

Enfermedad de Parkinson por mutación vasca de la dardarina (*LRRK2*): estudio epidemiológico, clínico y genético

TESIS DOCTORAL

JAVIER RUIZ MARTÍNEZ

(javier.ruizmartinez@osakidetza.net)

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Memoria presentada para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía
por la Universidad del País Vasco

Donostia-San Sebastián
2012

© Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU)
- *Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Argitalpen Zerbitzua*
- University of the Basque Country - UPV/EHU Press
- **ISBN: 978-84-9082-318-7**

Edita: EDITTEC (Tecnología y Ediciones del Conocimiento, SL)

Imprime: Ediciones Gráficas Rey, SL

Quedan rigurosamente prohibidas, sin la autorización escrita de los titulares del copyright, bajo las sanciones establecidas en la ley, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, y la distribución de ejemplares de esta mediante alquiler o préstamo públicos.

*A mi esposa Itziar, y mis hijos Amaia, Gorka, Leire, Xabier y Aitor.
Todos necesarios e imprescindibles en la consecución de este trabajo*

Parte de esta tesis ha sido publicada en los siguientes manuscritos:

Gorostidi A, **Ruiz-Martínez J**, López de Munain A, Alzualde A, and Martí Massó JF. *LRRK2* G2019S and R1441G mutations associated with Parkinson's disease are common in the Basque Country, but relative prevalence is determined by ethnicity. *Neurogenetics*. 2009;10:157-159.

Martí-Massó JF, **Ruiz-Martínez J**, Bolaño MJ, Ruiz I, Gorostidi A, Moreno F *et al.* Neuropathology of Parkinson's disease with the R1441G mutation in *LRRK2*. *Mov Disord* 2009; 24: 1998-2001.

Ruiz-Martínez J, Gorostidi A, Ibáñez B, Alzualde A, Otaegui D, Moreno F, López de Munain A, Bergareche B, Gómez-Esteban JC, Martí Massó JF. Penetrance in Parkinson's disease related to the *LRRK2* R1441G mutation in the Basque Country (Spain). *Mov Disorders* 2010;25:2340-5

Ruiz-Martínez J, Gorostidi A, Goyenechea E, Alzualde A, Poza JJ, Rodríguez F, Bergareche A, Moreno F, López de Munain A, and Martí Massó JF. Olfactory deficits and Cardiac ¹²³I-MIBG, in Parkinson's disease related to the *LRRK2* R1441G and G2019S mutations. *Mov Disord* 2011. May 24.

ACTA DE GRADO DE DOCTOR
ACTA DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL

DOCTORANDO **Don Javier Ruiz Martínez**

TITULO DE LA TESIS: *Enfermedad de Parkinson por mutación vasca de la dardarina (LRRK2): estudio epidemiológico, clínico y genético*

El Tribunal designado por la Subcomisión de Doctorado de la UPV/EHU para calificar la Tesis Doctoral arriba indicada y reunido en el día de la fecha, una vez efectuada la defensa por el doctorando y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado por _____ la calificación de:
unanimidad ó mayoría

Idioma/s defensa: _____

En _____ a _____ de _____ de _____

EL/LA PRESIDENTE/A,

EL/LA SECRETARIO/A,

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: _____

Dr/a: _____

VOCAL 1º,

VOCAL 2º,

VOCAL 3º,

Fdo.:

Fdo.:

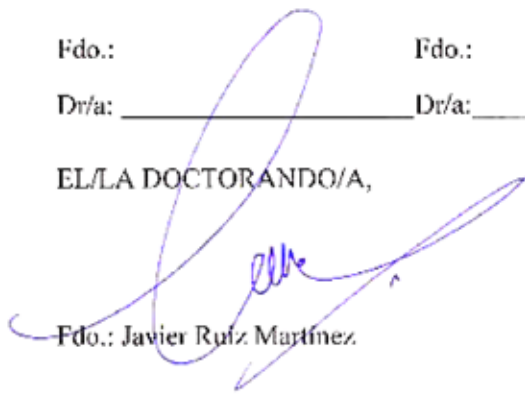
Fdo.:

Dr/a: _____

Dr/a: _____

Dr/a: _____

EL/LA DOCTORANDO/A,


Fdo.: Javier Ruiz Martínez

CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO

El Consejo del Departamento de Neurociencias, en reunión celebrada el día 28 de marzo de 2012, ha acordado dar la conformidad a la admisión a trámite de presentación de la Tesis Doctoral titulada:

*“Enfermedad de Parkinson por mutación vasca de la dardarina (LRRK2):
estudio epidemiológico, clínico y genético”*

dirigida por los Dres. José Félix Martí Massó y Adolfo López de Munain Arregui y presentada por Don Javier Ruiz Martínez ante este Departamento

En Leioa, a 28 de marzo de 2012

Vº Bº DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO


Fdo.: Pedro Grandes Moreno

SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO


Fdo.: Rafael Sarria Aróstegui



Universidad Euskal Herriko
del País Vasco Unibertsitatea

**AUTORIZACION DEL/LA DIRECTOR/A DE TESIS
PARA SU PRESENTACION**

Dr. José Félix Martí Massó con N.I.F. 39628956-W y **Dr. Adolfo López de Munain Arregui** con N.I.F. 16246491-G, como Directores de la misma, avalamos el Proyecto de Tesis Doctoral titulado:

*“Enfermedad de Parkinson por mutación vasca de la dardarina (LRRK2):
estudio epidemiológico, clínico y genético”*

realizada en el Departamento de Neurociencias por el Doctorando **Don Javier Ruiz Martínez**,

autorizamos la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En Donostia, a 8 de marzo de 2012

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Fdo.: José Félix Martí Massó

Fdo.: Adolfo López de Munain Arregui

Índice

<i>Agradecimientos</i>	15
<i>Abreviaturas</i>	21
<i>Índice de tablas y figuras</i>	23
Introducción	27
1. La enfermedad de Parkinson: nota histórica y nosológica	27
2. Epidemiología descriptiva	28
2.1. Prevalencia e incidencia	28
2.2. Estudios en España	29
2.3. Impacto económico-social	29
3. Cambios en la forma de entender la enfermedad.....	30
3.1. De idiopática a hereditaria	30
3.2. Una enfermedad motora con síntomas no motores.....	31
3.2.1. La fase premotora de la enfermedad.....	31
3.2.2. Correlación de la fase premotora con la neuropatología	31
4. Una enfermedad con etiología indeterminada: genética-ambiente	33
4.1. Influencia ambiental	33
4.2. La carga genética.....	35
4.2.1. Estudio de casos y controles	36
4.2.2. Estudios de gemelos	36
4.3. Alteraciones epigenéticas	36
5. Formas monogénicas de Enfermedad de Parkinson: las diferentes mutaciones	37
5.1. PARK1/PARK4: <i>SNCA</i>	37
5.2. PARK2: <i>PRKN</i>	38
5.3. PARK3	39
5.4. PARK5: <i>UHCL1</i>	39
5.5. PARK6: <i>PINK1</i>	40
5.6. PARK7: <i>DJ-1</i>	40
5.7. PARK9: <i>ATP13A2</i>	41
5.8. PARK11: <i>GIGYF2</i>	41

5.9. PARK15: <i>FBX07</i>	42
5.10. Otros genes candidato	42
5.10.1. PARK13: <i>HTRA2</i>	42
5.10.2. <i>GBA</i>	42
5.11. Otros loci identificados por ligamiento	43
5.11.1. PARK10. Relación con la edad de inicio.....	43
5.11.2. PARK12: <i>Xq21-q25</i>	43
5.11.3. PARK14: <i>PLA2G6</i>	43
5.12. Genome-wide association: GWA.....	43
5.12.1. PARK16.....	43
6. La irrupción del PARK8: un fenotipo similar con una neuropatología variable	45
6.1. De la familia Sagamihara a la dardarina	45
6.2. Las diferentes mutaciones en <i>LRRK2</i>	45
6.3. Fenotipo clínico de los portadores de mutaciones en <i>LRRK2</i>	46
6.4. Una neuropatología variable.....	49
7. Biomarcadores en la enfermedad de Parkinson.....	50
7.1. Los Biomarcadores en el diagnóstico precoz y diagnóstico diferencial.....	50
7.2. Biomarcador ideal.....	50
7.3. Marcadores clínicos: Estudio de síntomas no motores.....	51
7.3.1. Estudio del sistema autónomo mediante gammagrafía cardiaca con metaiodoben- zilguanidina (MIBG)	51
7.3.2. Estudio del olfato	52
7.4. Marcadores de imagen	52
7.4.1. Neuroimagen funcional mediante PET y DATSCAN.....	52
7.4.2. Resonancia magnética (RM)	53
7.4.3. Estudio de Sustancia Negra mediante ultrasonografía	54
7.5. Marcadores biológicos en correlación con las diferentes hipótesis patogénicas en la EP	55
8. Los portadores de mutaciones como modelo de estudio de la EP: la mutación R1441G	57
9. La EP asociada a mutaciones en <i>LRRK2</i> : un modelo diferente de neurodegeneración.....	58
Hipótesis	59
Objetivos	61
Material y métodos	63
1. Pacientes, familiares y grupo control	64
1.1. Total de individuos de la base de datos	64
1.2. Individuos para el estudio de la prevalencia de las mutaciones R1441G y G2019S en nuestra serie de pacientes con EP	64
1.3. Individuos para el estudio de la prevalencia geográfica de las mutaciones R1441G y G2019S en una muestra poblacional	65
1.4. Individuos del estudio de penetrancia de la mutación R1441G:.....	69
2. Obtención de datos clínicos para los diferentes estudios: protocolo clínico	69
3. Estudio genético.....	70
4. Estudio neuropatológico	70

5. Estudio de marcadores en pacientes y familiares: olfato, gammagrafía cardíaca con MIBG y ultrasonografía transcraneal de sustancia negra	71
5.1. Estudio del olfato	71
5.2. Gammagrafía cardíaca	72
5.3. Ultrasonografía transcraneal de sustancia negra	73
6. Estudio estadístico.....	73
6.1. Estudio de penetrancia de la mutación R1441G	73
6.2. Estudio de marcadores clínicos y de neuroimagen: estudio de disfunción olfatoria, gammagrafía cardíaca con MIBG, y ultrasonografía transcraneal de sustancia negra.....	74
6.3. Estudio comparativo de fenotipo clínico entre portadores de mutaciones R1441G y G2019S	74
Resultados	75
1. Estudio de prevalencia de las mutaciones R1441G y G2019S en pacientes con EP esporádica y familiar	75
2. Estudio de penetrancia de la mutación R1441G	77
3. Estudio de prevalencia de las mutaciones R1441G y G2019S en una muestra poblacional	79
3.1. Estudio sobre los individuos contactados	80
3.1.1. Pacientes con diagnóstico de EP	81
3.1.2. Individuos con parkinsonismo	81
3.1.3. Familiares asintomáticos	82
3.1.4. Individuos “sanos”	82
3.2. Estudio sobre los individuos no contactados	83
3.2.1. Pacientes con diagnóstico de EP	84
3.2.2. Pacientes con otros posibles parkinsonismos.....	84
3.2.3. Familiares asintomáticos	84
3.2.4. Individuos considerados “sanos”	84
3.3. Resultados globales sobre el total de la muestra.....	84
3.3.1. Pacientes con diagnóstico de EP.....	84
3.3.2. Total de portadores.....	85
3.3.3. Otros diagnósticos	86
4. Fenotipo clínico y curso evolutivo de las mutaciones R1441G y G2019S.....	86
4.1. Características clínicas de los pacientes con EP asociada a la mutación R1441G	87
4.1.1. Procedencia y edad.....	87
4.1.2. Síntomas motores, escalas, medicación, y complicaciones	87
4.1.3. Síntomas no motores.....	87
4.1.4. Análisis comparativo con la mutación G2019S	88
4.2. Curso evolutivo en pacientes portadores de R1441G y G2019S.....	89
4.2.1. Tiempo en aparición de complicaciones motoras	89
4.2.2. Tiempo en modificar la puntuación en la escala H&Y	89
4.2.3. Tiempo en adquirir otras complicaciones.....	89
4.2.4. Estudio comparativo con la mutación G2019S	90
5. Estudio neuropatológico	90
5.1. Caso Clínico	90
5.2. Hallazgos neuropatológicos	91
6. Estudio de marcadores clínicos en portadores de la mutación R1441G	92

6.1. Estudio de disfunción olfatoria	92
6.2. Estudio de función simpática mediante escintigrafía cardíaca con MIBG	94
7. Estudio de marcadores de imagen en portadores de la mutación R1441G	96
7.1. Estudio de vía nigroestriada mediante ultrasonografía transcraneal	96
Discusión	101
1. Prevalencia de las mutaciones R1441G y G2019S	102
1.1. Prevalencia en nuestra serie: determinar su origen étnico	102
1.2. Prevalencia de las mutaciones R1441G y G2019S en una muestra poblacional: Azpeitia y Azkoitia	104
2. Penetrancia de la mutación R1441G	105
3. Fenotipo clínico y curso evolutivo de las mutaciones R1441G y G2019S	108
4. Estudio Neuropatológico	110
5. Marcadores clínicos en portadores de la mutación R1441G	112
5.1. Estudio del olfato y función simpática mediante gammagrafía cardíaca con MIBG	112
6. Marcadores de imagen	115
6.1. Estudio de vía nigroestriada mediante ultrasonografía transcraneal (UTC)	117
7. Líneas futuras	117
7.1. Marcadores moleculares: estudio de los miRNA	117
7.2. Factores genéticos modificadores: Estudio de mutaciones en GBA	118
7.3. Marcadores neuropsicológicos	118
7.4. Estudio de factores ambientales	119
7.5. Estudio de síntomas no-motores e integridad de la vía nigroestriada en portadores asintomáticos de mutaciones en el gen <i>LRRK2</i> : Estudio ASAP	119
7.6. Estudio de formas mendelianas de EP	120
7.7. Estudios epigenéticos	120
Conclusiones finales	121
Referencias bibliográficas	123
1. Publicaciones	123
1.1. Referencias previas de miembros del grupo	123
1.2. Artículos directamente relacionados	124
2. Bibliografía	124
Anexos	141
1. Informes de evaluación por el comité de ética de los diferentes proyectos	141
2. Consentimiento informado para estudio genético	145
2.1. Hoja de Consentimiento informado para estudio genético en EP	145
2.2. Hoja de información para el paciente, familiar, o control dentro del estudio genético en EP	146
3. Plantilla de obtención de datos clínicos de pacientes, familiares asintomáticos, e individuos del estudio poblacional	147
3.1 Registro de datos clínicos de pacientes, familiares, o controles	147
3.2. Registro de datos clínicos de individuos en el estudio epidemiológico	148
4. Carta de información para participar en el estudio epidemiológico	149

Agradecimientos

No es difícil, sino imposible, nombrar en este apartado a todos aquellos que han intervenido en esta obra. Puede que no sea mi trabajo más importante desde el punto de vista científico, pero sí una oportunidad que me permite hacer un repaso de los hechos, y las personas que han empujado este proyecto, y dejar así constancia de mi enorme agradecimiento.

Me tengo que remontar a mis primeras prácticas de anatomía con las piezas que compraba mi madre en el bilbaíno mercado de la Ribera. Parece que algo se estaba fraguando. En Pamplona, Carlos Saga, Fernando Unceta y Kike Noé fueron testigos de unos años inolvidables, que se prolongaron un año más en Oviedo, donde apareció la figura de Pep Sala. La Medicina comienza a ser una realidad de la mano de Evelia, acompañado entonces de otros residentes noveles como Karlos Reviejo, Begoña Azkarate, Ainhoa Vicario, Juanjo Intxausti, e Isaak Plazaola.

Le toca ya el turno a la Neurología, y el primer contacto con los directores de esta tesis. Ambos me impresionaron en su inicio. El Dr. López de Munain tardó menos de 2 minutos en preguntar si tenía intención de hacer la tesis doctoral. Creo que dije que sí, aunque he tardado en materializarlo 17 años. En todos ellos he mantenido con él un contacto cercano con auténtica admiración. El Dr. Martí Massó mostraba vitalidad e ideas desde el primer momento. No hay palabras para definir la formación científica y humana que logré en años posteriores. Jefe, amigo, en ocasiones padre, y sin duda ejemplo. Adelanto mi gratitud, y el honor que supone tener esta dirección de tesis.

