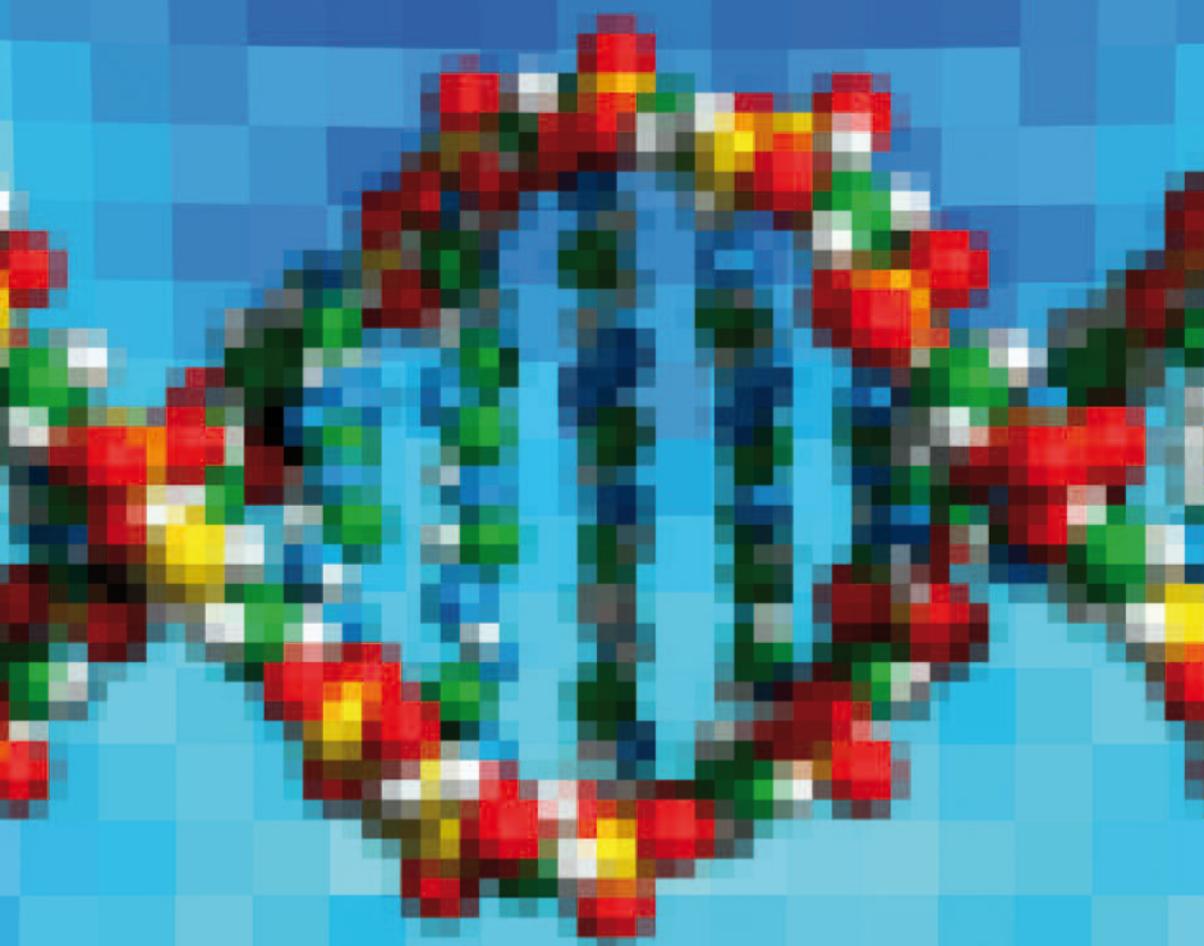


Estudio de asociación de la enfermedad de Parkinson
con genes que codifican sustratos de la parkina
y las subunidades del proteasoma
en una muestra de población gallega



Ángel Sesar Ignacio

2014



Universidad de Santiago de Compostela
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Medicina

Estudio de asociación
de la enfermedad de Parkinson
con genes que codifican sustratos de la parkina
y las subunidades del proteasoma
en una muestra de población gallega

Memoria para optar al grado de doctor

Ángel Sesar Ignacio

2014

DIRECTORES

Alfonso Castro García

María Jesús Sobrido Gómez



Alfonso Castro García, profesor titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, director de la Unidad de Trastornos del Movimiento del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, y **María Jesús Sobrido Gómez**, doctora en Medicina, directora del Grupo de Genética de Enfermedades Neurológicas del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN

que el presente trabajo titulado *Estudio de asociación de la enfermedad de Parkinson con genes que codifican sustratos de la parkina y las subunidades del proteasoma en una muestra de población gallega* se ha realizado bajo su dirección por el licenciado en Medicina **Ángel Sesar Ignacio** y se encuentra en condiciones de presentarse y defenderse como tesis doctoral ante el tribunal correspondiente en la Universidad de Santiago de Compostela.

Santiago de Compostela, 23 de abril de 2014

ALFONSO CASTRO GARCÍA

MARÍA JESÚS SOBRIDO GÓMEZ



*A la memoria de mi abuela Mercedes (1914 – 1997)
por el amor incondicional a sus nietos.*





*El esfuerzo merece la pena.
Siempre nos hace mejores.*

*Decís vosotros que los tiempos son malos.
Sed vosotros mejores, y los tiempos serán mejores.
Vosotros sois los tiempos.*

AGUSTÍN DE HIPONA





AGRADECIMIENTOS

Cuando oigo decir a alguien, generalmente joven y con formación limitada, *No le debo nada a nadie* no puedo dejar de pensar qué palabras más desafortunadas. El esfuerzo personal es fundamental, pero también es importante el número de personas que de un modo u otro contribuyen a la consecución de nuestro objetivo. Parafraseando al poeta inglés John Donne *No man is an island*. De modo que, ya que esta es la única sección estrictamente personal, la dedicaré a mencionar a todos los que me han ayudado no solo en este estudio, sino también en mi camino profesional. Para todos ellos mis más sinceros agradecimientos:

A mi madre y a mi abuela, a quien dedico este trabajo, por educarme, por enseñarme a hacer lo correcto y por hacerme más llevaderos los malos momentos.

A mi profesora de preescolar y de 2º de EGB Margarita Suárez Argibay, por su paciencia, cariño y comprensión en una época en que dominaban otros métodos.

A mi elocuente profesor de Ciencias de 6º de EGB, Eduardo Varela Pol (1929-1998) por iniciarme en los misterios de la biología humana. Creo que entonces empecé a ser médico.

A mis profesores de Matemáticas de la EGB y Bachillerato Faustino Masaguer, Constantino Arnosó y Bernardino Picallo, por enseñarme a pensar y a razonar.

A mis apreciados colegas Manolo Arias, antiguo jefe, y a Ignacio Requena por descubrirme siendo estudiante el proceloso camino de la Neurología Clínica y por ayudarme a realizar las horas de vuelo necesarias tras la residencia.

Al Profesor Manuel Noya, al que siendo un internista de 27 años se le encargó hacerse cargo de los pacientes neurológicos. Se formó, se convirtió en un brillante neurólogo y creó un servicio que hoy es de referencia nacional y que, a su vez, ha formado numerosas generaciones de neurólogos.

Al Profesor José Castillo por mejorar la herencia recibida y poner las condiciones para que el servicio siga creciendo y mejorando día a día en sus tres pilares de asistencia, docencia e investigación. Personalmente por el estímulo constante para la realización de este trabajo.

A la Profesora Manuela Lema y a toda la plantilla de mi época de MIR, Dolores Dapena, Rogelio Leira, Julio Pardo, José María Prieto, Alfredo Robles y Javier Vadillo por ayudar a formarme como neurólogo.

A mis compañeros de residencia Enrique Corredera, Rosa Rodríguez, Carmen Suárez, José Manuel Aldrey, Paula Suárez, Javier Naveiro y Linda Pardellas por sus buenos consejos y por haberme sacado las castañas del fuego más de una vez.

A mi compañera de curso, de residencia y codirectora de tesis María Jesús Sobrido por haberme permitido entrar y formarme en el mundo de la Genética. Ella ha sido clave para que este trabajo se haya podido realizar.

A los pacientes, a los estudiantes de Medicina y a los residentes de Neurología por obligarnos a no parar y a ser mejores.

Al Grupo de Medicina Genómica de la USC, es decir, a las Doctoras Beatriz Quintáns y Patricia Blanco, cuyo concurso resultó imprescindible para la parte experimental de este estudio.

A Pilar Cacheiro porque la Bioestadística, especialmente la Bioestadística Genética, pueden resultar muy complicadas. Su paciente labor nos ha permitido analizar e interpretar los resultados.

A la Fundación Pública Gallega de Medicina Genómica, especialmente a su director el Profesor Ángel Carracedo, y al CeGen por haber puesto los medios humanos y materiales para hacer el trabajo experimental.

A mis colegas Ernesto Cebrián y Antonio Koukoulis por su inestimable colaboración en la casuística de este trabajo.

A Marisol López y al personal de la Unidad de Trastornos del Movimiento del Instituto de Neurología y Neurocirugía de Ciudad de México por habernos cedido amablemente sus muestras para el estudio de replicación.

A todos los pacientes y controles que desinteresadamente han contribuido con sus muestras a este estudio. Sin ellos no se habría podido llevar a cabo. Incluimos nuestro agradecimiento a la Residencia Puerta del Camino, el Centro de Salud de Órdenes, la Asociación de Parkinson de La Coruña y la Residencia Sanitas de La Coruña, por habernos abierto sus puertas.

A mi buen amigo Fausto Isorna, genial dibujante y padre de mis encantadores sobrinos, por su arte en el material gráfico que acompaña a esta memoria y su excelente labor en la maquetación del volumen.

A mi colega de la Unidad de Trastornos del Movimiento Begoña Ares por su buena amistad y por hacer del lugar de trabajo un entorno amable.

A mi maestro, amigo y director de tesis Alfonso Castro por enseñarme el oficio de neurólogo, por introducirme en los trastornos del movimiento y, sobre todo, por ser un espejo donde mirarme.

A Mayte, excelente neuróloga, con quien tengo la gran fortuna de compartir mi devenir vital. Su estímulo constante me obliga a superarme día a día en todos los ámbitos. Suya es gran parte de la responsabilidad de que este trabajo llegue finalmente a buen puerto. Y, por supuesto, a nuestro hijo Santiago, que ha colmado nuestras vidas de satisfacción.



Este trabajo se pudo llevar a cabo
por la financiación recibida
del Instituto de Salud Carlos III
(FIS PI050393)
y del Gobierno Autónomo Gallego
(Red REGENPSI Xunta de Galicia
2006/XA062).



El estilo del texto. ¿Ubicuitina o ubiquitina?

El texto se ha escrito siguiendo la normativa de la Real Academia Española (www.rae.es).

En el caso del plural de SNP, pese a que el uso parece haber generalizado el término SNPs, se ha preferido la recomendación de la RAE de no añadir la letra s.

Se han evitado en la medida de lo posible los anglicismos, según las indicaciones del *Diccionario crítico de dudas inglés-español de Medicina* (Navarro FA. Madrid 2001. McGraw Hill Interamericana). Sin embargo, en los casos de nombres de proteínas y genes solo se han utilizado los términos en español de los nombres más comunes como *parkina*, *ciclina*, *septina* o *culina*. Los nombres más complejos se han mantenido en inglés, p.ej. LAMP A2 (*lysosome associated membrane protein A2*).

Se ha preferido el término *ubicuitina* a *ubiquitina*. Se trata de una traducción del inglés *ubiquitin*, pronunciado /ju'biwitn/. Inicialmente la molécula se denominó *ubiquitous immunopoietic polypeptide* (Goldstein *et al*, 1975), haciendo referencia a su ubicuidad en la célula. La palabra en inglés *ubiquitous* (/ju'biwitəs/) y la palabra en español *ubicuo* derivan ambas del adverbio latino *ubique*, pronunciado /u'biwe/. La RAE admite tanto *ubicuidad* como *ubiquidad*. Principalmente por razones fonéticas, se ha elegido *ubicuitina*. En cuanto a las palabras derivadas se ha adaptado *ubucuitinación* y *ubicutinar* del inglés *ubiquitination* y *ubiquitinate*.

Para el plural de *locus* se ha empleado *locus*, en lugar del original en latín *loci*, siguiendo el ejemplo de *virus*. Ambos derivan de nombres en latín masculinos de la segunda declinación, *virus*, -i, y *locus*, -i. Los plurales terminados en -i no se dan en español.

Se ha evitado el anglicismo *splicing*. El verbo *splice*, probablemente derivado del holandés antiguo, se utilizó inicialmente para definir el acto de pegar manualmente los fragmentos de películas (cintas) de cine. Posteriormente se adoptó en genética para denominar el proceso de maduración del ARN, del que se eliminan los fragmentos de intrones transcritos. No hay un verbo alternativo en español. Navarro recomienda utilizar la locución *corte y empalme*, que es lo que se ha empleado en este trabajo.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ASN	sinucleína α o alfasinucleína
CMA	autofagia mediada por chaperonas (<i>chaperone mediated autophagy</i>)
DAT	transportador de dopamina (<i>dopamine transporter</i>)
DUB	enzima desubiquitinadora (<i>deubiquitinating enzyme</i>)
EP	enfermedad de Parkinson
FDR	proporción de falsos positivos (<i>false discovery rate</i>)
GWAS	estudio de asociación de todo el genoma (<i>genome-wide association study</i>)
HW	Hardy-Weinberg (equilibrio de)
kb	kilobase (1000 pares de bases)
LD	desequilibrio de la unión (<i>linkage disequilibrium</i>)
MAF	frecuencia de alelo menor (<i>minor allele frequency</i>)
Mb	megabase (1000 kb)
OR	cociente de probabilidades (<i>odds ratio</i>)
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
SNP	polimorfismo de un único nucleótido (<i>single nucleotied polymorphism</i>)
SYT	sinaptotagmina (familia de proteínas)
SYT11	sinaptotagmina XI (gen)
UPR	respuesta a proteínas mal plegadas (<i>unfolded protein response</i>)
UPS	sistema ubiquitina proteasoma (<i>ubiquitin proteasome system</i>)
UTM	Unidad de Trastornos del Movimiento

1 **I. Introducción. Justificación del estudio**

7 **II. Hipótesis**

9 **III. Objetivos del estudio**

11 **IV. Antecedentes y estado actual del tema. Revisión bibliográfica**

11 **i. La enfermedad de Parkinson: definición, diagnóstico e importancia epidemiológica**

13 **ii. Etiología de la enfermedad de Parkinson**

14 1. Factores ambientales relacionados con la enfermedad de Parkinson

16 2. Formas monogénicas de la enfermedad de Parkinson

17 2.1 Enfermedad de Parkinson de herencia autosómica dominante

17 2.1.1 PARK 1. Mutaciones del gen *SNCA*

21 2.1.2 PARK8. Mutaciones del gen *LRRK2*

23 2.1.3 tres síndromes parkinsonianos monogénicos con herencia autosómica dominante

25 2.2 Enfermedad de Parkinson de herencia autosómica recesiva

25 2.2.1 PARK2. Mutaciones del gen de la parkina

31 2.2.2 PARK6. Mutaciones del gen *PINK1*

32 2.2.3 PARK7

33 2.2.4 Otros síndromes parkinsonianos monogénicos con herencia autosómica recesiva.

34 3. Alteraciones genéticas que incrementan la susceptibilidad de padecer enfermedad de Parkinson

37	iii. Fisiopatología molecular de la enfermedad de Parkinson
37	1. El sistema ubiquitina proteasoma y el estrés del retículo endoplásmico.
37	1.1. El proceso de ubiquitinización proteica
41	1.2. El proteasoma
47	1.3. Estrés proteico y formación de agregomas
49	1.4. Agregación proteica, sistema ubiquitina proteasoma y enfermedad de Parkinson
53	2. La mitocondria y el estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson
55	3. La vía lisosomal y la enfermedad de Parkinson
57	iv. Los estudios de asociación en enfermedades complejas. Los polimorfismos genéticos
61	1. El problema de los estudios de asociación
61	1.1. La hipótesis enfermedad común variante común
63	1.2. La <i>maldición de la dimensión</i>
64	1.3. La subestructura poblacional
67	1.4. El parentesco oculto
67	2. Los bloques haplotípicos. El desequilibrio del ligamiento (LD)
69	3. Cálculo del desequilibrio de ligamiento
71	4. Características de la población de estudio. El equilibrio de Hardy Weinberg (EHW)
73	5. Estudios de asociación alélica. Modelos de herencia
75	6. El control de calidad de las muestras
76	7. Imputación de datos no obtenidos

77 V. Material y métodos

77 i. Selección de pacientes y controles

- 77 1. Población de estudio y característica de la muestra
- 78 2. Grupo de estudio. Criterios de inclusión
- 78 3. Grupo control. Criterios de inclusión
- 80 4. Reclutamiento y toma de muestras

83 ii. Análisis genético

- 83 1. Estudio de asociación
 - 83 1.1 Selección de genes candidatos
 - 86 1.2 Selección de SNP
 - 87 1.3 Extracción de ADN
 - 87 1.4 Métodos de genotipado
 - 88 1.4.1 Genotipado por SNPlex®
 - 89 1.4.2 Genotipado por *MassArray* (Sequenom®)
 - 90 1.5 Métodos y análisis estadísticos
 - 92 1.6 estudio de replicación
- 92 2. Estudio de factores monogénicos
 - 93 2.1 Análisis de mutaciones por secuenciación
 - 94 2.2 Análisis de dosis génica por MLPA®
 - 95 2.3 Caracterización clínica y genealógica de las familias con formas monogénicas

96 iii. Aspectos éticos

99 VI. Resultados

99 i. Construcción de una colección de casos y controles para investigación en EP

100 ii. Estudio de asociación

101 1. Genes que previamente habían demostrado asociación con EP

105 2. Genes que codifican las subunidades del proteasoma

106 3. Genes que codifican las subunidades de parkina, otras proteínas con función de ligasa de ubiquitina y proteínas relacionadas con el estrés proteico

109 iii. Caracterización de pacientes y familias con formas monogénicas de EP

109 1. Pacientes y familias con mutación en *LRRK2*

111 2. Pacientes y familias con mutación en *PARK2*

115 VII. Discusión

115 i. Colección casos y muestras para investigación en EP

117 ii. Estudio de asociación

119 1. Factores genéticos de susceptibilidad a EP previamente validados en diversas poblaciones: *MAPT* y *LRRK2*

121 2. Proteasoma y proteínas relacionadas

123 3. Región genómica entre *SYT11* y *RAB21*

133 4. Interpretación global del estudio de asociación

134 iii. Determinantes monogénicos de EP: *LRRK2* y *PARK2*

139 VIII. Conclusiones

141 IX. Perspectivas futuras

145 Anexo I

Comunicaciones y publicaciones derivadas de este trabajo

147 Anexo II

Criterios de Gelb, Oliver y Gilman para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson (Gelb *et al*, 1999)

151 Anexo III

Criterios de la UK Parkinson's Disease Brain Bank Society para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson (Hughes *et al*, 1992a)

153 Anexo IV

Consentimiento informado de pacientes

157 Anexo V

Consentimiento informado de los controles

159 Anexo VI

Método de selección de SNP aplicado en este estudio. Búsqueda de SNP para estudios de asociación.

169 Anexo VII

Características de los SNP analizados

181 Bibliografía

Estudio de asociación
de la enfermedad de Parkinson
con genes que codifican sustratos de la parkina
y las subunidades del proteasoma
en una muestra de población gallega

Ángel Sesar Ignacio





I. Introducción. Justificación del estudio

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno degenerativo de varias áreas neuronales que da lugar a síntomas motores (temblor, rigidez, bradicinesia, alteraciones del equilibrio...) y no motores (alteraciones autonómicas, psiquiátricas, digestivas, olfatorias).

La incidencia y la prevalencia de la EP varían según la población estudiada. Tomando como referencia estudios epidemiológicos realizados en otros lugares de España, en Galicia podría haber entre 4000 y 7000 afectados. El gasto sanitario ocasionado es elevado. Solo en medicación, sin incluir los tratamientos de infusión, el coste medio puede estar en torno a los 5000€ (Richy *et al*, 2013). En el caso de EP avanzada tratada con medicación en infusión (apomorfina o levodopa intraduodenal) el total anual es de entre 15 000 y 60 000€. El coste de la colocación del dispositivo de estimulación subtalámica en los casos de EP avanzada quirúrgica se estima en 30 000€. A ello hay que añadir las complicaciones derivadas de las limitaciones producidas por la EP (caídas, infecciones, accidentes...).

La causa de la EP se desconoce en la mayoría de los casos. En una minoría de pacientes, la enfermedad es monogénica. Estas variantes de EP son enfermedades genéticas mendelianas y se clasifican dentro de un grupo denominado con la abreviatura PARK, seguida de un número ordinal (PARK1 a PARK18, hasta la fecha). La utilidad de una nosología basada en el locus génico es objeto de debate, ya que no todas estas formas responden a los criterios diagnósticos de la EP clásica. La mayoría de los casos de EP, sin embargo, no tienen causa monogénica y se incluyen en las llamadas enfermedades complejas o comunes. Estas enfermedades ocurren por la acción conjunta de una serie de genes o variaciones genéticas que interactúan con factores ambientales.

En cualquier caso la división clásica entre gen y ambiente probablemente es cada vez más difusa. Hay que tener en cuenta que en las enfermedades mendelianas la penetrancia depende en ocasio-

nes del ambiente o de la interacción con otros genes. Sucede lo mismo con la distinción entre herencia mendeliana (enfermedades raras, genéticas) y multifactorial (enfermedades comunes, complejas). De esta manera las herramientas habituales para estudiar las primeras (ligamiento, análisis gen a gen) y las segundas (estudios de asociación) deben considerarse como un continuo.

El descubrimiento de las formas monogénicas de EP, además de confirmar la existencia de heterogeneidad genética en la EP, ha permitido profundizar en el conocimiento de la fisiopatología molecular de esta entidad. Así la alfa-sinucleína (ASN) mutada o en exceso, cuyo gen *SNCA* se altera en *PARK1*, da lugar a la formación de precipitados tóxicos para la neurona. La parkina, cuyo gen es *PARK2*, tiene función de ligasa de ubiquitina. Las mutaciones de *PARK2* son la causa de la EP homónima. La ubiquitina es necesaria para la degradación de proteínas mediante el proteasoma, un complejo de proteasas. La propia parkina interviene, junto con *PINK1* (proteína alterada en *PARK6*), en la mitofagia. Diversos trabajos basados tanto en cultivos celulares, modelos animales como en el estudio de los propios pacientes con EP han mostrado la alteración de diversas vías o estructuras en la EP. En la actualidad se han implicado de una u otra manera el estrés oxidativo, la función mitocondrial, el sistema ubiquitina proteasoma (UPS) y la vía lisosomal.

Los estudios de asociación son la herramienta clave para poder relacionar una enfermedad compleja, en este caso la EP, con genes de susceptibilidad. El conocimiento de los factores genéticos relacionados con una determinada enfermedad es importante para mejorar el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de dicha enfermedad. Los estudios de asociación se basan en el análisis de polimorfismos de los genes en cuestión, principalmente los SNP (polimorfismos de base única). Se compara si hay diferencias significativas en las frecuencias alélicas o genómicas de los SNP en casos (pacientes) y en controles (sujetos sanos). En general los estudios de asociación genética se han basado en la premisa enfermedad común – variante común (la variante genética que confiere susceptibilidad a cierta enfermedad común es la misma –una variante frecuente– en la mayor parte de los pacientes con dicha enfermedad). Los resultados obtenidos hasta la fecha, no obstante, parecen contradecir en muchos casos esta premisa, pues la frecuencia e intensidad de las asociaciones han sido menores de lo es-

perado. Sin embargo, entre las asociaciones genéticas significativas con la EP esporádica, confirmadas en múltiples poblaciones y estudios independientes, se encuentran genes causantes de enfermedades mendelianas como *SNCA*, *MAPT* o *GBA*. Esto incide en que la división entre enfermedades monogénicas y complejas probablemente no refleja una clara diferencia de mecanismos etiopatogénicos. Por esto, al abordar la investigación integral de series de casos con una enfermedad determinada puede ser necesario utilizar de forma combinada aproximaciones metodológicas diferentes: el análisis de mutaciones de elevada penetrancia (análisis monogénicos) y de variantes de susceptibilidad (estudios de asociación genética).

Es importante tener en cuenta que el que se asocie un SNP de un determinado gen a la EP no implica una relación causa-efecto, ya que dicho polimorfismo puede formar parte de un locus que se hereda en bloque con un gen que sí es la variante causal. De este modo el SNP sería solo un marcador. Hay dos tipos de estudios de asociación: los estudios de todo el genoma (GWAS) y los que analizan genes candidatos de una o varias vías fisiopatológicas relacionadas con la enfermedad. Los GWAS son habitualmente multicéntricos debido a que requieren muestras muy grandes e importantes recursos económicos. Estos estudios permiten identificar factores de susceptibilidad incluso con riesgo relativo asociado no muy alto, pero también presentan limitaciones como la heterogeneidad en la aplicación de criterios de inclusión (a veces valoraciones subjetivas dependientes del examinador o de los usos clínicos en el lugar de reclutamiento) o la estratificación (heterogeneidad) poblacional.

Este trabajo se diseñó como un estudio de asociación en población gallega de factores genéticos de susceptibilidad de EP. Además se llevó a cabo una búsqueda directa de mutaciones causales en los genes *PARK2*, *LRRK2* y *SNCA* en aquellos pacientes que cumplían ciertos criterios. En el momento de plantear el presente estudio no se disponía de los recursos (económicos, número de muestras, participación en un gran consorcio de EP) para abordar un GWAS, por lo que se optó por investigar la posible asociación con genes candidatos relacionados con vías implicadas en la patogenia molecular de la EP. Para esta aproximación había dos ventajas: 1) la población gallega, con inmigración y mestizaje mínimos

durante siglos y sin estratificación genética poblacional significativa para polimorfismos frecuentes, 2) la mayoría de los pacientes pertenecían al área sanitaria tratada por un solo centro (Complejo Hospitalario Universitario de Santiago) y se evaluaron por el mismo neurólogo. Buscar la mayor homogeneidad posible en la aplicación de los criterios de reclutamiento y protocolos de evaluación de los sujetos de estudio es especialmente crítico en la investigación de síndromes clínicos frecuentes como el síndrome parkinsoniano, ya que, además de la EP, existen otras causas de parkinsonismos.

El estudio de poblaciones muy concretas o con características clínicas muy determinadas tiene la desventaja, sin embargo, de que los resultados obtenidos podrían no ser generalizables a la mayoría de los pacientes con la misma enfermedad de otras poblaciones. Por ello, en una segunda fase, los polimorfismos con resultado positivo se analizaron en una muestra de replicación perteneciente a una población independiente, de origen muy diferente a la inicial de estudio. Se trataba de una población mestiza del área de Ciudad de México.

La parte clínica de este trabajo se realizó principalmente en la Unidad de Trastornos del Movimiento (UTM) del Hospital Clínico de Santiago. En la actualidad la UTM está formada por 3 neurólogos, uno de ellos el autor de este trabajo y otro uno de los directores. Es centro referencia nacional de cirugía de trastornos del movimiento y cuenta con una amplia casuística y experiencia en diagnóstico y tratamiento de EP. Esto ha permitido que los criterios de selección fuesen razonablemente homogéneos.

La parte de análisis genético y estadístico se llevó a cabo en colaboración con el Grupo de Medicina Genómica de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), sección Neurogenética, del que forma parte la otra directora de este trabajo. Se trata de un grupo de referencia nacional para el estudio del componente genético de las enfermedades neurológicas.

El número final de muestras incluidas en el análisis estadístico fue de 267 pacientes y 274 controles en la muestra inicial, y 260 pacientes y 273 controles en la muestra de replicación. La selección de genes candidatos se realizó centrándose en el sistema ubiquitina proteasoma. Así se incluyeron los genes que codifican cada una de las subunidades del proteasoma, junto con los genes que co-

difican la mayoría de los sustratos conocidos de parkina. Además, como control de calidad del estudio se incluyeron los genes *MAPT* y *SNCA*, cuya asociación con EP se había descrito ampliamente en la literatura. La selección de SNP y genotipado resultó menos compleja por la larga experiencia del Grupo de Medicina Genómica en este campo, tanto en la aplicación de criterios de selección como en el empleo de las grandes bases de datos de variantes genéticas disponibles en la red (*dbSNP*, *HapMap*, *FEES*, *1000Genomes* y otras). Además el nodo CeGen en Galicia tiene su sede en el Hospital Clínico de Santiago. En este nodo disponen de varias plataformas de análisis como *MassARRAY*[®] (*Sequenom*), *SNPlex*[®] (*Applied Biosystems*) y *GeneChip*[®] microarrays (*Affymetrix*), que permiten adoptar el protocolo más adecuado según el diseño del estudio.

Por último, cabe destacar que este proyecto de investigación se desarrolló al tiempo que nacía el grupo de Neurogenética del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS). El desarrollo de este trabajo contribuyó a fortalecer una estructura y dinámica de colaboración entre el servicio de Neurología y los investigadores básicos (genetistas, estadísticos), potenciando así la complementación en conocimientos, recursos, bases de datos compartidas entre los sectores clínico y básico, condiciones imprescindibles para continuar estudiando no sólo la EP sino en general las bases genéticas de enfermedades neurológicas en nuestro entorno. Esta interacción se ha materializado en los últimos años en la obtención de financiación en convocatorias públicas para proyectos coordinados entre la Fundación de Medicina Genómica y el Servicio de Neurología del CHUS, entre ellos los que sustentaron económicamente la presente tesis doctoral (FIS PI050393, Red REGENPSI Xunta de Galicia 2006/XA062)



II. Hipótesis

En la EP idiopática existen variantes o polimorfismos genéticos que influyen en el riesgo de desarrollar la enfermedad individualmente. Es posible identificar estos polimorfismos mediante el genotipado masivo de SNP con la tecnología disponible en la actualidad. El conocimiento de esos polimorfismos es relevante para mejorar la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la EP, así como para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y nuevas estrategias terapéuticas y de prevención.

Las colecciones de pacientes y controles bien caracterizados clínica y genéticamente, recogidas a través de estrecha colaboración entre investigadores médicos y básicos en zonas geográficas definidas, son herramientas fundamentales para la investigación de la enfermedad común. Estas colecciones proporcionan una aproximación complementaria a los grandes estudios internacionales de miles de casos y controles



III. Objetivos del estudio

El objetivo general de este estudio es contribuir al conocimiento de los factores genéticos de susceptibilidad a la EP idiopática que puedan servir para mejorar la comprensión de los mecanismos etiopatogénicos de la EP, proponer nuevas dianas terapéuticas o desarrollar pruebas diagnósticas de utilidad clínica.

Para ello nos hemos propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Construir una colección bien caracterizada de pacientes y controles, representativa de la población gallega, que sirva para dar continuidad a una línea estable de investigación en el futuro.
2. Validar en población gallega la asociación de factores de riesgo genético a EP descritos en otras poblaciones.
3. Averiguar si genes del sistema ubiquitina proteasoma y proteínas identificadas como sustratos de la parkina pueden estar involucrados en la susceptibilidad a la EP idiopática.
4. Conocer las formas monogénicas y sus características en los pacientes de la muestra que cumplieran ciertas condiciones.



IV. Antecedentes y estado actual del tema. Revisión bibliográfica

i. La enfermedad de Parkinson: definición, diagnóstico e importancia epidemiológica

La EP es un trastorno degenerativo que **clínicamente** se caracteriza por: 1) una combinación de bradicinesia con rigidez o temblor, 2) que se suele presentar de forma asimétrica, 3) muestra una notable respuesta al tratamiento con medicación dopaminérgica, y 4) la respuesta se mantiene durante algunos años (Fahn y Jankovic, 2007). **Histopatológicamente** muestra: 1) pérdida neuronal progresiva en la parte compacta de la sustancia negra (SNpc) y en otras áreas neuronales (bulbo olfatorio, *locus coeruleus*, núcleos del rafe, núcleo motor dorsal del vago, corteza cerebral, sistema nervioso autónomo), y 2) inclusiones intracitoplasmáticas eosinofílicas que desplazan el resto de los componentes celulares, denominadas cuerpos de Lewy (Jellinger, 2005).

Algunas de las formas monogénicas de la EP no se ajustan exactamente a la definición clásica. Por ejemplo, en la mayoría de los casos secundarios a mutación de gen *PARK2* y en algunos por mutación del gen *LRRK2* no se observan cuerpos de Lewy (Shulman *et al*, 2011). Las manifestaciones clínicas y la evolución en estos casos también pueden ser diferentes de la EP idiopática. El descubrimiento de estas formas monogénicas, junto con la variabilidad evolutiva que muestran los paciente con EP idiopática, ha llevado a pensar que lo que se llama EP sea en realidad un grupo de enfermedades con un mecanismo patogénico similar.

El diagnóstico de la EP se basa en los hallazgos clínicos. Aunque en la actualidad se siguen empleando los criterios de *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank* (Hughes *et al*, 1992a, Hughes *et al*, 1992b), especialmente en los ensayos clínicos, con el advenimiento de las formas monogénicas de la enfermedad han perdido cierta precisión. Para el diagnóstico de la EP, tal vez los criterios de Gelb (Gelb *et al*, 1999) sean más adecuados de acuerdo con el conocimiento actual de la enfermedad.

Por el momento no existe ningún marcador biológico con la especificidad y sensibilidad suficientes para realizar el diagnóstico con razonable seguridad. Desde hace algunos años se dispone del SPECT (*single photon emission computed scan*) con BCIT (2 β -carbometoxi-3 β -4-iodofenil tropano), que permite determinar si existe degeneración de la vía nigroestriada. Sin embargo, este fenómeno no es patognomónico de la EP puesto que sucede en otros parkinsonismos degenerativos. Además en numerosos estudios se ha descrito un grupo de pacientes, los llamados SWEDD (*subjects without evidence of dopaminergic degeneration*), que cumplen los criterios clínicos de la enfermedad pero muestran una SPECT normal (Sixel-Döring *et al*, 2011).

La precisión diagnóstica resulta más complicada en las primeras fases de la enfermedad, puesto que otros parkinsonismos degenerativos (atrofia multisistema, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad por cuerpos de Lewy) pueden cursar inicialmente con manifestaciones clínicas y respuesta al tratamiento similares a la EP. Al cabo de un tiempo estas enfermedades evolucionan de manera diferente a la EP. En unos pocos casos este período puede ser de varios años. El diagnóstico diferencial mejora con el seguimiento de los pacientes durante meses o años.

La EP es la segunda enfermedad neuronal degenerativa en importancia epidemiológica, tras la enfermedad de Alzheimer. La prevalencia de la enfermedad varía según las áreas estudiadas. En 2 revisiones exhaustivas de estudios epidemiológicos en diferentes poblaciones se obtuvo una prevalencia global de entre 18 y 418 (Zhang *et al*, 1993) y de entre 57 y 230 casos por 100 000 habitantes (Muangpaisan *et al*, 2011) respectivamente para todas las edades. La disparidad entre las cifras tal vez se deba a diferencias metodológicas. La prevalencia se asocia con la edad. Alrededor del 1 % de los mayores de 60 años padecen EP (Nussbaum *et al*, 2003). El porcentaje se incrementa al 5 % en los mayores de 85 (Fahn, 2003).

Los estudios sobre la incidencia también han dado cifras muy distintas, entre 7,9 y 19 nuevos casos anuales por 100 000 habitantes en la población general (Muangpaisan *et al*, 2011), con diferencias entre 0,8 en los menores de 29 años y 304,8 en los mayores de 65 (Bower *et al*, 1999). Algunos estudios sugieren que la incidencia es ligeramente superior en varones (de Lau y Breteler, 2006).

Los estudios realizados entre la población española de diferentes lugares han hallado prevalencias de entre 166 y 270 casos por 100 000 en la población general (Artacoz Sanz *et al*, 1995; Criado Álvarez *et al*, 1998; Martínez Suárez y Blázquez Menes, 2000). Esto significaría un número total de pacientes en España de entre 80 y 120 000. En Galicia existe un estudio de prevalencia de la enfermedad en la Isla de Arosa. Se trata de un estudio puerta a puerta realizado en sujetos mayores de 65 años (Seijo-Martínez *et al*, 2011). El resultado fue una prevalencia del 2% (prevalencia ajustada 1,7%), mayor que en otras zonas estudiadas. Si se extrapolan los datos anteriormente indicados de prevalencia en toda España, en Galicia habría entre 4000 y 7000 afectados.

ii. Etiología de la enfermedad de Parkinson

Clásicamente, las causas de las enfermedades se solían dividir en genéticas y ambientales. Ambos tipos se consideraban compartimientos estancos. Las enfermedades genéticas suelen dividirse entre enfermedades mendelianas y las comunes o complejas. Las enfermedades mendelianas suceden por una mutación en un gen. En las enfermedades complejas, la acción conjunta de una serie de genes, junto con interacciones ambientales, da lugar a una mayor susceptibilidad para padecer la enfermedad. En la actualidad, la EP esporádica se incluye, como la hipertensión arterial o la diabetes mellitus tipo II, dentro de las llamadas enfermedades complejas, cuyo origen se atribuye a la interacción entre factores ambientales y factores intrínsecos del individuo. Esta categoría no incluye las formas monogénicas de EP, que representan menos del 5% de todas las EP.

Los métodos empleados para investigar las causas de estas tres categorías de enfermedad de acuerdo con su patogenia son diferentes: estudios epidemiológicos en el caso de enfermedades ambientales, análisis de ligamiento en enfermedades monogénicas y estudios de asociación en las enfermedades complejas o comunes. Lo cierto es, sin embargo, que los límites entre estas tres categorías son cada vez más difusos.

La patogenia de la EP tan solo se conoce parcialmente. Se han descrito diferentes mecanismos implicados, como el estrés oxida-

tivo, la inflamación, la disfunción mitocondrial, las alteraciones del sistema ubiquitina proteasoma (UPS) en relación con el estrés proteico, y, en los últimos años, las alteraciones lisosomales (Przedborski, 2007). Se desconoce si todos ellos operan en todos los casos de EP. Si bien se han descrito relaciones de estos mecanismos entre sí, tampoco se sabe cuál es el que desencadena la enfermedad, o si son todos ellos consecuencia de un fenómeno desconocido que los precede.

1. FACTORES AMBIENTALES RELACIONADOS CON LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Los factores ambientales más estudiados en la EP son los tóxicos. Algunos estudios han relacionado la EP con la contaminación industrial, profesiones como la de soldador o minero, el agua de pozo o ciertos pesticidas. Hay más evidencia de la asociación inversa entre la enfermedad y el consumo de tabaco, café o té (Wildefeldt et al, 2011). Se conocen una serie de toxinas neurales que actúan sobre el sistema dopaminérgico.

La 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) se descubrió como componente de una droga de diseño. Su metabolito activo, el MPP⁺ destruye el sistema dopaminérgico nigroestriado, mediante daño selectivo mitocondrial. Provoca un parkinsonismo agudo, que responde a la levodopa, pero cuyo curso es muy diferente del crónico y progresivo de la EP (Langston et al, 1983, Ballard et al, 1985).

El herbicida paraquat tiene una estructura molecular semejante al MPP⁺. Interfiere en la cadena respiratoria, de modo que da lugar a un incremento del estrés oxidativo y de la muerte celular. Produce parkinsonismo en la rata (McCormack et al, 2003). Se ha sugerido una relación entre el uso de este herbicida y la incidencia de enfermedad de Parkinson en granjeros (Tanner et al, 2011).

La rotenona, utilizada como insecticida, provoca en ratas intoxicadas crónicamente la degeneración del sistema nigroestriado, con inclusiones parecidas a los cuerpos de Lewy. Actúa produciendo daño mitocondrial, mediante la unión al complejo I. Para conseguir este efecto, la administración ha de hacerse mediante infusión continua. No afecta al sistema nervioso por vía oral (Sherer et al,

2003). Pese a esto y a que se degrada fácilmente en el suelo, se ha mostrado que, como el paraquat, puede tener algún papel en la incidencia de EP en trabajadores del campo (Tanner *et al*, 2011).

La exposición continuada en el tiempo al manganeso puede constituir un factor de susceptibilidad para padecer EP esporádica (Luchini *et al*, 2007, Squitti *et al*, 2009). En los últimos años se ha relacionado el manganeso con la agregación de ASN (Cai *et al*, 2010).

El uso de estas sustancias es relativamente restringido por lo que solamente podrían, en al mejor de los casos, explicar una pequeña parte de los casos esporádicos de EP. Además puede haber diferencias interindividuales en sujetos expuestos a estos tóxicos. Se ha mostrado en una población expuesta a pesticida que los individuos con una actividad baja o nula de CYP2D6 (citocromo P450 2D6) tenían el doble de riesgo de padecer EP, mientras que sujetos no expuestos con este déficit presentaban el mismo riesgo que la población general (Elbaz *et al*, 2004).

Tabla 1. Genes alterados que dan lugar a las formas monogénicas PARK de EP o parkinsonismo que responde a medicación dopaminérgica (explicación a lo largo del texto)

PARK	Gen	Locus	Herencia	Inicio
PARK1	SNCA	4q22.1	Dominante	Temprano
PARK2	PARK2	6q25-q27	Recesiva	Juvenil/Temprano
PARK3	SPR	2p13	Dominante	Tardío
PARK5	UCHL1	4p14	Dominante	Tardío
PARK6	PINK1	1p35-p36	Recesiva	Temprano
PARK7	PARK7	1p36	Recesiva	Temprano
PARK8	LRRK2	12q12	Dominante	Tardío
PARK9	ATP13A2	1p36	Recesiva	Enfermedad Kufor Rakeb EP temprana
PARK10	USP24	1p32	Dominante	Tardío
PARK11	¿GiGYF2?	2q36-q37	Dominante	Tardío
PARK12	Desconocido	Xq21-q25	Recesiva	Tardío
PARK13	Omi/HTRA2	2p12	No determinada	Tardío
PARK14	PLA2G6	22q13.1	Recesiva	Distonía parkinsonismo juvenil con respuesta a levodopa
PARK15	FBX07	22q12.3	Recesiva	Síndrome piramidal de inicio temprano con parkinsonismo
PARK16	Desconocido	1q32	No determinada	No determinado
PARK17	VPS35	16q13	Dominante	Tardío
PARK18	EIF4G1	3q27	Dominante	Tardío

Otros genes relacionados con EP/parkinsonismo monogénico			
Gen	Locus	Herencia	Inicio
GBA	4q22.1	Aumenta susceptibilidad en heterocigosis	Temprano
ATXN2	12q24.1	Dominante	Tardío
ATXN3	14q21	Dominante	Tardío
DNAJC6	1p31.3	Recesiva	Juvenil
POLG1	15q26.1	Dominante	Tardío

2. FORMAS MONOGENICAS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Hasta finales de los años 90, la hipótesis ambiental era la más aceptada para explicar el origen de la EP. Aunque alrededor de un 15 % de los pacientes tenían antecedentes familiares, se interpretaba que compartían algún factor ambiental causante de la enfermedad. Esto cambió notablemente a partir de 1997, cuando se describió que una mutación de la proteína sinucleína α (ASN) causaba una forma de EP muy poco frecuente que se transmitía de forma autosómica dominante (Polymeropoulos *et al*, 1997).

En los años siguientes se fueron describiendo nuevas formas monogénicas de la enfermedad. En la actualidad estas formas mendelianas se incluyen dentro de las PARK, de las que hay 17 formas, numerados del 1 al 18. En ocasiones el nombre de la enfermedad genética coincide con el del gen, como en el caso de PARK2 o PARK7. PARK4 ha pasado a incluirse dentro de PARK1, ya que corresponde a una triplicación del gen *SNCA*, que codifica la ASN.

Probablemente la clasificación necesite algún tipo de revisión, pues el PARK9 o síndrome de Kufor-Rakeb no cumple los criterios de EP, si bien quizá tampoco PARK2 los cumpla, al menos de forma estricta, puesto que la histopatología no muestra cuerpos de Lewy. En los casos de PARK1, PARK2, PARK6, PARK7, PARK8, PARK9, PARK13, PARK14, PARK15, PARK17 y PARK18 se ha determinado cuál es el gen mutado (tabla 1). En los casos de PARK3, PARK 5, PARK10 y PARK11 la asociación con EP de los genes atribuidos no parece tan clara. En otros casos (PARK12 o PARK16) solo se conoce el locus.

Además de las formas PARK, mutaciones de otros genes (tabla 2) pueden dar lugar a cuadros similares, al menos clínicamente, a la EP.

Tabla 2. Otros genes que dan lugar a formas monogénicas de EP o parkinsonismo que responde a medicación dopaminérgica (explicación a lo largo del texto)

2.1 Enfermedad de Parkinson de herencia autosómica dominante

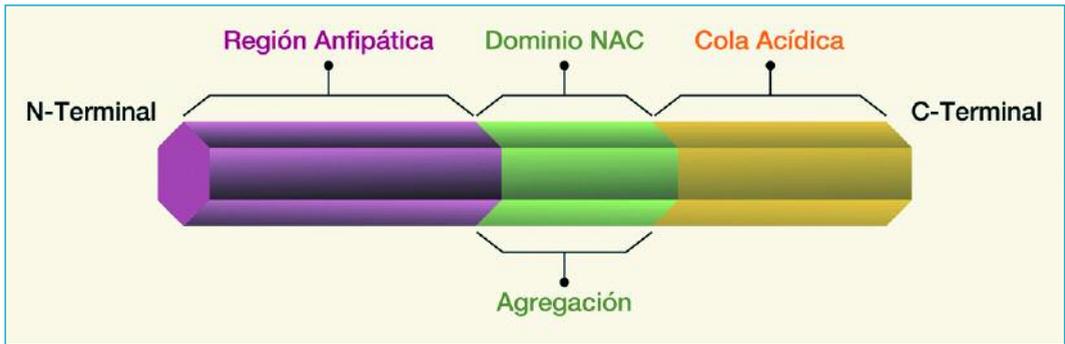
2.1.1 PARK1. Mutaciones del gen SNCA

La primera mutación patogénica de la EP fue la descrita en el gen *SNCA* (*Synuclein alpha*), situado en el locus 4q22.1 (4: 90645250 - 90759447). Codifica la proteína ASN. Este gen contiene 6 exones y ocupa 117 Kb. El exón 1 no se traduce. El gen contiene un promotor en la región 5' llamado REP1. La regulación de la síntesis de la ASN se lleva a cabo: 1) a través de este promotor, 2) mediante corte y empalme alternativo (*splicing*) y 3) mediante la acción de micro-ARN (revisado en Venda *et al*, 2010)

La alteración de este gen es una causa muy poco frecuente de EP. Se han descrito 4 mutaciones puntuales: A53T (Polymeropoulos *et al*, 1997), A30P (Krüger *et al*, 2001), E46K (Zarranz *et al*, 2004) y probablemente H50Q, hallada inicialmente en el cerebro de un paciente (Proukakis *et al*, 2013) y posteriormente en un paciente con EP familiar (Appel-Cresswell *et al*, 2013). El fenotipo de la enfermedad es similar a la esporádica si bien la edad de inicio es más temprana, alrededor de los 50, y el deterioro cognitivo ocurre con más frecuencia. De hecho, en el caso de la familia con la mutación E46K, coexisten individuos con fenotipo EP e individuos con fenotipo enfermedad con cuerpos de Lewy. La penetrancia de la mutación del gen *SNCA* es de alrededor del 85% (Nuytemans, 2010).

Además el gen *SNCA* puede producir EP familiar por duplicación (Ibáñez *et al*, 2004) o triplicación (Singleton *et al*, 2003). En el primer caso el fenotipo es similar a la EP idiopática, con un ligero adelanto en la edad de comienzo. Cuando hay triplicación la enfermedad comienza de forma temprana con trastorno autonómico y deterioro cognitivo precoz. Previamente las duplicaciones y triplicaciones se incluían en PARK4.

La ASN es una proteína de 140 aminoácidos perteneciente a la familia de las sinucleínas. Contiene un extremo N-terminal constituido por dos regiones helicoidales α interrumpidas, una región central hidrofóbica y una región C-terminal rica en prolina y en residuos acídicos de glutamato y aspartato. El extremo N-terminal tiene un motivo hexamérico anfipático, que sirve de unión a los lípidos de la membrana. Contiene varias repeticiones de 11 aminoáci-



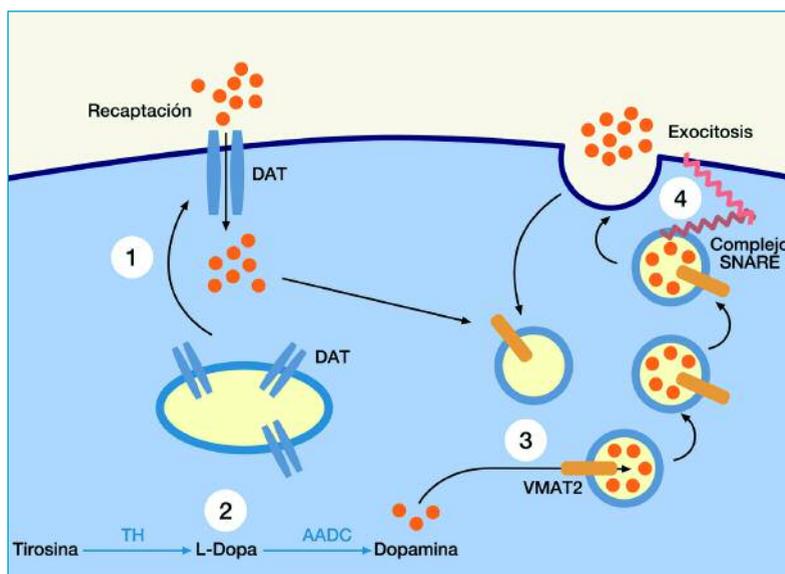
dos con el motivo KTKEGV. La región central se conoce como el componente no amilodeo β de la placa (NACP) y es la parte que tiende a agregarse (figura 1) (Dev *et al*, 2003). Las 4 mutaciones puntuales descritas se localizan en la región anfipática (Venda *et al*, 2010).

La ASN se expresa en neuronas corticales, neuronas dopaminérgicas, noradrenérgicas, células endoteliales y plaquetas. Se localiza en el citoplasma o unida a la membrana. Existe un equilibrio entre ambas formas (Farrer, 2006). En el citoplasma carece de estructura secundaria. La que se une a los lípidos de la membrana adopta una estructura helicoidal α (Olanow y McNaught, 2011). Se une de forma preferente a liposomas fosfolipídicos que contienen grupos acídicos (Davidson *et al*, 1998). Se colocaliza con las proteínas y los lípidos de las balsas lipídicas, estructuras clave en la formación de organelas membranosas (Fortin *et al*, 2004).

A la ASN se le atribuyen funciones de unión a ácidos grasos, regulación de enzimas, transportadores y neurotransmisores, así como un papel en la supervivencia neuronal (Dev *et al*, 2003). En cultivos celulares protege las gotas lipídicas de la hidrólisis (Cole *et al*, 2002). Se ha descrito que la ASN se une a la proteína SNARE (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein*). Esta molécula interviene en la fusión de las vesículas con la membrana plasmática (Burre *et al*, 2010, Chandra *et al*, 2005). Además ASN inhibe la hidroxilasa de tirosina (TH) (Pérez *et al*, 2002) y la descarboxilasa de aminoácido aromático (AADC) (Tehrani *et al*, 2006), enzimas clave en la síntesis de dopamina. En cultivos de neuronas mesencefálicas inhibe el transportador vesicular de monoaminas (VMAT2) (Lotharius *et al*, 2002). También se ha mostrado que en condiciones normales reduce la formación del transportador de

Figura 1. Estructura de la sinucleína alfa. Explicación en el texto

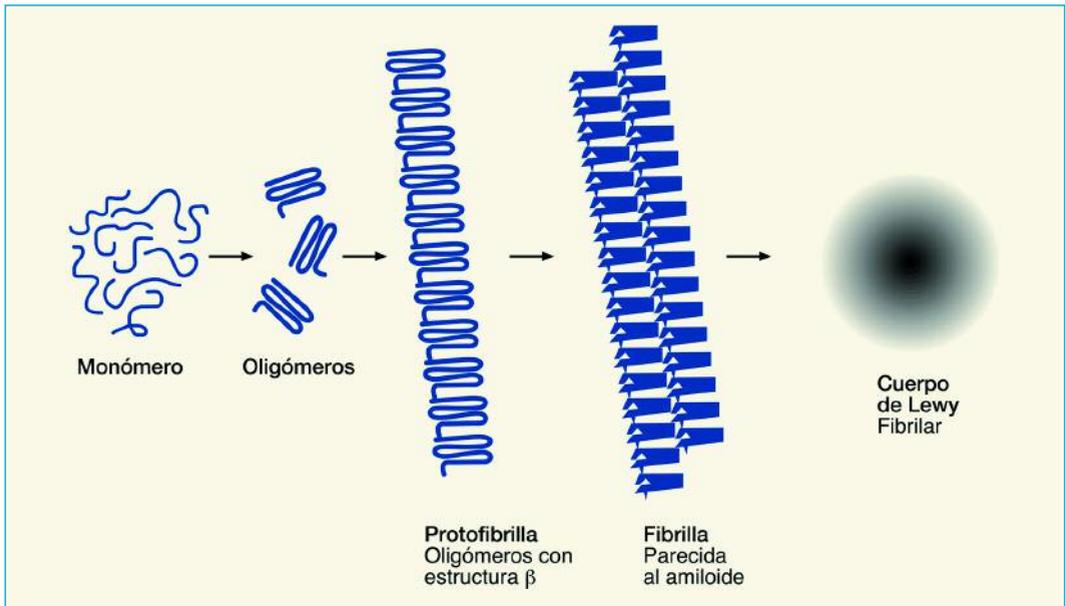
Figura 2. Algunas funciones atribuidas a la ASN: 1) reduce la formación de DAT, 2) inhibe la TH y la AADC, 3) inhibe VMAT2, 4) se une al complejo SNARE, que permite la fusión de la membrana de las vesículas con la membrana plasmática (modificado de Venda *et al*, 2013)



dopamina (DAT) (figura 2). La mutación A30P impide esta acción, con lo que se incrementa el DAT presináptico y aumenta la entrada de dopamina en la neurona (Sidhu *et al* 2004). La ASN libre inhibe la fosfolipasa 2 (Jenco *et al*, 1998, Payton *et al*, 2004), enzima que favorece la transmisión de señales, el tráfico de vesículas y la dinámica del citoesqueleto.

Las mutaciones que afectan al lugar de unión de la ASN con los lípidos o las que incrementan su cantidad aumentan el componente plasmático. El exceso de proteína citoplasmática hace que su conformación cambie a β . Esto favorece la formación de oligómeros, que resultan tóxicos, quizá por la formación de poros en la membrana celular, a la manera de bacterias. La sobreexpresión de la proteína normal condiciona su cambio conformacional a oligómeros y protofibrillas que muestran estructura β . Finalmente la ASN se asocia formando fibrillas parecidas al amiloide (Uversky, 2003). Las tres formas, oligómeros, protofibrillas y fibrillas son insolubles y tóxicas (Farrer, 2006). Los agregados de ASN, que forman parte de los cuerpos de Lewy, parece que actúan como mecanismo protector en el inicio del proceso patológico contra el efecto tóxico de estas formas de ASN (Olanow *et al*, 2004, Schulz *et al*, 2004) (figura 3).

Se desconoce por qué la agregación de la ASN es mayor en el cerebro. Algunos datos que podrían explicarlo son que en el cerebro



1) se expresa más, 2) hay una mayor concentración de macromoléculas, 3) el estrés oxidativo es mayor o 4) la dopamina estabiliza los oligómeros (Cookson, 2005)

La ASN también se agrega en la EP esporádica. No se conoce el mecanismo por el que la ASN normal se agrega. Algunos factores favorecen este proceso: 1) estrés oxidativo (Giasson *et al*, 2000), 2) interacción con tau (Giasson *et al*, 2003) o con amiloide β (Masliah *et al*, 2001), 3) cambios postraducción (Hasegawa *et al*, 2002), 4) inhibición del proteasoma (McNaught *et al* 2002a).

El papel patogénico de la ASN en la EP, tanto PARK1 como esporádica, solo se conoce parcialmente. Existen numerosos datos que establecen una relación entre ambos, aunque se ignora el mecanismo primario:

1. Las inclusiones de ASN y los cuerpos de Lewy se localizan en las regiones encefálicas funcionalmente dañadas en la EP y otras sinucleinopatías alfa (Braak *et al*, 1995).
2. Las formas tóxicas de ASN son las fibrillas, protofibrillas y oligómeros, que se han descrito en cerebros con EP (Farrer, 2006).
3. La expresión de ASN en las células facilita la muerte celular, favorece la disfunción mitocondrial y aumenta la susceptibi-

Figura 3. Formas que puede adoptar la ASN. En condiciones normales ocurre la forma monomérica. El resto de las formas aparecen en situaciones patológicas (modificado de Moore *et al*, 2005).

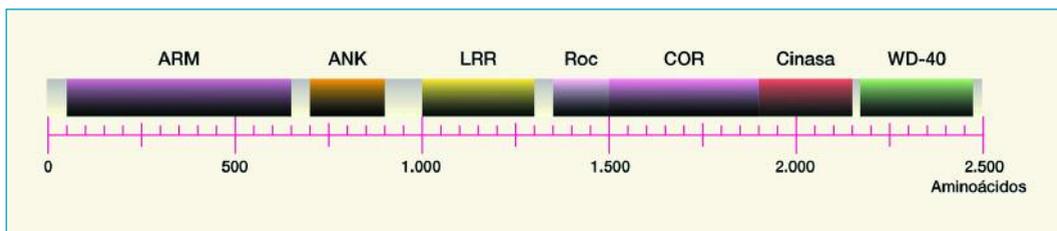
- lidad al estrés oxidativo o a la toxicidad in vitro mediada por MPTP (Lotharius y Brundin, 2002).
4. La ASN mutada o agregada se une al proteasoma y altera su función (Lindersson *et al*, 2004)
 5. La ASN mutada o agregada puede producir alteraciones de la autofagia mediada por lisosomas (Martínez-Vicente *et al*, 2004).
 6. Los agregados de ASN están presentes en las neuronas de modelos animales de EP con tóxicos (Kowall *et al*, 2000).
 7. Los agregados de ASN aparecen con la inhibición y desaparecen tras la restauración de la función de la mitocondria (Lee M *et al*, 2001).
 8. El incremento de ASN en ratones o moscas transgénicas da lugar a alteración y pérdida neuronal y a daño de organelas (Masliah *et al*, 2000, van der Putten *et al*, 2000).

