



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

Informe Final del Proyecto de Servicio Social

Nombre del proyecto específico:

Medición de telómeros como marcador de envejecimiento en pacientes con enfermedad de Parkinson.

Proyecto genérico:

Estudio farmacogenómico en población mexicana normal y en pacientes con enfermedades neurológicas

Etapa:

Identificación de factores genéticos asociados con el deterioro cognitivo en pacientes con enfermedades neurológicas.

Lugar de realización: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco Departamento de Sistemas Biológicos, Laboratorio de Genética Molecular (N-103)

Alumno: Rivera Calderón Marco Adrián

Matrícula: 2143060335

Licenciatura: Química Farmacéutica Biológica

División: Ciencias Biológicas y de las Salud

Nombre de los asesores:

Interno: Dra. Marisol López López (No. económico 7808)

Interno: Dr. Alberto Ortega Vázquez (No. económico 35583)

Fecha de inicio: 1/10/2019

Fecha de termino: 18/10/2021 **Inicio de tramite** 20/10/2021

Índice	Página
1. Datos generales.....	3
2. Introducción.....	4
2.1 Enfermedad de Parkinson.....	4
2.2 Datos epidemiológicos.....	5
2.3 Mecanismo molecular de la EP.....	6
2.4 Envejecimiento.....	6
2.5 Marcadores de envejecimiento.....	7
2.6 Telómeros.....	7
2.7 Longitud telomérica.....	7
2.8 Longitud telomérica y EP.....	8
3. Justificación	9
4. Objetivos generales.....	9
4.1 Objetivos específicos.....	9
5. Metodología utilizada.....	9
5.1 Descripción del estudio.....	9
5.2 Muestras de pacientes con EP y controles.....	10
5.3 Cuantificación relativa de la longitud telomérica.....	10
5.4 Validación de la metodología.....	11
5.5 Análisis estadístico.....	11
6. Actividades realizadas.....	11
7. Objetivos alcanzados.....	12
8. Resultados y conclusiones.....	12
9. Recomendaciones.....	16
10. Bibliografía.....	17
11. Vo. Bo. de los Asesores respecto a los contenidos académicos...	21

1. Datos generales:

Nombre: Rivera Calderón Marco Adrián

Matrícula: 2143060335

Lugar y periodo de realización:

- Laboratorio de Genética Molecular N-103, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Del 1/Septiembre/2019 al 30/Noviembre/2020

Unidad, División y Licenciatura:

Unidad: Xochimilco

División: Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento: Sistemas Biológicos

Licenciatura: Química Farmacéutica Biológica.

Nombre de plan, programa o proyecto en que se participa:

Estudio farmacogenómico en población mexicana normal y en pacientes con enfermedades neurológicas.

Asesores:

Interna: Dra. Marisol López López (7808)

Interno: Dr. Alberto Ortega Vázquez (35583)

2. Introducción:

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno del movimiento que se caracteriza por signos clínicos como temblor en reposo, bradicinesia, rigidez, inestabilidad postural y por alteraciones neuropatológicas como la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* (Ziegler et al., 2018) y la presencia de agregados conocidos como cuerpos de Lewy. La mayor parte de los casos de EP se presentan después de los 60 años; por lo tanto, el envejecimiento es el mayor factor de riesgo para la EP (Gaudioso, et al., 2020). Los telómeros humanos son complejos de ribonucleoproteínas, que consisten en una secuencia de ADN repetitiva y un núcleo de proteínas asociadas. Los telómeros son fundamentales para el mantenimiento de la estabilidad genómica en células de diferentes órganos, incluido el cerebro (Eitan et al., 2014).

La senescencia celular es un proceso irreversible de declinación de la proliferación en relación con la edad. Es un proceso activo genéticamente programado, que responde a una inducción dada por el acortamiento telomérico, generando una señal semejante a la producida por el daño en el ADN (Benavides et al., 2006). Existen reportes de diferencias en la longitud de los telómeros (LT) como posibles factores de riesgo para varios trastornos neuropsiquiátricos como la enfermedad de Alzheimer, la demencia vascular y la EP (Eitan et al., 2014).

En este estudio se aborda el análisis de LT en pacientes con EP y controles en tres tiempos distintos, siendo la PCR cuantitativa (qPCR) el método elegido para esta comparación ya que la conformación especial de la cromatina puede comprometer la fiabilidad de otras técnicas de análisis.

2.1 Enfermedad de Parkinson

La EP es una enfermedad neurodegenerativa causada por una variedad de factores que incluyen el envejecimiento, la predisposición genética y los factores ambientales. Las formas mendelianas de la EP son heredadas de forma autosómica dominante y están asociadas a variantes en diferentes genes tales como *SNCA*, *PARK2*, *PARK7* y *LRRK2*, mientras que las formas esporádicas están asociadas a genes de susceptibilidad como *STK39* y *MAPT* (Verstraeten et al., 2015).

Los pacientes con EP tienen múltiples síntomas no motores (SNM) como depresión, estreñimiento, trastornos del comportamiento del sueño por movimientos oculares rápidos y disfunción olfativa, que pueden ocurrir antes de la aparición de los síntomas motores (EM). Hasta hace unos años, los SNM eran poco reconocidos, entendiéndose clásicamente la EP como una enfermedad meramente motora. En la actualidad, y tras diversos estudios e investigaciones, se sostiene la elevada prevalencia de estos síntomas, su incremento conforme avanza la enfermedad, así

como el impacto sobre la calidad de vida de las personas que la padecen (Villaescusa., 2020).

De acuerdo con Villaescua (2020), los SNM se definen en cuatro fenotipos diferentes:

- Los síntomas neuropsiquiátricos, entre los que destacan la depresión y el deterioro cognitivo leve y la demencia.
- Los trastornos del sueño, entre los que encontramos trastornos de conducta del sueño de movimientos oculares rápidos (REM), hipersomnia diurna excesiva, ataques de sueño, insomnio y síndrome de pierna inquietas.
- Los síntomas sensitivos, donde destacan el dolor, la hiposmia y los trastornos visuales.
- Los síntomas autonómicos, como la frecuencia miccional, nicturia, disfunción sexual, hiperhidrosis e hipotensión ortostática.