Los años de residencia fueron especiales. La experiencia de Edurne, Miguel como adjunto preferido por todos, y el resto de adjuntos del Servicio de Neurología del Hospital Donostia, aportaron sus conocimientos y cercanía. Son Juanjo, Patxi, Bixen, Begoña, Ramón, Xabier, Iñaki, Sandro y Alberto. Más adelante he podido contar con la compañía de Héctor, Juan Carlos, Asier, Mari José Bolaños, Carlos, Félix, y Sebastián. Sin duda mis compañeros de residencia merecen mención especial. La genial Marta, Agustín “el gallego” y mi residente mayor Ana me acogieron como su “R pequeño”, y comenzaron a despejarme dudas. Maitetxu, Fermín, y Maite Mendi, como residentes posteriores con los que estuve igual de encantado. Itxaso, Ainhoa, Gerardo, Miren, Tamara, Alazne, Izaskun, Eli, Noemí, Maialen y Patricia más adelante, todos ellos con su aportación. En este contexto no puedo olvidar a mi compañero de piso y estupendo Cirujano Asier Martín, y los “consejos de vida” de Maite Serrano, y de quien siempre será nuestro secretario, aunque ya no esté con nosotros: Joaquín Aramberri.

De forma paralela a mi formación como residente, iba creciendo el Laboratorio de Neurogenética. Allí he ido encontrando explicación a numerosas cuestiones básicas. Ana Cobo, Amets Sáez, David Otaegui, Pili Camaño, Coro Paisán, y Asun Iribarren en sus comienzos, y Ana Gorostidi, Ainhoa Alzualde, María Goicoechea, Andone Sistiaga y Ana Aiastui posteriormente, sin olvidar a, Vanessa, Maider, Haritz y Belén Gago, así como el resto de compañeros del Laboratorio. David ha sido una pieza clave, y en labores menos gratas pero fundamentales tengo que reconocer y agradecer la labor de Kar mele y Leyre por su eficacia como secretarías poniendo orden a nuestro trabajo y acomodando nuestra agenda. También puntualmente, pero de forma igualmente eficaz Estibaliz Goyenechea, y Berta Ibáñez colaboraron aportando sus conocimientos en el análisis estadístico, y Anabel Asensio y Maripi Etxart con su apoyo en los ensayos clínicos. Os agradezco a todos vuestra paciencia y cercanía. Es justo reconocer, la labor de Coro Paisán, y Ana Gorostidi dentro de este gran grupo. Coro inició los estudios genéticos en la enfermedad de Parkinson, bien asesorada por Jordi Pérez-Tur desde Valencia, y Ana es la principal responsable de los estudios moleculares, fundamentales en la consecución de este trabajo. Gracias Ana.

Mis primeros años como adjunto me permitieron contactar con compañeros del Hospital de Mendaro. Nicolás Gurrutxaga por su confianza en un residente recién terminado, Miren, Elena y Koro en el papel de auxiliares, Magdalena por ser todo humanidad, y el resto de “compañeros del coche” como Pilar, Joserra, Ainoha, Ana, Inma, y Nekane.

De vuelta al Hospital Donostia tengo que destacar a las enfermeras y auxiliares que me han hecho el trabajo más fácil. Idoia, Begoña, Marisol, Carmen, y Josune son un ejemplo. En los últimos años Myriam Barandiaran, y Ainara Estanga han hecho algo más que analizar el perfil neuropsicológico de nuestros pacientes. Su compañía ha sido de enorme importancia.

Han colaborado activamente en los estudios a nuestros pacientes, Ana de Arce y Maite Martínez, aportando sus conocimientos en Neurosonología. Externamente Paco Rodríguez y Ramón Querejeta desde Onkologikoa nos han ayudado en la realización e interpretación de la gammagrafía cardiaca. Es justo reconocer como ha facilitado el trabajo el personal de los ambulatorios de Azpeitia y Azkoitia. Todos entendieron el objetivo del estudio, y permitieron su desarrollo. Otros profesionales han intervenido con sus consejos como Adolfo Mínguez del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, y Juan Carlos Gómez del Hospital de Cruces. También mi agradecimiento a Mari Cruz Rodríguez-Oroz inicialmente en la Clínica Universitaria de Navarra, y actualmente como un miembro más de nuestra Unidad de Trastornos del Movimiento. Su aportación en esta fase final de la tesis ha sido muy enriquecedora. Destacar también el papel destacado en el campo de la Neuropatología, de Cristina Caballero del Hospital Donostia y de Teresa Tuñón e Isidro Ferrer desde Pamplona y Barcelona. Sus aportaciones han sido de indudable importancia.

La mayoría de los estudios han sido avalados por la concesión de subvenciones. No podemos olvidar su importancia, y por ello agradecer a la Fundación Ilundain, FIS, Gobierno Vasco, Diputación de Gipuzkoa, y la *Michael J. Fox Foundation* que creyeran en nuestros proyectos. Además de contar con apoyo económico, el programa de intensificación otorgado por CIBERNED ha impulsado esta tesis doctoral. Se lo agradezco a José López Barneo, y Michael Patterson como responsables de esta red.

En los últimos meses este trabajo se ha visto engrandecido por la colaboración especial de Alberto Bergareche, Ana Gorostidi, Ainara Estanga, Elisabet Mondragón, Mari Cruz Rodríguez-Oroz, y los directores de tesis, que me han brindado un tiempo extra, y grandes consejos para su final consecución. Gracias por este final feliz.

Son muchas las personas nombradas, y seguro que habrá otras que también deberían figurar, pero quién no puede faltar es mi familia. Mis padres consiguieron mantener “mi ilusión” a pesar de las dificultades, y mis hermanos me dieron todo su apoyo. Mi padre hubiera sido una de las personas que más hubiera disfrutado con este trabajo.

Toca por fin hablar de los auténticos artistas de este estudio (Amaia, Gorka, Leire, Xabier y Aitor), dirigidos de forma increíble por quien es protagonista en la sombra: Itziar. En ellos siempre he encontrado esa sonrisa de vida. Reconozco que he sido consecuente con las circunstancias que he elegido para iniciar y terminar esta tesis, contando con este inigualable apoyo. Os quiero.

Todas estas personas me han aportado experiencia, conocimientos y amistad, y los pacientes con enfermedad de Parkinson, y sus familiares me han enseñado a estar al otro lado de la mesa. Gracias a todos ellos, y en especial a mis directores de tesis: José Félix y Adolfo.

Bihotzez, eskerrik asko denoi.

biodonostia
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES

ciberNed



Gipuzkoako Foru Aldundia
Diputación Foral de Gipuzkoa



is
Instituto
de Salud

FUNDACIÓN
MUTUAMADRILEÑA



THE MICHAEL J. FOX FOUNDATION
FOX
PARKINSON'S
RESEARCH

MeFoPa disease
Parkinson's
Medication



Osakidetza
DONOSTIA UNIBERTSITATE OSPITALEA
HOSPITAL UNIVERSITARIO DONOSTIA

Enfermedad de Parkinson por mutación vasca de la dardarina (*LRRK2*): estudio epidemiológico, clínico y genético

Tesis presentada por Javier Ruiz Martínez
al Departamento de Neurociencias

Bajo la supervisión de José Félix Martí Massó
y Adolfo López de Munain

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Facultad de Medicina
Universidad del País Vasco

Febrero de 2012

Abreviaturas

AADC:	Enzima decarboxilasa de aminoácidos aromáticos
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADC:	Coefficiente medio de difusión aparente
AMS:	Atrofia multisistémica
AD:	Autosómico dominante
AR:	Autosómico recesivo
AR-PJ:	Parkinsonismo juvenil autosómico recesivo
BDNF:	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
B-SIT:	Test abreviado de identificación del olfato (<i>Brief Smell Identification Test</i>)
CL:	Cuerpos de Lewy
cM:	CentiMorgan
Col:	Colaboradores
COR:	C-terminal of Roco
CV:	Coefficiente de variación
DA:	Dopamina
DAT:	Transportador presináptico de la Dopamina
DCB:	Degeneración córtico basal
DDC:	Dopadecarboxilasa
DCL:	Demencia con cuerpos de Lewy
DTI:	Imágenes con tensor de difusión
DWI:	Imagen potenciada en difusión
EA:	Enfermedad de Alzheimer
EG:	Enfermedad de Gaucher
EP:	Enfermedad de Parkinson
FA:	Anisotropía fraccionada
FPG:	Familiares en primer grado
GBA:	Gen de la glucocerebrosidasa
GWA:	<i>Genomic Wide Association</i>
H/M:	Coefficiente corazón / Mediastino (<i>Heart / mediastinum</i>)
H&E:	Hematoxilina-eosina
H&Y:	Hoehn & Yahr
kb:	Kilobases
kDa:	KiloDalton

LCR:	Líquido cefaloraquídeo
L-dopa:	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LRR:	Repeticiones ricas en leucina
<i>LRRK2</i> :	<i>Leucina rich repeat kinase 2</i> (cinasa rica en repeticiones de Leucina 2)
LSP:	Linfocitos en sangre periférica
Mb:	Megabases
miRNA:	Micro RNAs
MIBG:	Metaiodobenzilguanidina
MMS:	Escala Minimental (<i>Minimal scale</i>)
MPTP:	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
nm:	Nanómetros
NL:	Neuritas de Lewy
OMIM:	Online Mendelian Inheritance in Man (www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM)
ON:	Ovillos neurofibrilares
OR:	Odds Ratio
pb :	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PET:	Tomografía de emisión de positrones
PINK1:	potencial cinasa 1 inducida por PTEN (<i>phosphatase and tensin homolog</i>)
PSP:	Parálisis supranuclear progresiva
ROC:	<i>Ras of complex proteins</i>
RM:	resonancia magnética
RR:	Riesgo relativo
SCB:	Síndrome corticobasal
SD:	Desviación estandar (<i>Standard deviation</i>)
SN:	Sustancia negra
SNC:	Sustancia negra, <i>pars compacta</i>
SNC:	Sistema nervioso central
SNP:	Polimorfismo de un solo nucleótido
SPECT:	Tomografía computerizada por emisión de un único fotón
SPI:	Síndrome de piernas inquietas
SRA:	Síndrome rígido-acinético
SWI:	<i>Susceptibility-Weighted Imaging</i>
TCE:	Traumatismo craneo encefálico
TCREM:	Trastorno de conducta del sueño REM
TE:	Temblor esencial
TH:	Trosina hidroxilasa
UB:	Ubiquitina
UCHL1:	Ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1
UPDRS:	Escala unificada para la evaluación de la enfermedad de Parkinson (<i>Unified Parkinson Disease Rating Scale</i>)
UPS:	Sistema ubiquitina-proteosoma
UPSIT:	Test de la Universidad de Pennsylvania para la identificación del olfato (<i>University of Pennsylvania Smell Identification Test</i>)
UTC:	Ultrasonografía transcraneal
VMAT2:	Transportador vesicular de monaminas

Índice de tablas y figuras

Tablas

Tabla 1: Loci relacionados con la EP	44
Tabla 2: Prevalencia estimada de la mutación G2019S en raza caucásica, judíos Askhenazi y población africana (Ozelius y cols. 2006; Lesage y cols. 2005).....	47
Tabla 3: Casos descritos con estudio neuropatológicos en pacientes con EP asociada a mutaciones en <i>LRRK2</i>	49
Tabla 4: Biomarcadores estudiados en pacientes y en controles, tanto en LCR como en tejido cerebral (tabla adaptada de van Dijk y cols. 2010).....	56
Tabla 5: Distribución de la muestra del estudio poblacional.....	66
Tabla 6: Distribución de la muestra del estudio de penetrancia	68
Tabla 7: Características demográficas y genéticas de la población analizada para las mutaciones R1441G y G2019S	76
Tabla 8: Proporción de familiares en primer grado (FPG) sintomáticos y asintomáticos con estudio genético agrupados por edades (casos probando excluidos).....	77
Tabla 9: Penetrancia de la mutación R1441G en la EP. Estimación e intervalos de confianza por edad en los portadores excluyendo los probandos, y comparación con el <i>método de imputación</i> incluyendo los probandos	78
Tabla 10: Características de los individuos de la muestra contactada, distribuidos por grupos según condición	80
Tabla 11: Características de los pacientes con diagnóstico de EP, y de los que se ha detectado parkinsonismo, en el total de la muestra	85
Tabla 12: Características de los pacientes portadores de mutaciones R1441G y G2019S	88
Tabla 13: Características de los síntomas motores en pacientes portadores de mutaciones R1441G y G2019S	88
Tabla 14: Características de los síntomas no motores en pacientes portadores de mutaciones R1441G y G2019S.....	89
Tabla 15: Curso evolutivo de los pacientes con EP asociada a la mutación R1441G y a la mutación G2019S. Tiempo en años para alcanzar las diferentes situaciones desde el inicio clínico	90
Tabla 16: Características clínicas en pacientes con EP dependiendo de su carga genética, evaluado a través del test de identificación olfatoria B-SIT (n=190), y de la gammagrafía cardiaca con MIBG (I123-metaiodobencilguanidina) [n=90].....	93

Tabla 17: Distribución de la frecuencia de disfunción olfatoria en función de la carga genética en pacientes con EP (n=190)	94
Tabla 18: Diferencias en la distribución de la captación cardiaca de MIBG (¹²³ I-metaiodobenzilguanidina) según los parámetros de la gammagrafía en función de la carga genética (n=90).....	94
Tabla 19: Relación entre déficit olfatorio y captación cardiaca de MIBG según los parámetros de la gammagrafía, mediante el análisis de la distribución de frecuencias (n=90)	95
Tabla 20: Características clínicas dependiendo de la carga genética en pacientes con EP y en familiares asintomáticos	96
Tabla 21: Diferencias en la distribución de frecuencias en los valores de la UTC en función de la carga genética en pacientes con EP y en familiares asintomáticos.....	98

Figuras

Figura 1: Portada de la monografía (<i>An essay on the shaking palsy</i>). James Parkinson 1817.....	27
Figura 2: Incidencia de EP distribuida por edad y sexo. (Van Den Eeden, y cols. 2003)	29
Figura 3: Progresión del proceso neurodegenerativo según Braak y colaboradores. Estadios 1 y 2. (Braak, y cols. 2003)	32
Figura 4: Estadios 2, 3 y 4. (Braak, y cols. 2003)	32
Figura 5: Estadios 4, 5 y 6. (Braak, y cols. 2003)	32
Figura 6: PET con 18F-fluorodopa en paciente con EP asociada a mutación R1441G: disfunción nigroestriada típica de la EP. Se aprecia hipocaptación nigroestriada típica de la EP	45
Figura 7: Dominios funcionales de la proteína dardarina, y las diferentes mutaciones identificadas (en rojo las mutaciones consideradas patógenas). [Lesage y cols. 2009].....	46
Figura 8: Página de acceso al sistema de información asistencial <i>Osabide</i>	65
Figura 9: Municipios de Azpeitia y Azkoitia en la provincia de Gipuzkoa	67
Figura 10: Centro de Salud de Azkoitia (Gipuzkoa)	67
Figura 11: Centro de Salud de Azpeitia (Gipuzkoa)	67
Figura 12: Test de identificación olfatoria B-SIT	71
Figura 13: Cuestionario empleado para aplicar el test de identificación olfatorial B-SIT	72
Figura 14: Frecuencias publicadas de las mutaciones G2019S y R1441G, en las diferentes regiones de la península ibérica de acuerdo con la literatura. Las frecuencias se expresan en número de pacientes portadores por el total de pacientes analizados en cada estudio.....	76
Figura 15: Incidencia acumulada para el total de la muestra (a) y según el sexo (b), empleando los casos estudiados, y excluyendo los casos probando	78
Figura 16: Despigmentación de SN	91
Figura 17: Procesos de inflamación neuronal alfaB-cristalina (flecha), con contenido granular fino, e inclusiones positivas para alfaB-cristalina (flecha larga), junto con pérdida moderada de neuronas pigmentadas, y gránulos libres de neuromelanina (punta de flecha) en el neuropilo. Sección de parafina, inmunohistoquímica α B-cristalina con hematoxilina. Bar = 25 micras.....	91
Figura 18: Inmunocitoquímica. α -sinucleína (-)	92
Figura 19: Inmunocitoquímica. Ubiquitina (-)	92
Figura 20: Inmunocitoquímica. Tau (-)	92

Figura 21: Imágenes de gammagrafía cardiaca con MIBG, en fase precoz y tardía, en un individuo sano (a), y en paciente con EP asociada a mutación R1441G (b)	95
Figura 22: Imágenes de Ultrasonografía transcraneal (UTC) en paciente con EP sin mutación (a), y en familiar asintomático portador de la mutación R1441G (b)	97
Figura 23. Área de ecogenicidad de SN en función de los grupos (controles, familiares asintomáticos, y pacientes con EP).....	99

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas han cobrado una especial importancia en los últimos años. El progresivo envejecimiento de la población, la mayor concienciación ciudadana, y el avance en los métodos de diagnóstico y tratamiento, pueden justificar su mayor presencia en nuestra práctica médica diaria. La etiopatogenia permanece desconocida en la mayoría de ellas, y a pesar de poder detectarse marcadores precoces en algunas de estas enfermedades, seguimos sin contar con medidas neuroprotectoras eficaces.

