



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

TESIS

PROGRAMA DE MAGISTER DE NEUROCIENCIA

TITULO DE LA TESIS

Evaluación de las modificaciones epigenéticas en pacientes con enfermedad de Parkinson y antecedentes de exposición a metales.

INVESTIGADOR RESPONSABLE

Castillo	González	Sebastián Andrés	16335201-k
APELLIDO PATERNO	APELLIDO MATERNO	NOMBRES	RUT

Santa Laura, La Ramada número 1845

DIRECCIÓN PARA ENVIO DE CORRESPONDENCIA (CALLE, N°, DEPTO., COMUNA)

Curicó			
CIUDAD	CASILLA	TELÉFONO	FAX

sebacast@me.com	
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO	
Universidad de Chile	
INSTITUCIÓN	FIRMA INVESTIGADOR(A) RESPONSABLE

Fecha Aprobación Proyecto de Tesis:

12/11/2014

Fecha Presentación del Informe:

11/04/2015

Juan Segura-Aguilar

Director tesis

Alumno: Sebastián Castillo G

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.

Al doctor Juan Segura Aguilar por recibirme en su laboratorio y brindarme el apoyo para completar el proceso de mi magister, a mis compañeros de laboratorio sin los cuales hubiera sido imposible concretar mi tesi. En especial a mi pareja (Nicole G) la cual me acompaño y apoyo en cada paso de esta empresa.

INDICE

1. Portada	Página 1
2. Dedicatoria y agradecimientos	Página 3
3. Indice	Página 3
4. Resumen	Página 4
5. Abstract	Página 5
6. Introducción	Página 6
7. Hipotesis	Página 10
8. Población a estudiar y tamaño muestral	Página 15
9. Criterios de Inclusión y exclusión	Página 18
10. Metodología (extracción del DNA y cuantificación)	Página 20
11. Evaluación de Metilaciones Globales	Página 24
12. Evaluación del estado de metilación de SNCA	Página 37
13. Discusión y conclusión	Página 44
14. Bibliografía	Página 47

Mención Neurociencias

RESUMEN:

La epigenética como ciencia se dedica al estudio de la regulación de la transcripción de genes determinados, que está dada sin alteración en la secuencia de las bases nitrogenadas, siendo esta regulación marcas mitótica y meióticamente heredables. Diversas enfermedades han demostrado alteraciones en los patrones de metilación y por ende implicancia ambiental en la génesis de una patología determinada, entre estas encontramos el síndrome de Rett, Síndrome ATRX, Síndrome X frágil, e incluso publicaciones recientes han demostrado modificaciones epigenéticas en la patogenia del Alzheimer y el Parkinson.

En este contexto y dada la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas en nuestro país, y en especial de la enfermedad de Parkinson en la población chilena, es primordial evaluar la influencia ambiental que provoca la contaminación por metales en las modificaciones transcripcionales de genes puntuales y de significancia patológica y de cómo estos repercuten en la incidencia del Parkinson.

Para esto se ha seleccionado una población minera del norte de nuestro país, en donde se ha descrito una gran incidencia y agregación de pacientes con enfermedad de Parkinson, los cuales comparten un factor ambiental en común: El haber estado expuestos a metales.

Mi proyecto de tesis implica evaluar las diferencias en los patrones de metilación globales por medio de anticuerpos específicos para citosinas metiladas, analizando 4 grupos de trabajo: Pacientes parkinsonianos expuestos a contaminantes (trabajadores mineros), pacientes sanos expuestos a metales (trabajadores mineros), pacientes parkinsonianos sin exposición (muestras obtenidas de pacientes de Santiago) y pacientes sanos sin exposición (controles sanos de Santiago). Con esto se espera encontrar un espectro de metilación desde la muestra más metilada, (el control negativo, paciente sano sin exposición), hasta las muestras menos metiladas (pacientes parkinsonianos expuestos a metales).

Posteriormente se analizará el gen alfa-sinucleina (SNCA), el cual se ha descrito hipometilado en pacientes con Parkinson Idiopático (Ahmad Jowaed, 2010). Para esto se desarrollarán partidores específicos, tanto para muestras metiladas como no metiladas. Posteriormente se someterán tanto partidores como muestras a la secuenciación por bisulfito para posteriormente amplificar las muestras mediante PCR.

Abstract

We studied the role of epigenetic changes on the high incidence of Parkinson's disease (PD) in Antofagasta neighborhoods, a Chilean city built for exclusive use of mining companies. A significant decrease in global DNA methylation was observed in PD patients compared to controls, without significant difference in those directly exposed to metal mining, neither in patients nor controls. Compared with Santiago, there was no significant difference between PD patients from both cities, however controls in Santiago had significantly lower levels of DNA methylation than in Antofagasta. The alpha-synuclein gene was 80 and 100% demethylated in PD patients from both cities.

• INVESTIGACIÓN PROPUESTA:

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo frecuente, con una prevalencia estimada de 160/100.000, llegando hasta a un 4% de la población sobre los 80 años de edad. Del total de los parkinsonianos el Parkinson Idiopático representa el 70%. El 30% restante se denomina como parkinsonismo producido por metales, pesticidas, fármacos etc.

La marca patológica característica de la EP es la pérdida neuronal a nivel de sustancia nigra, específicamente a nivel de la Pars compacta. De hecho se ha detectado por medio de

estudios cadavéricos, hasta un 50-70% de pérdida neuronal en pacientes con enfermedad de Parkinson.

Los síntomas clásicos de la enfermedad (bradicinesia, temblor de reposo, rigidez en rueda dentada e inestabilidad postural) sólo se manifiestan cuando se ha perdido el 70-90% de las neuronas dopaminérgicas en la Pars compacta de la sustancia nigra (Braak H, 2006).

Aunque la mayor parte de los casos de EP son esporádicos, existen alteraciones de genes puntuales que han sido asociadas con la patogenia de la enfermedad. Hasta el momento los genes más importantes en la patogenia de esta enfermedad son; α -sinucleína (SNCA), ubiquitina, parkin (PRKN), LRRK 2, PINK 1 y DJ-1 (Ahmad Jowaed, 2010) (Eliezer Masliah, 2013) (Davie, 2008).

Hasta el momento, aún no es posible identificar con claridad la causa primaria subyacente que explique los diversos mecanismos moleculares identificados con la patogenia de la EP. Existen diversas etiologías propuestas, entre las que encontramos tanto factores moleculares endógenos: Disfunción de α -sinucleína, aminocromo, etc., como factores ambientales: Exposición a pesticidas, preservadores de madera, metales (Irmgard Paris, 2011). Los metales identificados que podrían tener un rol en la degeneración de neuronas dopaminérgicas serían: El magnesio, el cobre y el hierro (Kevin J Barnham, 2008) (Irmgard Paris, 2011).

Las manifestaciones clínicas de la toxicidad por manganeso están dadas por su daño focal a nivel de ganglios basales. Una breve exposición a manganeso incrementa las especies reactivas de oxígeno, lo cual afecta la membrana mitocondrial e induce con esto la muerte de neuronas dopaminérgicas (Raja Settivari, 2009).

El cobre por su parte; es un cofactor importante para el funcionamiento intracerebral de diversas enzimas. La acumulación y la deficiencia de cobre están asociadas a distintos desórdenes neurodegenerativos (Daniel Strausak, 2001). El cobre induce e incrementa el estrés oxidativo, generando daño en el DNA y la activación de P53, trayendo consigo la muerte celular. El hierro es esencial para la vida ya que forma parte de la hemoglobina, citocromos y

enzimas, pero también se asocia a los procesos neurogenerativos como la agregación proteica, generación de radicales libres y el estrés oxidativo.

El rol del hierro en la patogenia del Parkinson ha sido extensamente estudiado y soportado por el hallazgo de acúmulos de hierro en las regiones cerebrales afectadas en la enfermedad. Como se expuso previamente, en la enfermedad de Parkinson son conocidas las alteraciones moleculares generadas por la exposición prolongada a contaminantes, en este caso metales. Lo que queda por dilucidar es si estos metales generan modificaciones en la transcripción de genes puntuales, campo que surge luego del nacimiento de la epigenética.

Epigenética

El termino epigenética fue acuñado por Conrad Waddington en el año 1942, siendo inicialmente definida como la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus producto, dando lugar a un fenotipo determinado (Waddington, 1942). Las primeras apariciones de la epigenética en la literatura datan de mediados del siglo XIX, aunque los orígenes del concepto pueden encontrarse ya en Aristóteles.

Actualmente el concepto de epigenética implica el estudio de cómo se regula la transcripción de genes por mecanismos distintos a la alteración en la secuencia de las bases nitrogenadas, siendo estas regulaciones marcas heredables, las cuales serían determinadas por condicionantes ambientales.

El ADN esta constituido por nucleótidos, los que a su vez están conformados por un azúcar, una base nitrogenada y un fosfato. Es la base nitrogenada que los conforma, la que diferencia un nucleótido de otro. Existen cinco tipos de bases nitrogenadas: Adenina (A), Guanina (G), Tiamina (T), Citosina (C) y Uracilo (U). El orden o secuencia de las bases nitrogenadas en las regiones del genoma que codifican para un gen determinado (“codificantes”), determina la naturaleza de las proteínas. En las regiones denominadas “reguladoras” el orden de las bases nitrogenadas define con precisión cómo la maquinaria transcripcional y traduccional reconocerá y procesará esta información contenida en las regiones codificantes.

Todo el material genético debe ser transcrito para poder expresar una proteína determinada. Por medio de este proceso las secuencias de interés son copiadas en una molécula con una naturaleza química similar, el ARN. En este proceso juegan un papel relevante las secuencias reguladoras o factores de transcripción, de tal forma que se posibilita la formación y el acceso de la maquinaria transcripcional a las secuencias de ADN de interés. La accesibilidad de un gen a estos factores de transcripción, es lo que determina la expresión de una proteína determinada. En otras palabras, la expresión de un gen determinado, es regulada por la accesibilidad de este, lo cual está condicionado por las modificaciones o marcas epigenéticas. Por tanto no sólo las alteraciones en la secuencias de bases nitrogenadas afectan la expresión de un gen, sino también sus modificaciones epigenéticas.

El ADN puede estar sujeto a distintas marcas epigenéticas, como por ejemplo: Metilación/hidroxi-metilación de los dinucleótidos de citosina-guanina, acetilación de las lisinas de las histonas, entre otras. Si consideramos que la definición actual de marca epigenética implica que esta sea mitótica o meióticamente heredable, la principal modificación epigenética estudiable correspondería a las metilaciones/hidroxi-metilaciones de los dinucleótidos de citosina/guanina.

La metilación del ADN puede modular la transcripción de genes a través de dos mecanismos: El impedimento físico de la unión de factores transcripcionales al promotor y la unión al ADN metilado de proteínas que a su vez reclutarán otras enzimas remodeladoras de la cromatina, que podrían modificar las histonas y formar estructuras inactivas o silentes de cromatina. De forma macro, los estados hipermetilados se han relacionado con una inhibición de la transcripción, y los estados hipometilados con una inestabilidad cromosomal y mutaciones (Howard Cedar, 2009).