También podemos encontrar alteraciones que afectan a la comunicación y, por lo tanto, a la calidad de vida de las personas, se trata de alteraciones en el habla y en la voz, como son: La pérdida progresiva del volumen de voz, monotonía de la voz. afectación del ritmo de habla con tendencia a un aumento de la velocidad, cambios de la calidad de la voz (débil apagada, ronca, soplada, temblorosa y/o intermitente) dificultad en la articulación, vacilación antes de hablar con titubeos iniciales (Villaescua., 2020). Asimismo, Martínez-Fernández et. al. (2016) encontraron un elevado porcentaje de pacientes con disartria hipocinética, constituyendo una característica de las personas con EP.

Por otro lado, la presencia de deterioro cognitivo leve podría derivar en demencia subcortical (aproximadamente 80% de los pacientes con EP desarrollará una demencia), afectando así algunas de las funciones cognitivas como son las funciones ejecutivas, la atención, las habilidades visoespaciales, grave afectación de la memoria e incluso del lenguaje. Encontramos por tanto una alteración de la memoria semántica con dificultades en la programación de los recuerdos similar a una de las principales características en la enfermedad de Alzheimer (Toribio-Díaz, et al., 2015).

2.2 Datos epidemiológicos

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente del mundo (GBD, 2016). Según el Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores no existen cifras exactas de pacientes con EP en México. Sin embargo, el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez estima una prevalencia de 50 casos nuevos por cada 100 mil habitantes al año (Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores, 2019).

2.3 Mecanismo molecular de la EP

El desarrollo de la forma idiopática de la EP se ha asociado con la exposición a factores ambientales, aunque también hay formas familiares o hereditarias. En estos últimos casos la enfermedad se ha asociado a variaciones patogénicas en genes que codifican para proteínas como α -sinucleína y parkina. En los pacientes que carecen de una clara carga genética los mecanismos patogénicos son difíciles de entender debido a la variedad de factores que participan, entre los que están toxinas ambientales y estrés oxidativo. Sin embargo, la ruta final común de los mecanismos patógenos que deterioran a las neuronas de la sustancia *nigra* es la muerte neuronal, proceso en el que participa de manera importante el estrés oxidativo dependiente de la dopamina (Gómez et al., 2012).

Los cuerpos de Lewy aparecen en fases tempranas de la EP y son agregados de la proteína α -sinucleína principalmente. En algunas formas familiares de la EP se han encontrado proteínas-anómalas, en particular en la proteína α -sinucleína; la pérdida de la función normal de esta proteína, aunada al efecto tóxico de sus formas alteradas, favorece la acumulación de dopamina en los sitios donde se sintetiza y acumula, como son el citoplasma y terminales nigroestriales, donde inician cambios neurodegenerativos en los sujetos con EP. La mutación en los genes que codifican para las proteínas parkina y ubiquitina C-terminal hidrolasa L1 (*UCHL1*) también se relacionan con una forma hereditaria de EP. Estas mutaciones originan la acumulación de dopamina en el citoplasma, y disminuyen la eliminación de las formas tóxicas de la α -sinucleína; en ambos casos se favorece la formación de poros en las vesículas sinápticas, lo que incrementa la salida de dopamina al citoplasma, e inhiben el reciclado de estas vesículas, y estos eventos aumentan la acumulación de dopamina libre en el citoplasma. La mutación de estas proteínas afecta el adecuado funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal y provocan la muerte de estas neuronas. (Gómez et al., 2012).

2.4 Envejecimiento

El envejecimiento, entendido como la gradual disminución de la función orgánica en el transcurso del tiempo como consecuencia de la acumulación de células senescentes y la reducción del potencial regenerativo de células madre (Hou et al., 2019), ha sido reconocido como uno de los principales factores de riesgo para enfermedades neurodegenerativas, entre las que se incluyen las enfermedades de Alzheimer y de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la EP (Hou et al., 2019).

La asociación entre la longitud de los telómeros y la edad cronológica se manifiesta en varios tipos de células somáticas como un acortamiento de los telómeros a medida que avanza la edad (Ly et al., 2019). Adicionalmente, se ha propuesto que el acortamiento de los telómeros representa un marcador y un mecanismo de

envejecimiento biológico, que se vincula a enfermedades asociadas al envejecimiento. Con base en estas observaciones, la asociación entre el acortamiento de los telómeros y enfermedades neurodegenerativas se ha convertido en tópico de considerable interés desde la pasada década. Los estudios realizados sobre la variabilidad de la longitud de los telómeros en el ámbito de enfermedades neurodegenerativas buscan esclarecer las implicaciones fisiopatológicas de los telómeros y su utilidad como biomarcadores de gravedad y progresión de enfermedad (Sánchez et al., 2020).

El envejecimiento es el mayor factor de riesgo para la EP, aunque se conocen casos tempranos debidos a una variante genética patogénica. En caso de aparición temprana, menores de 40 años, existe una elevada probabilidad de un origen genético (sólo representa un 5 % de la población con EP) aunque cada vez son más los jóvenes diagnosticados y se calcula que 1 de cada 5 son menores de 50 años. (CORDIS, 2014).

2.5 Marcadores de envejecimiento.

Como concepto multidimensional, el envejecimiento incluye cambios físicos, psicosociales y biológicos. Estos últimos, se conocen comúnmente como “senescencia”, concepto que se usa para células individuales con capacidad limitada para proliferar, pero que también puede aplicarse al organismo completo (Rizzo et al. 2014). El estudio del envejecimiento biológico (i.e., mecanismos involucrados en el declive de las funciones fisiológicas y componentes de un organismo, relacionados con la edad (Tzourio et al. 2014) en poblaciones clínicas, generalmente se basa en la medición de relojes biológicos, dentro de los cuales, la LT ha sido el más investigado (Fries et al. 2017).