La enfermedad de Parkinson (EP) es en frecuencia la segunda enfermedad neurodegenerativa por detrás de la enfermedad de Alzheimer (EA) [Gasser, 2005]. Los avances científicos de la última década han cambiado la forma de entender esta enfermedad, tanto desde el punto de vista clínico, como en los diferentes mecanismos etiopatogénicos implicados.

En esta introducción actualizamos las características epidemiológicas, clínicas y etiopatogénicas, con especial atención a los hallazgos genéticos, que han contribuido especialmente a estos cambios.

1. La enfermedad de Parkinson: nota histórica y nosológica

La EP se identifica como entidad nosológica a principios del siglo XIX, pero tiene una dilatada historia previa. Existen descripciones bíblicas, egipcias, galénicas y anotaciones de científicos del siglo XVII sobre el temblor, la festinación y otros trastornos de la marcha. La EP sale realmente a la luz en 1817, por medio de James Parkinson (1755-1824) y su influyente monografía (*An essay on the shaking palsy*) (figura 1), donde describe de forma

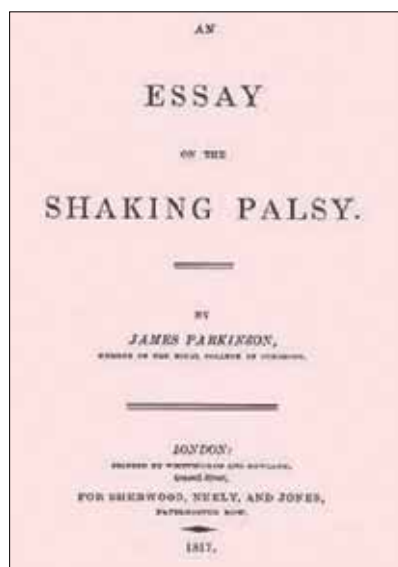


FIGURA 1

Portada de la monografía *An essay on the shaking palsy*.
James Parkinson 1817

meticulosa las manifestaciones motoras cardinales de la enfermedad, con especial referencia a la presencia de temblor (Goetz, y cols. 2002). Sin embargo, no es hasta cuatro décadas después cuando Jean-Marie Charcot en 1861 añade la rigidez al fenotipo clínico, y se le da el nombre de enfermedad de Parkinson.

La EP es definida clásicamente como un trastorno motor caracterizado clínicamente por la presencia de temblor de reposo, rigidez, y bradicinesia. Estos síntomas son la consecuencia de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* (SNc), y la consiguiente pérdida de dopamina (DA) en el estriado, fundamentalmente en el territorio motor (putamen dorsal) [Lees y cols. 2009], que justifica su buena respuesta a la medicación dopaminérgica.

Patológicamente se caracteriza por la presencia de cuerpos de inclusión eosinofílicos (cuerpos de Lewy, CL) en su citoplasma, y en sus terminales (Neuritas de Lewy, NL), constituidas principalmente por depósitos de α -sinucleína, como hallazgo neuropatológico característico, distribuidos en SNc y en otras estructuras como el *locus ceruleus*. A día de hoy, sigue siendo controvertido el papel fisiopatológico de los CL, y es desconocida la razón última por la que ocurre esta degeneración neuronal selectiva. Recientemente Double y colaboradores (Double y cols. 2010) han descrito un incremento de expresión de factores que pueden incrementar esta vulnerabilidad, y un déficit de elementos neuroprotectores. Todo ello podría contribuir a entender la mayoría de los mecanismos etiopatogénicos implicados, como el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la apoptosis.

2. Epidemiología descriptiva

2.1. Prevalencia e incidencia

La prevalencia e incidencia se determina en base a criterios clínicos, y los métodos de detección varían de unos estudios a otros.

La prevalencia estimada en estudios comunitarios y “puerta a puerta” oscilan entre 18 por 100.000 habitantes en Shangai (Shi y cols. 1987), y 901 por 100.000 habitantes en Cantalejo (Segovia) [Claveria y cols 2002]. La prevalencia de la enfermedad varía según la población, siendo mayor en Europa y América del Norte, que en Asia o África (Li y cols. 1985; Schoenberg y cols. 1988). En este momento se estima en un 1-2% en personas mayores de 65 años, y aumenta hasta el 4-5% a los 85 años de edad (de Rijk y cols. 2000; Elbaz y cols. 1999). Aunque la incidencia de la enfermedad es edad dependiente, con el pico de mayor incidencia en la séptima década de la vida, puede aparecer en cualquier edad, siendo excepcional por debajo de los 30 años. La mayoría de los estudios indican que el sexo no puede ser considerado un factor de riesgo significativo en su etiología (Shulman y cols. 2002; Van Den Eeden y cols. 2003) [figura 2], aunque se describe una mayor predisposición a padecer la enfermedad en el género masculino, con un riesgo relativo en hombres de 2,55 frente a las mujeres (Benito-León y cols. 2004).

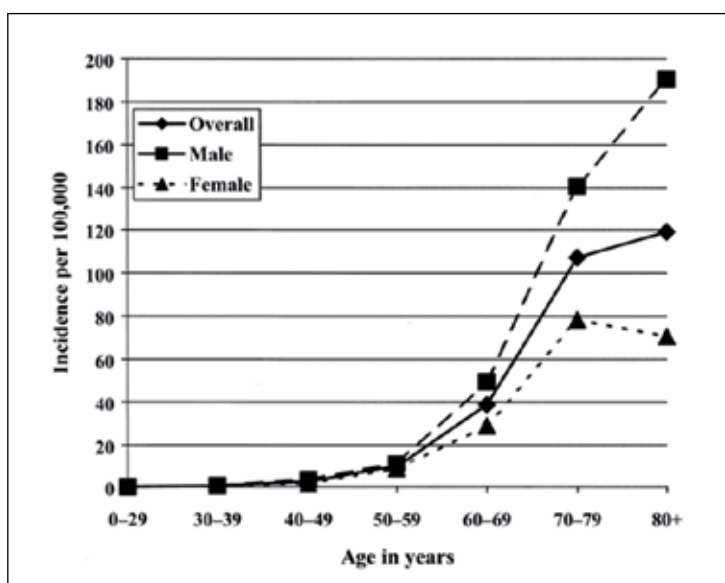


FIGURA 2
 Incidencia de EP distribuida por edad y sexo (Van den Eeden y cols., 2003)

2.2. Estudios en España

En estudios recientes en nuestro medio, la EP presenta una tasa de incidencia de 187 sujetos por 100.000 personas/año, en individuos de más de 65 años (Benito-León y cols. 2004). Se ha estimado una prevalencia poblacional de 1,7 casos por mil habitantes en España.

Centrando el estudio en el País Vasco, y concretamente en la provincia de Gipuzkoa, trabajos previos de nuestro grupo determinaron los datos epidemiológicos referentes al parkinsonismo, en los municipios de Irún y Hondarribia en la comarca del Bidasoa. En este estudio (Bergareche y cols. 2004) se pudo determinar una prevalencia según grupos de edad de 0.4 % (65-74 años), 4.7% (75-84 años), y 2.9% (> o =85 años) para la EP, y de 0.7%, 2%, y 3.9 % para el parkinsonismo en general, respectivamente. Estas cifras de prevalencia se ajustaban a las observadas en otros estudios europeos.

2.3. Impacto económico-social

A nivel económico, el coste anual de la EP en España fue estimado en 2006 sobre un registro realizado entre los años 1998 y 2000 (Abásolo-Osinaga y cols. 2006). La cifra ascendía a 58 millones de euros, considerando únicamente el coste derivado de la medicación empleada en su tratamiento. Además, se ha estimado la carga que supone la enfermedad en España, en cuanto a parámetros de discapacidad ajustados a la edad, años de vida perdidos, y años de vida con discapacidad, con costes por encima de las obtenidas en otros países de Europa, como Holanda (Cubo y cols. 2005). El coste socioeconómico de la EP se incrementa conforme progresa la incapacidad motora y no motora (Keränen y cols. 2003; Winter y cols. 2010; von Campenhausen y cols. 2011), siendo la demencia uno de los factores con mayor impacto. Se estima que el coste

socioeconómico medio por año y paciente es de 20.095 €, de los que la partida más alta se deriva de los cuidados del paciente tanto domiciliarios como en residencias especiales (3.789 €/año) [Winter y cols. 2010].

3. Cambios en la forma de entender la enfermedad

3.1. De idiopática a hereditaria

En los últimos años, la investigación ha conseguido una serie de logros que nos han situado en un escenario inesperado hace menos de una década.

La EP siempre había sido considerada una enfermedad no hereditaria a pesar de la existencia de formas familiares con un patrón mendeliano autosómico dominante (AD). De hecho, uno de los criterios de diagnóstico más empleados como son los diseñados por el Banco de Cerebros del Reino Unido, definía la EP, entre otras características, por la ausencia de antecedentes familiares de la enfermedad (Hughes y cols, 1992). La irrupción de la genética, y los estudios de ligamiento en particular, consiguieron cambiar esta idea, encontrándose una historia familiar positiva de EP en el 10,3% de los casos, y en el 3,5% de los controles (Elbaz y cols 1999). Esta tendencia era aún mayor en los casos de comienzo precoz.

En 1997 se descubrió la primera variante hereditaria de parkinsonismo, que establecía conexión entre la EP y una mutación en un único gen, el *SNCA* (Polymeropoulos y cols. 1996). En años posteriores fueron identificados otros locus (*PRKN*, *DJ-1*, *PINK1*, *LRRK2*) que abrían la puerta a una nueva forma de entender la etiología de la enfermedad, y de alguna forma desmantelaba esa idea inicial de la EP como enfermedad casi exclusivamente esporádica. Las primeras descripciones de casos de EP que pertenecían a familias en las que la enfermedad se presentaba con mayor frecuencia de lo habitual, fueron realizadas a principios de los años 80 del pasado siglo por Golbe (Golbe y cols. 1990). Estas familias compartían un origen geográfico común en la ciudad italiana de Contursi, y presentaban un fenotipo de EP típica. Era el comienzo de una fructífera búsqueda de genes que todavía continúa. Sin embargo, no todas las mutaciones patógenas que se iban describiendo mostraban el fenotipo característico de la enfermedad. La EP clásica con el fenotipo clásico y la evolución típica seguía sin tener respuesta. El loci denominado *PARK8*, descubierto por Funayama y colaboradores (Funayama y cols. 2002) en una familia japonesa ("*Sagamihara kindred*"), la identificación posterior del gen *LRRK2* que codifica la proteína dardarina (Paisán-Ruiz y cols. 2004; Zimprich y cols. 2004), y la posterior descripción de mutaciones patógenas en este gen en un grupo de familias del País Vasco y el Reino Unido, serviría para una mayor aproximación al fenotipo clínico, y curso evolutivo característico de la enfermedad. La importancia de este último hallazgo a nivel internacional se ve reflejada en la publicación de más de 500 trabajos relacionados sólo con este gen, desde su primera descripción en 2004.

En la actualidad, las formas genéticas de EP, permiten estudiar la fisiopatogenia de la enfermedad, y ofrecen un nuevo modelo en la búsqueda de marcadores que permitan un diagnóstico precoz, para un eventual empleo de medicación neuroprotectora.

3.2. Una enfermedad motora con síntomas no motores

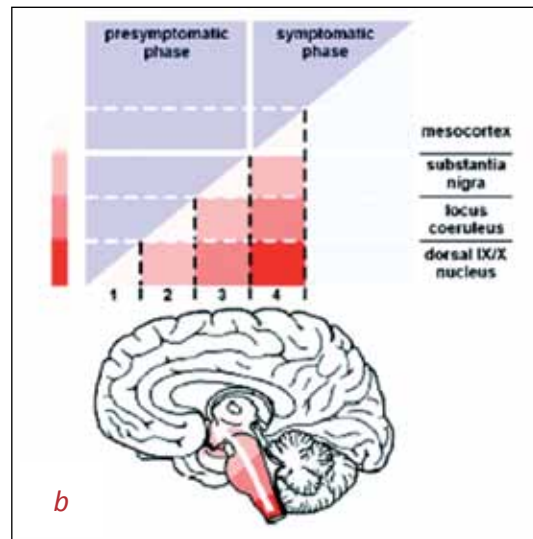
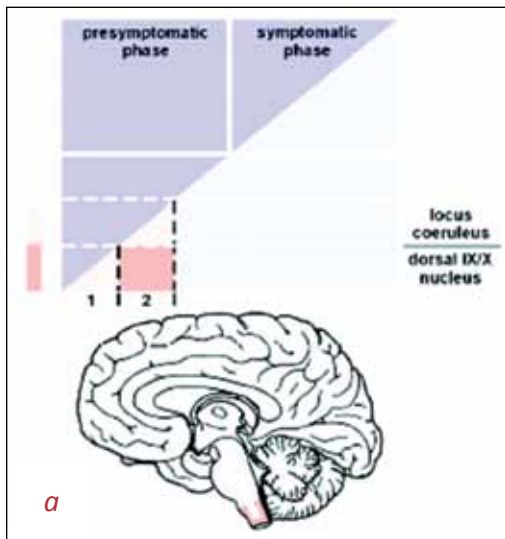
La EP se caracteriza clínicamente por síntomas motores clásicos (temblor de reposo, bradicinesia, rigidez y alteraciones posturales), que constituyen la base para el diagnóstico clínico de la enfermedad. Desde hace años se viene ampliando su espectro clínico, al demostrarse la presencia de una gran variedad de síntomas no motores. Esta ampliación del fenotipo clínico nos han hecho reflexionar sobre conceptos hasta la fecha inamovibles en el contexto de la EP. En este momento tendríamos que hablar de un complejo síndrome donde las manifestaciones motoras son una parte importante, pero quizás su aparición indica una situación ya avanzada o “tardía” de la enfermedad. Determinados síntomas no motores, como la disfunción olfatoria, el estreñimiento, alteraciones sensitivas como el dolor, o el trastorno de conducta del sueño REM (TCREM), pueden comenzar años antes, y otros como los signos de disautonomía, y el deterioro cognitivo son cada vez más frecuentes según avanza la enfermedad (Chaudhuri y cols. 2006).

3.2.1. La fase premotora de la enfermedad

Numerosas evidencias apoyan la existencia de una fase “premotora” en la EP, en la que determinados síntomas no motores ya están presentes. En este sentido, diferentes estudios clínicos, epidemiológicos, neuropatológicos y de neuroimagen sugieren que la neurodegeneración que acontece en la SNc en la EP, podría anteceder en unos 4 ó 6 años al desarrollo de los clásicos síntomas motores (Fearnley y cols., 1991; Gonera y cols., 1997; Morrish y cols., 1998; Abbot y cols., 2003; Tolosa y cols., 2007). Síntomas no motores descritos en la EP, como la hiposmia, el TCREM, el estreñimiento o la depresión, anteceden con frecuencia al desarrollo de los síntomas motores (Santamaría y cols. 1986; Abbot y cols., 2001; Ponsen y cols., 2004; Iranzo y cols., 2006; Haehner y cols., 2007; Chaudhuri y cols 2006). Otros síntomas como la hipersomnia diurna, los trastornos de ansiedad, la apatía, la depresión y ciertas características de personalidad, (*“low novelty or sensation seeking”*), y disfunciones cognitivas sutiles, también se han sugerido como síntomas no motores, ya presentes en las fases primeras de la EP (Chaudhuri y cols., 2006). Estudios de neuroimagen han confirmado mediante PET con fluorodopa, o SPECT utilizando trazadores del transportador de la dopamina (DAT), que se pueden detectar alteraciones de la vía nigro-estriada en esta fase “premotora” de la EP (Guttman y cols., 1997; Marek y cols., 2001).