Aunque la mutación del gen *SNCA*, que codifica la ASN, es muy poco frecuente como causa de EP, su descubrimiento ha permitido establecer la importancia de esta proteína en la patogenia de la EP esporádica

2.1.2 PARK8. Mutaciones del gen *LRRK2*

El gen *LRRK2* se sitúa en el locus 12p12 (12: 40618813 - 40763087). Codifica la proteína homónima, *leucine repeat rich kinase 2*, también llamada dardarina (Paisán Ruiz *et al*, 2004). Se trata de un gen de 144 Kb, que consta de 51 exones. La proteína posee 2517 aminoácidos (Zimprich *et al*, 2004). Contiene varios dominios funcionales importantes: ARM (*armadillo domain*), ANK (*ankyrin repeat domain*), LRR (*leucine repeat rich*), ROC (*Ras of complex proteins*), COR (*carboxy terminal of ROC*), cinasa o MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) y el dominio C-terminal WD40, rico en aspartato y triptófano (Gandhi PN *et al*, 2009, Cookson, 2010, Mills *et al*, 2012) (figura 4).

Las características clínicas de la EP PARK8 son similares a las de la EP clásica, con inicio tardío de los síntomas. Parece que el temblor es algo más frecuente que en la forma esporádica (Paisán Ruiz *et al*, 2004, Nuytemans *et al*, 2008). Al menos en el caso de la mutación p.G2019S, la gravedad de la enfermedad es menor, la pro-



gresión más lenta y la tendencia a desarrollar demencia es baja. La presencia de distonía ocurre, sin embargo, con mayor frecuencia. (Healy *et al*, 2008). La mutación del gen *LRRK2* se encuentra en el 3 % de los pacientes con EP familiar y en el 1 % de EP esporádica (Clark *et al*, 2006, Kay *et al*, 2006). La histopatología es variable. La mayoría de los pacientes muestran la clásica de pérdida neuronal con cuerpos de Lewy, pero hay casos con pérdida neuronal sin inclusiones o con inclusiones tau (Cookson, 2010).

El mecanismo de herencia de esta forma de EP es autosómico dominante. La penetrancia en la mayoría de los estudios es baja, del 35 % en algunas poblaciones (Clark *et al*, 2006). Otros estudios la elevan hasta el 85 % (Kachergus *et al*, 2005). Un fenómeno curioso de *PARK8* es que se han descrito pacientes homocigotos con un fenotipo similar a los heterocigotos, hecho poco frecuente en genética. En estos casos la penetrancia es mayor, aunque también se han descrito casos asintomáticos de edad avanzada (Ishihara *et al*, 2006). Se han comunicado casos de octogenarios portadores de la mutación que estaban asintomáticos (Kay *et al*, 2005, Carmine Berlin *et al*, 2006).

No se conoce con exactitud cuál es la función de la *LRRK2*. Es probable que se trate de una proteína parecida a la cinasa de tirosina (Mata *et al*, 2006). Este efecto cinasa se ejercería mediante el dominio MAPKKK (Ito *et al*, 2007, Cookson, 2010). El dominio ROC tiene actividad GTPasa y también puede unirse a la parkina (Smith *et al*, 2005). Los dominios LRR y WD40 intervienen en la interacción con otras proteínas. El dominio COR es necesario para la dimerización de la proteína (Gandhi PN *et al*, 2009). Otras funciones que se le atribuyen a *LRRK2* son modulación de la autofagia, tráfico de vesículas, regulación de la inflamación y modulación de la función mitocondrial (Rideout y Stefanis, 2014)

La *LRRK2* se localiza en la membrana plasmática, vesículas sinápticas, aparato de Golgi, microtúbulos, lisosoma, citoplasma y en

Figura 4. Estructura de la proteína *LRRK2*. Explicación en el texto

la membrana externa de la mitocondria (Biskup *et al*, 2006). En el sistema nervioso central se halla en el sistema nigroestriado, en mayor cantidad en los ganglios de la base que en la sustancia negra. También forma parte de los cuerpos de Lewy en cerebros de pacientes con EP esporádica (Higashi *et al*, 2007).

Se han descrito 127 mutaciones sin sentido o de cambio de sentido. 6 de ellas se han relacionado inequívocamente con la patogénesis de la enfermedad mediante análisis de segregación. p.R1441C, p.R1441G y p.R1441H se localizan en el dominio ROC (exón 31), Y1699C en el dominio COR (exón 35), y, por último p.G2019S y p.L2020T se ubican en el dominio cinasa (MAPKKK) (exón 41). Las mutaciones descritas fuera de los lugares enzimáticos no parecen transmitirse de forma mendeliana (Cookson, 2010). Globalmente, la mutación más frecuente es p.G2019S, que muestra una penetrancia variable. En los análisis de dosis génica (Gasser *et al*, 2011) no se han detectado mutaciones por deleciones, ni por duplicaciones de material genético. Se ha sugerido que las mutaciones p.G2019S y p.L2020T pueden aumentar la actividad cinasa de la proteína. Se desconocen las implicaciones de este hecho, si se confirma (West *et al*, 2007). Algunas de las mutaciones de cambio de sentido también se han hallado en sujetos control. Su significado es incierto (Cruts *et al*, 2012, Nuytemans *et al*, 2010).

2.1.3 Otros síndromes parkinsonianos monogénicos con herencia autosómica dominante

PARK 5 se ha asociado a la alteración del gen *UCHL1*, localizado en 4p14 (4: 41258898 - 41270446), de 9 exones y 9 kb. Codifica la proteína homónima, *ubiquitin c terminal hydrolase L1*, de 230 aminoácidos. Es un enzima desubcuitinador, que reduce las cadenas de poliubiquitina en monómeros u oligómeros (Liu *et al*, 2002). Se ha descrito una única mutación, I93M, transmitida de forma dominante en dos hermanos alemanes. El cuadro era superponible a la EP clásica, con edad de comienzo algo temprana (49 y 51 años). La histopatología en uno de los casos mostró cuerpos de Lewy (Leroy *et al*, 1998). No se han encontrado más familias afectadas por el momento. Dado que al menos otro de los miembros de la familia afectada era portador de la mutación y no había desarrollado EP, se cuestiona el papel patogénico de esta mutación.

PARK11 se había identificado con el gen *GIGYF2* (*GRB10 interacting GYF protein 2*), localizado en 2q37.1 (2: 233562015 - 233725287) (Lautier et al, 2008). El gen codifica la proteína homónima que se une al receptor Grb10 (*growth factor receptor-bound protein 10*), de modo que modula la actividad de la insulina y del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF1) (Giovannone et al, 2003). Estudios de asociación posteriores han cuestionado la relación de PARK11 con el gen *GIGYF2* (Nichols et al, 2009, Tan et al, 2009).

PARK13 ocurre por alteración del gen *HTRA2* (*high temperature requirement A2*), localizado en 2p12 (2: 74756532 - 74760683), de 8 exones y 3,8 kb. Codifica la proteína *HTRA serine peptidase 2*. La mutación de este gen da lugar a una forma de EP similar a la clásica, aparentemente esporádica. Previamente se había relacionado el locus PARK13 con una forma de EP autosómica dominante (Strauss et al, 2005). La proteína HTRA2 localizada en el espacio intermembranoso de la mitocondria se libera al citosol y promueve la apoptosis (Hegde et al, 2002).

PARK3 se ha relacionado con el gen *SPR* (*sepiapterin reductase*), localizado en 2p13.2 (2: 73114512 - 73119289), que codifica la reductasa de sepiapterina. Esta enzima interviene en la síntesis de tetrahydrobioptina (BH4), cofactor de la hidroxilasa de tirosina (TH) (Sharma et al, 2006).

PARK10 se ha asociado al gen *USP24* (*ubiquitin specific peptidase 24*), localizado en 1p32.3 (1: 55532032 - 55681039), que codifica la peptidasa específica de ubiquitina 24. Esta molécula actúa como una enzima desubcuitinadora (Haugarvoll et al, 2009).

PARK17 se ha asociado al gen *VPS35* (*Vacuolar protein sorting 35, yeast, homolog of*) localizado en 16q11.2 (16:46,693,588 - 46,723,143). Codifica una proteína homóloga relacionada con el transporte de endosomas. Causa EP de herencia autosómica dominante de inicio tardío (Zimpritch et al, 2011).

PARK18 se ha asociado al gen *EIF4G1* (*Eukaryotic translation initiation factor 4-gamma*), localizado en 3q26-q28 (3: 184032283 - 184053146), descrito en familias con EP familiar de herencia auto-

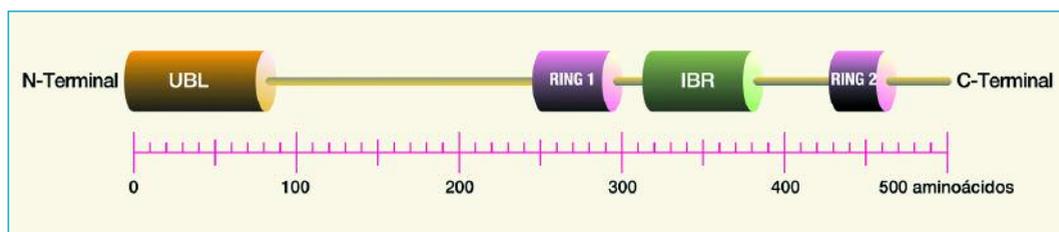


Figura 5. Estructura de la parkina. Explicación en el texto

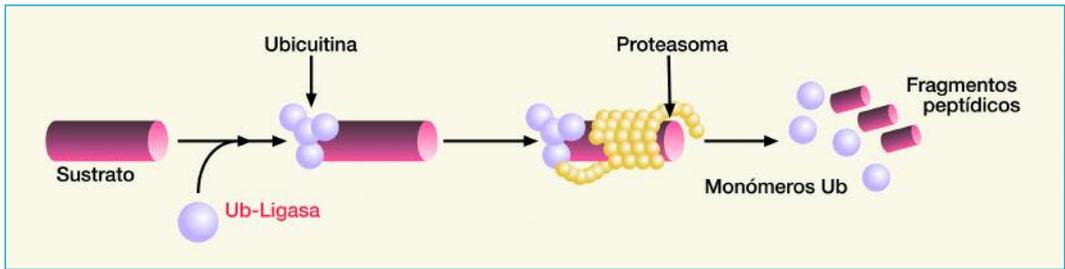
sómica dominante. El gen codifica una proteína homónima que ejerce de factor de iniciación para la traducción de diversos genes relacionados con la mitocondria, la supervivencia y el crecimiento celular. La clínica es similar a la EP esporádica, con progresión más lenta y funciones cognitivas conservadas (Chartier Harlin *et al*, 2012).

Las mutaciones de los genes *ATXN2* (ataxina 2, 12q24.1, 12: 111890018 - 112037480) y *ATXN3* (ataxina 3, 14q21, 14: 92524896 - 92572965), causantes de las atrofias espinocerebelosas SCA2 y SCA3 pueden dar lugar a un síndrome parkinsoniano clínicamente idéntico al de la EP esporádica (Socal *et al*, 2009, Bettencourt *et al*, 2011).

2.2 Enfermedad de Parkinson de herencia autosómica recesiva

2.2.1 *PARK2*. Mutaciones del gen de la parkina

El gen *PARK2* se ubica en el locus 6q25.2-27 (6: 161768590 - 163148834) (Matsumine *et al*, 1997). Consta de 12 exones separados por grandes regiones intrónicas. En total el gen contiene 1,53 Mb. Codifica la parkina, una proteína de 465 aminoácidos (52 Kd) muy conservada en las especies (Equipoda *et al*, 1998). Consta de un dominio UBL (*ubiquitin like*) en el fragmento N-terminal y 2 dominios dedo RING (*Really interesting new gene*), que flanquean un dominio IBR (*in between ring*), en el extremo C-terminal (Beasley *et al*, 2007) (figura 5). Parece que UBL es importante en el reconocimiento de sustratos. Los dominios dedo RING se unen al cinc y con mucha frecuencia se relacionan con las rutas de ubiquitinación (Joazeiro y Weissman, 2000). El promotor de este gen también regula el gen inmediatamente anterior, llamado *PACRG* (*PARK2 co-regulated*), cuya función es desconocida (West *et al*, 2003).



La enfermedad se transmite de forma autosómica recesiva, con una penetrancia próxima al 100 % (Klein *et al*, 2007). El 50 % de la EP juvenil y el 10 % de EP de comienzo tardío con historia familiar presentan mutaciones en parkina (Lücking *et al*, 2000). También se han descrito en casos sin historia familiar (Lücking *et al*, 2000). Algunas familias con parkina mutada no responden al modelo de herencia recesiva, lo que sugiere un mecanismo de haploinsuficiencia (Farrer *et al*, 2001). Las mutaciones pueden afectar a cualquier tramo del gen, y sus consecuencias son similares, lo que significa que toda la proteína es necesaria para cumplir su función. Se han descrito múltiples mutaciones del gen *PARK2*: eliminaciones parciales de uno o varios exones, desplazamiento del marco de lectura, mutaciones puntuales tanto de parada como de cambio de sentido, duplicaciones o triplicaciones de exones. (Bekris *et al*, 2010).

La clínica de la enfermedad puede ser similar a la EP clásica, sobre todo si el comienzo es después de los 40. No obstante un número importante de pacientes presenta algunas características particulares: distonía del pie, hiperreflexia en las extremidades inferiores, fluctuaciones diurnas y mejoría con el sueño, muy buena respuesta a la levodopa mantenida durante el tiempo, discinesias precoces y progresión lenta. Se han hallado mutaciones con fenotipos de parálisis supranuclear progresiva, EP con temblor esencial o síndrome de piernas inquietas (Nuytemans *et al*, 2010)

La histopatología de la EP por mutación de *PARK2* también difiere de la EP clásica. En general no se producen cuerpos de Lewy. La pérdida neuronal ocurre exclusivamente en la parte compacta de la sustancia negra (SNpc) y en el *locus coeruleus* (Mori *et al*, 1998). Se ha descrito una mutación con cuerpos de Lewy, en la que la parkina tiene una actividad parcial (Farrer *et al*, 2001). No hay parkina en los cuerpos de Lewy (Pawlyk *et al*, 2003).

Figura 6. La parkina actúa como ubiquitina ligasa, permitiendo la unión de ubiquitina al sustrato proteico. La ubiquitina ejerce el papel de marcador para que el sustrato entre en el proteasoma. La ubiquitina se monomeriza antes de entrar en el proteasoma

La parkina se localiza predominantemente en el citoplasma, pero también se ubica en las vesículas sinápticas, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y la membrana externa de la mitocondria (Bekris *et al*, 2010). Se le atribuye función de ligasa de ubiquitina (Imai *et al*, 2000, Shimura *et al*, 2000, Zhang *et al*, 2000) (figura 6). La ubiquitina es una proteína que actúa como marcador de otras proteínas a las que se une. Las ligasas de ubiquitina (E3) son un grupo de unas 75 enzimas que catalizan el último paso de la unión de la ubiquitina a la proteína diana. La función de la ubiquitinación es múltiple. La más frecuente y conocida tiene que ver con la degradación proteica. Las proteínas ubiquitinadas de este modo entran en el proteasoma, donde se reducen a pequeños péptidos (Glickman y Ciechanover, 2002).

Cada una de las ligasas de ubiquitina actúa sobre un número de proteínas que le sirven de sustrato. La parkina se ha relacionado con varias proteínas a las que presumiblemente ayudaría a ubiquitinar. Se ha pensado que la acumulación de estos sustratos en la neurona podría dar lugar o contribuir su muerte, si bien por el momento esto no se ha podido confirmar. La parkina interacciona con las enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) UbcH7 y UbcH8, y también con las E2 asociadas al retículo endoplásmico UBC6 y UBC7 (Imai *et al*, 2001). Las E2 intervienen en el paso previo a la ubiquitinación. Además de las E2, hay un número sorprendentemente alto de proteínas que se han relacionado con la parkina. Sería de esperar que una ligasa de ubiquitina interaccionase con unas pocas proteínas, por lo que es probable que algunas de estas moléculas no sean verdaderos sustratos o que la parkina tenga alguna otra función como se describe más adelante. Las proteínas que se han asociado a la parkina son (tabla 3):

- 1. Sinfilina 1:** se desconoce su función. Interactúa con la ASN (Engelender *et al*, 1999) y forma parte de los cuerpos de Lewy (Wakabayashi *et al*, 2000). Se ha encontrado en *SNCAIP*, el gen que codifica esta proteína, una mutación de cambio de sentido en 2 pacientes con EP esporádica (Marx *et al*, 2003). La parkina ubiquitina la sinfilina 1, cuando se sobreexpresa con ASN (Chung *et al*, 2001). La sinfilina 1 también interacciona con la subunidad PSMC4 (S6ATPasa) del proteasoma (Marx *et al*, 2007), estructura muy relacionada con la patogenia de la EP (ver más adelante).

Posibles sustratos de la parkina	
Proteína	Función
Sinfilina 1	Desconocida
CDCrel-1	Ciclo celular
GPR37	Señalización celular
α Sp22	ASN glicosilada
Sinaptotagmina 11	Inhibición de la exocitosis
AIMP2	Traducción proteica
Ciclina E	Ciclo celular
Septina 5	Ciclo celular
FUPB1	Desarrollo de oligodendrocitos
PARIS	Represor de PGC-1 α

Tabla 3. Posibles sustratos de la parkina

2. CDCrel-1 (*cell division control related protein 1*): pertenece a una familia de GTPasas llamada septinas, que intervienen en el ciclo celular. Se expresa principalmente en el sistema nervioso, donde se asocia a las vesículas sinápticas (Zhang *et al*, 2000, Dent *et al*, 2002). Se han hallado acúmulos de esta proteína en cerebros de pacientes con EP por mutación de *PARK2* (Choi *et al*, 2003). En ratones transgénicos en los que la proteína se sobreexpresa se ha observado degeneración neuronal (Dong *et al*, 2003). Se ha mostrado en modelos de *Drosophila* que la sobreexpresión de la septina 4, proteína homóloga de la humana CDCrel-1, resulta tóxica para las neuronas dopaminérgicas (Muñoz Soriano y Paricio, 2007).

3. GPR37 (*Probable G-protein coupled receptor 37*): también llamada Pael-R (*Parkin-associated endothelin receptor-like receptor*). Actúa en la señalización celular. Se expresa sobre todo en los oligodendrocitos, pero también en neuronas de la parte compacta de la sustancia negra (SNpc) y neuronas catecolaminérgicas. En cultivos tiende a agregarse y provocar la muerte celular. En estas condiciones, parece que parkina actúa a través del retículo endoplásmico inhibiendo este fenómeno. Es probable que GPR37 regule la cantidad de dopamina en las neuronas de la sustancia negra. Un aumento de su expresión da lugar a toxicidad neuronal mediada por dopamina. Se ha hallado GPR37 en el cerebro de pacientes con mu-

taciones de *PARK2* (Imai *et al*, 2001). Su sobreexpresión en modelos murinos da lugar a muerte neuronal por estrés del retículo endoplásmico y toxicidad dopaminérgica. Este fenómeno es mayor si no se expresa parkina (Equipao *et al*, 2007). En el modelo *Drosophila* produce degeneración de neuronas dopaminérgicas (Yang *et al*, 2003). Se ha detectado en los cuerpos de Lewy, pero no en las inclusiones oligodendrogiales de la atrofia multisistema (Murakami *et al*, 2004).

4. **α Sp22**: ASN glicosilada. Interacciona con la parkina y se ha encontrado en cerebros de pacientes con mutaciones de *PARK2* (Shimura *et al*, 2001).
5. **Sinaptotagmina XI**: Se ha relacionado con la inhibición de la exocitosis (Wang *et al*, 2009). Su expresión disminuye con parkina. Forma parte de los cuerpos de Lewy (Huynh *et al*, 2003).
6. **AIMP2** (*aminoacyl-tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein 2*): También conocida como p38. Forma parte de un complejo clave para la traducción proteica. Su sobreexpresión da lugar a muerte celular o formación de agregomas (Corti *et al*, 2003). Se ha descrito en los cuerpos de Lewy. Se incrementa en ratones defectivos para parkina y en cerebros de sujetos con mutación en el gen *PARK2*. Ejerce su papel tóxico activando la PARP1 (*Poly ADP-ribose polymerase 1*), una proteína inductora de la apoptosis (Lee *et al*, 2013).
7. **Ciclina E**: modula el ciclo celular, mediante la regulación de las cinasas dependientes de ciclina (CDK). Forma parte del complejo parkina-hSel-10-Cullin-1. Se ha encontrado en cerebros de pacientes con EP (Staropoli *et al*, 2003).
8. **SEPT5 v2/CDCrel2**: pertenece al grupo de las septinas, de estructura muy similar a CDCrel-1 (Choi *et al*, 2003).
9. **FUPB1** (*far upstream element (FUSE)-binding protein 1*): se ha relacionado con el desarrollo de los oligodendrocitos (Betegowda *et al*, 2011). Se acumula en ratones defectivos para parkina (Ko *et al*, 2006)

10. PARIS (*parkin interacting substrate*): en modelos de ratones defectivos para parkina se ha mostrado acumulación en el cerebro de esta proteína. En condiciones normales se ubiquitina y degradada mediante parkina. Si esto no ocurre, se produce degeneración neuronal. PARIS se une a PGC-1 α (*proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) coactivator 1 α*), que impide su transcripción y favorece la pérdida neuronal (Shin *et al*, 2011).

Además de la función de ubiquitinación, formando cadenas de ubiquitina que se unen en el residuo Lys48 para la degradación del sustrato por el proteasoma, la parkina tiene capacidad de ligar ubiquitina en otras posiciones. Se ha mostrado que interviene en la monoubiquitinación múltiple (Hampe *et al*, 2006), así como en la poliubiquitinación en Lys63 (Doss-Pepe *et al*, 2005). La poliubiquitinación en Lys63 de sinfilina 1 (Lim *et al*, 2005) o de DJ1 (Olzmann *et al*, 2007) mal plegada podría contribuir a su estabilización y a su inclusión en los cuerpos de Lewy.

La parkina interacciona con las tubulinas α y β . Los heterodímeros formados por estas dos proteínas forman los microtúbulos (Heald y Nogales, 2002). Con el exceso de parkina se vuelven inestables (Ren *et al*, 2003). La parkina se une fuertemente a la tubulina y a los microtúbulos, donde se ha propuesto que realiza funciones de estabilización ante tóxicos como el MPP+ y la rotenona, de ubiquitinación de proteínas transmembrana como el transportador de dopamina (DAT) y de fijación citoplásmica de factores de transcripción que regulan proteínas como la monoaminoxidasa (MAO) (Di Napoli M *et al*, 2007)

En los últimos años se ha descrito que la acción conjunta de PINK1 y de parkina interviene en la mitofagia. La mitofagia consiste en la autofagia de las mitocondrias dañadas. Una de las primeras señales que indican un mal funcionamiento de la neurona es la pérdida del potencial de membrana (Kim *et al*, 2007). En cultivos de células HeLa (Narendra *et al*, 2008) y en la *Drosophila* (Ziviani *et al*, 2010), a los que se ha alterado químicamente el potencial de membrana, se ha mostrado un transporte masivo de parkina desde el citoplasma a la mitocondria, donde mediante el sistema ubiquitina proteasoma degrada numerosas proteínas de la membrana externa mitocondrial. Para que ocurra este desplazamiento de parkina es necesaria

Tabla 4. Funciones celulares de la parkina

Función celular de la parkina
Actividad de ligasa de ubiquitina
Ubiquitinación Lys48 para degradación mediante UPS
Ubiquitinación Lys63
Monoubiquitinación múltiple
Estabilización de los microtúbulos
Degradación de mitocondrias dañadas mediante autofagosomas (junto con PINK1)
Represión de p53 (proteína proapoptótica)
Potenciación de la actividad del proteasoma

la presencia de PINK1, que también se acumula en la membrana despolarizada (Narendra *et al*, 2010). Posteriormente la mitocondria dañada mediante el transporte microtubular alcanza la región perinuclear, rica en lisosomas, donde se degrada mediante autofagia (Vives-Bauza *et al*, 2010, Vives Bauza y Przedborski, 2011).

Otra función que se ha asignado a la parkina es la de represión de la expresión del gen de la proteína proapoptótica p53, mediante la unión directa en el núcleo al promotor de esta proteína (da Costa *et al*, 2009).

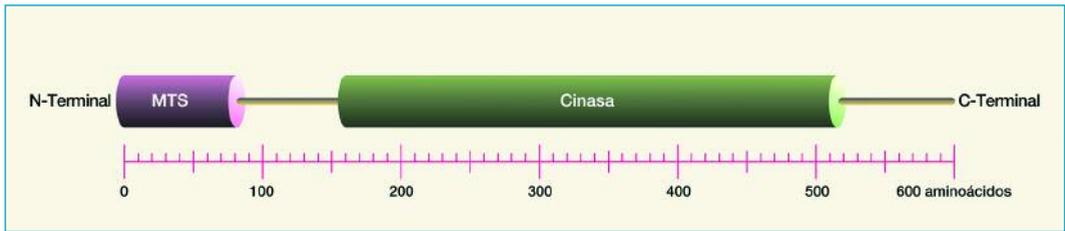
Se ha mostrado que la parkina interacciona con subunidades del proteasoma como PSMD4 (Rpn10), PSMC5 (Rpt6) y PSMA7 (α 4). La sobreexpresión de parkina potencia la actividad del proteasoma (Um *et al*, 2010).

Las principales funciones de la parkina se resumen en la tabla 4.

No se sabe de qué manera la parkina protege la neurona dopaminérgica, aunque hay algunos indicios 1) inhibe la hiperexcitabilidad provocada por el kainato en cultivos celulares, probablemente por aceleración del metabolismo de la ciclina E (Staropoli *et al*, 2003), 2) degrada la GPR37 y la AIMP2 en casos de exceso de estas proteínas (Corti *et al*, 2003; Imai *et al*, 2001), 3) se une a la tubulina y a los microtúbulos estabilizándolos (di Napoli M *et al*, 2007), 4) su aumento en cultivos produce resistencia a estímulos que activan la apoptosis (Darios *et al*, 2003).

2.2.2 PARK6. Mutaciones del gen *PINK1*

El gen *PINK1* se encuentra en el locus 1p35-p36 (1: 20959948 - 20978004). Codifica la proteína homónima, llamada *phosphatase*



and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase. Contiene 8 exones, con una extensión de 1,8 Kb. La proteína, de 581 aminoácidos, posee un dominio de unión a la mitocondria (MTS en el extremo N-terminal y un dominio serina / treonina, con actividad cinasa en el extremo C-terminal (Valente *et al*, 2001) (figura 7). Se localiza en la matriz mitocondrial y en el espacio intermembranas (Valente *et al*, 2004, Silvestri *et al*, 2005).

Figura 7. Estructura de la proteína PINK2

La mutación de este gen da lugar a una forma de EP que se hereda de forma autosómica recesiva, con penetrancia casi completa. Las características clínicas son similares al PARK2, si bien se han descrito casos aislados con demencia. Suponen entre el 1 y el 3 % de las formas de EP de inicio temprano de ascendencia europea (Valente *et al*, 2001, Valente *et al*, 2004, Bonifati *et al*, 2005).

PINK1 se localiza en la mitocondria. Se trata de una proteína que interviene en la respuesta de la mitocondria al estrés celular y oxidativo, de modo que ejerce un efecto protector mediante la fosforilación de ciertas proteínas mitocondriales (Valente *et al*, 2004). Se ha propuesto su intervención en el tráfico mitocondrial (Weihsfen *et al*, 2009), el estrés oxidativo, la eficacia de la respiración mitocondrial (Liu *et al*, 2009) y su permeabilidad (Gandhi S *et al*, 2009). Ya se ha señalado que junto con la parkina, PINK1 interviene en la mitofagia. Además PINK1 regula la actividad ligasa de ubiquitina de la parkina mediante su fosforilación (Sha *et al*, 2010).

Se han descrito 28 mutaciones patogénicas de forma concluyente, de cambio de sentido, sin sentido y de cambio de lectura de marco (Cruts *et al*, 2012, Nuytemans *et al*, 2010)

2.2.3 PARK7

El gen *PARK7* (*parkinson protein 7*) se encuentra en el locus 1p36.23 (1: 8021714 - 8045342). Consta de 7 exones, que ocupan

0,949 Kb. Codifica la proteína DJ1, de 189 aminoácidos (Bonifati *et al*, 2003). La mutación de *PARK7* causa una variedad de la EP, que se hereda de forma autosómica recesiva, de inicio antes de los 40 años. Pueda además cursar con síntomas psiquiátricos o demencia (Abou-Sleiman *et al*, 2004)

DJ1 es una proteína predominantemente citoplasmática, también se localiza en la mitocondria (Zhang L *et al*, 2005). Parece que actúa como antioxidante, mediante la formación de puentes disulfuro en el residuo de cisteína de la posición 106 (Canet Avilés *et al*, 2004). Se piensa que inhibe la agregación de ASN (Canet Avilés *et al*, 2004) y que representa un papel neutralizador de radicales libres (Taira *et al*, 2004). También se le ha atribuido función de ligasa de ubiquitina en un complejo formado con parkina y PINK1 (Xiong *et al*, 2009). La proteína se expresa en todo el organismo. En el sistema nervioso se localiza en las neuronas y en las células de la glía (Bandopadhyay *et al*, 2004).

En la actualidad se han descrito 6 mutaciones de cambio de sentido, una por delección y otra por duplicación parcial (Cruts *et al*, 2012, Nuytemans *et al*, 2010).

2.2.4 Otros síndromes parkinsonianos monogénicos herencia autosómica recesiva.

PARK9 se produce por una alteración del gen *ATP13A2*, localizado en 1p36 (1: 17312453 - 17338467). Este gen codifica la proteína homónima, una ATPasa tipo P que se ubica en la membrana lisosomal. Se le ha atribuido un papel protector contra los metales pesados mediante transporte lisosomal (Gitler *et al* 2009, Schmidt *et al*, 2009). La mutación de este gen en ambos alelos da lugar al síndrome de Kufor Rakeb, una forma muy infrecuente de parkinsonismo que comienza en la segunda década y se asocia a demencia, piramidalismo y parálisis supranuclear de la mirada. La respuesta a la levodopa es buena. (Williams *et al*, 2005).

PARK14 ocurre por la mutación del gen *PLA2G6* (*phospholipase A2 group VI*), que codifica una fosfolipasa A2 independiente de calcio. Se localiza en 22q13.1 (22: 38507502 - 38577857). La mutación de este gen da lugar a un síndrome de parkinsoniano de inicio temprano, progresión rápida, con distonía y demencia (Yoshino *et al*, 2010).

PARK15 ocurre por la mutación del gen *FBX07*, que codifica la proteína homónima *F-box only protein 7*, en el locus 22q12.3 (22: 32870707 - 32894818). Da lugar al llamado síndrome piramidal parkinsoniano, con parkinsonismo que responde a la levodopa, espasticidad, distonía e hiperreflexia. Las funciones cognitivas son normales (Zhao *et al*, 2011).

PARK12 es la única forma de EP hereditaria que está ligada al cromosoma X. Se conoce el locus, Xq21-q25 (Pankratz *et al*, 2003).

En una familia con parkinsonismo juvenil se ha identificado una mutación en homocigosis en el gen *DNAJC6* (*DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6*), localizado en 1p31.3 (1: 65720133 - 65881552) que codifica la chaperona auxilina, perteneciente a la familia HSP40 y cuya función es facilitar la actividad ATPasa (Edwardson *et al*, 2012)

3. ALTERACIONES GENÉTICAS QUE INCREMENTAN LA SUSCEPTIBILIDAD DE PADECER ENFERMEDAD DE PARKINSON

En la actualidad, tanto los estudios de genes candidatos como los análisis de asociación de todo el genoma (GWAS), basados en la búsqueda de polimorfismos espaciados a lo largo de todos los cromosomas sin hipótesis previas, han permitido confirmar el efecto de algunos genes en la susceptibilidad de padecer EP (tabla 5). Se han encontrado asociaciones que implican un aumento de susceptibilidad para los portadores, y otras de protección. Los cuatro genes que han mostrado una mayor consistencia en su relación con la EP son *GBA*, *SNCA*, *LRRK2* y *MAPT*.

Los familiares de pacientes con enfermedad de Gaucher tienen mayor riesgo de padecer enfermedad de Parkinson. La enfermedad de Gaucher se engloba dentro de las llamadas enfermedades de depósito lisosomal. Se hereda de forma autosómica recesiva. Se produce por mutaciones del gen *GBA* (1q21, 1: 155204239 - 155214653), que codifica la glucocerebrosidasa. Esta enzima de 497 aminoácidos metaboliza la glucosilceramida, un lípido que forma parte de la membrana plasmática. La enfermedad afecta a las vísceras y al sistema nervioso central (Neumann *et al*, 2009).

Alteraciones genéticas que incrementan la susceptibilidad de padecer EP

Gen /Locus	Forma de asociación con EP
GBA	Incrementa en 5-7 veces el riesgo de EP en heterocigotos
SNCA	Polimorfismo en el promotor (REP1-o, D4S3481), polimorfismo 3' UTR rs356219
LRRK2	Polimorfismos p.R1628P, p.G2385R, p.A419V (población asiática); p.M1646T
MAPT	Haplotipo H1

Tabla 5. Alteraciones genéticas que incrementan la susceptibilidad de padecer EP

Diversos estudios han mostrado que la prevalencia de mutaciones de *GBA* en heterocigosis es significativamente mayor en pacientes con EP que en controles. En el caso de ascendencia judía la diferencia es aun mayor. Se estima que los sujetos que presentan un alelo mutado del gen *GBA* tienen un riesgo de padecer EP entre 5 y 7 veces mayor que la población general (Neumann *et al*, 2009, Sidransky *et al*, 2009).

Las manifestaciones clínicas de la EP en pacientes con mutaciones en *GBA* son similares a la forma idiopática, si bien la edad de inicio es más temprana y la incidencia de demencia mayor (Goker-Alpan *et al*, 2008). La histopatología muestra cuerpos de Lewy que, en esta forma, son muy frecuentes en la región CA₂ del hipocampo (Hruska *et al*, 2006).

La prevalencia de mutaciones en el gen *GBA* en pacientes con EP es similar a la del gen *LRRK2* (3,6 % en población europea) (Neumann *et al*, 2009, Sidransky *et al*, 2009). Se desconoce el mecanismo por el que la mutación aumenta la susceptibilidad de padecer EP. Se ha sugerido interferencia con la ASN, de modo que favorecería la formación de fibrillas tóxicas, la inhibición del proteasoma y la inhibición del receptor lisosómico LAMP2 (Hruska *et al*, 2006).

En el caso de *SNCA*, además de las mutaciones descritas anteriormente, que se transmiten de forma autosómica dominante, se han descrito polimorfismos en regiones no codificantes, que incrementan la susceptibilidad para padecer EP (Lill *et al*, 2012). Uno de los polimorfismos más estudiado en población caucásica es un dinucleótido de repetición (REP1, D4S3481) alojado en el promotor del gen *SNCA*, que favorece la sobreexpresión de ASN (Maragano-re *et al*, 2006, Kay *et al*, 2008). Otra asociación descrita con frecuencia en caucásicos corresponde a un polimorfismo de la región

no traducida 3' (3'UTR), rs356219, (Mueller *et al*, 2005, Mata *et al*, 2010, Nalls *et al*, 2011). Probablemente induce a la sobreexpresión de ASN (Sotiriou *et al*, 2009). Este polimorfismo se ha relacionado con un comienzo más temprano de la EP (Brockmann *et al*, 2013).

Algunos polimorfismos del gen *LRRK2* también han mostrado un aumento de susceptibilidad para padecer EP. Los que están mejor caracterizados son p.R1628P y p.G2385R en población asiática (Ross *et al*, 2008, Di Fonzo *et al*, 2006). Un estudio posterior halló asociación con el polimorfismo p.G2385R y con los polimorfismos p.A419V y p.M1646T en población asiática. No se observó asociación con p.R1628P (Ross *et al*, 2011).

El gen *MAPT* (*microtubule-associated protein tau*), localizado en 17q21.31 (17: 43971702 - 44105700) codifica la proteína tau, que desempeña un papel determinante en la estabilización celular mediante su unión a los microtúbulos (Abel *et al*, 1993). Se trata de una proteína con 6 isoformas, de 352 a 441 aminoácidos (Goedert *et al*, 1999). Debido a una inversión cromosómica ancestral, este gen se encuentra en un bloque en completo LD y presenta 2 haplotipos H1 y H2, que no muestran ningún dato de recombinación entre sí (Donnelly *et al*, 2010). Las alteraciones de esta proteína se relacionan con diferentes enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal. En todas ellas hay inclusiones tau en la histopatología (Ballatore *et al*, 2007). En la enfermedad de Parkinson se han llevado a cabo múltiples estudios de asociación con variantes genéticas en el bloque de LD del cromosoma 17 que, además del gen *MAPT*, incluye el gen adyacente *CRHR1* (codificante para el receptor de la hormona liberadora de corticotropina). En todos ellos se ha visto que el haplotipo H1 aumenta la predisposición a padecer EP (Nalls *et al*, 2011).

iii. Fisiopatología molecular de la enfermedad de Parkinson

1. EL SISTEMA UBIQUITINA PROTEASOMA Y EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO.

1.1 El proceso de ubiquitinación proteica

Las proteínas son un componente básico de las células. Forman parte de la estructura celular y en este caso permanecen sin cambios durante un tiempo largo. Otras poseen un papel regulador, por lo que su presencia es necesaria solamente durante un tiempo muy corto. Una vez cumplida su función se degradan. Por otro lado algunas proteínas se sintetizan de forma defectuosa o sufren alteraciones por el concurso de factores externos. Por todo ello, es necesario un sistema de reciclaje proteico extremadamente preciso y específico que debe realizar las siguientes funciones (Baumeister *et al*, 1998):

1. mantenimiento de la estructura celular, sobre todo durante su crecimiento y respuesta a estímulos externos.
2. eliminación de proteínas sintetizadas de forma defectuosa
3. eliminación de las proteínas mutadas o alteradas por la oxidación o el calor.
4. eliminación de proteínas reguladoras cuando ya no son necesarias, como las ciclinas, los factores de transcripción o los componentes de las vías de señalización
5. capacidad para degradación y presentación antigénica

Uno de los principales mecanismos de degradación de proteínas es el sistema ubiquitina proteasoma (UPS). Desempeña esta función mediante proteasas contenidas en una estructura denominada proteasoma (ver más adelante). Los sustratos proteicos se unen previamente a una cadena de poliubiquitina, que actúa como marcador de degradación. UPS no funciona únicamente como *basurero celular* (Hershko *et al*, 2000) sino que también interviene en funciones clave como el crecimiento y la diferenciación celular, la regulación de la transcripción y la replicación del ADN, el ciclo celular, la reparación del ADN, la embriogénesis, la señalización del transporte celular, la apoptosis, la endocitosis, la respuesta al estrés celu-

lar, el transporte transmembrana o la presentación del antígeno (Di Napoli y Wójcik, 2007).

La producción de proteínas por minuto varía según la célula. En las células HeLa esta cifra es de 5×10^5 . La tercera parte de este número lo constituyen proteínas defectuosas (llamadas DRiP, por *defective ribosomal products*), que se degradan inmediatamente. Además UPS actúa sobre las proteínas estructurales deterioradas y las proteínas reguladoras de vida corta (Di Napoli y Wójcik, 2007).

Las proteínas mal sintetizadas o defectuosas constituyen una importante amenaza para la viabilidad de la célula. El sistema UPS no es el único encargado de la degradación de estas proteínas. También intervienen las chaperonas y la autofagia (ver más adelante)

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos, con una masa molecular de 8,5 Kd. El gen que codifica la proteína precursora de la ubiquitina, llamado *UBC (ubiquitin C)*, se localiza en 12q24.3 (12:125396192 - 125399587). El precursor se transforma en ubiquitina mediante la acción de las enzimas desubiquitinadoras (DUB) (Kimura y Tanaka, 2010). La ubiquitina se encuentra en todas las células eucariotas, pero no en las procariotas (Hegde, 2004). Es muy abundante en la célula donde supone del 0,1 al 5 % de todas las proteínas (Kimura y Tanaka, 2010).

Una proteína que se va a degradar mediante UPS (sustrato) se une de forma covalente a la ubiquitina. La unión se hace entre un grupo ϵ amino de un residuo de lisina del sustrato a la glicina (Gly76) del extremo C-terminal de la ubiquitina. A continuación, el resto de lisina Lys48 de la primera molécula de ubiquitina se une a Gly76 del extremo C-terminal de la siguiente molécula de ubiquitina. La acción se repite hasta formar una cadena de ubiquitina, generalmente de 4 moléculas. Si la ubiquitinación es monomérica o la cadena se forma mediante un resto de lisina que ocupe otra posición (6, 11, 27, 29, 33, 48 y 63), el sustrato no se degrada (Pickart, 2000). La unión a estos restos de lisina diferentes de Lys48 da lugar a otras funciones (figura 8):

1. La unión de uno o varios monómeros (en múltiples restos de lisina) de ubiquitina (monoubiquitinación) señala un cambio conformacional en la proteína. Esta modificación proteica interviene en al menos tres procesos celulares diferentes: la regulación de las histonas (la ubiquitinación puede ser nece-

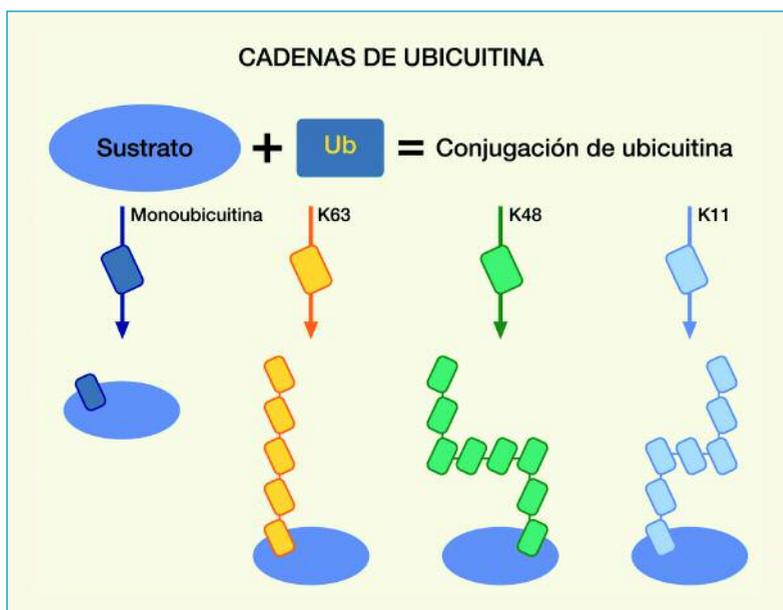


Figura 8. Diferentes modalidades de ubiquitinación proteica: 1) monoubicuitinación (regulación de histonas, endocitosis modificación de proteína Gag viral, 2) ubiquitinación en lys63 (endocitosis y reparación de ADN), 3) ubiquitinación en lys48 (sistema UPS); 4) ubiquitinación en lys11 (posible función de señal).

saría para la meiosis), la endocitosis y en los brotes de virus en células infectadas modificando la proteína Gag (Hicke, 2001).

2. Las cadenas de ubiquitina unidas mediante el resto de lisina en posición 63 se relacionan con funciones como la endocitosis o la reparación de ADN (Matiuhin y Glickman, 2007).
3. Las proteínas marcadas con ubiquitina mediante el resto de lisina 11 entran en el proteasoma y no se degradan. Es probable que la cadena de ubiquitina sirva en este caso como señal de algún tipo (Alberti *et al*, 2002).

La formación del complejo ubiquitina-sustrato está regulada por los enzimas E1, E2 y E3 (figura 9).

E1 (activadora de ubiquitina) está codificada por un solo gen, que produce dos isoformas, por traducción alternativa de los sitios de iniciación. La proteína pesa unos 105 Kd y reconoce la glicina (Gly76) del extremo C-terminal de ubiquitina. La reacción está mediada por ATP, que se hidroliza en AMP y da lugar a un éster tiol de ubiquitina (ubiquitina activada) (Hershko y Ciechanover, 1998). E1 tiene una señal de localización nuclear. Se encuentra en el núcleo y en otros compartimentos celulares, además del citoplasma (Handley *et al*, 1991).

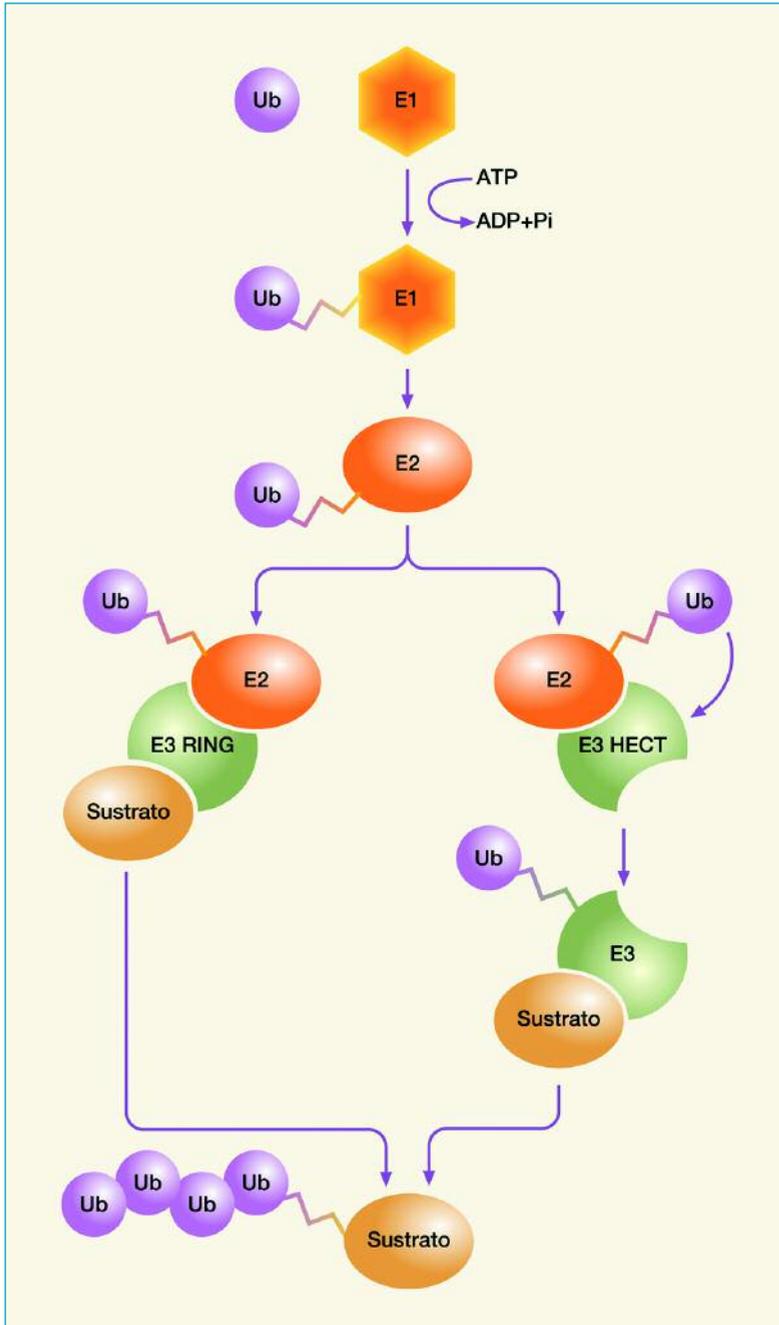


Figura 9. Proceso de ubiquitinización proteica, con las funciones de los enzimas E1, E2 y E3. Explicación en el texto (modificado de Woelk et al, 2007)

E2, enzimas conjugadoras o transportadoras de ubiquitina, transfieren la ubiquitina activada, mediante otro enlace de éster tior, de E1 a E3, aunque en algún caso transfieren la ubiquitina directamen-

te al sustrato (Glickman y Ciechanover, 2002). Habitualmente están en el citoplasma (Weissman, 2001).

La E3, o ligasa de ubiquitina, une la ubiquitina activada al sustrato. Si se precisa una cadena de poliubiquitina, sucesivos monómeros se van uniendo al resto de lisina correspondiente del monómero anterior, siguiendo la ruta enzimática descrita (Glickman y Ciechanover, 2002). En algunos casos la proteína que cataliza la unión de varias cadenas de ubiquitina es diferente a la E3. Este grupo de proteínas se denominan E4 (Koezl *et al*, 1999). La ubiquitina se libera antes de entrar en el proteasoma y se monomeriza mediante las DUB (Glickman y Ciechanover, 2002).

E3 pueden ser proteínas únicas o complejos proteicos. Las primeras, a su vez, se dividen en HECT (homologous to the E6AP carboxyl terminus) y RING (really interesting new gene). Pueden transportar la cadena de ubiquitina al sustrato o unirse a ambos y facilitar la unión (Glickman y Ciechanover, 2002)

Dentro de los complejos E3, uno de los mejor caracterizados es el grupo SCF (SKP1-culina-proteína FBox), que ubiquitina I κ B α (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*), I κ B β , ciclina E, p27 y otras proteínas que intervienen en la regulación del ciclo celular (Nakayama y Nakayama, 2005). Esta proteína se ha mostrado que disminuye en la parte compacta de la sustancia negra (SNpc) de los pacientes con EP (Grünblatt *et al*, 2004). Este fenómeno podría explicar la susceptibilidad de la SNpc a diferentes tipos de estrés como el metabolismo del hierro, el metabolismo de la dopamina, la acumulación de proteínas, la inhibición del proteasoma (Grünblatt *et al*, 2004). Se ha diseñado un modelo murino de EP mediante el silenciamiento del gen SKP1A (Fishman-Jacob *et al*, 2009)

Existen unas 25-30 E2 y unas 1000 E3. La combinación de ambas enzimas puede ser específicas para cada uno de los genes del genoma (Hegde *et al*, 2004).

1.2 El proteasoma

El proteasoma es un conjunto de complejos proteolíticos multiméricos celulares. En la célula puede existir en forma de 20S y de 26S. El 20S es la parte catalítica del complejo (Hegde y Upadhy, 2011). Se une a diferentes reguladores. El más importante es el 19S o P700,

Nomenclatura en mamíferos de las subunidades del proteasoma 20S			
Subunidad	Mamíferos	Subunidad	Mamíferos
α_1	PSMA6	β_1	PSMB6
α_2	PSMA2	β_2	PSMB7
α_3	PSMA4	β_3	PSMB3
α_4	PSMA7	β_4	PSMB2
α_5	PSMA5	β_5	PSMB4
α_6	PSMA1	β_6	PSMB1
α_7	PSMA3	β_7	PSMB4

con el que forma el proteasoma 26S (figura 10). Otros complejos reguladores son el PA28 α / β (o 11S), PA28 γ o PA200 (Cook y Petruccioli, 2009). Además de la función catalítica, tanto los proteasomas 20S (Petit *et al* 1997) como los 26S tienen actividad ARNasa (Kulichkova *et al*, 2010), que se regula específicamente durante la diferenciación celular y la apoptosis (Konstantinova *et al*, 2008).

El proteasoma constituye el 1 % del total de las proteínas de la célula. Su concentración varía según la actividad metabólica proteica de la célula. Se localizan en el citoplasma y en el núcleo fundamentalmente, aunque en menor medida también en el citoesqueleto y en el retículo endoplásmico (Coux *et al*, 1996).

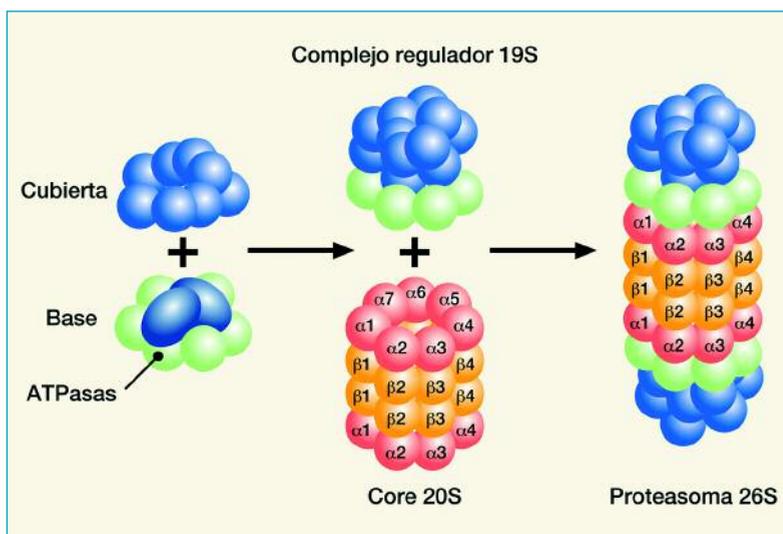
El proteasoma 20S es una estructura proteica que tiene forma de barril de 14,8 nm de longitud y 1,3 nm de diámetro (Amici y Eleuteri, 2007). Está constituido por 28 subunidades α y β dispuestas en 4 anillos de 7 unidades cada uno ordenados como α - β - β - α . En las células eucariotas cada una de las 7 unidades α o β es diferente y está codificada por un gen específico. Las subunidades α se numeran de α_1 a α_7 . Las subunidades β también se numeran de β_1 a β_7 . En los mamíferos el proteasoma por acción del interferón γ se transforma en inmunoproteasoma, que interviene en el procesamiento del antígeno. En estos casos las subunidades β_1 , β_2 y β_5 se ven reemplazadas por β_{1i} , β_{2i} y β_{5i} . Las subunidades α también se denominan PSMA (*proteasome subunit alpha-type*), seguidas del correspondiente número del 1 al 7, que no coincide con el de α . Las subunidades β también se denominan PSMB (*proteasome subunit beta type*) (tabla 6). Los genes que codifican estas proteínas tienen su mismo nombre (Sorokin *et al*, 2009).

La estructura de 4 anillos del proteasoma 20S permite la formación de 3 cámaras: 2 antecámaras que limitan una cámara central

Tabla 6.

Nomenclatura en mamíferos de las subunidades del proteasoma

Figura 10. Estructura del proteasoma de 26S, formado por el complejo core de 20S, con 2 anillos internos β y 2 externos α , y el complejo regulador 19S, a su vez compuesto de base y cubierta



formada por los 2 anillos β , donde se localiza la parte catalítica de la estructura (Coux *et al.*, 1996). Los extremos del proteasoma, constituidos por los anillos α , forman un canal central muy estrecho y limitado por las terminaciones N de las 7 subunidades α (Groll *et al.*, 2000).

La parte catalítica del proteasoma es una proteasa de treonina, situada en el extremo N-terminal de la subunidad β (Löwe *et al.*, 1995). El antibiótico lactacistina inhibe el proteasoma uniéndose a la treonina del N terminal β (Imajoh-Ohmi *et al.*, 1995).

En el proteasoma 20S se han descrito tres clases de actividades: 1) actividad parecida a la quimotripsina (ChT-L), que lisa los residuos hidrofóbicos, 2) actividad parecida a la tripsina (T-L), que lisa los residuos básicos, y 3) actividad hidrolizadora de los péptidos peptidilglutamina (PGPH) o actividad parecida a la caspasa, que lisa los residuos acídicos. Estas actividades se han atribuido respectivamente a $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ (Amici y Eleuteri, 2007). En el proteasoma de los mamíferos se han descrito 2 actividades adicionales, preferentemente sobre aminoácidos ramificados (BrAAP) y sobre pequeños aminoácidos neutros (SNAAP) (Orlowski *et al.*, 1993). La parte catalítica rompe las proteínas en péptidos de 3 a 32 aminoácidos (Kisselev *et al.*, 1998).

Las poblaciones de 20S existen de forma independiente del proteasoma 26S. Se localizan en el citoplasma y en el núcleo. Degradan algunas proteínas (de vida corta, mutadas, defectuosas)

independientemente de la ubiquitina y del ATP (Sorokin *et al*, 2009). En el núcleo el proteasoma 20S regula el catabolismo de las histonas (Ullrich y Grune, 2001).

19S es el principal complejo regulador. Se une al proteasoma 20S, formando el proteasoma 26S, del que existen 2 isoformas, RP1CP y RP2CP, según 19S se una a uno o a ambos extremos del proteasoma 20S (Brooks *et al*, 2000). El complejo 19S es clave para el reconocimiento selectivo del sustrato unido a la ubiquitina y su posterior transporte al proteasoma 20S (Wójcik y de Martino, 2007).

La estructura de 19S contiene unas 17 subunidades, que se agrupan en dos divisiones llamadas base y cubierta. La base consta 6 unidades ATPasa (pertenecientes a las AAA, ATPasas asociadas con actividades celulares diversas), denominadas Rpt (*regulatory particle tripleA-ATPase*), numeradas del 1 al 6. En los mamíferos, estas subunidades se nombran como PSMC (*proteasome 26S subunit ATPase*). Se numeran del 1 al 6, pero estos números no coinciden con los asignados a Rpt (Sorokin *et al*, 2009). Las 6 subunidades PSMC se colocan en forma de anillo alrededor de las subunidades no ATPásicas Rpn (*regulatory particle non-ATPase*) 1 y 2 (Da Fonseca y Morris, 2008, Rosenzweig *et al*, 2008), denominadas en los mamíferos PSMD (*proteasome 26S subunit non-ATPase*) 2 y 1 (en este caso tampoco coinciden los números) (ver figura 10). Rpn10 (PSMD4) ejerce de intermediario entre la base y la cubierta (Riedinger *et al*, 2004). Estas tres unidades no ATPásicas (PSMD) de la base contienen los dominios KEKE (Realini *et al*, 1994) y LRR (Lupas *et al*, 1999), que están implicados en la unión proteína-proteína.

La cubierta está formada por otras 8 unidades, todas ellas no ATPásicas: PSMD3 (Rpn), PSMD12 (Rpn5), PSMD11 (Rpn6), PSMD6 (Rpn7), PSMD7 (Rpn8), PSMD13 (Rpn9), PSMD14 (Rpn11) y PSMD8 (Rpn12). Otras subunidades, como PSMD10, PSMD11 o SHFM1 se pueden unir al proteasoma en determinadas circunstancias (Sorokin *et al*, 2009) (tabla 7). Las subunidades de la cubierta comparten una secuencia de unos 200 aminoácidos llamada dominio PCI (*proteasome, COP9, initiation factor 3*) (Hofmann y Bucher, 1998). Además tienen un dominio, de 120 aminoácidos, llamado MPN (*Mpr1p/Pad1p N-terminus*), importante para la función de PSMD7 y PSMD14 (Glickman y Ciechanover, 2002).

Nomenclatura en levaduras y en mamíferos de las subunidades del proteasoma 19S			
Levaduras	Mamíferos	Levaduras	Mamíferos
Rpt1	PSMC2	Rpn1	PSMD2
Rpt2	PSMC1	Rpn2	PSMD1
Rpt3	PSMC4	Rpn3	PSMD3
Rpt4	PSMC6	Rpn4	
Rpt5	PSMC3	Rpn5	PSMD12
Rpt6	PSMC5	Rpn6	PSMD11
		Rpn7	PSMD6
		Rpn8	PSMD7
		Rpn9	PSMD13
		Rpn10	PSMD4
		Rpn11	PSMD14
		Rpn12	PSMD8
		Rpn13	
		Rpn15	SHFM1
		S5b	PSMD5
		p28	PSMD10
		p27	PSMD9

Tabla 7. Nomenclatura en levaduras y en mamíferos de las subunidades del proteasoma 19S.