2.6 Telómeros.

Los telómeros son regiones de ADN no codificante ubicadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Están constituidos por secuencias de ADN altamente conservadas, repetidas en tándem (TTAGGG)_n y proteínas asociadas. Los telómeros están organizados en una estructura en bucle denominada bucle en T y asociada con proteínas especializadas. Este bucle retrocede e invade el tracto telomérico bicatenario, asegurando que los extremos sueltos del ADN estén alojados internamente dentro de la estructura de nucleoproteína (Turner et al., 2019). Dicha estructura especial impide su unión a los extremos de otros cromosomas, previniendo la fusión telomérica (Cottliar, et al., 2012). Los telómeros funcionan para mantener la estabilidad del genoma, protegiendo al ADN codificante de la acción enzimática y la degradación, contribuyendo al mantenimiento de la estabilidad cromosómica; median importantes interacciones entre los cromosomas y la matriz nuclear, pudiendo además ejercer efectos sobre la transcripción de genes situados en regiones subteloméricas e interactúan con los mecanismos regulatorios del ciclo celular (Cottliar, et al., 2012).

La enzima telomerasa mantiene la integridad telomérica, actúa elongando los extremos cromosómicos erosionados a expensas de un componente de ARN que contiene un dominio que es complementario a la secuencia de ADN telomérico. Ese dominio permite alinear la enzima con el sustrato y provee de un templado para la adición de *nov*o de deoxinucleótidos a las secuencias teloméricas (Cottliar, et al., 2012).

2.7 Longitud telomérica

El envejecimiento es un fenómeno presente a lo largo del ciclo vital desde el mismo proceso de la concepción hasta la muerte. Existen numerosas definiciones del envejecimiento, pero a su vez es difícil precisar el concepto general del mismo; autores como (Alvarado, et al.,2014) lo define como un proceso dinámico, multifactorial e inherente a todos los seres humanos, que puede verse afectado por diferentes procesos como bioquímicos, fisiológicos, morfológicos, psicológicos y funcionales, el reemplazo de las células funcionales cardiovasculares con tejido fibroso. inmunidad reducida, reducción telomérica, pérdida de fuerza muscular y disminución de la memoria. (Alvarado, et al.,2014). Uno de los cambios de mayor interés durante el proceso de envejecimiento es el acortamiento telomérico

El tamaño de las secuencias teloméricas varía dependiendo de diversos procesos biológicos. Se ha observado una reducción progresiva del número de repeticiones teloméricas *in vitro*, así como en función del envejecimiento celular *in vivo*. Después de un cierto número de divisiones celulares, la célula adquiere una longitud telomérica crítica, pudiendo resultar en la pérdida de secuencias de regiones subtelo méricas que podrían llevar a la muerte celular. La pérdida de estas repeticiones terminales durante la proliferación celular debido a una incompleta replicación puede ser contrarrestada por la elongación de los telómeros por parte de la telomerasa. Existen distintas evidencias que indicarían que el acortamiento telomérico durante el envejecimiento de células somáticas normales *in vitro* jugaría un rol causal en la senescencia celular. Una longitud telomérica crítica estaría asociada con un bloqueo en la replicación característico de las células senescentes (Cottliar, et al., 2012).

En células presenescentes se han reportado la presencia de telomerasa enzimáticamente activa, acompañada del mantenimiento de la longitud telomérica y de una demora en el desencadenamiento de la senescencia. En individuos normales se detectó una disminución de la longitud telomérica con el avance de la edad, observándose variaciones entre distintos tipos celulares desde 15000-20000 pb en células germinales, 10000 pb en adultos jóvenes y 5000-7000 pb en células de personas mayores. Se sabe que el número de divisiones celulares correlaciona positivamente con la longitud telomérica inicial habiéndose observado una pérdida

progresiva de secuencias teloméricas de entre 50 y 200 nucleótidos con cada duplicación de la población celular, calculándose que la pérdida promedio de ADN telomérico en tejido hematopoyético sería de 9pb/año. En células somáticas en activa división, los telómeros pueden llegar a un acortamiento tal que cese la capacidad proliferativa por disminución de la longitud telomérica a niveles críticos (aproximadamente 2.5 Kb), situación definida como punto límite de Hayflick. Esas observaciones llevaron a la hipótesis de que la longitud telomérica serviría como un reloj biológico regulando la vida de las células normales. (Cottliar, et al., 2012).

Esta pérdida acumulativa narra simultáneamente la historia replicativa e impone un límite replicativo finito. Los telómeros son sensibles a una serie de estímulos que incluyen estrés oxidativo, inflamación crónica, IMC, tabaquismo, consumo de alcohol, estrés percibido y actividad física. El interés clínico y público en la LT se basa en la asociación con el envejecimiento biológico y patologías relacionadas, tales como la EP (Chilton et al., 2017).

2.8 Longitud telomérica y enfermedad de Parkinson.

Se han observado telómeros cortos en células senescentes como respuesta al aumento del estrés oxidativo y la inflamación crónica, lo que lleva a la hipótesis de que la longitud de los telómeros puede ser un biomarcador útil para enfermedades de aparición tardía con una mayor producción de especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, es plausible que la EP, un trastorno neurodegenerativo relacionado con la edad que se caracteriza por la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, se asocie con un acortamiento de la longitud de los telómeros. Aunque se han realizado muchos estudios la mayoría de los resultados son contradictorios. (Vega, et al., 2017)

Guan et al., 2008, estudiaron la LT en la sustancia *nigra* de 96 pacientes y 172, encontrando una disminución en pacientes con EP, así mismo de Maeda et al., 2012, reportó resultados similares. En contraste con el estudio realizado por Schürks et al., 2014 donde reportaron un incremento de la LT en pacientes con EP, por otra parte, múltiples estudios encontraron que no hay correlación entre la EP y LT como Wang et al., 2012, Eerola et al., 2010, Watfa et al., 2011 y Degerman et al., 2014. Los datos anteriormente mencionados muestran una controversia de la LT en la EP. Sin embargo, un metaanálisis que incluyó ocho estudios primarios, para un total de 956 pacientes con EP y 1284 controles sanos provenientes de poblaciones europeas y asiáticas, se concluyó que no existen evidencias consistentes de acortamiento de telómeros en pacientes con esta enfermedad. Este estudio enfatiza la necesidad de evaluar la asociación potencial entre la longitud de los telómeros y la EP en diferentes poblaciones del mundo, y en diferentes regiones cerebrales. (Forero et al., 2016). De modo global, los resultados obtenidos hasta el momento no permiten establecer la relevancia de la biología de los telómeros en la fisiopatología de la EP.