Desde el auge de la epigenética, han surgido distintas dudas con respecto a la forma mediante la cual se miden las modificaciones epigenéticas. El principal problema fue cómo se correlacionaban las mediciones realizadas a partir de muestras de DNA extraído desde la sangre periférica (principalmente DNA de linfocitos) con su correlativo a nivel neuronal. Este tema tan controversial ha sido afrontado recientemente, analizando mediante microarreglos muestras de DNA extraídas desde cortes cerebrales, con el fin de compararlas con las muestras

de DNA extraído desde muestras sanguíneas. Los resultados fueron alentadores, encontrándose una alta correlación entre ambas muestras (Christoph Bock, 2006) (Eliezer Masliah, 2013).

Enfocándonos en la enfermedad de Parkinson, han sido diversos los intentos para determinar modificaciones en los patrones de metilación de los genes reconocidos como causales del origen de la patología. Recientemente se ha publicado una lista de los genes hipermetilados e hipometilados evaluados por medio de microarreglos y confirmado por medio de PCR cuantitativa. Entre los patrones más consistentes, encontramos hipermetilación de KCTD5, VAV2, MOG, TRIM10, PARK7 entre otros, e hipometilación de SNCA, DNAJA, JAKMIP3, FRK, LRRC27 (Eliezer Masliah, 2013).

Dado los antecedentes previamente descritos y la implicancia que puede llegar a tener el ambiente sobre la manifestación de una enfermedad determinada, es de vital importancia correlacionar la patogenia del Parkinson a la exposiciones a metales, no sólo desde el punto de vista molecular, sino también desde las modificaciones a nivel de genes puntuales y alteraciones de los patrones de metilación.

α -Sinucleína y Enfermedad de Parkinson

En la patogenia y en las alteraciones moleculares de la enfermedad de Parkinson podemos encontrar depósitos de estructuras intracelulares (eosinófilas compuestas de proteínas) llamadas cuerpos de Lewy. Estas inclusiones de 8-30 nm de diámetro, de ubicación perinuclear, están conformadas por diversos componentes tales como: Proteínas del citoesqueleto, del sistema ubiquitin-proteásico y de shock térmico. El mayor compuesto que compone los cuerpos de Lewy son homopolímeros fibrilares de una proteína citoplasmática llamada α -sinucleína. α -sinucleína es una proteína citoplasmática de 140 aminoácidos, que se expresa en todo el sistema nervioso central. Esta proteína monomérica se ubica en terminales nervioso pre sinápticos, asociada a la membrana con una conformación preferentemente de hélice- α (Robert Bussell, 2001) ó en el citoplasma con conformación de ovrillo siendo considerada nativamente desplegada (Paul H. Weinreb, 1996). La exacta función de esta proteína es desconocida, aunque evidencia reciente sugiere que interactuaría directamente con lípidos y

con la membrana tanto de forma fisiológica como patológica. Se ha demostrado que bajo ciertas condiciones, los agregados de α -sinucleína son altamente tóxicos para la neurona y que la agregación de la α -sinucleína está relacionada con neurodegeneración. Estas inclusiones provocan una disminución en la cantidad de terminales dopaminérgicos en el núcleo estriado y déficit motor en ratones (Eliezer Masliah, 2013) (He-Jin Lee, 2004). Las evidencias sugieren que los agregados de α -sinucleína que inducen toxicidad no son las fibras, sino estructuras oligoméricas posiblemente precursoras de las fibras, llamadas protofibras (Maria Grazia Spillantini, 1998) (Paul H. Weinreb, 1996).

Es poco claro el mecanismo tóxico de los oligómeros sobre la célula. Los oligómeros de α -sinucleína pueden agregarse entre sí y formar estructuras tipo anillo, lo que no se ha observado para la forma monomérica o fibrilar. Estas estructuras pueden incorporarse en las membranas y formar poros (Mark D. Shtilerman, 2002) (Michael J. Volles and Peter T. Lansbury, 2002) e incluso romper paredes de organelos celulares (Pavan K. Auluck, 2002)

En cuanto al gen SNCA y su metilación, se ha demostrado que existe hipometilación en la enfermedad de Parkinson idiopático, (Ahmad Jowaed, 2010) (San-xi Ai a, 2013). Esto aún no se logra repetir en enfermedad de Parkinson por exposición a metales. La hipometilación del gen SNCA aumentaría su expresión, y esta sobreexpresión llevaría al “secuestro” de la DNA metiltransferasa 1 en una posición extranuclear (DNMT1) conllevando a la posterior mantención de este estado de hipometilación.

Lo interesante en este caso, sería correlacionar alteraciones de la metilación de SNCA, en pacientes con antecedentes de exposición directa a metales.

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

1. Los pacientes con enfermedad de Parkinson que presentan antecedentes de exposición ambiental directa a metales y salitre, presentan hipometilación del DNA en comparación a sus controles sanos, la cual estaría mediada por el gen de SNCA.

OBJETIVO(S):

Generales

- Determinar diferencias en los patrones de metilación global y del gen SNCA en muestras de DNA de individuos que padecen o no la enfermedad Parkinson, que por su actividad laboral han sido expuestos o no a contaminación directa por metales.

Específicos

- Reclutar los sujetos y tomar las muestras
- Determinar grado de metilación global de cada muestra
- Diseñar partidores específicos para la evaluación del estado de metilación de SNCA
- Determinar el estado de metilación de los alelos del gen SNCA para cada muestra obtenida.
- Determinar si hay diferencias significativas en los grados de metilación global y del gen SNCA entre los distintos grupos estudiados.

MATERIALES

- De Merck Co., NJ., EEUU., se obtuvo: El etanol absoluto, el metanol absoluto.
- De Invitrogen Co., CA., EEUU., se obtuvo: El cloruro de magnesio, el EDTA sal disódica 2-hidrato y Platinum TaqPCRx DNA Polymerase.
- De BioRad Laboratories, Inc., PA., EEUU., se obtuvo: El Tween 20.

- De New England Biolabs Inc., MA., EEUU., se obtuvo: La enzima Metiltransferasa SssI
- De Winkler Ltda., Santiago, Chile, se obtuvo: La agarosa.
- De Zymo Research, EZ DNA Methylation Lighting Kit, DNA Clean & Concentrator - 5 Kit.
- De Epigentek, Methylamp Global DNA Methylation Quantification Ultra Kit.
- De E.Z.N.A, se utilizó el Tissue DNA Kit (D3396-02).

Análisis y estadísticas

Para el análisis y los gráficos del proyecto se utilizarán los programas SPSS, Graphpad.

Primero: Para analizar que existen diferencias entre los porcentajes de metilacion intergrupo vs intragrupo, se realizará un análisis de varianza ANOVA. El test de ANOVA evalúa las diferencias de las medias de una variable cuantitativa y nos entrega informacion de esta, ya sea en su análisis intragrupal como intergrupar. Si al realizar la prueba ANOVA se obtiene un valor de significacion menor a 0.05, se rechaza la hipótesis nula de que las medias de todos los grupos comparados son similares. Lo siguiente que queda por analizar, es en cuál de estos grupos se producen las diferencias y como estas se correlacionan unas con otras.

T de Tukey:

El Test HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey es un test de comparaciones múltiples. Permite comparar las medias de los t niveles de un factor después de haber rechazado la Hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA.

PLAN DE TRABAJO:

Tiempo estimado total Para el proyecto: 10-12 meses

Carta Gantt

Objetivos			Tiempo (en meses)											
	Pasos específicos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a. Recolección de muestras y selección de pacientes			■	■										
b. Extracción y purificación de la muestras de DNA	Extracción de DNA				■									
	Concentración de los preparados					■								
c. Evaluación de patrones de metilación	Globales	Se utilizará el kit Methylamp Global DNA Methylation Quantification Ultra					■	■						
	Genes específicos (SNCA)	Diseño de partidores							■					
		Estandarización de la Técnica								■	■			
		Evaluación de patrones de metilación de genes específicos entre las muestras										■	■	
d. Recolección de datos y finalización del proyecto														■

- **RECURSOS DISPONIBLES:**

Recurso Humano

- **Investigador titular:** Médico Cirujano en proceso de obtención grado de Magíster Neurociencias.
- **Investigadores asociados:** Alumna de doctorado de Farmacología, Doctor en Farmacología

Equipamiento científico disponible

- Termociclador
- Real Time PCR
- Nano Drop
- Centrífuga
- Insumos para extracción de muestras
- HPLC
- Espectrofotómetro acoplado a PC
- Baño termostático con agitador
- Cámaras de electroforesis de DNA en gel de agarosa y poliacrilamida
- Pipetas y puntas
- Kit para concentrar DNA: DNA Clean & Concentrator -5 Kit (catalog No; D4003s).
- Fuente de emisión UV para visualizar tinción con bromuro de etidio
- Balanza analítica, Medidor de pH

Otros

- Suscripción a revistas (otorgados por VPN Universidad de Chile)
- Conexión a Internet
- Sigma Plot (licenciados)
- Prizma (licenciados)
- Refrigeradores y Freezer a -20°C , computadores, scanner e impresora láser de alta resolución.
- SPSS (licenciado)

Bioseguridad:

En el caso de reactivos usados en técnicas bioquímicas que tengan alguna indicación de toxicidad, se procederá según los principios generales indicados en el Manual de Normas de Bioseguridad de CONICYT (1994), en lo que tienen relación con su manipulación durante los ensayos y su posterior eliminación.

Consentimiento Informado

Dado que muchas de las muestras utilizadas se obtendrán desde proyectos previos, no existe posibilidad alguna de modificar el consentimiento informado, dado que sería imposible que esta modificación fuera aceptada por el comité de ética.

Enfermedad de Parkinson (EP) y Pakinsonismo: Estudios de Polimorfismo relacionados con el metabolismo de Dopamina

FICHA CONTROL SANO

NOMBRE.....

...Teléfono.....

RUT.....EDAD.....Grupo

Sanguineo.....

Dirección.....Co

muna.....

Hospital o

consulta.....

Fecha de Toma de

muestra.....

Médico

Tratante.....Fono.....

ANTECEDENTES

- Antecedentes familiares de Parkinson Consanguíneo

No Si

En caso positivo indique Parentesco

Indique Médico que trató a este

paciente.....

Su diagnóstico.....Edad de

inicio.....

Enfermedades.....

.....

Medicamentos que toma o ha tomado.....

Exposición a tóxicos laborales, ambientales, de consumo (pesticidas, minerales, marihuana, cocaína, pegamentos, plásticos, etc)

Agricultura Si No
¿Cuál?.....

Minería Si No
¿Cuál?.....

Industria Si No
¿Cuál?.....

Drogas Si No
¿Cuál?.....

Consentimiento informado

YO.....
.....RUT.....Doy mi consentimiento para que se me extraiga una muestra de sangre de 10 ml para un importante estudio que busca la causa de la enfermedad de Parkinson. Este estudio se realizará en el programa de farmacología molecular y clínica de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Juan Segura-Aguilar y en colaboración con médicos neurólogos de este y otras universidades o centros médicos.

Firma
Paciente.....Fecha.....
.....