El acoplamiento entre el complejo regulador 19S y el proteasoma 20S depende de ATP. Las subunidades de la base PSMD2 (Rpn1) y PSMD1 (Rpn2) se unen al anillo α (da Fonseca y Morris, 2008). En la célula hay un equilibrio dinámico entre los proteasomas 20S y 26S (Hendil y Hartmann-Petersen, 2004)

El complejo regulador 19S actúa como intermediario entre el sustrato proteico ubiquitinizado y el complejo proteolítico 20S. Sus funciones son las siguientes:

1. reconocimiento de la ubiquitina, mediante PSMD4 (Rpn10) principalmente, a través del motivo LALAL (Riedinger *et al*, 2010).
2. unión al sustrato, a cargo las subunidades de la base, que además retienen el sustrato en el proteasoma para su posterior desdoblamiento y correcta orientación, de forma que pueda entrar en el proteasoma 20S (Braun *et al*, 1999)
3. desdoblamiento y translocación del sustrato, para esto es necesaria la hidrólisis del ATP, que realizan las subunidades PSMC (Rpt) (Lee C *et al*, 2001)

4. desubicutinación, la cadena de ubiquitina se libera del sustrato antes de entrar en el proteasoma 20S. El primer paso se realiza a través de PSMD14 (Rpn11), que necesita el concurso del ion Zn^{+2} (Yao y Cohen, 2002). Después intervienen otras DUB que se unen al proteasoma, rompen el enlace con el sustrato y dividen la cadena de polibucitina en monómeros listos para reutilizar (Amerik y Hochstrasser, 2004)

Las DUB rompen las moléculas de ubiquitina en el extremo C-terminal del último resto de glicina en la posición Gly76 (Oh et al, 2007). Permiten mantener una cantidad adecuada de moléculas de ubiquitina para que pueda ejercer sus funciones biológicas (Amerik y Hochstrasser, 2004).

Además del complejo regulador 19S, existen otras proteínas que pueden unirse al proteasoma 20S y modificar su actividad. Las más importantes son la familia PA28 α , β y γ (11S REG α , β y γ) y la proteína P200. Ambas son independientes del ATP y permiten la hidrólisis de pequeños péptidos (Dubiel et al, 1992, Iwanczyk et al, 2006). PA28 α y β se han relacionado con la presentación antigénica (Rechsteiner et al, 2000). Se han descrito proteasomas híbridos con 20S unido a 19S en un extremo y a P28 en el opuesto (Tanahashi et al, 2000). P200 parece que también desempeña un papel en la reparación del ADN (Ustrell et al, 2002).

Algunas subunidades del proteasoma modifican su actividad al fosforilarse mediante la cinasa A de proteína (PKA). Este proceso, que afecta a PSMA2 (α 2), PSMA4 (α 3), PSMA6 (α 1), PSMB3 (β 3), PSMB4 β 7 y PSMB7 (β 2), incrementa la actividad parecida a la quimotripsina y parecida a la caspasa (Zong et al, 2006). En el caso de PSMA2 (α 2) la fosforilación es necesaria para que el proteasoma se localice en el núcleo (Benedict et al, 1995).

Por tanto, para que ocurra una degradación proteica a través de UPS, es necesario que se verifique la unión del sustrato a una cadena de poliubiquitina. El complejo regulador 19S del proteasoma reconoce al sustrato unido al marcador, desdobra la proteína y la transfiere a la cámara proteolítica del proteasoma 20S (figura 11). Antes de que esto último suceda la ubiquitina se desprende del sustrato mediante las DUB. En general, este proceso sirve para degradar las proteínas en péptidos cortos. En algunos casos, sin embargo, el producto resultante es la forma activa de la proteína,

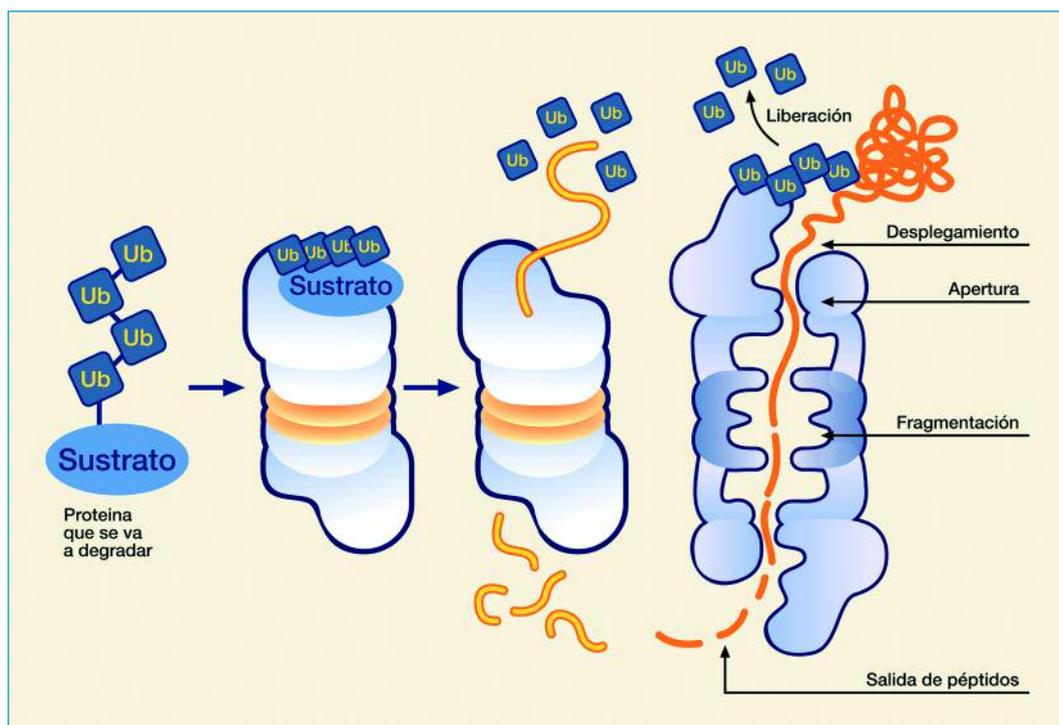


Figura 11. Proceso de unión del sustrato a la cubierta del proteasoma 26S, con monomerización de la ubiquitina y entrada y posterior degradación del sustrato (modificado de <http://info.agscientific.com/advancing-biochemical-research/>)

como ocurre con la familia de factores de transcripción NF- κ B. Las formas activas de estas proteínas se producen tras la acción del sistema ubiquitina proteasoma sobre sus precursores (Coux y Goldberg, 1998).

1.3 Estrés proteico y formación de agrosomas

Las proteínas se secretan en el retículo endoplásmico rugoso por la acción de múltiples ribosomas. Recién formadas, las proteínas no tienen estructura secundaria. Se pliegan con la ayuda de las chaperonas, sobre todo de la familia Hsp70 (*heat shock protein*) y Hsp90, que, entre otras funciones, impiden su agregación evitando la exposición de superficies hidrofóbicas o restos de cisteína no pareados de las cadenas proteicas. Algunas modificaciones de las cadenas polipeptídicas, como la N-glicosilación o la formación transitoria de puentes disulfuro, facilitan el plegamiento proteico. Las proteínas plegadas adecuadamente se transfieren al aparato de Golgi, donde continúan su maduración. Las proteínas mal plegadas se quedan retenidas durante un tiempo en el retículo endoplás-

mico, donde continuará la acción de las chaperonas. En caso de que estas no consigan su objetivo, la cadena mal plegada se transporta al citoplasma (retrotransposición), donde se degrada mediante UPS (revisado por Benyair *et al*, 2011).

Cuando en el retículo endoplásmico hay un exceso de proteínas mal plegadas, defectuosas, mutadas o agregadas se produce el llamado **estrés del retículo endoplásmico**. Las causas son diversas: envejecimiento celular, alteraciones del metabolismo del calcio, infecciones virales, mutaciones, déficit de glucosa o hipoxia. Para evitar el colapso del sistema, se pone en marcha la respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR, *unfolded protein response*) que consiste en: 1) incremento de la retrotransposición al citoplasma para que UPS actúe sobre las proteínas defectuosas, 2) aumento de la actividad de las chaperonas, buscando una mejoría del plegamiento proteico, y 3) disminución de la traducción proteica (revisado por Chakrabarti *et al*, 2011).

En caso de que la UPR no sea suficiente para mantener la viabilidad celular pueden ocurrir 3 fenómenos: 1) inducción de autofagia (Bernal *et al*, 2006) 2) formación de agresomas (ver a continuación), 3) activación de proteínas apoptóticas que dan lugar a la muerte celular (Shore *et al*, 2011) (figura 12)

Los agresomas están formados por inclusiones proteicas que se localizan en el centro organizador de los microtúbulos (o centrosoma en las células animales). Se forman mediante el transporte retrógrado de los agregados proteicos a través de los microtúbulos hasta el centrosoma (Johnston *et al*, 1998). En células HeLa la inhibición del proteasoma da lugar a la formación de agresomas (Wójcik *et al*, 1996). Por otro lado, la despolimerización de los microtúbulos frena la formación del agresoma (Johnston *et al*, 1998, García Mata *et al*, 1999). El agresoma está compuesto entre otras estructuras por chaperonas, fragmentos de proteasoma, filamentos intermedios tipo III, especialmente la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la vimentina. Esta última forma una capa externa que rodea al resto de la estructura (Thibodeau *et al*, 2007). Los agresomas ejercen un efecto protector sobre la célula, aislando agregados proteicos que de otra manera resultarían tóxicos. Una vez formado el agresoma puede persistir en la célula o degradarse, probablemente por mecanismos de autofagia (Jänen *et al*, 2010).

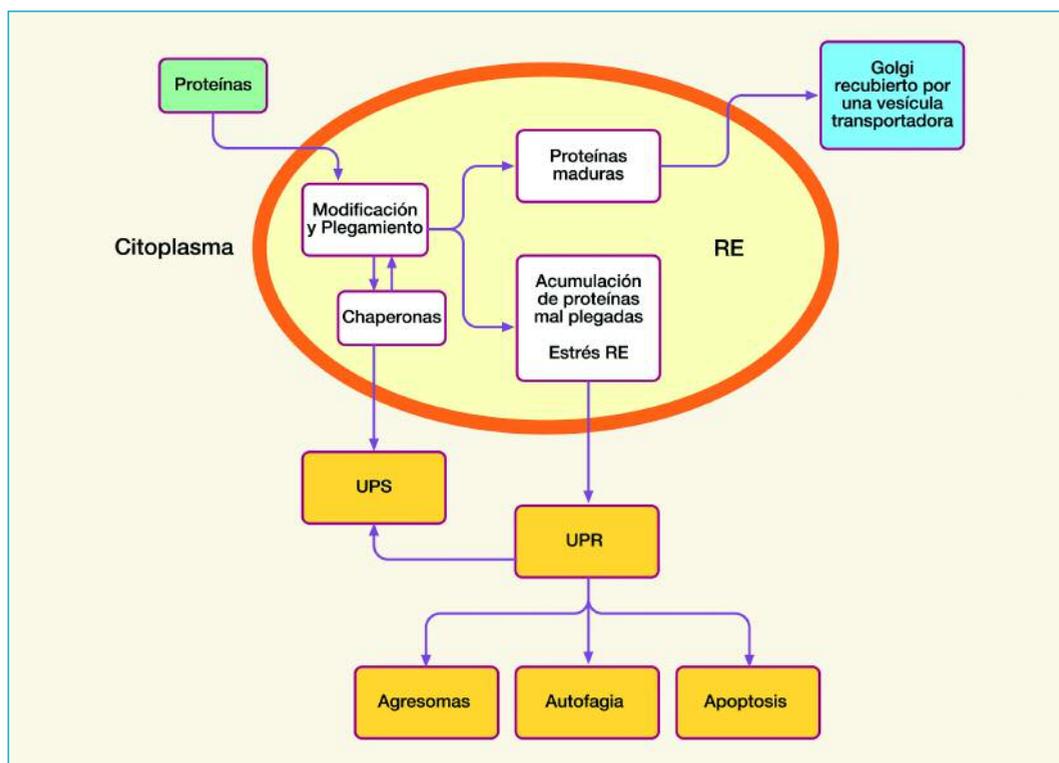


Figura 12.

Plegamiento normal de las proteínas y estrés del retículo endoplásmico. Explicación en el texto. RE retículo endoplásmico, UPS sistema ubiquitina proteasoma, UPR respuesta a proteínas mal plegadas (modificado de http://pdbj.org/eprints/index_en.cgi?PDB:2RIO)

1.4 Agregación proteica, sistema ubiquitina proteasoma y enfermedad de Parkinson

Los sistemas de control de calidad de las proteínas son especialmente activos en el sistema nervioso central. Las neuronas solo pueden obtener energía mediante el ciclo de Krebs. La presencia de oxígeno da lugar a metabolitos que oxidan neurotransmisores y a un aumento de radicales libres. Esta situación puede incrementar la cantidad de proteínas dañadas. Para evitar daño celular actúa el sistema de degradación de proteínas. El funcionamiento correcto de este sistema es además necesario para mantener las neuronas estructuralmente viables (Keller *et al*, 2004).

En la EP se han observado agregados proteicos sobre todo de ASN. Estos agregados ocurren bien por alteraciones del gen SNCA (mutaciones, duplicaciones o triplicaciones), bien por modificaciones de la proteína por otras causas. En la EP esporádica se desconoce por qué la ASN se agrega. La ASN no se degrada habitualmente mediante el sistema UPS (Shimura *et al*, 2001). El exceso de ASN interacciona con la cubierta 19S y altera la función

del proteasoma 26S, en concreto de la subunidad PSMC3 (Rpt5) (Snyder *et al*, 2003).

En las mutaciones de parkina se han constatado acumulaciones de algunos de sus sustratos como GPR37 (Pael-R) (Imai *et al*, 2001), CDCrel (Choi *et al*, 2003), ciclina E (Staropoli *et al*, 2003), AIMP2 (p38) (Ko *et al*, 2005) o FUBP1 (Ko *et al*, 2006). Estos acúmulos ocurren en otras células además de las neuronas dopaminérgicas. Dado que solo estas últimas degeneran, deben existir otros factores coadyuvantes. AIMP2 (p38) también se ha hallado en acúmulos en cerebros de pacientes con EP idiopática (Ko *et al*, 2005). La parkina ejerce un importante efecto protector celular ante diversas agresiones como en la disfunción del proteasoma (Tsai *et al*, 2003), el exceso de ASN (Petrucci *et al*, 2002) o la excitotoxicidad inducida por el kainato (Staropoli *et al*, 2003)

Otra proteína que se agrega en la EP es la sinfilina 1. Forma parte de los cuerpos de Lewy y puede formar inclusiones por sí misma en su forma ubiquitinada. Se une tanto a la parkina como a la ASN (Eyal y Engelender, 2006). También interacciona con el proteasoma, en concreto con la subunidad PSMC4 (Rpt3) (Marx *et al*, 2007)

Los agregados proteicos más característicos de las neuronas de los pacientes con EP son los cuerpos de Lewy. No se han observado en los casos de mutación de *PARK2* y en algunos pacientes con mutación de *LRRK2*. Se han descrito en cerebros de ancianos sin enfermedades degenerativas. Se trata de unas estructuras eosinofílicas de 8-30 μm de diámetro formadas por material granular que se dispone centralmente y una capa externa formada por filamentos en forma radial. Aunque el componente principal de los cuerpos de Lewy es la ASN, están formados por otras muchas proteínas: neurofilamentos, ubiquitina, sinfilina 1, torsina A, enzimas ubiquitinadoras y desubiquitinadoras, proteínas ubiquitinadas, proteínas de golpe de calor (sobre todo Hsp70 y Hsp90) o fragmentos de proteasoma (Olanow *et al*, 2004). Algunas de las proteínas que componen estas estructuras forman parte del sistema de regulación proteico de la neurona. En la actualidad se cree que los cuerpos de Lewy desempeñan el papel de agresomas. De este modo secuestrarían los agregados proteicos neurotóxicos y los aislarían del ambiente celular. Los cuerpos de Lewy muestran tinción positiva para tubulina- γ y pericentrina, ambos marcadores específicos de los agresomas (Olanow *et al*, 2004).

La agregación proteica en la EP puede deberse a diferentes mecanismos. Se han considerado la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la inflamación, la excitotoxicidad y las alteraciones del proteasoma (McNaught *et al*, 2006).

El papel del proteasoma en la EP se ha investigado exhaustivamente por el grupo de McNaught. Inicialmente mostraron disminución de la actividad hidrolizadora del proteasoma en homogeneizado de sustancia negra de 10 pacientes con diagnóstico histopatológico de EP respecto a 7 controles sin la enfermedad (McNaught *et al*, 2001). Este hallazgo se confirmó poco después y se describió que en áreas del cerebro que no degeneraban la actividad del proteasoma era mayor que en condiciones normales (Furukawa *et al*, 2002). En cultivos celulares de neuronas de mesencéfalo ventral de rata incubadas con lactacistina, un inhibidor del proteasoma, se observó pérdida de células dopaminérgicas y alteraciones morfológicas en las supervivientes, con disminución de la captación de dopamina. También se describió la formación de cuerpos de inclusión con ASN y fragmentos de ubiquitina (McNaught *et al*, 2002a).

A continuación se diseñó un modelo de EP. Consistió en administrar de forma local lactacistina en el estriado de ratas. Se comprobó toxicidad selectiva para las neuronas dopaminérgicas estriatales, con apoptosis retrógrada en la sustancia negra (McNaught *et al*, 2002b). En un modelo posterior (McNaught *et al*, 2004) administraron epoxomicina, un inhibidor natural del proteasoma, de forma sistémica a un grupo de ratas. Al cabo de 1 o 2 semanas, los animales desarrollaron un síndrome bradicinético rígido con temblor y alteraciones posturales que mejoraba con apomorfinina o con levodopa. La histopatología mostró agregados intracitoplasmáticos eosinofílicos de ASN y ubiquitina y degeneración neuronal en la sustancia negra, *locus coeruleus*, núcleo motor dorsal del vago y núcleo basal de Meynert. También mostraron que la actividad enzimática del proteasoma estaba disminuida en la sustancia negra y en la parte inferior del tronco cerebral (en la región del *locus coeruleus* y el núcleo dorsal motor del vago), pero se encontraba incrementada en áreas que no degeneraban.

La contundencia de estos estudios parecía abrir una nueva vía de investigación sobre la etiopatogenia de al menos parte de la EP. Sin embargo, los resultados de los trabajos que trataron de reproducir

Réplicas a los estudios de McNaught et al sobre el proteasoma en la patogenia de la EP	
Autores	Resultado
Fornai et al, 2003	Positivo
Miwa et al, 2005	Positivo
Bové et al, 2006	Negativo
Kordower et al, 2006	Negativo
Mannig-Bog et al, 2006	Negativo
Schapira et al, 2006	Parcial
Zeng et al, 2006	Parcial

Tabla 8. Réplica a los estudios de McNaught et al sobre el proteasoma en la patogenia de la EP

el modelo de McNaught han sido muy desiguales (tabla 8). Solo 2 estudios han mostrado resultados similares (Fornai et al, 2003, Miwa et al, 2005). Otros 2 trabajos solo han conseguido reproducir parcialmente los resultados de McNaught (Zeng et al, 2006, Schapira et al, 2006) Sin embargo, otros experimentos con un diseño similar no mostraron resultado alguno (Bové et al, 2006, Kordower et al, 2006, Manning-Bog et al, 2006).

El grupo de McNaught trató de analizar las causas de estas diferencias experimentales, argumentando: 1) variación en las propiedades del inhibidor del proteasoma aplicado, incluso en diferentes lotes del mismo fabricante, 2) factores ambientales (dieta, exposición a agentes microbianos, temperatura, humedad, estrés), 3) diferencias en dosis y biodisponibilidad cerebral del inhibidor. En el mismo artículo mostraron los resultados de un trabajo similar en ratas a las que administraron PSI, otro inhibidor del proteasoma. Los resultados fueron superponibles al anterior estudio. Incluso añadieron un estudio histopatológico con microscopía electrónica, en la que observaron cuerpos de inclusión y vórtices membranosos reactivos para ASN y ubiquitina (McNaught et al, 2006). Posteriormente los propios autores corrigieron estos últimos hallazgos, que habían interpretado erróneamente por causas técnicas (McNaught y Olanow, 2009).

Desde esta controversia los avances en esta línea de investigación han sido menores. No obstante se han publicado algunos resultados reseñables. Así, un modelo de ratón defectivo para el gen del componente de 19S PSMC1 en las neuronas de la sustancia negra y del telencéfalo mostró inclusiones parecidas a los cuerpos de Lewy ricos en ubiquitina, ASN y componentes de la mitocondria

(Bedford *et al*, 2008). En otro trabajo, a un grupo de ratones C57BL/6 se les inyectó en el fascículo telencefálico medial un inhibidor del proteasoma, que podía ser lactacistina, PSI o MG-32. Los resultados fueron similares a la histopatología y la clínica de la EP: 1) degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra, en mucha mayor cuantía que las del área tegmental ventral, 2) acumulación de proteínas en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (SNpc), entre ellas ASN, 3) reacción glial y acumulación de hierro, 4) alteraciones motoras que responden a agonistas (Xie *et al*, 2010). El mismo grupo mostró posteriormente en un modelo *in vitro* de células dopaminérgicas tratadas con lactacistina que la destrucción del proteasoma daba lugar muerte celular probablemente mediada por alteraciones en el metabolismo del hierro (Li XP *et al*, 2012).

2. LA MITOCONDRIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La principal función de la mitocondria es la realización del ciclo de Krebs y la generación de ATP, mediante la cadena respiratoria. Además desempeña un papel clave en la apoptosis celular y en la regulación de calcio citoplasmático y de la propia mitocondria. (de Castro *et al*, 2011). El calcio es necesario para la activación de al menos 3 enzimas del ciclo de Krebs, las deshidrogenasas de piruvato, cetoglutarato e isocitrato (McCormack *et al*, 1990).

Las neuronas dependen casi exclusivamente del ciclo de Krebs para obtener energía, por tanto poseen un gran número de mitocondrias. Las mitocondrias se forman en el cuerpo neuronal y de ahí se transportan al axón. Las que están deterioradas vuelven al axón para su degradación mediante autofagia. Las terminales sinápticas poseen una alta actividad energética y un constante movimiento de calcio, funciones ambas que realiza la mitocondria. (de Castro *et al*, 2011)

El primer indicio de relación entre la EP y la mitocondria se observó con el descubrimiento del MPTP. Esta molécula se transforma en MPP⁺ en el sistema nervioso mediante la glía. MPP⁺ alcanza las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina (DAT), e inhibe el transporte de electrones uniéndose al com-

plejo I de la mitocondria (Langston *et al*, 1983, Ballard *et al*, 1985). Posteriormente se describió que en los pacientes con EP la actividad de este complejo I mitocondrial está disminuida en las neuronas de la sustancia negra, linfocitos y en las plaquetas (Schapira *et al*, 1990). La sustancia negra posee una actividad metabólica alta, lo que implica un gran consumo de oxígeno. Esto da lugar a la producción de sustancias oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales superóxido (O_2^-). El coenzima Q10, en concreto su forma reducida ubiquinona, forma parte de la membrana de la mitocondria y actúa como antioxidante. El citocromo c, que forma parte del complejo IV de la membrana mitocondrial ejerce un papel similar. La mitocondria dañada puede, por tanto, producir un incremento de radicales oxidados y el consiguiente deterioro celular (Bogaerts *et al*, 2008). Por otro lado, la propia edad incrementa el estrés oxidativo en la sustancia negra y disminuye la actividad antioxidante (Venkateshappa *et al*, 2012). Las neuronas de la sustancia negra de los pacientes con EP han mostrado un aumento significativo de deterioro del ADN mitocondrial (ADNmt), respecto a controles sanos (Bender *et al*, 2006).

Además del MPTP, otras toxinas como la rotenona o el paraquat provocan parkinsonismo uniéndose a proteínas de la mitocondria, especialmente al complejo I (McCormack *et al*, 2003, Sherer *et al*, 2003). Es posible, sin embargo, que estos tóxicos produzcan degeneración neuronal mediante algún otro mecanismo aún desconocido. Se sabe que los ratones defectivos para el gen *Ndufs4* (*NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial*), que codifica una proteína necesaria para la integridad del complejo I, no están protegidos contra el efecto de estas sustancias (Choi *et al*, 2008)

Se ha mostrado que las neuronas que degeneran en la EP presentan actividad marcapasos por la presencia de canales de calcio tipo L. Estas neuronas requieren una gran actividad metabólica, lo que podría explicar la vulnerabilidad selectiva por estrés oxidativo y el consecuente daño mitocondrial. Además la mitocondria desempeña un importante papel en la homeostasis del calcio intracelular, por lo que cualquier alteración en su integridad rompería el equilibrio de este ion, incrementando el daño neuronal (Surmeier *et al*, 2011)

El descubrimiento de las formas monogénicas de la enfermedad ha renovado el interés por la relación entre la mitocondria y la EP.

Ya se ha indicado que algunas de las proteínas mutadas, como LRRK2, parkina, DJ1 o PINK1, se localizan en la mitocondria. Esta última regula algunas actividades mitocondriales. También se ha tratado el fenómeno de la mitofagia en el que intervienen las proteínas parkina y PINK1. También se ha mencionado la mutación del gen HTRA2, identificado con PARK13, que codifica una proteína mitocondrial relacionada con la apoptosis.

De forma poco frecuente se ha descrito la presencia de parkinsonismo con respuesta a la dopa en algunas enfermedades mitocondriales: MELAS (*mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes*) (De Coo *et al*, 1999), enfermedad de Leber (Nikoskelainen *et al*, 1995) y MERRF (*myoclonic epilepsy with ragged red fibers*) (Horvarth *et al*, 2007).

El gen *POLG1* (*polymerase DNA gamma*), situado en el locus 15q26.1 (15: 89859536 - 89878026) interviene en la replicación del ADN mitocondrial (Chan y Copeland, 2009). Algunas mutaciones de este gen provocan una enfermedad mitocondrial que puede cursar con ataxia, neuropatía, epilepsia, oftalmoplejia progresiva o parkinsonismo, además de hipogonadismo o insuficiencia hepática aguda inducida por valproato (Horvath *et al*, 2006). En ocasiones el parkinsonismo puede dominar el cuadro clínico. La histopatología confirma la pérdida neuronal en la sustancia negra, sin la presencia de cuerpos de Lewy. La edad de comienzo suele ser alrededor de los 50 y el modo de herencia es en general autosómica dominante (Mancuso *et al*, 2004).

3. LA VÍA LISOSOMAL Y LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La autofagia es un mecanismo de degradación proteico mediado por lisosomas. Degrada proteínas de origen extracelular e intracelular, contenido masivo citoplasmático y organelas dañadas. Se puede dividir en (revisado por Lee *et al*, 2012) (figura 13):

1. Macroautofagia (o autofagia): se forman unas vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas o vacuolas autofágicas, que engloban la materia que se va a degradar. Posteriormente se unen mediante su membrana externa a los lisosomas, formando los autolisosomas, para la degradación

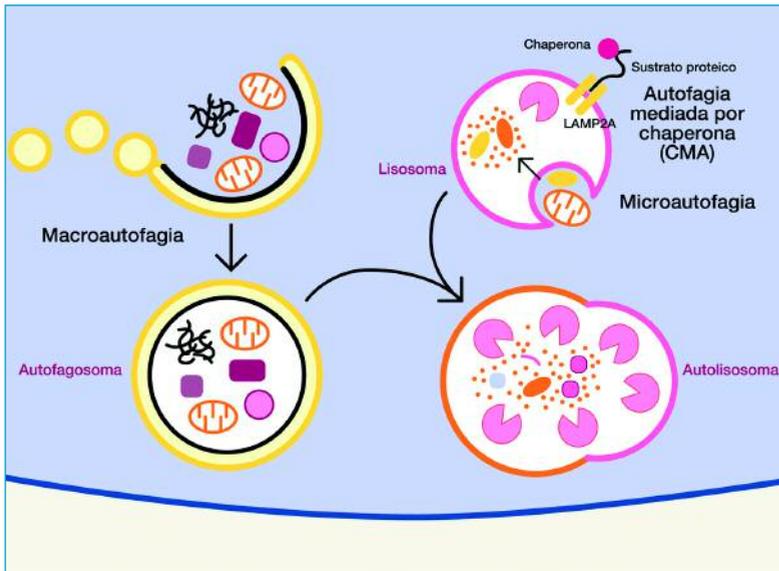


Figura 13. Las diferentes modalidades de autofagia: 1) macroautofagia: se forman vesículas, autofagosomas, que engloban el material que se va a degradar. Se fusionan con los lisosomas, formando los autolisosomas, 2) microautofagia: el propio lisosoma se encarga de fagocitar material de desecho, 3) CMA: mediante el receptor LAMP2A y con la colaboración de las chaperonas se captan algunos sustratos proteicos (modificado de Cheung et al, 2009)

de su contenido en un medio ácido. En este proceso intervienen más de 30 proteínas *Atg* (*autophagy related*).

2. Microautofagia: los lisosomas engloban directamente al sustrato proteico en el citoplasma sin la intervención de autofagosomas.
3. Autofagia mediada por chaperonas (CMA): las chaperonas, sobre todo Hcs70, se unen a proteínas que contengan el motivo KFERQ o similar. El complejo formado se une al receptor LAMP A2 (*lysosome associated membrane protein A2*), en los lisosomas, que internalizan este complejo y lo degradan. Este subtipo de autofagia solo afecta a proteínas (no organelas) y es mucho más selectivo que los anteriores. Las proteínas a las que afecta esta modalidad de degradación representan el 30 % de todas las citoplasmáticas, incluyendo la mayoría de las sintetasas de aminoacil ARMt (Dice, 2007).

En los últimos años se ha mostrado que alteraciones de la autofagia pueden contribuir, al menos parcialmente, a la patogenia de la EP. La ASN se degrada mediante autofagia y CMA (Webb *et al*, 2003, Vogiatzi *et al*, 2008). También se ha observado que la sobreexpresión de Beclin 1 (o Atg6), una proteína que interviene en el

proceso de macroautofagia, disminuye la agregación de ASN (Spencer *et al*, 2009). Por el contrario, la inhibición de CMA favorece las formas insolubles de ASN (Vogiatzi *et al*, 2008). La sobreexpresión de ASN mutada inhibe la CMA (Xilouri *et al*, 2009). La sobreexpresión de PINK 1 incrementa la autofagia (Michiorri *et al*, 2010). La mutación p.G2019S de *LRRK2* aumenta las vacuolas autofágicas (Plowey *et al*, 2008). En cerebros de pacientes con EP hay acumulación de autofagosomas (Mizushima *et al*, 2008). Los cuerpos de Lewy pueden degradarse mediante autofagia (Fortun *et al*, 2003)

Ya se ha tratado la mayor susceptibilidad que presentan los portadores heterocigotos de mutaciones en el gen *GBA*, relacionado con alteraciones lisosomales para padecer enfermedad de Parkinson. Recientemente se ha sugerido que polimorfismos del gen *SCARB2* (*scavenger receptor class B, member 2*) podrían constituir un factor de riesgo para la EP. *SCARB2* (localizado en 4q21.1) codifica LIMP2 (*lysosomal integral membrane protein 2*), una proteína transmembrana ubicua, con fuerte presencia en los endosomas y lisosomas (Michelakakis *et al*, 2012). También se ha observado que *UCHL1* interacciona con Hcc70, Hsp90 y con LAMP A2. En cultivos celulares la mutación I93M de *UCHL1* inhibe la CMA, vía a través de la que se degrada, al menos parcialmente ASN (Kabuta *et al*, 2008).

iv. Los estudios de asociación en enfermedades complejas. Los polimorfismos genéticos.

La EP esporádica se incluye dentro de las *enfermedades comunes o complejas*. Las enfermedades complejas ocurren por la acción combinada de genes ubicados en múltiples locus. El efecto individual de cada uno de ellos es pequeño. Estos genes interactúan entre sí y a su vez lo hacen con factores ambientales.

El componente genético de las enfermedades complejas, mucho más frecuentes que las mendelianas, se estudia en poblaciones no emparentadas mediante los *estudios de asociación*. Los estudios de asociación se basan en el análisis de locus de ADN polimórfico.

En la mayor parte del genoma, la secuencia de ADN es idéntica para todos los seres humanos. Estos locus que no varían son locus

monomórficos. En una proporción de locus se han detectado una serie de variantes que tienden a mantenerse a lo largo de generaciones. Consisten en cambios de bases o repeticiones en las secuencias de ADN. Este hecho da lugar a que para un determinado locus existan 2 o más alelos que se expresan de forma diferente en diferentes individuos.

El análisis de asociación genética consiste en la comparación de las frecuencias alélicas de estos polimorfismos entre casos (pacientes) y controles (sujetos sanos). Una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de un determinado polimorfismo entre los casos y los controles significa una posible relación (factor de riesgo o factor protector) del locus que contiene el polimorfismo con la enfermedad o rasgo fenotípico en estudio. Puede suceder que dicho locus no se relacione directamente con la enfermedad pero se herede en bloque con el verdadero locus causal (ver más adelante)

Los estudios de asociación tratan de explicar la *heredabilidad* de un rasgo o de una enfermedad, que se define como la parte de la variación fenotípica que se debe a la variación genética aditiva (Vischer *et al*, 2008). Su valor varía entre 0 y 1. De forma ideal, los estudios de asociación deberían identificar todos los locus implicados y caracterizar las complejas relaciones que se establecen entre ellos.

Los SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) son los polimorfismos más simples y más empleados en los estudios de asociación (Hartwell *et al*, 2011a) (figura 14). Consisten en el cambio de una única base nucleotídica, de modo que el locus resultante presenta únicamente 2 alelos. La frecuencia del alelo menor (MAF) ha de ser mayor del 1 %. Si es inferior se hablará de *variante rara*, no de SNP. Los SNP representan la mayor parte de la variabilidad genética entre individuos. Sus principales ventajas son su simplicidad, que facilita el análisis automatizado a gran escala, su estabilidad, su

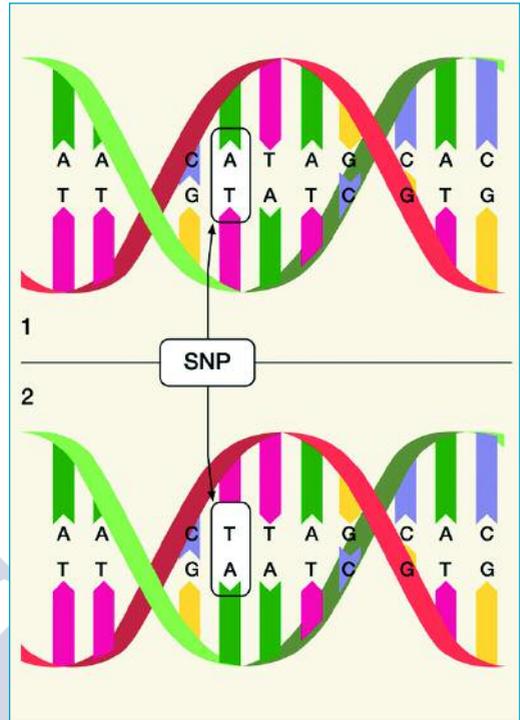


Figura 14. SNP consistente en un cambio de adenina (A) por timina (T)

abundancia (aproximadamente uno cada 1000 pares de bases) y su distribución homogénea por todo el genoma.

La mayor parte de los SNP no alteran la función génica por encontrarse en regiones que no se expresan. Algunos pueden localizarse en secuencias codificantes (cSNP) (Cargill *et al*, 1999) o en regiones reguladoras (rSNP) (Hudson, 2003). Los análisis genómicos de los genetistas James Watson y Craig Venter mostraron respectivamente 1 096 873 y 924 333 SNP, de los que 2641 y 2374 respectivamente dieron lugar a cambios en los aminoácidos de las proteínas implicadas (Hartwell *et al*, 2011a).

La figura 15 (en la página siguiente) representa de forma muy esquemática el fundamento de los estudios de asociación. El sujeto sano y el sujeto que presenta una enfermedad compleja tienen la misma estructura en los genes A, B, D y E. Los alelos de los SNP de estos genes muestran una frecuencia similar. Las frecuencias de los alelos del SNP del gen C son muy diferentes. Si se demuestra que esta diferencia entre sujetos sanos y enfermos es estadísticamente significativa existe una alta probabilidad de que el gen C esté relacionado con la patogenia de la enfermedad o esté asociado a un factor patogénico.

Según el número de SNP analizados y la hipótesis de partida los estudios de asociación pueden dividirse en (Zondervan, 2011):

1. Estudios de genes candidatos. Se analizan aquellos genes que forman parte de una ruta biológica sobre la que existe cierta evidencia experimental de su implicación en el desarrollo de una determinada enfermedad. Se seleccionan varios SNP que cubren toda la extensión del gen en estudio. En muchos casos varios SNP forman bloques haplotípicos (ver más adelante). De cada bloque solo se estudia un SNP, el llamado *tagSNP*. Este es el tipo de estudio con el que se ha hecho este trabajo.

2. Genome Wide Association Studies (GWAS). Son estudios de asociación de todo el genoma. En este caso no hay hipótesis previa. Se emplean módulos de genotipado genéricos que cubren parte o la totalidad del genoma, con mayor o menor cobertura 500k – varios millones de SNP. El genoma humano comprende aproximadamente 3200 Mb, de modo que se pue-

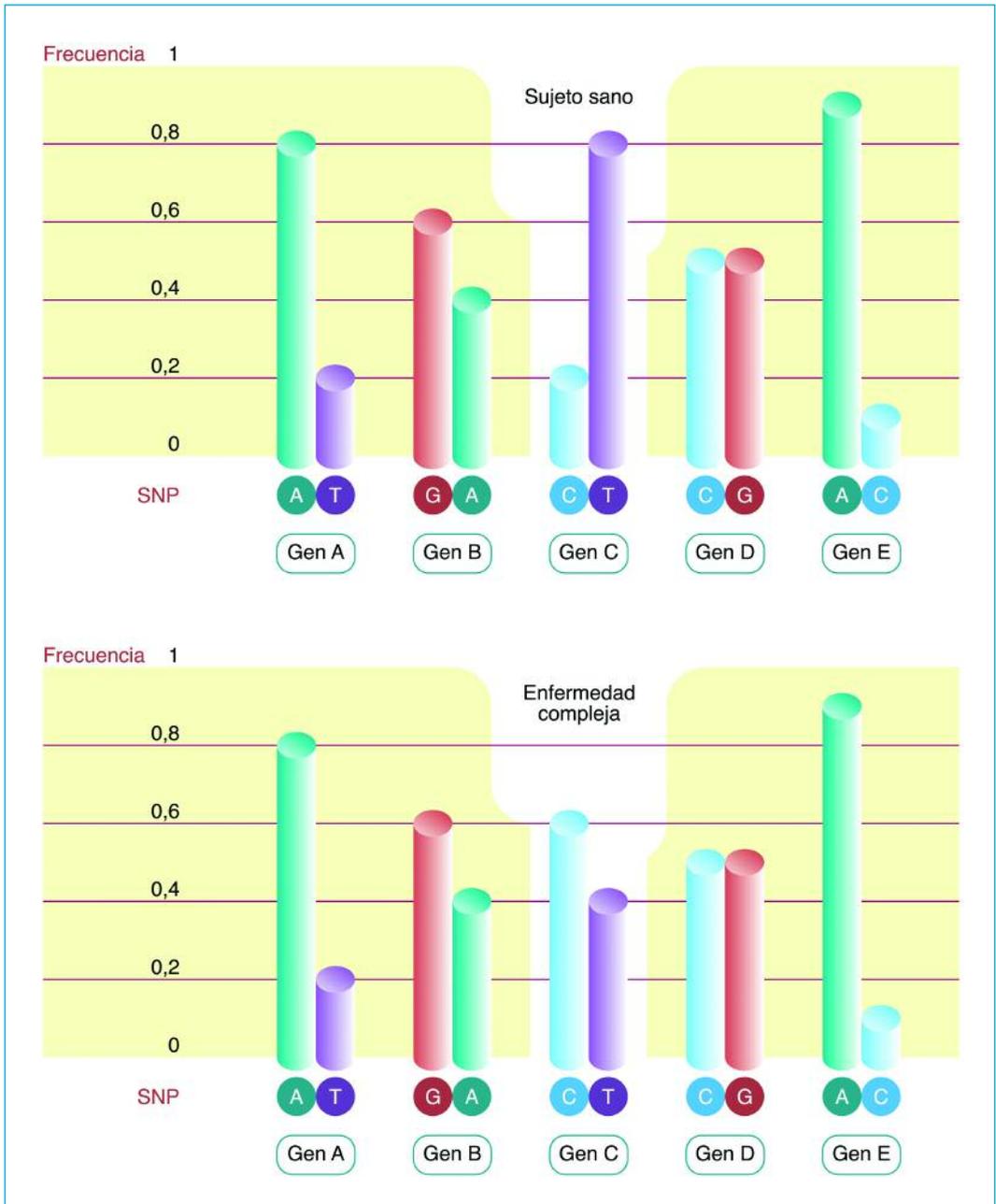


Figura 15. Fundamento de los estudios de asociación. Se basan en las diferencias de frecuencias de ciertos SNP entre los sujetos sanos y los pacientes con enfermedades complejas. Explicación en el texto

de capturar gran parte de la variabilidad del genoma mediante el concepto de bloques de desequilibrio de ligamiento (ver más adelante).

De los 20 000 genes que posee el genoma humano, 8000 se expresan en todas las células y tejidos y 6000 únicamente en el cerebro. Es decir, en el cerebro se expresan un total de 14 000 genes (Purves *et al*, 2013).

1. PROBLEMAS DE LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN

1.1. La hipótesis enfermedad común variante común

Los estudios de asociación suelen asumir la hipótesis enfermedad común – variante común (Lander, 1996, Chakravarti, 1999). Es decir, las variantes comunes (SNP con frecuencias superiores al 1 % de la población) modifican el riesgo en la mayoría de enfermedades complejas. Los resultados de los estudios de asociación realizados hasta la fecha, sin embargo, han sido poco concluyentes y parecen cuestionar esta hipótesis. Aunque los estudios de asociación, especialmente los GWAS, han identificado gran cantidad de polimorfismos de numerosos rasgos, tan solo han permitido explicar una pequeña parte de la heredabilidad (Mahen, 2008). En general, identifican variantes con efectos muy pequeños, con un cociente de probabilidades (*Odds ratio*, OD) de entre 1,1 y 1,3, es decir los portadores del SNP analizado incrementan el riesgo de padecer la enfermedad en 10 - 30 % respecto al riesgo de los no portadores. Es probable que haya otras variantes no detectadas porque aumentan el riesgo en valores más pequeños, quizás menores del 1 %. Por tanto, tal vez las enfermedades complejas estén causadas por una conjunción de variantes comunes y raras (Pritchard, 2001, Cirulli y Goldstein, 2006).

Un ejemplo muy ilustrativo es la estatura de los individuos. Aunque se trata de un rasgo, se analiza de forma similar a las enfermedades complejas mediante estudios de asociación. Se sabe que la heredabilidad de la altura es muy grande, en concreto de 0,8. Es decir el 80% de la variación fenotípica depende de factores genéticos aditivos (Silventoinen, 2003). Diversos GWAS, sin embargo, no han conseguido explicar más del 0,16 de la variación fenotípica

(Visscher *et al*, 2011). Aplicando un método de análisis en que se consideran en conjunto todos los SNP implicados el valor se incrementa a 0,45. Aun así, no se detecta el 0,35 de variación fenotípica que depende de factores genéticos (Yang *et al*, 2010). Esta proporción de la heredabilidad que los GWAS no pueden explicar se denomina heredabilidad perdida.

Existen por lo tanto, serias dificultades para descifrar el componente genético de las enfermedades complejas. Algunas de las razones de las limitaciones de los estudios de asociación para detectar factores genéticos de susceptibilidad, para detectar la heredabilidad perdida, son las siguientes (Manolio *et al*, 2009):

1. **Variantes comunes.** Cada una de ellas con un efecto muy pequeño, de modo que se necesita identificar una gran cantidad para determinar la asociación
2. **Variantes raras.** Que las variantes de susceptibilidad aparezcan en menos del 1 % de la población.
3. **Epistasis.** La expresión de un determinado genotipo viene condicionada por la acción de determinados alelos pertenecientes a otros genes, bien en heterocigosis (epistasis dominante) o en homocigosis (epistasis recesiva).
4. **Interacciones gen-ambiente.** Determinados gen o genes tienen efecto solo en presencia de determinados factores ambientales.
5. **Infraestimación del ambiente** compartido por una misma familia
6. **Posible papel de otros polimorfismos** que, hasta ahora, no se valoraban como los CNVs (*copy-number variations*).

En la figura 16 se expresa gráficamente el problema para determinar la parte genética de las enfermedades complejas. Las variantes comunes implicadas en las enfermedades complejas tienen un efecto en la OR muy pequeño, al contrario que las mutaciones causantes de enfermedades mendelianas, de muy baja frecuencia, pero con una enorme probabilidad de causar la enfermedad. Como se planteará en la discusión, puede que algún alelo al que se le atribuya un papel patogénico en enfermedades mendelianas, sea, tal vez, una variante de baja frecuencia con efecto intermedio alto (OR intermedio alta) sobre la enfermedad.

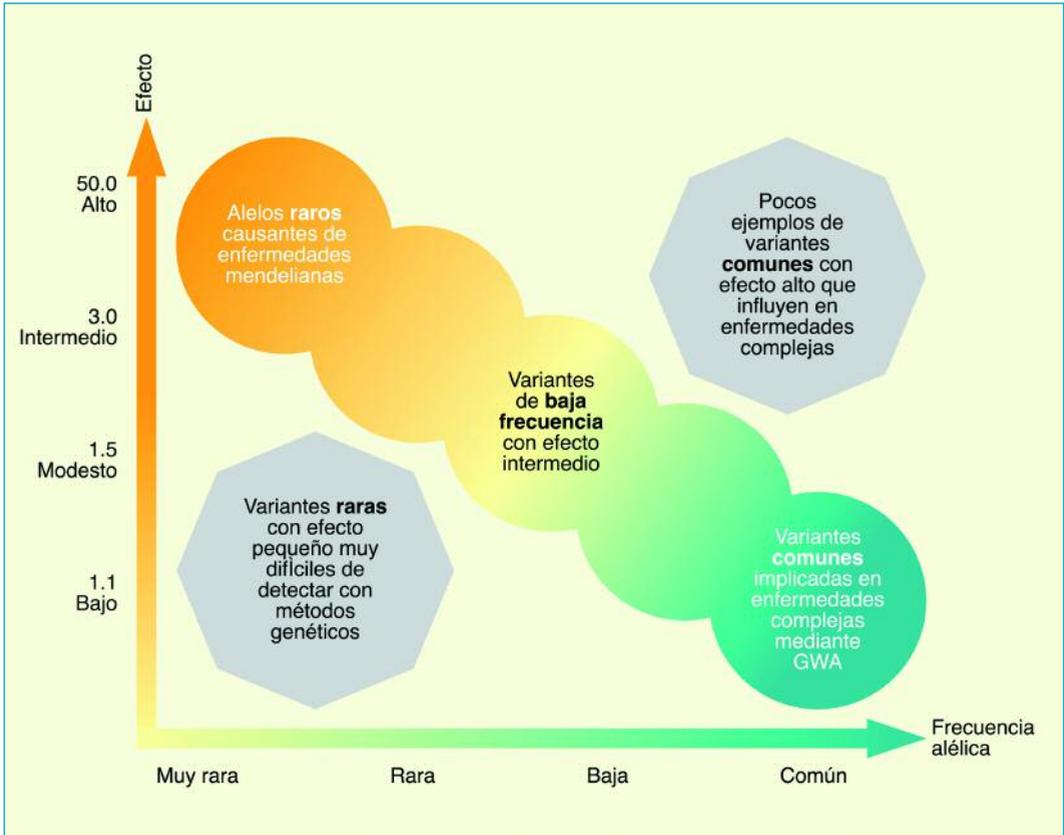


Figura 16. Relación entre la frecuencia alélica y el efecto (OR) sobre la enfermedad estudiada. Explicación en el texto (modificado de Manolio *et al*, 2009).

1.2. La maldición de la dimensión

Otras limitaciones de los estudios de asociación tienen que ver con la metodología. Uno de los principales problemas de estos estudios, principalmente GWAS, es la *maldición de la dimensión* (*curse of dimensionality*) (Bellman, 1961) Existe un elevado número de variables predictoras en relación al número de observaciones. Estas variables están potencialmente correlacionadas y además pueden interactuar (en un sentido biológico o estadístico) en su asociación con la variable respuesta.

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas o adaptado otras existentes para este tipo de datos, que permiten abordar el problema de la dimensión: *Clasificación and Regression Trees* (CART), *Randomforest*, *Logic Regression*, *Multifactor Dimensionality Reduction* (MDR)... Estos métodos se basan en la reducción de la dimensión, la selección de variables o el análisis directo de un gran número de variables.

Una de las aproximaciones para abordar este problema la constituyen las técnicas de selección de variables. Esta selección de variables se puede hacer empleando métodos univariantes o multivariantes (Urrea, 2009).

1. Univariantes. Es la aproximación más habitual en este tipo de estudios. Se establecen unos criterios para medir la asociación de cada una de las variables predictoras con la respuesta y se determinan las más significativas según un umbral preestablecido. Esta aproximación univariante de selección de variables presenta varios inconvenientes:

- No permite considerar la existencia de posibles correlaciones. Por tanto no es posible medir el efecto combinado de diferentes locus y se infraestima la contribución genética en presencia de interacciones (Heidema *et al*, 2006)
- El problema de las comparaciones múltiples. Al estudiar la asociación de diferentes marcadores de manera independiente la probabilidad de error tipo I se incrementa y hay que realizar ajustes para corregir el nivel de significación: Bonferroni, *False Discovery Rate* (FDR)... Esta corrección implica que la probabilidad de detectar un efecto cuando realmente está presente disminuya, de modo que se pueden estar perdiendo asociaciones débiles.

2. Multivariantes. Las variables predictoras se consideran en un contexto dinámico. Permiten incorporar interacciones entre las variables.

1.3. La subestructura poblacional

Las poblaciones estudiadas pueden ser genéticamente homogéneas, de modo que los individuos se cruzan al azar con cualquier otro individuo de la población (panmixia) o puede estar dividida en diferentes subpoblaciones, cada una con una estructura genética propia por diferente origen, en las que los individuos de cada subpoblación tienden a cruzarse entre sí. En este último caso se dice que la población está estructurada o estratificada. Las diferencias étnicas de estos tipos de población representan un factor de

confusión para los estudios de asociación, puesto que las diferencias de frecuencias en un polimorfismo entre los casos (pacientes) y los controles puede deberse a estas diferencias y no a la enfermedad que se estudia (Astle y Balding, 2009).

Una forma de evitar este factor de confusión consiste en utilizar para los estudios de asociación poblaciones genéticamente homogéneas de un tamaño no demasiado pequeño. En caso contrario puede surgir como otro factor de confusión el parentesco oculto, que se trata más adelante. Han de ser, por tanto, poblaciones con tasas de inmigración bajas. Las poblaciones europeas son, en general, bastante homogéneas genéticamente (Lao *et al*, 2008). Hay que tener en cuenta que las inmigraciones son un fenómeno relativamente reciente, que comenzó a mediados del siglo XX. Tradicionalmente eran los europeos los que emigraban a otros continentes.

No siempre se dispone de la posibilidad de estudiar poblaciones homogéneas genéticamente. Si la población estudiada no presenta esta característica se pueden aplicar diversos métodos estadísticos, como la prueba de Armitage (Devlin y Roeder, 1999), para calcular el *factor de inflación* (λ), es decir, la variación en los resultados de los estudios de asociación que se debe a la estructura poblacional y no a la enfermedad que se estudia.

La población gallega se incluye dentro de las genéticamente homogéneas, debida a la baja incidencia de inmigración. La historia de la población gallega comenzó con la llegada del hombre moderno a la Península Ibérica, hace unos 40 000 años, procedente en su mayoría de Oriente Próximo (Bosch *et al*, 2001, Salas *et al*, 1998). La segunda gran oleada de migraciones a Europa, ocurrida en el Neolítico, procedente de Oriente Medio, tuvo menor importancia en la Península Ibérica, especialmente en el Norte y Oeste (Bosch *et al*, 2001, Salas *et al*, 1998).

Las colonizaciones posteriores de los celtas, procedentes del Norte de Europa, y de los romanos tuvieron relativamente poca importancia en el acervo genético de la población gallega, puesto que el número de invasores siempre fue muy bajo respecto a la población autóctona (Salas *et al*, 1998).

Esta tónica se mantuvo en la Edad Media, en la que Galicia se vio invadida por los suevos (unos 30 000 sujetos), visigodos (unos 200 000 en toda la Península Ibérica poblada por unos 4 000 000 habitantes) y los musulmanes procedentes del Norte de África que

apenas ocuparon Galicia durante 50 años. Otras migraciones sucedidas en esta época fue la de bretones que huían de los invasores germánicos en el siglo VI, judíos y francos a través del Camino de Santiago (Pallarés, 2005).

Algunos estudios de genética de poblaciones han mostrado, sin embargo, la presencia de haplogrupos en la población gallega procedentes del Norte de África e, incluso, de África subsahariana. Una parte se atribuye al intercambio de población durante la romanización, la invasión musulmana (mayoritariamente de etnia bereber) y el comercio de esclavos. El resto de los haplogrupos se remontan a finales del Paleolítico, hace unos 11 000 años (Cerezo *et al*, 2012)

Sobre la inmigración en la Edad Moderna, en el período entre 1480 y 1835 se han realizado diversos estudios que concluyen que desde el punto de vista demográfico las inmigraciones tuvieron una importancia mínima. En 1791 se contabilizaron 649 cabezas de familia extranjeros (Salas Ausens, 2004), sobre una población de 1 345 805 (Fernández Cortizo, 1997).

A finales del siglo XVIII comenzaron a establecerse comerciantes catalanes que iniciaron la industria de la salazón. Llegaron a ser unos 15 000 si bien no todos vivían permanentemente en Galicia (Meijide Pardo, 1969). Además entonces había algunas industrias florecientes como el papel, el textil y los astilleros, que atraían mano de obra foránea (Rey Castelao, 1994). La caída de esta industria en los años 1830 cortó de raíz la inmigración y dio lugar a una emigración masiva, que duró 150 años, primero a Iberoamérica y a partir de la Segunda Guerra Mundial a Europa Central hasta los años 1970 (de Juana López y Vázquez González, 2005).

En los últimos 25 años Galicia ha visto un aumento de la población extranjera, que en la actualidad es de 97 863 personas, lo que supone un 3,56 % de la población total (datos del Instituto Nacional de Estadística, 1 de enero de 2014). Dado que es un fenómeno históricamente reciente su influencia en el acervo genético gallego es nula.

1.4. El parentesco oculto

El parentesco oculto constituye otro factor de confusión en los estudios de asociación. Consiste en la posibilidad de que individuos incluidos en los casos o en los controles tengan parentesco no conocido. Cuando realmente los pacientes comparten un factor genético, la probabilidad de parentesco oculto es mayor que en los controles. Devlin y Roeder en 1999 plantearon que este fenómeno representaba un importante factor de confusión.

En 2005, Voight y Pritchard diseñaron un método estadístico para hallar el factor de inflación (δ) que se debía al parentesco oculto. Se basaron en el factor de coalescencia, es decir, el número de generaciones (T) necesarias para que 2 cromosomas concretos de 2 individuos compartan un atepasado común.

Llegaron a la conclusión de que, en general, el parentesco oculto distorsiona poco los estudios de asociación, salvo que se den ciertas condiciones: 1) poblaciones pequeñas, 2) poblaciones que han crecido rápidamente en poco tiempo, 3) excesiva endogamia.

Finalmente destacan que en caso de que los afectados por la enfermedad en estudio tengan menor descendencia que en condiciones normales, tendrán menos posibilidades de parentesco oculto que los controles. En ocasiones, puede suceder que la selección de pacientes y controles no se haga de forma independiente, pues los familiares de pacientes pueden consultar más que la población normal.

2. LOS BLOQUES HAPLOTÍPICOS. EL DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO (LD)

Los polimorfismos se agrupan en bloques que se heredan juntos (bloques haplotípicos). La razón de la formación de los bloques hay que buscarla en la recombinación cromosómica. Si la recombinación cromosómica durante la meiosis dependiese únicamente del azar, la probabilidad de que 2 alelos de diferentes locus se heredasen juntos sería de 0,5. Esto sucede en locus que ocupan diferentes cromosomas o en los que están muy separados dentro del mismo cromosoma. Sin embargo, para distancias menores de 500 kb la probabilidad de que dos alelos que ocupan diferentes locus se hereden juntos se incrementa según estén más próximos físicamente. Este fenómeno se conoce como desequilibrio de ligamiento (*linkage*

ge disequilibrium LD). Cuanto más próximos están 2 alelos mayor será el LD. Si ambos están suficientemente cerca, la recombinación ocurrirá a una tasa tan baja que se heredarán juntos (cosegregación) (Dick, 2008) (figura 17).

Las recombinaciones no ocurren de forma uniforme en todo el genoma, sino que se multiplican en una serie de localizaciones (puntos de alta actividad) (Jeffreys *et al*, 2004). Este fenómeno implica una diferencia entre la distancia de desequilibrio de ligamiento según la parte del genoma considerada (Gabriel *et al*, 2002, Reich *et al*, 2002)

El concepto de LD es clave en los estudios de asociación genética, ya que significa que no se tiene que llegar a genotipar la variante causal para detectar asociación. Es suficiente con genotipar un marcador que se herede con el locus causal, (figura 18). También resulta muy útil determinar si un grupo de polimorfismos están en LD. Si 2 o más SNP forman un bloque haplotípico, es suficiente con analizar uno de ellos (*tagSNP*).