3. Justificación

La EP es el trastorno del movimiento más común y la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente. En México se estima una prevalencia de 50 casos-nuevos/100,000 habitantes/año (INAPAM, 2019). La edad, el sexo masculino y factores ambientales son factores de riesgo para desarrollar la EP. Su etiología es desconocida, la mayoría de los casos son esporádicos, sin embargo, se reconoce como una enfermedad multifactorial con un fuerte componente genético (Tarakad y Jankovic, 2020; Balestrino y Schapira, 2020).

El acortamiento de la longitud de los telómeros se considera un indicador del envejecimiento celular, que se acelera por el estrés oxidativo y la inflamación. Los pacientes con EP son altamente susceptibles a este proceso, por lo cual es de gran importancia determinar la LT en dichos pacientes. La disfunción mitocondrial produce especies reactivas de oxígeno que pueden provocar daño oxidativo y contribuir al acortamiento de los telómeros. El acortamiento de la longitud de los telómeros (LT) se considera un biomarcador biológico del envejecimiento.

En la EP, la erosión de los telómeros puede acelerarse. Sin embargo, los datos sobre el acortamiento de los telómeros en la EP son inconsistentes entre varios estudios.

4. Objetivos generales

Evaluar la LT en pacientes con EP y en controles sanos para identificarlo como un mecanismo involucrado en el envejecimiento acelerado.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Captar 30 pacientes con EP.
- B. Captar 30 individuos voluntarios sanos.
- C. Extraer de DNA genómico en 30 pacientes con EP
- D. Extraer de DNA genómico en 30 controles voluntarios sanos
- E. Analizar del DNA.
- F. Determinar la LT en 30 pacientes con EP mediante qPCR.
- H. Determinar la LT en 30 controles voluntarios sanos qPCR.
Analizar los resultados obtenidos.

4. Metodología utilizada

5.1 Descripción del estudio

Se realizó un análisis comparativo entre pacientes con EP y voluntarios sanos en tres tiempos, siendo el primer año T0, el segundo T1 y el tercer año T2. Los pacientes en T0 están libres de tratamiento farmacológico.

5.2 Muestras de pacientes con EP y controles.

Siguiendo todos los requerimientos éticos de acuerdo con el Comité de Ética del INNNMVS y previa firma del Consentimiento Informado se incluyeron en el estudio 30 pacientes con diagnóstico de EP y 30 individuos sanos (controles). Las muestras fueron proporcionadas por el Laboratorio de

Unidad Periférica para el Estudio de la Neuro inflamación en Patologías Neurológicas, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNNMVS) y del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Las muestras proporcionadas corresponden a pacientes y controles en 3 tiempos siendo T0 la primera toma, T1 la segunda y T2 la última toma, todas las muestras se congelaron hasta el momento de su análisis; las muestras en T0 son de pacientes libres de tratamiento farmacológico.

Los pacientes y controles fueron mestizos mexicanos residentes de la Ciudad de México y de varios estados de la República Mexicana.

A los pacientes de nuevo ingreso al protocolo se les realizó una toma de muestra (20 mL) de sangre periférica en tubos *Vacutainer*® con anticoagulante citratos-dextrosa (ACD). Las muestras de sangre periférica colectadas fueron procesadas en un lapso no mayor a 3 horas después de su obtención, en todos los casos se realizó la separación del plasma y las células mononucleares (CMN). La sangre total se fraccionó en volúmenes de 3 mL. El plasma fue separado de 3 mL de sangre por centrifugación (3000 rpm x 6 min), y las CMN se separaron con solución amortiguadora de lisis de glóbulos rojos (NH_4Cl 0.155 M, KHCO_3 0.01 M, EDTA 0.001 M) y centrifugación (3000 rpm x 1 min), se les adicionó un amortiguador de fosfatos (PBS 1X) y un estabilizador (RNA *later*, AMBION®) para preservar las células. El plasma y las CMN se congelaron inmediatamente a -70°C hasta su uso. Del resto de la muestra de sangre se extrajo DNA genómico por método salino y se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.3 Cuantificación relativa de longitud telomérica.

Para la cuantificación relativa de LT fue necesario incluir la amplificación de un gen normalizador, que debe ser de secuencia monocopia, a partir de la misma muestra de DNA, y bajo las mismas condiciones experimentales. El valor de dosis obtenido del gen de interés (en nuestro caso fue el repetido hexanucleótido telomérico (TEL) se divide entre el valor obtenido para el gen monocopia para normalizar los resultados y asegurar que las variaciones observadas sean en realidad debidas a cambios en la dosis y no a cantidad variable de muestra añadida entre dos ensayos.

La cuantificación relativa de la LT se realizó por PCR cuantitativa (qPCR) midiendo el TEL, y usando como referencia el gen Beta-2 microglobulina (*B2M*) (Norris et al. 2019).

Se utilizó el método de cuantificación de $\Delta\Delta\text{CT}$, descrito por Abad 2013: (CT= ciclo umbral: el número de ciclo en el cuál la fluorescencia alcanza el umbral de detección), en donde es necesario construir una curva de rango dinámico para el gen blanco y el control endógeno y obtener el ΔCT (CT gen de interés – CT control endógeno) para cada uno de los puntos. Este ΔCT se gráfica vs la concentración de cada uno de los puntos, y la línea obtenida debe tener una pendiente menor o igual a 0.1, la cual valida la utilización del

método de ΔCT que requiere que la eficiencia de amplificación de ambos genes (endógeno y blanco) sea similar/comparable.

Una vez validado este método, directamente se aplica la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$

$$\Delta\Delta CT = CT \text{ gen de interés (secuencia telomérica)} - CT \text{ gen endógeno}$$

Gen de interés: es la secuencia telomérica que nos interesa cuantificar (*TEL*)

Gen endógeno: es el gen de expresión constitutiva cuyos niveles no cambian en las condiciones experimentales usadas (*B2M*) y necesariamente de copia única en el genoma diploide para el análisis de dosis génica.

$$\Delta\Delta CT = \Delta Ct \text{ muestra interés} - \Delta CT \text{ calibrador}$$

ΔCT calibrador: muestra de estudio en las condiciones experimentales contra las cuales deseamos comparar (Control comercial).

En este trabajo para el análisis de LT, cada muestra de DNA se analizó por triplicado.