METODOLOGÍA:

a. Selección de pacientes y extracción de muestras

En esta primera etapa; a pesar de que la organización original preveía un viaje a la ciudad de Antofagasta con el objetivo de seleccionar y extraer nuevas muestras; por un tema de planificación, se determinó utilizar las muestras disponibles en el laboratorio de neurofarmacología de la Universidad de Chile. A los preparados disponibles se les sometió a

tamizaje en base a los criterios de selección descritos (**Tabla 1**). Las muestras disponibles se clasificaron en seis grupos: Pacientes con enfermedad de Parkinson de la ciudad de Antofagasta con antecedentes de exposición directa a metales (PAED), pacientes con enfermedad de Parkinson de la ciudad de Antofagasta sin antecedentes de exposición directa (PA), controles sanos de Antofagasta con antecedentes de exposición directa a metales (CAED), controles sanos de Antofagasta sin antecedentes de exposición directa (CA), pacientes con enfermedad de Parkinson de Santiago (PDS), controles sanos de Santiago (CS). En el caso de aquellos que requirieran el antecedente anamnésico de exposición directa a metales, se evaluó los antecedentes disponibles y en los casos que correspondía, se corroboró esta información vía telefónica. Se definió como exposición ambiental directa a aquellos pacientes que presentaran antecedentes de trabajo en minas o salitreras.

En Chile se estima que existe una prevalencia de la enfermedad de Parkinson cercana a 1.9 pacientes por 100.000 habitantes, lo cual aproximadamente correspondería a 40.000 pacientes (Pedro Chaná C., 2013). Considerando que del total de pacientes con enfermedad de Parkinson, aproximadamente el 2-4% es provocado por metales, el tamaño muestral estimado es de 29 pacientes, el cual fue calculado mediante la siguiente fórmula:

Cálculo del Tamaño Muestral

$$n = \frac{z^2 pq}{B^2}$$

Donde n= Tamaño de la muestra,

z= 1,96 para el 95% de confianza, 2,56 para el 99%

p= Frecuencia esperada del factor a estudiar

q= 1- p

B= Precisión o error admitido

Tabla 1 : Criterios de inclusión – exclusión

Paciente de Antofagasta con enfermedad de Parkinson y exposición ambiental a contaminantes y/o metales	Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	
	Paciente de Antofagasta	Enfermedad de Alzheimer u otra patología demenciante diagnosticada o sospechada mediante anamnesis, independiente del inicio de esta patología en relación al diagnóstico de la enfermedad de Parkinson.	
	Antecedentes de exposición ambiental a contaminantes y/o metales	Antecedentes sólidos para sospechar enfermedad de Parkinson familiar	
	Enfermedad de Parkinson diagnosticada por médico especialista	Tratamiento con drogas neurolépticas	
		Antecedentes de cáncer en remisión o en tratamiento	Antecedentes de quimio o radioterapia
		Síndrome de Rett	Síndrome de ATRX
		Síndrome de X frágil	Síndrome de Beckwith/Wiedemann
		Síndromes de Prader/Willi/Angelman	
Paciente de Antofagasta con enfermedad de Parkinson sin exposición ambiental a contaminantes y/o metales	Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	
	Paciente de Antofagasta	Enfermedad de Alzheimer u otra patología demenciante diagnosticada o sospechada mediante anamnesis, independiente del inicio de esta patología en relación al diagnóstico de la enfermedad de Parkinson.	
	Enfermedad de Parkinson diagnosticada por médico especialista	Antecedentes sólidos para sospechar enfermedad de Parkinson familiar	
		Tratamiento con drogas neurolépticas	Antecedentes de cáncer en remisión o en tratamiento
		Antecedentes de quimio o radioterapia	Antecedentes de exposición laboral a metales
		Síndrome de Rett	Síndrome de ATRX
		Síndrome de X frágil	Síndrome de Beckwith/Wiedemann
		Síndromes de Prader/Willi/Angelman	
Paciente de Antofagasta sano con exposición ambiental a contaminantes y/o metales	Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	
	Paciente de Antofagasta	Enfermedad de Alzheimer u otra patología demenciante diagnosticada o sospechada mediante anamnesis, independiente del inicio de esta patología en relación al diagnóstico de la enfermedad de Parkinson.	
	Antecedentes de exposición laboral a metales	Antecedentes sólidos para sospechar enfermedad de Parkinson familiar	
	Sin enfermedades diagnosticadas	Tratamiento con drogas neurolépticas	
	Antecedentes de cáncer en remisión o en tratamiento	Antecedentes de quimio o radioterapia	
	Enfermedad de Parkinson diagnosticada por médico especialista	Síndrome de Rett	
	Síndrome de ATRX	Síndrome de X frágil	
	Síndromes de Beckwith/Wiedemann Síndromes de Prader/Willi/Angelman		

Paciente de Antofagasta sano sin exposición ambiental a contaminantes y/o metales	Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	
	Paciente de Antofagasta	Enfermedad de Alzheimer u otra patología demenciante diagnosticada o sospechada mediante anamnesis, independiente del inicio de esta patología en relación al diagnóstico de la enfermedad de Parkinson.	
	Sin enfermedades diagnosticadas	Antecedentes sólidos para sospechar enfermedad de Parkinson familiar	
		Tratamiento con drogas neurolépticas	Antecedentes de cáncer en remisión o en tratamiento
		Antecedentes de quimio o radioterapia	Enfermedad de Parkinson diagnosticada por médico especialista
		Antecedentes de exposición laboral a metales	Síndrome de Rett
		Síndrome de X frágil	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
		Síndrome de Prader-Willi/Angelman	
		Síndrome de X frágil	
		Síndrome de Beckwith-Wiedemann	
		Síndromes de Prader-Willi/Angelman	
Paciente de Santiago con enfermedad de Parkinson sin exposición ambiental a contaminantes y/o metales	Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	
	Paciente de Santiago	Enfermedad de Alzheimer u otra patología demenciante diagnosticada o sospechada mediante anamnesis, independiente del inicio de esta patología en relación al diagnóstico de la enfermedad de Parkinson.	
	Enfermedad de Parkinson diagnosticada por médico especialista	Antecedentes sólidos para sospechar enfermedad de Parkinson familiar	
		Tratamiento con drogas neurolépticas	Antecedentes de cáncer en remisión o en tratamiento
		Antecedentes de exposición laboral a metales	Síndrome de Rett
		Síndrome de X frágil	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
		Síndrome de Prader-Willi/Angelman	
		Síndrome de X frágil	
		Síndrome de Beckwith-Wiedemann	
Paciente de Santiago sano sin exposición ambiental a contaminantes y/o metales	Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	
	Paciente de Santiago	Enfermedad de Alzheimer u otra patología demenciante diagnosticada o sospechada mediante anamnesis, independiente del inicio de esta patología en relación al diagnóstico de la enfermedad de Parkinson.	
	Sin enfermedades diagnosticadas	Antecedentes sólidos para sospechar enfermedad de Parkinson familiar	
		Tratamiento con drogas neurolépticas	Antecedentes de cáncer en remisión o en tratamiento
		Enfermedad de Parkinson diagnosticada por médico especialista	Antecedentes de exposición laboral a metales
		Antecedentes de exposición laboral a metales	Síndrome de Rett
		Síndrome de X frágil	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
		Síndrome de Prader-Willi/Angelman	
		Síndrome de X frágil	
		Síndrome de Beckwith-Wiedemann	
		Síndromes de Prader-Willi/Angelman	

Considerando lo anterior, en base al cálculo del tamaño poblacional y a los criterios de inclusión y exclusión, se extrajo (en una primera etapa) el DNA de: 52 controles sanos de la ciudad de Antofagasta, 45 pacientes con enfermedad de Parkinson de la ciudad de Antofagasta, 59 controles sanos de la ciudad de Santiago y 52 pacientes con enfermedad de Parkinson de la ciudad de Santiago. De los pacientes con enfermedad de Parkinson de Antofagasta, 2 presentaban sólo un Síndrome Parkinsoniano, en 1 caso existía sospecha de enfermedad de Parkinson familiar, y del resto de los pacientes, 8 presentaban antecedentes de exposición directa a metales y minerales (principalmente cobre y salitre). Los pacientes 507, 533, 534, 535, 536, 537, 538 y 539 habían trabajado directamente en una mina o salitrera. Los 34 pacientes restantes si bien no presentaban antecedentes directos de exposición, todos ellos vivían en una población minera. De los controles sanos de Antofagasta 8 presentaban antecedentes de exposición directa a metales o minerales (6 trabajaron como mineros y 2 trabajaron dentro de una mina como conductores. Estos corresponden a los controles 1216, 1223, 1225, 1228, 1229, 1236, 1238 y 1243). Con respecto al resto de los 42 controles sanos, todos vivían en una población minera. Una de estas muestras no pudo ser utilizada dado que no existía el consentimiento informado.

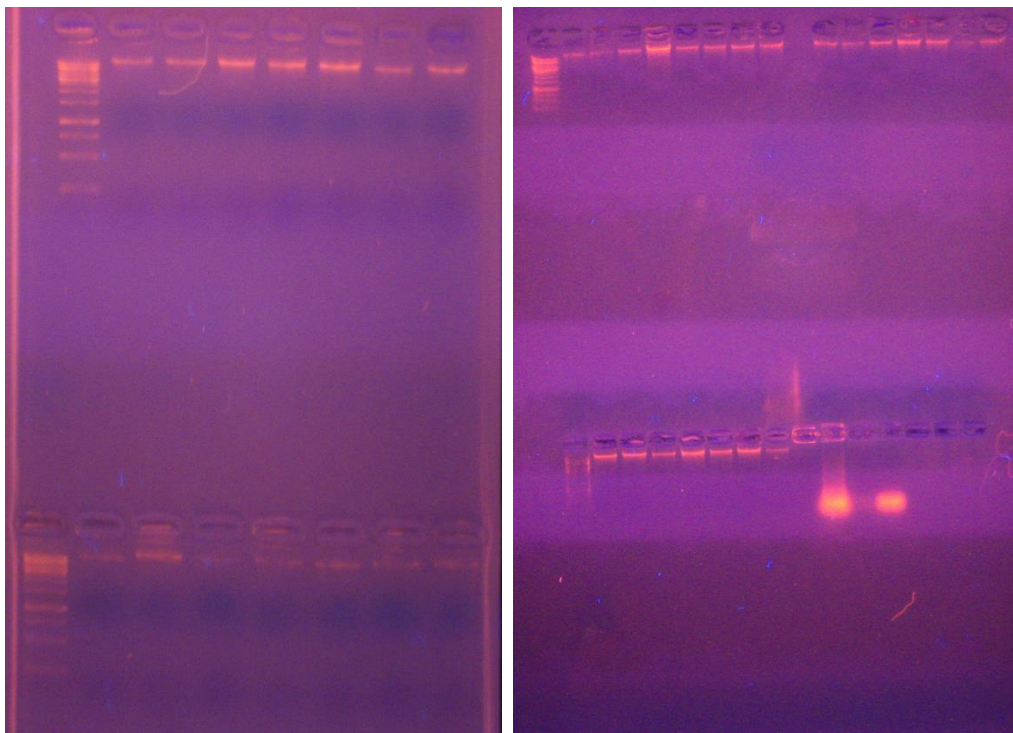
b. Extracción de DNA

De todas las muestras seleccionadas, se encontraba disponible aproximadamente 250-500 cc de sangre por paciente. Por ende se determinó utilizar el kit Tissue DNA Kit (D3396-02, EZNA), el cual pese a no conseguir concentraciones altas de DNA (50-100 ng/ul), permite extraer DNA desde muestras de sangre menores a 1 ml. La clave de este sistema es la nueva matriz HiBind, la cual se une de forma específica pero reversible al ADN o RNA, bajo condiciones óptimas que permiten remover proteínas y otros contaminantes. Los ácidos nucleicos se eluyen fácilmente con agua desionizada o un tampón de baja salinidad. Luego cada muestra de DNA obtenida se verificó por medio de electroforesis de DNA en un gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio.