Una herramienta indispensable para los estudios de asociación y para la determinación de bloques haplotípicos es el proyecto Internacional *HapMap* (www.hapmap.org) (Altshuler *et al*, 2010). Ha identificado más de 10 000 000 de variantes comunes de ADN, sobre todo polimorfismos. En este proyecto se genotiparon inicialmente 269 individuos de 4 poblaciones con diferente origen étnico (Yoruba de Nigeria, japoneses de Tokio, chinos Han de Pekín y estadounidenses de origen europeo de Utah). Posteriormente el estudio se extendió a 1184 muestras que incluyeron otras 7 poblaciones (sujetos de origen africano del suroeste de Estados Unidos, chinos del área metropolitana de Denver, Colorado (EUA), indios Gujatari de Houston, Texas (EUA), luhya de Kenia, masai de Kenia, sujetos de origen mexicano de Los Ángeles (EUA) y sujetos de Toscana, Italia. Se ha mostrado que poblaciones de diferente

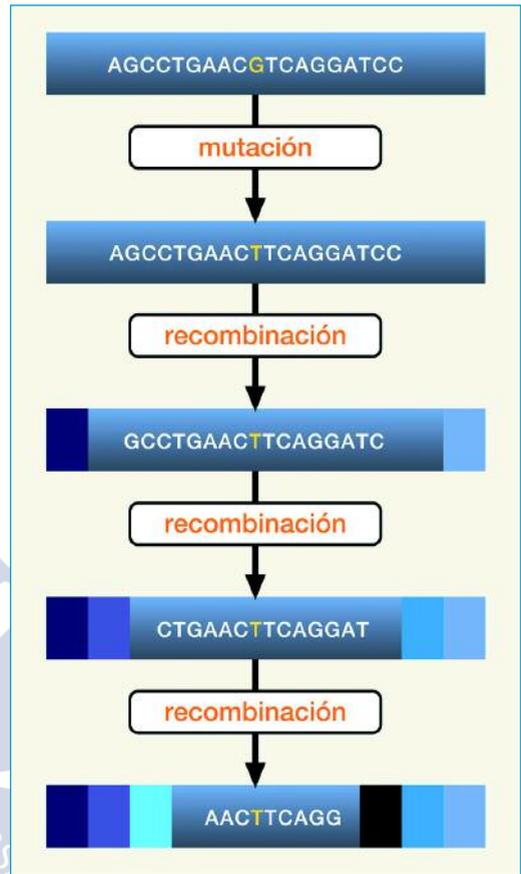


Figura 17. Sucede una mutación, una guanina (G) se sustituye por una timina (T). Tras varias recombinaciones cromosómicas, el material genómico más próximo es el que se hereda en bloque junto a la mutación.

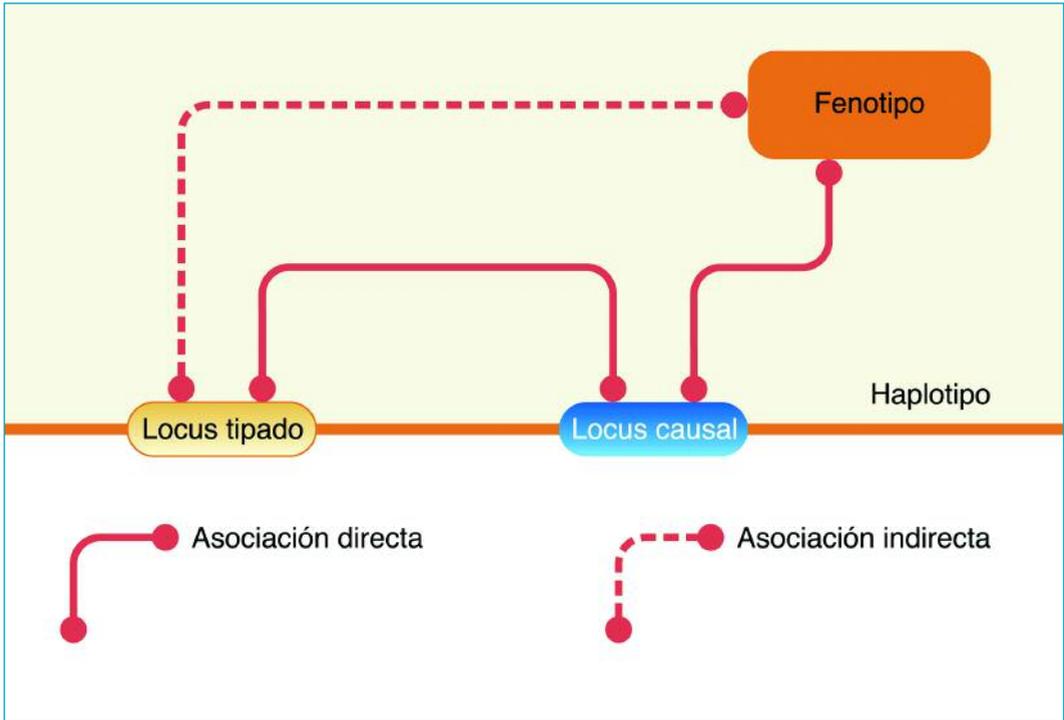


Figura 18. El marcador contenido en el locus tipado (izquierda) está en LD con el locus causal (ambos se heredan conjuntamente). El locus causal da lugar al fenotipo de la enfermedad estudiada. La asociación entre el marcador y el fenotipo resulta de la doble relación entre ambos y el locus causal (modificado de Balding et al, 2006)

origen comparten la mayoría de los SNP. *HapMap* proporciona un mapa de LD de millones de SNP a lo largo del genoma y permite, a la hora de diseñar un estudio de asociación, seleccionar para una región del genoma de interés *tagSNP* que cubran un bloque haplotípico. Se ha calculado que los 10 000 000 de SNP de un individuo dado se pueden estudiar con 500 000 *tagSNP* (Gabriel et al, 2002)

El número de polimorfismos requeridos dependió en parte de las diferentes regiones genómicas, en particular del grado de desequilibrio de LD existente. La existencia de LD significativo a lo largo de una región genómica extensa reduce considerablemente el número de polimorfismos que es necesario analizar en dicha región hasta un SNP cada 50 o 100 Kb.

3. CÁLCULO ESTADÍSTICO DEL DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

El cálculo del LD es necesario para determinar si un grupo de SNP que han mostrado asociación con una enfermedad forman un bloque haplotípico. Existen diferentes estadísticos para calcular LD.

Si consideremos dos locus bialélicos, de modo que el primer locus tiene los alelos A y a y el segundo locus los alelos B y b, existen 4 haplotipos posibles: AB, ab, Ab y aB.

Las frecuencias haplotípicas se muestran en la tabla. Esta tabla refleja las frecuencias para cada haplotipo en el caso de que los locus fuesen independientes, donde

$$\begin{array}{ll} p_{AB} = p_A p_B & p_{Ab} = p_A p_b \\ p_{aB} = p_a p_B & p_{ab} = p_a p_b \end{array}$$

representan la probabilidad de observar cada haplotipo y p_A , p_a , p_B y p_b representan la frecuencia de cada alelo. Las desviaciones de esta tabla constituyen una evidencia de correlación.

	A	a	
B	p_{AB}	p_{aB}	p_B
b	p_{Ab}	p_{ab}	p_b
	p_A	p_a	1

Lewontin y Kojima en 1960 propusieron el coeficiente de desequilibrio de ligamiento o covarianza D como:

$$D = p_{AB} - p_A p_B$$

(para dos alelos que ocupan diferentes locus)

$$D = p_{AB} p_{ab} - p_{Ab} p_{aB}$$

(para dos pares de alelos, cada par ocupa diferentes locus)

Si la probabilidad de herencia de cada uno de los alelos (que ocupan diferentes locus) fuese independiente, p_{AB} sería igual a $p_A p_B$, por lo que D sería igual a 0. Cuanto mayor sea D, mayor es la probabilidad de que ambos alelos se hereden juntos. También puede ocurrir que D sea negativo, lo que significa que la probabilidad de heredar ambos alelos juntos es menor de la esperada.

D expresa la diferencia entre la frecuencia observada de herencia de 2 o más alelos que ocupan diferentes locus y la frecuencia esperada si se heredasen de forma independiente.

El estadístico D presenta el inconveniente de que su magnitud depende de las frecuencias de los alelos en los locus considerados.

Por este motivo Lewontin en 1964 estandarizó D al máximo valor posible que puede tomar:

$$D' = \frac{D}{D_{\text{máx}}}$$

donde $D_{\text{máx}}$ es el máximo valor de D para las frecuencias alélicas dadas.

$$D_{\text{máx}} = (\min p_A p_B, p_a p_b) \text{ si } D < 0 \text{ y } (\min p_A p_B, p_a p_b) \text{ si } D > 0$$

D' toma valores entre -1 y 1 y permite establecer el grado de desequilibrio de ligamiento relativo al máximo valor posible que puede tomar. Normalmente se emplea el valor absoluto de D' , es decir $|D'|$

Otra medida de desequilibrio de ligamiento la proporciona r^2 , coeficiente de correlación (Hill y Robertson, 1968):

$$r^2 = \frac{D^2}{p_A p_a p_B p_b}$$

r^2 varía entre 0 y 1, $r^2 = 1$ implica LD perfecto, lo que indica una relación determinista. Si, por el contrario, su valor es 0, ambos marcadores son completamente independientes. Por lo tanto es importante conocer el grado de desequilibrio en el que se encuentran 2 ó más alelos dados, pues si el grado es alto el análisis de más de uno de los SNP es redundante.

4. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO. EL EQUILIBRIO DE HARDY WEINBERG (EHW)

Para poder hacer un estudio de casos y controles en una población es necesario que esté en equilibrio de Hardy Weinberg (EHW). La ley de Hardy Weinberg (HW) es una ecuación binomial que se aplica a ciertas poblaciones para calcular las frecuencias genotípicas (Hartwell *et al*, 2011b). Las poblaciones a las que se puede aplicar esta ecuación han de cumplir unos criterios. Se dice entonces que esa población está EHW. Los criterios son:

1. Se trata de una población infinita
2. Los entrecruzamientos ocurren al azar
3. No hay mutaciones en la población
4. No hay migraciones en la población
5. Las diferentes variantes alélicas de un locus no influyen en la capacidad de supervivencia del individuo

Pese a que estas asunciones no se cumplen en la práctica, la ecuación resultante de la ley de HW resulta muy robusta en poblaciones grandes durante unas pocas generaciones.

Aplicando la ley de HW, si se considera un locus con dos alelos posibles A y a cuyas frecuencias son $p_A = p$ y $p_a = 1 - p = q$, el número de copias del alelo A sigue una distribución binomial $\text{Bin}(2,p)$. Por lo tanto las probabilidades de los genotipos (frecuencias genotípicas) AA, Aa y aa serán p^2 , $2pq$ y q^2 respectivamente. La probabilidad de que un alelo aparezca en un homólogo es independiente de que alelo esté presente en el segundo homólogo.

De este modo $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. En el siguiente ejemplo, se atribuye a $p_A = p = 0,8$ y $p_a = q = 0,2$. A partir de las frecuencias alélicas se pueden calcular las frecuencias genotípicas:

		p	q
		0,8	0,2
p	0,8	AA 64 %	Aa 16 %
	q	0,2	aA 16 %

Genotipos de la primera generación
de dos individuos heterocigotos Aa
p = frecuencia del alelo A
q = frecuencia del alelo a

En este ejemplo, $p^2 (0,64) + 2pq (0,32) + q^2 (0,04) = 1$

Es decir, en una población que cumpla las características anteriores, las probabilidades de heredar cada uno de los alelos se mantiene de una generación a otra.

Dados los genotipos, las frecuencias alélicas observadas y esperadas se pueden comparar empleando diferentes estadísticos (χ^2 ,

prueba de Fisher,...). De este modo se comprueba si la población considerada está en equilibrio de HW.

En los estudios de asociación es necesario verificar que los SNP genotipados se encuentran en equilibrio de HW en la población considerada. Si esto no se cumple, las comparaciones entre casos y controles resultan muy complicadas ya que no se podrá determinar si una asociación dada tiene que ver con la enfermedad o con la heterogeneidad de la población.

5. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN ALÉLICA. MODELOS DE HERENCIA

El genotipo de un individuo para un determinado marcador viene dado por la combinación de los dos alelos en el locus considerado. Si se denominan los dos posibles alelos como A y a, asumiendo a como el alelo más frecuente o natural (*wild type*) y A el alelo menos frecuente, existen tres posibles genotipos: el genotipo AA será el homocigoto para el alelo menos frecuente, Aa el heterocigoto y aa el homocigoto para el alelo más frecuente.

Por lo tanto, para cada SNP hay tres posibles genotipos. Basándose en este hecho, se pueden evaluar diferentes modelos genéticos para describir la relación entre el genotipo de un individuo y el fenotipo o rasgo. En el contexto de los estudios de asociación genética, el fenotipo se refiere la presencia o ausencia de una determinada enfermedad. En una escala binaria se denomina Y, de modo que

Y = 1	afectados (casos)
Y = 0	no afectados (controles)

En el caso de enfermedades mendelianas los modelos genéticos son determinísticos: el genotipo determina el fenotipo. En el caso de las enfermedades complejas, la relación entre el genotipo y el fenotipo es más compleja. Se establece una relación probabilística, el genotipo influye en las probabilidades de desarrollar la enfermedad.

Dado el genotipo de un individuo (G), el efecto probabilístico del locus en el fenotipo Y viene descrito por $P(Y|G)$, que se denomina función de penetrancia y define la probabilidad de enfermedad condicionada al genotipo (Laird y Lange, 2011)

Los cuatro modelos de herencia más empleados en genética estadística son los siguientes:

1. Modelo codominante. Es el más general. Se consideran los tres genotipos por separado suponiendo que cada uno proporciona un riesgo de enfermedad diferente. No se hacen otras consideraciones

$$P(Y=1|AA) \neq P(Y=1|Aa) \neq P(Y=1|aa)$$

2. Modelo dominante. Solo es necesaria una copia del alelo de riesgo para tener un efecto sobre el genotipo. Supone que una única copia del alelo A es suficiente para modificar el riesgo y poseer dos copias del alelo lo modifica en igual magnitud.

$$P(Y=1|AA) = P(Y=1|Aa) = 1 \text{ y } P(Y=1|aa) = 0$$

3. Modelo recesivo. Son necesarias dos copias del alelo de riesgo A para modificar el riesgo de enfermedad.

$$P(Y=1|aa) = P(Y=1|Aa) = 0 \text{ y } P(Y=1|AA) = 1$$

4. Modelo aditivo. Dependiendo de la escala, la probabilidad del genotipo heterocigoto están entre la de los dos homocigotos. El riesgo asociado al heterocigoto es intermedio entre los dos homocigotos.

En escala lineal:

$$P(Y=1|Aa) = 0,5 [(Y=1|AA) + (Y=1|aa)]$$

En escala log (multiplicativa):

$$P(Y=1|Aa) = \sqrt{P(Y=1|AA) P(Y=1|aa)}$$

Estos genotipos, que constituyen variables categóricas se recodifican como variables numéricas o indicadoras. A continuación se muestra la codificación de los genotipos según los diferentes modelos genéticos.

Genotipo	Codominante	Dominante	Recesivo	Aditivo
aa	0 0	0	0	0
Aa	1 0	1	0	1
AA	1 1	1	1	2

6. EL CONTROL DE CALIDAD DE LAS MUESTRAS

Antes de proceder al análisis estadístico de la muestras obtenidas han de aplicarse una serie de controles de calidad que descarten la eventual existencia de sesgos (Anderson *et al*, 2010). El control de calidad se aplica tanto a los individuos como a los marcadores.

En el caso de los individuos, deben determinarse para su posible descarte:

1. individuos con información discordante en cuanto al sexo,
2. individuos que sobrepasan un umbral (entre 3-7 %) de genotipos perdidos,
3. individuos duplicados o emparentados,
4. individuos con diferentes orígenes genéticos.

En cuanto a los marcadores, ha de considerarse la exclusión de:

1. SNP con un exceso de genotipos perdidos,
2. SNP que se desvíen del equilibrio de Hardy Weinberg en el grupo control,
3. SNP con diferencias importantes en cuanto a genotipos perdidos entre los casos y los controles,
4. marcadores con una frecuencia del alelo menor (MAF) muy baja.

Los genotipos perdidos se determinan mediante programas matemáticos denominados algoritmos de determinación del genotipo, que estiman la probabilidad de los posibles genotipos en un determinado marcador (p.e. AA, AT, TT). Se establece un umbral. Si la probabilidad de alguno de los genotipos no supera este umbral, será un genotipo perdido.

Para un determinado genotipo (G) se aplica la proporción de la tasa de determinación por muestra (*call rate per simple*) para calcular los genotipos perdidos por cada SNP.

$$\text{Tasa de determinación por muestra} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de individuos con G perdido}}{\text{n}^\circ \text{ total de individuos}}$$

Para el cálculo de la proporción de genotipos perdidos en un individuo dado:

$$\text{Genotipos perdidos por individuo} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de SNP con genotipos perdidos}}{\text{n}^\circ \text{ total de SNP analizados}}$$

(Sullivan y Purcell, 2010)

7. IMPUTACIONES DE DATOS NO OBTENIDOS

Los métodos de imputación se basan en la comparación de los polimorfismos de una localización cromosómica pertenecientes a una muestra de individuos de una población genéticamente homogénea con un panel de referencia formado por individuos genotipados en locus similares de una población genéticamente similar (Howie et al, 2009). El panel de referencia más empleado es el proyecto internacional *HapMap*.

Estos métodos se basan en dividir los SNP genotipados en dos grupos:

1. tipados (T), que se encuentran en la muestra y en el panel de referencia,
2. no tipados (U), que no se encuentran en la muestra y sí en el panel de referencia.

Se asume que los haplotipos que muestran coincidencias en T, también las mostrarán en U. De este modo se extrapolan los resultados de los marcadores de la muestra a los marcadores de referencia del panel, con lo que se incrementa el número de marcadores del haplotipo de la muestra.

Los métodos de imputación emplean algoritmos matemáticos y pueden estimar con gran exactitud genotipos no observados, de modo que la probabilidad de encontrar asociaciones verdaderas es mayor.

i. Selección de pacientes y controles

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

La población del estudio la constituyeron pacientes diagnosticados de EP, originarios de la Comunidad Autónoma de Galicia (población 2 747 559 habitantes, datos del Instituto Nacional de Estadística, 1 de enero de 2014). Por razones logísticas, la mayoría de ellos pertenecían al área sanitaria de Santiago de Compostela. No existen estudios epidemiológicos sobre el número de pacientes con EP en el área sanitaria de Santiago. Aplicando estudios de prevalencia en la población general realizados en otras áreas de España (Artacoza Sanz *et al*, 1995; Criado Álvarez *et al*, 1998; Martínez Suárez y Blázquez Menes, 2000) se puede estimar un número entre 750 y 1000 personas con la enfermedad. Esta prevalencia permitió garantizar que se alcanzaría un número mínimo de 200 casos para incluir en la presente investigación.

La diversidad genética de la población de estudio es muy baja (Flores *et al*, 2004). La situación geográfica de Galicia, en el noroeste peninsular y aislada por cadenas montañosas del resto de la Península ha hecho que las inmigraciones fuesen, hasta tiempos recientes, irrelevantes como se expuso anteriormente (Brion *et al*, 2004). Esta característica socio-geográfica de Galicia hace que, para polimorfismos autosómicos comunes, no exista estratificación genética relevante en la población gallega. Por ello se trata de una población adecuada para estudios genéticos basados en un diseño de casos y controles con marcadores autosómicos frecuentes, aunque en este tipo de poblaciones es necesario tener más cautela cuando se usan marcadores genéticos poco frecuentes o raros ($MAF < 5\%$) debido a la posible existencia de parentesco oculto.

2. GRUPO DE ESTUDIO. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

El diagnóstico de la enfermedad de basa exclusivamente en criterios clínicos. Para minimizar sesgos de selección solamente se incluyeron los pacientes que cumplieron los criterios de Gelb *et al*, 1999, para el diagnóstico probable de EP (Anexo II). Se descartaron los criterios de la UK *Parkinson's Disease Brain Bank Society* (Hughes *et al*, 1992b) porque excluye la enfermedad en el caso de tener más de un familiar afectado (Anexo III). El que los criterios de Gelb para diagnóstico probable de EP requiera un mínimo de 3 años de evolución de la enfermedad disminuye la probabilidad de incluir otros parkinsonismos degenerativos. La inclusión se realizó de acuerdo a los siguientes **criterios**:

- a. Diagnóstico de EP **probable** según los criterios de Gelb (Anexo II).
- b. Al menos 3 abuelos de padres gallegos
- c. Obtención de consentimiento informado (Anexo IV)

No se incluyeron en el estudio de asociación miembros de la misma familia. Tampoco se incluyeron pacientes con mutaciones conocidas de los genes *PARK2* o *LRRK2*, ya que su patogenia es diferente de la EP idiopática.

No se consideró límite de edad.

Las variables clínicas que se midieron en estos pacientes figuran en la tabla 9.

3. GRUPO CONTROL. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se analizó un grupo control de sujetos sin EP. Para evitar sesgos de selección se trató de minimizar la posibilidad de que los sujetos de este grupo desarrollasen EP, por lo que se aplicaron los siguientes criterios de inclusión:

- a. Edad mayor de 60 años
- b. Ausencia de datos de parkinsonismo en la exploración neurológica
- c. Al menos 3 abuelos de padres gallegos

Variables clínicas que se evaluaron en el grupo de pacientes.		
Variable	Definición	Escala
Edad	Edad en el momento del diagnóstico	Años cumplidos
Sexo		Hombre / Mujer
Síntoma predominante	Síntoma que domina inicialmente	T / BR*
Años de evolución	Años desde el inicio de la EP	Años
Complicaciones precoces	Discinesias o fluctuaciones en los 3 primeros años	Sí / No
Antecedentes familiares	EP o demencia en familiares de 1º o 2º grado	Sí (1º / 2º grado) / No

*T: temblor; BR: bradicinesia-rigidez

Tabla 9. Variables clínicas que se evaluaron en el grupo de pacientes.

- d. Ausencia de antecedentes de parkinsonismo por fármacos
- e. Ausencia de antecedentes familiares de EP
- f. Ausencia de historia de depresión
- g. Ausencia de otra enfermedad neurológica relevante
- h. Obtención de consentimiento informado (Anexo V)

El criterio a. se incluyó porque la posibilidad de desarrollar la enfermedad disminuye conforme decrece la esperanza de vida. Por esta razón solamente se incluyeron personas de edad media avanzada (mayores de 60 años).

El criterio c. se justifica para igualar la variable origen geográfico al grupo de pacientes y minimizar un posible efecto de estratificación genética poblacional en las presumibles diferencias observadas.

Los criterios d. y e. se establecieron con el fin de excluir a sujetos que tienen una mayor predisposición a padecer la EP. También se ha constatado que en pacientes con EP la depresión puede formar parte de la enfermedad y anteceder a los problemas motores, por lo que se prefiere excluir a sujetos con este trastorno psiquiátrico (criterio f).

En cuanto a los datos de los sujetos control tan solo se incluyó el sexo y la edad en el momento en que se tomó la muestra.

4. RECLUTAMIENTO Y TOMA DE MUESTRAS

La mayoría de los pacientes (73,7%) se reclutaron de las consultas de la Unidad de Trastornos del Movimiento del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. El 26,3% restante de los pacientes se enviaron del Hospital General de Vigo, del Hospital de Pontevedra y del Hospital San Rafael de La Coruña, donde se evaluaron por otros neurólogos del equipo investigador. Los criterios de selección para los pacientes se diseñaron buscando la mayor especificidad posible, por lo que no se realizó la inclusión de ningún paciente en el caso de que hubiese duda o información incompleta. El objetivo de esta selección fue evitar incluir en la medida de lo posible pacientes que no tuviesen realmente EP.

La Unidad de Trastornos del Movimiento (UTM) del Servicio de Neurología del Hospital Clínico comenzó a finales de los 80 como una consulta semanal monográfica a cargo de uno de los directores de este trabajo. En dicha consulta se veían pacientes con EP y otros trastornos del movimiento y se infiltraba toxina botulínica. En los años siguientes la UTM fue creciendo con un aumento progresivo del número de consultas semanales. En 2001, en colaboración con los servicios de Neurocirugía y Neurofisiología, se comenzó con el tratamiento quirúrgico de la EP avanzada y otros trastornos del movimiento. Desde 2004 la UTM está formada por 3 neurólogos, entre los que están uno de los directores de este trabajo y el autor. Además de la colaboración permanente con miembros de los servicios de Neurocirugía y Neurofisiología para la realización de cirugía de estimulación cerebral profunda, la UTM cuenta también con una neuropsicóloga.

En la actualidad se realizan 3 consultas semanales de trastornos del movimiento, 3 consultas de EP avanzada, 2 de valoración prequirúrgica y seguimiento posquirúrgico, 2 consultas para tratamiento con toxina botulínica. Cada mes se consultan 80 – 100 pacientes con EP. La UTM es centro de referencia nacional para cirugía de EP y otros trastornos del movimiento. A finales de 2013 se habían llevado a cabo 206 cirugías de estimulación cerebral profunda. Además se tratan de forma rutinaria EP avanzada con tratamientos de infusión (apomorfina y levodopa duodenal). A finales de 2013 se habían colocado 163 infusores de apomorfina, de los que 69 estaban activos, y 6 infusores de levodopa intraduodenal, 4 activos.

Por lo tanto se trata de una unidad con una amplia experiencia en el diagnóstico y tratamiento de la EP en todas sus fases evolutivas.

Durante el período de abril de 2005 a febrero de 2007 en las consultas de la UTM, a los pacientes, evaluados por el autor, que cumplían los criterios previamente establecidos se les propuso participar en el estudio. Aunque se disponía de bases de datos de pacientes, no fue necesario recurrir a este método para el reclutamiento. El elevado volumen de consulta de pacientes con EP llevado a cabo mensualmente en la UTM garantizaba alcanzar el número de casos previstos en un tiempo razonable, con un reclutamiento prospectivo. Todos los pacientes candidatos para el estudio ya se habían diagnosticado previamente al día del reclutamiento, pues uno de los criterios de inclusión era que llevaran un mínimo de 3 años con síntomas motores. El diagnóstico de la EP fue clínico, basándose en la presencia de bradicinesia con rigidez o temblor, afectación asimétrica y respuesta mantenida a la medicación dopaminérgica. No se realizaron pruebas complementarias diagnósticas ya que no son necesarias según los criterios aplicados en la actualidad internacionalmente para el diagnóstico de la EP. Si bien a alguno de los pacientes se le había realizado un SPECT BCIT en fases anteriores de la enfermedad, cuando el diagnóstico no era tan claro. Se incluyeron algunos pacientes que cumplían los criterios, vistos por primera vez en la UTM, previamente diagnosticados en otras áreas sanitarias.

Los pacientes con algún síntoma que no encajase con el tiempo de evolución de la enfermedad (p.e. disfagia, alteraciones autonómicas, caídas frecuentes u oftalmoplejia en estadios intermedios) o con síntomas atípicos (p.e. síndrome cerebeloso) no se incluyeron. La falta de respuesta al tratamiento en estadios muy avanzados no fue criterio de exclusión, ya que es una manifestación de la evolución natural de la EP.

En las entrevistas se explicó a los pacientes en qué consistía el estudio, su objetivo principal, metodología y riesgos, y si estaban de acuerdo en donar una muestra de ADN, previa firma de un consentimiento informado específicamente diseñado y aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica de Galicia (Anexo IV). Se recalcó que la participación era completamente voluntaria, que no se beneficiarían directamente del estudio, que solamente el equipo investigador conocería el origen de las muestras y que no se les co-

municaría ningún resultado a título individual, salvo en aquellos casos en que se identificase la presencia de una mutación patogénica (es decir, que se diagnosticase una forma mendeliana de la enfermedad).

A los pacientes que refirieron antecedentes familiares de EP se les solicitó una información más detallada de sus relaciones familiares y de los parientes afectados para poder realizar un árbol genealógico. Los datos clínicos de los pacientes, codificados, junto con las variables clínicas consideradas (ver apartado 2), se introdujeron en una base de datos construida específicamente para esta investigación mediante el programa *Microsoft Excel*®.

Los controles se reclutaron, siguiendo los criterios del apartado 3, en diversos centros de Galicia, la mayoría de ellos en el área sanitaria de Santiago de Compostela y algunos en el área de La Coruña. Se siguieron diferentes estrategias:

1. Cónyuges de los pacientes del estudio
2. Sujetos sin datos de enfermedad degenerativa ni otras patologías relevantes que acudieron a la consulta de Neurología por otros motivos o como acompañantes
3. Visitas programadas a centros de salud, asociaciones y residencias de mayores.

A los posibles controles se les explicó en qué consistía el estudio y si estaban de acuerdo en donar una muestra de su ADN previo consentimiento informado (Anexo V). Como en el caso de los pacientes, se insistió en la voluntariedad, confidencialidad de los datos y ausencia de beneficio directo para ellos y de comunicación de resultados. Los datos codificados de los sujetos control, se introdujeron en la base de datos construida con el programa *Microsoft Excel*®.

Tanto para los pacientes como para los sujetos control, la toma de muestra se hizo en la propia consulta (o en los centros que se visitaron). Se extrajeron 20ml de sangre periférica por venopunción en 2 tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de 10 ml.

ii. Análisis genético

1. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN

1.1 Selección de genes candidatos

La selección de genes se basó en los que codifican proteínas que intervienen en la patogenia de la enfermedad, detallada en *Antecedentes*. También se incluyeron algunos en los que previamente se había demostrado asociación, con el objetivo de validar la metodología del estudio.

Se emplearon las bases de datos *Genetic Association Database* (<http://geneticassociationdb.nih.gov/>), *PDGene* (<http://www.pdgene.org>) y *PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para una rápida selección de genes asociados a EP en estudios previos. Utilizando el programa *Excel*® se elaboró una base de datos preliminar de genes candidatos, agrupados en categorías según la ruta biológica implicada. Posteriormente la selección se redujo y se centró principalmente en los genes implicados en los mecanismos de degradación intracelular de las proteínas, especialmente en el sistema ubiquitina proteasoma. En concreto se analizaron los componentes del proteasoma y proteínas relacionadas junto con los sustratos de la parkina. Además se incluyeron en la selección del presente estudio genes que ya habían mostrado previamente asociación con la EP (*MAPT*, *SNCA*) así como genes con resultado de asociación positivo en un estudio de asociación de todo el genoma que se acababa de publicar cuando se llevó a cabo este trabajo (Maraganore *et al*, 2005)

El listado de la selección final de genes es el siguiente:

1.1.1 Genes para los que previamente se había mostrado

asociación con EP: *SNCA* (synuclein, alpha non A4 component of amyloid precursor; 4q21.3-q22); *MAPT* (microtubule-associated protein tau; 17q21)

Aparte estos SNP, se incluyeron otros 13 que en un estudio de todo el genoma realizado en 2005 por Maraganore *et al* mostraron asociación con la EP. De esos 13 SNP, 4 se encontraron en locus ocupados por genes conocidos:

- *SEMA5A* (*semaphorin 5A*; 5p15.31): se ha mostrado que la proteína homónima, semaforina 5A, está sobreexpresada en la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) de pacientes con EP (Grünblatt *et al.*, 2004). Interviene en el desarrollo neuronal ejerciendo de guía de los axones. Inicia la apoptosis neuronal
- *GALNT3* (*UDP-GalNAc transferase 3*; 2q24.3): codifica la proteína homónima, enzima que transfiere grupos N-acetilgalactosamina. Se ha mostrado que determina el grado de diferenciación y agresividad de algunos tumores (Taniuchi *et al.*, 2011).
- *PRDM2* (*PR domain zinc finger protein 2*; 1p36.21): la proteína homónima, también llamada RIZ (*retinoblastoma protein-interacting zinc-finger*), se une al cinc, interviene en la transcripción, tiene función de supresor tumoral, interviene en la diferenciación celular y se une al receptor de estrógenos (Abbondanza *et al.*, 2012).
- *PASD1* (*PAS domain-containing 1*; Xq28): la proteína homónima es un transductor de señal (Liggins *et al.*, 2004).

Los 9 SNP restantes ocupaban locus no codificantes.

1.1.2 Genes que codifican las subunidades del proteasoma 26S:

a. Proteasoma 20S

- Subunidades α : *PSMA1* (11p15.1), *PSMA2* (7p13), *PSMA3* (14q23), *PSMA4* (15q25.1), *PSMA5*(1p13), *PSMA6* (14q13), *PSMA7* (20q13.33).
- Subunidades β : *PSMB1*(6q27), *PSMB2* (1p34.2), *PSMB3* (17q12), *PSMB4* (1q21), *PSMB5* (14q11.2), *PSMB6* (17p13), *PSMB7* (9q34.11)

b. Proteasoma 19S

- Subunidades ATPásicas: *PSMC1* (14q32.11), *PSMC2* (7q22.1-22.3), *PSMC3* (11p13), *PSMC4* (19q13.11-13.13), *PSMC5* (17q24-q25), *PSMC6* (14q.22.1).

- Subunidades no ATPásicas: *PSMD1* (2q37.1), *PSMD2* (3q27.1), *PSMD3* (17q21.2), *PSMD4* (1q21.2), *PSMD5* (9q34.11), *PSMD6* (3p14.1), *PSMD7* (16q22.1), *PSMD10* (Xq22.3), *PSMD11* (17q12), *PSMD12* (17q24.3), *PSMD13* (11p15.5), *PSMD14* (2q14.3).

c. Genes que codifican otras proteínas relacionadas con el proteasoma

- *NOB1* (*NIN1/RPN12-binding protein 1, S cerevesiae homolog of; 16q22.3*): previamente llamado *PSMD8 binding protein 1*. Codifica una proteína homónima implicada en la maduración del ARN ribosómico. Se une al proteasoma (Zhang Y et al, 2005).

1.1.3 Genes que codifican sustratos de la parkina (ver *PARK2. Mutaciones del gen de la parkina* en la sección *Antecedentes*), otras proteínas con función de ligasa de ubiquitina y proteínas relacionadas con el estrés proteico.

- a. *CCNE1* (*Cyclin E1; 19.q12*): codifica la ciclina E1.
- b. *GPR37* (*Probable G-protein coupled receptor 37; 7q31*): codifica la proteína homónima, llamada también Pael-R (*Parkin-associated endothelin receptor-like receptor*)
- c. *SEPT5* (*septin 5; 22q11.2*): codifica la proteína homónima septina 5, llamada también CDCrel-1 (*cell division control related protein 1*)
- d. *SNCAIP* (*synuclein alpha interacting protein; 5q23.2*): codifica la sinfilina 1.
- e. *SYT11* (*synaptotagmin 11; 1q22*): codifica la sinaptotagmina XI.
- f. *SKP1A* (*S-phase kinase-associated protein 1; 5q31*): codifica la proteína homónima. Forma parte del complejo SCF (*Skp, Cullin, F-box containing complex*).
- g. *HSPB2* (*heat shock 27kDa protein 2; 11q22.3-q23.1*): codifica la cristalina α B (CRYAB), una chaperona molecular que forma parte de los cuerpos de Lewy. En condiciones normales evita la agregación proteica, proceso que, sin embargo, favorece en caso de sobreexpresión, dando lugar a la formación de fibras de amiloide (Meehan et al, 2007)

1.2 Selección de SNP

La selección de SNP en los genes diana para este trabajo se llevó a cabo utilizando las bases de datos públicas dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov) y *HapMap* (www.hapmap.org). También se empleó la base *Functional Element SNP database* (FESS; <http://combio.kribb.re.kr/FESD>). Esta página ya no está disponible, puesto que existe una nueva versión (FESD II; <http://sysbio.kribb.re.kr:8080/fesd/>). Para su utilidad en el estudio de asociación, las características que debieron cumplir los SNP seleccionados fueron: 1) una frecuencia MAF > 10%; 2) los SNP debían haberse validado en poblaciones caucásicas; 3) $r^2 \leq 0,85$.

Con los requisitos anteriores, se dio prioridad a SNP con posible efecto funcional. Se consideran SNP potencialmente funcionales aquellos que se localizan en exones y cambian el sentido de lectura, los SNP de regiones promotoras, posibles sitios de unión de factores de transcripción o sitios de corte y empalme (*splicing*) y aquellos situados en regiones muy conservadas entre especies. Para esta finalidad está disponible el programa PupASNP (<http://pupASNP.bioinfo.cnio.es>) desarrollado por el grupo de bioinformática del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) para ayudar en la búsqueda de SNP con potencial efecto funcional en la región genómica de interés (Conde *et al.*, 2004). Los SNP de mayor valor son los que se encuentran en regiones conservadas en la escala filogenética. Para comprobar si la región del genoma estudiada cumple estas características se puede utilizar la aplicación *USCS Genome Bioinformatics* (<http://genome.uscs.edu>)

Otra herramienta útil que se empleó para la selección de SNP en los genes candidatos es el *Genome Browser* mantenido por el Instituto Sanger (<http://www.ensembl.org>). Este buscador permite, en cada gen de interés, una visualización esquemática de su estructura y un resumen de los SNP en la región. La información obtenida en dbSNP se complementó con la utilización del programa *SNPbrowser 2.0*® de distribución gratuita por *Applied Biosystems*, así como las bases de datos privadas de *CELERA* (www.celeradiscoverysystem.com) y *SEQUENOM* (www.realsnp.com).

Para seleccionar los SNP informativos en regiones más polimórficas (*tagSNP*) se utilizó información de población caucásica depositada en *HapMap* (www.hapmap.org). El programa *Haploview*

(Barret et al, 2005) se empleó para identificar los tagSNP a partir de conjuntos de SNP en desequilibrio de ligamiento, en cada región génica candidata.

En el Anexo VI se explica con más detalle el método seguido para seleccionar los SNP. Las versiones de los programas utilizados han cambiado, por lo que las capturas de pantallas presentadas son diferentes a las disponibles actualmente.

Se seleccionaron 5-10 SNP por cada gen candidato, dependiendo del tamaño del gen y grado de desequilibrio de ligamiento en la región. Este objetivo en algunos casos no se pudo alcanzar, ya que la densidad de SNP identificados y depositados en las bases de datos públicas es variable de unas regiones a otras del genoma.

En el anexo VII se detalla el listado completo de SNP genotipados en el conjunto de todos los genes estudiados.

1.3 Extracción del ADN

A partir de las muestras de sangre periférica obtenidas de pacientes y controles se extrajo el ADN genómico mediante un procedimiento de centrifugación y purificación a través de una membrana de silica gel. Se aplicó el *Wizard Genomic DNA Purification Kit*[®] (*Promega Corporation*, Madison, WI, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante. La pureza y concentración de ADN se cuantificaron mediante un espectrofotómetro *Nano Drop ND-1000* (*Thermo Scientific*). Se prepararon alícuotas de trabajo a 50-100 ng/ μ l, a partir de las cuales se prepararon las muestras en formato de placas de 96 pocillos, en cantidad y concentración requeridas para las diferentes plataformas de genotipado.

1.4 Genotipado

Para llevar a cabo el genotipado se contrató el servicio del CeGen. El nodo de CeGen en Galicia tiene su sede en el Hospital Clínico de Santiago. En este nodo disponen de las plataformas de análisis *MassArray* (*Sequenom*[®]) y *SNPlex*[™] (*Applied Biosystems*). Mientras esta última plataforma es apropiada para proyectos a gran escala como el propuesto, la tecnología *Sequenom* es adecuada para proyectos de media-gran escala, con menor número de SNP. En este estudio básicamente se ha empleado la plataforma *SNPlex*[™]

(Applied Biosystems). La producción de genotipos se completó con MassArray (Sequenom®) para algunos SNP que presentaron dificultades técnicas en SNPlex. Una vez seleccionados los SNP para analizar se hizo llegar al CeGen el listado completo. En el CeGen se diseñaron los plexes de polimorfismos (conjunto de SNP analizados en una misma reacción).

1.4.1 Genotipado por SNPlex®

La técnica de SNPlex™ (Sobrino *et al*, 2005) se realiza en placas de 384 pocillos (una muestra de ADN por pocillo), con la posibilidad de análisis de hasta 48 SNP simultáneamente. La capacidad potencial semanal es de 70.656 genotipos, con una precisión mayor del 99,5% y un porcentaje de éxito mayor del 95%. La alta capacidad de discriminación alélica se debe a una reacción de ligación específica de alelo (*OLA, oligonucleotide ligation assay*), en la que a la región adyacente al SNP se unen un oligonucleótido común y un oligonucleótido complementario al SNP en el extremo 3'. La ligación, se produce únicamente cuando hay una complementariedad perfecta de los dos oligonucleóticos con el ADN genómico.

La ligación se sigue de una purificación con exonucleasa que elimina todas las moléculas de ADN de la muestra, excepto las resultantes de la ligación específica del alelo. En cada pocillo se comienza el ensayo con cantidades inferiores a un nanogramo de ADN genómico por SNP. Una vez obtenidos los productos de la ligación se amplifican por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con cebadores (*primers*) universales, cuya secuencia es complementaria a las regiones externas de los productos de ligación específicos del alelo. Uno de estos cebadores universales está marcado en el extremo 5' con biotina, cuya afinidad por la estreptavidina se emplea para la fijación de la molécula de ADN en una placa.

Posteriormente se lleva a cabo la hibridación de sondas *ZipChute*, que contienen una secuencia única complementaria a una porción específica del producto de PCR de cadena simple. Tras un paso de lavado se realiza la elución de las sondas a una placa. Las sondas *ZipChute* contienen fragmentos modificadores de la movilidad y están marcadas con un fluorocromo (FAM™, dR6G o LIZ®), lo que posibilita una detección multiplex cuando las muestras se separan por electroforesis capilar en un analizador de ADN ABI3730xl (*Ap-*

plied Biosystems), con una resolución inferior a 2 nucleótidos. Las lecturas de los genotipos se generan con el software *GeneMapper* v3.5.

1.4.2. Genotipado por MassArray (Sequenom®)

MassArray (Sequenom®) es una plataforma para análisis cuantitativo de frecuencias alélicas mediante espectrometría de masa, que alcanza un alto nivel de eficiencia a través del análisis *multiplex* de SNP (potencialmente hasta 10-12 por reacción) y de mezcla (*pooling*) de muestras de ADN (Bansal *et al.*, 2002). En cada reacción se utilizan 25 ng de ADN, dos cebadores específicos para el locus de interés diseñados con el software *MassARRAY® Assay Design* y un cebador universal marcado con biotina. Los productos de PCR se inmovilizan sobre partículas paramagnéticas cubiertas con estrep-tavidina y se obtiene de cada producto mediante desnaturalización una cadena única que será utilizada para la reacción de extensión del primer (*MassEXTEND*). Para esta reacción se utiliza un cebador específico y una mezcla de terminación de tres dideoxinucleótidos.

Los productos así obtenidos se resolubilizan del soporte sólido y 15 nl de muestra se transfieren con un pipeta piezoeléctrica a un chip de silicón sobre el que tiene lugar el análisis mediante láser con el espectrómetro de masa *MassARRAY®* de *SEQUENOM®*. El analizador *MassARRAY®* utiliza una técnica de espectrometría de masa con deabsorción/ ionización láser asistida por matriz - tiempo de vuelo (MALDI-TOF). En cada ensayo se pueden analizar dos chips, cada uno con 384 productos. Un software incluido con el sistema (*MassARRAY® Typer*) se utiliza para la recogida y el análisis de los datos.

Para la determinación de frecuencias alélicas se procesan los espectros de masa y se calcula el área bajo cada pico individual (representando un alelo) dividida por la suma total de área de los picos. Estas áreas representan la estimación de frecuencias alélicas. Se ha validado este método de mezcla de muestras para el cálculo de frecuencias alélicas y se ha estimado que el margen de error es de un 4 % (Bansal *et al.*, 2002).

1.5 Métodos y análisis estadístico

El análisis del poder estadístico se realizó empleando del software *Quanto v.1.2.4* (Gauderman *et al*, 2006). Mediante un modelo logarítmico aditivo, este estudio presenta un poder estadístico de 0.80 para detectar tamaños de efecto moderados ($OR \geq 1,7$ con un error tipo I de 0,05) para SNP con $MAF > 0,10$. Con el mismo modelo genético, considerando que muchos SNP alcanzan MAF hasta de 0,40 el tamaño del efecto detectado podría llegar a $OR = 1,4$ para detectar tamaños de efecto menores, la muestra de este estudio es escasa.

El control de calidad de los datos de genotipado se realizó siguiendo las recomendaciones para estudios de asociación de genes candidatos (Anderson *et al*, 2010). Las diferencias significativas en los genotipados entre casos y controles se valoraron mediante la prueba exacta. La tasa de determinación (*call rate*) mínima para pasar el control de calidad se estableció en 0,80 por muestra y 0,95 por SNP, respectivamente. Es decir, las muestras que no superaron un 80% de SNP genotipados, así como los SNP que no superaron un 95% de muestras genotipadas, no se incluyeron en el análisis final. Además, se excluyeron todos los marcadores con $MAF < 0,10$ así como los SNP que no estuviesen en equilibrio de Hardy Weinberg en controles ($p < 0,01$).

El análisis de asociación se llevó a cabo utilizando el paquete *SNPassoc R package*, perteneciente al programa de estadística R. Se aplicó una regresión logística (González *et al*, 2007) con un modelo logarítmico aditivo. La regresión logística se basa en la ecuación:

$$Y_i = \alpha + \beta X_i$$

donde Y_i representa el genotipo (en este caso EP), X_i corresponde al genotipo de cada individuo (en este caso el alelo menor), β indica cómo varía Y según X y α es el valor que tomaría Y si X fuese 0. Otra manera de calcular la regresión logística es con el cociente de probabilidades (*odds*) entre la probabilidad del genotipo, $p(Y_i)$, y la probabilidad de su ausencia, $1 - p(Y_i)$:

$$ODDS = \frac{p(Y_i)}{1-p(Y_i)} = e^{\alpha + \beta X_i}$$

Con el modelo logarítmico aditivo se considera que el riesgo de los heterocigotos es intermedio entre ambos homocigotos.

La significación estadística se valoró mediante la prueba de razón de verosimilitud (*likelihood ratio test*, LRT), aplicando la ecuación:

$$LRT = 2(\ln Lik_{\text{null}} - \ln Lik_{\text{logadditive}})$$

\ln (o \log) es el logaritmo neperiano o natural (logaritmo cuya base es al número e), siendo

$$e = \lim_{n \rightarrow \infty} \left(1 + \frac{1}{n} \right)^n$$

Lik_{null} es la probabilidad de que $X = 0$, es decir de que el genotipo considerado no se relacione con el fenotipo. $Lik_{\text{logadditive}}$ es la probabilidad de que X tome el valor que le atribuye en este caso el modelo *log-additive*.

Las pruebas de corrección múltiple se realizaron mediante el *False Discovery Rate* (FDR) con el paquete informático *qvalue R* (Storey *et al*, 2003).

LD y el análisis de los bloques haplotípicos, tanto en la muestra como en los datos de HapMap se llevaron a cabo con *Haploview 4.2* (Barret *et al*, 2005)

Para los genes que mostraron SNP con asociación nominal ($p < 0,05$) se realizó una imputación de variantes en regiones candidatas mediante el programa *IMPUTE v2.2*[®] y un panel de referencia de múltiples poblaciones (Howie *et al*, 2009). El análisis de asociación de las variantes imputadas –junto con las genotipadas– se llevó a cabo con *SNPTESTv2*[®] (Marchini *et al*, 2007).

Se realizaron dos análisis estadísticos de forma independiente, con sus correspondientes pruebas de corrección múltiple. Por un lado se consideraron los resultados obtenidos en los polimorfismos de los genes del proteasoma y por otro lado se agruparon el resto de los polimorfismos.

Los resultados obtenidos tanto en el genotipado como en la imputación de marcadores se compararon mediante un metanálisis con *PDGene* (<http://www.pdgene.org/>) con asociaciones previamente descritas en población española. *PDGene* es un recurso muy

útil para comparar los resultados obtenidos con las asociaciones descritas previamente. Presenta los resultados ya publicados por separado o en metanálisis que incluyen tanto genes como polimorfismos.

1.6 Estudio de replicación

Una vez obtenidos los resultados, el estudio de asociación se replicó en una muestra perteneciente a otra población completamente diferente. Esta muestra consistía en 260 controles y 273 pacientes con EP de Ciudad de México y áreas próximas. Los pacientes se reclutaron en la Unidad de Trastornos del Movimiento del Instituto de Neurología y Neurocirugía (INN). Se diagnosticaron según los criterios de *UK PD Society Brain Bank*. Los controles no tenían historia familiar de trastornos del movimiento. Tanto los pacientes como los controles pertenecían al grupo étnico mestizo mexicano de al menos 3 generaciones. El estudio se aprobó por el comité de ética del INN y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado.

Los genes con asociación nominal significativa, aún no validados en población española, se analizaron en la muestra de replicación. El método de análisis de las variantes genotipadas e imputadas fue el mismo que se aplicó en la muestra de estudio. Con el fin de no desestimar regiones potencialmente asociadas, se consideraron también marcadores sugestivos de asociación aunque no hubiesen alcanzado significación estadística.

2. ESTUDIO DE FACTORES MONOGÉNICOS

Los pacientes portadores de mutaciones en alguno de los genes responsables de formas mendelianas de EP no se incluyeron en el estudio de asociación. Estos casos se caracterizaron con mayor detalle, tanto desde el punto de vista clínico como familiar/genealógico. El análisis de determinantes monogénicos consistió en el despistaje de mutaciones en genes causantes de EP y se llevó a cabo en pacientes con historia familiar de EP o edad de inicio juvenil. Este análisis directo se realizó para los siguientes genes:

- a. *PARK2*: se llevó a cabo la búsqueda de mutaciones puntuales en toda la región codificante por secuenciación directa, así como análisis de dosis génica con MLPA®.
- b. *SNCA*: se realizó secuenciación directa y análisis de dosis con MLPA®.
- c. *LRRK2 (PARK8)*: se efectuó la secuenciación de los exones 31 (p.R1441C, p.R1441G, p.R1441H) y 41 (p.G2019S, p.I2020T), para la detección de las mutaciones más frecuentes.
- d. *PINK1, DJ1, UCHL1* y *ATP13A2*: se llevó a cabo análisis de dosis génica con MLPA®.

Las técnicas de análisis genético para la búsqueda de mutaciones en los genes citados fueron las siguientes:

2.1 Análisis de mutaciones por secuenciación

El protocolo de secuenciación comprende la amplificación por PCR de los exones codificantes, en algunos casos toda la región codificante (*PARK2*) y en otros solo algunos exones en los que se hayan descrito mutaciones frecuentes. Para el diseño de cebadores flanqueantes se utilizó el software *Primer3* (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Para excluir la posibilidad de amplificación inespecífica, los cebadores se alinearon con las secuencias de ADN depositadas en las bases de datos públicas en NCBI utilizando BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Los productos de PCR se purificaron mediante digestión por ExoSapIT® y se procedió a continuación a las reacciones de secuenciación con química BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems®). Las sales contaminantes y los terminadores no incorporados se eliminaron mediante filtración con el equipo Montage- SEQ96® (Millipore). Los productos se separaron por electroforesis capilar en un ABI3730xl (Applied Biosystems®). Los electroferogramas se analizaron con el paquete informático *Staden*.

2.2. Análisis de dosis génica por MLPA® (multiplex ligation-dependent probe amplification) (Shouten et al., 2002)

Mediante MLPA® es posible realizar una cuantificación relativa simultánea de más de 40 fragmentos diferentes de ADN. Esta técnica, similar en muchos aspectos a *SNPlex*®, consiste en una combinación de 1) ligación selectiva de un par de sondas específicas cuando están hibridadas a una diana a la que son 100 % complementarias, 2) posterior amplificación de los productos de la ligación mediante PCR con un único par de cebadores complementarios a los extremos de las sondas ligadas, 3) separación de los productos amplificados por electroforesis capilar y 4) detección y cuantificación de los productos mediante fluorescencia. Existen múltiples equipos comerciales (*MRC Holland*) que contienen sondas diseñadas contra dianas de interés agrupadas en función del síndrome clínico (por ejemplo, el equipo para EP contiene sondas dirigidas a genes causantes de esta enfermedad) con un nivel de resolución particularmente apto para la detección de deleciones, duplicaciones y triplicaciones. La cuantificación se realiza mediante la comparación de superficies bajo los picos de fluorescencia generados por los cebadores marcados e incorporados en cada producto. Las sondas se diseñan contra dianas de 50-70 nucleótidos, lo que permite interrogar la dosis de un exón determinado. Por cuestiones de economía y eficiencia del diseño, no todos los exones de los genes asociados a cierta enfermedad están incluidos en un equipo comercial determinado, generalmente se incluyen todos los exones de los genes más relevantes o de mayor prevalencia.

Se empleó el equipo SALSA® MLPA® P051-C1/P052-C1 (*MRC-Holland*) diseñado especialmente para EP. Este equipo permite identificar las siguientes alteraciones en los genes causantes de EP:

- a. *SNCA*: el equipo comercial utilizado detecta cambios de dosis en los 6 exones codificantes del gen. Este equipo contiene, además, una sonda específica para detectar la mutación p.A30P.
- b. *PARK2*: el equipo permite detectar alteraciones de dosis en cualquier región del gen de la parkina, pues contiene dos sondas diferentes para cada uno de los 12 exones del gen.

- c. *LRRK2*: el equipo incluye sondas solamente para 7 de 51 exones. Además, tiene una sonda específica para detectar la mutación más frecuente p.G2019S.
- d. *PINK1*: el equipo utilizado permite detectar cambios de dosis en cada uno de los 8 exones de este gen.
- e. *DJ1*: se detectan 4 de 7 exones de este gen.
- f. *UCHL1*: se analizan 4 de los 9 exones codificantes mediante el equipo empleado.
- g. *ATP13A2*: el equipo de MLPA® utilizado contiene sondas para analizar 4 de los 29 exones del gen.
- h. Además de las sondas para los genes PARK indicados, el equipo SALSA® MLPA® P051-C1/P052-C1 contiene algunas sondas para el gen *GCH1*, implicado en la distonía que responde a levodopa.

2.3. Caracterización clínica y genealógica de familias con formas monogénicas

En el caso de aquellos pacientes en los que se identificaron mutaciones causales en genes de EP se procedió a citarlos para darles el resultado, explicándoles en qué consistía su enfermedad, por qué se producía y las repercusiones familiares a la luz de los conocimientos actuales. Además se realizó una revisión detallada de la historia, una nueva exploración clínica más detallada y se profundizó en la historia familiar. Una vez informados, aquellos familiares que lo deseasen pudieron realizarse un análisis genético predictivo, previa explicación de que no hay ningún tratamiento preventivo para la EP. Se usó el programa *Progeny*® para construir los árboles genealógicos.

iii. Aspectos éticos

El estudio se autorizó por parte del Comité de Ética del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Las principales consideraciones éticas que se han tenido en cuenta en este estudio son las siguientes:

1. Relativas a la utilización y almacenamiento de muestras de origen humano. Se han respetado la declaración de la UNESCO sobre el genoma y los derechos humanos, así como la Declaración de Helsinki con respecto a la investigación en humanos. En adaptación al Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, de tratamiento de muestras con fines de investigación biomédica, una vez concluido el estudio las muestras han pasado a incorporarse en la colección registrada C.0001360 para la línea de investigación de enfermedades neurológicas, cuya responsable es la Dra. María Jesús Sobrido.
2. Relativas a la realización de análisis genéticos con fines de investigación y de diagnóstico. Se respetaron los preceptos establecidos en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica.
3. Relativas a la confidencialidad de la información personal y clínica. Dado que el estudio implica la recogida de datos personales (edad, sexo), así como datos referidos a la enfermedad, es necesario garantizar la confidencialidad del manejo de estos datos (Ley Orgánica 15/99 de Protección de Datos de carácter Personal). Para ello, el formulario de recogida de datos clínicos para cada sujeto del estudio estuvo codificado, código que se aplicó también a su muestra de sangre. Solo los miembros del equipo de investigación involucrados en el reclutamiento del paciente han tenido acceso a la información que correlacionaba el código con la identidad del sujeto.
4. Relativas a la voluntariedad y confidencialidad de la participación. A fin de solicitar su consentimiento expreso para la participación en el estudio, tanto a los pacientes como a los

controles se les informó de manera sencilla y comprensible sobre el objetivo y procedimiento de la investigación (anexo II). Específicamente, se les resaltó que no recibirían remuneración alguna y que la decisión o no de participar no influiría en la asistencia médica que fuesen a recibir. Se tuvo especial cuidado de no ejercer ningún tipo de influencia en la libre decisión de participar.

5. Relativos a los resultados del estudio. Se informó a los pacientes y se incorporó a su historia clínica el resultado de los estudios de genes causales conocidos. En el caso del estudio de asociación se mantuvo la confidencialidad sobre el resultado del análisis genético de los sujetos estudiados, resultado que no se incorporó a la historia clínica.





i. Construcción de una colección de casos y controles para investigación en EP

Como resultado del reclutamiento y caracterización de los pacientes y de los controles, cuyas muestras se analizaron genéticamente, se ha construido una colección con aproximadamente 300 muestras y 300 controles, todos ellos pertenecientes a la población gallega que, como se ha indicado anteriormente, no tiene subestructura poblacional significativa desde el punto de vista genético. El RD 1716/2011 de 18 de noviembre, de biobancos exige que, una vez finalizados los estudios concretos para los que se donaron, las muestras que no se destruyan pasen a incorporarse bien a un biobanco o bien a colecciones de muestras. Estas últimas deben responder a un objetivo o línea de investigación determinada y deben tener un investigador responsable. La colección de muestras de pacientes y controles utilizados en el presente estudio se encuentra depositada en las instalaciones de la Fundación Pública Gallega de Medicina Genómica, formando parte de la colección registrada C.0001360 en el Instituto de Salud Carlos III para la línea de enfermedades neurológicas, cuya responsable es la Dra María Jesús Sobrido. Los datos clínicos correspondientes, codificados y encriptados, se han recogido en una base de datos construida con el programa *Microsoft Access*[®]. Los datos recogidos en dicha base de datos figuran en la tabla 9. Además de la edad de inicio, la duración de la enfermedad y el sexo también se han registrado los antecedentes familiares y datos clínicos relevantes de la enfermedad como son la forma de inicio y la presencia de complicaciones precoces. De este modo se podrán caracterizar subgrupos en ulteriores investigaciones.

Los datos clínicos y genealógicos de las familias con formas mendelianas de EP se almacenaron en una base de datos construida con el programa *Progeny*[®]. Esta base de datos, accesible mediante clave, a los investigadores del grupo, podrá ampliarse en el futuro, lo

que será un valioso apoyo para dar continuidad a una línea de trabajo sobre la base genética de la EP.

Esta colección de muestras con su correspondiente base de datos quedará de este modo disponible para futuras investigaciones. La colección y el conjunto de datos también podrán incrementarse y perfeccionarse progresivamente con nuevas aportaciones y proyectos, completando así un recurso estratégico para mantener una línea estable de investigación molecular en EP en nuestro entorno.

ii. Estudio de asociación

De la colección de casos reclutada pertenecientes a la población gallega se retiraron los pacientes con algún determinante monogénico conocido (9 pacientes que se describen más adelante). Tras estas correcciones la muestra final genotipada fue de 287 casos y 293 controles.