5.4 Coeficiente de variación intraplaca e interplaca

Se calculó la variación intraplaca e interplaca para garantizar la posterior repetibilidad del ensayo, así como descartar la variación de LT por un error en la cantidad de DNA adicionado en cada pozo de la placa.

Esto se llevó a cabo evaluando los resultados de réplicas de todas las muestras en cada placa (variación intraplaca), y analizando la variación interplaca usando las mismas muestras en placas diferentes dentro de un mismo ensayo.

5.5 Validación de metodología

Se validó la metodología utilizando un DNA control.

Se realizaron diluciones seriadas 10-30-50-100 ng de DNA. En las curvas estándar de cada región amplificada se ajustó la eficiencia de amplificación a valores cercanos al 100% (90-110%).

5.6 Análisis estadístico

Los datos de la LT se reportaron como medias \pm DS. Los datos obtenidos de la LT se analizaron con el paquete estadístico *Rstudio*, se realizó la prueba Shapiro–Wilk, para determinar el tipo de distribución de cada grupo. La relación entre grupos con distribución normal se determinó con una prueba de T, los grupos con una distribución no normal fueron tratados con la prueba de Wilcox.

6. Actividades realizadas

Se capturaron 24 controles y 18 pacientes con EP de la consulta externa del INNNMVS y fueron proporcionadas 92 muestras por el laboratorio Unidad Periférica para el Estudio de la Neuro-inflamación en Patologías Neurológicas del INNNMVS y del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

A las muestras captadas se les extrajo el DNA por el método salino.

Se realizó un análisis cualitativo-cuantitativo a todas las muestras para determinar los parámetros óptimos para el análisis molecular de las muestras. La integridad de las muestras se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa con TBE1X y *gelred* como agente intercalante para su resolución. Los geles fueron visualizados mediante un fotodocumentador (*Enduro GDS*). La concentración y la pureza de las muestras fueron determinadas mediante espectrofotometría con un equipo *NanoDrop 2000 Thermo Scientific*[®] a longitudes de onda de 260nm, 280nm y 230nm.

Se determinó la LT a 92 muestras de pacientes con EP y controles por cuantificación relativa mediante el método de $\Delta\Delta CT$ en el equipo *Quantstudio 5*. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

Se realizó una comparación de la LT entre pacientes con EP y controles a T0, T1 y T2 para determinar si existieron diferencias en el tamaño del telómero entre los grupos mediante uso del paquete estadístico *Rstudio*.

Adicionalmente con el uso del paquete estadístico *Rstudio*, se compararon la LT en pacientes con EP, en T0 y T1, así como T1 y T2, para determinar el avance del deterioro telomérico.

7. Objetivos y metas alcanzadas

Se extrajo ADN genómico de 92 muestras de sangre totales entre pacientes y controles.

Se evaluó la LT en 37 pacientes con EP y 36 controles.

Se confirmó T0-T2 pacientes

Se identificó una menor LT en pacientes vs controles a T1 (0.91 ± 0.28 vs 1.10 ± 0.17 , $p=0.03$).

Se encontró mayor erosión de LT a T2 (0.59 ± 0.27 vs 1.09 ± 0.18 , $p=0.0007$),

Se logró correlacionar la erosión acelerada de TL en pacientes con EP en T1 y T2 como un mecanismo involucrado en el envejecimiento acelerado la cual podría explicarse por daño oxidativo y estrés.

8. Resultados y discusión

En la Tabla 1 se muestra la eficiencia de la amplificación de las secuencias *B2M* y *TEL*, ambos valores cercanos al 100% (90-110%). Como parte de la validación del método comparativo $\Delta\Delta CT$ se realizaron curvas estándar para cada secuencia y se compararon (Fig. 1), las pendientes presentaron valores logarítmicos cercanos a -3.0. En la Tabla 2 se observa el número de muestras analizadas y edades de pacientes y controles, debido al largo tiempo entre toma de muestras, no se le logró dar seguimiento al total de los pacientes y controles. Los pacientes fueron pareados por edad, se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para determinar el tipo de distribución de los datos, obteniéndose que el tipo de distribución es normal. Posteriormente se realizó una prueba de T, obteniéndose una $P= 0.2399$, lo que indica que no hay diferencia entre las edades de los pacientes y controles a T0.

El análisis de LT a T0 muestra mayor media de valores de CT entre los controles vs pacientes con EP sin significancia estadística entre ambas muestras (0.9740 ± 0.2829 vs 0.6693 ± 0.3318 respectivamente, $P = 0.053$ por prueba de *t student*) (Fig.2). Estos resultados son concordantes con lo reportado en la literatura por Watfa et al. 2011, donde sugiere que la disminución telomérica es atribuible a mecanismos relacionados con la edad.

Por otra parte, en T1 se encontró mayor LT en controles vs pacientes a pesar de que en T1 los pacientes ya se encuentran bajo tratamiento con dopamina o agonistas de la misma; 1.1012 ± 0.1698 vs 0.9145 ± 0.2795 , respectivamente, $P=0.004$ por una prueba de *U Mann Whitney* (Fig. 3), de igual manera en T2 se encontró una diferencia entre LT, siendo mayor en controles vs pacientes (1.0892 ± 0.1759 vs 0.5944 ± 0.2650 , $P= 0.001$, por una prueba de *t student* (Fig. 4), concordando con lo reportado con Maeda et al. 2012, en un el estudio realizado en mujeres asiáticas con EP entre 49 y 62 años de edad. Mismo resultado fue reportado por Wu et al, 2020. Ambos autores coinciden en la relación que existe entre la EP y la erosión telomérica.

La diferencia de LT entre controles y pacientes a T0 no fue estadísticamente significativa. Esta falta de significancia podría ser debida al bajo número de muestras, mientras que, en el resto de los tiempos, la diferencia si fue significativa, indicando una disminución acelerada de LT en pacientes con EP. Hudson et al., 2017, encontró que en células mononucleares de sangre periférica la LT aumentaba, mientras que en células del epitelio se obtuvo lo contrario, los autores concluyeron que no existen evidencias consistentes de acortamiento de telómeros en pacientes con esta enfermedad.