Dada la forma de conservación de las muestras, (tubos heparinizados en temperaturas menores a 20°C), y lo antiguo de la mayoría de las muestras (las mas antiguas datan del año 1997), la calidad de la extracción de DNA fue en muchos casos pobre y deficiente, lo cual se aprecia en el siguiente gel de agarosa (**Figura N°1**).

Figura N° 1 (Suplementaria)

Fotos de geles



Evaluación cualitativa de la extracción de DNA desde muestras de sangre.

Se cargó 10 uL de DNA más 2 uL de Buffer de Carga en gel de Acrilamida al 1%. La barra superior de cada columna corrobora la calidad de la extracción, nótese la pobre extracción de algunas muestras debido a la degeneración del DNA.

Por lo cual, en muchos de estos casos (según la disponibilidad del material) se debió repetir la extracción del DNA modificando el volumen de Buffer de elución, desde utilizar 250 ul en un primer intento, a sólo llevar a un volumen final de 150 ul con Buffer de elución. Si bien en muchos de estos casos se logró una evaluación cualitativa aceptable de las muestras, dos problemas surgieron en este punto: Primero: disminuyó de forma considerable el volumen final de la mayoría de las muestras, por lo cual muchas de estas no podrían ser utilizadas para los dos experimentos a realizar. Segundo: A pesar de la nueva extracción, muchas de estas muestras no alcanzaron las concentraciones necesarias, por lo cual se debió realizar una etapa adicional concentrando el DNA por el medio del KIT DNA Clean & Concentrator -5 Kit (catalog No; D4003s), desarrollando el siguiente protocolo:

1. En un tubo de 1.5 ml, adicionar de 2x-5x de DNA Binding Buffer siendo x el volumen de DNA a concentrar.
2. Transferir a la mezcla a una columna de Zymo dentro de un tubo de colección de 1.5 ml.
3. Centrifugar a 13.000 rpm por 30 segundos, descartar el líquido residual.
4. Agregar 200 μ l de DNA Wash Buffer a la columna, centrifugar por 30 segundos.
Repetir este paso.
5. Agregar a la columna 10 μ l de Buffer de elución, dejar incubar por 1 minuto a temperatura ambiental. Centrifugar por 30 segundos.

Todas las muestras que presentaban una correcta evaluación cualitativa (por medio del gel de agarosa) pasaron a la siguiente etapa. En este punto, pese a los intentos realizados, 10 muestras de pacientes con enfermedad de Parkinson de la ciudad de Antofagasta, 12 muestras de controles sanos de la ciudad de Antofagasta, 15 muestras de pacientes con enfermedad de Parkinson de la ciudad de Santiago, y 20 muestras de controles sanos de la ciudad de Santiago, no pudieron ser utilizadas, dado que el volumen inicial de sangre 250 cc permitía sólo una extracción de DNA, y, a pesar de la concentración de este, no alcanzó un nivel óptimo.

Finalmente, dado que el paso siguiente requería una concentración mínima de 100 ng/ μ l por muestra, se debió cuantificar cada una de estas extracciones de DNA por medio de un Nano Drops, el El NanoDrop® ND-1000 es un espectrofotómetro de espectro total (220-750nm) que mide concentraciones con 1 μ l de muestra, con gran exactitud y reproductibilidad. Utiliza la tensión superficial para mantener la muestra en su sitio. La concentración objetivo necesaria es de al menos 50 ng / μ l de muestra. En caso de no obtenerse una buena muestra, dado que las evaluaciones previas solo eran cualitativas mediante gel de agarosa , existían dos opciones: Repetir la extracción de DNA o concentrar la muestra de DNA.

Por ultimo se realizó un cribaje de las muestras, seleccionando solo aquellas de un grupo etario semejante y del sexo masculino (para evitar el sesgo dado por las diferencias en los estados de metilación dadas por la edad y el sexo) .

Por todo lo descrito anteriormente: Dificultades de concentración del DNA y las características etarias determinadas, sólo se procedió al siguiente paso con: 12 muestras de pacientes con enfermedad de Parkinson de la ciudad de Antofagasta, 12 muestras de controles sanos de la

ciudad de Antofagasta, 6 muestras de pacientes con enfermedad de Parkinson de la ciudad de Santiago y 5 muestras de controles sanos de la ciudad de Santiago. En este punto se consideró pertinente volver a viajar a la ciudad de Antofagasta con el fin de extraer preparados nuevos. Esto finalmente fue desechado por dos razones: Primero por dificultades de planificación y económicas, y segundo porque el extraer muestras nuevas nos generaría un sesgo de selección dado que algunos preparados tendrían 17 años de guardado desde la extracción y otras habrían sido extraídas de forma reciente.

Se interrogó vía telefónica a los pacientes o por defecto a los familiares de estos, con respecto a los antecedentes mórbidos personales así como por sus hábitos. (**Tabla 2**):

Tabla 2: Antecedentes mórbidos y hábitos, por grupos de pacientes.

	HTA	DM	TABACO (más de 5 cig/día)	OH (ocasional)
PA	3 (50%)	1 (16%)	2 (33%)	1 (16%)
PAED	2 (33%)	2 (33%)	1 (16%)	1 (16%)
CA	4 (66%)	2 (33%)	1 (16%)	4 (66%)
CAED	2 (33%)	1 (16%)	1 (16%)	2 (33%)
PDS	1 (20%)	1 (20%)	2 (40%)	1 (20%)
CS	3 (60%)	2 (40%)	1 (20%)	3 (60%)

(PAED): Pacientes de Antofagasta con exposición directa

(PA): Pacientes de Antofagasta

(CAED): Controles sanos de Antofagasta con exposición directa

(CA): Controles sanos de Antofagasta

(PDS): Pacientes con enfermedad de Parkinson de Santiago

(CS): Controles sanos de Santiago

Las características etarias de cada grupo de pacientes fueron las siguientes (**Tabla 3**):

Tabla 3: Características etarias por grupo de pacientes

GRUPO DE PACIENTES	NUMERO DE PACIENTES	MEDIA EDAD
PAED	6	66
PA	6	67
CAED	6	64
CA	6	65
PDS	6	64
CS	5	60

(PAED): Pacientes de Antofagasta con exposición directa

(PA): Pacientes de Antofagasta

(CAED): Controles sanos de Antofagasta con exposición directa

(CA): Controles sanos de Antofagasta

(PDS): Pacientes con enfermedad de Parkinson de Santiago

(CS): Controles sanos de Santiago

c. Evaluación de metilaciones globales

Para este paso se utilizó el kit Methylamp Global DNA Methylation Quantification Ultra Kit (Base catalog P-1014B), cuya sensibilidad es de 0,2 ng/ul de muestra metilada. El método utilizado por este kit, es el marcaje de citosinas metiladas por medio de anticuerpos específicos los cuales están asociados a un colorímetro. El kit descrito requería una concentración de DNA óptima de 100 ng/ul, por lo tanto, en todas aquellas muestras que no se logró la concentración requerida se debió realizar un paso adicional de concentración. Posteriormente se efectuó el protocolo previsto por este kit, con pequeñas modificaciones en los tiempos de incubación final. Como control positivo se utilizó el previsto por el Kit, así como también uno obtenido mediante la metilación de una muestra de DNA recientemente extraída, elegida de forma randomizada y procesada por medio de la enzima M. SssI (metiltransferasa) de New englands Biolabs, la cual metila el DNA en un porcentaje superior al 90% añadiendo un grupo metilo a cada residuo de citosina del dinucleotido CG. El protocolo seguido para esto fue el siguiente:

1. Diluir SAM a 1600 uM usando el stock de 32 mM.
 - a. a. 1 ul de SAM 32 mM
 - b. b. 19 ul de agua libre de nucleasas

2. Agregar en orden:
 - a. a. Agregar 14 ul de agua libre de nucleasas
 - b. b. Agregar 2 ul de 10X NEBuffer 2
 - c. c. Diluir SAM del paso 1
 - d. d. 1 ul de DNA gemonico (1 µg)
 - e. e. 1 ul de SssI methylase (4 U/µl)
3. Mezclar, pipetear al menos seis veces
4. Incubar a 37°C por al menos una hora
5. Detener la reacción calentando a 65°C por 20 minutos

Estos controles positivos permitían calcular una curva de concentración de estandarización. El protocolo a seguir con el fin de evaluar las absorbancias de cada muestra con este Kit fue el siguiente:

1. Preparar cada muestra DNA con el fin de obtener la concentración requerida para la ejecución de este Kit.
2. Predeterminar el numero de pocillos a utilizar, remover todos lo que no serán utilizados y almacenar a 4°C.
3. Predeterminar el orden de cada pocillo considerando los pocillos requeridos para el control negativo y los controles positivos.
4. Diluir GU1 con agua destilada en una relación 1:10 (1 ml de GU1 mas 9 ul de agua destilada libre de nucleasas).
5. Agregar 28 ul de GU2 en cada pocillo que será utilizado para cargar las muestras de DNA.
6. Para el control positivo, en el caso de utilizar una curva de estandarización, diluir GU3 con GU2. Agregar 28 ul de GU2, a cada pocillo para después adicionar 2 ul de GU3 en una concentración de 0.4, 1, 2, 5, 10 y 20 ng/por pocillo.
7. Para el control negativo agregar 28 ul de GU2, seguido de 2 ul de DNA para control negativo.
8. Agitar la placa para que la solución cubra la totalidad del pocillo.
9. Incubar la placa a 37°C sin humedad, por 40 minutos seguido de una incubación a 60°C por 35-40 minutos, con el fin de evaporar toda la solución de cada pocillo.

10. Agregar 150 ul de GU4 a cada pocillo seco. Incubar por 40 minutos a 37°C.
11. Aspirar y lavar cada pocillo con 150 ul de GU1 diluido, al menos 3 veces.
12. Diluir GU5 (en una relación 1:1000) a 1 ug/ml con GU1 diluido. Agrega 50 ul de GU5 diluido a cada pocillo, incubar a temperatura ambiental por 60 minutos.
13. Lavar 4 veces cada pocillo con 150 ul de GU1.
14. Diluir GU6 (en relación 1:5000 a 1:10000) con GU1 diluido. Agregar 50 ul de GU6 diluido a cada pocillo e incubar a temperatura ambiental por al menos 30 minutos.
15. Lavar 5 veces cada pocillo con GU1 diluido.
16. Diluir GU7 (de 1:5000 a 1:10000) con GU1 diluido. Agregar 50 ul de GU7 a cada pocillo e incubar por 30 minutos.
17. Lavar cada pocillo un total de 5 veces con GU1 diluido.
18. Agregar 10 ul de GU8 a cada pocillo e incubar a temperatura ambiental por 1-5 minutos alejado de la luz. Comenzar el monitoreo del cambio de color. Cuando el control positivo se torne azul, detener la reacción con 50 ul de GU9. Al realizar este ultimo paso, el color de cada pocillo cambiará desde el azul al amarillo.
19. Leer la placa a 450 nM.