3.2.2. Correlación de la fase premotora con la neuropatología

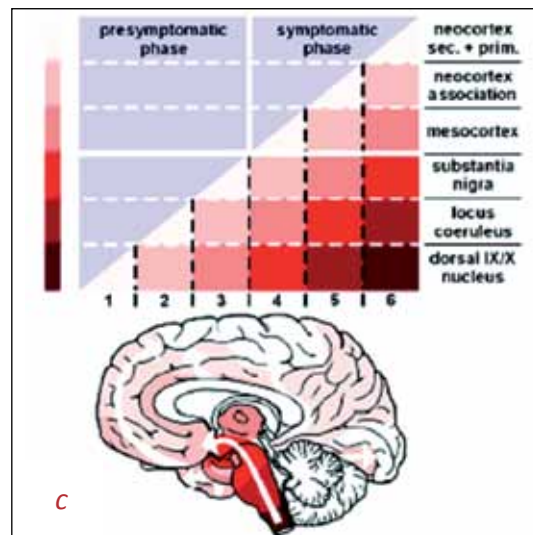
El sustrato neuropatológico que subyace en el sistema nervioso de los pacientes con EP, se caracteriza por la pérdida neuronal en la SNc, y en otras estructuras del tronco cerebral, sistema límbico y corteza cerebral, junto con la presencia de agregados de α -sinucleína en forma de CL y NL en las regiones afectadas. Los estudios neuropatológicos de Braak y colaboradores (Braak y cols. 2003) apoyan la existencia de esta fase “premotora” en la EP (figuras 3, 4, y 5).



a FIGURA 3
Progresión del proceso neurodegenerativo según Braak y colaboradores. Estadios 1 y 2. (Braak, y cols. 2003)

b FIGURA 4
Estadios 2, 3 y 4. (Braak, y cols. 2003)

c FIGURA 5
Estadios 4, 5 y 6. (Braak, y cols. 2003)



Según estos autores, el proceso neurodegenerativo en la EP sigue una progresión determinada. En los estadios I y II, que corresponden a las fases más iniciales, las alteraciones neuropatológicas (CL y NL) tendrían lugar en la parte más inferior del tronco cerebral, y en las estructuras olfativas (núcleo dorsal del vago, núcleo olfatorio anterior, y bulbo olfatorio), con un curso ascendente en el tronco cerebral (núcleo del rafe, *locus coeruleus*, y núcleo pedúnculo pontino entre otros) antes de afectar a la SNc en el mesencéfalo. Este sería el estadio III, en el que aparecerían los síntomas motores clásicos de la enfermedad.

Las lesiones se extenderían posteriormente a estructuras más rostrales como el sistema límbico, el hipotálamo y la corteza cerebral en los estadios IV a VI. La hiposmia, el estreñimiento, el TCREM o la depresión como síntomas no motores, se han relacionado con alteraciones neuropatológicas en la zona caudal del tronco cerebral y bulbo olfatorio, afectadas en las fases I

y II de Braak, y por tanto antecederían a la clásica fase motora de la enfermedad. Este estadiaje propuesto por Braak y colaboradores no contempla otra sintomatología no motora que puede estar presente desde las primeras etapas, como es la disfunción autonómica, que deriva de una probable afectación precoz del sistema nervioso periférico.

4. Una enfermedad con etiología indeterminada: genética-ambiente

A pesar del tiempo transcurrido desde la primera descripción de la EP (James Parkinson, 1817), su etiología, permanece a día de hoy desconocida en la mayoría de casos. En su etiopatogenia, se postula una compleja interacción entre factores ambientales presumiblemente tóxicos, y factores genéticos en el contexto del envejecimiento. Sólo una minoría de casos se debe a causas genéticas o medioambientales únicas claramente definidas. En la mayoría de los casos se trataría de una interacción entre varios genes, el efecto modificador de alelos de susceptibilidad, la influencia de agentes medioambientales sobre la expresión de los genes, y su impacto directo sobre el cerebro en fase de desarrollo y de envejecimiento.

4.1. Influencia ambiental

El interés por los factores ambientales como agentes responsables de la enfermedad se muestra por primera vez en 1963, cuando se propuso la hipótesis de un posible agente infeccioso como causa de la EP (Poskander y cols. 1963), a raíz de la epidemia de *Encephalitis lethargica* (relacionada con la pandemia de gripe de 1918), que trajo consigo numerosos casos de parkinsonismo. Otro hecho destacable, fue la intoxicación por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) acaecida a principios de los años ochenta en el pasado siglo, en un grupo de toxicómanos que desarrollaron un parkinsonismo, con buena respuesta a L-dopa (Langston y cols. 1983). Ya que este tóxico produce una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas, esta hipótesis se ha reforzado por la demostración posterior de que la exposición a otras sustancias químicas con capacidad similar para inhibir el complejo I mitocondrial (pesticidas como el paraquat, o rotenona), producen también parkinsonismo.

Diversos estudios epidemiológicos han intentado detectar factores ambientales potencialmente de riesgo, pero también han detectado factores que podrían disminuir el riesgo de desarrollar la enfermedad, como son el consumo de tabaco y de café (Morens y cols. 1995; Ross y cols. 2000; Tanner y cols. 2000).

- **Consumo de cigarrillos:** Existe una asociación inversa entre el consumo de cigarrillos (y la exposición pasiva al humo del cigarrillo), y el riesgo de EP. El hábito tabáquico es el factor ambiental más consistente en todos los estudios realizados desde hace décadas, y extendidos de forma universal (Hernany cols. 2002; Mellick y cols 2006; Quick y cols.

2008). No se conoce el mecanismo fisiológico por el cual se puede establecer esta asociación, pero se postula que el posible efecto neuroprotector podría derivar de algún compuesto del cigarrillo, como el monóxido de carbono cuya unión a otros radicales libres daría lugar a compuestos menos neurotóxicos. Por otro lado, la nicotina tiene la capacidad de modular la liberación de DA por las neuronas dopaminérgicas, al unirse a receptores nicotínicos de interneuronas que regulan esta liberación, por lo que podría tener un cierto efecto sintomático. En modelos experimentales con primates la nicotina disminuye las discinesias, y otras complicaciones derivadas del tratamiento con L-dopa, por lo que se postula que ligandos de receptores nicotínicos selectivos del sistema nervioso central (SNC) podrían convertirse en un prometedor tratamiento de la EP (Quik y cols. 2008).

- **Consumo de Café y Té:** El riesgo de EP se reduce en los consumidores habituales de café o té (Hu y cols. 2007; Saaksjarvi y cols. 2008), con cifras similares a las que ofrecen los estudios de consumo de tabaco. La asociación inversa entre la cafeína y la EP es menos consistente en el sexo femenino. La cafeína es un antagonista de los receptores A2A de la adenosina, y puede bloquear la toxicidad del MPTP en los modelos animales, aunque el mecanismo último sigue siendo desconocido (Chen y cols. 2001; Saha y cols. 2009).
- **Antagonistas del calcio:** La activación mantenida de los canales de calcio en las células dopaminérgicas del SNC, puede acelerar el envejecimiento, y predispone a la EP (Chan y cols. 2009). Martí Massó y colaboradores ya demostraron el poder parkinsonizante de un antagonista del calcio como es la cinarizina (Martí Massó, y cols. 1996). Se han publicado con posterioridad 2 estudios epidemiológicos, en los que se ha encontrado una correlación inversa entre el consumo de otros antagonistas del calcio, y el riesgo de desarrollar la EP, que podrían sugerir un teórico efecto protector (Rodnitzky y cols. 1999; Becker y cols. 2008). En modelos animales de EP, los calcioantagonistas protegen de la degeneración de neuronas dopaminérgicas (Kupsch y cols. 1996). Esta reducción de la neurotoxicidad se realiza a través de mecanismos en los que supuestamente está implicada *LRRK2*. En esta línea, la actividad antioxidante de los antagonistas del calcio, podría compensar la disfunción mitocondrial, la estabilización de los microtúbulos, y la reducción de apoptosis (Liang y cols. 2006).
- **Exposición a pesticidas:** La exposición a pesticidas se asocia con un mayor riesgo de EP, con odds ratios (OR) en un rango que varía desde 1,6 a 7.0 (Priyadarshi y cols. 2002; Flemming y cols. 1994). Muchas de las características fisiopatológicas asociadas con la EP, se reproducen en los estudios de laboratorio con plaguicidas (paraquat, rotenona y dieldrina). Los pesticidas intervienen en la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial, el estrés oxidativo, e interfieren con el sistema proteasoma. Estos mecanismos también se han asociado con la disfunción de la proteína *LRRK2*. Curiosamente, la sensibilidad a la rotenona se incrementó en un modelo de *Drosophila melanogaster* con mutaciones en los dominios quinasa, COR o LRR (Venederova y cols. 2009).
- **Antecedente de traumatismo craneo encefálico (TCE):** Los traumatismos con pérdida de conciencia, se asocian décadas después con un mayor riesgo de desarrollar EP (Bower y

cols. 2003). Los traumatismos podrían desencadenar una cascada inflamatoria que puede interferir en los mecanismos de reparación celular, que podrían estar ya vulnerables en portadores de mutaciones causantes de EP.

- **Factores dietéticos y actividad física:** El patrón de dieta mediterránea, con un alto consumo de frutas, hortalizas, legumbres, cereales integrales, nueces, pescado y aves, una baja ingesta de grasas saturadas, y una ingesta moderada de alcohol, se ha asociado con un posible efecto protector frente a la EP (Gao y cols. 2007). Una dieta capaz de aumentar los niveles de ácido úrico puede contribuir a cambiar el riesgo de la enfermedad (Gao y cols. 2008). Un estudio reciente (Myake y cols. 2010), relaciona una mayor ingesta de ácido araquidónico y de colesterol con un riesgo mayor de EP. Por el contrario, otros autores describen como una baja ingesta de colesterol, particularmente en la presencia de hierro, puede estar asociada con un riesgo elevado de esta enfermedad (Powers y cols. 2009). Estudios epidemiológicos sugieren que dietas hipercalóricas y deficientes en ácido fólico aumentan el riesgo de EP y de EA (Mattson y cols. 2003). Igualmente, los niveles elevados de homocisteína pueden predisponer al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas en personas con predisposición genética (Mattson y cols. 2003), y se han descrito niveles plasmáticos elevados de homocisteína en pacientes con EP, frente a un grupo control, aunque sin correlación con el estado cognitivo (Rodríguez-Oroz y cols. 2009).

Si bien existe cierta controversia al relacionar los factores dietéticos con el riesgo o protección a desarrollar esta enfermedad, en la literatura científica aparece bien establecido la relación entre la inactividad física y el deterioro cognitivo (Deslandes y cols. 2009). Otro trabajo muestra como el ejercicio físico y distintos factores nutricionales pueden inducir la expresión de BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) en el cerebro, y siguieren una posible reducción del riesgo de sufrir enfermedades neurodegenerativas (Mattson y cols. 2004).

De cualquier forma, el estudio de factores ambientales de riesgo o protección en la EP, es complejo teniendo en cuenta la dificultad en determinar la cuantía de la exposición, los efectos aditivos de múltiples productos, y el contexto de la vulnerabilidad nigroestriatal en el envejecimiento, genéticamente determinada.

4.2. La carga genética

Desde Gowers, se conoce que existe una agregación familiar de casos, que este autor cifró en un 15%, y que otras series de base epidemiológica realizadas a lo largo del siglo XX han confirmado. Estudios epidemiológicos posteriores mostraron incrementado el riesgo de desarrollar EP hasta 14 veces, en los familiares en primer grado, cuando se comparaban con los controles (Word y cols. 1998; Passer y cols. 1998). Con la llegada de la biología molecular los estudios de ligamiento en familias con patrones de herencia mendeliana tanto autosómica recesiva (AR) como AD, han permitido confirmar la naturaleza genética de un creciente porcentaje de casos de EP, con el descubrimiento de genes implicados (*SNCA, PRKN, DJ-1, PINK, UCHL-1, LRRK2*).

Dependiendo de la población estudiada, las formas monogénicas suponen un 5-10% de los casos de EP. Se han descrito al menos 15 loci y 9 genes causantes de esta enfermedad (Lesage, y cols. 2009). Existen otros genes implicados, como factores de susceptibilidad con alelos que aumentan o disminuyen el riesgo de padecerla.

Se ha estudiado el papel de la genética a través de tres tipos de estudios epidemiológicos: el estudio de casos y controles, el estudio de gemelos, y los estudios familiares.

4.2.1. Estudio de casos y controles

Además de las descripciones de Gowers (Gowers y cols. 1900), diversos estudios posteriores mostraron que la frecuencia de EP era más alta entre familiares de pacientes con EP, que entre los familiares de individuos sanos (De Michele y cols. 1996; Marder y cols. 1996). En estos estudios, entre el 6% y el 30% de pacientes con EP mostraron un familiar en primero o segundo grado con la enfermedad.

El riesgo relativo (RR) de tener EP en un miembro de la familia oscila entre 2 y 14, y según el estudio realizado por Marder y colaboradores (Marder y cols. 2006) se asigna un RR a los familiares de 2,3. Este riesgo entre familiares de un individuo con EP parece aumentar en función del número de miembros de la familia afectados (Lazzarini, y cols. 1994).

4.2.2. Estudios de gemelos

La hipótesis de que los factores genéticos podrían ser causa de la enfermedad fue rechazada en principio por la baja tasa de concordancia obtenida en los estudios de gemelos (Marttila y cols. 1988; Tanner y cols. 1999). Sin embargo, los estudios funcionales con 18F-dopa PET mostraron la existencia de una disfunción dopaminérgica nigroestriatal en gemelos afectados, que mostraba concordancia con la patología nigral en gemelos, especialmente en la EP de inicio temprano, en comparación con gemelos dicigotos o los que tenían un inicio más tardío de la enfermedad (Wirdefeldt y cols. 2004). Además, un estudio anterior mostraba diferencias en las tasas de concordancia entre gemelos monocigóticos y dicigóticos, con una tasa superior en los gemelos monocigóticos (Piccini y cols. 1999). El mismo grupo publicó también unos años antes, que los familiares asintomáticos de sujetos pertenecientes a familias con más de un individuo con EP, mostraban también disfunción dopaminérgica nigroestriatal (Piccini y cols. 1997).

4.3. Alteraciones epigenéticas

Los factores ambientales pueden contribuir a la neurodegeneración a través de la inducción de modificaciones epigenéticas, como la metilación del ADN, y la remodelación de la cromatina, que puede inducir alteraciones en los programas de expresión génica. La epigenética se refiere a cualquier proceso que altera la actividad del gen, sin cambiar la secuencia de ADN. La modulación epigenética ocurre desde la etapa prenatal, y los cambios pueden transmitirse a las células hijas. El proceso de envejecimiento se asocia a una pérdida de plasticidad fenotípica de las modificaciones

epigenéticas. Dado que el envejecimiento es el factor de riesgo más importante para la EP, se supone que las alteraciones epigenéticas en el ADN y en la estructura de la cromatina, también podrían influir en la neurodegeneración asociada a esta enfermedad (Marqués y cols. 2011).

La exposición ambiental a agentes químicos nutricionales y físicos, puede alterar la expresión del gen, y afectar al fenotipo adulto por estas modificaciones epigenéticas en una región genómica lábil. El epigenotipo muestra una plasticidad mucho mayor que el genotipo, ya que varía entre los tejidos y durante la vida, mientras que la secuencia de ADN sigue siendo esencialmente la misma. Estas modificaciones epigenéticas pueden ser una de las causas que justificarían la discordancia en la presentación de EP en gemelos monocigóticos (Marttila y cols. 1988; Tanner y cols. 1999).