Scheffold et al (2016) y Wu et al (2020), relacionan la erosión de los telómeros con diversas enfermedades neurológicas, lo que indica la importancia de la LT con el envejecimiento como un factor de riesgo importante en los trastornos neurodegenerativos.

Sin embargo, dado que los estudios sobre este tema son controvertidos se necesitan más investigaciones para dilucidar el efecto del acortamiento de los telómeros y su impacto en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, así como ampliar el análisis en diferentes poblaciones del mundo, y en diferentes regiones cerebrales. (Eerola et al, 2010, Forero et al.,2016).

Tabla 1: Datos demográficos de pacientes con EP y controles.

Tiempo	Tiempo 0		Tiempo 1		Tiempo 2	
	Hombres	mujeres	Hombres	mujeres	Hombres	mujeres
Pacientes	8	0	12	9	4	4
Edad	55 ± 9	0	61±12	63±11	56 ±12	57±11
Controles	3	5	10	8	6	4
Edad	60 ± 5	60 ± 5	55±9	56±12	56±10	53±11

Tabla 2: intercepto, pendiente y eficiencia para los genes *B2M* y *TEL*.

	Pendiente	Intercepto	R2	EF%
<i>B2M</i>	-3.067	26.25	0.89	111
<i>TEL</i>	-2.2	17.973	0.95	95

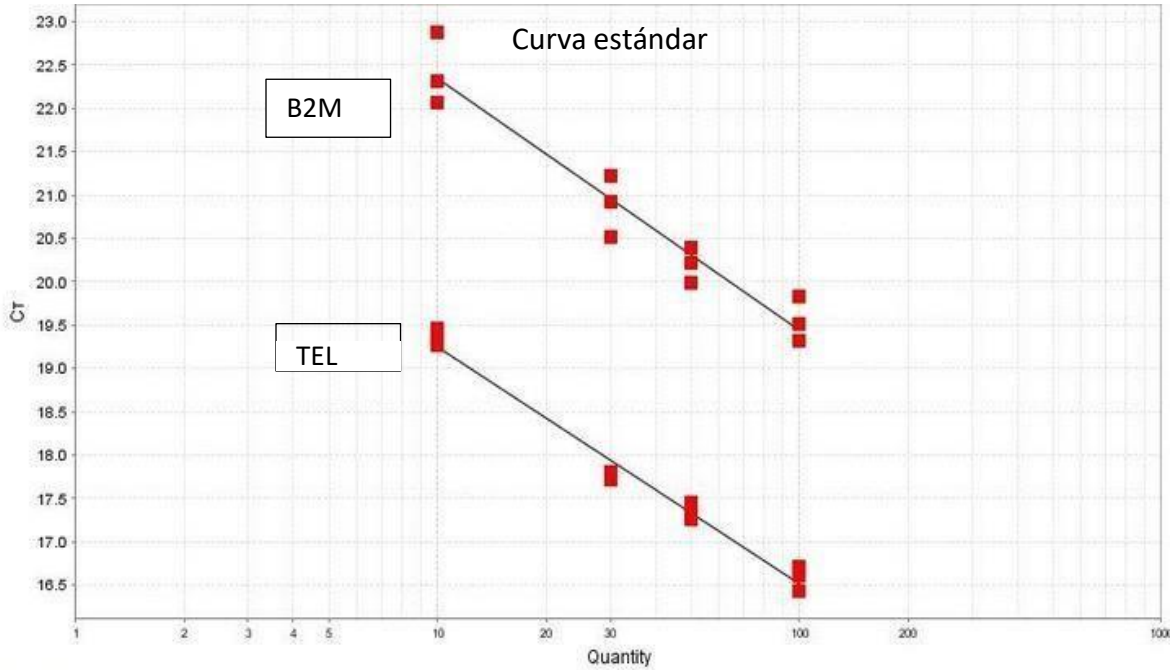


Fig. 1: Curvas estándar de para la amplificación de ambas secuencias (*B2M* y *TEL*). Se muestran eficiencias cercanas al 100% comparable entre sí.

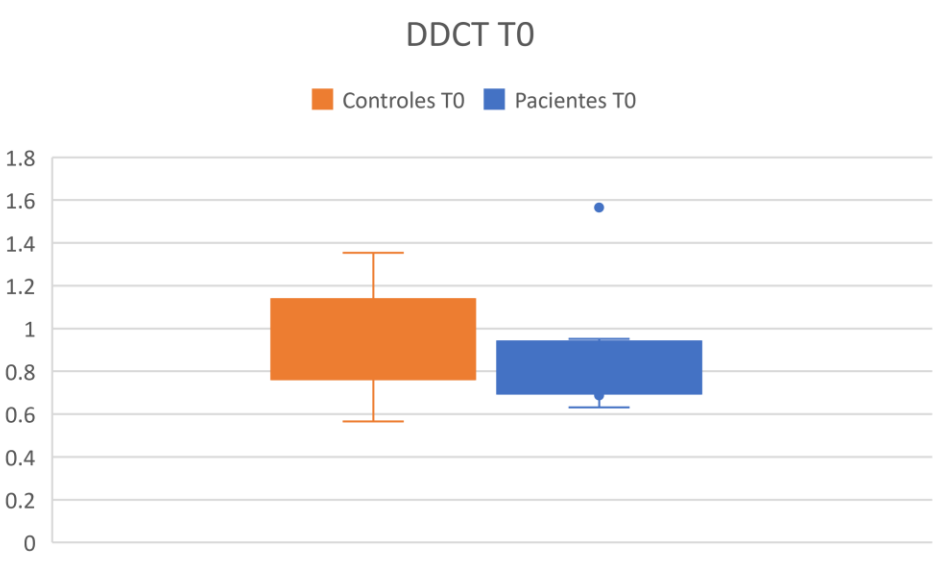


Fig. 2: Cuantificación relativa de la longitud del telómero entre pacientes (n=8) y controles (n=8) en Tiempo 0 (P=0.053).