RESULTADOS

Según lo programado, el primer paso de este estudio, fue obtener una evaluación global del estado de metilación de cada muestra. Luego de lograr una concentración adecuada de DNA, se procedió a dar ejecución al KIT previamente descrito (Methylamp Global DNA Methylation Quantification Ultra Kit), evaluando posteriormente la absorbancia de cada preparado en un espectrofotómetro a 450 nM. Los resultados finales fueron los siguientes (**Tabla 4**):

Tabla 4: Absorbancia por paciente

PACIENTES	ABSORBANCIAS
PA 503	0,1450
PA 504	0,1325
PA 505	0,1250
PA 501	0,1380
PA 506	0,1212
PA 508	0,1180
PAED 507	0,1350
PAED 534	0,1380
PAED 535	0,1414
PAED 538	0,1432
PAED 539	0,1325
PAED 540	0,1234
CA 1202	0,1870
CA 1203	0,1775
CA 1204	0,1880
CA 1205	0,1986
CA 1206	0,2120
CA 1207	0,1965
CAED 1223	0,2040
CAED 1227	0,2030
CAED 1228	0,1876
CAED 1229	0,2000
CAED 1236	0,1987
CAED 1243	0,2070
PDS 419	0,1440
PDS 429	0,1470
PDS 438	0,1380
PDS 666	0,1250
PDS 667	0,1410
CS 1060	0,2630
CS 1062	0,2450
CS 1063	0,2420
CS 1064	0,2500
CS 1065	0,2480

(PAED): Pacientes de Antofagasta con exposición directa

(PA): Pacientes de Antofagasta

(CAED): Controles sanos de Antofagasta con exposición directa

(CA): Controles sanos de Antofagasta

(PDS): Pacientes con enfermedad de Parkinson de Santiago

(CS): Controles sanos de Santiago

Con estos resultados en mente y mediante la fórmula descrita en el protocolo: Porcentaje de DNA metilado= (Absorbancia de la muestra – Absorbancia del control negativo)/pendiente*2, se obtuvo los porcentajes de DNA metilado por paciente (**Tabla 5**).

PACIENTES	% DNA METILADO
PA 503	0,271
PA 504	0,224
PA 505	0,196
PA 501	0,245
PA 506	0,181
PA 508	0,169
PAED 507	0,233
PAED 534	0,245
PAED 535	0,258
PAED 538	0,264
PAED 539	0,224
PAED 540	0,190
CA 1202	0,429
CA 1203	0,393
CA 1204	0,433
CA 1205	0,473
CA 1206	0,523
CA 1207	0,465
CAED 1223	0,493
CAED 1227	0,489
CAED 1228	0,431
CAED 1229	0,478
CAED 1236	0,473
CAED 1243	0,505
PDS 419	0,267
PDS 429	0,279
PDS 438	0,245
PDS 666	0,196
PDS 667	0,256
CS 1060	0,715
CS 1062	0,648
CS 1063	0,636
CS 1064	0,666
CS 1065	0,659

(PAED): Pacientes de Antofagasta con exposición directa

(PA): Pacientes de Antofagasta

(CAED): Controles sanos de Antofagasta con exposición directa

(CA): Controles sanos de Antofagasta

(PDS): Pacientes con enfermedad de Parkinson de Santiago

(CS): Controles sanos de Santiago

Luego de recopilar los datos obtenidos, se procedió a calcular los promedios de metilación de cada grupo con sus respectivas desviaciones estándar (**Tabla 6**)

Tabla 6: Promedio de Metilación por grupo de pacientes

GRUPO	PROMEDIO % DNA METILADO	DESVIACION ESTANDAR
PAE	0,214	0,036
PAED	0,236	0,025
CA	0,453	0,041
CAED	0,478	0,023
PDS	0,248	0,029
CS	0,665	0,027

(PAED): Pacientes de Antofagasta con exposición directa

(PA): Pacientes de Antofagasta

(CAED): Controles sanos de Antofagasta con exposición directa

(CA): Controles sanos de Antofagasta

(PDS): Pacientes con enfermedad de Parkinson de Santiago

(CS): Controles sanos de Santiago

Luego, mediante el programa SPSS Statistics se calculó el ANOVA y el HDS de Tukey para los Grupos (CAED, CA, PAED, PA, PDS, CS).

ANOVA

Esta prueba estadística, nos permite demostrar que existe una diferencia estadísticamente significativa al confrontar un par de estos grupos, pero no nos da mayor información con respecto a dónde se encuentra esta diferencia ni cuantifica la relevancia de esta.

Se demostró que predominaba la diferencia de las medias entre los grupos por sobre aquellas dentro un mismo grupo, por lo cual era posible realizar evaluaciones de las medias intergrupales con el fin de obtener mayor información. (**Tabla 7**).

Tabla 7: Cálculo del Valor de ANOVA

ANOVA					
PORCENTAJE DE DNA METILADO					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,871	5	,174	150,2653	0,0000
Dentro de grupos	,032	28	,001		
Total	,903	33			

Tabla 7: Como podemos observar, la significancia de la diferencia de las medias entre los grupos vs las diferencias de los valores de los valores intragrupal, es menor a 0,05. Por lo cual se confirma el hecho de que predomina la homogeneidad dentro del grupo, y que los grupos difieren entre si.

En base a los porcentajes de DNA metilado de cada muestra, se procedió a calcular el HDS de Tuckey para los preparados (**Tabla 8**)

Tabla 8: Cálculo del HSD de TUKEY

(I) GRUPO DE PACIENTES		HSD Tukey					
		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Significancia	Significancia	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
PA	PAED	-,021333	,019657	0,8831		-,08140	,03874
	CA	-0,238333	,019657	<1,77816650293039E-11	***	-,29840	-,17826
	CAED	-0,263833	,019657	<2,33335573085469E-12	***	-,32390	-,20376
	PDS	-,034267	,020616	0,5666		-,09727	,02873
	CS	-0,450467	,020616	<8,861800182558E-13	***	-,51347	-,38747
PAED	PA	,021333	,019657	0,8831		-,03874	,08140
	CA	-0,217	,019657	<1,51639145684612E-10	***	-,27707	-,15693
	CAED	-0,2425	,019657	<1,20671250769533E-11	***	-,30257	-,18243
	PDS	-,012933	,020616	0,9880		-,07593	,05007
	CS	-0,429133	,020616	<8,861800182558E-13	***	-,49213	-,36613
CA	PA	0,238333	,019657	<1,77816650293039E-11	***	,17826	,29840
	PAED	0,217	,019657	<1,51639145684612E-10	***	,15693	,27707
	CAED	-,025500	,019657	0,7840		-,08557	,03457
	PDS	0,204067	,020616	<1,74434933164491E-09	***	,14107	,26707
	CS	-0,212133	,020616	<7,40555394784792E-10	***	-,27513	-,14913
CAED	PA	0,263833	,019657	<2,33335573085469E-12	***	,20376	,32390
	PAED	0,2425	,019657	<1,20671250769533E-11	***	,18243	,30257
	CA	,025500	,019657	0,7840		-,03457	,08557
	PDS	0,229567	,020616	<1,24499077713836E-10	***	,16657	,29257
	CS	-0,186633	,020616	<1,18870950860384E-08	***	-,24963	-,12363
PDS	PA	,034267	,020616	0,5666		-,02873	,09727
	PAED	,012933	,020616	0,9880		-,05007	,07593
	CA	-0,204067	,020616	<1,74434933164491E-09	***	-,26707	-,14107
	CAED	-0,229567	,020616	<1,24499077713836E-10	***	-,29257	-,16657
	CS	-0,4162	,021533	<8,861800182558E-13	***	-,48200	-,35040
CS	PA	0,450467	,020616	<8,861800182558E-13	***	,38747	,51347
	PAED	0,429133	,020616	<8,861800182558E-13	***	,36613	,49213
	CA	0,212133	,020616	<7,40555394784792E-10	***	,14913	,27513
	CAED	0,186633	,020616	<1,18870950860384E-08	***	,12363	,24963
	PDS	0,4162	,021533	<8,861800182558E-13	***	,35040	,48200

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

**. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.005.

***. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.0005.

Como podemos observar, en base a los resultados entregados por este análisis estadístico, existen diferencias estadísticamente significativas entre diversos grupos. Pese a estas diferencias, nuestro postulado inicial no se corroboró. Inicialmente, dados los antecedentes laborales y personales de nuestros pacientes, se esperaba encontrar un gradiente de metilación desde la muestra menos metilada (paciente con enfermedad de Parkinson de Antofagasta y antecedentes de exposición directa a metales) hasta la muestra más metilada (los controles sanos de Santiago), lo cual no pudo ser corroborado en base a los resultados entregados.

En resumen, al comparar los diferentes grupos entre sí, se demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los siguientes grupos:

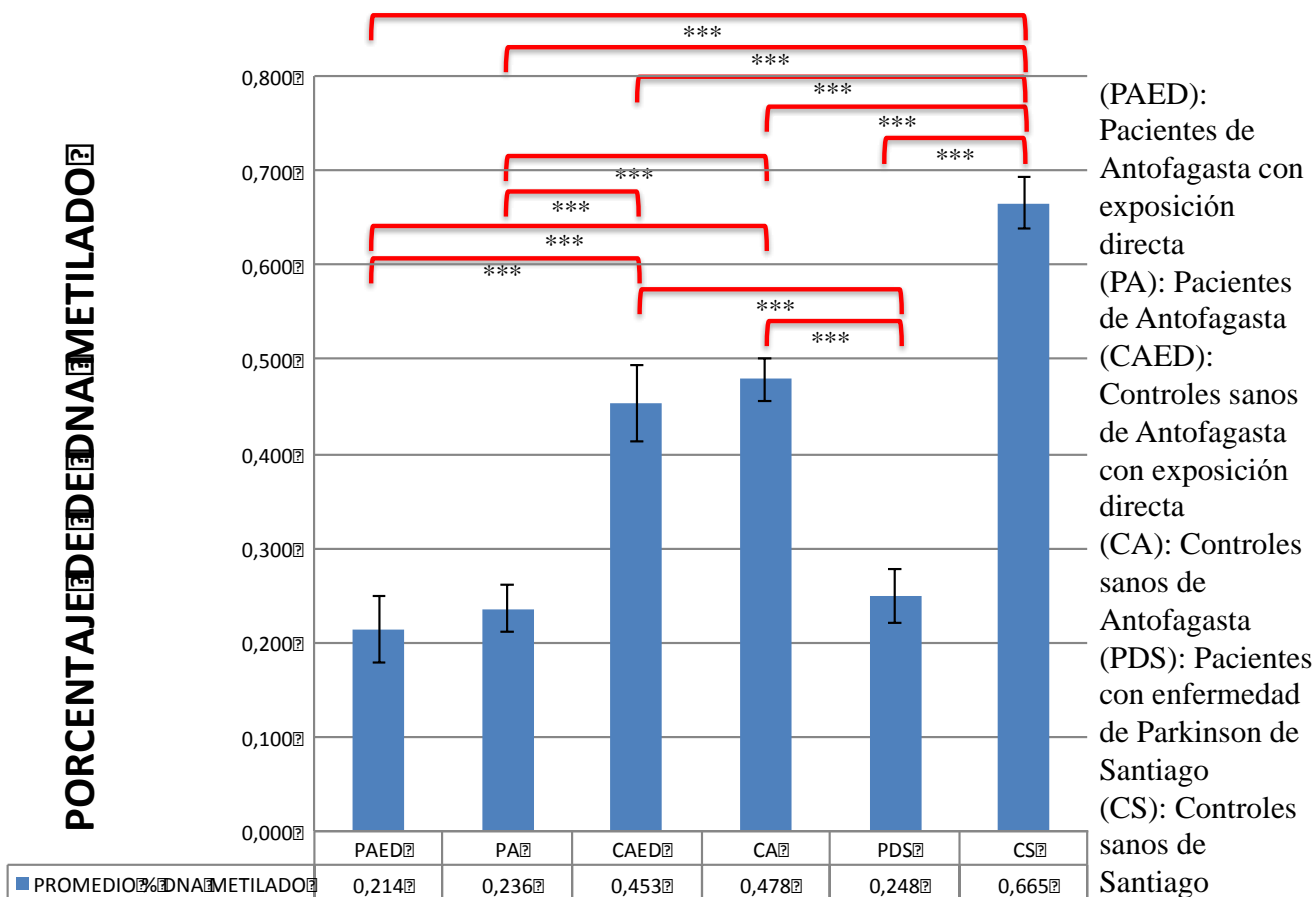
- Pacientes con enfermedad de Parkinson de Antofagasta con antecedentes de exposición directa a metales (PAED) y pacientes con enfermedad de Parkinson de Antofagasta sin antecedentes de exposición ambiental a metales (PA).
- Entre controles de Antofagasta (CA (control de Antofagasta sin antecedentes de exposición ambiental a metales) y CAED (control de Antofagasta con antecedentes de exposición directa a metales)).
- Y en pacientes con enfermedad de Parkinson de Antofagasta con y sin antecedentes de exposición directa a metales (PAED y PA) vs pacientes con enfermedad de Parkinson de la ciudad de Santiago (PDS).