Tras la aplicación de los filtros de control de calidad, descritos en la sección de material y métodos, el número de individuos analizables se redujo a 274 pacientes (45,9% mujeres) y 267 controles (56,2% mujeres). La edad media de inicio de EP en los casos fue de 60,66 años ($\pm 11,27$). La edad media de los controles en el momento de la toma de la muestra fue de 72,18 años ($\pm 11,19$). De los casos 36 pacientes (13,09%) tenían antecedentes familiares de primer grado de EP.

En cuanto a los SNP, la selección inicial fue de 374, pertenecientes a 46 genes. En esta muestra superaron los controles de calidad 312 SNP pertenecientes a 43 genes (Anexo VII). Ningún SNP de *PSMA4* pasó el control de calidad. De los 13 SNP del estudio de Maraganore, 7 tampoco superaron el control de calidad, entre ellos rs7878232 (perteneciente a *PASD1*) y rs16851009 (perteneciente a *GALNT3*).

Para el estudio de replicación, realizado con la muestra de población mestiza mexicana referida anteriormente, se aplicaron los mismos criterios de calidad. De este modo en la muestra de replicación resultaron 273 pacientes (47,3% mujeres) y 260 controles (70,0% mujeres). La edad media de inicio de EP fue de 55,38 años ($\pm 11,63$). La edad media de los controles en el momento de la toma de la muestra fue de 58,20 años ($\pm 12,36$). En esta muestra se ana-

Características de las muestras inicial y de replicación				
	Muestra inicial		Muestra de replicación	
	Controles	Casos	Controles	Casos
N	267	274	260	273
% Mujeres	56.2	45.9	70.0	47.3
Edad media de inicio (DT)	NA	60.66 (11.27)	NA	55.38 (11.63)
Edad media de toma de muestra (DT)	72.18 (11.19)	NA	58.20 (12.36)	NA

Tabla 10. Características de las muestras inicial y de replicación
DT: desviación típica
NA: no aplicable

lizaron los SNP que habían mostrado asociación con EP en la muestra inicial. En la tabla 10 se resumen las características de las muestras inicial y de replicación.

El estudio de asociación se realizó en dos partes de forma independiente, aplicando también de forma independiente las pruebas de corrección múltiple. Por un lado se analizaron 246 SNP pertenecientes a 31 genes que codifican subunidades del proteasoma y proteínas relacionadas. Por otro lado se analizaron 66 SNP pertenecientes a los 12 genes que no codifican las subunidades del proteasoma, incluyendo *MAPT* y *SNCA*.

Se encontraron varias asociaciones nominales (ver tablas 11, 12 y 13) en SNP de *MAPT* y *SNCA*, así como en algunos genes que codifican subunidades del proteasoma y en *SYT11*, cuyo producto es sustrato de la parkina. La asociación con el SNP rs2435207 de *MAPT* mantuvo significación estadística tras aplicar la corrección para comparaciones múltiples múltiples con FDR ($p = 0,00037$, OR = 1,60, valor $q = 0,0273$).

Los resultados del estudio de asociación se presentan en 3 partes: 1) genes en los que previamente se había demostrado asociación, 2) genes que codifican las subunidades del proteasoma y proteínas relacionadas y 3) genes que codifican sustratos de la parkina, otras proteínas con función de ligasa de ubiquitina y proteínas relacionadas con el estrés proteico

1. GENES EN LOS QUE PREVIAMENTE SE HABÍA DEMOSTRADO ASOCIACIÓN CON EP

En este apartado se incluyen *MAPT*, y su región que abarca *CRHR1*, y *SNCA*. De los genes *MAPT* / *CRHR1* se analizaron 9 SNP. De ellos,

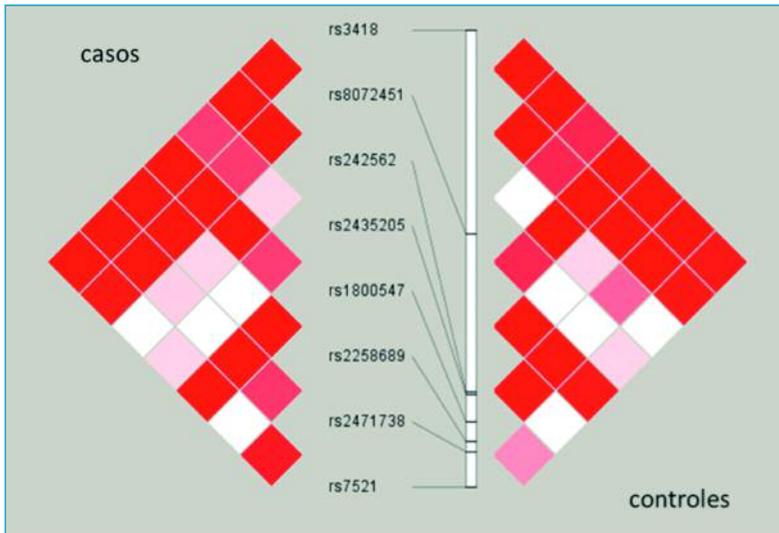


Figura 19A. Bloques haplotípicos de MAPT calculados según el valor de D'

4 pertenecientes a *MAPT* mostraron asociación nominal: rs242562 ($p=0,0366$, $OR=1,32$), rs 1800547 ($p=0,0039$, $OR=0,65$), rs2435207 ($p=0,0003$, $OR=1,60$) y rs2471738 ($p=0,035$, $OR=1,61$). La asociación con rs2435207 continuó siendo significativa al aplicar pruebas de corrección múltiple con FDR ($q=0,0273$).

Además, se pudieron imputar en los individuos estudiados los genotipos del SNP rs1052553 ($p = 0,0027$, OR (alelo A) = 1,54), utilizado previamente como definitorio del haplotipo H1 tau (alelo A- H1) en estudios de asociación con EP (Wider *et al*, 2010, Elbaz A *et al*, 2011).

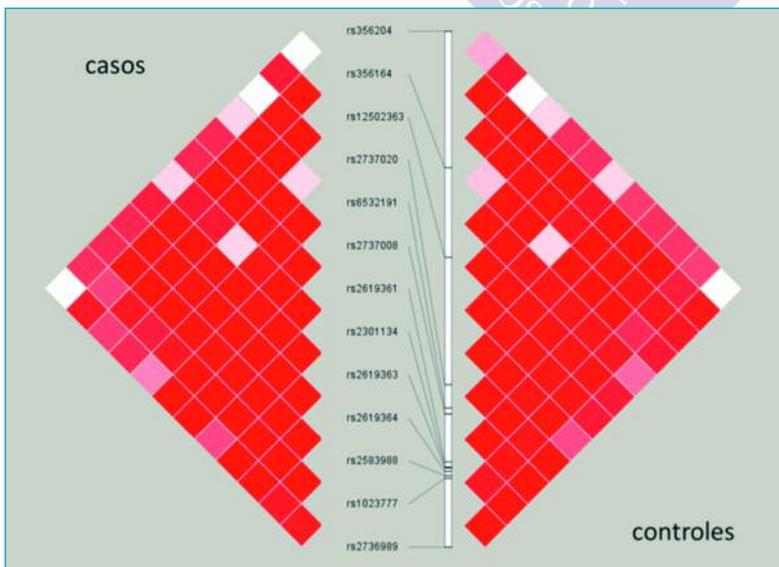
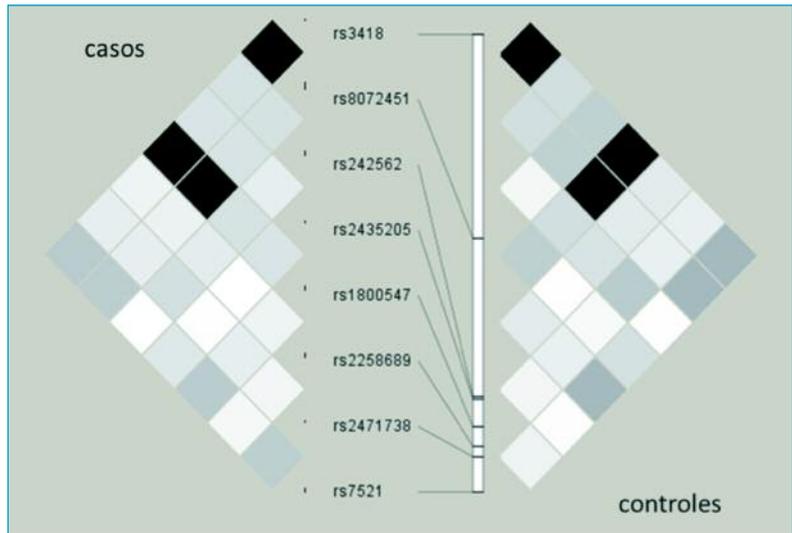


Figura 20A. Bloques haplotípicos de SNCA calculados según el valor de D'

Figura 19B. Bloques haplotípicos de MAPT calculados según el valor de r^2

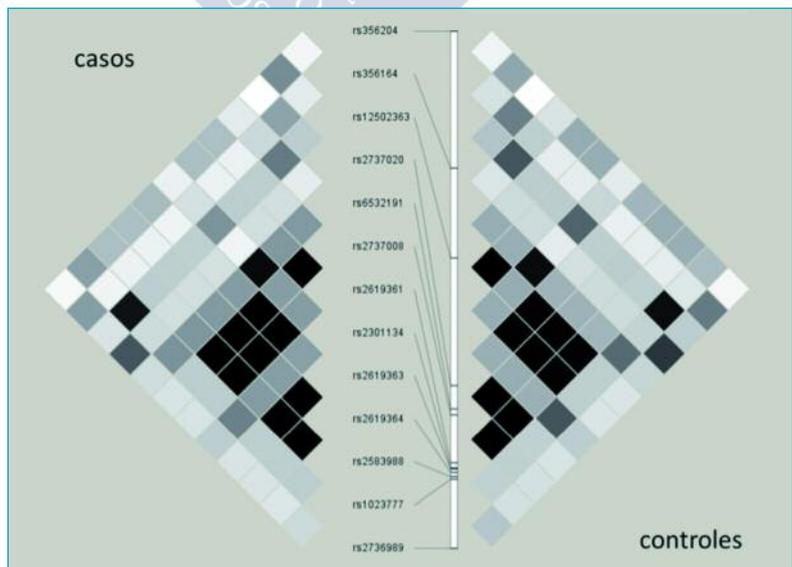


También se hallaron 2 polimorfismos asociados con EP en el gen *CRHR1* (*Corticotropin releasing hormone receptor 1*), contiguo a *MAPT*: rs3418 ($p=0,0039$, OR = 0,65) y rs 8072471 ($p=0,0062$, OR = 0,67).

Varios de los polimorfismos que mostraron asociación formaron un bloque haplotípico como se muestra en las figura 19A y B, calculados respectivamente según los valores de D' y r^2 .

En el caso de *SNCA*, se analizaron 13 SNP y se halló asociación nominal con rs356204 ($p=0,168$, OR=1,35) y rs356164 ($p=0,046$,

Figura 20B. Bloques haplotípicos de SNCA calculados según el valor de r^2



SNP pertenecientes a MAPT / CRHR1 y SNCA que han mostrado

SNP	Gen	Posición	G/ ¹	Alelos	Alelo menor	MAF
rs3418	CRHR1/MAPT	17: 43723462	G	A/G	A	0,239
rs8072451	CRHR1/MAPT	17: 43893716	G	C/T	T	0,241
rs242562	MAPT	17: 44026739	G	A/G	A	0,302
rs1800547	MAPT	17: 44051846	G	A/G	G	0,240
rs2435207	MAPT	17: 44058928	G	A/G	A	0,287
rs1052553 ²	MAPT	17: 44073889	I	A/G	G	
rs2471738	MAPT	17: 44076063	G	C/T	T	0,179
rs356219	SNCA	4: 90637601	I	A/G	G	
rs356204	SNCA	4: 90663542	G	A/G	A	0,458
rs356164	SNCA	4: 90693476	G	C/G	C	0,150

1 Genotipado / Imputado

2 SNP imputado. La asociación significa que el genotipo de los

▲ **Tabla 11.** SNP pertenecientes a MAPT / CRHR1 y SNCA que han mostrado en el estudio asociación significativa con la EP

▼ **Tabla 12.** Resultados nominales positivos obtenidos en los genes de las subunidades del proteasoma

Resultados nominales positivos obtenidos en los genes de las subunidades del proteasoma

SNP	Gen	Posición		Alelo		Valor p	OR (95 % IC) (alelo menor)
		(GRCh37/hg19)	Alelos	menor			
rs2597220	PSMA1	11: 14529527	C/T	C	0,0375	0,69 (0,49 - 0,98)	
rs6573194	PSMA3	14: 58712914	C/T	C	0,0269	0,75 (0,58 - 0,97)	
rs7156944	PSMA6	14: 35790467	G/T	G	0,0189	0,72 (0,55 - 0,95)	
rs10838708	PSMC3	11: 47441513	A/G	A	0,0013	0,68 (0,53 - 0,88)	
rs7948705	PSMC3	11: 47447955	C/G	G	0,0063	1,52 (1,12 - 2,07)	
rs3781625	PSMC3	11: 47443080	A/G	G	0,0129	0,73 (0,56 - 0,94)	
rs11600581	PSMC3	11: 44051846	C/T	C	0,0161	0,74 (0,57 - 0,95)	
rs6748332	PSMD1	2: 231914845	C/T	T	0,0161	0,71 (0,53 - 0,94)	
rs6436998	PSMD1	2: 231918591	C/T	C	0,0209	0,73 (0,56 - 0,96)	
rs17440378	PSMD1	2: 231979355	C/T	T	0,0277	0,69 (0,50 - 0,96)	
rs3731783	PSMD1	2: 31913056	A/G	A	0,0415	0,73 (0,54 - 0,99)	
rs10510901	PSMD6	3: 64013062	A/G	G	0,0395	0,70 (0,49 - 0,99)	
rs12497119	PSMD6	3: 64014640	A/G	G	0,0444	0,69 (0,50 - 0,96)	
rs12448188	PSMD7	16: 74313430	A/G	G	0,0272	0,73 (0,55 - 0,97)	
rs12921488	PSMD7	16: 74325131	A/G	A	0,0251	0,70 (0,51 - 0,96)	

en el estudio asociación significativa con la EP

Valor p	Valor q	OR (IC 95%)	Metanálisis con PdGene valor p /OR	Mata (2011) Asturias Valor p /OR
0,00395	0,0734	0,65 (0,49 - 0,88)	0,0002 / <1	
0,00624	0,0927	0,67 (0,50 - 0,89)	0,0017 / <1	
0,03667	0,3168	1,32 (1,02 - 1,73)	NS	
0,00390	0,0735	0,65 (0,49 - 0,88)	<5E-08 / 0,78	0,0003 / 0,79
0,00037	0,0273	1,60 (1,23 - 2,08)	NS	
0,0027	-	0,65 (0,49 - 0,87)	<5E-08 / 0,79	
0,00357	0,0735	1,61 (1,16 - 2,23)	NS	
0,0099	-	1,34 (1,04 - 1,71)	<5E-08 / 1,28	0,0006 / 1,23
0,01687	0,2090	1,35 (1,05 - 1,73)	<5E-08 / 1,27	
0,04688	0,3168	0,70 (0,50 - 1,00)	<5E-08 / 0,78	

pacientes con EP en la muestra es H1/H1

IC 95 % Intervalo de confianza 95%

OR = 0,70). El polimorfismo rs356219, previamente asociado a EP en población asturiana (Mata *et al*, 2011), pudo imputarse en la muestra de este estudio, con valor $p = 0,0099$ y $OR = 1,34$.

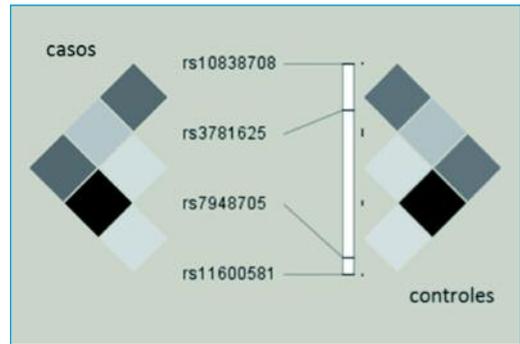
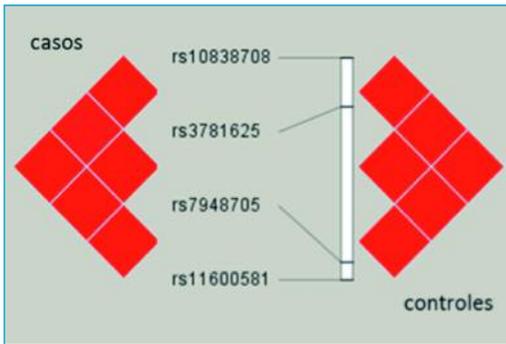
Los SNP que mostraron asociación junto con el imputado formaron un bloque haplotípico como se muestra en las figuras 20A y B, calculados respectivamente según los valores de D' y r^2 .

Los resultados de los SNP que mostraron asociación con MAPT / CRHR1 y SNCA se muestran en la tabla 11. Se incluye una columna con los resultados del metanálisis de *PDGene* para cada polimorfismo.

2. GENES QUE CODIFICAN LAS SUBUNIDADES DEL PROTEASOMA

En la muestra de población gallega, se encontraron asociaciones nominales ($p < 0,05$) para 14 SNP pertenecientes a 7 genes que codifican subunidades del proteasoma *PSMA1*, *PSMA3*, *PSMA6*, *PSMC3*, *PSMD1*, *PSMD6* y *PSMD7* (ver tabla 12). La asociación más destacada correspondió al polimorfismo rs10838708 perteneciente a *PSMC3* ($p = 0,0013$, $OR = 0,68$).

Según los cálculos realizados con los genotipos obtenidos, los SNP de este gen que mostraron asociación nominal formaron un bloque haplotípico (fig 21A y B).



En este caso, ninguna de estas asociaciones permaneció significativa tras aplicar FDR.

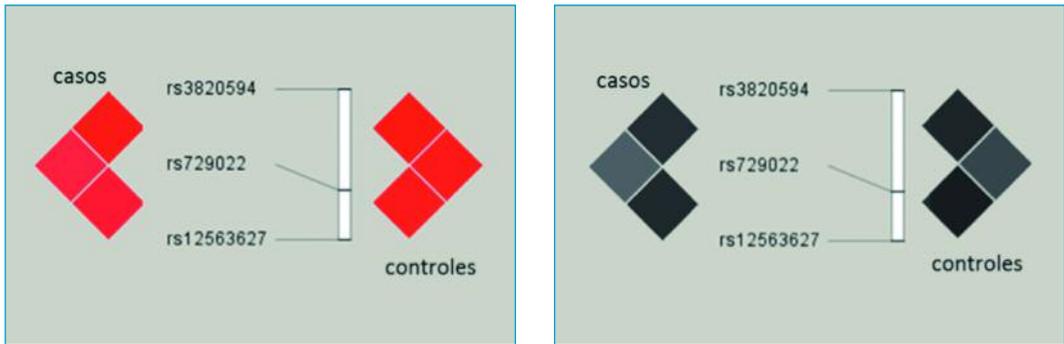
Las variantes obtenidas se analizaron en la muestra de replicación pero no se obtuvieron en ella resultados de asociación estadísticamente significativa. Tampoco los resultados correspondientes al metanálisis de *PDGene* para estos polimorfismos mostraron asociación alguna.

3. GENES QUE CODIFICAN SUSTRATOS DE LA PARKINA, OTRAS PROTEÍNAS CON FUNCIÓN DE LIGASA DE UBIQUITINA Y PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS PROTEICO

El estudio de asociación con el resto de los genes analizados fue negativo para los polimorfismos de *CCNE1*, *GPR37*, *HSBP2*, *NOB1*, *SEP5*, *SKP1* y *SNACIP*. Tampoco se encontró asociación con los 6 polimorfismos analizados que en el estudio de Maraganore habían mostrado asociación con EP. Se halló asociación, nominal, con *SYT11*. De este gen se analizaron en la muestra inicial 3 SNP que no se habían descrito previamente en la literatura.

De estos 3 SNP analizados, 2 de ellos mostraron asociación nominal con EP: rs3820594 ($p = 0,0378$, OR = 1,32) y rs729022 ($p = 0,0384$, OR = 1,30). El tercer SNP analizado, rs12563627 no llegó a alcanzar significación estadística ($p = 0,06541$, OR = 1,27 (0,98 - 1,63)). Estos SNP están en LD relativamente fuerte en esta muestra inicial ($r^2 = 0,77$). Sin embargo, haciendo el cálculo con los datos de HapMap II estos SNP podrían pertenecer a diferentes bloques haplotípicos en la población caucásica. rs3820594 se sitúa en la región 5'UTR, rs729022 en la región 3'UTR, mientras

Izquierda: Figura 21A. Bloque haplotípico formado por los SNP de PSMC3 según el valor de D'
Derecha: Figura 21B
 Bloque haplotípico formado por los SNP de PSMC3 según el valor de r^2



Izquierda: Figura 22A. Bloques haplotípicos de SYT11 calculados según el valor de D'
Derecha: Figura 22B. Bloques haplotípicos de SYT11 calculados según el valor de r^2

rs12563627 se aloja fuera de la región codificante en sentido 3'.

Se trató de llevar a cabo la imputación genotípica en la muestra inicial de los 2 polimorfismos relacionados con *SYT11* previamente asociados a EP en la literatura. No fue posible imputar el genotipo de rs202015799 (no estaba depositado en las bases de datos utilizadas). Sí pudo imputarse el genotipo de rs34372695, sin resultado significativo de asociación ($p = 0,19$).

El SNP de *SYT11* rs729022, uno de los 2 que mostraron asociación nominal en la muestra inicial, se analizó en la muestra de replicación. El SNP rs3820594, que también presentó asociación a EP en la muestra inicial, no pudo incluirse para el genotipado multiplex en el estudio de replicación –no fue posible encajarlo en el diseño de cebadores– por lo que se sustituyó por rs822508, del mismo bloque haplotípico. También se incluyó el polimorfismo rs12563627, aunque no había llegado a alcanzar significación estadística nominal en la muestra inicial. Para estos tres polimorfismos el estudio de replicación confirmó la asociación nominal y además los 3 SNP resultaron estar en LD completa, $r^2 \geq 0,98$ también en la población mexicana (ver figuras 22A y B). Además, la imputación de genotipos para el SNP rs34376925, previamente asociado a EP en la literatura, mostró la asociación más fuerte ($p = 0,00003$, OR = 2,07)

Los resultados tanto en la muestra inicial como en la muestra de replicación, junto con los resultados del metanálisis de *PDGene*, se exponen en la tabla 13.

SNP de SYT11 que mostraron asociación nominal con EP. rs729022 en el mismo

SNP	Gen	Posición	G/I ¹	Alelos	Muestra inicial		
					Alelo menor	MAF	Valor p
rs3820594	SYT11	1: 155829511	G	C/T	T	0,281	0,04570
rs202015799	SYT11	1: 155839054	I	C/T	T		NA
rs822508	SYT11	1: 155850558	G	C/T			-
rs729022	SYT11	1: 155852123	G	A/G	G	0,324	0,03425
rs12563627	SYT11	1: 155862966	G	C/T	T	0,343	0,06541
rs34372695 ²	SYT11/RAB25	1: 156030037	I	C/T	T		NS

▲ **Tabla 13.** SNP de SYT11 que mostraron asociación nominal con EP. rs729022 en el mismo bloque haplotípico que rs3820594 sustituye a este en el estudio de replicación. En este estudio se incluye rs12563627 que no había resultado significativo en el estudio de asociación inicial. La imputación del SNP descrito previamente rs34372695 mostró asociación únicamente en el estudio de replicación. En rs729022 y rs12563627 los alelos con menor frecuencia en la muestra inicial y en la de replicación son diferentes.

¹ Genotipado / imputado. ² rs34372695 es el único SNP de los genotipados o imputados que resulta positivo en el metanálisis con PDGene, con $p = 0,0267$ y $OR < 1$
IC 95%: Intervalo de confianza 95%. NA: no aplicable. NS: no significativo

Características de la enfermedad en pacientes con mutación p.G2019S

Paciente	Sexo	Edad de inicio	Duración (años)	Síntoma inicio	Antecedentes familiares
PARK8-1	M	39	6	Temblor	No
PARK8-2	M	62	15	Bradícinésia	Hermana, 2 sobrinos
PARK8-3	M	71	12	Temblor	Hermana, 2 hijos
PARK8-4	M	45	7	Temblor	No
PARK8-5	M	28	32	Distonía	No
PARK8-6	M	43	5	Bradícinésia	No
PARK8-7	V	58	3	Bradícinésia	Padre

Tabla 14.

Características de la enfermedad en los pacientes con la mutación p.G2019S

bloque haplotípico que rs3820594 sustituye a este en el estudio de replicación

Valor q	OR (IC 95%)	Muestra de replicación		Valor p	OR (IC 95%)
		Alelo menor	MAF		
0,3168	1,31 (1,00-1,72)				
NA	NA			NS	NS
-	-	C	0,464	0,0187	1,33 (1,05-1,68)
0,3168	1,31 (1,02-1,69)	A	0,460	0,0352	1,29 (1,02-1,64)
0,4052	1,27 (0,98-1,63)	C	0,449	0,0242	1,32 (1,04-1,68)
NS	NS			0,00003	2,07 (1,24-3,87)

iii. Caracterización de pacientes y familias con formas monogénicas de EP

Se llevó a cabo una revisión detallada, clínica y genealógica, de aquellos casos con mutación en genes conocidos causantes de EP familiar: se hallaron 7 casos con la mutación p.G2019S en *LRRK2* y 2 pacientes con mutación de *PARK2* en homocigosis.

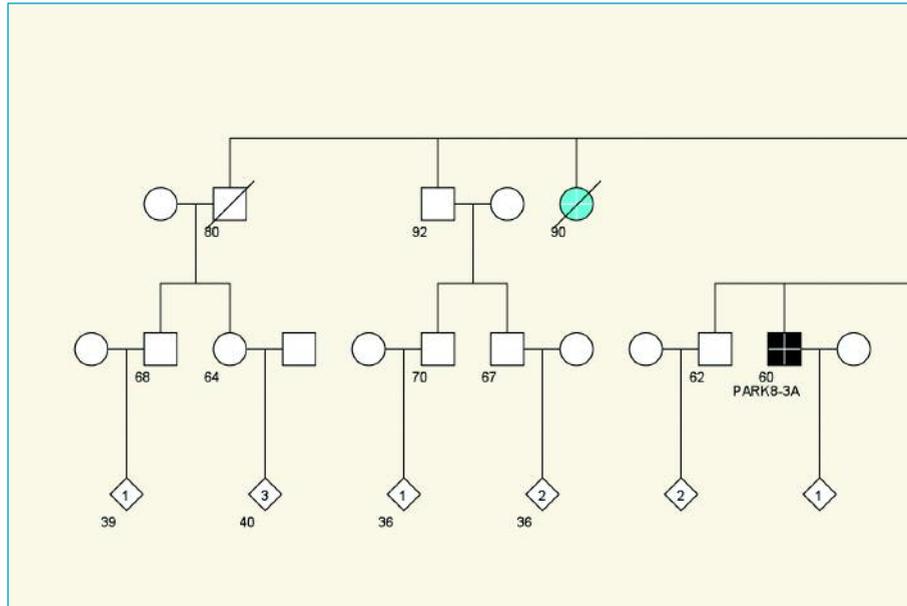
No se detectaron mutaciones de *SNCA*. Tampoco se identificaron las otras mutaciones de *LRRK2* descritas en los exones secuenciados (p.R1441C, p.R1441G y p.R1441H en el exón 31 y p.I2020T en el exón 41)

1. PACIENTES Y FAMILIAS CON MUTACIÓN EN *LRRK2*

Las características de los pacientes portadores de la mutación p.G2019S se resumen en la tabla 14. Todos ellos presentaron este cambio nucleotídico en heterocigosis. La edad media de presentación fue 49,43 ($\pm 14,86$) y el tiempo medio de evolución 11,43 ($\pm 9,98$). 4 pacientes habían comenzado la enfermedad antes de los 45 años. 3 pacientes presentaron antecedentes familiares: 1 varón que había comenzado a los 58 años cuyo padre había padecido EP y 2 mujeres que eran hermanas. Una de ellas tenía 2 hijos afectados.

Las pacientes PARK8-2 y PARK8-3 son hermanas y pertenecen a una familia cuyos progenitores eran primos hermanos. Estas 2 mujeres pertenecen a una familia de 6 hermanos. Los 4 hermanos restantes no padecieron EP. De estos 4, 2 mujeres eran sordomundas.

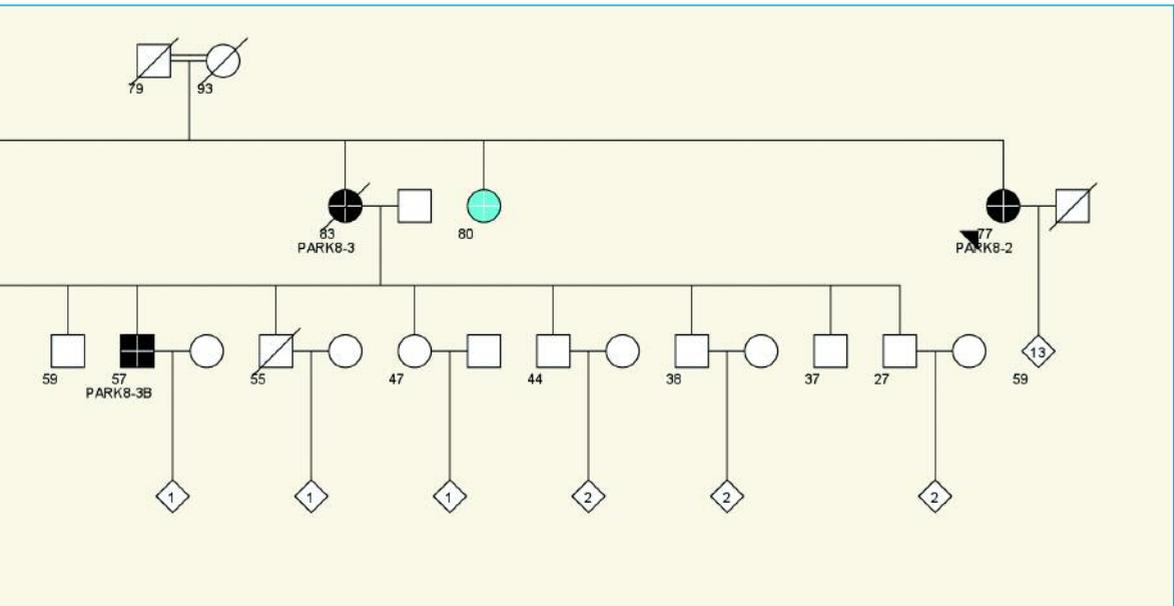
Figura 23. Árbol genealógico de PARK8-2 (flecha) y PARK8-3 (hermana). Dos hermanas sordomudas se marcan en azul



PARK8-3 tiene 2 hijos (PARK8-3A y PARK8-3B) que padecen EP. PARK8-3B presenta la misma mutación que su madre, p.G2019S en *LRRK2*. PARK-8 3A, sin embargo, no es portador de ninguna de las mutaciones más frecuentes de *LRRK2* que se analizaron.

PARK8-2, de 77 años, comenzó con EP a los 62. Los síntomas iniciales fueron dificultad para realizar movimientos de precisión con las extremidades izquierdas y para caminar. Cuando consultó hacía 9 meses que presentaba la clínica. Se trató con medicación dopaminérgica, inicialmente ropinirol hasta 16 mg. Posteriormente se añadió levodopa. La respuesta fue buena hasta los 9 años de evolución. Entonces comenzó con fluctuaciones y discinesias. La medicación dejó de ser efectiva durante las 24 horas del día. Además en los momentos de máximo beneficio del tratamiento, la paciente presentaba discinesias, sobre todo en el cuello y la región orofacial. Pese al ajuste de la medicación oral no mejoró el control motor. A los 10 años de evolución se colocó un infusor de apomorfina. En la actualidad la dosis de este fármaco es de 7 mg por hora durante 16 horas. Además se trata con levodopa. La paciente presenta buen control motor de forma permanente sin discinesias. Nunca ha tenido temblor

PARK8-3 consultó hace 12 años, cuando tenía 71, por temblor de 6 meses de evolución. En aquel momento afectaba a la extremidad

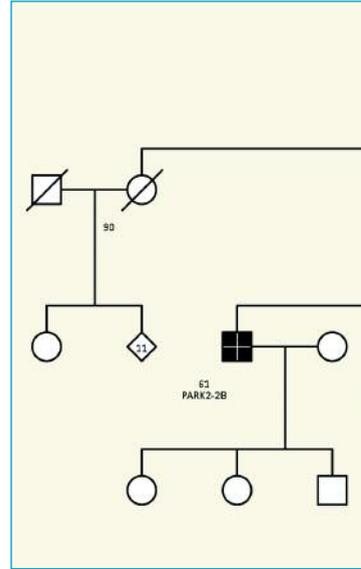


superior derecha, con predominio de reposo, y un cierto componente postural. Entonces apenas mostraba ligera rigidez y bradicinesia. Se trató con levodopa a dosis bajas y se mantuvo con buen control motor durante varios años. El temblor se hizo bilateral, la bradicinesia se incrementó y también se hizo bilateral. Sin embargo, la respuesta a la dopa, cuya dosis se fue aumentando moderadamente, continuó siendo buena. Cuando llevaba 12 años de evolución, la paciente sufrió un importante empeoramiento de sus síntomas, con incremento del temblor, de la rigidez y de la bradicinesia. El temblor apenas se modificó al subir la dosis de levodopa. La rigidez y la bradicinesia mejoraron de forma importante. Se mantuvo en esa situación hasta su fallecimiento 4 meses después por una neumonía.

PARK8-3A acudió por primera vez a la consulta hace 2 años, cuando tenía 58, por un cuadro de 2 años de evolución de temblor y torpeza en las extremidades izquierdas. En la exploración se apreció un síndrome rígido acinético con temblor de reposo en las extremidades izquierdas. Se trató con 8 mg de rotigotina. El cuadro mejoró de modo que en la actualidad solo se aprecia una leve bradicinesia izquierda. El paciente sigue con su actividad laboral normal. Este paciente no es portador de la mutación p.G2019S ni de ninguna otra conocida.

PARK8-3B, de 57 años, consultó hace 6 meses por torpeza y temblor en las manos, especialmente en la derecha. En la exploración se apreció un síndrome rígido acinético, con temblor de reposo, de predominio derecho. Mejoró inicialmente con 8 mg de rotigotina. Posteriormente se añadió levodopa a dosis bajas. En la actualidad apenas presenta leve bradicinesia derecha. Este paciente es portador de la mutación p.G2019S.

El árbol genealógico (figura 23) resume esta familia extensa en la que hay pocos afectados (uno de ellos no portador de ninguna mutación conocida). A todos los pacientes se les explicó lo que se conoce del significado de la mutación, así como las incertidumbres todavía existentes sobre su penetrancia y variabilidad en las manifestaciones clínicas, con las posibles implicaciones para sus descendientes. Se les ofreció la posibilidad de consulta genética a sus familiares.



2. PACIENTES Y FAMILIAS CON MUTACIONES DE PARK2

Se hallaron 2 casos índice homocigotos para mutaciones de PARK2, PARK2-1 y PARK2-2A.

PARK2-1 es una mujer de 40 años sin antecedentes familiares. Sus padres no son parientes. Tiene una hermana sana de 37 años. La paciente comenzó a los 14 años con temblor de reposo y postural y gran amplitud de predominio derecho. Tras probar varios fármacos (betabloqueantes, anticolinérgicos, primidona, clonacepam) se hizo, cuando tenía 20 años, una prueba con dosis bajas de levodopa. La respuesta fue muy buena, con gran mejoría del temblor. Posteriormente se retiró la levodopa. El temblor recidivó y la paciente desarrolló una importante distonía del tronco. Se reintrodujo la levodopa a dosis bajas, con lo que desapareció la distonía y el temblor volvió a mejorar. El cuadro se mantuvo estable durante 10 años. Inicialmente se diagnosticó de distonía que responde a la dopa (DRD). Sin embargo, al cabo de ese tiempo, el cuadro empezó a fluctuar y comenzó con torpeza y rigidez en las extremidades derechas. Un SPECT con BCIT demostró degeneración bilateral de la neurona presináptica dopaminérgica, lo que descartaba definitivamente el diagnóstico de DRD. El análisis genético por MLPA mostró la presencia en homocigosis de una delección en el exón 4 de

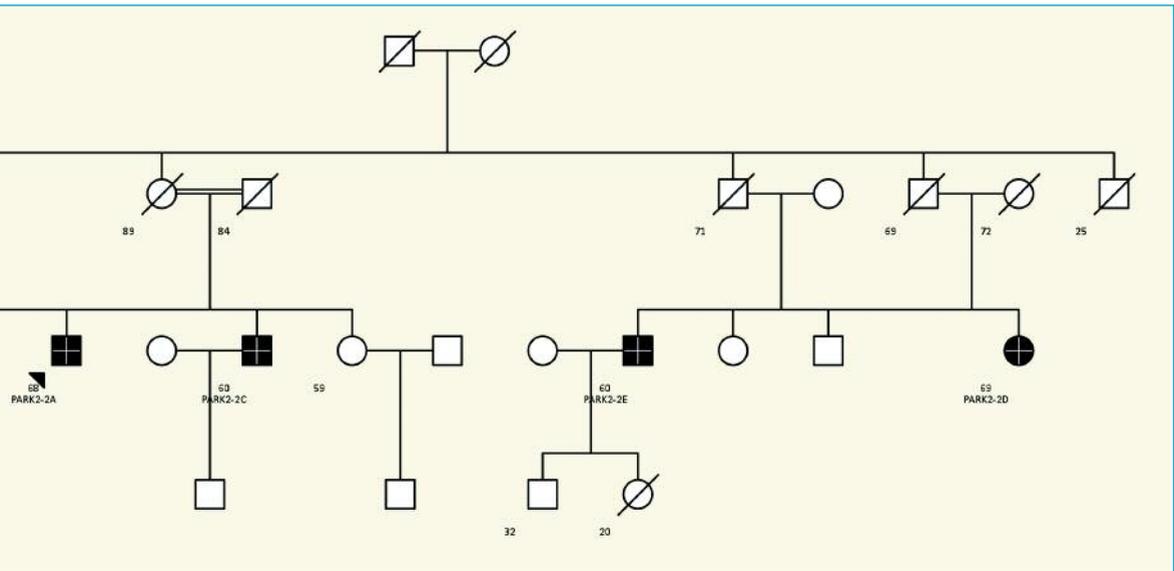


Figura 24. Árbol genealógico de PARK2A, paciente índice (flecha) con mutación en PARK2. Sus padres eran consanguíneos. Tiene 2 hermanos y 2 primos hermanos afectados con la misma mutación. Ver leyenda en la figura 19

PARK2. Se incrementaron las dosis de levodopa y se introdujeron agonistas. Los síntomas continuaron respondiendo muy bien a la medicación dopaminérgica. En la actualidad se trata con levodopa, 600 mg al día, y pramipexol, 3,15 mg diarios. Mantiene un buen control motor sin apenas fluctuaciones, con leve bradicinesia y temblor postural moderado derechos.

El caso PARK2-2A presenta una importante historia familiar con 2 hermanos varones y 2 primos hermanos afectados (varón y mujer). Todos ellos presentaron la mutación c.255delA, que corresponde a una delección en heterocigosis de un residuo adenina en el exón 2 del gen, que modifica el marco de lectura y da lugar a la aparición de un codón de parada prematura y a una proteína truncada (p.D52MfsX29: NP_004553.2). Los padres de PAK2-2A eran primos segundos (ver árbol genealógico en la figura 24).

PARK2-2A, varón de 61 años, comenzó a los 30 años con temblor de reposo y postural en las extremidades derechas y en la cabeza. Se trató con anticolinérgicos y levodopa. Unos 12 años después del inicio comenzó con fluctuaciones y discinesias de beneficio de dosis. Se incrementó la levodopa, se retiraron los anticolinérgicos y se añadieron agonistas dopaminérgicos. Tras ajustar la medicación desaparecieron las fluctuaciones. Se mantienen las discinesias, que afectan sobre todo a la región orofacial y cervical y en menor medida a las extremidades superiores. Son de beneficio de dosis

de moderada intensidad y las tolera bien. En la actualidad, globalmente, el control motor es bueno con bradicinesia ligera moderada de predominio derecho. Se trata con levodopa, 800 mg diarios, y pramipexol, 3,15 mg diarios.

PARK2-2B, varón de 62 años, hermano del anterior, comenzó a los 30 años con temblor y torpeza en las extremidades derechas. Se trató con medicación dopaminérgica y la respuesta motora fue buena durante 5 años. A partir de entonces comenzó con fluctuaciones y discinesias. Los ajustes de medicación le permitieron un control de la enfermedad bastante aceptable durante 25 años. En los últimos 2 años, sin embargo, los ajustes de medicación oral fueron ineficaces. El paciente presenta hasta 5 horas al día con mal control junto con importantes discinesias de beneficio de dosis. Se le propuso tratamiento con estimulación subtalámica, infusión de levodopa o de apomorfina pero no lo consideró.

PARK2-2C, varón de 60 años, hermano de los anteriores, comenzó con la enfermedad alrededor de los 40 años. Inicialmente mejoró con medicación dopaminérgica, pero a los 6 años empezó con fluctuaciones y discinesias. No se dispone de datos de su situación actual pues prefiere no acudir a revisión.

PARK2-2D, mujer de 69 años, prima hermana de los anteriores comenzó con temblor en las extremidades derechas a los 57 años. Sus padres no estaban emparentados, aunque eran de la misma zona. El temblor era de predominio en reposo, y se acompañaba de bradicinesia ligera derecha. Se ha mantenido estable desde el inicio de los síntomas con 300 mg de levodopa y 1 mg de rasagilina. En la actualidad apenas muestra bradicinesia derecha.

PARK2-2E, varón de 60 años, hermano de la anterior comenzó a los 35 años con temblor y torpeza en las extremidades derechas. Respondió bien a la medicación dopaminérgica durante 7 años. Posteriormente hubo de modificarse frecuentemente el tratamiento por fluctuaciones y discinesias. En 2008 se colocaron sensores estimuladores subtalámicos, que se retiraron por infección. Ese mismo año se inició apomorfina en infusión continua. En la actualidad presenta buen control motor durante todo el día con bradicinesia y rigidez de grado leve moderado y discinesias leves o moderadas.

i. Colección de casos y muestras para la investigación en EP

La línea de investigación aplicada en este trabajo, estudio de polimorfismos relacionados con EP en una población, requiere de la construcción de una colección de muestras registradas, que incluyan tanto casos como controles. Previamente hubieron de definirse unos criterios de inclusión estrictos en cada uno de los grupos. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica de Galicia.

Los datos de los pacientes, tanto personales como de las características de su enfermedad, se almacenaron en un archivo solo disponible para el equipo investigador. De forma ideal los datos deberían actualizarse periódicamente, lo que resulta difícil tanto por su volumen como por la necesidad de mantener la confidencialidad.

A su llegada al laboratorio, las muestras de sangre recibieron un código con el que se desarrolló todo el trabajo posteriormente. Este código quedó asignado a las muestras de ADN almacenadas.

Durante la realización de este proyecto, entró en vigor el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre sobre la formación de biobancos. Se trata de un decreto que desarrolla la disposición final tercera de la Ley 14/2007, de 3 de julio sobre investigación biomédica. En concreto establece los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica. Consta de 4 títulos incluyendo el preliminar, 3 disposiciones finales y un anexo.

En el título II, sobre el tratamiento de muestras biológicas de origen humano con fines de investigación biomédica, se regula cómo ha de transmitirse la información al paciente al que se pide que done una muestra biológica, la naturaleza del estudio que se va a realizar, los posibles beneficios e inconvenientes del estudio, el

destino de la muestra una vez terminado el estudio, el manejo de los datos personales o la posibilidad de que el paciente revoque el consentimiento en cualquier momento.

El mismo título II regula el almacenamiento y conservación de las muestras de origen humano. Una vez terminado el estudio, si el paciente autoriza que no se destruya la muestra, esta puede 1) almacenarse en un biobanco, de modo que se podría utilizar para cualquier investigación biomédica en los términos que refiere la Ley 14/2007, de 3 de julio, siempre que el sujeto fuente haya prestado su consentimiento; 2) conservarse fuera del ámbito de un biobanco como colección de muestras para fines de investigación biomédica, de modo que solo se podrán utilizar para la línea de investigación y centro/s que consten en el documento de consentimiento, salvo nuevo consentimiento expreso del sujeto para otra finalidad. Las colecciones de muestras biológicas deben contar con un investigador responsable.

Las muestras de este estudio se conservan en el Registro Nacional de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III (sección colecciones) como colección C.0001360 para *investigación en genética de enfermedades neurológicas*. Por tanto no se requiere un nuevo consentimiento informado siempre que las muestras se empleen para esta línea de investigación.

Las muestras almacenadas y los datos forman un instrumento más del grupo de investigación de Neurogenética de la Fundación Gallega de Medicina Genómica. Han permitido abrir la línea de investigación de genética de la EP. Los controles de este trabajo han servido para controles de otros estudios neurogenéticos al tratarse de personas mayores sin síntomas neurológicos relevantes. Por otro lado, esta colección ha permitido establecer colaboraciones con otros grupos de investigación neurogenética como el de A Salas (artículo en preparación) o X Estivill o iniciar una relación de investigación con el Instituto de Neurología y Neurocirugía de Ciudad de México.

ii. Estudio de asociación

Los genes en lo que se analizaron polimorfismos para este estudio figuran en la sección *Material y métodos*. Se incluyeron SNP de genes como *MAPT* y *SNCA* ampliamente validados de modo que actuaran de control de calidad de la muestra. El resto de los polimorfismos se centraron fundamentalmente en las subunidades del proteasoma y sustratos de la parkina. Se incluyeron 9 polimorfismos que mostraron asociación en el estudio de Maraganore *et al* (2005), que finalmente no se validaron en estudios posteriores (Bialecka *et al*, 2006, Clarimon *et al*, 2006, Elbaz *et al*, 2006, Fung *et al*, 2006, Goris *et al*, 2006)

Tabla 15. Estudios de asociación previos con EP de los genes analizados en este estudio

Algunos de los genes analizados ya se habían incluido en estudios buscando asociación con la enfermedad de Parkinson. En la tabla 15 se relacionan los estudios que han incluido alguno de estos genes en población caucásica y el resultado (Lill *et al*, 2012).

Estudios de asociación previos con EP de los genes analizados en este estudio				
Gen	Coordenadas genómicas (NCBI)	Proteína	Estudios de asociación previos (Población caucásica)	Asociación
PSMA7	20: 60711783 - 60718514	Subunidad de proteasoma tipo alfa 7	Maraganore, 2005 Pankratz, 2008 Simón Sánchez, 2009	Negativa
PSMC4	19: 40476912 - 40487671	Subunidad 4 ATPasa del proteasoma 26S	Wahl, 2008	c.579 + 29_41delins GTTGGAG
GPR37	7:124,385,654 - 124,406,078	GPR37 (PAELR)	Pankratz, 2008 Simón Sánchez, 2009	Negativa Negativa
SNCAIP	5:121,647,819 - 121,799,793	Sinfilina 1	Bandopadhyay, 2001 Farrer, 2001 Maraganore, 2003 Myhre, 2008 Simón Sánchez, 2009	Negativa Negativa Negativa D5S2010 Negativa
SYT11	1: 155,829,260 - 155,854,990	Sinaptotagmina 11	Pankratz, 2008 Simón Sánchez, 2009 Nalls, 2011 Sharma, 2012 Pihlstrom, 2013	Negativa Negativa rs202015799 rs34372695 rs34372695
PRDM2	1:14,026,734 - 14,151,573	PR Domain Containing Protein 2	Maraganore, 2005 Goris, 2006 Elbaz, 2006 Pankratz, 2008 Sharma, 2009 Simón Sánchez, 2009	rs2245218 Negativa Negativa Negativa Negativa Negativa

Estudios de asociación previos con EP de los genes analizados en este estudio				
Gen	Coordenadas genómicas (NCBI)	Proteína	Estudios de asociación previos (Población caucásica)	Asociación
SEMA5A	5:9,035,137 - 9,546,232	Semaforina 5A	Maraganore, 2005	rs7702187
			Bialecka, 2006	Negativa
			Clarimon, 2006	Negativa
			Goris, 2006	Negativa
			Elbaz, 2006	Negativa
			Farrer, 2006	Negativa
			Fung, 2006	Negativa
			Li, 2008	Negativa
			Pankratz, 2008	Negativa
			Sharma, 2009	Negativa
Simón Sánchez, 2009	Negativa			
GALNT3	12: 166604313 - 166650803	UDP-GalNAc transferasa 3	Maraganore, 2005	rs16851009
			Goris, 2006	Negativa
			Elbaz, 2006	Negativa
			Farrer, 2006	Negativa
			Li, 2008	Negativa
			Pankratz, 2008	Negativa
			Sharma, 2009	Negativa
Simón Sánchez, 2009	Negativa			
PASD1	X: 150732007 - 150845211	PAS domain-containing 1	Maraganore, 2005	rs7878232
			Goris, 2006	Negativa
			Elbaz, 2006	Negativa
			Farrer, 2006	Negativa
			Li, 2008	Negativa
SNCA	4:90,645,249 - 90,759,446	Sinucleína alfa	Maraganore, 2006	REP1
			Sotiriou, 2009	rs356219
			Mata, 2011	rs356219
			Elbaz, 2011	rs2583988
			Elbaz, 2011	rs181489
			Elbaz, 2011	rs356219
			Elbaz, 2011	rs11931074
			Nalls, 2011	rs356219
			Cardo, 2012	rs356165
			Otros 72 estudios	
MAPT	17:43,971,747 - 44,105,699	Proteína Tau	Elbaz, 2011	rs1052553
			Mata, 2011	rs1800547
			Nalls, 2011	rs2942168
			Otros 44 estudios	

Tabla 15. Estudios de asociación previos con EP de los genes analizados en este estudio

1. FACTORES GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDAD A EP PREVIAMENTE VALIDADOS EN DIVERSAS POBLACIONES: *MAPT* Y *SNCA*

Según la base de datos *PDGene* *MAPT* y *SNCA* son los genes asociados de forma más consistente a la EP (Lill *et al.*, 2012). Estos genes se habían estudiado previamente en la población de Asturias, muy próxima a Galicia, con resultado de asociación (Mata *et al.*, 2011, Cardo *et al.*, 2012). En concreto en este estudio los SNP rs356219 y rs356165, pertenecientes a *SNCA* y rs1800547, perteneciente a *MAPT*, se asociaron con EP.

En nuestro estudio se halló que el alelo A del SNP rs356204, localizado en el intrón 4 de *SNCA* se asocia con mayor susceptibilidad a la EP (OR = 1,35, $p = 0,01687$). Esta misma asociación se había descrito previamente con el mismo alelo y OR similar (Mueller *et al.*, 2005). Simón Sánchez *et al.*, en 2009, describieron el polimorfismo rs2736990, también localizado en el intrón 4, que forma un bloque haplotípico con rs356204. Además de los polimorfismos genotipados directamente, en la muestra de población gallega de este trabajo se pudo imputar el genotipo del polimorfismo rs356219, de la región no traducida 3' (3'UTR). Este SNP se había asociado previamente con susceptibilidad a EP en varias poblaciones, entre ellas la asturiana (Mueller *et al.*, 2005, Mata *et al.*, 2010, Nalls *et al.*, 2011). Hay datos que sugieren que este polimorfismo probablemente induce a la sobreexpresión de ASN (Sotiropoulos *et al.*, 2009). Como se indicó en la sección de *Antecedentes* la ASN mutada, defectuosa o en exceso se relaciona con la EP. El mecanismo fisiopatogénico solo se conoce parcialmente. Tiene que ver con la acumulación de formas insolubles de la proteína en la neurona.

Respecto a *MAPT* en este estudio se ha reproducido la asociación con rs1800547, descrita por Mata *et al.* (tabla 13). En el metanálisis recogido en la base de datos *PDGene* (<http://www.pdgene.org/meta.asp?geneid=14&polyID=1364>) también se observó una asociación significativa con esta variante. En concreto, el alelo G, de menor frecuencia, es menos prevalente en la EP (OR = 0,78). Otros 3 SNP de este gen, rs242562, rs2471738 y rs2435207, se asociaron asimismo de forma significativa con mayor susceptibilidad a EP en la población gallega. Aunque ninguno de ellos figura como positivo en los metanálisis de *PDGene*,

rs2435207 fue el único polimorfismo de todos los analizados en este estudio cuya asociación con EP mantuvo significación estadística tras aplicar la prueba de corrección para comparaciones múltiples FDR. La imputación en nuestra serie de los genotipos para rs1052553, SNP que define el haplotipo H1 de *MAPT*, mostró que en este estudio que el citado haplotipo se asocia a EP, como ya se había descrito en estudios de asociación previos (Nalls *et al*, 2011).

En el análisis de la muestra de población gallega, 2 de los polimorfismos que mostraron asociación nominal con la EP se encuentran en el gen *CRHR1* (Corticotropin releasing hormone receptor 1; pos 17: 43697710 - 43913194), muy próximo a *MAPT* (17: 43920722 - 43972879). Previamente ya se habían descrito polimorfismos asociados a EP en este gen (Pankratz *et al*, 2009, Rhodes *et al* 2011).

Como se trató en la sección de *Antecedentes*, otros parkinsonismos como la parálisis supranuclear progresiva y la degeneración córtico basal ocurren por alteración de la proteína tau, producto de *SNCA*. Tau es clave para la estabilización de los microtúbulos del citoesqueleto.

El haber replicado la asociación de *SNCA* y *MAPT* con EP, en pacientes gallegos, sugiere que la metodología del estudio tuvo un adecuado nivel de calidad (criterios de selección, calidad del genotipado, análisis estadístico). Incluso el SNP rs2435207 pudo superar el umbral de significación corregido para comparaciones múltiples. Por tanto, el resto de los resultados obtenidos, que vienen avalados por los mismos métodos, son para tener en consideración.

Los estudios de asociación de Mata *et al* (2011) y Cardo *et al* (2012) realizados en población asturiana y de Navarra, respectivamente, están entre los más completos realizados en España con más de un millar de pacientes en ambos casos. Como se ha indicado, el primero halló asociación con los SNP rs1800547 (*MAPT*) y rs356219 (*SNCA*). En el segundo la asociación encontrada fue con el SNP rs356165, también perteneciente a *SNCA*. Ezquerro *et al* (2011) compararon 505 pacientes del área de Barcelona con 233 controles y también hallaron asociación con *MAPT*, en concreto con el SNP rs242557. Otras asociaciones con otros genes descritas en España son la de Agúndez *et al* (2008) con el SNP rs11558538 del

Estudios de asociación de EP publicados en población española							
Autor	Año	N casos	N controles	Área geográfica	Genes	Polimorfismos	Resultado
Agúndez	2008	214	295	Madrid,	<i>HNMT</i>	rs11558538	Positivo
				Extremadura	<i>AOC1</i>	His645Asp	Negativo
Blázquez	2006	276	212	Salamanca	<i>APOE</i>	ε4/ ε4	Negativo
Cardo	2012	1135	772	Asturias, Navarra	<i>SNCA</i>	rs356165	Positivo
Ezquerria	2005	210	102	Barcelona	<i>TF</i>	G258S	Negativo
Ezquerria	2011	505	233	Barcelona	<i>MAPT</i>	rs242557	Positivo
Gao	2010	193	300	Sevilla	<i>BDNF</i>	G196A	Negativo
Lorenzo	2011	721	1117	Varias	<i>LINGO1</i>	rs11856808	Positivo
Mata	2011	1441	1161	Asturias, Navarra	<i>MAPT</i>	rs1800547	Positivo
					<i>SNCA</i>	rs356219	Positivo
De Mena	2010	512	268	Asturias	<i>FGF20</i>	rs12720208	Negativo
Muñoz	1999	71	109	Barcelona	<i>ACT</i>	ACT-AA	Negativo
Pastor	2001	117	90	Barcelona	<i>SNCA</i>	-164insA/ C-116G	Negativo
Samaranch	2010	147	70	Navarra	<i>GIGYF2</i>	p.P1238insAGC	Negativo
						p.Q1249del	Negativo
						p.L1230_Q1237del	Negativo

Tabla 16. Estudios de asociación de EP publicados en población española

ACT actin like protein, AOC1 amine oxidase, copper containing 1, APOE apolipoproteína E, BDNF brain derived neurotrophic factor, FGF20 fibroblast growth factor 20, GIGYF2 GRB10 interacting GYF protein 2, HNMT histamine N-methyltransferase, LINGO1 leucine rich repeat and Ig domain containing 1, MAPT microtubule-associated protein tau, SNCA sinucleína alfa, TF transferrina.

gen *HNMT* (*histamine N-methyltransferase*) en 214 pacientes y 295 controles de Madrid y Extremadura, y la de Lorenzo *et al* (2011) con el SNP rs11856808 del gen *LINGO1* (*leucine rich repeat and Ig domain containing 1*) en 721 pacientes y 1117 controles de varias zonas de España.

En la tabla 16 se resumen los estudios de asociación con EP publicados hasta la fecha en población española.

2. PROTEASOMA Y PROTEÍNAS RELACIONADAS

Como se trató con detalle en la sección *Antecedentes* el sistema UPS se ha relacionado con la patogenia de la EP. La agregación pro-

teica es clave para que ocurra EP. Dado que una de las funciones de UPS es la eliminación de proteínas no necesarias mediante el proteasoma, previo marcaje con ubiquitina, el papel de este sistema en la EP se ha estudiado detalladamente.

Los estudios previos para analizar la posible existencia de asociación entre las subunidades del proteasoma y la EP son escasos. En una cohorte de sujetos con EP alemanes se describió una variante en el gen de la subunidad ATPásica del proteasoma 19S PSMC4 (S6), que podría actuar como factor de riesgo para EP (Wahl *et al*, 2008). La variante en cuestión consiste en una inserción/delección de una secuencia nucleotídica corta en el intrón 5 (c.579 + 29 41 delinsGTTGGAG), mucho más frecuente en pacientes que en controles (OR = 4,28, $p = 0,032$), asociación especialmente significativa para el subgrupo de pacientes que habían comenzado con la enfermedad antes de los 50 años.