5. Formas monogénicas de Enfermedad de Parkinson: las diferentes mutaciones

5.1. PARK1/PARK4: SNCA

El primer locus implicado en la EP, PARK1, fue identificado a partir de una gran familia de origen italiano (familia Contursi) [Polymeropoulos y cols. 1996]. El gen fue identificado un año después por el mismo equipo, y codificaba la proteína α -sinucleína (SNCA, OMIM*163890) [Polymeropoulos MH y cols. 1997].

El gen SNCA se localiza en la región cromosómica 4q21 (Spillantini y cols. 1995), se expande por unas 111 kb, y codifica una proteína soluble de 140 aminoácidos abundante en las neuronas, especialmente en los terminales presinápticos (Iwai y cols. 1995). La proteína pertenece a una familia que incluye también la β -sinucleína y la γ -sinucleína (George y cols. 2002), presentes sólo en vertebrados. Aunque las tres formas se expresan en el cerebro y sus secuencias son similares, hasta la fecha solo la α -sinucleína ha sido implicada en la EP. Ambientes lipídicos promueven el pliegue de la α -sinucleína acelerando su agregación, lo que sugeriría que esta conformación asociada a los lípidos podría ser relevante en enfermedades neurodegenerativas.

En 1997 se sugirió el papel de este gen en la EP tras la identificación de dos mutaciones en varias familias, y la abundancia de α -sinucleína en los CL donde es el componente mayoritario (Spillantini y cols. 1997). La primera mutación, 157G>A (A53T), fue identificada en la familia italiana (los Contursi) en la que los pacientes presentaban una forma de inicio temprano (46 ± 13 años). Esta mutación fue hallada en otras 10 familias griegas (Polymeropoulos y cols. 1997) que procedían del Peloponeso, en el sur de Grecia, con un posible efecto fundador, corroborado más tarde por el análisis de los haplotipos (Athanasidou y cols. 1999). Además de una edad de comienzo temprana, los portadores presentaban bradicinesia y rigidez, pero raramente presentaban temblor (Athanasidou y cols. 1999).

La segunda mutación en SNCA, 88G>C (A30P), fue hallada en una familia de origen alemán (Kruger y cols. 1998), con una edad de comienzo ligeramente más tardía que los casos con la A53T (rango 52-56 años), y un fenotipo similar a las formas esporádicas.

Los análisis genéticos continuaron y permitieron la identificación de una tercera mutación en una familia española (136G>A; E46K) con una forma AD de parkinsonismo, y demencia con cuerpos de Lewy (DCL) [Zarranz y cols. 2004].

Más adelante, se identificaron otro tipo de mutaciones que implicaban un cambio en el número de copias del gen. En estos casos, lo que hacía aparecer la enfermedad era un exceso de una proteína, que por otra parte era absolutamente normal. En esta línea, se identificaron multiplicaciones del gen *SNCA*, causantes de las formas de EP inicialmente asociadas al locus PARK4, tanto triplicaciones del gen completo en dos familias (Farrer y cols. 2004; Singleton y cols. 2003), como una duplicación (Chartier-Harin y cols. 2004; Ibañez y cols. 2004) con un efecto dosis dependiente. Los pacientes con la triplicación tenían un inicio más temprano (una media de 38 años, por 48 de los portadores de la duplicación), y un curso evolutivo más agresivo de la enfermedad, con más deterioro cognitivo, pudiendo establecerse una relación entre el número de copias normales del gen y el fenotipo. Estos hallazgos demostraron que tanto las mutaciones puntuales, como el aumento en la cantidad de la α -sinucleína normal, podían ser causa suficiente para la aparición de la EP.

Aunque la función que tiene la α -sinucleína no ha sido completamente determinada, su estructura sugiere un papel en procesos asociados a la transmisión sináptica. Por otra parte, la sobreexpresión de la forma normal de la α -sinucleína es tóxica para las células en división, y la sobreexpresión de las formas mutantes (53T y 30P) muestra incluso mayor toxicidad, lo que podría ser debido a que inhiben proteínas involucradas en procesos de traducción de señales, que podría afectar a la viabilidad celular (Ostrerova y cols. 1999). Todos estos hallazgos sugieren que la α -sinucleína tendría un papel importante como modulador de la plasticidad sináptica, y estaría implicada, bajo ciertas condiciones, en la degeneración del sistema dopaminérgico a través de múltiples y complejas vías aún no caracterizadas.

5.2. PARK2: *PRKN*

En 1998, un grupo japonés describió la existencia de mutaciones en un gen que codificaba una proteína bautizada como parkina. De esta forma, se justificaban las formas familiares AR de parkinsonismo juvenil (AR-PJ), con una edad de inicio típica anterior a los 40 años (Ishikawa y cols. 1996; Takahashi y cols. 1994). Esta diferencia clínica, junto con el origen étnico de los primeros pacientes descritos, hizo pensar en un gen que no estaba implicado en la EP sino en otro tipo de parkinsonismo. En 1997 se había identificado el locus asociado a estas formas en la región cromosómica 6q25.2-27, al que se denominó PARK2 (OMIM*602544) [Matsumine y cols. 1997]. Un año después se identificó el gen (*PRKN*), y la proteína denominada parkina (Kitada y cols. 1998). El gen *PRKN* contiene 12 exones, con un tamaño de 1,53 Mb (Kitada y cols. 1998; Wesy y cols. 2001). Codifica una proteína de 465 aminoácidos, con un peso molecular de unos 52 kDa.

Hasta la fecha se han identificado numerosas mutaciones en *PRKN*, incluyendo deleciones, duplicaciones y triplicaciones de uno o varios exones, y mutaciones puntuales de todo tipo (cambio de aminoácido, *splicing*, etc.) [Mata y cols. 2004]. Este tipo de alteraciones, sin ser una causa frecuente de EP familiar con el fenotipo clásico, eran importantes en la EP de inicio precoz de

tipo recesivo en la población europea (Abbas y cols. 1999). *PRKN* presenta unos dominios que la definen como una E3-ubiquitina ligasa, que participa en la señalización de la α -sinucleína para su degradación por el proteosoma. Se han hallado mutaciones en todos los dominios de parkina, aunque la mayoría de las mutaciones están localizadas entre los dominios RING-IBR-RING, en particular en el primer dominio RING, con una función no del todo conocida, pero que podría ser relevante para la función de la proteína. Por otro lado, los pacientes pueden presentar tanto mutaciones en homocigosis, como ser heterocigotos compuestos (con mutaciones distintas en cada alelo), o en heterocigosis.

Hasta la identificación del gen *LRRK2*, las mutaciones en el gen *PRKN* eran consideradas la causa genética más frecuente de las formas familiares de EP, pero con un fenotipo diferencial, y unos hallazgos neuropatológicos distintos. La mayoría de los pacientes con mutaciones en *PRKN* se diferenciaban de las formas idiopáticas por la ausencia de CL (Mori y cols. 1998; Khan y cols. 2003), por lo que la relación con la α -sinucleína, sigue siendo controvertida. Parece lógico pensar que la α -sinucleína, como componente más abundante de los CL, y la parkina, cuya actividad podría ser necesaria para la formación de estas inclusiones, deberían interactuar de alguna forma. La α -sinucleína podría ser un sustrato para la parkina, hipótesis que no se ha podido demostrar hasta la fecha (Cheng y cols. 2001).

5.3. PARK3

En 1998 Gasser y colaboradores describieron en el locus 2p13 un ligamiento que determinaba una forma de EP similar a la forma esporádica en múltiples familias alemanas, con una penetrancia reducida, y con patología Lewy en el examen anatomopatológico (Gasser y cols. 1998). Se publicó más adelante la posible implicación del gen de la sepiapterina en esta EP familiar, aunque la confirmación de este hallazgo aún no ha sido obtenida (Karamohamed y cols. 2003).

5.4. PARK5: UHCL1

En 1998 Leroy y colaboradores (Leroy y cols. 1998) identificaron una mutación en el gen de la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa-L1 (*UHCL1*, OMIM*191342) en una familia de origen alemán con un patrón de herencia AD, y penetrancia incompleta. Este gen está en la región cromosómica 4p14 (Edwards y cols. 1991), y consta de nueve exones en unas 10 kb de genoma.

UHCL1 es una de las proteínas más expresadas en el cerebro (más del 2% de la proteína total). Pertenece a una familia de genes cuyas proteínas hidrolizan los extremos carboxilo de pequeños grupos de ubiquitina, generando monómeros de la misma. Así, reciclan estas moléculas que pueden ser posteriormente reutilizadas para marcar una nueva proteína en el proceso de degradación por el proteosoma. Además, también muestran cierta actividad ubiquitina ligasa (Liu y cols. 2002), y estas cualidades les hacen ser parte importante del sistema ubiquitin proteasoma (UPS). La proteína se expresa específicamente en neuronas, particularmente de la SNC (Solano y cols. 2000). *UHCL1* se halla tanto en los CL como en otras agregaciones proteicas (Wilkinson y cols. 1989).

Estudios en distintas poblaciones no han hallado mutaciones, ni en formas familiares, ni en casos esporádicos, lo que sugiere que se trata de una causa extremadamente rara de EP (Harhangi y cols. 1999; Hasegawa y cols. 2001; Maraganore y cols. 1999; Shi y cols. 2003). Además de la mutación puntual descrita por Leroy y colaboradores, se ha descrito un polimorfismo en la región codificante, 53C>A (S18Y) [Lincoln y cols. 1999], que podría estar asociado con el riesgo de desarrollar EP (Maraganore y cols. 1999). La frecuencia de S18Y es del 14-20% en poblaciones caucásicas (Maraganore y cols. 1999), y puede llegar hasta el 50% en China y Japón (Momose y cols. 2002; Satoh y cols. 2001), lo que sugiere un papel muy limitado en el desarrollo de la enfermedad. Además, detectaron un efecto de dosis génica consistente con los hallazgos de los estudios funcionales (Liu y cols. 2002).

5.5. PARK6: *PINK1*

La búsqueda de nuevos genes en familias con EP de inicio precoz, en las que no se había identificado alteraciones en *PRKN*, culminó con el descubrimiento de un locus en el cromosoma 1, 1035-p36. El gen de la potencial cinasa 1 inducida por PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) [*PINK1*; OMIM*608309] fue relacionado inicialmente con el cáncer (Unoki y cols. 2001). *PINK1* codifica una proteína de 581 aminoácidos, con un peso molecular de unos 62,8 kDa. Las mutaciones en este gen pueden causar formas recesivas de EP de inicio temprano (Valente y cols. 2004a), y fueron identificadas en varias familias en las que previamente se había demostrado ligamiento al locus PARK6, en el brazo corto del cromosoma 1 (Valente y cols. 2001; Valente y cols. 2002). *PINK1* tiene 8 exones distribuidos a lo largo de 1,8 kb, y la proteína se localiza en la mitocondria, lo que permitía establecer relación de manera precisa con la disfunción mitocondrial descrita en la EP, y concretamente con la reducción de la actividad del complejo I mitocondrial descrita en la SN de pacientes con EP comparado con controles (Schapira y cols. 1989). De hecho, se sugiere que actúa a nivel mitocondrial en respuesta al estrés oxidativo. Las mutaciones en este gen podrían ser la causa, no sólo de formas familiares recesivas, sino también de algunos casos esporádicos (Valente y cols. 2004b). Hasta la fecha, se han hallado 14 mutaciones en *PINK1* en pacientes de diferentes poblaciones. Al igual que para *PRKN*, se hallaron casos con una sola mutación en heterocigosis, lo que sugiere que éstos podrían tener más riesgo de desarrollar la enfermedad.

Aunque la función de *PINK1* no está del todo clara, su localización en la mitocondria, y su estructura similar a las serín/treonín cinasas, sugieren que podría tener un papel en la fosforilación de otras proteínas localizadas en este orgánulo, en respuesta al estrés celular, evitando así la disfunción mitocondrial.

5.6. PARK7: *DJ-1*

El gen *DJ-1* (OMIM*602533) fue identificado como otra causa de formas juveniles de EP en 2003 (Bonifati y cols. 2003). El locus PARK7 fue localizado al igual que *PINK1* en el brazo

corto del cromosoma 1 (1p36) en dos familias de los Países Bajos (van Duijn y cols. 2001), y posteriormente en dos familias italianas (Bonifati y cols. 2002). *DJ-1* está formado por 8 exones a lo largo de 24 kb del genoma, y codifica una proteína de 189 aminoácidos y 20 kDa. Mutaciones en homocigosis en este gen explicarían aproximadamente el 1% de los casos de EP con inicio temprano (Abou-Sleiman y cols. 2003; Bonifati y cols. 2003; Hague y cols. 2003; Hering y cols. 2004). También se han identificado mutaciones en heterocigosis en pacientes con EP de inicio temprano (Abou-Sleiman y cols. 2003; Hague y cols. 2003), aunque en estos casos la segregación con la EP no pudo ser demostrada. Durante el proceso de búsqueda de mutaciones se hallaron algunas variantes en regiones no codificantes, incluyendo una inserción/delección de 18pb en el promotor (Hague y cols. 2003), y análisis posteriores mostraron que este polimorfismo no contribuye al riesgo de desarrollar EP de inicio tardío (Morris y cols. 2003).

DJ-1 no es un componente esencial de los CL ni de las NL, a diferencia de la parkina y la α -sinucleína (Bandopadhyay y cols. 2004; Bonifati y cols. 2003; Rizzu y cols. 2004). Sin embargo, *DJ-1* tiene varias posibles funciones, y se ha postulado que junto a *PINK1* y *PRKN* constituirían un nuevo tipo de complejo E3 ligasa. Por otra parte, *DJ-1* puede cambiar a una forma más ácida cuando las células son tratadas con el herbicida paraquat, causando su sobreexpresión además de inducir la agregación de la α -sinucleína mediada por proteínas oxidativas (Manning-Bog y cols. 2002; Mitsumoto y cols. 2001).

5.7. PARK9: *ATP13A2*

Najim-al-Din y colaboradores (Najim-al-Din y cols. 1994) describieron en una familia jordana, un síndrome clínico con características de EP, pero algunos signos diferenciales. La edad de inicio era precoz, la progresión era rápida, pero con buena respuesta a L-dopa, presentaban demencia, parálisis de la mirada vertical, y espasticidad. Hampshire y colaboradores (Hampshire y cols. 2001) identificaron la región ligada a la enfermedad en 1p36, y Ramírez y colaboradores (Ramírez y cols. 2006) describieron mutaciones en el gen *ATP13A2* en esta familia jordana (enfermedad de Kufor-Rakeb), y en otra de origen chileno. *ATP13A2* es un gen de 26 kb en 1p36, y tiene 29 exones codificantes que generan una proteína que se expresa de manera ubicua en el organismo, especialmente en el cerebro. Se trata de una ATPasa que se encarga del transporte de cationes inorgánicos y otros sustratos a través de membranas celulares.

5.8. PARK11: *GIGYF2*

En 2008 Lautier y colaboradores (Lautier y cols. 2008) identifican mutaciones en *GIGYF2* como causantes de EP familiar de inicio tardío, con un fenotipo similar a la EP idiopática. Publicaciones posteriores ofrecen sin embargo, una imagen poco clara del cuadro clínico. Algunas de las variantes encontradas podrían ser poliformismos de baja frecuencia, por lo que no se puede determinar su patogenicidad.

5.9. PARK15: *FBX07*

Davidson en 1954 (Davidson 1954) describe por primera vez un síndrome parkinsoniano de comienzo en la segunda o tercera década de la vida, con un fenotipo típico de EP pero agravada por síntomas piramidales. Más adelante se describió respuesta de los síntomas parkinsonianos a L-dopa en una pareja de hermanos (Horowitz y cols. 1975). Este síndrome denominado palido-piramidal fue localizado en el cromosoma 22 mediante análisis de ligamiento, y de los 4 genes candidato identificados, *FBX07* presentó mutaciones en una familia iraní. Más adelante Di Fonzo y colaboradores (Di Fonzo y cols. 2009) identificaron otras mutaciones en el mismo gen en muestras de origen europeo.