En cuanto a las diferencias objetivables se demostró que existen diferencias estadísticamente significativas (con un valor de p menor a 0,005) entre los siguientes grupos:

- Pacientes con enfermedad de Parkinson de Antofagasta con y sin antecedentes de exposición ambiental a metales (PAED y PA) al contrastarlos con sus controles respectivos (CAED y CA).
- Pacientes con enfermedad de Parkinson de Santiago (PDS) y su control respectivo (control de Santiago (CS)).
- Por último llama la atención que los pacientes controles de Santiago (CS) se diferenciaban de forma estadísticamente significativa con todos los grupos, incluso de los controles de la ciudad de Antofagasta independiente del antecedente de exposición ambiental a metales (CA Y CAED, vs CS).

Finalmente se procedió a graficar los resultados previamente explicados (**Figura N°2**)

Figura 2: Porcentajes de Metilación por grupos de pacientes



Evaluación de los porcentajes de metilación global por grupo de pacientes

- *. Valor de alfa menor a 0,05
- ** . Valor de alfa menor a 0,005
- ***. Valor de alfa menor a 0,0005

Dado que existía cierta homogeneidad entre algunos grupos, (entre los cuales no se pudo determinar diferencias estadísticamente significativas), se procedió a reagrupar las muestras.

Se desestimó esta vez el antecedente de exposición directa a metales (dado que no generaba diferencias estadísticamente significativas), por ende las muestras fueron reasignadas de la siguiente forma: Pacientes con enfermedad de Parkinson de Antofagasta (PA), pacientes controles de Antofagasta (CA), pacientes con enfermedad de Parkinson de Santiago (PS), controles sanos de Santiago (CS).

Se procedió a calcular el promedio de metilación para cada grupo, junto a su desviación estandar respectiva (**Tabla 9**).

Tabla 9: Promedio de Metilación por grupo de pacientes

GRUPO	PROMEDIO % DNA METILADO	DESVIACION ESTANDAR
PA	0,225	0,032
CA	0,466	0,036
PDS	0,248	0,029
CS	0,665	0,027

(PA): Pacientes de Antofagasta

(CA): Controles sanos de Antofagasta

(PDS): Pacientes con enfermedad de Parkinson de Santiago

(CS): Controles sanos de Santiago

Con los datos previos, se procedió a recalculer el ANOVA para estos nuevos grupos, el cual nuevamente nos permitió corroborar que existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos contrastados (**Tabla 10**).

Tabla 10: Cálculo del Valor de ANOVA

ANOVA					
PORCENTAJE DE DNA METILADO					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,868	3	,289	242,5301	0,0000
Dentro de grupos	,036	30	,001		
Total	,903	33			

Tabla 10 Como podemos observar, la significancia de la diferencia de las medias entre los grupos vs las diferencias de los valores de los valores intragrupal, es menor a 0,05. Por lo cual se confirma el hecho de que predomina la homogeneidad dentro del grupo, y que los grupos difieren entre si.

En consideración a los datos previos, se procedió a recalculer el HDS de Tukey para los nuevos grupos (**Tabla 11**). Este test estadístico nos permitió ahondar en las diferencias al contrastar los diferentes grupos.

Tabla 11: Cálculo del HSD de TUKEY

HSD Tukey							
(I) GRUPO DE PACIENTES	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Significancia	Significancia	95% de intervalo de confianza		
					Límite inferior	Límite superior	
PA	CA	-,240417*	,014097	<7,44404538011167E-13	***	-,27875	-,20208
	PDS	-,023600	,018381	,579		-,07358	,02638
	CS	-,439800*	,018381	<7,44404538011167E-13	***	-,48978	-,38982
CA	PA	,240417*	,014097	<7,44404538011167E-13	***	,20208	,27875
	PDS	,216817*	,018381	<5,77293768344589E-12	***	,16684	,26680
	CS	-,199383*	,018381	<4,00512956133525E-11	***	-,24936	-,14940
PDS	PA	,023600	,018381	0,579		-,02638	,07358
	CA	-,216817*	,018381	<5,77293768344589E-12	***	-,26680	-,16684
	CS	-,416200*	,021840	<7,44404538011167E-13	***	-,47558	-,35682
CS	PA	,439800*	,018381	<7,44404538011167E-13	***	,38982	,48978
	CA	,199383*	,018381	<4,00512956133525E-11	***	,14940	,24936
	PDS	,416200*	,021840	<7,44404538011167E-13	***	,35682	,47558

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

**. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.005.

***. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.0005.

Resultados obtenidos:

1. Existían diferencias estadísticamente significativas (con valor de $p < 0,005$) entre ambos grupos de pacientes con enfermedad de Parkinson (tanto de Antofagasta como de Santiago) al ser contrastados con sus controles respectivos. Este resultado era esperado, y, como se discutirá posteriormente, las razones y causas de estas diferencias han sido descritas por otros autores.

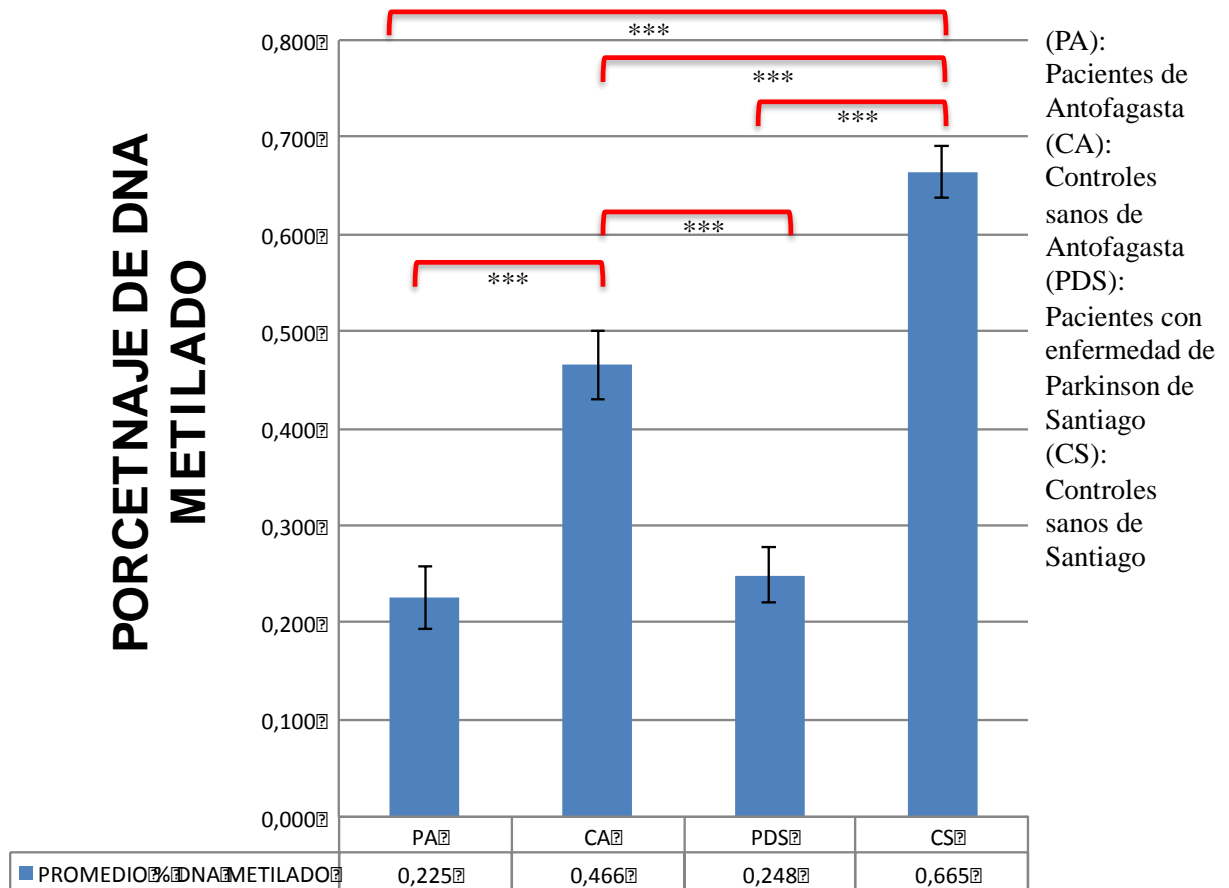
2. A pesar de que las condiciones ambientales son claramente diferentes y la exposición a contaminantes ambientales difiere entre los pacientes de Antofagasta (PA) en relación a los pacientes de Santiago (PDS), no se corroboró diferencias estadísticamente significativas al contrastar estos grupos. Esto podría estar dado y sería explicado por dos causas posibles.

Primero: El ambiente en los pacientes de Antofagasta, no juega un rol importante al determinar un estado de metilación menor que lo esperado para habitantes fuera de esta región.

Segundo: La enfermedad de Parkinson genera un estado de hipometilación global basal, bajo el cual es imposible disminuir su estado de metilación, sin poner a juego la viabilidad celular. Por último, el resultado más novedoso (que en parte responde la pregunta anterior) es la clara diferencia que existe al contrastar los grupos de controles de Antofagasta (CA) vs los controles sanos de Santiago (CS), lo cual implicaría que claramente el ambiente juega un rol determinante en cuanto al estado de metilación global de nuestro ADN, el cual sería poco consistente en la literatura (lo cual será explicado posteriormente).