Las subunidades ATPásicas del proteasoma (PSMC1-6) pertenecen a la familia AAA, **A**TPasas **A**sociadas con diversas **A**ctividades celulares, entre las que se encuentran, por ejemplo, el transporte de endosomas, control de calidad y autofagia, modelado de membranas, función de microtúbulos y citoesqueleto (Sorokin *et al*, 2009). La espastina (Hazan *et al*, 1999) o la torsina A (Konakova *et al*, 2001), responsables respectivamente de la paraplejía espástica familiar tipo 4 (SPG4) y la distonía de torsión (DYT1) también pertenecen a esta familia de proteínas. Parece, por tanto, haber evidencias que apuntan a la existencia de un vínculo entre estas proteínas y enfermedades neurológicas degenerativas, que tienen en común el depósito de proteínas mal plegadas. Se ha mostrado que ASN inhibe la función proteasómica interaccionando con PSMC3 (S6' o *tbp1*) (Snyder *et al*, 2003). La ataxina 7, cuya mutación produce atrofia espinocerebelosa 7 (SCA7), interacciona con la unidad PSMC1 (S4) (Matilla *et al*, 2001). PSMC4 se relaciona con sinfilina 1 (Marx *et al*, 2007), sustrato de la parkina, que además se une a *asn* (Eyal y Engelender, 2006). Se ha mostrado que ambas proteínas, PSMC4 y sinfilina 1, interaccionan entre sí, se localizan conjuntamente en la célula, constituyen cuerpos de inclusión que funcionan como agrosomas y forman parte de los cuerpos de Lewy (Marx *et al*, 2007). Es interesante el hecho de que se ha descrito una mutación de cambio de sentido en 2 pacientes con EP esporádica en el gen que codifica la sinfilina 1 (*SNCAIP*) (Marx *et al*, 2003).

Todos estos datos sugieren la posible contribución de los genes que codifican las subunidades del proteasoma en el mecanismo patogénico y susceptibilidad a la EP. No obstante, son datos aún escasos y serán precisos estudios más exhaustivos para validar el papel de estos factores genéticos relacionados con el proteasoma y su papel celular.

3. REGIÓN GENÓMICA ENTRE SYT11 Y RAB25

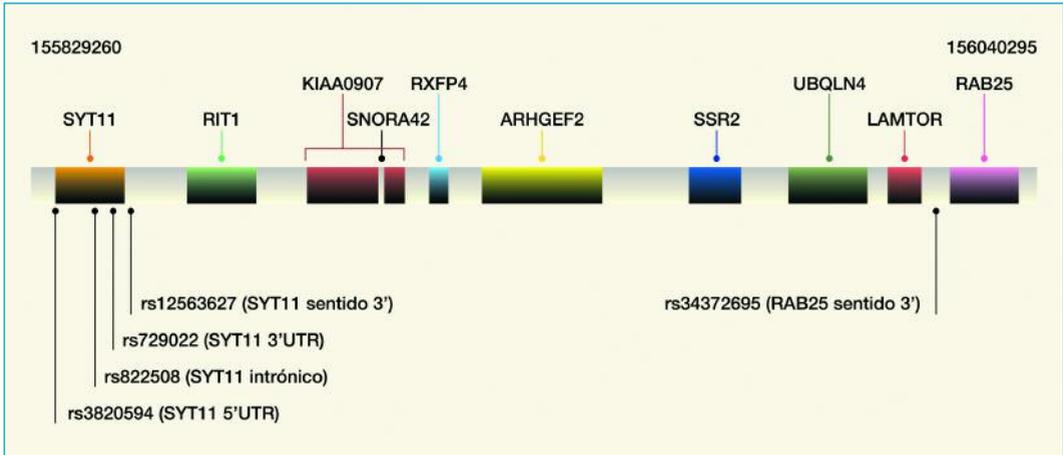
Hasta la fecha, se han publicado 3 estudios que mostraron asociación entre *SYT11* o sus proximidades y la EP (Nalls *et al*, 2011, Sharma *et al*, 2012, Pihlstrøm *et al*, 2013). El primero es un GWAS en el que se hallaron varias asociaciones con polimorfismos de diferentes genes. En los otros dos estudios se intentaron replicar los resultados del primer trabajo y en ambos casos se detectó una asociación significativa con polimorfismos de *SYT11*. Con anterioridad a estos tres trabajos, un estudio de asociación entre *SYT11* y EP realizado con 393 pacientes no había mostrado resultados estadísticamente significativos (Glass *et al*, 2004).

No tenemos conocimiento de ningún estudio de asociación entre *SYT11* y EP en población española. Ninguno de los GWAS incluyó pacientes españoles.

La primera asociación con EP descrita para el gen *SYT11*, rs202015799 (Nalls *et al*, 2011) corresponde a un polimorfismo intrónico. Curiosamente, en las dos réplicas realizadas se estudió el SNP rs34372695 que, de hecho, no se encuentra en localización intragénica en *SYT11* sino que se sitúa sentido 3' fuera de *SYT11*, en concreto a 176 kb, en el gen *RAB25*. (Sharma *et al*, 2012, Pihlstrøm *et al*, 2013).

En la muestra inicial de población gallega se detectó una asociación nominal con el alelo T del SNP rs3820594, situado en la región 5'UTR de *SYT11* y con el alelo G de rs729022, situado en 3'UTR. El alelo T de rs12563627, localizado entre *SYT11* y el gen contiguo *RIT1* no alcanzó significación estadística ($p = 0,065$, OR 1,27 [0,98 - 1,63]). Estos SNP se encuentran cercanos a rs202015799 y muy alejados de rs 34372695 (Figura 25).

En la muestra de replicación se observó asimismo una asociación nominal significativa entre la EP y variantes de *SYT11*. Como se in-



dicó en el apartado resultados, rs3820594 se sustituyó por rs822508. Los MAF de rs729022 y de rs12563627 en la población mexicana fueron diferentes de los de la población gallega. Ambos MAF, A y C respectivamente, se asociaron a EP en la muestra de replicación. Es decir, la replicación del SNP asociado sucedió con el alelo contrario al de la muestra inicial.

Si el alelo del SNP asociado en este caso a EP variase en poblaciones similares, probablemente se trataría de una asociación espuria. El que ocurra en poblaciones diferentes no anula la asociación. Lin *et al* (2007) denominan a este fenómeno genético *flip-flop* (biestable). Lo atribuyen a diferencias en el ambiente y en el acervo genético de las poblaciones, que pueden condicionar diferentes interacciones multigénicas (efecto multilocus). Por otro lado, los patrones de LD pueden ser completamente diferentes en poblaciones no relacionadas puesto que dependen de la historia de la población, la deriva genética, la tasa de recombinación y el equilibrio mutación selección.

Pese a las diferencias en las frecuencias alélicas y estructura entre las poblaciones de las muestras de Galicia y de México se logró replicar la asociación. No se puede descartar la influencia de estratificación poblacional en la muestra mexicana, si bien tanto casos como controles son muestras de la misma población mestiza. La contribución genética de la población mestiza de Ciudad de México está constituida por un 69% de origen indoamericano, 26% europeo, sobre todo español y 5% africano (Juárez-Cedillo *et al* 2008). Hay pocos estudios de asociación en población mestiza indoameri-

Figura 25.

Representación esquemática de la región genómica que se extiende entre SYT11 y RAB25, con todos los genes que hay entre ambas localizaciones.

Estudios de asociación con EP realizados en población mexicana							
Autor	Año	N casos	N controles	Población	Genes	Polimorfismos	Resultado
Gallegos	2009	105	107	Mestiza	APOE	ε3	Protector
						ε4	Positivo
López	2007	229	229	Mestiza	APOE	ε3/ ε3	Positivo
						ε4/ ε4	Positivo
Martínez	2010	117	122	Mestiza	PARK2	Ser167ASN	Negativo
						Val380Leu	Negativo
Ramírez							
Jirano	2006	51	125	Mestiza	SNCA	-116C-G	Negativo
Ramírez							
Jirano	2007	51	125	Mestiza	SNCA	IVS4+66A-G	Negativo

Tabla 17. Estudios de asociación con EP realizados en población mexicana

cana. En la tabla 17 se resumen los estudios de asociación con EP realizados en población mexicana.

En la región genómica de 211,05 kb (0,211 Mb) comprendida entre *SYT11* y *RAB25*, además de estos dos genes se ubican varios otros: *RIT1*, *SNORA42*, *KIAA0907*, *RXFP4*, *ARHGEF2*, *SSR2*, *UBQLN4* y *LAMTOR2*, que se resumen en la tabla 18 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) y figura 25.

SYT11 se sitúa en el locus 1q22 (1: 155829260 – 155854990). Aunque todos los estudios previos se refieren a la asociación entre EP y *SYT11*, sin hacer mención a otros genes en las proximidades, no es posible establecer en la actualidad de manera definitiva cuál es el posible elemento funcional relevante en dicha asociación. El gen más próximo a uno de los SNP asociados en estudios previos, *RAB25* está constituido por 5 exones. Sus coordenadas son 156030966 - 156040295. Codifica la proteína homónima *RAB25*, *member Ras oncogene family*, de 217 aminoácidos (He et al, 2002). No se ha identificado expresión de esta proteína en el sistema nervioso. La familia *Ras* (*Rat sarcoma*) está constituida por GTPasas de pequeño tamaño que actúan en el tráfico de membrana. *RAB25* colabora en numerosas funciones: transmisión de señales, proliferación celular, apoptosis, organización microtubular, reciclado del receptor de la transferrina, transporte transcelular de la inmunoglobulina A o tráfico de integrinas. Interviene en la génesis y extensión de tumores del tubo digestivo, ovario, mama o riñón (Agarwal et al, 2009), aunque, paradójicamente, también desempeña un papel de supresión tumoral en determinadas circunstancias (Nam et al, 2010). *RAB25* se relacio-

Características de los genes situados entre SYT11 y RAB25

Símbolo del gen	Coordenadas genómicas (NCBI)	Nombre completo del gen	Producto genético	Función
RIT1	1:155.867.599 – 155.881.193	<i>Ras-like without CAAX 1</i>	<i>Ras-like protein without CAAX 1 motif 1</i>	GTPasa
SNORA42	1:155.889.700 – 155.889.833	<i>Small nucleolar RNA, H/ACA box 42</i>	<i>Small nucleolar RNA, H/ACA box 42</i>	Gen ARN
KIAA0907	1:155.882.836 – 155.904.188	<i>KIAA0907</i>	<i>UPF0469 Protein KIAA0907</i>	Proteína de gran tamaño y función desconocida
RXFP4	1:155.911.480 – 155.912.625	<i>Relaxin/insulin-like family peptide receptor 4</i>	<i>Relaxin/insulin-like family peptide receptor 4</i>	Receptor acoplado a proteína G (GPR)
ARHGEF2	1:155.916.630 – 155.948.336	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2</i>	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2</i>	Se une a Rho (una GTPasa)
SSR2	1:155.978.838 – 155.990.757	<i>Signal sequence receptor, beta (translocon-associated protein beta)</i>	<i>Signal sequence receptor, beta</i>	Proteína de señal del retículo endoplásmico
UBQLN4	1:156.005.091 – 156.023.515	<i>Ubiculina 4</i>	<i>Ataxin-1 ubiquitin-like interacting protein (A1Up)</i>	Regula la degradación de la conexina 43. Interacciona con la ataxina 1
LAMTOR2	1:156.024.516 – 156.028.300	<i>Late endosomal /lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 2</i>	<i>Mapbpip interacting protein</i>	Posible papel en la biogénesis del endosoma

na estrechamente con las integrinas $\alpha 2$, $\alpha 5$ y $\beta 1$, proteínas que interviene en las uniones celulares (Krishnan *et al.*, 2013). En concreto RAB25 se ocupa de la vuelta a la superficie celular de fragmentos proteicos previamente internalizados. Esta relación es clave para la extensión tumoral (Caswell *et al.*, 2007). Se ha descrito un incremento o disminución de otras proteínas RAB en el cerebro de rata tratada con clozapina (Kontkanen *et al.*, 2001). Curiosamente el exceso de ASN altera la formación de vacuolas en un estadio muy inicial debido a su interacción con una proteína de la familia RAB, RAB1a (Winslow *et al.*, 2010). Dado que la proteína RAB25 no se ha descrito en el sistema nervioso, en el momento actual resulta complicado relacionarla con la patogenia de enfermedades degenerativas neurológicas.

De los otros genes próximos a SYT11 en sentido 3' ninguno se ha asociado con la EP (Lill *et al.*, 2012). Se trata de genes muy variados, que incluyen un gen anidado (Kumar, 2009) codificante de ARN, SNORA42. Se encuentra dentro del gen KIAA0907. En esta

Tabla 18.

Características de los genes situados entre SYT11 y RAB25

región genómica se han encontrado 2 SNP que se han asociado a enfermedades del sistema nervioso. En concreto rs228301, situado en *RIT1*, se ha relacionado con los trastornos de atención (Sonuga-Barke *et al*, 2008) y rs2364403, localizado en *ARHGEF2* podría tener que ver con la edad de inicio de la esclerosis lateral amiotrófica (ALSGEN Consortium, 2013). *ARHGEF2* (*Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2*) codifica la proteína homónima de 985 aminoácidos. Las GTPasas pequeñas relacionadas con Rho intervienen en la señalización entre el espacio extracelular y en núcleo. Los factores de intercambio del nucleótido guanina (GEF) como *ARHGEF2* permiten el intercambio de GDP por GTP en las proteínas Rho (Krendel *et al*, 2002). Las mutaciones del gen *ALS2* (alsina) dan lugar a una forma juvenil recesiva de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), a esclerosis lateral primaria y a una forma de paraparesia espástica hereditaria ascendente infantil. La proteína homónima que codifica este gen contiene tres dominios GEF, uno de ellos para proteínas Rho (Yamanaka *et al*, 2003).

De especial interés por su relación con el proteasoma puede ser *UBQLN4* (ubicuilina 4). Codifica una proteína de 4,0 Kb y 661 aminoácidos llamada A1Up (*ataxin-1 ubiquitin-like interacting protein*), que interacciona tanto con la ataxina 1 natural como con la mutada por repeticiones de poliglutamina. Esta mutación da lugar a la ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1) (Davidson *et al*, 2000). A1Up pertenece a la familia de proteínas UbL-UBA, que tienen que ver con UPS. Contiene un dominio N-terminal UbL (*ubiquitin like*), 4 motivos ST11 que se unen a chaperoninas y un dominio C-terminal UBA (*ubiquitin associated*). UbL se une a la unidad no ATPasa del proteasoma 19S PSD4 (S5a, Rpn10). La ataxina 1 mutada dificulta esta unión. UBA determina la localización y estabilidad de la proteína y se une a ubiquitina. A1Up estabiliza la ataxina (Riley *et al*, 2004). La proteína homóloga a A1Up en la levadura y el ratón CIP75 regula la degradación de la proteína conexina 43, situada en las uniones intercelulares comunicantes (*gap*) (Li *et al*, 2008), por un mecanismo independiente de la ubiquitina (Su *et al*, 2010).

Las sinaptotagminas (SYT) son un grupo de 17 proteínas transmembrana que intervienen en la regulación del tráfico tanto a través de la membrana plasmática como a través de la membrana de las vesículas. Desempeñan un papel clave en la transmisión sinápti-

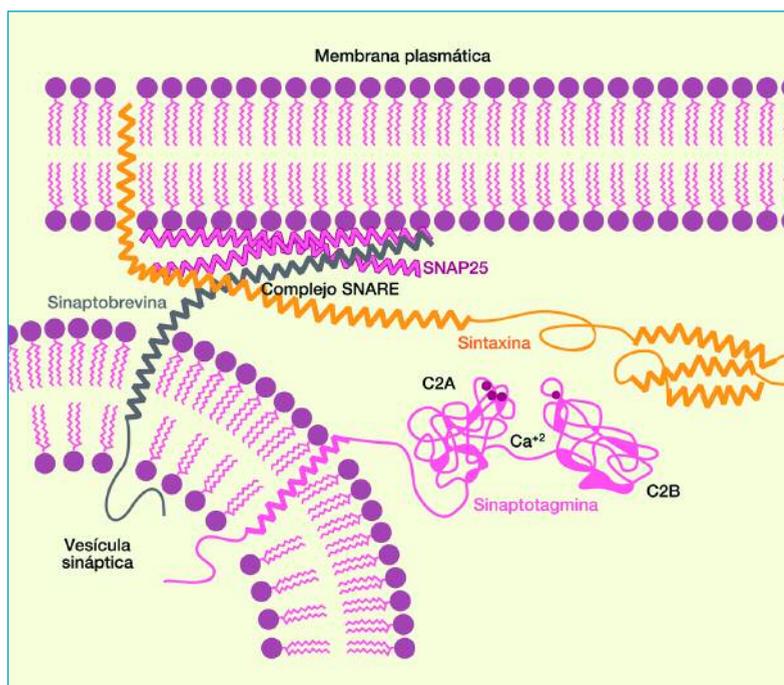
ca mediante la exocitosis de vesículas que contienen neurotransmisores (Chapman, 2008, <http://www.genenames.com>). SYT 1-7 y 9-13 se expresan sobre todo en neuronas, aunque también en las células de la glía (Glavan *et al*, 2009). Las SYT constan de un dominio N-terminal con 4-62 aminoácidos dentro de la vesícula presináptica, un dominio corto transmembrana y un dominio extravésicular citoplasmático con dos lugares C2, C2A y C2B unidos entre sí (Südhof, 2002, Chapman, 2008).

En algunas SYT (SYT 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9 and 10) C2A y C2B actúan como sendos lugares de unión a iones Ca^{+2} (Fernández Chacón *et al*, 2002). En ausencia de calcio, los fosfolípidos de membrana y los dominios C2 de las SYT muestran una fuerte repulsión entre sí, debido a que ambos están cargados negativamente. La unión del calcio con C2A activa la exocitosis mediante la fusión entre la membrana vesicular y la membrana plasmática. El dominio C2B también tiene capacidad de unión al calcio, aunque mucho menor (Fernández Chacón *et al*, 2002). C2B también se une a AP-2 (*clathrin assembly protein-2*). Este complejo interviene en la endocitosis y en el reciclaje de la membrana plasmática (Zhang *et al*, 1998). La afinidad de C2A y C2B por el calcio se incrementa 1000 veces en presencia de los fosfolípidos de las membranas (Zhang *et al*, 1998).

En el momento en que el botón presináptico se despolariza se abren los canales de calcio dependientes del voltaje (VDCC), que dan lugar a la entrada masiva de este ion. La unión al calcio es imprescindible para que las SYT actúen en los procesos de fusión de membranas previos a la exocitosis. Para ello necesitan activar el complejo proteico SNARE (*Soluble NSF Attachment Protein Receptor*). SNARE consta de 4 cadenas proteicas, divididas en una parte vesicular (V-SNARE), formada por la sinaptobrevina/VAMP (*vesicle-associated membrane protein*), y una parte transmembrana (T-SNARE), formada por la sintaxina y por SNAP 25 (*25-kD synaptosomal-associated protein*), esta última formada a su vez por 2 cadenas. En concreto las SYT se unen a la sintaxina. Este anclaje doble a los fosfolípidos de la membrana vesicular y de la membrana plasmática es crucial para que se produzca la fusión de las membranas y la exocitosis (Malsam *et al*, 2008, Yoon y Shin, 2009) (figura 26).

Como se indicó en la sección *Antecedentes*, la ASN favorece la formación del complejo SNARE. Dos estudios han sugerido diferentes

Figura 26. El complejo SNARE, formado por sinaptobrevina, sintaxina y SNAP25 provoca la exocitosis mediante la fusión de las membranas plasmática y de la vesícula. Para activarse necesitan de ciertas sinaptotagminas. La entrada de calcio en el botón presináptico permite que la sinaptotagmina se una a la sintaxina y se inicie la exocitosis. Se desconoce la función de las sinaptotagminas que no se unen al calcio (modificado de <https://wiki.brown.edu/confluence/display/BN0193S04/SNARE>)



mecanismos. En el primero se muestra que la ASN revierte los efectos negativos de la pérdida de la proteína sináptica CSP α (*cysteine-string protein- α*) en un grupo de ratones con déficit de esa proteína. CSP α presenta actividad cochaperona y se postula que contribuye a la eliminación de moléculas tóxicas en la sinapsis. También es necesaria para ensamblar los componentes de SNARE. En los ratones defectivos el proceso de ensamblaje, inicialmente alterado por la falta de CSP α , se compensa mediante la acción de ASN (Chandra et al, 2005). Otro estudio mostró que ASN se une a la parte vesicular de SNARE, sinaptobrevina/VAMP, lo que favorece el ensamblaje de los componentes proteicos del complejo (Burre et al, 2010).

Se ignora la función de las SYT que no se unen al calcio, SYT 4, 8, 11, 12, 13 y 15, y que, por lo tanto, no interactúan con SNARE. Se ha propuesto que tal vez inhiban la exocitosis, mediante el bloqueo de la unión de las otras SYT con SNARE (Bhalla et al, 2008). Por otra parte, se ha sugerido que algunas SYT (1, 2, 4, 7, 10 y 11) podrían desempeñar algún papel en la plasticidad neuronal. Se han mostrado cambios en la expresión génica de las SYT relacionados con la respuesta inflamatoria, con el tráfico de membrana o con la formación de sinapsis que se habían perdido (Glavan et al, 2009).

Además de regular la exocitosis de las vesículas sinápticas, las SYT también intervienen en la exocitosis de hormonas (Gustavsson y Han, 2009) del acrosoma de los espermatozoides (Roggero *et al*, 2007), fagocitosis (Arango Duque *et al*, 2013) y en la desgranulación de las células mastoideas (Melicoff *et al*, 2009).

El gen *SYT11* tiene una longitud de 5 kb y consta de 4 exones (Glass *et al*, 2004). Codifica una proteína homónima de 431 aminoácidos que se expresa en la mayoría de las áreas encefálicas tanto en las neuronas como en los astrocitos, donde es la SYT más abundante (Mittelsteadt *et al*, 2009). Es de las SYT que aparece con mayor frecuencia en las células CA1 del hipocampo (Glavan *et al*, 2009). También se expresa en células no nerviosas (von Poser *et al*, 1997). La sinaptotagmina XI (*SYT11*) se colocaliza con la parkina alrededor de la membrana nuclear y en las neuritas (Huyhn *et al*, 2003). Es más abundante en la terminal presináptica (vesículas y membrana presináptica) que en las dendritas postsinápticas. Está presente en las terminales presinápticas tanto excitatorias como inhibitorias. Probablemente forma complejos multiméricos (Yeo *et al* 2012).

SYT11 se diferencia de otras SYT en un resto de serina que sustituye a uno de los 5 restos de aspartato necesarios para la unión con calcio en el sitio C2A (von Poser *et al*, 1997). Muestra una gran homología con *SYT4*. Ambas se incluyen en las SYT de clase 4 (Yeo *et al*, 2012). Los dominios de *SYT11* son: dominio vesicular (resto de aminoácido 1-15), transmembrana (16-36) y citoplásmico (37-431). Dentro de este último se encuentran C2A (resto de aminoácidos 174-262) y C2B (resto de aminoácidos 304-397) (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9BT88>) (figura 27).

Se desconoce la función de *SYT11*. Se ha sugerido un papel en la regulación negativa de la transmisión presináptica rápida (Wang *et al*, 2001). Se han considerado otras funciones como regulación de la liberación de neurotransmisor y el tráfico postsináptico (Yeo *et al*, 2012). También se ha relacionado con la plasticidad neuronal (Glavan *et al*, 2009). Un estudio mostró que *SYT11* se une a KIF1A (*Kinesin family member 1A*). Las cinesinas son una familia de proteínas que favorecen el transporte anterógrado de vesículas a través de los microtúbulos en las terminales presinápticas, así como el transporte de las mitocondrias. Es probable que *SYT11* sea necesario para que la carga se una a la molécula transportadora (Park

Figura 27. Secuencia aminoacídica de SYT11. C2A y C2B están formados por los aminoácidos marcados y constituyen en lugar de unión a la parkina

10	20	30	40	50	60
MAEITNIRPS	FDVSPVVAGL	IGASVLVVCV	SVTVFVWSCC	HQQAEKKQKN	PPYKFIHMLK
70	80	90	100	110	120
GISIYPETLS	NKKKIIKVR	DKDGPREGG	RRNLLVDAE	AGLLSRDKDP	RGFSSGSCID
130	140	150	160	170	180
QLPIKMDYGE	ELRSPITSLT	PGESKTTSPS	SPEEDVMLGS	LTFSVDYNFP	KKALVVTIQE
190	200	210	220	230	240
AHGLPVMDDQ	TQGSDDPIKM	TILPKRHRV	KTRVLRKTLT	PVFDFTFTFY	GIPYSQLQDL
250	260	270	280	290	300
VLHFLVLSFD	RFSRDDVIGE	VMVPLAGVDP	STGKVLTRD	IIKRNQKCI	SRGELQVSL
310	320	330	340	350	360
YQFVAQRMTV	VVLRARHLPK	MDTGLSSENF	YVKVNVYVGR	KRIAKRKHV	KRCTLNEIFK
370	380	390	400	410	420
ESFIVDIPFD	LLPDISIEFL	VIDFRTTKN	EVVGRLLGA	HSVTASGAEH	WREVCESPRK
430					
PVAKWHSLSE	Y				

et al, 2005). En ratones defectivos para *KIF1A* se observó una reducción de la densidad de vesículas sinápticas en las terminales nerviosas (Yonekawa *et al*, 1998). Se han identificado mutaciones en *KIF1A* en la paraplejía espástica hereditaria autosómica recesiva SPG30 (Klebe *et al*, 2012).

Fuera del sistema nervioso se ha estudiado con detalle el papel de SYT11 en los macrófagos, implicada en la capacidad microbicida de estas células ya que interviene en la formación del fagosoma. Algunos microorganismos patógenos inactivan SYT11 para contrarrestar la capacidad microbicida del macrófago (Arango Duque *et al*, 2013).

SYT11 se ha identificado como sustrato de la parkina. Junto con otros sustratos como p38 o sinfilina 1, SYT11 forma parte de los cuerpos de Lewy. La parkina se une a los dominios C2A y C2B de SYT11, dando lugar a su poliubiquitinación. Los lugares de unión de la a SYT11 se encuentran en la parkina entre los residuos 204 y 238 y 257 y 293 (figura 27). Este último tramo contiene el dominio RING1. La parkina mutada tiene menos afinidad por SYT11, como sucede en una mutación de cambio de sentido en RING1. En estas mutaciones la cantidad de SYT11 ubiquitinada es mucho menor

que en condiciones normales. La unión a la parkina incrementa la velocidad de recambio de SYT11 (Huyhn *et al*, 2003).

Se ha sugerido que SYT11 puede representar algún papel en la esquizofrenia. Se ha encontrado una unidad de repetición en tándem de 33 pb, con actividad promotora, que se localiza inmediatamente antes del inicio de la transcripción de *SYT11*. Mientras que el alelo más frecuente en general es el de 2 repeticiones, en pacientes con esquizofrenia se ha detectado con mayor frecuencia de lo habitual el alelo de 3 repeticiones, excepcional en la población general. Del mismo modo que la eliminación de esta repetición en tándem disminuye la síntesis de SYT11, la triple repetición la incrementa, probablemente por la diferente capacidad de unión a la proteína Sp1 (*specificity protein 1*), un factor de transcripción. En este proceso de transcripción de *SYT11* interviene asimismo YY1, con actividad tanto promotora como represora de la transcripción. En esta región promotora de *SYT11* también se ha identificado un SNP que condiciona la transcripción del gen, pero no se ha relacionado con la esquizofrenia (Yokota *et al*, 2003, Inoue *et al*, 2007). En el cerebro de rata tratada con clozapina se ha descrito un incremento SYT11 (Kontkanen *et al*, 2002). En otro modelo de rata tratada con MK-801, un antagonista dopaminérgico que simula los síntomas negativos de la esquizofrenia, se ha constatado una disminución del ARNm de SYT11 en la corteza cerebral (Paulson *et al*, 2003).

En resumen, los resultados de estudios previos de asociación, junto con los del presente trabajo en dos poblaciones diferentes, sugieren una posible relación de *SYT11* o de factores genéticos en su región próxima con la EP. Los datos que relacionan *SYT11* con enfermedades del sistema nervioso central son consistentes. Es muy probable que regule la transmisión sináptica y no se descarta que intervenga en la plasticidad neuronal. Por otro lado SYT11, es sustrato de la parkina y está presente en los cuerpos de Lewy. Además se ha sugerido una asociación entre la región promotora de *SYT11* y esquizofrenia. Todo ello sugiere que *SYT11* podría ser el factor clave en esta región génica con influencia en el riesgo a EP. El gen *UBQLNA*, próximo a *RAB25*, también es un interesante candidato funcional para un posible papel en la EP. Serán necesarios nuevos estudios que profundicen tanto en la función de la proteína sinaptotagmina XI, como en su papel y la de genes vecinos en la EP

y otras enfermedades del sistema nervioso central. Podría incluso ocurrir que fuese la combinación de variantes en todo el bloque haplotípico lo que confiriese susceptibilidad.

4. INTERPRETACIÓN GLOBAL DEL ESTUDIO DE ASOCIACIÓN

Globalmente, los datos de este estudio apoyan el papel de *MAPT* y *SNCA* como factores de riesgo de EP en población gallega, como ya se había mostrado en otras poblaciones. Los resultados de la región genómica de *SYT11*, junto con los mostrados recientemente en otros estudios sugieren que este gen o alguno próximo podrían intervenir de algún modo en la patogenia de la EP. Respecto al estudio de asociación con los genes que codifican las subunidades del proteasoma, tan solo se halló asociación nominal en la población gallega, que no se pudo reproducir en la muestra mexicana. Estudios previos sobre estos genes, con excepción de variantes en *PSC4*, tampoco arrojaron datos sugestivos de asociación entre los elementos del proteasoma y la EP. No obstante, dado la relación biológica entre el proteasoma y la fisiopatología de la EP, probablemente esta línea de investigación debiera explorarse con más detenimiento, en mayores series y con mayor número de marcadores en el futuro.

Han de tenerse en cuenta las limitaciones de este estudio. En primer lugar, el tamaño muestral es pequeño. Con el diseño empleado no es posible detectar factores que incrementen el riesgo de padecer la enfermedad en menos del 40%. En la actualidad los estudios de asociación son generalmente multicéntricos, con miles de muestras y abordajes de todo el genoma, y aun así los resultados son limitados. Por otra parte, este tipo de planteamientos de asociación están basados en la hipótesis *enfermedad común - variante común* que, como se indicó en la introducción, puede ser o no el escenario real en la mayoría de los casos. Si esta hipótesis no fuese cierta, y los factores que influyen la susceptibilidad o protección frente a la EP fuesen variantes raras diversas en distintos pacientes, las aproximaciones metodológicas de este tipo de estudios no serían adecuadas para detectarlas. Un factor que puede incrementar el riesgo de falsos positivos en los estudios de asociación es la presencia de estratificación poblacional. Para la muestra gallega no se

consideró necesario, ya que existen datos que sugieren la ausencia de subestructura poblacional significativa para variantes no raras. En la muestra mexicana, compuesta por sujetos mestizos, tampoco se llevaron a cabo análisis de SNP neutrales en casos y controles para evaluar la posible estratificación de casos y controles.

A la hora de interpretar los resultados de un estudio como este es importante recordar que la detección de asociación entre un polimorfismo concreto y una enfermedad puede o no tener un significado funcional. El polimorfismo en cuestión podría estar implicado en la patología por alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína (SNP funcional). Incluso estando en regiones intrónicas, un determinado polimorfismo podría afectar a la traducción de la proteína o a la regulación de la expresión del gen a través de estructuras secundarias, por efecto sobre el corte y empalme alternativo o alterando la estabilidad del ARN mensajero. También puede ocurrir que un polimorfismo asociado a cierta enfermedad no tenga ningún papel funcional, sino que se trate de un marcador en desequilibrio de ligamiento con otra mutación funcional. Por ello, el posible papel en la EP de los SNP que han mostrado asociación en este estudio debería confirmarse y definirse por medio de estudios funcionales.

iii. Determinantes monogénicos de EP: LRRK2 y PARK2

En nuestra serie se identificaron 2 pacientes, de familias independientes, con mutación de *PARK2* en homocigosis. Ambos casos se corresponden clínicamente con el patrón descrito habitualmente para la EP causada por mutaciones en *PARK2*: datos de herencia autosómica recesiva, inicio temprano y respuesta mantenida al tratamiento al cabo de varios años. En España se han publicado diversos estudios para evaluar la presencia de mutaciones de *PARK2* en la EP, especialmente juvenil. Hoenicka *et al* (2002) en familias originarias de varios lugares de España encontraron una prevalencia de mutaciones de *PARK2* en homocigosis del 38% en familias con EP recesiva, que incluían dos nuevas mutaciones (p.V56E y p.C212Y). Los análisis de *SNCA* y *UCHL1* no permitieron identificar ninguna mutación en las 19 familias estudiadas por estos auto-

res. Muñoz *et al* (2002) analizaron 37 pacientes con enfermedad de Parkinson hereditaria recesiva de comienzo temprano. El 19% eran portadores de mutaciones de PARK2 (6 en homocigosis y 1 en heterocigosis). La mutación c.255delA fue la más frecuente en esta serie.

De los pacientes con la mutación p.G2019S de LRRK2 solo 3 de 7 tenían antecedentes familiares de la enfermedad. Ninguno de los pacientes con esta mutación e inicio de la enfermedad antes de los 45 refería historia familiar de EP. La familia descrita en la sección *Resultados*, con 4 miembros afectados por EP, muestra algunos datos que retan las características mendelianas esperables en una enfermedad con herencia autosómica dominante como LRRK2:

1. Consanguinidad de los padres (eran primos hermanos) de los dos pacientes que desarrollaron inicialmente la enfermedad. En esta generación no hay más afectados por la EP. 2 hermanas de estas pacientes padecen sordera congénita. Antes de que se constatasen miembros afectados de la siguiente generación, se esperaba encontrar una forma recesiva de EP.
2. Baja prevalencia de EP en una familia extensa con una mutación autosómica dominante, aunque LRRK2 tiene penetrancia incompleta. No se dispone del análisis genético de otros miembros de la familia que no padecen la enfermedad. La paciente PARK8-2 tiene 13 hijos. Si el 50% hubiesen heredado la mutación, considerando una penetrancia baja del 35%, tendría que haber al menos 2 afectados. Podrían aún desarrollar la enfermedad en el futuro, considerando que su madre comenzó a los 61.
3. Uno de los sujetos afectados, con antecedentes familiares (madre, tía materna y hermano) presenta un fenotipo de EP similar a la de sus familiares con la mutación p.G2019S pero no es portador de la mutación. Se trata, por tanto, de una fenocopia, fenómeno no infrecuente en la EP monogénica.

El término fenocopia se refiere a los pacientes con fenotipo similar al de una enfermedad monogénica conocida con una mutación diferente a la aparentemente causal o sin causa genética o ambien-

tal conocida (Klein *et al*, 2011). En una amplia revisión de familias con mutaciones en *SNCA*, *PARK2*, *PINK1* y *LRRK2*, Klein *et al* (2011) encuentran 14,4% de familias y un 5% de individuos con fenocopias. En el caso de *LRRK2* los porcentajes son, respectivamente, de 18,2 y 5,1%. Las posibles explicaciones para este fenómeno incluyen la presencia de otra mutación causante de EP en la misma familia, y la coincidencia de una EP esporádica o bien otras causas de parkinsonismo.

La EP atribuida a la mutación del gen de la *LRRK2* tal vez constituya un ejemplo de la frontera difusa entre la herencia mendeliana y factores genéticos de susceptibilidad. Aunque la penetrancia es variable, puede llegar a ser tan baja como del 35% (Clark *et al*, 2006). Se han descrito sujetos de avanzada edad portadores de una mutación en el gen *LRRK2* y asintomáticos (Carmine Berlin *et al* 2006, Gaig *et al*, 2006). También se han encontrado homocigotos para alguna mutación de este gen cuyo fenotipo no se diferenciaba de los heterocigotos (Ishihara *et al*, 2006). Se han descrito 127 variantes del gen *LRRK2* relacionadas de una u otra manera con la EP. Solo 6 de ellas se consideran mutaciones y otras se consideran variantes de susceptibilidad. La penetrancia variable, junto con una elevada frecuencia de fenocopias sugieren que tal vez las variantes de *LRRK2* sean, más que un factor monogénico o mendeliano, un factor que confiere elevada susceptibilidad a padecer EP, mayor que *GBA* pero menor que *SNCA*, o un factor cuyo concurso es necesario para que otro gen, indeterminado, provoque la EP. Recientemente se ha propuesto que las mutaciones de *LRRK2* podrían modificar las sinucleinopatías mediante: 1) disminución de la degradación de asn por autofagia, 2) incremento de la agregación de asn mediante un aumento de la actividad inflamatoria de la microglía, 3) facilitación de la transporte interneuronal de asn (Hyun *et al*, 2013).

En España se ha estudiado la prevalencia de mutaciones de *LRRK2* en pacientes con EP en varias poblaciones, que se describen en la tabla 19

Esta forma de EP se describió por primera vez en 5 familias de Inglaterra y del País Vasco. El factor causal se denominó *dardarina* (Paisán Ruiz *et al*, 2004). La mutación más frecuente en España es p.G2019S salvo en el País Vasco, donde es más frecuente la mutación p.R1441G, con prevalencias respectivas de 3,82% y 13,15%

Estudios de LRRK2 en población española							
Autor	Año	N casos	N controles	Área geográfica	Tipo EP	Mutación	Prevalencia%
Gaig	2006	302 (94F, 208E)	*	Barcelona	Familiar y esporádico	p.G2019S	6,4 F; 3,4 E
						p.R1441G	0,7
Gao	2009	172	287	Andalucía	Esporádico	p.G2019S	1,74
						p.R1441G	1,74
Gorostidi	2009	418	138	País Vasco	Esporádico	p.G2019S	3,82
						p.R1441G	13,15
Infante	2006	105	310	Cantabria	Esporádico	p.G2019S	7,6
						p.R1441G	0
Mata	2005	225	100	Asturias	Esporádico	p.R1441G	2,7
Mata	2006	225	100	Asturias	Esporádico	p.G2019S	2,7
Morán	2010	96	163	Extremadura	Familiar y esporádico	p.G2019S	2,08
						p.R1441G	0

F: familiar, E: esporádico. *Estudio sin grupo control

Tabla 19. Estudios de LRRK2 en población española.

en EP esporádica (Gorostidi *et al*, 2009). Se ha demostrado un efecto fundador de la mutación p.R1441G en el País Vasco en el siglo VII (Mata *et al*, 2009, Simón Sánchez *et al*, 2006). La prevalencia de las mutaciones p.G2019S y p.R1441G varía según la población estudiada. En Asturias la prevalencia de ambas mutaciones es de 2,7% en EP esporádica (Mata *et al*, 2005, Mata *et al*, 2006). En Andalucía, también en EP esporádica, ambas mutaciones se registran en el 1,74% de los casos (Gao *et al*, 2009). En Cataluña p.R1441G ocurre en un 0,7% de EP en general y p.G2019S un 6,4% en EP familiar y 3,4% en EP esporádica (Gaig *et al*, 2006). En Cantabria se ha descrito una prevalencia de 7,6% de la mutación p.G2019S en EP esporádica y ningún caso de p.R1441G (Infante *et al*, 2006). Finalmente en Extremadura no se han detectado casos con la mutación p.R1441G y la prevalencia de p.G2019S fue de 2,08% en una muestra de 96 pacientes que incluían EP esporádica y familiar. En este caso, los 2 pacientes tenían antecedentes familiares (Morán *et al*, 2010). El estudio realizado en nuestro trabajo no es comparable a los anteriores, pues el análisis se realizó a un grupo de pacientes seleccionados y no a toda la muestra.

Según estos estudios, la prevalencia de mutaciones de LRRK2 en la EP, incluso esporádica, aun siendo baja, no es rara. Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente sobre la baja penetrancia y la

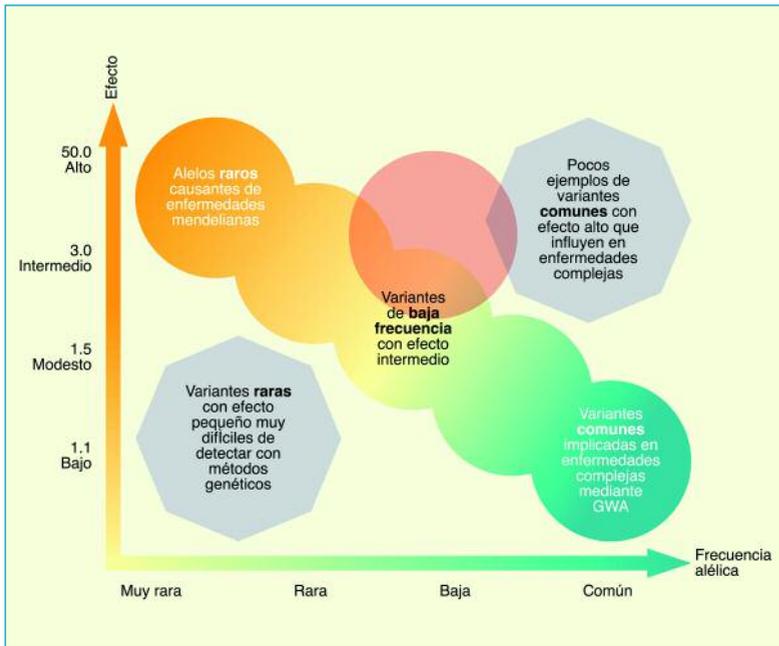


Figura 28. Posible situación de las variantes de la *LRRK2* en relación con la EP (círculo anaranjado ●). Explicación en el texto (modificado de Manolio *et al*, 2009).

posibilidad de que las mutaciones de *LRRK2* pudiesen ser más un factor de susceptibilidad que un determinante monogénico mendeliano, el efecto sobre la EP podría situarse en la zona marcada en rojo en la figura 28.

La EP debida al gen *SNCA* (*PARK1*) es muy infrecuente. Tan solo se han descrito 4 mutaciones. Una de estas, p.E46K, se halló en una familia muy numerosa del País Vasco. Los sujetos afectados podrían cursar como EP o como enfermedad con cuerpos de Lewy (Zarranz *et al*, 2004). Esta es la única familia española publicada con mutación en *SNCA*. No se observó ningún caso con mutación de *SNCA* en nuestra serie.

VIII. Conclusiones

1. Se ha creado una colección bien caracterizada de pacientes con EP y controles que servirá en el futuro para realizar nuevas investigaciones sobre factores de susceptibilidad relacionados con la EP.
2. Este estudio confirma la asociación previamente descrita entre EP y los genes *MAPT* y *SNCA* en la población gallega, genéticamente muy homogénea. En el caso de algunos polimorfismos, los resultados son superponibles a los obtenidos en la población asturiana, geográficamente muy próxima, con una estructura genética semejante y un tamaño muestral mayor en los estudios publicados.
3. Este resultado positivo que confirma asociaciones previas sugiere que los métodos aplicados son correctos y fiables. Muestras pequeñas pero adecuadamente seleccionadas, con características clínicas y genéticas bien controladas en pacientes y controles podrían ser suficientes para tener en consideración frente a otras colecciones de mucho mayor tamaño.
4. Se ha hallado una asociación nominal entre polimorfismos de los genes que codifican subunidades del proteasoma y la EP en la muestra de población gallega. Esta asociación no se matuvo en el estudio de replicación en la muestra mexicana. De todos modos, tanto los datos conocidos del papel del proteasoma en la EP como algún polimorfismo descrito en alguno de estos genes no permiten descartar una posible asociación, para lo que se necesitarán nuevos estudios con muestras de mayor tamaño.
5. Pese a no superar las correcciones de pruebas múltiples, la asociación nominal entre algunos polimorfismos de *SYT11* y la EP encontrada en la muestra de población gallega sí se reprodujo en el estudio de replicación con la muestra mexicana. Estos dos resultados positivos junto con los dos descritos previamente en la

literatura médica hacen pensar que SYT11, o el producto de algún gen próximo, podrían intervenir de algún modo en la patogenia de la EP. La ubicuidad de SYT11 en el sistema nervioso central, su presencia en las sinapsis, especialmente en la terminal presináptica, su condición de sustrato de la parkina, su posible papel en la plasticidad neuronal y en la regulación de la exocitosis y su relación con la esquizofrenia refuerzan su posible papel en la patogenia de la EP.

6. Este es el primer estudio positivo de asociación entre *SYT11* y la EP en población española. Ninguno de los tres publicados anteriormente incluyeron pacientes españoles.
7. Serán necesarios más estudios de asociación con muestras de mayor tamaño, que incluyan un número mayor de polimorfismos tanto de los genes diana como en las regiones próximas a estos genes para intentar confirmar la posible señal de esta región genómica en la génesis de la EP.
8. En nuestra serie se identificaron dos familias con mutación de *PARK2* en homocigosis (delección en el exón 4 y c255delA). Ambas mutaciones ya eran conocidas previamente en la literatura, pero su prevalencia en nuestra comunidad no es conocida. Las características clínicas de estos pacientes fueron similares a las descritas previamente en *PARK2*.
9. Los datos en la familia con EP portadora de la mutación p.G2019S de *LRRK2*, junto con los conocidos previamente sugieren que esta mutación podría características intermedias entre un determinante monogénico y un factor de susceptibilidad, lo que supone un gran reto para su interpretación y aplicación clínica.

IX. Perspectivas futuras

En el momento actual el conocimiento acerca de la EP se encuentra en una encrucijada. En los últimos años la investigación básica, especialmente el descubrimiento de las formas monogénicas de la EP, ha permitido dilucidar ciertos mecanismos de la fisiopatología de la enfermedad, como el papel de la ASN. La fisiopatología molecular se sigue centrando en la mitocondria, el proteasoma, el estrés oxidativo, la inflamación o la autofagia. Tal vez todas estas alteraciones sean epifenómenos de una causa que se desconoce.

Las formas monogénicas han demostrado que lo que se ha llamado EP en realidad es síndrome de Parkinson. Algunas de estas formas cumplen perfectamente tanto los criterios clínicos como los histopatológicos de EP, pero su causa, hereditaria monogénica, es diferente a las de la EP esporádica.

Para complicar más las cosas, la definición clásica tampoco se ajusta a algunas de las nuevas formas de EP. Un síndrome parkinsoniano con buena respuesta mantenida a los dopaminérgicos y con pérdida neuronal y cuerpos de Lewy sigue definiendo a la mayoría de formas de EP, pero no a PARK2 ni a algunas formas de PARK8, que carecen de cuerpos de Lewy. Curiosamente estas se siguen considerando EP. Sin embargo no reciben la misma categoría formas, excepcionales, de atrofia multisistema o parálisis supranuclear progresiva que clínicamente siempre se comportan como EP y en las que solo la histopatología permite hacer el diagnóstico de certeza.

Una de las limitaciones para mejorar el conocimiento de la EP es que se trata de una enfermedad que solo afecta a seres humanos. Por tanto, la investigación se basa en modelos animales que inevitablemente difieren de la verdadera enfermedad. Hoy día la mayor parte de la investigación animal se hace con modelos transgénicos a los que se manipulan sus propios genes o se les insertan genes humanos. El modelo tóxico, muy útil para el estudio de la vía dopaminérgica, no lo es tanto para buscar la etiología de la enfermedad.

Si se asume que la EP es una enfermedad compleja donde confluyen factores ambientales y una susceptibilidad individual consecuencia de la acción sinérgica de diferentes genes, los estudios de asociación pueden seguir siendo clave para desentrañar el origen de la enfermedad. El problema, como se señaló en la introducción, está en que quizá la hipótesis *enfermedad común - variante común* se ajuste a la realidad menos de lo que se pensaba inicialmente. En este sentido el resultado de este trabajo, en el que la región génica próxima a *SYT11* podría asociarse con la EP, abre una línea de investigación para estudiar con más detalle esta región, en la que algunos de sus genes se han relacionado con enfermedades degenerativas del sistema nervioso. Tampoco sería descartable que alteraciones sutiles en el proteasoma contribuyesen a la génesis de la EP. Es otra de las dianas en las que se podría trabajar en un futuro.

El mayor conocimiento de la enfermedad, aunque con mucha información difícil de clasificar, no ha significado una mejoría en el tratamiento. La terapia actual se sigue basando en la compensación la vía nigroestriada, deficitaria en dopamina. La levodopa, que comenzó a comercializarse en 1967, sigue siendo el mejor tratamiento 47 años después. Lo más novedoso son los tratamientos de la fase avanzada (estimulación cerebral profunda, infusión continua con apomorfina o levodopa intraduodenal). Estas terapias, que han permitido extender en al menos 5 años el período de buena calidad de vida, también actúan exclusivamente en la vía nigroestriada. La EP afecta a múltiples sistemas neuronales de forma selectiva (vía nigroestriada, sistema olfatorio, sistema nervioso autónomo, núcleos del tronco, corteza...). A medida que la enfermedad avanza, los síntomas extranigricos son más frecuentes e incapacitantes. Llega un momento en que principalmente los trastornos autonómicos, las alteraciones del equilibrio y el deterioro cognitivo dominan el cuadro y no hay terapias para estos problemas.

Se están empezando a conocer las causas de la vulnerabilidad selectiva, lo que podría ser fundamental en el diseño de nuevos tratamientos. Ya se ha señalado que las neuronas de los sistemas que degeneran en la EP tienen actividad marcapasos dependiente de los canales de calcio tipo L (Surmeier *et al*, 2011). Independientemente de que se determine la etiología de la EP, tal vez el trata-

miento futuro esté en la nanomedicina. Un nanotransportador no viral podría acceder a las neuronas vulnerables y modificar su información genética, de modo que impidiese su degeneración. Para ello tendría que poder discriminarse cuáles son estas neuronas vulnerables. El que tengan alguna característica diferenciadora como los canales tipo L podría resultar clave en esta terapia futura.





Comunicaciones y publicaciones relacionadas con este trabajo

COMUNICACIONES

Sesar A, Cacheiro P, Camiña-Tato M, López M, Quintáns B, Alonso E, Cebrián E, Castro A, Carracedo A, Sobrido MJ. Validation study of genetic factors contributing to Parkinson's disease in Spanish and Latin American populations. 16th Congress of the European Federation of Neurological Societies-EFNS 2012. Estocolmo 2012

Sesar A, Cacheiro P, Camiña-Tato M, Cebrián E, Sobrino B, Carracedo A, Castro A, Sobrido MJ. Validación en población gallega de factores genéticos se susceptibilidad a Enfermedad de Parkinson. II Jornada de Investigación Biosanitaria. Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela. 2012.

Cacheiro Martínez P, Sesar Ignacio Á, Quintans Castro B, Camiña Tato M, López López M, Cebrián Pérez E, Alonso V, Ares Pensado B, Rivas López MT, Carracedo Álvarez Á, Castro García A, Sobrido Gómez MJ. Estudio de asociación genética de subunidades del proteasoma en la enfermedad de Parkinson. LXIV Reunión Anual Sociedad Española Neurología. Barcelona 2012.

Sesar Ignacio Á, Jiménez Martín I, Quintáns Castro B, Blanco Arias P, Ares Pensado B, Rivas López MT, Pardo Fernández J, Sobrido Gómez MJ, Castro García A. Evaluación de la función motora y cognitiva en enfermedad de Parkinson por mutación de *LRRK2*. LXV Reunión Anual Sociedad Española Neurología. Barcelona 2013.

PUBLICACIONES

Sesar A, Cacheiro P, López M, Camiña Tato M, Quintans B, Alonso E, Monroy N, Cebrián E, Yescas P, Ares B, Rivas MT, Castro A, Carracedo A, Sobrido MJ. Validation of SYT11 as a genetic factor contributing to Parkinson's disease in Spanish and Mexican populations. (En preparación).



Criterios de Gelb, Oliver y Gilman para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson (Gelb et al, 1999)

TABLA 1. AGRUPACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS SEGÚN SU UTILIDAD DIAGNÓSTICA

Grupo A: características de la enfermedad de Parkinson

- Temblor de reposo
- Bradicinesia
- Rigidez
- Inicio asimétrico

Grupo B: sugestivas de diagnósticos alternativos

- Características infrecuentes en las primeras fases de la enfermedad:
 - Marcada inestabilidad postural en los 3 primeros años
 - Fenómeno de congelación en los 3 primeros años
 - Alucinaciones no relacionadas con la medicación los 3 primeros años
 - Demencia que precede a los síntomas motores o en el primer año
- Parálisis supranuclear de la mirada (salvo limitación de la mirada vertical) o enlentecimiento de las sacadas verticales
- Disautomía sintomática grave no relacionada con la medicación
- Documentación de una condición conocida que produce parkinsonismo presumiblemente relacionada con los síntomas del paciente (como una lesión cerebral localizada estratégicamente o el tratamiento con neurolépticos en los 6 meses previos).

TABLA 2. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS PARA LA ENFERMEDAD DE PARKINSON PROPUESTOS

Criterios para el diagnóstico de enfermedad de Parkinson POSIBLE

Presencia de al menos 2 de las 4 características del GRUPO A, siempre que al menos 1 de ellas sea el temblor o la bradicinesia

y

o bien no está presente ninguna de las características del grupo B

o bien la duración de los síntomas es menor de 3 años

y no está presente ninguna de las características del grupo B

y

o bien constatación de una respuesta buena y duradera a la levodopa o agonistas

o bien no se ha hecho un ensayo terapéutico adecuado con levodopa o agonistas.

Criterios para el diagnóstico de enfermedad de Parkinson PROBABLE

Al menos 3 de las 4 características del grupo A están presentes

y

ninguna de las características del grupo B está presente (nótese que en este caso la duración de los síntomas ha de ser mayor de 3 años)

y

constatación de una respuesta buena y duradera a la levodopa o agonistas

Criterios para enfermedad de Parkinson DEFINITIVA

Todos los criterios para enfermedad de Parkinson POSIBLE

y

Confirmación histopatológica del diagnóstico en autopsia (tabla 3)

**TABLA 3. CRITERIOS PROPUESTOS PARA LA CONFIRMACIÓN
HISTOPATOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

- Notable pérdida neuronal con gliosis acompañante en la sustancia negra.
- Al menos 1 cuerpo de Lewy en la sustancia negra o *locus coeruleus* (nota: puede ser necesario examinar hasta 4 secciones que no se solapen de cada área antes de concluir que los cuerpos de Lewy no están presentes).
- Ausencia de evidencia histopatológica de otras enfermedades que puedan producir parkinsonismo (ej. parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistema, degeneración córtico basal) (nota: para excluir otras enfermedades que producen parkinsonismo deberían emplearse criterios de consenso publicados cuando estén disponibles).





Criterios de la UK Parkinson's Disease Brain Bank Society para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson (Hughes *et al*, 1992a)

PASO 1. DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME PARKINSONIANO

■ Bradicinesia

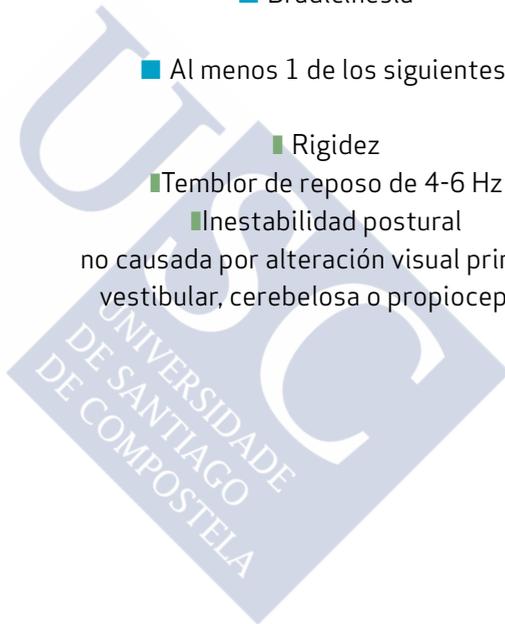
■ Al menos 1 de los siguientes:

■ Rigidez

■ Temblor de reposo de 4-6 Hz

■ Inestabilidad postural

no causada por alteración visual primaria, vestibular, cerebelosa o propioceptiva



PASO 2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN PARA LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

- Historia de ictus repetidos con progresión paso a paso de clínica parkinsoniana
- Historia de traumatismo craneoencefálicos repetidos
- Historia de encefalitis
- Crisis oculógiras
- Tratamiento con neurolépticos al inicio de los síntomas
- Más de un familiar afectado
- Remisión mantenida
- Clínica exclusivamente unilateral después de 3 años
- Parálisis supranuclear de la mirada
- Clínica cerebelosa
- Clínica autonómica precoz
- Demencia precoz grave con alteraciones de la memoria, lenguaje y praxis
- Signos de Babinski
- Presencia de un tumor o una hidrocefalia comunicante en la neuroimagen
- Respuesta negativa a dosis altas de levodopa en ausencia de mala absorción
- Exposición a MPTP

PASO 3. CRITERIOS PROSPECTIVOS POSITIVOS QUE APOYAN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

- Inicio unilateral
- Temblor de reposo
- Trastorno progresivo
- Asimetría de los síntomas mantenida en el tiempo
- Excelente respuesta (70 – 100 %) a la levodopa
- Corea grave inducida por levodopa
- Respuesta a la levodopa más de 5 años
- Curso clínico de más de 10 años

Consentimiento informado de pacientes

ESTUDIO GENÉTICO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se le está pidiendo que participe en una investigación sobre los factores genéticos de la Enfermedad de Parkinson. Su colaboración puede ser de gran ayuda para el proyecto, bien porque Vd. sufre la enfermedad o porque es una persona sana sin indicios de padecerla. Su participación es totalmente voluntaria. Por favor, lea detenidamente la información que sigue y realice cualquier pregunta que desee aclarar antes de aceptar la participación.

OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN:

La causa de la Enfermedad de Parkinson no se conoce, pero se sabe que en algunas familias puede tener un origen genético. En los pacientes sin antecedentes familiares de Enfermedad de Parkinson se cree que puede haber también factores genéticos que les hacen más predispuestos a padecer la enfermedad. Por ello, es también importante estudiar las características genéticas de pacientes que no tienen en su familia otros miembros con la enfermedad de Parkinson. Las diferencias genéticas entre las personas también pueden ser la causa de que unos pacientes respondan al tratamiento mejor que otros o tengan menos efectos secundarios del tratamiento.

La investigación en la que Vd. ha sido invitado a participar tiene como finalidad identificar la causa genética que lleva a la aparición de la Enfermedad de Parkinson. Cuanto más conozcamos sobre las alteraciones genéticas que identifican u originan la Enfermedad de Parkinson más cerca estaremos de poder desarrollar un tratamiento efectivo y seguro.

Para los estudios genéticos no sólo es importante disponer de muestras de pacientes, sino también de personas sanas con las que poder comparar los resultados.

PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN:

Si acepta participar en la presente investigación, se le requerirá la obtención de unos 20 a 30 ml de sangre, que será utilizada para extraer de ella el ADN, molécula que alberga toda nuestra información genética. La muestra de ADN será conserva-

da indefinidamente y podrá ser usada posteriormente en otros estudios, salvo que usted manifieste lo contrario.