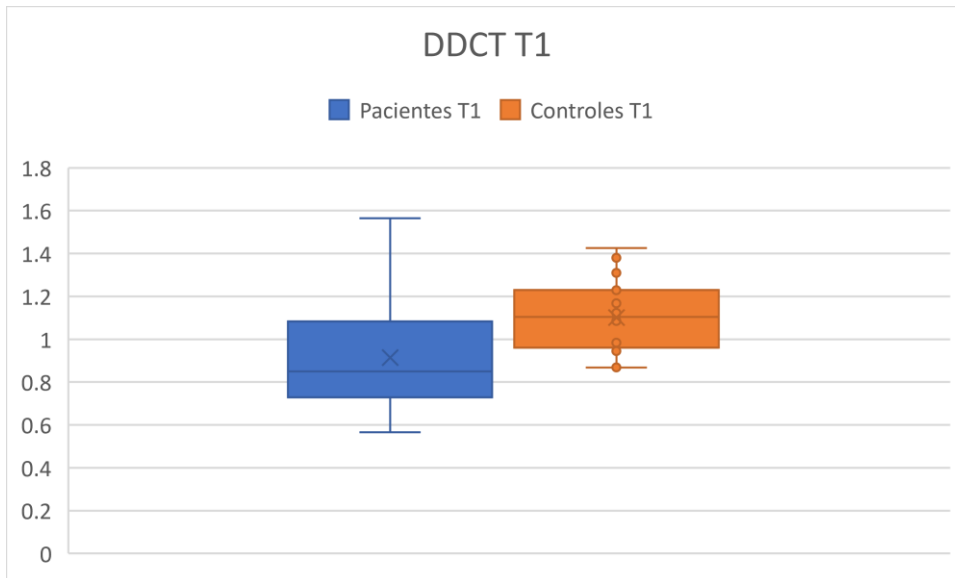


Fig. 3: Cuantificación relativa de la longitud del telómero entre pacientes (n=21) y controles (n=18) en Tiempo 1 (P=0.004).

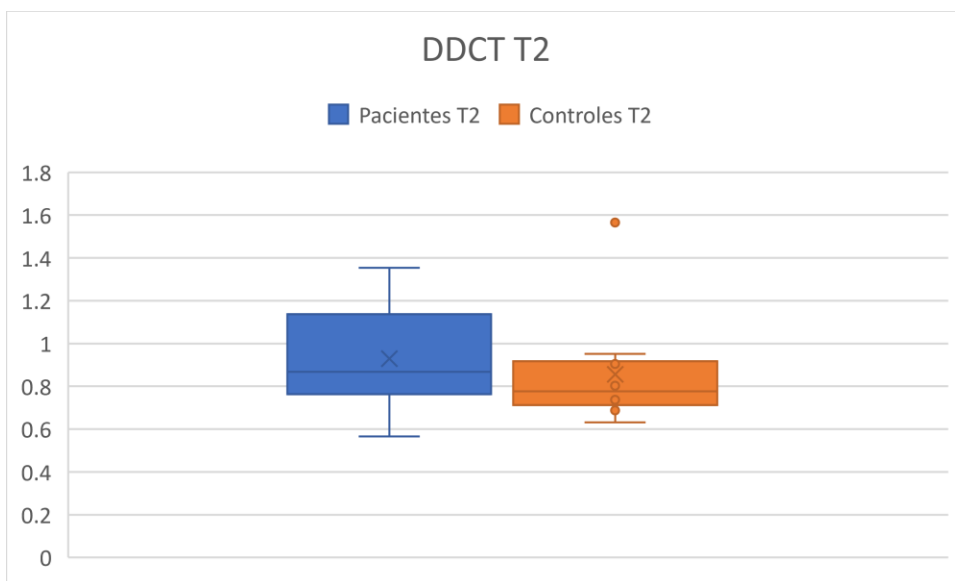


Fig. 4: Cuantificación relativa de la longitud del telómero entre pacientes (n=8) y controles (n=10) en Tiempo 2 (P=0.001).

9. Recomendaciones

Se recomienda aumentar la muestra de pacientes con EP y controles.

Comparar la longitud telomérica (LT) de células epiteliales y leucocitos circundantes.

Realizar estudios la LT en muestras con menor tiempo de almacenaje.

Evaluar la relación entre la LT y las características clínicas de los pacientes.

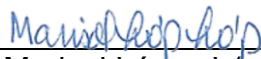
10. Bibliografía

- Alvarado García, A. M., & Salazar Maya, Á. M. (2014). Análisis del concepto de envejecimiento. *Gerokomos*, 25(2), 57-62.
- Benavides Couto, A., & Morales Mondeja, O. (2008). Telomerasa: fuente de juventud para la célula. *Medisur*, 6(2), 190-193. Recuperado de <http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/461/579>
- Chilton, W., O'Brien, B., & Charchar, F. (2017). Telomeres, Aging and Exercise: Guilty by Association?. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2573. <https://doi.org/10.3390/ijms18122573>
- Cottliar, A. S., & Slavutsky, I. R. (2001). Telómeros y actividad de telomerasa: su participación en el envejecimiento y el desarrollo neoplásico. *Medicina (Buenos Aires)*, 61, 335-42.
- Degerman S, Domellof M, Landfors M, Linder J, Lundin M, Haraldsson S, et al. Long leukocyte telomere length at diagnosis is a risk factor for dementia progression in idiopathic parkinsonism. *PLoS ONE*. 2014; 9: e113387.
- Dorsey, E. R., Elbaz, A., Nichols, E., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Adsuar, J. C., ... Collado-Mateo, D. (2018). Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*. doi:10.1016/s1474-4422(18)30295-3
- Eerola, j., kananen, l., manninen, k., hellström, o., tienari, p. J., & hovatta, i. (2010). No evidence for shorter leukocyte telomere length in parkinson's disease patients. *The journals of gerontology. Series a, biological sciences and medical sciences*, 65(11), 1181–1184. <https://doi.org/10.1093/gerona/glq125>
- Eitan, e, Hutchison, er Mattson m. (2014). Telomere shortening in neurological disorders: an abundance of unanswered questions. *Trends neurosci*. 2014 may;37(5):256-63. Doi: 10.1016/j.tins.2014.02.010. Epub 2014 mar 31. Pmid: 24698125; pmcid: pmc4008659.
- Forero, D. A., González-Giraldo, y., López-Quintero, C., Castro-Vega, L. J., Barreto, G. E., & Perry, G. (2016). Telomere length in parkinson's disease: a meta-analysis. *experimental gerontology*, 75, 53–55. <https://doi.org/10.1016/J.Exger.2016.01.002>
- Fries, G.R., Bauer, I.E., Scaini, G. Et al. Accelerated epigenetic aging and mitochondrial DNA copy number in bipolar disorder. *Transl Psychiatry* 7, 1283 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41398-017-0048-8>
- Gaudioso A, (2020) Nuevas modificaciones lipídicas implicadas en autofagia: papel en la enfermedad de Parkinson y el envejecimiento (tesis doctoral). UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, Madrid, España.
- Gómez-Chavarín, M., Roldan-Roldan, G., Morales-Espinosa, R., Pérez-Soto, G., & Torner-Aguilar, C. (2012). Physiopathological mechanisms of Parkinson's disease. *Archivos de Neurociencias*, 17(1), 25-33.