Por último, se procedió a graficar los resultados previamente descritos (**figura N°3**), con lo cual se puede apreciar con facilidad las diferencias enunciadas con anterioridad.

Figura 3: Porcentajes de Metilación por grupos de pacientes



Evaluación de los porcentajes de metilación global por grupo de pacientes

*. Valor de alfa menor a 0,05

**, Valor de alfa menor a 0,005

***. Valor de alfa menor a 0,0005

d. Evaluación de genes puntuales

METODOLOGÍA

Dados los hallazgos previos, se procedió a determinar la metilación de un gen específico. Mi candidato para esto es el gen para alfa sinucleína (SNCA), dado que es amplia la evidencia que avala su rol modulador y participativo en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson. Para esto se diseñó partidores específicos tanto para la amplificación del gen metilado, como del no metilado.

Primero se buscó la secuencia del gen SNCA en la base de datos de Gen Blast. Luego, se introdujo de forma íntegra al programa ProScan, el cual entregó las zonas en las cuales se concentran los dinucleótidos 5'-CpG-3'. Se seleccionó la región de interés y se llevó al programa Meth Primer (el cual se encuentra libre en internet). Este programa seleccionó la zona en la cual se concentran dinucleótidos 5'-CpG-3' para formar los partidores metilados y no metilados.

En el partidor metilado no se generaron cambios en las Citosinas asociadas a una Guanina dado que estas estarían metiladas en la muestra a evaluar, y gracias a esta metilación, son resistentes a los cambios inducidos por la secuenciación por bisulfito. Todas las otras Citosinas aisladas son cambiadas por una Timina en la hebra forward y por una Adenina en la hebra reverse.

En la secuencia que formará el partidor no metilado, se cambiaron todas las Citosinas (estén o no asociadas a una Guanina) por una Timina en la hebra forward o por una Adenina en la hebra reverse. Esto se explica ya que este partidor será el encargado de amplificar la muestra no metilada que fue sometida a la secuenciación por bisulfito. Por tanto, y, dado que no presenta Citosinas metiladas, todas estas Citosinas han sido cambiadas por un Uracilo luego de la secuenciación por bisulfito. Luego los partidores diseñados se mandaron a ensamblar a la empresa Fermentas (**Tabla 12**).

Tabla 12: Partidor diseñado

Gen	Región	Localización del primer		
			Metilado	No Metilado
SNCA	-926 a -483	-812 a -638	F 5' GCGAGGATGTTTTATGGAGC 3'	F 5' GTGAGGATGTTTTATGGAGT 3'
			R 5' CCGCGCCAACACTTATTA 3'	R 5' CCACACCAACACTTATTA 3'

Posteriormente, y mediante la secuenciación de bisulfito (a través del kit EZ DNA Methylation Lighting Kit, de ZYMO RESEARCH), se indujeron las modificaciones adecuadas en todas las muestras de DNA y en los controles, para su posterior análisis.

La modificación del DNA con bisulfito de sodio, consiste en convertir todas las Citosinas no metiladas (mediante un proceso de desaminación) a Uracilo. En cambio, las metil-citosinas no son modificadas, permitiendo la detección específica de DNA metilado o no metilado. La modificación con bisulfito de sodio se realiza como se describió (Clark y cols., 2006).

Protocolo de modificación por bisulfito

1. Agregar 130 ul de Lightning Conversion Reagent a 20 ul de DNA en un tubo PCR. Mezclar. Luego centrifugar para asegurarse que no queden residuos en los bordes del tubo .
2. Poner el tubo de PCR en un termociclador. Ajustar para completar los siguientes ciclos:
 - 98°C por 8 minutos
 - 54°C por 60 minutos
 - 4°C para almacenamiento hasta por 20 horas.
3. Agregar 600 ul de M-Binding Buffer a una columna Zymo-Spin™, luego poner la columna dentro de un tubo de 2m.
4. Cargar la muestra del paso 2, dentro de la columna, la cual contiene el M- Binding Buffer. Cerrar la tapa y mezclar por inversión de forma reiterada.
5. Centrifugar a 13.000 rpm por 30 segundos.
6. Agregar 100 ul M-Wash Buffer dentro de la columna. Centrifugar a 13.000 rpm por 30 segundos.

7. Agregar 200 ul de L-Desulphonation Buffer a la columna, dejar a temperatura ambiente por 15-20 min. Luego de la incubación centrifugar a 13.000 rpm por 30 segundos.
8. Agregar 200 ul de M-Wash Buffer a la columna. Centrifugar a 13.000 rpm por 30 segundos.
9. Repetir el paso anterior.
10. Cambiar la columna a un nuevo tubo de colección de 1.5 ml, agregar 10-15ul de M-Elution Buffer, directamente al centro de la columna. Centrifugar a 13.000 rpm por 30 segundos.

Luego de la preparación de cada muestra, se procedió a evaluar por medio del nanodrops la concentración de cada preparado. Como previamente se había descrito, las concentraciones de DNA de nuestras muestras distaban mucho de lo ideal, lo cual se acrecentaba con el hecho de que luego de la secuenciación por bisulfito aproximadamente solo un 80% del DNA original es recuperado.

El tratamiento del ADN con bisulfito convierte los residuos de Citosina en Uracilo, pero deja residuos de 5-metilcitosina no afectado. Por lo tanto, el tratamiento de bisulfito introduce cambios específicos en la secuencia de ADN que dependen del estado de metilación de residuos de citosina individuales, luego la secuencia modificada es amplificada mediante PCR para su comparación y análisis. Para esto se utiliza una Taq recombinante, que contiene un anticuerpo que inhibe la actividad de polimerasa a temperatura ambiental. Además es altamente sensible y de gran rendimiento para el análisis de regiones ricas en islas CpG. Esta taq contiene un búfer enhancer, el cual permite una alta eficiencia con bajas concentraciones de muestra (25 ng/ul, de templado).

MS-PCR con Taq Platinum

Para este PCR se utilizó la siguiente TAQ: Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). Me comuniqué con la empresa encargada de la venta y distribución de este KIT, con el fin de obtener información con respecto a la concentración ideal de DNA a utilizar, información que fue corroborada con la disponible de otros estudios previos. Se determinó utilizar como concentración inicial de DNA 50 ng/ul , por lo tanto las muestras que no alcanzaran esta meta inicial fueron nuevamente concentradas con el kit previamente descrito. El protocolo a utilizar corresponde al diseñado por Invitrogen, para la optimización de templados problemáticos ricos en dinucleótidos C-G. Este se encuentra diseñado de la siguiente forma: 5 ul de 10x PCRx Amp Buffer, 1 ul de 10 mM dNTP, 1.5 ul de 50 mM MgSO₄, 1 ul de cada partidor forward y reverse, para cada muestra metilada y no metilada, volumen de la muestra de DNA suficiente para alcanzar 50 ng, 0,5 ul de Taq, 5 ul de enhancer y 20 ul de agua. Se procederá a estandarizar el proceso para determinar los volúmenes y concentraciones de cada preparado del mix inicial del protocolo de PCR a utilizar.

Se necesitan 25-35 ciclos de PCR, determinados de la siguiente forma:

- Denaturación a 95°C por 30-45 segundos
- 55°C por 30 segundos
- Extensión 68°C por 1 minutos

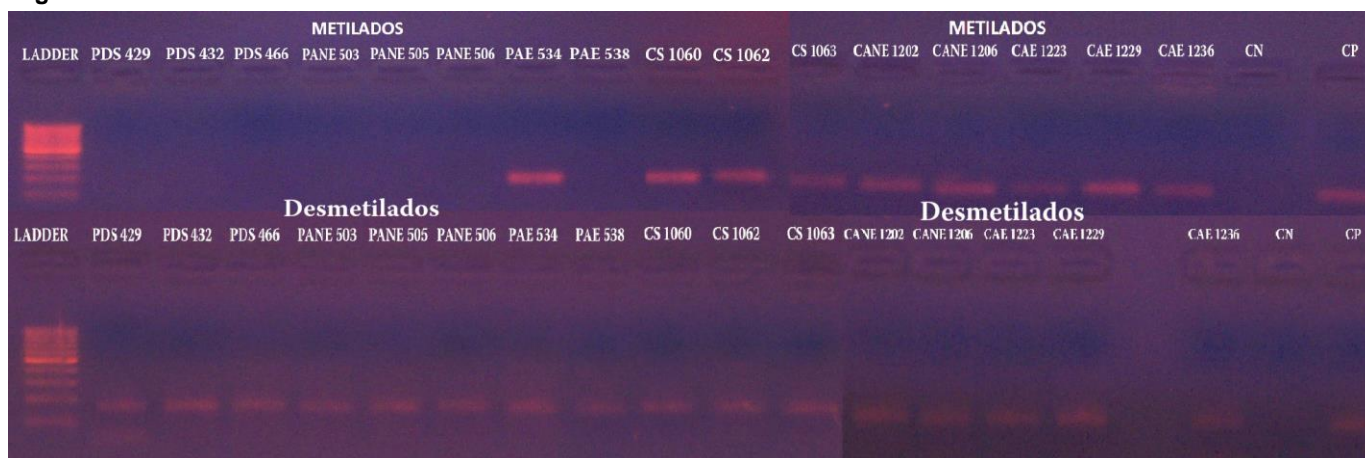
Análisis de los productos obtenidos mediante MS-PCR por electroforesis en gel de agarosa.

La visualización de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. En presencia del amortiguador TBE (Tris borato 9mM a pH 8,0 y EDTA 2mM) el gel se tiñó con Bromuro de Etidio. Como estándar de tamaño molecular se utilizó el

GeneRuler DNA ladder. La electroforesis se realizó a un voltaje de 100 volts por 30 minutos aproximadamente. La observación se realizó en un transiluminador UV. El análisis de metilación es cualitativo, debido a que se informa la observación de la banda del tamaño correspondiente al producto metilado (M) y/o al producto no metilado (UM). La presencia de ambos productos, M y UM, puede deberse al resultado de hipermetilación de sólo un alelo. En el caso en el cual la muestra presente sólo una clase de producto, se puede indicar que ambos alelos están Metilados (M) o no metilado (UM), para un gen en particular. Dado que sólo se cargaron 50 ng de DNA los cuales fueron resuspendidos en 150 ul de solución en el mix de MS-PCR, la concentración final de esta muestra sería insuficiente para ser visualizada mediante la electroforesis en gel de agarosa, de no ser que esta haya sido amplificada por el partidor correspondiente.

RESULTADOS

Figura 4: Resultado de estado de metilación de SNCA



Evaluación cualitativa del estado de metilación de SNCA

Se cargó 10 uL de DNA de cada muestra más 2 uL de Buffer de Carga en gel de Acrilamida al 1%.