BENEFICIOS Y RIESGOS DE LA PARTICIPACIÓN:

El resultado de esta investigación puede desvelar cuál es la mutación (alteración genética) que causa la Enfermedad de Parkinson en su caso. Este conocimiento es poco probable que tenga relevancia para tomar decisiones sobre su tratamiento, aunque puede ser de gran importancia para sus familiares. El conocimiento derivado de esta investigación también puede ser beneficioso para otros pacientes con la Enfermedad de Parkinson o trastornos similares. Los resultados de este análisis no serán comunicados ni a Vd. ni a su médico, a no ser que se crea que el conocimiento de estos resultados pueda ser de beneficio para usted o su familia, en cuyo caso se le comunicarán a su neurólogo. Si Vd. no desea recibir información sobre los resultados del análisis genético deberá marcar con una X la casilla correspondiente al final de este documento.

Su participación no tiene ningún tipo de compensación económica y tampoco supone ningún gasto para Vd. La atención médica que se le dispensa no se verá afectada por el hecho de que participe en esta investigación.

La extracción de sangre puede conllevar ligeras molestias derivadas del pinchazo o la aparición de un pequeño hematoma. Puede ser que, como en cualquier otra extracción de sangre, pueda sufrir ligeras molestias en el lugar de punción o algún mareo, que en la inmensa mayoría de los casos son muy poco duraderas.

En raras ocasiones, aún sin ser un dato buscado, la información obtenida a través de los análisis genéticos puede sugerir que el padre o madre biológico de un individuo no coincide con el padre o madre reconocido. En el caso improbable de surgir estos hallazgos no serán comunicados a los participantes.

CONFIDENCIALIDAD:

Su participación en la presente investigación será confidencial. La información concerniente a su muestra se guardará de manera anónima e independientemente a la perteneciente a su persona y a su enfermedad. Sólo los investigadores responsables del proyecto podrán analizar conjuntamente los datos clínicos y genéticos. Se tomarán las medidas necesarias para impedir que cualquier información referente a su enfermedad o los resultados del análisis sean accesibles a personas ajenas a la presente investigación, excepto en casos que fuese requerido por ley.

En algunas ocasiones podría ser de utilidad realizar el análisis genético a otros miembros de su familia. En ningún caso serán contactadas otras personas de su familia con este propósito sin su permiso.

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO:

Es Vd. Libre de cambiar de opinión en cualquier momento y revocar el presente consentimiento, en cuyo caso su muestra será destruida. Esto en ningún caso esta retirada conllevará ningún perjuicio para Vd. ni influencia alguna en la atención y tratamiento que le proporcione su neurólogo.

Para cualquier duda o cuestión relacionada con el proyecto, no dude en contactar con cualquiera de los investigadores:

Dra. M^a Jesús Sobrido ssobrido@arrakis.es

Dra. Beatriz Quintáns beaqiml@usc.es

Fundación Pública Galega de Medicina Genómica

Hospital Clínico de Santiago

Tel: 981951490

Dr. Ángel Sesar

Servicio de Neurología

Hospital Clínico de Santiago

Tel: 981951320

He leído y comprendido el presente documento. Todas mis preguntas sobre la investigación han sido respondidas de manera satisfactoria. Doy mi consentimiento para participar en la presente investigación.

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

CÓDIGO PACIENTE: _____

CENTRO: _____

INVESTIGADOR RESPONSABLE: _____

FECHA Y FIRMA DEL PACIENTE

FECHA Y FIRMA
DEL INVESTIGADOR

FECHA Y FIRMA
DEL RESPONSABLE LEGAL



Consentimiento informado de los controles**ESTUDIO GENÉTICO DE ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS****Consentimiento para participa en la investigación como individuo control**

NOMBRE: _____

DNI: _____

Se me ha invitado a participar en una investigación sobre enfermedades del sistema nervioso. He leído y comprendido la información que me han dado sobre los objetivos de la investigación y las implicaciones de mi participación en la misma. Todas mis preguntas sobre la investigación han sido respondidas de manera satisfactoria. Doy mi consentimiento para participar en la presente investigación.

No deseo recibir ninguna información genética que pudiera derivarse de esta investigación

CÓDIGO CONTROL: _____

CENTRO: Clínico _____

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Ángel Sesar _____

FECHA Y FIRMA DEL PACIENTE

FECHA Y FIRMA
DEL INVESTIGADORFECHA Y FIRMA
DEL RESPONSABLE LEGAL

.....
REVOCO EL PRESENTE CONSENTIMIENTO

Fecha y firma del paciente o representante legal



Método de selección de SNP aplicado en este estudio. Búsqueda de SNP para estudios de asociación.

1. BÚSQUDA DE SNP FUNCIONALES

a. Búsqueda en dbSNP

Se introduce el nombre del gen en “Gene” del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene>) y se selecciona el gen correcto. En *LINKS* se elige la opción *Gene-View in dbSNP*. *dbSNP* ofrece una visión rápida de los SNP en ese gen, si están validados y si hay datos de frecuencia. Por defecto aparece marcada la opción de cSNP (sólo muestra los codificantes) por lo que hay marcar la opción *in gene región*. Aquí ya se pueden ir seleccionando aquellos SNP que en principio pueden interesar y se

The screenshot shows the NCBI dbSNP interface. At the top, there's a search bar with 'SNP' entered. Below it, a section titled 'SNP linked to Gene (geneID:5685)' indicates that SNPs are linked to gene PDLIM4. A 'Gene Model (mRNA alignment) Information from genome sequence' section shows two transcripts: NM_002789 and NM_002789. A table below lists SNPs with their positions and validation status.

Region	Contig position	dbSNP rs#	Heterozygosity	Validation	3D OMM	Function	dbSNP allele	Protein residue	Codon	Amino acid position
exon_1	49623112	rs11971	0.308	✓		untranslated	A/C			
	49623152	rs11970	0.472	✓		untranslated	A/G			
intron_1	49623543	rs12501682	0.642	✓		untranslated	A/C			
	49634078	rs286521	0.360	✓		untranslated	A/G			
	49634150	rs1049083	0.436	✓		untranslated	C/G			

llevan a una tabla de Excel® todos los campos que se necesitan. Al anotar la posición hay que dejar constancia de la versión de NCBI utilizada. Puede haber diferencias entre versiones. Hay que tener en cuenta que a veces puede haber SNP en *HapMap* con datos poblacionales que todavía no se han volcado en *dbSNP* así que, los SNP funcionales sin datos poblacionales en *dbSNP* deben revisarse en *HapMap*.

b. Búsqueda en FESD (<http://combio.kribb.re.kr/FESD/>)

Se comprueba si la lista de SNP es la misma que *dbSNP*. Va a haber diferencias porque en FESD se incluyen 2000pb hacia arriba no incluidas en la búsqueda anterior. Solo se miran aquellos SNP que salen en FESD pero no en *dbSNP*. Se abre el enlace N que proporciona los datos del SNP de interés en *dbSNP* y se introducen los datos en la tabla de Excel®.

The screenshot shows the FESD website interface in Internet Explorer. The page title is 'Functional Element SNPs Database (FESD)'. The navigation menu includes 'Home', 'Search Gene', 'User Guide', 'SNPlink', and 'Statistics'. The main content area displays a 'Result SNPs List: 29' with columns for 'refSNP ID', 'Allele', 'Chr', 'Chr Position', 'Func Class', 'Space', and 'NCBI ENSEMBL UCSC'. A black arrow points to the 'N' link in the 'NCBI' column of the first row.

refSNP ID	Allele	Chr	Chr Position	Func Class	Space	NCBI ENSEMBL UCSC
12915366	A/G	15	76618808	upstream	0	N E U
12915652	A/G	15	76618983	upstream	175	N E U
12916480	A/G	15	76619452	upstream	469	N E U
3813572	A/G	15	76619643	upstream	191	N E U
3813571	A/C	15	76619847	Subr	204	N E U
3813570	A/G	15	76619807	Subr	40	N E U
12901682	A/C	15	76620278	intron	391	N E U
4866571	A/G	15	76620813	intron	535	N E U
4243083	C/G	15	76620885	intron	72	N E U
17588	C/T	15	76621588	coding-synon	703	N E U
2292117	A/G	15	76621744	intron	156	N E U
11551784	A/C	15	76621926	coding-synon	182	N E U
11551779	C/G	15	76621948	coding-nonsynon	22	N E U
11551776	A/G	15	76621950	coding-synon	2	N E U
11658030	A/G	15	76622607	intron	657	N E U
8025429	A/G	15	76623417	intron	810	N E U
11551786	C/T	15	76623617	coding-synon	200	N E U
11551782	A/G	15	76623643	coding-nonsynon	26	N E U
11551774	A/G	15	76624317	coding-synon	674	N E U
4866572	A/G	15	76624507	intron	190	N E U
4867062	A/G	15	76624856	intron	349	N E U

c. Búsqueda en PupASNP (<http://pupASnp.bioinfo.ochoa.fib.es/>)

Se introduce el nombre del gen como *External ID* y se amplía la zona del promotor hasta un máximo de 20000 pb (por defecto salen 4000). Se decide la distancia de búsqueda según el gen, el número de SNP que se tengan hasta el momento, del tamaño de los intrones,... Como mínimo se amplía en 5000bp.

...or paste your genes
(quick search)

Select the gene id External ID

PSMA4

Define the region upstream... 20000

Run

En la página que se abre, hay que ir a *Pupas-view* porque desde ahí se pueden especificar parámetros interesantes para encontrar SNP potencialmente funcionales. Abrir *PupasView* (debajo del nombre del gen).

Gene	Transcript	Num. SNPs	5'UTR	3'UTR	Coding	Aa location	Aa variation								
PSMA4 PupasView	ENST0000044462 IPR000426:Proteasome_A IPR001353:Protsme_protease IPR000243:Proteasome_B	three prime UTR: 3 intronic: 14 coding: 10 five prime UTR: 2	3813571(f) 3813570(f)	1052635 (f) 1052640 (n) 11551782 (n) 3209623 (n) 11551774 (n) 8053(f) 11551785 (n) 1065640 (n)	17588(n) 11551784 (n) 11551779 (n) 11551776 (n) 11551786 (n) 11551782 (n) 11551774 (n) 8053(f) 11551785 (n) 1065640 (n)	10 35 43 43 84 93 117 244 254 257	IPR000426 IPR001353 IPR000243 IPR000243 IPR001353 IPR000243 IPR001353 IPR001353 IPR000243 IPR001353 IPR000243	D A A-P A T G-E A H G-E K-E							
									ENST00000341646 IPR000426:Proteasome_A	three prime UTR: 3 intronic: 11	3813570(f) 12961502 (2b2a) 1052635 (f) 1052640 (n)	17588(n) 11551784 (n) 11551779 (n) 11551776 (n) 11551786 (n)	6 31 39 39 80	IPR000426 IPR001353 IPR000243 IPR000243 IPR001353 IPR000243	D A A-P A T

Send this gene to PupasView

http://pupasview.bioinfo.ochoa.fib.es/?db_externalgene_id=PSMA4

Se vuelven a poner a poner 20000 pb en la región flanqueante y se marcan los siguientes puntos:

-- Data coming from PupaSNP --

PSMA4

Define the flanking region

Limit to these SNPs:

-- Validation Status (dbSNP) --		-- Type --	
<input checked="" type="checkbox"/> by-frequency		<input checked="" type="checkbox"/> coding	
<input checked="" type="checkbox"/> by-2hit-2allele		<input checked="" type="checkbox"/> intron	
<input checked="" type="checkbox"/> by-duster		<input checked="" type="checkbox"/> utr	
<input checked="" type="checkbox"/> by-other-pop		<input checked="" type="checkbox"/> local	
<input checked="" type="checkbox"/> no-info			

-- Frequency & Population --

Filter Minor Allele Frequency from to

<input checked="" type="checkbox"/> Europe	<input type="checkbox"/> Central/South America	<input type="checkbox"/> Central Asia	<input checked="" type="checkbox"/> Unknown
<input checked="" type="checkbox"/> Europe, Multi-National	<input checked="" type="checkbox"/> North/East Africa & Middle East	<input type="checkbox"/> East Asia	<input checked="" type="checkbox"/> HAPMAP
<input checked="" type="checkbox"/> Europe, North America	<input type="checkbox"/> Central/South Africa	<input type="checkbox"/> Pacific	
<input checked="" type="checkbox"/> North America	<input type="checkbox"/> West Africa	<input checked="" type="checkbox"/> Multi-National	

MAF aquí aparece entre 0 y 0,5, o sea, todos. En este caso se incluyen los SNP exónicos con $MAF > 0,05$ y el resto con $MAF > 0,1$.

-- Functional Properties --

<input checked="" type="checkbox"/> Non-synonymous SNPs <input checked="" type="radio"/> All non-syn mutations <input type="radio"/> Only Pathological non-syn mutations	<input type="checkbox"/> Triplets Minimum length of triplex sequences <input type="text" value="10"/> bp <input checked="" type="radio"/> All regions <input type="radio"/> Only Rattus Norvegicus conserved regions <input type="radio"/> Only Rattus Norvegicus high conserved regions
<input checked="" type="checkbox"/> TFBS (10000 bp upstream) <input checked="" type="radio"/> All regions <input type="radio"/> Only Rattus Norvegicus conserved regions <input type="radio"/> Only Rattus Norvegicus high conserved regions	<input checked="" type="checkbox"/> Intron Boundaries
<input checked="" type="checkbox"/> Exonic Splicing Enhancer <input checked="" type="radio"/> All regions <input type="radio"/> Only Rattus Norvegicus conserved regions <input type="radio"/> Only Rattus Norvegicus high conserved regions	<input checked="" type="checkbox"/> Rattus Norvegicus conserved regions <input type="text" value="BLASTZ NET (cons)"/>

-- Block finding algorithms --

Confidence Intervals (Gabriel et al.)
 Four Gamete Rule (Wang et al.)
 Solid Spine of LD

2. BÚSQUEDA DE TAGSNP

a. Obtención de datos en HapMap

En *Browse Project Data-Meter* se introduce el nombre del gen. Hay que asegurarse de estar trabajando con la última versión disponible. También hay que tener en cuenta que hay datos en HapMap no volcados todavía en *dbSNP*.

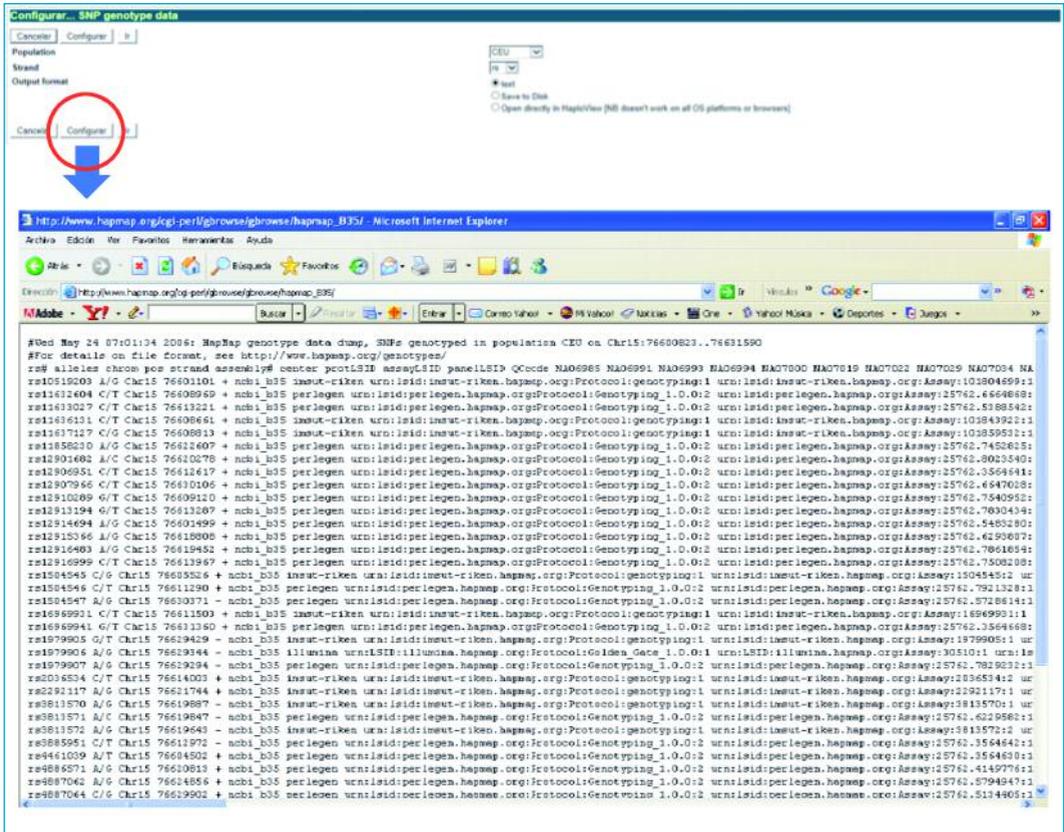
The screenshot shows the HapMap Data Browser interface. At the top, there are search examples: "Ejemplos: Chr20, Chr9:660,000..760,000, SNP:rs6870660, NM_153254, BRCA2, ENM010". Below this are navigation links: "[Ocultar encabezado] [Marcar esta página] [Ligar a imagen] [Imagen de alta resolución] [Ayuda]". A search bar contains "PSMA4" and a "Buscar" button. The "Fuente de datos" dropdown is set to "HapMap Data Ref#20/phase1 Jan06, on NCBI B35 assembly, dbSNP b125". Population descriptors include "YRI: Yoruba in Ibadan, Nigeria, JPT: Japanese in Tokyo, Japan, CHB: Han Chinese in Beijing, China". An "Ideogram" section shows a chromosome overview with a scale from 0M to 40M and a label "Genes/588Kb".

Se amplía la zona de estudio entre 5 y 20Kb para el promotor (hacia arriba) y entre 2 y 5 Kb hacia abajo. Se pone la misma distancia que en Pupas. Para ello se anota la posición cromosómica del gen que se ve en la parte superior de la página y se modifican las posiciones.

The screenshot shows a zoomed-in view of the HapMap Data Browser interface. The title bar reads "Mostrando 8.768 kbp de chr15, posiciones 76,619,823 a 76,628,590". Below the title, there are instructions: "Instrucciones: Buscar usando el nombre de una secuencia, el nombre de un gen, locus, o otro punto a registrar de referencia. El carácter comodín * está permitido. Para concentrarse en una locación, pulsar los botones Avanzar/Retrasar para cambiar la magnificación y la posición. Para guardar tal imagen, marcar esta página." Search examples include "Ejemplos: Chr20, Chr9:660,000..760,000, SNP:rs6870660, NM_153254, BRCA2, ENM010". The search bar contains "PSMA4" and a "Buscar" button. The "Fuente de datos" dropdown is set to "HapMap Data Ref#20/phase1 Jan06, on NCBI B35 assembly, dbSNP b125". The "Avanzar/Retrasar" controls are set to "500" and "1000" respectively. The "Dar la vuelta" button is visible.

En el cuadro *Punto o región de referencia* se introduce la posición del gen (Chr15:76,619,823..76,628,590), con las ampliaciones sentido 5' y 3' que se estimen necesarias, en esta caso Chr15:76,600,823..76,631,590.

A continuación en la sección *Reportes y análisis* se elige *Depositar SNP genotype data* y se entra en *Configurar*.



Los datos obtenidos se guardan como un archivo txt

b. Obtención de datos en Haploview

A continuación se aplica el programa *Haploview* que procesa todos los datos obtenidos anteriormente y busca los *tagSNP*.



En el apartado *Genotype file* se carga el archivo txt generado mediante *HapMap* y se da a OK.

#	Name	Position	Obs...	Rec...	r ² ...	%S...	Fam...	Rec...	MAF	Rating
1	rs10519209	76601101	0.494	0.499	0.747	98.9	29	0	0.432	✓
2	rs12914594	76601499	0.398	0.476	0.268	92.2	25	0	0.391	✓
3	rs8031948	76602112	0.494	0.499	0.747	98.9	29	0	0.432	✓
4	rs4451039	76604502	0.371	0.324	0.568	96.9	21	0	0.303	✓
5	rs1504545	76607506	0.364	0.452	0.114	97.8	28	0	0.345	✓
6	rs952215	76606308	0.36	0.458	0.074	96.9	21	0	0.356	✓
7	rs962216	76606257	0.375	0.452	0.152	97.8	29	0	0.347	✓
8	rs11636131	76606661	0.371	0.46	0.102	96.9	21	0	0.358	✓
9	rs11637127	76606112	0.0	0.0	3.0	99.9	29	0	0.0	✓
10	rs11632694	76609969	0.367	0.46	0.102	98.0	30	0	0.358	✓
11	rs12910289	76609120	0.364	0.452	0.152	97.8	28	0	0.347	✓
12	rs7169751	76609784	0.0	0.0	3.0	98.0	30	0	0.0	✓
13	rs1504546	76612290	0.352	0.46	0.102	97.8	28	0	0.359	✓
14	rs16969991	76611903	0.0	0.0	3.0	98.0	30	0	0.0	✓
15	rs12906961	76612617	0.376	0.453	0.152	96.7	27	0	0.347	✓
16	rs3888961	76612922	0.223	0.249	3.0	98.0	30	0	0.142	✓
17	rs11633027	76613221	0.056	0.049	3.0	98.0	30	0	0.025	✓
18	rs931794	76613225	0.5	0.499	0.649	98.0	30	0	0.432	✓
19	rs12913194	76613287	0.0	0.0	3.0	98.0	30	0	0.0	✓
20	rs7180652	76613625	0.0	0.0	3.0	98.0	30	0	0.0	✓
21	rs12916999	76613967	0.36	0.458	0.074	96.9	21	0	0.356	✓
22	rs2006934	76614003	0.382	0.398	0.411	98.9	29	0	0.212	✓
23	rs7161644	76614608	0.0	0.0	3.0	97.8	28	0	0.0	✓
24	rs12915366	76618800	0.344	0.45	0.134	98.0	30	0	0.342	✓
25	rs12916183	76619452	0.333	0.454	0.096	98.8	21	0	0.348	✓

En el apartado Check Markers, se cambia el MAF de 0,001 a 0,05 en este caso y se marca *Rescore Markers*.

The screenshot shows the Haploview 3.2 interface with the 'Check Markers' configuration window open. The 'Configuration' tab is selected, and the 'Results' sub-tab is active. A table lists various SNPs with columns for '#', 'Name', 'Position', 'Force Include', 'Force Excl...', and 'Capture thi...'. The 'pairwise tagging on' radio button is selected. The 'Run Tagger' button is highlighted with a red circle.

#	Name	Position	Force Include	Force Excl...	Capture thi...
1	rs13519203	76601101	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
2	rs12914694	76601499	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
3	rs8031946	76603112	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
4	rs4451039	76604502	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
5	rs1504545	76605526	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
6	rs952215	76605208	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
7	rs952216	76605257	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
8	rs11636131	76603661	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
10	rs11632604	76609969	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
11	rs12910289	76609120	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
13	rs1504546	76611290	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
15	rs12906951	76612617	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
16	rs388951	76612972	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
18	rs931794	76613235	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
21	rs12916999	76613967	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
22	rs2396534	76614003	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
24	rs12915366	76613808	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
25	rs12916483	76613452	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
26	rs3313572	76613643	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
27	rs3313571	76613647	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
28	rs3313570	76613687	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
30	rs4386571	76620813	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
31	rs2292117	76621744	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
32	rs11858230	76622607	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
33	rs8356429	76623417	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

pairwise tagging on
 aggressive tagging: use 2-marker haplotypes
 aggressive tagging: use 2- and 3-marker haplotypes

r² threshold: 0.8
 LOD threshold for sub-marker tests: 3.0

Run Tagger Reset Table

Se selecciona *pairwise tagging only* porque es la opción más restrictiva y se da a *Run Tagger*

The screenshot shows the Haploview 3.2 interface. The 'Tests' panel on the left lists various SNPs, with some in bold. The 'Alleles captured by Current Selection' panel below it shows a subset of SNPs. The main table on the right displays the results of the tagging process, including the SNP ID, the tag SNP, and the r^2 value.

Allele	Test	r^2
rs14519203	rs8039948	1.0
rs12914694	rs8039948	1.0
rs8039948	rs8039948	1.0
rs4481009	rs2036524	1.0
rs1504545	rs8039948	1.0
rs62215	rs8039948	1.0
rs92216	rs8039948	1.0
rs1436133	rs8039948	1.0
rs11532604	rs8039948	1.0
rs12910099	rs8039948	1.0
rs1504546	rs8039948	1.0
rs1290655	rs8039948	1.0
rs3889961	rs3889961	1.0
rs11794	rs8039948	1.0
rs12916999	rs8039948	1.0
rs2036524	rs2036524	1.0
rs12915366	rs12915366	1.0
rs12914483	rs8039948	1.0
rs3812672	rs8039948	1.0
rs3813671	rs8039948	1.0
rs3812670	rs2036524	0.951
rs4886071	rs8039948	1.0
rs2292117	rs8039948	1.0
rs11896230	rs8039948	0.958
rs6029429	rs8039948	1.0
rs4887362	rs8039948	0.964
rs88703	rs8039948	1.0
rs1929067	rs7164039	1.0
rs1929066	rs7164039	1.0
rs1929065	rs7164039	1.0
rs4887064	rs7164039	1.0
rs12909566	rs7164039	1.0
rs803306	rs7164039	1.0
rs465740	rs7164039	1.0
rs7164039	rs7164039	1.0

El cuadro de arriba a la izquierda contiene los *tagSNP*. Marcando cada uno de los SNP de este cuadro aparecen en el cuadro de abajo a la izquierda todos los SNP del bloque haplotípico.

Características de los SNP analizados

Gen	SNP	Posición (NCBI)	Alelos	Alelo menor (HapMap CEU)	MAF (HapMap CEU)
PSMA1					
	rs10500802	11: 14637391	G/T	T	0,075
	rs10766186	11: 14615973	G/T		0,500
	rs10832284	11: 14638484	C/G	G	0,110
	rs11023273	11: 14630819	A/G	A	0,325
	rs16930358	11: 14609858	A/T	A	0,108
	rs2305305	11: 14540942	C/T	T	0,367
	rs2575846	11: 14575366	A/T	T	0,458
	rs2575849	11: 14539639	A/T	T	0,341 (AFD_EUR)
	rs2575850	11: 14603548	C/T	C	0,442
	rs2597217	11: 14532883	C/T	T	0,407
	rs2597220	11: 14529527	C/T	C	0,133
	rs7931378	11: 14614415	A/G	A	0,491
	rs7951597	11: 14559707	A/G	G	0,062
PSMA2					
	rs591740	7: 42962527	A/G	A	0,125 (AFD_EUR)
	rs638171	7: 42958092	A/G	G	0,125 (AFD_EUR)
	rs650786	7: 42965141	C/T	C	0,120 (CEPH)
	rs653517	7: 42965733	C/T	T	0,145
	rs661592	7: 42952486	C/T	C	0,149
	rs668537	7: 42960226	A/C	A	0,125 (AFD_EUR)
PSMA3					
	rs10134112	14: 58701880	C/T	T	0,106
	rs10147580	14: 58714140	C/T	T	0,274
	rs12879675	14: 58707253	A/G	G	0,270
	rs12892257	14: 58732748	A/G	G	0,380 (AoD)
	rs1885133	14: 58737402	C/T	C	0,274
	rs2180871	14: 58739537	A/G	G	0,274
	rs6573194	14: 58712914	C/T	C	0,429

Gen	SNP	Posición (NCBI)	Alelos	Alelo menor (HapMap CEU)	MAF (HapMap CEU)
PSMA5					
	rs10776806	1:109952127	A/G	G	0,229 (AFD_EUR)
	rs10776807	1:109956156	A/G	G	0,274
	rs12746776	1:109963318	C/T	C	0,115
	rs1465607	1:109958035	A/G	A	0,319
	rs17586966	1:109955569	C/T	C	0,136
	rs1880670	1:109941133	C/T	C	0,274
	rs3820667	1:109968410	G/T	T	0,467
	rs4970729	1:109979202	A/G	G	0,274
PSMA6					
	rs10142113	14:35767829	A/G	G	0,125 (AFD_EUR)
	rs10144857	14:35761084	A/G	G	0,159
	rs1048990	14:35761675	C/G	G	0,117
	rs17512585	14:35789682	C/T	T	0,276
	rs4982254	14:35755737	C/T	T	0,257
	rs7153434	14:35788110	C/G	C	0,177
	rs7156874	14:35778469	A/T	A	0,067
	rs7156944	14:35790467	G/T	G	0,342
	rs8017676	14:35762666	A/G	A	0,093
PSMA7					
	rs17812169	20:60711075	C/T	T	0,088
	rs2057170	20:60710563	C/T	C	0,199
	rs6089664	20:60714525	A/G	G	0,250
	rs7076	20:60713311	C/T	C	0,229 (AFD_EUR)
PSMB1					
	rs12200850	6:170842311	A/G	G	0,075
	rs12210583	6:170862029	G/T	T	0,068
	rs12717	6:170862300	C/G	C	0,365
	rs1474642	6:170852561	C/T	C	0,128
	rs1474643	6:170849100	C/T	T	0,475
	rs1474644	6:170848895	A/G	G	0,158
	rs2056970	6:170849476	A/G	A	0,450
	rs2179373	6:170863373	A/G	G	0,283
	rs2206286	6:170861835	C/T	T	0,150
	rs2223473	6:170855987	G/T	G	0,449
	rs3778589	6:170859715	A/G	G	0,438 (AFD_EUR)

Gen	SNP	Posición (NCBI)	Alelos	Alelo menor (HapMap CEU)	MAF (HapMap CEU)
PSMB1					
	rs4579340	6:170854754	A/G	A	0,438 (AFD_EUR)
	rs756518	6:170850994	A/G	G	0,438
	rs7771229	6:170864467	A/G	G	0,449
	rs9295416	6:170842825	C/G	C	0,413 (AFD_EUR)
	rs9348277	6:170836531	A/T	T	0,438 (AFD_EUR)
	rs9356664	6:170860395	G/T	G	0,254
PSMB2					
	rs569942	1:36088107	A/G	A	0,370 (CEPH)
	rs6668196	1:36069204	A/G	G	0,075
	rs676614	1:36107510	G/T	G	0,107
	rs953035	1:36079508	A/G	A	0,053
PSMB3					
	rs2019203	17:32704762	A/C	A	0,416
	rs228272	17:32703110	C/T	T	0,379
	rs228273	17:32704213	C/T	T	0,331
	rs228275	17:32706916	C/T	T	0,425
	rs228278	17:32711735	A/T	A	0,217 (AFD_EUR)
	rs228279	17:32714455	C/T	C	0,217 (AFD_EUR)
	rs228280	17:32714656	G/T	T	0,136 (AFD_EUR)
	rs65926	17:32712538	C/G	C	0,212
PSMB4					
	rs1887544	1:151374545	C/T	C	0,136
	rs2769270	1:151355858	C/T	T	0,183
	rs4603	1:151374025	C/T	C	0,128
	rs6684085	1:151357333	C/T	T	0,164
	rs7172	1:151372138	A/G	G	0,144
PSMB5					
	rs10138759	14:23492276	A/G	A	0,102
	rs11543947	14:23504021	C/T	T	0,103
	rs12889177	14:23491329	A/G	A	0,199
	rs17125731	14:23494234	C/T	T	0,050
	rs4981456	14:23511357	C/G	G	0,292
	rs8010955	14:23494141	A/G	A	0,473
	rs8013143	14:23494277	A/G	G	0,314
	rs8020463	14:23504783	A/G	G	0,442

Gen	SNP	Posición (NCBI)	Alelos	Alelo menor (HapMap CEU)	MAF (HapMap CEU)
PSMB6					
	rs7468	17: 4701402	C/T	T	0,120 (CEPH)
	rs8078118	17: 4690038	A/C	A	0,407
	rs8080212	17: 4694337	C/T	T	0,363
PSMB7					
	rs10119911	9:127127172	C/T	T	0,389
	rs10760359	9:127174353	A/G	A	0,458 (AFD_EUR)
	rs10760361	9:127178266	G/T	T	0,332
	rs10818951	9:127131062	A/G	G	0,385
	rs10986333	9:127168391	A/T	A	0,433
	rs10986339	9:127195873	A/G	A	0,204
	rs12344916	9:127163623	C/T	C	0,367
	rs1323761	9:127116942	C/T	C	0,413 (SC_95_C)
	rs17315546	9:127148229	C/T	C	0,411
	rs2236386	9:127177736	C/G	G	0,408 (pilot1_CEU)
	rs4574	9:127177161	C/T	C	0,424
	rs4838173	9:127189686	C/G	C	0,336
	rs6478660	9:127133920	A/T	A	0,388
	rs7854989	9:127133584	C/T	C	0,500
PSMC1					
	rs10140761	14: 90740588	C/G	G	0,367
	rs11621563	14: 90739495	A/G	A	0,049
	rs17799220	14: 90739446	A/C	A	0,183
	rs2277517	14: 90722778	C/T	C	0,416
	rs2282031	14: 90730943	C/T	C	0,320
	rs3742673	14: 90735707	C/T	T	0,478
	rs4904667	14: 90738567	A/G	G	0,097
PSMC2					
	rs10257369	7:102971399	C/T	C	0,156
	rs12536983	7:103007599	C/T	C	0,111
	rs17136728	7:102989726	G/T	G	0,164
	rs2074624	7:102985211	C/G	G	0,292

Gen	SNP	Posición (NCBI)	Alelos	Alelo menor (HapMap CEU)	MAF (HapMap CEU)
PSMC3					
	rs10838708	11: 47441513	A/G	A	0,469
	rs11600581	11: 47448497	C/T	C	0,396 (AFD_EUR)
	rs17790804	11: 47447202	C/T	C	0,114
	rs2293579	11: 47440758	C/T	T	0,389
	rs3781625	11: 47443080	A/G	G	0,383
	rs7948705	11: 47447955	C/G	G	0,193
PSMC4					
	rs234365	19: 40475211	A/G	A	0,092
	rs234370	19: 40477465	A/G	G	0,066
	rs28366011	19: 40476720	C/T	T	0,033 (pilot1_CEU)
	rs371500	19: 40480923	C/T	T	0,049
PSMC5					
	rs13030	17: 61908556	C/T	T	0,205
	rs968719	17: 61908271	A/G	G	0,389
PSMC6					
	rs10144318	14: 53189731	A/C		0,500
	rs10483616	14: 53178303	A/C	A	0,042
	rs12897399	14: 53193068	A/T	A	0,009
	rs2273743	14: 53195076	A/G	G	0,415
	rs2295827	14: 53174981	C/T	T	0,088
	rs7142734	14: 53178746	A/G	G	0,408
	rs7155648	14: 53168126	A/C	C	0,044

Gen	SNP	Posición (NCBI)	Alelos	Alelo menor (HapMap CEU)	MAF (HapMap CEU)
PSMD1					
	rs10194776	2:231980019	C/T	T	0,333
	rs10498257	2:231993038	A/T	T	0,250
	rs11694724	2:231947467	A/G	G	0,058
	rs13424110	2:231933408	C/T	T	0,119
	rs17440378	2:231979355	C/T	T	0,092
	rs17619600	2:231976460	C/T	C	0,084
	rs2288147	2:231937505	A/G	G	0,275
	rs3731783	2:231913056	A/G	A	0,168
	rs4973377	2:231981992	A/G	A	0,171
	rs6436995	2:231907894	A/C	A	0,117
	rs6436998	2:231918591	C/T	C	0,250
	rs6436999	2:231942492	A/G	A	0,261
	rs6437002	2:232025284	A/G	G	0,321
	rs6748332	2:231914845	C/T	T	0,308
PSMD2					
	rs11545169	3:184020542	G/T	T	0,134 (pilot3_CEU)
	rs11545172	3:184019681	A/G	A	0,044 (pilot3_CEU)
	rs2376524	3:184011561	A/C	C	0,233
	rs4912533	3:184013551	A/C	C	0,258(pilot1_CEU)
PSMD3					
	rs11655584	17:38139024	C/T	T	0,080
	rs2305481	17:38138624	A/G	A	0,342
	rs2305482	17:38140927	A/C	A	0,442
	rs3826330	17:38150236	C/T	C	0,086
	rs3859190	17:38136562	G/T	T	0,066
	rs4794822	17:38156712	C/T	T	0,417
	rs8075668	17:38137623	C/T	T	0,442
	rs9912981	17:38141636	C/T	T	0,398 (AFD_CEU)
	rs9916279	17:38146154	C/T	C	0,190
PSMD4					
	rs16833107	1:151233007	C/T	T	0,088
	rs2275900	1:151238222	A/G	G	0,270
	rs3811405	1:151227371	A/G	A	0,192

Gen	SNP	Posición (NCBI)	Alelos	Alelo menor (HapMap CEU)	MAF (HapMap CEU)
PSMD5					
	rs1060817	9:123583192	C/T	T	0,451
	rs10739575	9:123606101	A/G	G	0,230
	rs10760117	9:123586737	G/T	T	0,483
	rs10985051	9:123607880	A/C	C	0,170
	rs12379604	9:123616858	G/T	G	0,168
	rs6602	9:123578964	A/G	G	0,142
PSMD6					
	rs1046025	3:63996262	A/G	A	0,164
	rs10510901	3:64013062	A/G	G	0,159
	rs12497119	3:64014640	A/G	G	0,425
	rs2037119	3:63994879	A/G	A	0,323
	rs2280160	3:63997896	C/T	C	0,417 (pilot1_CEU)
	rs35837	3:64013249	C/T	C	0,212
	rs35839	3:64013417	A/G	A	0,233 (pilot1_CEU)
	rs3816156	3:63999712	A/T	A	0,080
	rs3816157	3:63999322	C/T	C	0,164
	rs3906971	3:64025887	C/T	C	0,172
	rs40610	3:64009508	A/G	A	0,288
	rs6808752	3:64024529	A/G	A	0,243
PSMD7					
	rs10500585	16:74324862	C/T	T	0,292
	rs1195629	16:74337036	A/G	A	0,442
	rs1195630	16:74340431	A/C	C	0,257
	rs1195631	16:74341902	A/C	C	0,327
	rs12325102	16:74333737	C/T	C	0,142
	rs12448188	16:74313430	A/G	G	0,336
	rs12921488	16:74325131	A/G	A	0,177
	rs13331008	16:74312512	A/G	A	0,147
	rs17336700	16:74335204	C/T	C	0,168
	rs17336867	16:74337104	C/G	C	0,159
	rs17421100	16:74327012	C/G	C	0,133 (pilot1_CEU)
	rs3760054	16:74329919	A/G	G	0,159
	rs889641	16:74333380	C/T	C	0,340

Gen	SNP	Posición (NCBI)	Alelos	Alelo menor (HapMap CEU)	MAF (HapMap CEU)
PSMD10					
	rs4036579	X:107333853	A/G	G	0,403
	rs5973841	X:107335711	A/C	C	0,333 (AFD_EUR)
	rs807178	X:107328436	A/G	G	0,347
	rs807182	X:107335261	A/C	C	0,403
PSMD11					
	rs12162135	17:30805795	G/T	T	0,447
	rs7212835	17:30798525	A/G	A	0,128
	rs8078837	17:30763537	A/G	G	0,491
	rs9889607	17:30785585	A/G	G	0,372
	rs9900089	17:30772577	C/T	C	0,376
	rs9912262	17:30791936	A/T	T	0,141
PSMD12					
	rs11079691	17:65362552	A/T	T	0,183
	rs12601131	17:65359260	C/T	T	0,305
	rs12939848	17:65370808	C/T	T	0,372
	rs12944890	17:65330538	A/G	G	0,117
	rs17648225	17:65363813	G/T	G	0,257
	rs17726709	17:65343725	C/G	C	0,283
	rs3935732	17:65336527	A/G	G	0,406
	rs8073599	17:65367094	C/T	C	0,403
	rs9303518	17:65345963	C/T	C	0,219
	rs9903804	17:65329358	C/T	C	0,385
PSMD13					
	rs1045288	11:237087	A/G	A	0,237
	rs1128322	11:244197	C/T	T	0,230
	rs2272566	11:244552	A/G	A	0,496
	rs3020899	11:247906	C/G	C	0,495 (pilot1_CEU)
	rs3817630	11:252231	C/G	G	0,204
	rs3829999	11:247102	A/G	A	0,225
	rs524555	11:246678	A/T	A	0,150
	rs532483	11:257030	A/G	A	0,102
	rs559422	11:248181	A/C	C	0,115
	rs6540	11:252649	A/G	A	0,058
	rs6598055	11:252318	A/G	A	0,363
	rs6598057	11:251034	A/G	G	0,134
	rs7930624	11:253841	A/C	A	0,207
	rs939915	11:237737	A/T	A	0,208

Gen	SNP	Posición (NCBI)	Alelos	Alelo menor (HapMap CEU)	MAF (HapMap CEU)
PSMD14					
	rs1064576	2:162268108	A/G	A	0,063
	rs1116173	2:162226838	C/T	T	0,183
	rs12463483	2:162252619	G/T	T	0,066
	rs13398392	2:162187250	C/T	T	0,325
	rs16845757	2:162156260	C/T	T	0,067
	rs2013879	2:162176044	A/G	G	0,133
	rs2042489	2:162225169	A/G	A	0,192
	rs2059337	2:162167013	A/G	G	0,111
	rs2216941	2:162258705	A/T	T	0,111
	rs2303318	2:162224495	A/C	C	0,066
	rs2303319	2:162224664	C/T	T	0,083
	rs6727917	2:162234608	A/G	A	0,243
	rs6733456	2:162258433	C/T	C	0,248
	rs7574882	2:rs7574882	C/T	T	0,225
	rs9713	2:162165008	A/T	A	0,246
MAPT/CRHR1					
	rs3418	17:43723462	A/G	A	0,203
	rs8072451	17:43893716	C/T	T	0,208
	rs2435205	17:44018764	A/G	G	0,425
	rs242562	17:44026739	A/G	A	0,379
	rs1800547	17:44051846	A/G	G	0,208
	rs2435207	17:44058928	A/G	A	0,354
	rs2258689	17:44067382	C/T	C	0,175
	rs2471738	17:44076063	C/T	T	0,288
	rs7521	17:44105395	A/G	A	0,429

Gen	SNP	Posición (NCBI)	Alelos	Alelo menor (HapMap CEU)	MAF (HapMap CEU)
SNCA					
	rs356164	4: 90693476	C/G	C	0,117
	rs356204	4: 90663542	A/G	A	0,483
	rs12502363	4: 90713064	A/G	A	0,420
	rs2737020	4: 90740878	C/T	C	0,183
	rs6532191	4: 90745930	C/T	C	0,491
	rs2737008	4: 90747183	C/T	T	0,319
	rs2619361	4: 90757735	A/C	C	0,237
	rs2301134	4: 90758945	C/T	T	0,482
	rs2619363	4: 90759047	G/T	T	0,308 (pilot1_CEU)
	rs2619364	4: 90759887	A/G	A	0,317
	rs2583988	4: 90760828	C/T	T	0,264
	rs1023777	4: 90761412	C/T	C	0,403
	rs2736989	4: 90776257	A/G	A	0,200
CNCE1					
	rs3218036	19: 30305684	A/G	A	0,295
GPR37					
	rs1008290	7: 124381635	A/G	A	0,412
	rs17147421	7: 124383948	A/G	A	0,341
	rs4731206	7: 124385665	A/T	A	0,292
	rs3735270	7: 124387092	C/G	C	0,492
	rs724356	7: 124387374	C/T	T	0,212
	rs2284215	7: 124387871	A/C	C	0,358
	rs2284214	7: 124388204	C/T	T	0,464
	rs2402749	7: 124389723	A/T	T	0,392
	rs4639456	7: 124390408	A/G	A	0,261
	rs989177	7: 124412886	C/T	C	0,280
HSPB2					
	rs4252591	11: 111784923	C/T	T	0,243
	rs10891299	11: 111787962	G/T	T	0,233
NOB1					
	rs2965749	16: 69771914	C/T	C	0,288
	rs17299478	16: 69775500	C/T	T	0,199
	rs4985518	16: 69787158	C/T	C	0,199

Estudio de Maraganore					
Gen	SNP	Posición (NCBI)	Alelos	Alelo menor (HapMap CEU)	MAF (HapMap CEU)
PRDM2					
	rs2245218	1: 14139826	A/G	G	0,125
SEMA5A					
	rs7702187	5: 9332281	A/T	T	0,167
	rs11737074	4: 125081373	A/G	A	0,242
	rs17329669	7: 36851929	A/G	G	0,167
	rs1509269	4: 138753724	C/T	T	0,108
	rs2313982	4: 138788060	C/T	T	0,084





BIBLIOGRAFÍA

- Abbondanza C, De Rosa C, D'Arcangelo A, Pacifico M, Spizuoco C, Piluso G *et al.* Identification of a functional estrogen-responsive enhancer element in the promoter 2 of *PRDM2* gene in breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* 2012; 227: 964-975.
- Abel KJ, Boehnke M, Prahald M, Ho P, Flejter WL, Watkins M *et al.* A radiation hybrid map of the *BRCA1* region of chromosome 17q12-q21. *Genomics* 1993; 17: 632-641.
- Abou-Sleiman PM, Healy DG, Wood NW. Causes of Parkinson's disease: genetics of DJ-1. *Cell Tissue Res* 2004; 318: 185-188.
- Agarwal R, Jurisica I, Mills GB, Cheng KW. The emerging role of the RAB25 small GTPase in cancer. *Traffic* 2009; 10: 1561-1568.
- Agúndez JA, Luengo A, Herráez O, Martínez C, Alonso-Navarro H, Jiménez-Jiménez FJ, García-Martín E. Nonsynonymous polymorphisms of histamine-metabolising enzymes in patients with Parkinson's disease. *Neuromolecular Med* 2008; 10: 10-16.
- Alberti S, Demand J, Esser C, Emmerich N, Schild H, Hohfeld J. Ubiquitylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome. *J Biol Chem* 2002; 277: 45920-45927.
- ALSGEN Consortium. Age of onset of amyotrophic lateral sclerosis is modulated by a locus on 1p34.1. *Neurobiol Aging* 2013; 34: 357.e7-19.
- Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Altshuler DM and the International HapMap 3 Consortium. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 2010; 467: 52-58.
- Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1695: 189-207.
- Amici M, Eleuteri AM. Structure and function of the 20S proteasome. En Di Napoli D, Wójcik C (ed). *The ubiquitine proteasome system in the central nervous system: from physiology to pathology.* Nueva York 2007. Nova Medical Books. Pág 117-136.
- Anderson CA, Pettersson FH, Clarke GM, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Data quality control in genetic case-control association

- studies. *Nat Protoc* 2010; 5: 1564–1573.
- Appel-Cresswell S, Vilarino-Güell C, Encarnación M, Sherman H, Yu I, Shah B *et al.* Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013; 28: 811-813.
- Arango Duque G, Fukuda M, Descoteaux A. Synaptotagmin XI regulates phagocytosis and cytokine secretion in macrophages. *J Immunol* 2013; 190: 1737-17345.
- Artacoz-Sanz, MT, Viñes-Rueda JJ. Estimación de la prevalencia de enfermedad de Parkinson en Navarra. Estudio farmacoepidemiológico de consumo de antiparkinsonianos. *Rev Esp Salud Pública* 1995; 69: 479-485.
- Astle W, Balding DJ. Population structure and cryptic relatedness in genetic association studies. *Stat Sci* 2009; 24: 451-471.
- Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 781-91
- Ballard PA, Tetrad JW, Langston JW. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology* 1985; 35: 949-956.
- Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 663-672.
- Bandopadhyay R, Kingsbury AE, Cookson MR, Reid AR, Evans IM, Hope AD *et al.* The expression of *DJ-1* (*PARK7*) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. *Brain* 2004; 127: 420-430.
- Bansal A, van den Boom D, Kammerer S, Honisch C, Adam G, Cantor CR *et al.* Association testing by DNA pooling: an effective initial screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 16871-16874.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21: 263-265.
- Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 1998; 82: 367-380
- Beasley SA, Hristova V A, Shaw GS. Structure of the parkin in-between-ring domain provides insights for E3-ligase dysfunction in autosomal recessive Parkinson's disease. *Proc Na Acad Sci* 2007; 104: 3095-3100.
- Bedford L, Hay D, Devoy A, Paine S, Powe DG, Seth R *et al.* Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies. *J Neurosci* 2008; 28: 8189-8198.

- Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP. The genetics of Parkinson's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010; 23: 228-242.
- Bellman R. *Adaptive Control Processes*. Princeton NJ: Princeton University Press 1961.
- Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH *et al*. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 2006; 38: 515-517.
- Benedict CM, Ren L, Clawson GA. Nuclear multicatalytic proteinase alpha subunit RRC3: differential size, tyrosine phosphorylation, and susceptibility to antisense oligonucleotide treatment. *Biochemistry* 1995; 34: 9587-9598.
- Benyair R, Ron E, Lederkremer GZ. Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum. *Int Rev Cell Mol Biol* 2011; 292: 197-280.
- Bernales S, McDonald KL, Walter P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol.* 2006; 4: 2311-2324.
- Bettegowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH *et al*. Mutations in *C11orf95* and *FUS* contribute to human oligodendroglioma. *Science* 2011; 333: 1453-1455.
- Bettencourt C, Santos C, Coutinho P, Rizzu P, Vasconcelos J, Kay T *et al*. Parkinsonian phenotype in Machado-Joseph disease (MJD/SCA3): a two-case report. *BMC Neurol* 2011; 11: 131-135.
- Bhalla A, Chicka MC, Chapman ER. Analysis of the synaptotagmin family during reconstituted membrane fusion. Uncovering a class of inhibitory isoforms. *J Biol Chem* 2008; 283: 21799-21807
- Bialecka M, Kurzawski M, Klodowska-Duda G, Opala G, Tan EK, Drozdziak M. Polymorphism in semaphorin 5A (*Sema5A*) gene is not a marker of Parkinson's disease risk. *Neurosci Lett* 2006; 399: 121-123.
- Biskup S, Moore DJ, Celsi F, Higashi S, West AB, Andrabi SA *et al*. Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Ann Neurol* 2006; 60: 557-569.
- Blázquez L, Otaegui D, Sáenz A, Paisán-Ruiz C, Emparanza JI, Ruiz-Martinez J *et al*. Apolipoprotein E epsilon4 allele in familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2006; 406: 235-239.
- Bogaerts V, Theuns J, van Broeckhoven C. Genetic findings in Parkinson's disease and translation into treatment: a leading role for mitochondria? *Genes Brain Behav* 2008; 7: 129-151.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E *et al*.

- Mutations in the *DJ-1* gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003; 299: 256-259.
- Bonifati V, Rohé CF, Breedveld GJ, Fabrizio E, De Mari M, Tassorelli C *et al*. Early-onset parkinsonism associated with *PINK1* mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology*. 2005; 65: 87-95.
- Bosch E, Calafell F, Comas D, Oefner PJ, Underhill PA, Bertranpetit J. High-resolution analysis of human Y-chromosome variation shows a sharp discontinuity and limited gene flow between northwestern Africa and the Iberian Peninsula. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1019-1029.
- Bové J, Zhou C, Jackson-Lewis V, Taylor J, Chu Y, Rideout HJ *et al*. Proteasome inhibition and Parkinson's disease modeling. *Ann Neurol*. 2006; 60: 260-264.
- Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976 to 1990. *Neurology* 1999; 52: 1214-1220.
- Braak H, Braak E, Yilmazer D, Schultz C, de Vos RA, Jansen EN *et al*. Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 1995; 46: 15-31.
- Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol*. 1999; 1: 221-226.
- Brion M, Quintans B, Zarrabeitia M, González-Neira A, Salas A, Lareu V *et al*. Micro-geographical differentiation in Northern Iberia revealed by Y-chromosomal DNA analysis. *Gene* 2004; 329: 17-25.
- Brockmann K, Schulte C, Hauser AK, Lichtner P, Huber H, Maetzler W *et al*. *SNCA*: Major genetic modifier of age at onset of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013; 28: 1217-1221.
- Brooks P, Fuertes G, Murray RZ, Bose S, Knecht E, Rechsteiner MC *et al*. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J* 2000; 346: 155-161.
- Burre J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Sudhof TC. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 2010; 329: 1663-1667.
- Cai T, Yao T, Zheng G, Chen Y, Du K, Cao Y *et al*. Manganese induces the overexpression of α -synuclein in PC12 cells via *ERK* activation. *Brain Res* 2010; 1359: 201-207.
- Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S *et al*. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial

- localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 9103-9108.
- Cardo LF, Coto E, de Mena L, Ribacoba R, Lorenzo-Betancor O, Pastor P *et al.* A search for SNCA 3' UTR variants identified SNP rs356165 as a determinant of disease risk and onset age in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 2012; 47: 425-430.
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N *et al.* Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 1999; 22: 231-238.
- Carmine Belin A, Westerlund M, Sydow O, Lundströmer K, Håkansson A, Nissbrandt H *et al.* Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) mutations in a Swedish Parkinson cohort and a healthy nonagenarian. *Mov Disord* 2006; 21: 1731-1734.
- Caswell PT, Spence HJ, Parsons M, White DP, Clark K, Cheng KW *et al.* Rab25 associates with alpha5beta1 integrin to promote invasive migration in 3D microenvironments. *Dev Cel.* 2007; 13: 496-510.
- Cerezo M, Achilli A, Olivieri A, Perego UA, Gómez-Carballa A, Brisighelli F *et al.* Reconstructing ancient mitochondrial DNA links between Africa and Europe. *Genome Res* 2012; 22: 821-826
- Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng* 2011; 108: 2777-2793.
- Chakravarti A. Population genetics –making sense out of sequence. *Nat Genet* 1999; 22: 56-60
- Chan SS, Copeland WC. DNA polymerase gamma and mitochondrial disease: understanding the consequence of POLG mutations. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787: 312-319
- Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, Schlüter OM, Südhof TC. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 2005; 123: 383-396.
- Chapman ER. How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu Rev Biochem* 2008; 77: 615-641.
- Chartier-Harlin MC, Dachsel JC, Vilarinho-Güell C, Lincoln SJ, Leprêtre F, Hulihan MM *et al.* Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 398-406.
- Cheung ZH, Ip NY. The emerging role of autophagy in Parkinson's disease. *Mol Brain* 2009 16; 2: 29.
- Choi P, Snyder H, Petrucelli L, Theisler C, Chong M, Zhang Y *et al.* SEPT5_v2 is a parkin-binding protein. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 117: 179-189.
- Choi WS, Kruse SE, Palmiter RD, Xia Z. Mitochondrial complex I inhibition

- is not required for dopaminergic neuron death induced by rotenone, MPP+, or paraquat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 15136-15141
- Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J *et al.* Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med* 2001; 7: 1144-1150.
- Cirulli ET, Goldstein DB. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 415-425.
- Clarimon J, Scholz S, Fung HC, Hardy J, Eerola J, Hellstrom O *et al.* Conflicting results regarding the semaphorin gene (*SEMA5A*) and the risk for Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 1082-1084
- Clark LN, Wang Y, Karlins E, Saito L, Mejia-Santana H, Harris J *et al.* Frequency of *LRRK2* mutations in early- and late-onset Parkinson disease. *Neurology* 2006; 67: 1786-1791.
- Cole NB, Murphy DD, Grider T, Rueter S, Brasaemle D, Nussbaum RL. Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein α -synuclein. *J Biol Chem* 2002; 277: 6344-6352.
- Conde L, Vaquerizas JM, Santoyo J, Al-Shahrour F, Ruiz-Llorente S, Robledo M, Dopazo J. PupASNP Finder: a web tool for finding SNP with putative effect at transcriptional level. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(Web Server issue): W242-248.
- Cook C, Petrucelli L. A critical evaluation of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 664-675.
- Cookson MR. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 29-52.
- Cookson MR. The role of leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*) in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2010; 11: 791-797.
- Corti O, Hampe C, Koutnikova H, Darios F, Jacquier S, Prigent A *et al.* The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1427-1437.
- Coux O, Goldberg AL. Enzymes catalyzing ubiquitination and proteolytic processing of the p105 precursor of nuclear factor kappaB1. *J Biol Chem* 1998; 273: 8820-8828.
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 801-847
- Criado Álvarez JJ, Lomo Barrientos C, Martínez Hernández J, González

- Solana I. Consumo de antiparkinsonianos en Castilla La Mancha. Estimación de la prevalencia de la enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol* 1998; 27: 405-408.
- Cruts M, Theuns J, Van Broeckhoven C. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Human Mutation* 2012; 33: 1340-1344.
- Da Costa CA, Sunyach C, Giaime E, West A, Corti O, Brice A *et al.* Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 1370-1375. .
- Da Fonseca PC, Morris EP. Structure of the human 26S proteasome: subunit radial displacements open the gate into the proteolytic core. *J Biol Chem* 2008; 283: 23305-23314.
- Darios F, Corti O, Lücking CB, Hampe C, Muriel MP, Abbas N *et al.* Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 517-526
- Davidson JD, Riley B, Burright EN, Duvick LA, Zoghbi HY, Orr HT. Identification and characterization of an ataxin-1-interacting protein: A1Up, a ubiquitin-like nuclear protein. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2305-2312.
- Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 1998; 273: 9443-9449.
- de Castro IP, Martins LM, Loh SH. Mitochondrial quality control and Parkinson's disease: a pathway unfolds. *Mol Neurobiol* 2011; 43: 80-86.
- De Coo IF, Renier WO, Ruitenbeek W, Ter Laak HJ, Bakker M, Schägger H *et al.* A 4-base pair deletion in the mitochondrial cytochrome b gene associated with parkinsonism/MELAS overlap syndrome. *Ann Neurol* 1999; 45: 130-133.
- de Juana López J, Vázquez González A. Población y emigración en Galicia. En de Juana J, Prada J (coords). *Historia contemporánea de Galicia*. Ariel, Barcelona 2005. Págs 393-440.
- De Lau LML, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5: 525-535.
- Dent J, Kato K, Peng XR, Martinez C, Cattaneo M, Poujol C *et al.* A prototypic platelet septin and its participation in secretion. *Proc Nat Acad Sci* 2002; 99: 3064-3069.
- Dev KK, Hofele K, Barbieri S, Buchman VL, van der Putten H. Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in

- neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 2003; 45: 14-44.
- Devlin B, Roeder K. Genomic control for association studies. *Biometrics* 1999; 55: 997-1004
- Di Fonzo A, Wu-Chou YH, Lu CS, van Doeselaar M, Simons EJ, Rohé CF *et al.* A common missense variant in the *LRRK2* gene, Gly2385Arg, associated with Parkinson's disease risk in Taiwan. *Neurogenetics* 2006; 7: 133-138.
- Di Napoli D, Wójcik C. Focusing on the ubiquitine proteasome system in nervous system. En Di Napoli D, Wójcik C (ed). *The ubiquitine proteasome system in the central nervous system: from physiology to pathology*. Nueva York 2007. Nova Medical Books. Pág 1-14.
- Di Napoli M, Shah IM, Stewart DA. Molecular pathways and genetic aspects of Parkinson's disease: from bench to bedside. *Expert Rev Neurother* 2007; 7: 1693-1729.
- Dice JF. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 2007; 3: 295-299.
- Dick DM. Introduction to association. En Neale BM, Ferreira MAR, Medland SE, Posthuma D (Eds). *Statistical Genetics: Gene Mapping Through Linkage and Association*. Taylor & Francis Group. Nueva York 2008. Págs 311-321.
- Dong Z, Ferger B, Paterna JC, Vogel D, Furler S, Osinde M *et al.* Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vector-mediated overexpression of the parkin target protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12438-12443.
- Donnelly MP, Paschou P, Grigorenko E, Gurwitz D, Mehdi SQ, Kajuna SL *et al.* The distribution and most recent common ancestor of the 17q21 inversion in humans. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 161-171.
- Doss-Pepe EW, Chen L, Madura K. Alpha-synuclein and parkin contribute to the assembly of ubiquitin lysine 63-linked multiubiquitin chains. *J Biol Chem* 2005; 280: 16619-16624.
- Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M. Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 1992; 267: 22369-22377.
- Edvardson S, Cinnamon Y, Ta-Shma A, Shaag A, Yim YI, Zenvirt S *et al.* A deleterious mutation in *DNAJC6* encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PLoS One* 2012; 7: e36458.
- Elbaz A, Levecque C, Clavel J, Vidal JS, Richard F, Amouyel P *et al.* CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure, and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; 55: 430-434.