FBX07 es una proteína que contiene un dominio de unos 40 aminoácidos. Es componente de las E3 ubiquitin-ligasas modulares, que funcionan en procesos de ubiquitinización dependientes de fosforilación.

5.10. Otros genes candidato

5.10.1. PARK13: *HTRA2*

En 2003 Jones y colaboradores (Jones y cols. 2003) identificaron en la proteína *Omi/HTRA2* la mutación causante de un fenotipo típico de enfermedad de motoneurona con parálisis progresiva y atrofia muscular. Esta proteína está codificada en el ADN nuclear, aunque ejerce su función en la mitocondria. Strauss y colaboradores (Strauss y cols. 2005) comprobaron como mutaciones en este gen producían fenotipos compatibles con disfunción de ganglios basales en una población de pacientes alemanes, pero sin un fenotipo típico de EP.

5.10.2. *GBA*

Se ha descrito recientemente una gran prevalencia a nivel mundial, de mutaciones en el gen de la glucocerebrosidasa (*GBA*) en pacientes con EP. Estas mutaciones se asocian a la enfermedad de Gaucher (EG) en estado recesivo, y se ha estudiado su presencia en pacientes con EP de descendencia judía Ashkenazi, debido a la alta prevalencia de portadores en esta población. Las mutaciones en el gen de la *GBA* asocian la EP en este grupo étnico, con una OR frente a los controles de 7,0 (Aharon-Peretz y cols. 2004). También se ha encontrado en poblaciones asiáticas (Hu y cols 2010; Sun y cols. 2010), población norteamericana (Nichols y cols. 2009; Clark y cols. 2007), suramericana (Mariana y cols. 2008), y europea según datos del banco de cerebros de Londres. Sin embargo, estos hallazgos no han sido corroborados en población norteafricana (Nishioka y cols. 2009).

5.11. Otros loci identificados por ligamiento

5.11.1. PARK10. Relación con la edad de inicio

En 2002 los trabajos de Li y Hicks (Li y cols. 2002; Hicks y cols. 2002) de forma independiente analizaron familias con EP en búsqueda de loci implicados en la enfermedad de inicio tardío. Los resultados permitieron relacionar un locus en el cromosoma 1 con la edad de inicio de la enfermedad.

5.11.2. PARK12: *Xq21-q25*

En los estudios en los que se identificó el PARK11, Pankratz y colaboradores (Pankratz y cols. 2002) identificaron otro locus en el cromosoma X. Resultados similares fueron publicados por los equipos de Hicks y Scout (Hicks y cols. 2002; Scott y cols. 2001).

5.11.3. PARK14: PLA2G6

En pacientes con distrofia neuroaxonal infantil y neurodegeneración asociada al acumulo de hierro, se identificaron mutaciones en el gen PLA2G6 (22q13.1; OMIM *603604) [Paisán-Ruiz y cols. 2009], que recientemente también se han hallado en individuos con un parkinsonismo rígido-acinético progresivo (Yoshino y cols. 2010). PLA2G6 codifica una enzima de 752 aminoácidos que como otras fosfolipasas puede inducir cambios en la composición de la membrana, activar la cascada inflamatoria y altera las vías de señalización celular.

5.12. Genome-wide association: GWA

Cuando no se conoce el gen o los genes causantes de la patología a estudio, se pueden hacer estudios de ligamiento en grandes familias o en grandes grupos, normalmente a través de consorcios para conseguir un número de casos acorde con los objetivos. Estos estudios se conocen como GWA (*Genomic Wide Association*) y buscan zonas del genoma que se hereden junto a la enfermedad. Para ellos se necesitan familias grandes, con muchos miembros (y a poder ser en varias generaciones) y muy bien caracterizados. Este tipo de estudios nos permiten descubrir zonas del genoma ligadas a la enfermedad y determinar una serie de genes candidatos que deberán ser validados o estudiados posteriormente con más profundidad. Son estudios de búsqueda de loci relacionados con un carácter concreto que toman como base estadística para el análisis, la existencia de asociación genética en lugar de buscar ligamiento genético.

5.12.1. PARK16

En el GWA realizado por Satake y colaboradores (Satake y cols. 2009) se describe un nuevo locus en 1q32. Dentro de este locus el SNP rs947211 presentaba la mayor significación estadística con la EP. Simón-Sánchez y colaboradores (Simón-Sánchez y cols. 2009) ratificaron este hallazgo en su muestra de origen caucasiano.

TABLA 1

Loci relacionados con la EP. CL: Estudios patológicos con cuerpos de Lewy

Locus	Año	Cromosoma	Gen/proteína	Herencia	Mutaciones	CL
PARK1/PARK4	1996/1999	4q21-q23	SNCA/alfa-sinucleína	AD	3 mutaciones missense, duplicaciones/triplicaciones de gen completo	+
PARK2	1998	6q25.2-q27	Parkin	AR	>100 mutaciones diferentes	-/+
PARK3	1998	2p13	SPR?	AD	Homocigosis del alelo T del SNP RS1876487	+
PARK5	1998	4p14	UCHL1	AD	1 mutación detectada en una única familia	?
PARK6	2001	1p35-p36	PINK1	AR	40 pequeños cambios en la secuencia.	?
PARK7	2001	1p36	DJ-1	AR	10 mutaciones (puntuales y grandes deleciones)	?
PARK8	2002	12q12	<i>LRRK2</i> /dardarina	AD	> 50 variantes, > 16 de ellas patógenas	-/+
PARK9	1999	1p36	ATP13A2	AR	3 mutaciones diferentes que producen una proteína truncada	?
PARK10	2002	1p32	20 cM	?	4 genes identificados por ligamiento	?
PARK11	2003	2q36-q37	GiGYF2		No parece ser gen relevante	?
PARK12	2003	Xq21-Xq25	20 cM	AR?		?
PARK13	2005	2p12	Omi/HtrA2	Desconocida	1 mutación puntual en 4 familias 1 variante asociada a la enfermedad	?
PARK14	2009	18q11	PLA2G6		No determinado gen responsable	?
PARK15	2008	22q12-q13	FBX07	AR	Diversas mutaciones asociadas	?
PARK16	2009	1q32	?	?		?
No asignado		5q23.1-q23.3	Sinfilina-1	Desconocida	1 mutación missense en 2 pacientes	?
No asignado		2q22-q23	NR4A2/Nurr1	Desconocida	3 mutaciones diferentes, 1 de ellas en una región codificante	?
No asignado		15q25	POLG/ADN polimerasa gamma	Desconocida	1 familia con mutaciones en heterocigosis	?

6. La irrupción del PARK8: un fenotipo similar con una neuropatología variable

6.1. De la familia Sagamihara a la dardarina

Wszolek y colaboradores (Wszolek y cols. 1995) describieron las características clínicas de una familia norteamericana de origen europeo con parkinsonismo familiar, con una evolución lenta y herencia AD. Años después, en 1997 Hasegawa y Kowa (Hasegawa y cols. 1997) publican con detalle el fenotipo clínico de una familia japonesa ("*Sagamihara kindred*") con un parkinsonismo asimétrico, de edad de inicio alrededor de los 50 años, con buena respuesta a L-dopa, y con presencia de degeneración nigrica, pero sin formación de CL en el estudio neuropatológico. En 2002 Funayama y colaboradores (Funayama y cols. 2002) analizaron genéticamente esta familia japonesa, identificando mediante análisis de ligamiento una región de 4cM en 12p11.2-q13.1. Este locus, denominado PARK8 (OMIM*607060) fue confirmado con posterioridad en dos familias de origen europeo (Zimprich y cols. 2004). Todas ellas presentaban una forma de EP con herencia dominante, un patrón clínico típico, y un inicio tardío.

Por otra parte, Paisán-Ruiz y colaboradores (Paisán-Ruiz y cols. 2004) identificaron en 2004, cuatro familias de origen vasco con una edad media de inicio de 65 años, y un curso clínico benigno, aunque con disfunción nigroestriatal demostrada mediante PET, típica de la EP idiopática (figura 6). En estas familias y en una británica se pudo comprobar que también existía ligamiento genético a la misma zona, y que reducían ligeramente la región de ligamiento. El análisis posterior les permitió identificar 2 mutaciones en un gen, que a partir de entonces se denominó *LRRK2*, por cinasa con repeticiones ricas en leucina, mientras que a la proteína codificada por este gen se le denominó dardarina, que procede del término vasco "*dardara*" que significa temblor (Paisán-Ruiz y cols. 2004). Una de las mutaciones, R1441G aparecía en las 4 familias vascas, mientras que la segunda mutación, Y1699C se observaba en la familia de origen británico. La presencia de la misma mutación en las cuatro familias vascas, sugería la existencia de un efecto fundador en

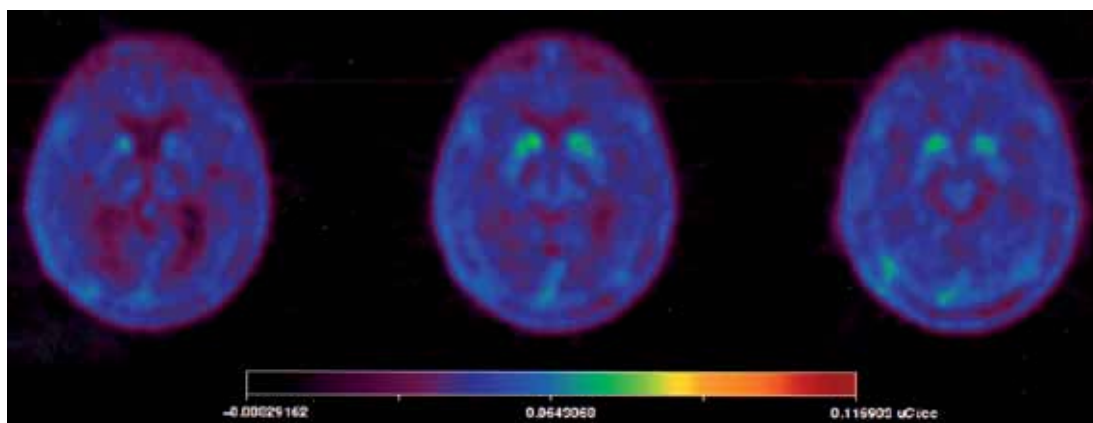


FIGURA 6
PET con 18F-fluorodopa en paciente con EP asociada a mutación R1441G: disfunción nigroestriatal típica de la EP

esta población, por lo que fue analizado un grupo de pacientes de este mismo origen étnico, con y sin historia familiar de EP, y se observó un porcentaje relativamente alto de casos (alrededor del 6%) [Simón-Sánchez y cols. 2006] que presentaban la misma mutación. Además, se pudo comprobar que esta mutación provenía del mismo cromosoma ancestral, y no de nuevos eventos mutacionales, como demostraba el hecho de que el haplotipo alrededor de esta mutación fuera compartido también entre los casos.

El gen *LRRK2* (OMIM*609007) se extiende por unas 144 kb en el cromosoma 12, y contiene 51 exones que codifican esta proteína de 2.527 aminoácidos. Dardarina es miembro de la familia enzimática ROCO y presenta 5 dominios funcionales (figura 7). En la mitad amino terminal se encuentran repeticiones de tipo armadillo, seguidas de repeticiones de tipo anquirina, y repeticiones ricas en leucina (LRR). A continuación se encuentra el dominio con actividad GTPasa de tipo ROC (del inglés *ras of complex proteins*), seguido del dominio COR (del inglés *C-terminal of Roco*) de función desconocida. La asociación de estos dominios da lugar a la familia de proteínas denominadas "ROCO". Tras este dominio ROCO dardarina posee un dominio del tipo MAP3K, seguida de un dominio WD40. Esta asociación de dominios sugiere que dardarina es una cinasa GTPasa dependiente, que está involucrada en la reorganización del citoesqueleto en respuesta a estímulos externos (Ridley y cols. 2001). Por otro lado, los dominios LRR están relacionados con múltiples funciones, relacionadas con la interacción proteína/proteína (Kobe y cols. 2001). Dado que no se ha identificado sustrato alguno para dardarina, su función sigue siendo poco conocida.

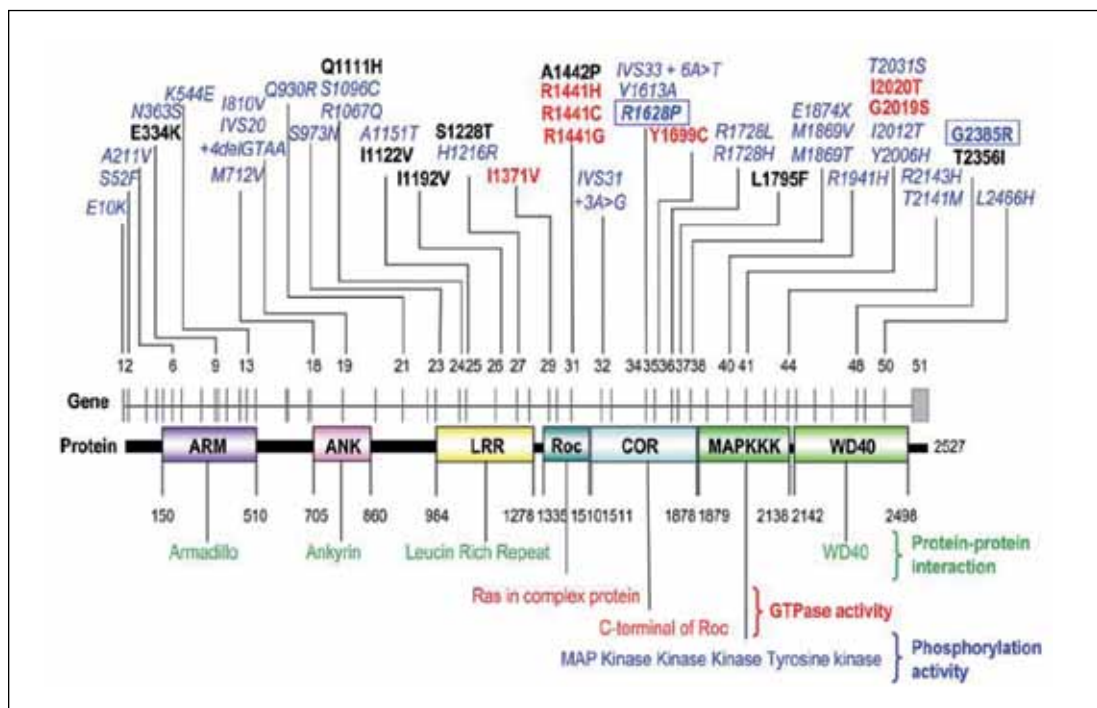


FIGURA 7 Dominios funcionales de la proteína dardarina, y las diferentes mutaciones identificadas (en rojo las mutaciones consideradas patógenas) [Lesage y cols. 2009]

6.2. Las diferentes mutaciones en *LRRK2*

Tras los primeros hallazgos, se identificaron seis mutaciones distintas que segregaban con formas familiares de EP: cinco mutaciones con cambio de aminoácido y una mutación de *splicing*. Además de las descripciones de Paisán-Ruiz y colaboradores (Paisán-Ruiz y cols. 2004), Zimprich y colaboradores (Zimprich y cols. 2004a) identificaron dos mutaciones: la mutación Y1699C, situada en el mismo nucleótido que el de la familia británica descrita por Paisán-Ruiz y colaboradores, y la mutación R1441C. Más tarde, diversos grupos identificaron otra mutación patogénica con elevada prevalencia (G2019S) [Di Fonzo y cols. 2005; Gilks y cols. 2005; Kachergus y cols. 2005; Nichols y cols. 2005], en casi todos los países, y que sigue siendo en la actualidad la mutación más frecuente. La mutación G2019S es especialmente frecuente entre los judíos Ashkenazi y la población norteafricana con EP, con una frecuencia del 13 % en formas esporádicas de EP y del 41 % en formas familiares de la enfermedad (tabla 2) [Ozelius y cols. 2006; Lesage y cols. 2005]. También en España, la mutación G2019S es frecuente en la EP, estando presente en el 4,3-7,6 % de los pacientes (6,4-18,7 % en los casos familiares y 3,4%-6,1 % en los casos esporádicos. [Gaig y cols. 2006; Infante y cols. 2006]. Esta mutación ha mostrado una penetrancia variable (Kachergus y cols. 2005), y habitualmente reducida, descrita entorno a un 30 % a la edad 75 años, (Goldwurm y cols. 2007; Latourelle y cols. 2008).