UM (Unmethylated): hebra no metilada

M: (Methylated): hebra metilada

Por último se procedió a tabular los hallazgos encontrados en el gel de agarosa. (**Tabla: 13**)

Tabla 13: Estado de metilación de gen SNCA por grupo de pacientes

	Metilado	Hemimetilado	Desmetilado
PA	0,0%	20,0%	80,0%
CA	0,0%	100,0%	0,0%
PDS	0,0%	0,0%	100,0%
CS	0,0%	100,0%	0,0%

(PA): Pacientes de Antofagasta

(CA): Controles sanos de Antofagasta

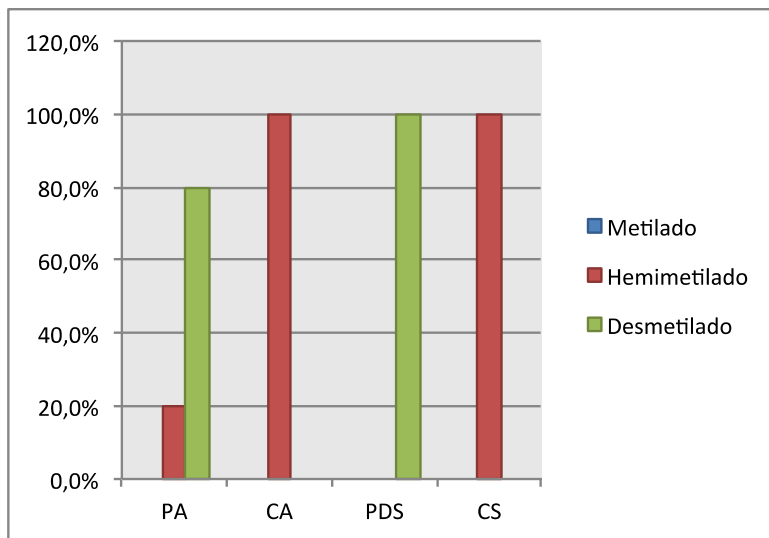
(PDS): Pacientes con enfermedad de Parkinson de Santiago

(CS): Controles sanos de Santiago

Se pudo corroborar resultados descritos previamente en otros estudios. La gran mayoría de los pacientes con enfermedad de Parkinson evaluados de esta forma, tanto provenientes de la ciudad de Antofagasta (con la excepción de PAED) como de Santiago, presentaban desmetilación del gen SNCA, esto ya se había demostrado en Parkinson esporádico (Ahmad Jowaed, 2010) (Paula Desplats, 2011). No existió otra diferencia a rescatar entre estos grupos.

Finalmente se procedió a graficar lo previamente descrito.

Figura 5: Estado de metilación de gen SNCA por grupo de pacientes



(PA): Pacientes de Antofagasta

(CA): Controles sanos de Antofagasta

(PDS): Pacientes con enfermedad de Parkinson de Santiago

(CS): Controles sanos de Santiago

En cuanto a los controles, no se corroboraron diferencias al confrontar las muestras de controles de Santiago vs los controles de Antofagasta, por lo tanto las diferencias existentes en el estado de hipometilación global existente en los controles de Antofagasta estaría dado por otro mecanismo independiente del gen SNCA.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Al iniciar este estudio, nuestra hipótesis inicial estaba dada por el hecho de que se esperaba corroborar y determinar diferencias estadísticamente significativas al momento de evaluar el estado de metilación global así como el puntual en un gen específico (SNCA). Estas diferencias serían evaluadas en diferentes poblaciones, tanto de Santiago como de Antofagasta, con la hipótesis de que tanto el ambiente dado por la exposición a contaminantes ambientales de la ciudad de Antogasta como el antecedente personal de padecer la enfermedad de Parkinson generarían diferencias estadísticamente significativas. Estos factores descritos (ambientales, personales y laborales) serían factores independientes sobre los resultados esperables, por lo tanto su efecto se debiese agregar al evaluar cada muestra.

En base a lo anterior esperábamos encontrar:

- Hipometilación global en ambos grupos de pacientes con enfermedad de Parkinson en comparación a sus controles sanos respectivos.
- Mayor hipometilación global de los pacientes con enfermedad de Parkinson y antecedentes de exposición directa a metales en comparación a los pacientes con Parkinson pero sin antecedentes de exposición.
- Diferencias estadísticamente significativas al comparar controles sanos con antecedentes de exposición directa a metales en relación a los controles sanos sin antecedentes de exposición.
- Desmetilación del gen SNCA en ambos grupos de pacientes con enfermedad de Parkinson, así como en las muestras de controles sanos de la ciudad de Antofagasta con antecedentes de exposición directa a metales.

Los resultados obtenidos permiten concluir lo siguiente:

En relación a la metilación global

Se confirma lo que se había descrito previamente en diversos estudios.

- El Parkinson genera un estado de hipometilación global, el cual sería independiente de la etiología presumible como causal de la enfermedad.
- No existen diferencias en los niveles de metilación global en los grupos contrastados, en cuanto al antecedente de exposición directa a metales, lo cual implicaría que el efecto laboral directo de exposición en este caso en particular no generaría mayores modificaciones con respecto al nivel de metilación basal de cada individuo. Esto se podría explicar de la siguiente manera: **Primero:** La enfermedad de Parkinson pareciera ser el nivel de hipometilación basal para todas las muestras. **Segundo:** Los pacientes controles de la ciudad de Antofagasta se encuentran envueltos en un ambiente donde la contaminación ambiental ha generado modificaciones epigenéticas persistentes en su DNA, esto explicaría la diferencia estadísticamente significativa al contrastarlos con los controles sanos de Santiago. Esta diferencia no podría estar dada por sexo o edad, dado que los grupos son homogéneos para estas características. Esto implicaría que el ambiente juega un rol determinante en el estado de metilación del DNA, y la falta de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con enfermedad de Parkinson de Antofagasta y pacientes de Santiago podrían estar dadas por los resultados previamente descritos (Paula Desplats, 2011). En este estudio (Paula Desplats, 2011) se demostró que la sobreexpresión de SNCA generaba un secuestro extranuclear de la enzima DNMT1 (encargada de la mantención del estado de metilación). Este secuestro generaba hipometilación global de las muestras.

Considerando lo anterior, se podría explicar por qué por sobre cierto punto de hipometilación global no existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de dos grupos de pacientes en los cuales no podría existir una mayor supresión de la actividad de DNMT1 (que ya se encontrase completamente secuestrada en una posición extranuclear) por la sobreexpresión de SNCA.

En relación al estado de metilación puntual de SNCA

Nuestro MS PCR demostró lo previamente esperado. Los pacientes con enfermedad de Parkinson en su amplia mayoría, con la excepción de PAED 534, demostraron una consistente desmetilación del gen de SNCA. Esto corroboraría nuestros hallazgos previos, dado que es conocido que la sobreexpresión de SNCA genera un secuestro extranuclear de DNMT1 lo cual conlleva a la hipometilación global. Por otra parte, a pesar de existir diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de controles (al evaluar el estado de metilación global de estas muestras) esta diferencia no estaría dada por la sobreexpresión de SNCA, por ende serían otros los mecanismos involucrados en este proceso.

En síntesis, los datos son consistentes al determinar la influencia del medio ambiente sobre nuestro DNA, si bien los controles de la ciudad de Antofagasta no presentaban una enfermedad de Parkinson, es indudable e inegable el deterioro que el ambiente ha generado en su material genético. Por otra parte, se corrobora que es consistente el papel que juega el gen SNCA en la fisiopatología de la enfermedad, lo cual demuestra claramente, que independiente de la etiología causal de la enfermedad de Parkinson, la modulación de la expresión de este gen pareciera ser una meta terapéutica.

Bibliografía

Ahmad Jowaed, * I. (Mayo de 2010). Methylation Regulates Alpha-Synuclein Expression and is decreased in parkinson's disease patient's brains. 6355-6359.

Christoph Bock, M. P. (Marzo de 2006). CpG Island Methylation in Human Lymphocytes Is Highly Correlated with DNA Sequence, Repeats, and Predicted DNA Structure. *Plos Genetics* , 243-252.

Daniel Strausak, J. F. (Enero de 2001). Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Research Bulletin* , 175–185.

Davie, C. A. (Febrero de 2008). A review of Parkinson's disease. *British Medical Bulletin* , 109-127.

Eliezer Masliah, W. D. (Octubre de 2013). Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. *Epigenetics* , 1030-1038.

He-Jin Lee, F. K.-J. (Noviembre de 2004). Clearance of α -Synuclein Oligomeric Intermediates via the Lysosomal Degradation Pathway. *The Journal of Neuroscience* , 1888 –1896.

Howard Cedar, Y. B. (Mayo de 2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics* , 295-304.

International Human Genome Sequencing Consortium. (Febrero de 2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* , 861-921.

Irmgard Paris, J. S.-A. (Marzo de 2011). The role of metal ions in dopaminergic neuron degeneration in Parkinsonism and Parkinson's disease. *Monatshefte für Chemie* , 365–374.

Kevin J Barnham, A. I. (Mayo de 2008). Metals in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Chemical Biology* , 222–228.

Maria Grazia Spillantini, R. A. (Mayo de 1998). α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurobiology* , 6469–6473.

Mark D. Shtilerman, T. T. (Febrero de 2002). Molecular Crowding Accelerates Fibrillization of R-Synuclein: Could an Increase in the Cytoplasmic Protein Concentration Induce Parkinson's Disease? *Biochemistry* , 3855-3860.

Michael J. Volles and Peter T. Lansbury, J. (Marzo de 2002). Vesicle Permeabilization by Protofibrillar R-Synuclein Is Sensitive to Parkinson's Disease-Linked Mutations and Occurs by a Pore-like Mechanism. *Biochemistry* , 4595-4602.

Paris I, L. J.-P.-A. (Octubre de 2009). Molecular and neurochemical mechanisms in PD pathogenesis. 271-277.

Paul H. Weinreb, W. Z. (Octubre de 1996). NACP, A Protein Implicated in Alzheimer's Disease and Learning, Is Natively Unfolded. *American Chemical Society* , 13709-13715.

Pavan K. Auluck, H. Y.-Y. (Septiembre de 2002). Chaperone Suppression of α -Synuclein Toxicity in a Drosophila Model for Parkinson's Disease. *Science* , 865-868.

Pedro Chaná C., M. J. (Marzo de 2013). Mortalidad por enfermedad de Parkinson en Chile. *Revista Médica de Chile* , 327-331.

Raja Settivari, J. L. (Septiembre de 2009). The Divalent Metal Transporter Homologues SMF-1/2 Mediate Dopamine Neuron Sensitivity in Caenorhabditis elegans Models of Manganism and Parkinson Disease. *The Journal Of Biological Chemistry* , 35758–35768.

Robert Bussell, D. E. (Julio de 2001). Residual Structure and Dynamics in Parkinson's Disease-associated Mutants of α -Synuclein. *The Journal Of Biological Chemistry* , v.

Rocio G Urdinguio, J. V.-M. (Junio de 2009). Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurology* , 1056-1072.

Ted M. Dawson, V. L. (Enero de 2003). Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *The Journal of Clinical Investigation* , 145–151.

Waddington, C. H. (Julio de 1942). The Epigenotype. *Endeavour* , 18-20.

Braak H, B. J. (Mayo de 2006). Pathology associated with sporadic Parkinson's disease – where does it end? *J Neural Transm* , 89-96.

Paula Desplats, B. S. (Marzo de 2011). Alpha synuclein Sequesters Dnmt1 from the Nucleus. *The journal of biological chemistry* , 9031-9037.

San-xi Ai a, Q. a.-c.-y.-f.-r.-l.-x.-s. (Diciembre de 2013). Hypomethylation of SNCA in blood of patients with sporadic Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* , 123-128.