- Elbaz A, Nelson LM, Payami H, Ioannidis JP, Fiske BK, Annesi G *et al.* Lack of replication of thirteen single-nucleotide polymorphisms implicated in Parkinson's disease: a large-scale international study. *Lancet Neurol* 2006; 5: 917-923.
- Elbaz A, Ross OA, Ioannidis JP, Soto-Ortolaza AI, Moisan F, Aasly J *et al.* Independent and joint effects of the *MAPT* and *SNCA* genes in Parkinson disease. *Ann Neurol*. 2011; 69: 778-792.
- Engelender S, Kaminsky Z, Guo X, Sharp AH, Amaravi RK, Kleiderlein JJ *et al.* Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet*. 1999; 22: 110-114.
- Eyal A, Engelender S. Synphilin isoforms and the search for a cellular model of Lewy body formation in Parkinson's disease. *Cell Cycle* 2006; 5: 2082-2086.
- Ezquerria M, Campdelacreu J, Muñoz E, Tolosa E. Association study of the G258S transferrin gene polymorphism and Parkinson's disease in the Spanish population. *J Neurol* 2005; 252: 1269-1270.
- Ezquerria M, Pastor P, Gaig C, Vidal-Taboada JM, Cruchaga C, Muñoz E *et al.* Different *MAPT* haplotypes are associated with Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Neurobiol Aging* 2011; 32: 547.e11-16.
- Fahn S, Jankovic J. Principles and practice of movement disorders. Elsevier. Filadelfia 2007. Parkinsonism. Capítulo 4. Parkinsonism: Clinical features and differential diagnosis. Pág 79-103.
- Fahn S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 991: 1-14.
- Farrer M, Chan P, Chen R, Tan L, Lincoln S, Hernandez D *et al.* Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol* 2001; 50: 293-300.
- Farrer MJ. Genetics of Parkinson's disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Gen* 2006, 7: 306-318.
- Fernández Cortizo C. La población de Galicia en los siglos XVI-XVIII. En Villares R (director) *Historia de Galicia*. Vigo : Faro de Vigo, 199-. Págs 537-556
- Fernández-Chacón R, Shin OH, Königstorfer A, Matos MF, Meyer AC, Garcia J *et al.* Structure/function analysis of Ca²⁺ binding to the C2A domain of synaptotagmin 1. *J Neurosci* 2002; 22: 8438-8446.
- Fishman-Jacob T, Reznichenko L, Youdim MB, Mandel SA. A sporadic Parkinson disease model via silencing of the ubiquitin-proteasome/E3 ligase component *SKP1A*. *J Biol Chem* 2009; 284: 32835-32845.

- Flores C, Maca-Meyer N, González AM, Oefner PJ, Shen P, Pérez JA *et al.* Reduced genetic structure of the Iberian peninsula revealed by Y-chromosome analysis: implications for population demography. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 855-863.
- Fornai F, Lenzi P, Gesi M, Ferrucci M, Lazzeri G, Busceti CL *et al.* Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition. *J Neurosci* 2003; 23: 8955-8966.
- Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, Kubo S, Anthony MD, Edwards RH. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J Neurosci* 2004; 24: 6715-6723.
- Fortun J, Dunn WA Jr, Joy S, Li J, Notterpek L. Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. *J Neurosci* 2003; 23: 10672-10680.
- Fung HC, Scholz S, Matarin M, Simón-Sánchez J, Hernandez D, Britton A *et al.* Genome-wide genotyping in Parkinson's disease and neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data. *Lancet Neurol* 2006; 5: 911-916.
- Furukawa Y, Vigouroux S, Wong H, Guttman M, Rajput AH, Ang L *et al.* Brain proteasomal function in sporadic Parkinson's disease and related disorders. *Ann Neurol* 2002; 51: 779-782.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B *et al.* The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296: 2225-2229.
- Gaig C, Ezquerro M, Marti MJ, Muñoz E, Valldeoriola F, Tolosa E. LRRK2 mutations in Spanish patients with Parkinson disease: frequency, clinical features, and incomplete penetrance. *Arch Neurol* 2006; 63: 377-382.
- Gallegos-Arreola MP, Figuera LE, Ortiz GG, Jiménez-Gil FJ, Ramírez-Vega J, Ruíz-Sandoval JL *et al.* Apolipoprotein E genotypes in Mexican patients with Parkinson's disease. *Dis Markers*. 2009; 27: 225-230.
- Gandhi PN, Chen SG, Wilson-Delfosse AL. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2): a key player in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 2009; 87: 1283-1295.
- Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, Plun-Favreau H, Deas E, Klupsch K *et al.* PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell*. 2009; 33: 627-638.
- Gao L, Díaz-Corrales FJ, Carrillo F, Díaz-Martín J, Caceres-Redondo MT,

- Carballo M *et al.* Brain-derived neurotrophic factor G196A polymorphism and clinical features in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 2010; 122: 41-45.
- Gao L, Gómez-Garre P, Díaz-Corrales FJ, Carrillo F, Carballo M, Palomino A *et al.* Prevalence and clinical features of LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease in southern Spain. *Eur J Neurol* 2009; 16: 957-960.
- García-Mata R, Bebök Z, Sorscher EJ, Sztul ES. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* 1999; 146: 1239-1254.
- Gasser T, Hardy J, Mizuno Y. Milestones in PD genetics. *Mov Disord* 2011; 26: 1042-1048.
- Gauderman WJ, Morrison JM. QUANTO 1.1: A computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies, <http://hydra.usc.edu/gxe>, 2006.
- Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1999; 56: 33-39.
- Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI *et al.* Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*. 2000; 290: 985-989.
- Giasson BI, Forman MS, Higuchi M, Golbe LI, Graves CL, Kotzbauer PT *et al.* Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science* 2003; 300: 636-640.
- Giovannone B, Lee E, Laviola L, Giorgino F, Cleveland KA, Smith RJ. Two novel proteins that are linked to insulin-like growth factor (IGF-I) receptors by the Grb10 adapter and modulate IGF-I signaling. *J Biol Chem* 2003; 278: 31564-31573.
- Gitler AD, Chesi A, Geddie ML, Strathearn KE, Hamamichi S, Hill KJ *et al.* Alpha-synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. *Nat Genet* 2009; 41: 308-315.
- Glass AS, Huynh DP, Franck T, Weitalla D, Müller T, Pulst SM *et al.* Screening for mutations in synaptotagmin XI in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 2004; 68: 21-28.
- Glavan G, Schliebs R, Zivin M. Synaptotagmins in neurodegeneration. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009; 292: 1849-62.
- Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002;

- 82: 373-428.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989; 3: 519-526.
- Goker-Alpan O, López G, Vithayathil J, Davis J, Hallett M, Sidransky E. The spectrum of parkinsonian manifestations associated with glucocerebrosidase mutations. *Arch Neurol* 2008; 65: 1353-1357.
- Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975; 72: 11-15.
- González JR, Armengol L, Sole X, Guino E, Mercader JM, *et al.* SNPAssoc, an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007; 23: 644-645
- Goris A, Williams-Gray CH, Foltynie T, Compston DA, Barker RA, Sawcer SJ *et al.* No evidence for association with Parkinson disease for 13 single-nucleotide polymorphisms identified by whole-genome association screening. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 1088-1090.
- Gorostidi A, Ruiz-Martínez J, Lopez de Munain A, Alzualde A, Martí Massó JF. LRRK2 P.G2019S and R1441G mutations associated with Parkinson's disease are common in the Basque Country, but relative prevalence is determined by ethnicity. *Neurogenetics* 2009; 10: 157-159.
- Groll M, Bajorek M, Köhler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R *et al.* A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol*. 2000; 7: 1062-1067.
- Grünblatt E, Mandel S, Jacob-Hirsch J, Zeligson S, Amariglio N, Rechavi G *et al.* Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes. *J Neural Transm* 2004; 111: 1543-1573.
- Gustavsson N, Han W. Calcium-sensing beyond neurotransmitters: functions of synaptotagmins in neuroendocrine and endocrine secretion. *Biosci Rep* 2009; 29: 245-259.
- Hampe C, Ardila-Osorio H, Fournier M, Brice A, Corti O. Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 2059-2075.

- Handley PM, Mueckler M, Siegel NR, Ciechanover A, Schwartz AL. Molecular cloning, sequence, and tissue distribution of the human ubiquitin-activating enzyme E1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 258-262.
- Hartwell LH, Hood L, Goldberg ML, Reynolds AE, Silver LM. *Genetics: from gene to genomes*. McGraw Hill. Nueva York 2011a, 4ª edición. Capítulo 11. Genome-wide variation and trait analysis. Pág 368-404.
- Hartwell LH, Hood L, Goldberg ML, Reynolds AE, Silver LM. *Genetics: from gene to genomes*. McGraw Hill. Nueva York 2011b, 4ª edición. Capítulo 19. Variations and selection in populations. Págs 655-689
- Hasegawa M, Fujiwara H, Nonaka T, Wakabayashi K, Takahashi H, Lee VM *et al*. Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J Biol Chem*. 2002; 277: 49071-49076.
- Haugarvoll K, Toft M, Skipper L, Heckman MG, Crook JE, Soto A *et al*. Fine-mapping and candidate gene investigation within the PARK10 locus. *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 336-343.
- Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, Paternotte C, Samson D, Artiguenave F *et al*. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet* 1999; 230: 296-303.
- He H, Dai F, Yu L, She X, Zhao Y, Jiang J *et al*. Identification and characterization of nine novel human small GTPases showing variable expressions in liver cancer tissues. *Gene Expr* 2002; 10: 231-242.
- Heald R, Nogales E. Microtubule dynamics. *J Cell Sci* 2002; 115: 3-4.
- Healy DG1, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S *et al*. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* 2008; 7: 583-590.
- Hegde AN. Ubiquitin-proteasome-mediated local protein degradation and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 2004; 73: 311-357.
- Hegde AN, Upadhyya SC. Role of ubiquitin-proteasome-mediated proteolysis in nervous system disease. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1809: 128-140
- Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G *et al*. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 2002; 277: 432-438.
- Heidema AG, Boer JM, Nagelkerke N, Mariman EC, van der A DL, Feskens EJ. The challenge for genetic epidemiologists: how to analyze large

- numbers of SNP in relation to complex diseases. *BMC Genet* 2006; 7: 23.
- Hendil KB, Hartmann-Petersen R. Proteasomes: a complex story. *Curr Protein Pept Sci* 2004; 5: 135-151
- Hershko A, Ciechanover A, Varshavsky A. Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat Med* 2000; 6: 1073-1081.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425-479.
- Hicke L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 195-201.
- Higashi S, Biskup S, West AB, Trinkaus D, Dawson VL, Faull RL *et al*. Localization of Parkinson's disease-associated LRRK2 in normal and pathological human brain. *Brain Res* 2007; 1155: 208-219.
- Hill WG, Robertson A. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor Appl Genet* 1968, 38: 226-231.
- Hoehnck J, Vidal L, Morales B, Ampuero I, Jiménez-Jiménez FJ, Berciano J *et al*. Molecular findings in familial Parkinson disease in Spain. *Arch Neurol*. 2002; 59: 966-970.
- Hofmann K, Bucher P. The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 204-205.
- Horvath R, Hudson G, Ferrari G, Fütterer N, Ahola S, Lamantea E *et al*. Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain* 2006; 129: 1674-1684.
- Horvath R, Kley RA, Lochmüller H, Vorgerd M. Parkinson syndrome, neuropathy, and myopathy caused by the mutation A8344G (MERRF) in tRNALys. *Neurology* 2007; 68: 56-58.
- Howie BN, Donnelly P, Marchini J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet* 2009; 5: e1000529
- Hruska KS, Goker-Alpan O, Sidransky E. Gaucher disease and the synucleinopathies. *J Biomed Biotechnol* 2006; 2006: 78549
- Hudson TJ. Wanted: regulatory SNP. *Nat Genet* 2003; 33: 439-440.
- Hughes AJ, Ben Shlomo Y, Daniel SE, Lees AJ. What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinical pathological study. *Neurology* 1992a; 42: 1142-1146.
- 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* 1992b; 55: 181-184.
- Huynh DP, Scoles DR, Nguyen D, Pulst SM. The autosomal recessive

- juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2587-2597
- Hyun CH, Yoon CY, Lee HJ, Lee SJ. LRRK2 as a Potential Genetic Modifier of Synucleinopathies: Interlacing the Two Major Genetic Factors of Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol* 2013; 22: 249-257.
- Ibáñez P, Bonnet AM, Débarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P *et al.* Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 364: 1169-1171.
- Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of parkin. *Cell* 2001; 105: 891-902
- Imai Y, Soda M, Takahashi R. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem* 2000; 275: 35661-35664.
- Imajoh-Ohmi S, Kawaguchi T, Sugiyama S, Tanaka K, Omura S, Kikuchi H. Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217: 1070-1077.
- Infante J, Rodríguez E, Combarros O, Mateo I, Fontalba A, Pascual J *et al.* LRRK2 p.G2019S is a common mutation in Spanish patients with late-onset Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2006; 395: 224-226.
- Inoue S, Imamura A, Okazaki Y, Yokota H, Arai M, Hayashi N *et al.* Synaptotagmin XI as a candidate gene for susceptibility to schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007; 144B: 332-340.
- Ishihara L, Warren L, Gibson R, Amouri R, Lesage S, Dürr A *et al.* Clinical features of Parkinson disease patients with homozygous leucine-rich repeat kinase 2 P.G2019S mutations. *Arch Neurol* 2006; 63: 1250-1254.
- Ito G, Okai T, Fujino G, Takeda K, Ichijo H, Katada T, Iwatsubo T. GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson's disease. *Biochemistry* 2007; 46: 1380-1388.
- Iwanczyk J, Sadre-Bazzaz K, Ferrell K, Kondrashkina E, Formosa T, Hill CP, Ortega J. Structure of the Bim10-20 S proteasome complex by cryo-electron microscopy. Insights into the mechanism of activation of mature yeast proteasomes. *J Mol Biol* 2006; 363: 648-659.
- Jänen SB, Chaachouay H, Richter-Landsberg C. Autophagy is activated by proteasomal inhibition and involved in aggresome clearance in cultured

- astrocytes. *Glia* 2010; 58: 1766-1774.
- Jeffreys AJ, Holloway JK, Kauppi L, May CA, Neumann R, Slingsby MT, Webb AJ. Meiotic recombination hot spots and human DNA diversity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004; 359: 141-152.
- Jellinger KA. The pathology of Parkinson's disease-recent advances. En Gálvez Jiménez N (ed). *Scientific basis for the treatment of Parkinson's disease*. Taylor & Francis. Londres y Nueva York 2005. Pág 53-85.
- Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, Morris AJ. Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry* 1998; 37: 4901-4909.
- Joazeiro CA, Weissman AM. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 2000; 102: 549-552.
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 1998; 143: 1883-1898.
- Juárez-Cedillo T, Zuñiga J, Acuña-Alonzo V, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Barquera R *et al*. Genetic admixture and diversity estimations in the Mexican Mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers. *Forensic Sci Int Genet* 2008; 2: e37-e39.
- Kabuta T, Furuta A, Aoki S, Furuta K, Wada K. Aberrant interaction between Parkinson disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 2008; 283: 23731-23738.
- Kachergus J, Mata IF, Hulihan M, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J *et al*. Identification of a novel *LRRK2* mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 672-680.
- Kay DM, Factor SA, Samii A, Higgins DS, Griffith A, Roberts JW *et al*. Genetic association between alpha-synuclein and idiopathic Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; 147B: 1222-1230.
- Kay DM, Kramer P, Higgins D, Zabetian CP, Payami H. Escaping Parkinson's disease: a neurologically healthy octogenarian with the *LRRK2* P.G2019S mutation. *Mov Disord* 2005; 20: 1077-1078
- Kay DM, Zabetian CP, Factor SA, Nutt JG, Samii A, Griffith A *et al*. Parkinson's disease and *LRRK2*: frequency of a common mutation in U.S. movement disorder clinics. *Mov Disord* 2006; 21: 519-523.
- Keller JN, Dimayuga E, Chen Q, Thorpe J, Gee J, Ding Q. Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. *Int J*

- Biochem Cell Biol 2004; 36: 2376-2391.
- Kim I, Rodríguez-Enríquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. Arch Biochem Biophys 2007; 462: 245-253.
- Kimura Y, Tanaka K. Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. J Biochem 2010; 147: 793-798.
- Kisselev AF, Akopian TN, Goldberg AL. Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. Biol Chem 1998; 273: 1982-1989.
- Equipoad T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature 1998; 392: 605-608.
- Equipoa Y, Imai Y, Ozawa K, Kataoka A, Ikeda T, Soda M *et al.* Pael receptor induces death of dopaminergic neurons in the substantia nigra via endoplasmic reticulum stress and dopamine toxicity, which is enhanced under condition of parkin inactivation. Hum Mol Genet 2007; 16: 50-60.
- Klebe S, Lossos A, Azzedine H, Mundwiller E, Sheffer R, Gaussen M *et al.* KIF1A missense mutations in SPG30, an autosomal recessive spastic paraplegia: distinct phenotypes according to the nature of the mutations. Eur J Hum Genet. 2012; 20: 645-649.
- Klein C, Chuang R, Marras C, Lang AE. The curious case of phenocopies in families with genetic Parkinson's disease. Mov Disord 2011; 26: 1793-1802.
- Klein C, Lahmann Hedrich K, Rogaeve E, Schlossmacher MG, Lang A. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. Lancet Neurol 2007; 6: 652-662.
- Ko HS, Kim SW, Sriram SR, Dawson VL, Dawson TM. Identification of far upstream element-binding protein-1 as an authentic Parkin substrate. J Biol Chem 2006; 281: 16193-16196.
- Ko HS, von Coelln R, Sriram SR, Kim SW, Chung KK, Pletnikova O, Troncoso J *et al.* Accumulation of the authentic parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death. J Neurosci 2005; 25: 7968-7978.
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. Cell 1999; 96: 635-644.
- Konakova M, Huynh DP, Yong W, Pulst SM. Cellular distribution of torsin A and torsin B in normal human brain. Arch Neurol 2001; 58: 921-927.

- Konstantinova IM, Tsimokha AS, Mittenberg AG. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int Rev Cell Mol Biol* 2008; 267: 59-124.
- Kontkanen O, Törönen P, Lakso M, Wong G, Castrén E. Antipsychotic drug treatment induces differential gene expression in the rat cortex. *J Neurochem* 2002; 83: 1043-1053.
- Kordower JH, Kanaan NM, Chu Y, Suresh Babu R, Stansell J 3rd, Terpstra BT *et al.* Failure of proteasome inhibitor administration to provide a model of Parkinson's disease in rats and monkeys. *Ann Neurol* 2006; 60: 264-268.
- Kowall NW, Hantraye P, Brouillet E, Beal MF, McKee AC, Ferrante RJ. MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport*. 2000; 11: 211-213.
- Krendel M, Zenke FT, Bokoch GM. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 294-301.
- Krishnan M, Lapierre LA, Knowles BC, Goldenring JR. Rab25 regulates integrin expression in polarized colonic epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2013; 24: 818-831.
- Krüger R, Kuhn W, Leenders KL, Sprengelmeyer R, Müller T, Woitalla D *et al.* Familial parkinsonism with synuclein pathology: clinical and PET studies of A30P mutation carriers. *Neurology* 2001; 56: 1355-1362.
- Kulichkova VA, Tsimokha AS, Fedorova OA, Moiseeva TN, Bottril A, Lezina L *et al.* 26S proteasome exhibits endoribonuclease activity controlled by extra-cellular stimuli. *Cell Cycle* 2010; 9: 840-849
- Kumar A. An overview of nested genes in eukaryotic genomes. *Eukaryot Cell* 2009; 8: 1321-1329.
- Laird NM, Lange C. *The Fundamentals of Modern Statistical Genetics.* Springer-Verlag Nueva York. 2011. Págs 15-30.
- Lander ES The new genomics: global views of biology. *Science* 1996; 274: 536-539.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219: 979-980.
- Lao O, Lu TT, Nothnagel M, Junge O, Freitag-Wolf S, Caliebe A *et al.* Correlation between genetic and geographic structure in Europe. *Curr Biol* 2008; 18: 1241-1248.
- Lautier C, Goldwurm S, Dürr A, Giovannone B, Tsiaras WG, Pezzoli G *et al.* Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 822-833.

- Lee C, Schwartz MP, Prakash S, Iwakura M, Matouschek A. ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. *Mol Cell* 2001; 7: 627-637.
- Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* 2012; 441: 523-540.
- Lee M, Hyun D, Halliwell B, Jenner P. Effect of the overexpression of wild-type or mutant alpha-synuclein on cell susceptibility to insult. *J Neurochem* 2001; 76: 998-1009.
- Lee Y, Karuppagounder SS, Shin JH, Lee YI, Ko HS, Swing D *et al.* Parthanatos mediates AIMP2-activated age-dependent dopaminergic neuronal loss. *Nat Neurosci.* 2013; 16: 1392-400.
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E *et al.* The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 395: 451-452.
- Lewontin R, Kojima K. The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. *Evolution* 1960, 14:458-472.
- Lewontin RC. The interaction of selection and linkage. General considerations; heterotic models. *Genetics* 1964, 49: 49-67.
- Li X, Su V, Kurata WE, Jin C, Lau AF. A novel connexin43-interacting protein, CIP75, which belongs to the UbL-UBA protein family, regulates the turnover of connexin43. *J Biol Chem* 2008; 283: 5748-5759.
- Li XP, Xie WJ, Zhang Z, Kansara S, Jankovic J, Le WD. A mechanistic study of proteasome inhibition-induced iron misregulation in dopamine neuron degeneration. *Neurosignals* 2012; 20: 223-236
- Liggins AP, Brown PJ, Asker K, Pulford K, Banham AH. A novel diffuse large B-cell lymphoma-associated cancer testis antigen encoding a PAS domain protein. *Br J Cancer* 2004; 91: 141-149.
- Lill CM, Roehr JT, McQueen MB, Kavvoura FK, Bagade S, Schjeide BM *et al.* Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet.* 2012; 8: e1002548
- Lim KL, Chew KC, Tan JM, Wang C, Chung KK, Zhang Y *et al.* Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: implications for Lewy body formation. *J Neurosci* 2005; 25: 2002-2009.
- Lin PI, Vance JM, Pericak-Vance MA, Martin ER. No gene is an island: the flip-flop phenomenon. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 531-538.
- Lindersson E, Beedholm R, Højrup P, Moos T, Gai W, Hendil KB, Jensen PH. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *J*

- Biol Chem 2004; 279: 12924-12934.
- Liu W, Vives-Bauza C, Acín-Peréz R, Yamamoto A, Tan Y, Li Y *et al.* PINK1 defect causes mitochondrial dysfunction, proteasomal deficit and alpha-synuclein aggregation in cell culture models of Parkinson's disease. *PLoS One* 2009; 4: e4597.
- Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT Jr. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 2002; 111: 209-218.
- López M, Guerrero J, Yescas P, Boll MC, Familiar I, Ochoa A *et al.* Apolipoprotein E epsilon4 allele is associated with Parkinson disease risk in a Mexican Mestizo population. *Mov Disord* 2007; 22: 417-420.
- Lorenzo-Betancor O, Samaranch L, García-Martín E, Cervantes S, Agúndez JA, Jiménez-Jiménez FJ *et al.* LINGO1 gene analysis in Parkinson's disease phenotypes. *Mov Disord* 2011; 26: 722-727.
- Lotharius J, Barg S, Wiekop P, Lundberg C, Raymon HK, Brundin P. Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. *J Biol Chem.* 2002; 277: 38884-38894.
- Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -sinucleína. *Nat Rev Neurol* 2002; 3: 932-942.
- Löwe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 1995; 268: 533-539.
- Lucchini RG, Albin E, Benedetti L, Borghesi S, Coccaglio R, Malara EC *et al.* High prevalence of Parkinsonian disorders associated to manganese exposure in the vicinities of ferroalloy industries. *Am J Ind Med* 2007; 50: 788-800.
- Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T *et al.* Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 2000; 342: 1560-1567.
- Lupas A, Baumeister W, Hofmann K. A repetitive sequence in subunits of the 26S proteasome and 20S cyclosome (anaphase-promoting complex). *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 195-196.
- Mahen B. Personal genomes: the case of the missing heritability. *Nature* 2008; 456: 18-21.
- Malsam J, Kreye S, Söllner TH. Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 2814-2832
- Mancuso M, Filosto M, Oh SJ, Di Mauro S. A novel polymerase gamma mutation in a family with ophthalmoplegia, neuropathy, and

- Parkinsonism. *Arch Neurol* 2004; 61: 1777-1779.
- Manning-Bog AB, Reaney SH, Chou VP, Johnston LC, McCormack AL, Johnston J *et al.* Lack of nigrostriatal pathology in a rat model of proteasome inhibition. *Ann Neurol* 2006; 60: 256-260.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ *et al.* Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009; 461: 747-753.
- Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Kruger R, *et al.* Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 2006; 296: 661-670.
- Maraganore DM, de Andrade M, Lesnick TG, Strain KJ, Farrer MJ, Rocca WA *et al.* High-resolution whole-genome association study of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 685-693.
- Marchini J, Howie B, Myers S, McVean G, Donnelly P. A new multipoint method for genome-wide association studies via imputation of genotypes. *Nature Genetics* 2007; 39: 906-913.
- Martínez HR, González-González H, Cantú-Martínez L, Rangel-Guerra R, Hernández-Castillo CD, Vergara-Saavedra JJ *et al.* PARKIN-coding polymorphisms are not associated with Parkinson's disease in a population from northeastern Mexico. *Neurosci Lett* 2010; 468: 264-266.
- Martínez Suárez MN, Blázquez Menes B. Estimación de la prevalencia de la enfermedad de Parkinson en Asturias, España. Un estudio farmacoepidemiológico de consumo de antiparkinsonianos. *Rev Neurol* 2000; 31: 1001-1006.
- Martínez-Vicente M, Talloczy Z, Kaushik S, Massey AC, Mazzulli J, Mosharov EV *et al.* Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest* 2008; 118: 777-788.
- Marx FP, Holzmann C, Strauss KM, Li L, Eberhardt O, Gerhardt E *et al.* Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1223-1231.
- Marx FP, Soehn AS, Berg D, Melle C, Schiesling C, Lang M *et al.* The proteasomal subunit S6 ATPase is a novel synphilin-1 interacting protein—implications for Parkinson's disease. *FASEB J* 2007; 21: 1759-1767.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A *et al.* Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science*

- 2000; 287: 1265-1269.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Sagara Y, Mallory M, Hashimoto M, Mucke L. Beta-amyloid peptides enhance alpha-synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 12245-12250.
- Mata IF, Hutter CM, González-Fernández MC, de Pancorbo MM, Lezcano E *et al*. LRRK2 R1441G-related Parkinson's disease: evidence of a common founding event in the seventh century in Northern Spain. *Neurogenetics* 2009; 10: 347-353.
- Mata IF, Ross OA, Kachergus J, Huerta C, Ribacoba R, Moris G *et al*. LRRK2 mutations are a common cause of Parkinson's disease in Spain. *Eur J Neurol* 2006; 13: 391-394.
- Mata IF, Shi M, Agarwal P, Chung KA, Edwards KL, Factor SA *et al*. SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. *Arch Neurol* 2010; 67: 1350-1366.
- Mata IF, Taylor JP, Kachergus J, Hulihan M, Huerta C, Lahoz C *et al*. LRRK2 R1441G in Spanish patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2005; 382: 309-311.
- Mata IF, Yearout D, Alvarez V, Coto E, de Mena L, Ribacoba R *et al*. Replication of MAPT and SNCA, but not PARK16-18, as susceptibility genes for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011; 26: 819-823.
- Matilla A, Gorbea C, Einum DD, Townsend J, Michalik A, van Broeckhoven C *et al*. Association of ataxin-7 with the proteasome subunit S4 of the 19S regulatory complex. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2821-2831.
- Matiuhin Y, Glickman HM. Ubiquitin and ubiquitination: an overview of the ubiquitin-proteasome system for protein degradation. En Di Napoli D, Wójcik C (ed). *The ubiquitin proteasome system in the central nervous system: from physiology to pathology*. Nueva York 2007. Nova Medical Books. Pág 41-70.
- Matsumine, H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, Tanaka H, Ishikawa A, Nakagawa-Hattori Y *et al*. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 588-596.
- McCormack AL, Di Monte DA. Effects of L-dopa and other amino acids against paraquat-induced nigrostriatal degeneration. *J Neurochem* 2003; 85: 82-86.
- McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev*

- 1990; 70: 391-425
- McNaught KS, Björklund LM, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW. Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats. *Neuroreport* 2002b; 13: 1437-1441.
- McNaught KS, Mytilineou C, Jnobaptiste R, Yabut J, Shashidharan P, Jennert P, Olanow CW. Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *J Neurochem* 2002a; 81: 301-306.
- McNaught KS, Olanow CW. Proteasome inhibitor-induced model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006; 60: 243-247.
- McNaught KS, Olanow CW. Reply. *Ann Neurol* 2009; 65: 485.
- McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; 56: 149-162.
- McNaught KSP, Jenner P. Proteasomal function is impaired in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2001; 297: 191-194.
- Meehan S, Knowles TP, Baldwin AJ, Smith JF, Squires AM, Clements P *et al.* Characterisation of amyloid fibril formation by small heat-shock chaperone proteins human alphaA-, alphaB- and R120G alphaB-crystallins. *J Mol Biol* 2007; 372: 470-484.
- Mena L, Cardo LF, Coto E, Miar A, Díaz M, Corao AI *et al.* FGF20 rs12720208 SNP and microRNA-433 variation: no association with Parkinson's disease in Spanish patients. *Neurosci Lett* 2010; 479: 22-25.
- Meijide Pardo A. Contribución de los catalanes al desarrollo de la industria pesquera de Vigo. *Anuario de Vigo* 1969; 29: 9-15.
- Melicoff E, Sansores-García L, Gómez A, Moreira DC, Datta P, Thakur P *et al.* Synaptotagmin-2 controls regulated exocytosis but not other secretory responses of mast cells. *J Biol Chem.* 2009; 284: 19445-19451.
- Michelakakis H, Xiromerisiou G, Dardiotis E, Bozi M, Vassilatis D, Kounta PM *et al.* Evidence of an association between the scavenger receptor class B member 2 gene and Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27: 400-405.
- Michiorri S, Gelmetti V, Giarda E, Lombardi F, Romano F, Marongiu R *et al.* The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy. *Cell Death Differ.* 2010; 17: 962-974.
- Mills RD, Mulhern TD, Cheng HC, Culvenor JG. Analysis of *LRRK2* accessory repeat domains: prediction of repeat length, number and

- sites of Parkinson's disease mutations. *Biochem Soc Trans* 2012; 40: 1086-1089.
- Mittelsteadt T, Seifert G, Álvarez-Barón E, Steinhäuser C, Becker AJ, Schoch S. Differential mRNA expression patterns of the synaptotagmin gene family in the rodent brain. *J Comp Neurol* 2009; 512: 514-528.
- Miwa H, Kubo T, Suzuki A, Nishi K, Kondo T. Retrograde dopaminergic neuron degeneration following intrastriatal proteasome inhibition. *Neurosci Lett* 2005; 380: 93-98.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451: 1069-1075.
- Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 2005; 28: 57-87.
- Morán JM, Castellanos-Pinedo F, Casado-Naranjo I, Durán-Herrera C, Ramírez-Moreno JM, Gómez M *et al.* Prevalencia de las mutaciones P.G2019S y R1441 de *LRRK2* en pacientes con enfermedad de Parkinson en Extremadura, España. *Rev Neurol* 2010; 50: 591-594.
- Mori H, Kondo T, Yokochi M, Matsumine H, Nakagawa-Hattori Y, Miyake T *et al.* Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* 1998; 51:890-892.
- Muangpaisan W, Mathews A, Hori H, Seidel D. A systematic review of the worldwide prevalence and incidence of Parkinson's disease. *J Med Assoc Thai* 2011; 94: 749-755.
- Mueller JC, Fuchs J, Hofer A, Zimprich A, Lichtner P, Illig T *et al.* Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005; 57: 535-541.
- Muñoz E, Obach V, Oliva R, Martí MJ, Ezquerro M, Pastor P *et al.* Alpha1-antichymotrypsin gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. *Neurology* 1999; 52: 297-301.
- Muñoz E, Tolosa E, Pastor P, Martí MJ, Valldeoriola F, Campdelacreu J, Oliva R. Relative high frequency of the c.255delA parkin gene mutation in Spanish patients with autosomal recessive parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 73: 582-584.
- Muñoz-Soriano V, Paricio N. Overexpression of Septin 4, the *Drosophila* homologue of human CDCrel-1, is toxic for dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 3150-3158.
- Murakami T, Shoji M, Imai Y, Inoue H, Kawarabayashi T, Matsubara E *et al.* Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; 55: 439-442.

- Nakayama KI, Nakayama K. Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16: 323-333.
- Nalls MA, Plagnol V, Hernández DG, Sharma M, Sheerin UM, Saad M, Simón-Sánchez J *et al.* Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet* 2011; 377: 641-649
- Nam KT, Lee HJ, Smith JJ, Lapierre LA, Kamath VP, Chen X *et al.* Loss of Rab25 promotes the development of intestinal neoplasia in mice and is associated with human colorectal adenocarcinomas. *J Clin Invest* 2010; 120: 840-849
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 2008; 183: 795-803.
- Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J *et al.* PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 2010; 8: e1000298.
- Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH *et al.* Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain* 2009; 132: 1783-1794.
- Nichols WC, Kissell DK, Pankratz N, Pauciulo MW, Elsaesser VE, Clark KA *et al.* Variation in *GIGYF2* is not associated with Parkinson disease. *Neurology* 2009; 72: 1886-1892.
- Nikoskelainen EK, Marttila RJ, Huoponen K, Juvonen V, Lamminen T, Sonninen P, Savontaus ML. Leber's "plus": neurological abnormalities in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 59: 160-164.
- Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003; 348: 1356-1364.
- Nuytemans K, Rademakers R, Theuns J, Pals P, Engelborghs S, Pickut B *et al.* Founder mutation p.R1441C in the leucine-rich repeat kinase 2 gene in Belgian Parkinson's disease patients. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 471-479
- Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *PARK7*, and *LRRK2* genes: a mutation update. *Hum Mutat* 2010; 31: 763-780.
- Oh K, Sun Bang O, Chung CA. Diversity and cellular function of deubiquitinating enzymes. En Di Napoli D, Wójcik C (ed). *The ubiquitin proteasome system in the central nervous system: from physiology to*

- pathology. Nueva York 2007. Nova Medical Books. Pág 71-92.
- Olanow CW, McNaught K. Parkinson's disease, proteins, and prions: milestones. *Mov Disord*. 2011; 26: 1056-1071.
- Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KS. Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol* 2004; 3: 496-503.
- Olzmann JA, Li L, Chudaev MV, Chen J, Perez FA, Palmiter RD, Chin LS. Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6. *J Cell Biol* 2007; 178: 1025-1038.
- Orlowski M, Cardozo C, Michaud C. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* 1993; 32: 1563-1572.
- Paisán-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J *et al*. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004; 44: 595-600.
- Pallarés MC. Aportes externos a la población de Galicia durante la Edad Media. En Carracedo A, Pereira G (Eds). *Xenética e historia do Noroeste Peninsular*. Consello da Cultura Galega. Santiago de Compostela 2005. Págs 97-120.
- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Murrell J, Rudolph A *et al*. Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2599-608.
- Pankratz N, Wilk JB, Latourelle JC, DeStefano AL, Halter C, Pugh EW *et al*. Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Hum Genet* 2009; 124: 593-605.
- Park HY, Yea SS, Jang WH, Chung JY, Lee SK, Kim SJ *et al*. Kinesin superfamily KIF1A protein binds to synaptotagmin XI. *Koren J Anat* 2005; 38: 403-411.
- Pastor P, Muñoz E, Ezquerra M, Obach V, Martí MJ, Valldeoriola F *et al*. Analysis of the coding and the 5' flanking regions of the alpha-synuclein gene in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2001; 16: 1115-1119.
- Paulson L, Martin P, Persson A, Nilsson CL, Ljung E, Westman-Brinkmalm A *et al*. Comparative genome- and proteome analysis of cerebral cortex from MK-801-treated rats. *J Neurosci Res* 2003; 71: 526-533.
- Pawlyk AC, Giasson BI, Sampathu DM, Perez FA, Lim KL, Dawson VL *et al*.

- Novel monoclonal antibodies demonstrate biochemical variation of brain parkin with age. *J Biol Chem* 2003; 278: 48120-48128.
- Payton JE, Perrin RJ, Woods WS, George JM. Structural determinants of PLD2 inhibition by alpha-synuclein. *J Mol Biol* 2004; 337: 1001-1009.
- Pérez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 2002; 22: 3090-3099.
- Petit F, Jarrousse AS, Dahlmann B, Sobek A, Hendil KB, Buri J *et al.* Involvement of proteasomal subunits zeta and iota in RNA degradation. *Biochem J* 1997; 326: 93-98.
- Petrucelli L, O'Farrell C, Lockhart PJ, Baptista M, Kehoe K, Vink L *et al.* Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron* 2002; 36: 1007-1019.
- Pickart CM. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 544-548.
- Pihlstrøm L, Axelsson G, Bjørnarå KA, Dizdar N, Fardell C, Forsgren L *et al.* Supportive evidence for 11 loci from genome-wide association studies in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2013; 34: 1708.e7-1708.e13.
- Plowey ED, Cherra SJ 3rd, Liu YJ, Chu CT. Role of autophagy in P.G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 2008; 105: 1048-1056.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-2047.
- Pritchard JK. Are Rare Variants Responsible for Susceptibility to Complex Diseases? *Am J Hum Genet* 2001; 69: 124-137.
- Proukakis C, Dudzik CG, Brier T, MacKay DS, Cooper JM, Millhauser GL *et al.* A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology* 2013; 80: 1062-1064.
- Przedborski S. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. En Jankovic J, Tolosa E (ed). *Parkinson's disease & movement disorders*. Lippicott, Williams & Wilkins. Filadelfia 2007. Pág 77-92.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, White LE. *Neuroscience*. Sinauer. Sunderland, MA, EUA 2013. 5ª edición. Capítulo 1. Studying the nervous system. Págs 1 – 24.
- Ramírez-Jirano LJ, Ruiz-Sandoval JL, Jiménez-Gil FJ, Ramírez-Vega J, Vargas-Frutos E, Gallegos-Arreola MP. Frecuencia del polimorfismo IVS4+66A-G en el gen alfa-sinucleína en pacientes con enfermedad de

- Parkinson del noroccidente de México. *Rev Neurol* 2007; 44: 15-17.
- Ramírez-Jirano LJ, Ruiz-Sandoval JL, Jiménez-Gil FJ, Ramírez-Vega J, Vargas-Frutos E, Gallegos-Arreola MP. Polimorfismo -116C-G del gen α -sinucleína en pacientes con enfermedad de Parkinson. *Salud Publica Mex* 2006; 48: 289-290.
- Realini C, Rogers SW, Rechsteiner M. KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors. *FEBS Lett* 1994; 348: 109-113.
- Rechsteiner M, Realini C, Ustrell V. The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* 2000; 345: 1-15.
- Reich DE, Schaffner SF, Daly MJ, McVean G, Mullikin JC, Higgins JM *et al*. Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. *Nat Genet* 2002; 32: 135-142.
- Ren Y, Zhao J, Feng J. Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci*. 2003; 23: 3316-3324.
- Rey Castelao O. Movimientos migratorios en Galicia, en Eiras Roel A (coord) Migraciones internas y media distancia en la Península Ibérica, 1500-1900. Vol II. Xunta de Galicia. Santiago, 1994. Págs 85-130.
- Rhodes SL, Sinsheimer JS, Bordelon Y, Bronstein JM, Ritz B. Replication of GWAS associations for *GAK* and *MAPT* in Parkinson's disease. *Ann Hum Genet* 2011; 75: 195-200.
- Richy FF, Pietri G, Moran KA, Senior E, Makaroff LE. Compliance with pharmacotherapy and direct healthcare costs in patients with Parkinson's disease: a retrospective claims database analysis. *Appl Health Econ Health Policy* 2013; 11: 395-406.
- Rideout HJ, Stefanis L. The Neurobiology of LRRK2 and its Role in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Neurochem Res* 2014; 39: 576-592.
- Riedinger C, Boehringer J, Trempe JF, Lowe ED, Brown NR, Gehring K *et al*. Structure of Rpn10 and its interactions with polyubiquitin chains and the proteasome subunit Rpn12. *J Biol Chem* 2010; 285: 33992-34003.
- Riley BE, Xu Y, Zoghbi HY, Orr HT. The effects of the polyglutamine repeat protein ataxin-1 on the UbL-UBA protein A1Up. *J Biol Chem* 2004; 279: 42290-42301.
- Roggero CM, De Blas GA, Dai H, Tomes CN, Rizo J, Mayorga LS. Complexin/synaptotagmin interplay controls acrosomal exocytosis. *J Biol Chem* 2007; 282: 26335-26343
- Rosenzweig R, Osmulski PA, Gaczynska M, Glickman MH. The central unit within the 19S regulatory particle of the proteasome. *Nat Struct Mol*

- Biol 2008; 15: 573-580.
- Ross OA, Soto-Ortolaza AI, Heckman MG, Aasly JO, Abahuni N, Annesi G *et al.* Association of *LRRK2* exonic variants with susceptibility to Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* 2011; 10: 898-908.
- Ross OA, Wu YR, Lee MC, Funayama M, Chen ML, Soto AI, Mata IF *et al.* Analysis of *Lrrk2* R1628P as a risk factor for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2008; 64: 88-92.
- Salas A, Comas D, Lareu MV, Bertranpetit J, Carracedo A. mtDNA analysis of the Galician population: a genetic edge of European variation. *Eur J Hum Genet* 1998; 6: 365-375.
- Salas Ausens JA. Inmigrantes en una tierra de emigración: extranjeros en Galicia en la segunda mitad del siglo XVIII. *Obradoiro de Historia Moderna* 2004; 13: 163-193.
- Samaranch L, Lorenzo E, Pastor MA, Riverol M, Luquin MR, Rodríguez-Oroz MC *et al.* Analysis of the *GIGYF2* gene in familial and sporadic Parkinson disease in the Spanish population. *Eur J Neurol* 2010: 321-325.
- Schapira AH, Cleeter MW, Muddle JR, Workman JM, Cooper JM, King RH. Proteasomal inhibition causes loss of nigral tyrosine hydroxylase neurons. *Ann Neurol* 2006; 60: 253-255.
- Schapira AH, Mann VM, Cooper JM, Dexter D, Daniel SE, Jenner P *et al.* Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1990; 55: 2142-2145.
- Schmidt K, Wolfe DM, Stiller B, Pearce DA. Cd²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ and Se²⁺ toxicity to *Saccharomyces cerevisiae* lacking YPK9p the orthologue of human ATP13A2. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 383: 198-202.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e57.
- Schulz JB, Falkenburger BH. Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 2004; 318: 135-147.
- Seijo-Martínez M, Castro del Río M, Rodríguez Álvarez J, Suárez Prado R, Torres Salgado E *et al.* Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in the Arosa Island (Spain): a community-based door-to-door survey. *J Neurol Sci* 2011; 304: 49-54.
- Sha D, Chin LS, Li L. Phosphorylation of parkin by Parkinson disease-linked kinase PINK1 activates parkin E3 ligase function and NF-kappaB

- signaling. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 352-363.
- Sharma M, Ioannidis JP, Aasly JO, Annesi G, Brice A, Van Broeckhoven C *et al.* Large scale replication and heterogeneity in Parkinson disease genetic loci. *Neurology* 2012; 79: 659-667.
- Sharma M, Mueller JC, Zimprich A, Lichtner P, Hofer A, Leitner P *et al.* The sepiapterin reductase gene region reveals association in the PARK3 locus: analysis of familial and sporadic Parkinson's disease in European populations. *J Med Genet* 2006; 43: 557-562.
- Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH *et al.* Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2003; 23: 10756-10764.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S *et al.* Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; 25: 302-305.
- Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R *et al.* Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 2001; 293: 263-269.
- Shin JH, Ko HS, Kang H, Lee Y, Lee YI, Pletinkova O *et al.* PARIS (ZNF746) repression of PGC-1 α contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell* 2011; 144: 689-702.
- Shore GC, Papa FR, Oakes SA. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol* 2011; 23: 143-149.
- Shulman JM, de Jager P, Feany MB. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2011; 6: 193-222.
- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER *et al.* Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2009; 361: 1651-1661.
- Sidhu A, Wersinger C, Vernier P. Alpha-Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *FEBS Lett* 2004; 565: 1-5.
- Silventoinen K. Determinants of variation in adult body height. *J Biosoc Sci* 2003; 35: 263-285.
- Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, Atorino L, Dallapiccola B, Valente EM, Casari G. Mitochondrial import and enzymatic activity of *PINK1* mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet* 2005;14: 3477-3492.
- Simón-Sánchez J, Martí-Massó JF, Sánchez-Mut JV, Paisán-Ruiz C, Martínez-Gil A, Ruiz-Martínez J. Parkinson's disease due to the R1441G

- mutation in Dardarin: a founder effect in the Basques. *Mov Disord* 2006; 21: 1954-1959.
- Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D *et al*. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* 2009; 41: 1308-1312.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J *et al*. Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 841.
- Sixel-Döring F, Liepe K, Mollenhauer B, Trautmann E, Trenkwalder C *et al*. The role of 123I-FP-CIT-SPECT in the differential diagnosis of Parkinson and tremor syndromes: a critical assessment of 125 cases. *J Neurol* 2011; 258: 2147-2154.
- Smith WW, Pei Z, Jiang H, Moore DJ, Liang Y, West AB *et al*. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18676-18681.
- Snyder H, Mensah K, Theisler C, Lee J, Matouschek A, Wolozin B. Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *J Biol Chem* 2003; 278: 11753-11759.
- Sobrinho B, Brion M, Carracedo A. SNP in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int* 2005; 154: 181-194.
- Socal MP, Emmel VE, Rieder CR, Hilbig A, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB. Intrafamilial variability of Parkinson phenotype in SCAs: novel cases due to SCA2 and SCA3 expansions. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15: 374-378.
- Sonuga-Barke EJ, Lasky-Su J, Neale BM, Oades R, Chen W, Franke B *et al*. Does parental expressed emotion moderate genetic effects in ADHD? An exploration using a genome wide association scan. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; 147B: 1359-1368.
- Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Mosc)* 2009; 74: 1411-1442.
- Sotiriou S, Gibney G, Baxevas AD, Nussbaum RL. A single nucleotide polymorphism in the 3'UTR of the SNCA gene encoding alpha-synuclein is a new potential susceptibility locus for Parkinson disease. *Neurosci Lett* 2009; 461: 196-201.
- Spencer B, Potkar R, Trejo M, Rockenstein E, Patrick C, Gindi R *et al*. Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the

- neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J Neurosci* 2009; 29: 13578-13588.
- Squitti R, Gorgone G, Panetta V, Lucchini R, Bucossi S, Albini E *et al*. Implications of metal exposure and liver function in Parkinsonian patients resident in the vicinities of ferroalloy plants. *J Neural Transm* 2009; 116: 1281-1287.
- Staropoli JF, McDermott C, Martinat C, Schulman B, Demireva E, Abeliovich A. Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron* 2003; 37: 735-749.
- Storey JD and Tibshirani R. Statistical significance for genome-wide experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 9440-9445.
- Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D *et al*. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2099-2111.
- Su V, Nakagawa R, Koval M, Lau AF. Ubiquitin-independent proteasomal degradation of endoplasmic reticulum-localized connexin43 mediated by CIP75. *J Biol Chem* 2010; 285: 40979-40990.
- Südhof TC. Synaptotagmins: why so many? *J Biol Chem* 2002; 277: 7629-7632.
- Sullivan PF, Purcell S. Analyzing genome-wide association study data: a tutorial using PLINK. En Neale BM, Ferreira MAR, Medland SE, Posthuma D (Eds). *Statistical Genetics: Gene Mapping Through Linkage and Association*. Taylor & Francis Group. Nueva York 2008. Págs 355-394.
- Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Schumacker PT. The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neuroscience* 2011; 198: 221-231.
- Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Takahashi K, Ariga H. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 2004; 5: 213-218.
- Tan EK, Lin CH, Tai CH, Tan LC, Chen ML, Li R *et al*. Non-synonymous GIGYF2 variants in Parkinson's disease from two Asian populations. *Hum Genet* 2009; 126: 425-430.
- Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, Shimbara N, Hendil KB, Tanaka K. Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 2000; 275: 14336-14345.
- Taniuchi K, Cerny RL, Tanouchi A, Kohno K, Kotani N, Honke K *et al*.

- Overexpression of GalNAc-transferase GalNAc-T3 promotes pancreatic cancer cell growth. *Oncogene* 2011; 30: 4843-4854.
- Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M *et al.* Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 866-872.
- Tehrani R, Montoya SE, Van Laar AD, Hastings TG, Pérez RG. Alpha-synuclein inhibits aromatic amino acid decarboxylase activity in dopaminergic cells. *J Neurochem* 2006; 99: 1188-1196.
- Thibodeau PH, Corboy MJ, Wgley WC. Aggresome formation: a failure in the ubiquitin proteasome system. En Di Napoli D, Wójcik C (ed). *The ubiquitin proteasome system in the central nervous system: from physiology to pathology*. Nueva York 2007. Nova Medical Books. Pág 241-270.
- Tsai YC, Fishman PS, Thakor NV, Olyer GA. Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function. *J Biol Chem* 2003; 278: 22044-22055.
- Ullrich O, Grune T. Proteasomal degradation of oxidatively damaged endogenous histones in K562 human leukemic cells. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 887-893.
- Um JW, Im E, Lee HJ, Min B, Yoo L, Yoo J *et al.* Parkin directly modulates 26S proteasome activity. *J Neurosci* 2010; 30: 11805-11814.
- Urrea Gales V, Calle Rosingana ML. Detección de interacciones genéticas asociadas a enfermedades complejas. Aplicación al cáncer de vejiga. Trabajo de fin de máster. Máster en Estadística e Investigación Operativa. Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Facultad de Matemáticas y Estadística. Universidad Politécnica de Barcelona. Febrero 2009
- Ustrell V, Hoffman L, Pratt G, Rechsteiner M. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J* 2002; 21: 3516-3525.
- Uversky VN. A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. *J Biomol Struct Dyn* 2003; 21: 211-234.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304: 1158-1160.
- Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M *et al.* Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset

- parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 895-900.
- van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, Barbieri S, Mistl C, Danner S *et al.* Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci.* 2000; 20: 6021-6029.
- Venda LL, Cragg SJ, Buchman VL, Wade-Martins R. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 2010; 33: 559-568.
- Venkateshappa C, Harish G, Mythri RB, Mahadevan A, Bharath MM, Shankar SK. Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: implications for Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2012; 37: 358-369.
- Visscher PM, Hill WG, Wray NR. Heritability in the genomics era—concepts and misconceptions. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 255-266.
- Visscher PM, McEvoy B, Yang J. From Galton to GWAS: quantitative genetics of human height. *Genet Res (Camb)* 2010; 92: 371-379.
- Vives-Bauza C, Przedborski S. Mitophagy: the latest problem for Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 2011; 17: 158-165.
- Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J *et al.* PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 378-383.
- Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 23542-23556.
- Voight BF, Pritchard JK. Confounding from cryptic relatedness in case-control association studies. *PLoS Genet* 2005; 1: e32
- von Poser C, Ichtchenko K, Shao X, Rizo J, Südhof TC. The evolutionary pressure to inactivate. A subclass of synaptotagmins with an amino acid substitution that abolishes Ca^{2+} binding. *J Biol Chem* 1997; 272: 14314-14319.
- Wahl C, Kautzmann S, Krebiehl G, Strauss K, Voitalla D, Müller T *et al.* A comprehensive genetic study of the proteasomal subunit S6 ATPase in German Parkinson's disease patients. *J Neural Transm* 2008; 115: 1141-1148
- Wakabayashi K, Engelender S, Yoshimoto M, Tsuji S, Ross CA, Takahashi H. Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2000; 47: 521-523.
- Wang CT, Grishanin R, Earles CA, Chang PY, Martin TF, Chapman ER,

- Jackson MB. Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science* 2001; 294: 1111-1115.
- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* 2003; 278: 25009-25013.
- Weihofen A, Thomas KJ, Ostaszewski BL, Cookson MR, Selkoe DJ. Pink1 forms a multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry* 2009; 48: 2045-2052.
- Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 169-78.
- West AB, Lockhart PJ, O'Farrell C, Farrer MJ. Identification of a novel gene linked to parkin via a bi-directional promoter. *J Mol Biol* 2003; 326: 11-19.
- West AB, Moore DJ, Choi C, Andrabi SA, Li X, Dikeman D *et al.* Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 223-232.
- Wider C, Vilarinho-Güell C, Jasinska-Myga B, Heckman MG, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA *et al.* Association of the MAPT locus with Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2010; 17: 483-486.
- Wildefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* 2011; 26: S1-S58.
- Williams DR, Hadeed A, al-Din AS, Wreikat AL, Lees AJ. Kufor Rakeb disease: autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia. *Mov Disord* 2005; 20: 1264-1271.
- Winslow AR, Chen CW, Corrochano S, Acevedo-Arozena A, Gordon DE, Peden AA *et al.* α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J Cell Biol* 2010; 190: 1023-1037.
- Woelk T, Sigismund S, Penengo L, Polo S. The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div* 2007; 2: 11.
- Wójcik C, de Martino G. Structure and function of the 20S proteasomes. En Di Napoli D, Wójcik C (ed). *The ubiquitine proteasome system in the central nervous system: from physiology to pathology*. Nueva York 2007. Nova Medical Books. Pág 137-157.
- Wójcik C, Schroeter D, Wilk S, Lamprecht J, Paweletz N. Ubiquitin-

- mediated proteolysis centers in HeLa cells: indication from studies of an inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Eur J Cell Biol* 1996; 71: 311-318.
- Xie W, Li X, Li C, Zhu W, Jankovic J, Le W. Proteasome inhibition modeling nigral neuron degeneration in Parkinson's disease. *J Neurochem* 2010; 115: 188-199.
- Xilouri M, Vogiatzi T, Vekrellis K, Park D, Stefanis L. Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLoS One* 2009; 4: e5515.
- Xiong H, Wang D, Chen L, Choo YS, Ma H, Tang C *et al.* Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest* 2009; 119: 650-660.
- Yamanaka K, Vande Velde C, Eymard-Pierre E, Bertini E, Boespflug-Tanguy O, Cleveland DW. Unstable mutants in the peripheral endosomal membrane component ALS2 cause early-onset motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 16041-16046.
- Yang J, Benyamin B, McEvoy BP, Gordon S, Henders AK, Nyholt DR *et al.* Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nat Genet* 2010; 42: 565-569.
- Yang Y, Nishimura I, Imai Y, Takahashi R, Lu B. Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron* 2003 Mar; 37: 911-924.
- Yao T, Cohen RE. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 2002; 419: 403-407.
- Yeo H, Kim HW, Mo J, Lee D, Han S, Hong S *et al.* Developmental expression and subcellular distribution of synaptotagmin 11 in rat hippocampus. *Neuroscience* 2012; 225: 35-43.
- Yokota H, Tsujita T, Okazaki Y, Kikuya E, Oishi M. Polymorphic 33-bp repeats with promoter-like activity in synaptotagmin 11 gene. *DNA Res* 2003; 10: 287-289.
- Yonekawa Y, Harada A, Okada Y, Funakoshi T, Kanai Y, Takei Y *et al.* Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice. *J Cell Biol* 1998; 141: 431-441.
- Yoon TY, Shin YK. Progress in understanding the neuronal SNARE function and its regulation. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 460-469.
- Yoshino H, Tomiyama H, Tachibana N, Ogaki K, Li Y, Funayama M *et al.* Phenotypic spectrum of patients with *PLA2G6* mutation and PARK14-linked parkinsonism. *Neurology* 2010; 75: 1356-1361.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I *et*

- al.* The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004; 55: 164-173.
- Zeng BY, Bukhatwa S, Hikima A, Rose S, Jenner P. Reproducible nigral cell loss after systemic proteasomal inhibitor administration to rats. *Ann Neurol* 2006; 60: 248-252.
- Zhang L, Shimoji M, Thomas B, Moore DJ, Yu SW, Marupudi NI *et al.* Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2063-2073.
- Zhang X, Rizo J, Südhof TC. Mechanism of phospholipid binding by the C2A-domain of synaptotagmin I. *Biochemistry* 1998; 37: 12395-12403.
- Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 13354-13359.
- Zhang Y, Ni J, Zhou G, Yuan J, Ren W, Shan Y *et al.* Cloning, expression and characterization of the human NOB1 gene. *Mol Biol Rep* 2005; 32: 185-189.
- Zhang ZX, Román GC. Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an updated review. *Neuroepidemiology* 1993; 12: 195-208.
- Zhao T, De Graaff E, Breedveld GJ, Loda A, Severijnen LA, Wouters CH *et al.* Loss of nuclear activity of the FBX07 protein in patients with parkinsonian-pyramidal syndrome (PARK15). *PLoS One* 2011; 6: e16983.
- Zimprich A, Benet-Pagès A, Struhal W, Graf E, Eck SH, Offman MN *et al.* A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 168-175.
- Zimprich A, Müller-Myhsok B, Farrer M, Leitner P, Sharma M, Hulihan M *et al.* The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 11-19.
- Ziviani E, Tao RN, Whitworth AJ. Drosophila parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 5018-5023.
- Zondervan KT. Genetic association study design. En Zeggini E, Morris A. *Analysis of complex disease association studies. A practical guide.* Elsevier. San Diego 2011. Págs 25-48

Zong C, Gomes AV, Drews O, Li X, Young GW, Berhane B *et al.* Regulation of murine cardiac 20S proteasomes: role of associating partners. *Circ Res* 2006; 99: 372-380.