La mutación responsable de la EP en la familia japonesa que originalmente sirvió para la identificación del ligamiento, resultó ser I2020T, mutación que también apareció en el grupo de familias analizado por Zimprich y colaboradores (Zimprich y cols. 2004b). Estos autores identificaron dos mutaciones que cambian el aminoácido (I1122V y I2020T), y una tercera mutación en un nucleótido que afectaría al procesamiento o *splicing* del ARN (L1114L) [Zimprich y cols. 2004].

En la actualidad múltiples estudios demuestran que el gen que codifica la dardarina es el más frecuentemente alterado en la EP familiar, con cerca de 80 mutaciones distintas publicadas en la literatura, repartidas a lo largo de todo el gen, y afectando a todos los dominios funcionales. Sin embargo, puesto que algunas de las mutaciones más frecuentes son especialmente importantes en algunos grupos étnicos, puede que existan otras no detectadas por el sesgo de estudios limitados a población caucásica y asiática.

En este momento se conocen más de 125 variantes génicas en este gen, de las cuales sólo 7 han demostrado segregación con formas familiares de EP (R1441G, R1441C, R1441H, Y699C, G2019S, I2020T, I1371V). La elevada frecuencia de mutaciones en dardarina en enfermos con EP en principio esporádica, la existencia de mutaciones en individuos sanos, y la variabilidad en edades de inicio de la EP asociada a estas mutaciones, hace difícil interpretar la posible patogenicidad de cualquier nuevo cambio encontrado.

	Caucásico	Norteafricanos	Ashkenazi
EP Familiar	5 %	37 %	41 %
EP Esporádica	2 %	41 %	13 %

TABLA 2

Prevalencia estimada de la mutación G2019S en raza caucásica, judíos Ashkenazi y población norteafricana (Ozelius y cols. 2006; Lesage y cols. 2005)

6.3. Fenotipo clínico de los portadores de mutaciones en *LRRK2*

Los diferentes estudios publicados que analizan la expresión clínica de estas mutaciones, destacan como rasgos más característicos una penetrancia variable, pero una mayor homogeneidad en su expresión fenotípica, y en su forma de progresión, con un patrón indistinguible de la EP clásica. La edad de debut es variable habitualmente entre los 55 y 65 años, si bien se ha descrito en algunos casos antes de los 45 años, y por encima de los 80 (Hasegawa y cols. 1997; Paisán-Ruiz y cols. 2005; Di Fonzo y cols. 2005).

En nuestra serie de pacientes portadores de la mutación R1441G, pudimos comprobar una edad de inicio entre los 50 y 70 años, predominando el temblor de reposo asimétrico como síntoma de inicio (Paisán-Ruiz y cols. 2004; Paisán-Ruiz y cols. 2005). El curso clínico era lentamente progresivo, y con excelente respuesta al tratamiento dopaminérgico. La mayoría de los pacientes desarrollaron fluctuaciones motoras y discinesias a los años, con escasa presencia de demencia incluso pasados 15 años desde el inicio de la enfermedad (Paisán-Ruiz y cols. 2005).

Los pacientes portadores de la mutación más extendida, la G2019S, en su mayoría presentan un parkinsonismo similar a la EP clásica (Di Fonzo y cols. 2005; Nichols y cols. 2005; Gilks y cols. 2005; Aasly y cols. 2005; Hernández y cols. 2005; Deng y cols. 2005). La edad de inicio es habitualmente entre los 50 y 70 años, con temblor de reposo, bradicinesia, rigidez, o un cuadro mixto, en su mayoría de inicio asimétrico. En algunos casos se describe distonía focal en el pie como síntoma inicial (Gilks y cols. 2005; Aasly y cols. 2005). La respuesta al tratamiento es buena, con desarrollo de fluctuaciones motoras y discinesias tras varios años, de igual forma que en la EP clásica. Algunos autores (Nichols y cols. 2005) describen una enfermedad menos agresiva, de evolución más lenta, con menos riesgo de desarrollar demencia, incluso en casos con más de 30 años de evolución (Di Fonzo y cols. 2005).

La experiencia con terapias menos convencionales como la estimulación cerebral profunda en pacientes portadores de mutaciones en *LRRK2* es limitada, y con diferencias en el resultado en función de la mutación. Si bien en pacientes portadores de la mutación G2019S la estimulación subtalámica bilateral muestra resultados positivos (Schüpbach y cols. 2007), en los cuatro casos descritos con la mutación R1441G, la eficacia es menor frente a los individuos del resto de la serie publicada por este grupo (Gómez-Esteban y cols. 2008).

En la familia Sagamihara, los pacientes portadores de la mutación I2020T, presentaban un parkinsonismo de inicio asimétrico, sin signos atípicos para la EP clásica, con complicaciones motoras secundarias al tratamiento a los 6-8 años, y con buena respuesta a levodopa (Hasegawa y cols. 1997; Funayama y cols. 2002, Funayama y cols. 2005). En esta familia la edad media de inicio era de 54 años, si bien en un caso el debut había sido a los 39 años, y en otros a los 74 años.

En los pacientes portadores de la mutación R1441C, el temblor de reposo era el signo predominante (Wszolek y cols. 2004; Zimprich y cols. 2004), y el resto del cuadro clínico era el característico de la EP clásica, si bien se describía un paciente con paresia supranuclear de la mirada. Los mismos autores publican en portadores de la mutación Y1699C, dos pacientes con amiotrofia, y dos que habían desarrollado demencia (Wszolek y cols. 1997; Zimprich y cols. 2004).

En conjunto, el fenotipo parkinsoniano de los pacientes portadores de mutaciones en *LRRK2*, es muy similar al que presenta la EP clásica, con un curso evolutivo relativamente benigno. Los rasgos fenotípicos que se han asociado a un peor pronóstico, como la disfunción cognitiva, la inestabilidad postural (Burn y cols. 2006), la escasa respuesta al tratamiento dopaminérgico, y el desarrollo precoz de discinesias y distonía asociadas a la toma de levodopa, están también presentes en la EP asociada a mutaciones en *LRRK2*, pero se describen en menor proporción que en las series de EP idiopática (Paisán-Ruiz y cols. 2004; Simón-Sánchez y cols. 2006).

6.4. Una neuropatología variable

Las descripciones neuropatológicas publicadas referentes a pacientes con EP asociada a mutaciones en *LRRK2* han sido bastante heterogéneas. El análisis patológico de las dos familias descritas por Zimprich y colaboradores, reveló esta gran variabilidad entre los afectados. En las dos familias estudiadas por estos autores se describieron pacientes con una degeneración nigral inespecífica, e inclusiones positivas para ubiquitina. Además, en una de ellas, dos pacientes presentaban patología con CL, uno de ellos con una distribución de acúmulos de α -sinucleína (incluyendo CL), con un patrón típico de DCL. En esta misma familia, un tercer familiar afectado presentaba patología tau, similar a las que se observa en casos de parálisis supranuclear progresiva (PSP). Además, en la otra familia pudieron describir en un paciente patología tipo EA (Zimprich y cols. 2004a). El único estudio *post-mortem* de EP asociado a la mutación R1441G publicado por nuestro grupo no presentaba CL, y únicamente mostraba degeneración pura de la SN (Martí Massó y cols. 2009).

TABLA 3

Casos descritos de estudio neuropatológicos en pacientes con EP asociada a mutaciones en *LRRK2*

Mutación	Casos	Neuropatología	Autores
I1371V	1	CL	Giordana, 2007
R1441C	4	CL, ON, UB	Wszolek, 2004. Zimprich, 2004
T1699C	2 1	UB CL	Wszolek, 1997. Zimprich 2004 Khan, 2005
G2019S	3 8 3 1	CL CL CL No CL	Gilks, 2005 Ross, 2006 Giasson, 2006 Gaig, 2007
I2020T	4	No inclusiones	Funayama, 2002
R1441G	1	No inclusiones	Martí-Massó 2009

CL: Cuerpos de Lewy. UB: Ubiquitina. ON: ovillos neurofibrilares

7. Biomarcadores en la enfermedad de Parkinson

7.1. Los Biomarcadores en el diagnóstico precoz y diagnóstico diferencial

La EP sigue sustentando su diagnóstico en criterios clínicos basados en la sintomatología motora característica, la ausencia de síntomas atípicos, y el apoyo de la respuesta positiva a la medicación dopaminérgica. Son muchos los casos en los que el diagnóstico diferencial resulta difícil, especialmente en sus primeras etapas. En particular, el temblor esencial (TE) y parkinsonismos atípicos como la PSP y la atrofia multisistema (AMS), que inicialmente pueden confundirse con la EP. El valor predictivo positivo del diagnóstico clínico final de EP idiopática hecho por especialistas en trastornos del movimiento, se demostró que era muy alto (98,6%) [Hughes y cols. 2002], pero para mejorar la exactitud del diagnóstico diferencial de la EP, contar con otros signos clínicos, con los resultados de la neuroimagen, o con variables bioquímicas resultaría de enorme importancia.

Además de la precisión en el diagnóstico, la precocidad del mismo es importante, especialmente si pensamos en terapias neuroprotectoras o modificadoras del curso de la enfermedad. Se han realizado múltiples ensayos clínicos con este propósito, pero hasta la fecha no han tenido éxito, posiblemente por llevarse a cabo en fases avanzadas de la enfermedad, cuando la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN ya ha superado el 50%, y pueden haber comenzado las lesiones en áreas que afectan a otras estirpes neuronales, como las catecolaminérgicas del tronco. Por todo ello, urge la necesidad de poder aplicar estas terapias en estadios más iniciales, y resulta esencial un diagnóstico más temprano de la EP.

La detección de biomarcadores es una pieza clave en este proceso. En los últimos años han surgido gran cantidad de estudios que intentan identificar marcadores biológicos en grandes series de pacientes con EP.

7.2. Biomarcador ideal

Definimos como biomarcadores aquellas características que pueden ser medidas de forma objetiva como indicadores de la normalidad, de procesos patogénicos, o como respuesta a una intervención terapéutica. El biomarcador ideal debe ser sensible, reproducible, estrechamente relacionado con el proceso fisiopatológico de la enfermedad, fácil de medir, de bajo coste, no invasivo y completamente validado (Michell y cols. 2004).

Ejemplos de estos biomarcadores son los marcadores clínicos de la enfermedad, como la presencia de síntomas no motores (hiposmia, TCREM o la disfunción autonómica), marcadores de imagen como es el DAT-SPECT, y la gammagrafía cardíaca con metaiodobenzilguanidina (MIBG), y también los marcadores biológicos, expresados en diferentes fluidos como suero o líquido cefalorraquídeo (LCR).

7.3. Marcadores clínicos: Estudio de síntomas no motores

Los síntomas característicos de la EP, aparecen en una fase que podríamos considerar “tardía”, teniendo en cuenta que el proceso fisiopatológico se ha iniciado ya años atrás. Un marcador clínico eficaz debería aportarnos información en fases previas. Identificar síntomas en ese momento permitiría detectar individuos con riesgo de desarrollar la enfermedad motora en un futuro cercano. El descubrimiento de los síntomas no motores de la enfermedad, ha revolucionado el conocimiento de la EP, y aunque diversos estudios como la clasificación o estadiaje neuropatológico de Braak (Braak y cols., 2003) apuntan en esta misma dirección, todavía quedan muchas cuestiones sin resolver. Resulta obligado conocer la prevalencia, que tienen los síntomas no motores en las formas genéticas de EP, determinar su impacto en el contexto del resto de síntomas de la enfermedad, y determinar su valor como marcadores clínicos.

7.3.1. Estudio del sistema autonómico mediante gammagrafía cardiaca con metaiodobenzilguanidina (MIBG)

Los síntomas de disfunción autonómica son comunes en la EP, y en otros parkinsonismos como la DCL y la AMS. La mayoría de pacientes con EP desarrollan diferentes síntomas a lo largo del tiempo, y su afectación puede detectarse incluso desde fases muy precoces, mediante el estudio de las neuronas simpáticas postganglionares (Gibb y cols.1988; Wakabayashi y cols. 1993; Braak y cols. 2003; Iwanaga y cols. 1999). Esta situación, no aparece en todos los casos, y en los que se ha detectado la presencia de CL en los ganglios y plexos periféricos, no siempre se ha correlacionado con síntomas clínicos (Iwanaga y cols.1999).

La función simpática puede evaluarse con gran sensibilidad (Haensch y cols. 2009; Courbon y cols. 2003), mediante gammagrafía (o escintigrafía) cardíaca, empleándose el trazador Metaiodobenzilguanidina (^{123}I -MIBG). MIBG es un análogo de la noradrenalina, con capacidad de unión a su transportador de membrana. La captación de este trazador está disminuida frecuentemente en la EP, desde sus primeros estadios (Orimo y cols. 1999; Spiegel y cols. 2005), incluso en la fase “premotora” de la enfermedad (Goldstein y cols. 2002; Mínguez y cols. 2007). Diversos estudios han mostrado una alta sensibilidad en el diagnóstico diferencial de la EP idiopática frente a otros parkinsonismos de naturaleza degenerativa en los que también pueden existir síntomas de disfunción autonómica, (Braune y cols. 2001; Braune y cols. 1998; Courbon y cols. 2003; Nagayama y cols 2005) donde la captación es normal, al igual que en el parkinsonismo vascular (Kim y cols. 2006), en el parkinsonismo inducido por fármacos (Lee y cols. 2006a), y en el TE (Lee y cols. 2006b). Dentro de la EP, no todos los fenotipos clínicos tienen una misma respuesta en la prueba. En las formas tremóricas, la escintigrafía muestra una mejor captación del trazador (Saiky y cols. 2006; Spiegel y cols. 2007), y hay una mayor disfunción en las formas rígido acinéticas, así como en los casos que presentan alucinaciones visuales (Oka y cols. 2007). Queda por determinar con mayor grado de certeza la afectación simpática en pacientes con EP de base genética, donde hasta la fecha los estudios realizados en cortas series de pacientes, han descrito una menor afectación cardíaca en la gammagrafía cardíaca con MIBG frente a la EP idiopática (Quattrone y cols. 2007; Tomimaya y cols. 2006).

7.3.2. Estudio del olfato

La afectación del olfato es común en la EP, aunque no es un síntoma referido espontáneamente por los pacientes (Doty y cols. 1992), y no precede de forma inequívoca a los síntomas derivados de la pérdida neuronal de SNc, como podríamos esperar en base a la clasificación de Braak (Braak y cols. 2003). El estudio de la disfunción olfatoria puede ayudar en el diagnóstico diferencial frente a otras formas de parkinsonismo, en las que no se aprecia este déficit. Habitualmente la hiposmia es bilateral y acontece independientemente del tratamiento utilizado (Tissing y cols. 2001). La asociación del déficit olfatorio con el desarrollo futuro de EP se ha determinado en un estudio prospectivo de base poblacional, donde se sugiere que la hiposmia puede aparecer 4 años antes del cuadro clínico característico de la EP (Ross y cols. 2008). Al igual que la disfunción simpática, no queda claramente establecido como es la disfunción olfatoria en pacientes con EP de base genética. En series cortas de portadores asintomáticos de mutaciones en *LRRK2* (Silveira-Moriyama y cols. 2008), no se han encontrado diferencias con respecto al grupo control de población sana, y en pacientes portadores de mutación en α -sinucleína, se han descrito casos sin afectación del olfato (Bostantjopoulou y cols. 2001).

7.4. Marcadores de imagen

En la actualidad contamos con técnicas de neuroimagen, tanto a nivel estructural como funcional, que pueden proporcionar una mayor precisión diagnóstica, y pueden contribuir a la detección precoz de la EP. Asumiendo que ninguna técnica es totalmente específica, y que existen discordancias clínico-radiológicas, estas técnicas tienen todavía un papel controvertido en la práctica clínica diaria.

