forte G, Bocca B, Senofonte O, Petrucci F, Brusa L, Stanzione P, Zannino S, Violante N, Alimonti A, Sancesario G. Trace and major elements in whole blood, serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2004;111(8):1031.
59. Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett.* 1994;165(1-2):208.
60. Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 β and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 1995;202: 17.
61. Caronti B, Antonini G, Calderaro C, Ruggieri S, Palladini G, Pontieri FE, Colosimo C. Dopamine transporter immunoreactivity in peripheral blood lymphocytes in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2001;108(7):803.
62. Orth M, Schapira AH. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochem Int* 2002;40(6):533.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

63. Sato S, Mizuno Y, Hattori N. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels as a biomarker for progression of Parkinson disease. *Neurology* 2005;64(6):1081.
64. Colombo C, Cosentino M, Marino F, Rasini E, Ossola M, Blandini F, Mangiagalli A, Samuele A, Ferrari M, Bombelli R, Lecchini S, Nappi G, Frigo G. Dopaminergic modulation of apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells: possible relevance for Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:679.
65. Blandini F, Mangiagalli A, Cosentino M, Marino F, Samuele A, Rasini E, Fancellu R, Martignoni E, Riboldazzi G, Calandrella D, Frigo GM, Nappi G. Peripheral markers of apoptosis in Parkinson's disease: the effect of dopaminergic drugs. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:675.
66. Anderson NG, Anderson L. The Human Protein Index. *Clin Chem* 1982;28(4 Pt 2):739.
67. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999;19(3):1720.
68. Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet* 2003;33:311.
69. Fey SJ, Larsen PM. 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis. *Curr Opin Chem Biol* 2001;5(1):26.
70. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 1999;17(3):121.
71. Xiao Z, Prieto D, Conrads TP, Veenstra TD, Issaq HJ. Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. *Mol Cell Endocrinol* 2005;230(1-2):95-106.
72. Ren Y, He QY, Fan J, Jones B, Zhou Y, Xie Y, Cheung CY, Wu A, Chiu JF, Peiris JS, Tam PK. The use of proteomics in the discovery of serum biomarkers from patients with severe acute respiratory syndrome. *Proteomics* 2004;4(11):3477.
73. Xia Q, Kong XT, Zhang GA, Hou XJ, Qiang H, Zhong RQ. Proteomics-based identification of DEAD-box protein 48 as a novel autoantigen, a prospective serum marker for pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330(2):526.

Comparación del perfil proteico del plasma sanguíneo entre individuos control y pacientes con enfermedad de Parkinson mediante geles bidimensionales

74. Liao H, Wu J, Kuhn E, Chin W, Chang B, Jones MD, O'Neil S, Clauser KR, Karl J, Hasler F, Roubenoff R, Zolg W, Guild BC. Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50(12):3792.
75. Zou L, Wu Y, Pei L, Zhong D, Gen M, Zhao T, Wu J, Ni B, Mou Z, Han J, Chen Y, Zhi Y. Identification of leukemia-associated antigens in chronic myeloid leukemia by proteomic analysis. *Leuk Res* 2005.
76. Almeras L, Lefranc D, Drobecq H, de Seze J, Dubucquoi S, Vermersch P, Prin L. New antigenic candidates in multiple sclerosis: identification by serological proteome analysis. *Proteomics*. 2004;4(7):2184.
77. Li X, Gong Y, Wang Y, Wu S, Cai Y, He P, Lu Z, Ying W, Zhang Y, Jiao L, He H, Zhang Z, He F, Zhao X, Qian X. Comparison of alternative analytical techniques for the characterisation of the human serum proteome in HUPO Plasma Proteome Project. *Proteomics* 2005;5(13):3423.
78. Basso M, Giraudo S, Corpillo D, Bergamasco B, Lopiano L, Fasano M. Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteomics*. 2004;4(12):3943.
79. Goldknopf IL, Sheta EA, Bryson J, Folsom B, Wilson C, Duty J, Yen AA, Appel SH. Complement C3c and related protein biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Apr 21;342(4):1034.
80. Nishihara JC, Champion KM. Quantitative evaluation of proteins in one- and two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain. *Electrophoresis*. 2002 23(14):2203.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Marcos Jair Guerrero Muñoz

Campo de Estudio: Morfología

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Monterrey Nuevo León, el 16 de Diciembre de 1974, hijo del Sr. Juan Antonio Guerrero Moreno y la Sra. Rosa Elia Muñoz Jaramillo.

Escolaridad: Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Agosto de 1995.

Maestría en Ciencias con Orientación en Morfología. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Diciembre del 2002.

Experiencia profesional: Coordinador de producción e investigador de Polímeros en la empresa Adhesivos y Productos Especiales S.A. de C.V. 1997 a 1999.