- Guan JZ, Maeda T, Sugano M, Oyama J, Higuchi Y, Suzuki T, Makino N. A percentage analysis of the telomere length in Parkinson's disease patients. *The journals of gerontology*. 2008; 63:467–473.[pubmed: 18511749
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature reviews. Neurology*, 15(10), 565–581. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>
- Hudson, G., Faini, D., Stutt, A., Eccles, M., Robinson, L., Burn, D. J., & Chinnery, P. F. (2011). No evidence of substantia nigra telomere shortening in Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 32(11), 2107.e3–2107.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.05.022>
- Instituto nacional de las personas adultas mayores (2019), Parkinson, segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en personas mayores de 50 años.
- Ly, K., Walker, C., Berry, S., Snell, R., Marks, E., Thayer, Z., Atatoa-Carr, P., & Morton, S. (2019). Telomere length in early childhood is associated with sex and ethnicity. *Scientific reports*, 9(1), 10359. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46338-x>
- Maeda T, Guan JZ, Koyanagi M, Higuchi Y, Makino N. Aging-associated alteration of telomere length and subtelomeric status in female patients with Parkinson's disease. *J Neurogenet*. 2012; 26: 245-51
- Norris, K., Hillmen, P., Rawstron, A., Hills, R., Baird, D. M., Fegan, C. D., & Pepper, C. (2019). Telomere length predicts for outcome to FCR chemotherapy in CLL. *Leukemia*, 33(8), 1953–1963. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0389-9>
- Sánchez Ochoa, G., Cuello Almarales, D., & Almaguer Mederos, L. (2020). Acortamiento de telómeros en enfermedades neurodegenerativas: implicaciones terapéuticas. *Revista Habanera De Ciencias médicas*, 19(5), e3144. Recuperado de <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/3144/2712>
- Scheffold, a., holtman, i. R., dieni, s., brouwer, n., katz, s. F., jebaraj, b. M., kahle, p. J., hengerer, b., lechel, a., stilgenbauer, s., boddeke, e. W., eggen, b. J., rudolph, k. L., & biber, k. (2016). Telomere shortening leads to an acceleration of synucleinopathy and impaired microglia response in a genetic mouse model. *Acta neuropathologica communications*, 4(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0364-x>
- Schürks M, Buring J, Dushkes R, Gaziano JM, Zee RY, Kurth T. Telomere length and Parkinson's disease in men: a nested case-control study. *Eur J Neurol*. 2014; 21: 93-9.
- Toribio-Diaz, M. E., & Carod-Artal, F. J. (2015). Subtipos de deterioro cognitivo leve en la enfermedad de Parkinson y factores predictores de conversión a demencia [Subtypes of mild cognitive impairment in Parkinson's disease and factors predicting its becoming dementia]. *Revista de neurologia*, 61(1), 14–24.
- Turner, K. J., Vasu, V., & Griffin, D. K. (2019). Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells*, 8(1), 73. <https://doi.org/10.3390/cells8010073>

- Tzourio, C., Laurent, S., & Debette, S. (2014). Is hypertension associated with an accelerated aging of the brain?. *Hypertension* (Dallas, Tex. : 1979), 63(5), 894–903. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.00147>
- Vega-Robledo, G. B., & Rico-Rosillo, M. G. (2017). Senescencia del sistema inmune y alteraciones relacionadas con el asma. *Revista Alergia México*, 64(2), 206-219.
- Verstraeten, A., Theuns, J., & Van Broeckhoven, C. (2015). Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. *Trends in genetics: TIG*, 31(3), 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.01.004>
- Villaescusa A, (2020) Enfermedad de Parkinson. Una propuesta de atención integral desde la logopedia (Tesis de grado). Universidad de Valladolid, Valladolid, España.
- Wang H, Chen H, Gao X, mcgrath M, Deer D, De Vivo I, et al. Telomere length and risk of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2008; 23: 302-5
- Wafar G, Dragonas C, Brosche T, Dittrich R, Sieber CC, Alecu C, et al. Study of telomere length and different markers of oxidative stress in patients with Parkinson's disease. *J. Nutr Health Aging.* 2011; 15: 277-81
- Wu, Y., Pei, Y., Yang, Z., Li, K., Lou, X., & Cui, W. (2020). Accelerated telomere shortening independent of LRRK2 variants in Chinese patients with Parkinson's disease. *Aging*, 12(20), 20483–20492. <https://doi.org/10.18632/aging.103878>
- Xiao, J., Yuan, Q., Zhang, S., Li, X., Bai, H., Wang, Y., & Duan, S. (2019). The telomere length of peripheral blood cells is associated with the risk of ischemic stroke in Han population of northern China. *Medicine*, 98(7), e14593. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014593>
- Ziegler, D. A., Wonderlick, J. S., Ashourian, P., Hansen, L. A., Young, J. C., Murphy, A. J., Koppuzha, C. K., Growdon, J. H., & Corkin, S. (2013). Substantia nigra volume loss before basal forebrain degeneration in early Parkinson disease. *JAMA neurology*, 70(2), 241–247. <https://doi.org/10.1001>

11. VO. BO. DE LOS ASESORES RESPECTO A LOS CONTENIDOS ACADÉMICOS



Dra. Marisol López López
Prof. Titular "C" TC
Departamento de Sistemas Biológicos,
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Asesora Interna
No. Económico:7808



Dr. Alberto Ortega Vázquez
Prof. Asociado "D" Tc
Departamento de Sistemas Biológicos,
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Asesor Interno
No. Económico:35583