7.4.1. Neuroimagen funcional mediante PET y DATSCAN

Actualmente es la forma más objetiva de poder obtener una aproximación a la posible afectación fisiológica de la vía dopaminérgica. La tomografía por emisión de positrones (PET), y la tomografía computerizada por emisión de un único fotón (SPECT) son técnicas que permiten la medición *in vivo* de la actividad cerebral focal, con una sensibilidad muy elevada. Existen trazadores que evalúan la actividad presináptica de la vía dopaminérgica nigroestriatal en estadios preclínicos de la enfermedad, y otros que evalúan la actividad de los receptores dopaminérgicos postsinápticos. El estudio de la integridad funcional de las proyecciones nigroestriatales es el principal objetivo de estas técnicas.

En la actualidad estos son los principales marcadores de la función de las terminales dopaminérgicas:

- **Actividad de la dopa-decarboxilasa mediante PET con ^{18}F -dopa (AADC: enzima decarboxilasa de aminoácidos aromáticos):** La captación estriatal de ^{18}F -dopa refleja la integridad de estructuras estriatales con actividad dopa-decarboxilasa, enzima responsable de la conversión de levodopa a DA y se correlaciona con la densidad de neuronas dopaminérgicas funcionantes en SNc. En estadios iniciales de la EP, la densidad de captación de este radiofármaco puede no alterarse, e infraestimarse el proceso degenerativo, en función

de mecanismos de compensación (Ribeiro y cols. 2002). La captación de ^{18}F -dopa en el putamen se correlaciona con las escalas de incapacidad funcional que hacen referencia a la rigidez e hipocinesia cuantificada por la *Unified Parkinson Disease Rating Scale* (UPDRS), pero no se correlaciona con la intensidad del temblor, lo que indica la implicación de vías no dopaminérgicas en la fisiopatología del temblor.

- **Marcadores del transportador presináptico de dopamina (DAT):** Este transportador se encuentra en las dendritas y axones de neuronas dopaminérgicas, y es un potencial marcador de la integridad de las proyecciones nigroestriatales. Existen varios ligandos destacando ^{123}I -CIT por una afinidad similar por los transportadores presinápticos de DA, noradrenalina y serotonina. A pesar de tener una cinética de captación estriatal lenta (24 horas), si se utiliza el análisis por voxels tiene potencial discriminativo en el diagnóstico diferencial de la EP, la AMS y la PSP. La sensibilidad de estos marcadores para diferenciar la EP precoz del sujeto sano es del 90 %, y al contrario que en la PET con ^{18}F -dopa la captación estriatal de ligandos de DAT puede estar reducida, ya que la actividad DAT está reducida en estadios iniciales en un intento de mantener una concentración de DA sináptica adecuada. En la práctica clínica se dispone de un radiofármaco comercial para su uso con SPECT: el 123I-FP-CIT (DATSCAN), análogo de la cocaína, con una sensibilidad del 90-97 % en la valoración de la integridad presináptica nigroestriatal. Su uso permite diferenciar parkinsonismo de TE y del sujeto sano, donde la captación de DAT es normal. No tiene igual eficacia en la diferenciación de la EP con otros parkinsonismos, donde también existe una afectación presináptica de grado variable. Si es esperable encontrar una asimetría en la distribución del radioligando, con mayor afectación del putamen en los casos de EP.
- **Marcadores del transportador vesicular de monoaminas (VMAT2):** Este transportador es responsable del paso de monoaminas desde el citoplasma al interior de las vesículas sinápticas, y se ha establecido que la densidad de VMAT2 estriatal es proporcional al número de neuronas nigroestriatales funcionantes (Vander-Borghet y cols. 1995). Para marcar esta proteína se emplea ^{11}C -Dihidotetrabenazina, que en comparación con otros radiotrazadores, parece que su captación en la EP está más reducida que la fluorodopa y menos que la DAT, por lo que podría proporcionar una medición más real de la densidad de terminales dopaminérgicos (Seppi y cols. 2006).
- **Marcadores de la vía nigroestriada postsináptica (^{11}C -racloprida):** Para estudiar la densidad relativa de receptores estriatales D2 se emplea el PET con ^{11}C -racloprida, que en la EP encuentra valores normales, reducidos o aumentados a diferencia de la AMS, donde todos los estudios encuentran una reducción de captación (Van Laere y cols. 2010).

7.4.2. Resonancia magnética (RM)

Esta técnica de imagen es una de las herramientas más utilizadas en el diagnóstico diferencial de la EP frente a otros parkinsonismos degenerativos o secundarios, formando parte de las pruebas complementarias más habitualmente empleadas en la práctica clínica diaria.

En condiciones normales la SNc muestra una hiperseñal en T2 limitada lateralmente por la *pars reticulata*, y medialmente por el núcleo rojo, que se observa hipointenso en esta secuencia. La RM convencional es normal en la EP sin presencia de demencia, sólo mostrando alteraciones anatómicas en otros parkinsonismos como la AMS o la PSP. Con el desarrollo de equipos más sofisticados, y de mejor calidad de imágenes, si se puede observar un menor volumen relativo de la SNc, que pierde su hiperseñal. Estos cambios se observan mejor en secuencias de inversión-recuperación donde se aprecia la SN más pequeña e irregular en su región lateral, lo que puede ayudar a diferenciar la EP de un individuo sano (Minati y cols. 2007). Con técnicas de RM potenciadas en difusión (DWI), se han mostrado rasgos diferenciales entre la EP y la AMS a nivel de putamen, de protuberancia, y de pedúnculos cerebelosos medios (Nicoletti y cols. 2006). La imagen cuantitativa que ofrece la RM espectroscópica puede ayudar en este diagnóstico diferencial debido a las concentraciones de N-acetilaspártato anormalmente reducidas en el núcleo lenticular de pacientes con AMS y PSP (Guevara y cols. 2010). Las imágenes con tensor de difusión (DTI) son prometedoras para evaluar la integridad de los tractos nerviosos en sustancia blanca, e indirectamente la conectividad cerebral. En esta técnica hay dos mediciones de interés: el coeficiente medio de difusión aparente (ADC), que mide el movimiento molecular promedio en todas las direcciones, y la anisotropia fraccionada (FA) que mide la difusión direccional del agua. Mediante un procedimiento computarizado (DTT) se reconstruyen las principales vías en el cerebro, basándose en la anisotropia del movimiento de agua en la sustancia blanca mielinizada. Se han publicado valores bajos de FA en la SN de pacientes con EP comparados con controles, que se relacionan inversamente con la gravedad de la enfermedad (Chan y cols 2007). La RM con secuencias de *Susceptibility-Weighted Imaging* (SWI) evalúa el curso y patrón de mineralización de los núcleos grises profundos del cerebro. En la EP la SNc muestra un grado de mineralización mayor que en la AMS o la PSP, aunque todavía la aplicabilidad práctica de esta técnica queda por concretar (Gupta y cols. 2010).

7.4.3. Estudio de Sustancia Negra mediante ultrasonografía

La ultrasonografía transcraneal (UTC) es un método no invasivo y accesible, que puede ayudar en el proceso diagnóstico en la EP. La hiperecogenicidad de la SN registrada mediante UTC es un signo típico de la EP, presente en algunas series hasta en el 90% de los individuos afectados (Berg y cols. 2002). Este área de ecogenicidad se mantiene estable en adultos sanos, y permanece sin cambios en los pacientes durante el curso de la enfermedad (Berg y cols. 2005). No se conoce el motivo último por el cual se muestra este aumento de ecogenicidad en la SNc, pero los estudios con animales, y los análisis *post-mortem* de pacientes indican una probable relación con el aumento del contenido de hierro en la SNc (Berg y cols. 2006).

Este hallazgo ultrasonográfico se ha propuesto como un posible marcador de susceptibilidad de la vía nigroestriada en la EP (Siderowf y cols. 2006), que sin embargo no está presente en otros parkinsonismos como la AMS y la PSP (Gaenslen y cols. 2008). Estudios realizados en controles sanos detectan este rasgo en el 8-10% de los individuos (Becker y cols. 1995, Berg y

cols 1999) en todas las edades, pero especialmente en sujetos de edad avanzada que mostraban signos clínicos de acinesia (Behnke y cols. 2007).

Pocos estudios han descrito los hallazgos ultrasonográficos en las diferentes formas monogénicas de EP, con diferentes resultados (Schweitzer y cols. 2007). Schweitzer y colaboradores realizaron el estudio ecográfico a pacientes con EP asociada a mutaciones en *SNCA*, *LRRK2*, *PRKN*, *PINK1* y *DJ-1*, y mostraron una menor hiperecogenicidad de SN en los diferentes subtipos genéticos frente a la EP idiopática. En portadores de mutaciones en parkina, Hagenah y colaboradores (Hagenah y cols. 2008) observaron un aumento de ecogenicidad de la SNc, tanto en individuos afectados, como en no afectados. El mismo autor detectó hallazgos similares en portadores de mutaciones en *PINK1* (Hagenah y cols. 2007). En estos trabajos no se determinó la posible correlación con los hallazgos de DATSCAN o PET con F-dopa.

7.5. Marcadores biológicos en correlación con las diferentes hipótesis patogénicas en la EP

Hasta la fecha no se ha identificado ningún biomarcador en la EP que cumpla todos los criterios anteriormente definidos para ser considerado un marcador ideal. La investigación se ha centrado en el estudio proteómico del LCR, el análisis metabólico del suero o plasma, y la expresión génica en linfocitos de sangre periférica (LSP).

El estudio en suero, plasma o sangre periférica sería ideal por su accesibilidad, escasa invasividad y bajo coste. Los estudios realizados han mostrado resultados en muchos casos contradictorios, en parte por las dificultades que crea el gran contenido proteico de la muestra. El LCR es una fuente potencial de biomarcadores en pacientes vivos, por el contacto directo con el cerebro enfermo, y las proteínas implicadas en la patogénesis de la EP. Estas proteínas se originan en su mayor parte en la propia sangre, y la contaminación hemática durante la punción lumbar puede tener un efecto significativo, por lo que resulta imprescindible estandarizar los protocolos de extracción (Teunissen y cols. 2009). Han sido muchos los estudios que han buscado biomarcadores en diferentes muestras biológicas, acorde con las diferentes hipótesis sobre los mecanismos fisiopatológicos implicados, con resultados en ocasiones contradictorios (tabla 4) [Van Dijk y cols. 2001].

- **Disfunción mitocondrial y aumento de estrés oxidativo:** La reducción de la actividad del complejo I mitocondrial en la SN de pacientes con EP comparado con controles, es un hecho conocido desde hace más de 20 años (Schapira y cols.1989), y reforzado también por el efecto de un pesticida capaz de producir parkinsonismo como es la rotenona (Betarbet y cols. 2000), y del tóxico MPTP. Ambos inhiben este complejo y se emplean en modelos animales de parkinsonismo. Además, las proteínas relacionadas con las formas monogénicas de EP, incluyendo *SNCA*, *PRKN*, *DJ-1*, *PINK1*, *LRRK2* y *HTRA2*, también se han visto implicadas en esta disfunción mitocondrial (Lin y cols. 2006), que favorece un incremento de radicales libres, y de proteínas modificadas por la oxidación como es *UHCL-1* (Choi y cols. 2004) y la propia α -sinucleína (Giasson y cols. 2000).

TABLA 4

Biomarcadores estudiados en pacientes y en controles, tanto en LCR como en tejido cerebral (tabla adaptada de van Dijk y cols. 2010)

	Tejido cerebral	LCR
Disfunción mitocondrial		
• Ceruloplasmina	↑ (Loeffler et al., 1996)	↓ (Abdi et al., 2006) = (Loeffler et al., 1994)
• <i>DJ-1</i>	↓ (Kumaran et al., 2009)	↑ (Waragai et al., 2006) ↓ (Hong et al., 2010)
• Superóxido dismutasa modificada 1 (SOD1)	↑ (Choi et al., 2005)	↑ (Guo et al., 2009)
Fallo en la degradación de proteínas		
• Actividad de Beta-glucocerebrosidasa	Alteración en la secuencia del gen (Lwin et al., 2004)	↓ (Balducci et al., 2007)
Agregación proteica y formación de cuerpos de Lewy (CL)		
• SDS-soluble α -synuclein	Presencia en cuerpos de Lewy (Tong et al., 2010)	= (Borghi et al., 2000; Ohrfelt et al., 2009) ↓ (Tokuda et al., 2006; Hong et al., 2010)
• Transglutaminasa tisular	↑ (Andringa et al., 2004)	↑ (Vermes et al., 2004)
• Osteopontina	↓ (Iczkiewicz et al., 2006); Presencia en cuerpos de Lewy (Maetzler et al., 2007)	↑ (Maetzler et al., 2007)
Inflamación y activación glial		
• Interleukina 1-beta	↑ (Mogi et al., 1994a)	= (Pirttila et al., 1994) ↑ (Blum-Degen et al 1995) no detectable (Mogi and Nagatsu, 1999)
• Interleukina-6	↑ (Mogi et al., 1994a)	↑ (Blum-Degen et al., 1995; Muller et al., 1998) no detectable (Mogi and Nagatsu, 1999)
• <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> (BDNF)	↓ (Mogi et al., 1999; Murer et al., 2001; Parain et al., 1999)	↓ (Zhang et al., 2008) ↑ (Salehi, Mashayekhi, 2009)
• Inhibidor tisular del MMP 1 (TIMP-1)	↑ (Lorenzl et al., 2002)	↑ (Lorenzl et al., 2003)
• <i>Tumor necrosis factor-alpha</i> (TNF- α)	↑ (Mogi et al., 1994b; Nagatsu et al., 2000)	↑ (Le et al., 1999; Mogi and Nagatsu, 1999)
• <i>Beta-2-microglobulina</i>	↑ (Mogi et al., 1995)	↓ (Mogi et al., 1989) ↑ (Zhang et al., 2008) no detectable (Mogi and Nagatsu, 1999)

Abreviaturas: SDS = sodium dodecyl sulfate. ↑ indica aumento de nivel en EP comparado con control; ↓ indica descenso de nivel en EP comparado con control; = indica no diferencias entre EP y control

- **Agregación protéica:** La producción de proteínas anómalas, y el fallo en su degradación favorecen su agregación formando los CL y NL. La proteína más representada en los CL es α -sinucleína. En la EP se agrega en formas insolubles, pero en estadios intermedios, siguen siendo formas tóxicas, y se constituye en oligómeros solubles que forman las protofibrillas de α -sinucleína (El-Agnaf y cols. 2003). Son varios los factores que favorecen la formación fibrilar, como las mutaciones puntuales en el gen, el descenso de pH, el aumento de temperatura, la presencia de hierro, o de otras proteínas capaces de inducir su agregación como la transglutaminasa.
- **Inflamación y actividad glial:** Se ha demostrado la activación glial, y la presencia de infiltración linfocítica en la SN (Hirsch y cols. 2009). Aumentan los niveles de interleukinas (Mogi y cols. 1994a), y se aprecian modificaciones en los factores de crecimiento. Se han hallado polimorfismos en genes implicados en la neuroinflamación, como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α), la interleukina-1-beta, y la interleukina-6. Todos ellos se han relacionado con el riesgo de desarrollar la enfermedad (Hirsch y cols. 2009). Por otra parte, se ha descrito un posible efecto neuroprotector de antiinflamatorios no esteroideos (Chen y cols. 2003).

8. Los portadores de mutaciones como modelo de estudio de la EP: la mutación R1441G

Es indudable que la EP es una enfermedad heterogénea. De acuerdo al fenotipo clínico, la edad de comienzo, el curso clínico, y la respuesta al tratamiento se pueden diferenciar diferentes subgrupos. Los factores que determinan un tipo u otro de EP siguen sin ser identificados, pero son múltiples las hipótesis que se pueden plantear, relacionadas con la todavía desconocida etiopatogenia de la enfermedad.

La alta frecuencia de la mutación R1441G en el gen *LRRK2* en los pacientes con EP en nuestra población, en virtud de un efecto fundador (Simón-Sánchez y cols. 2006), nos permite en la actualidad identificar portadores asintomáticos, que aún no han desarrollado los síntomas motores clásicos, pero en los que pueden ya detectarse diversas modificaciones en diferentes test y pruebas diagnósticas. Los portadores asintomáticos de la mutación R1441G, con una elevada probabilidad de desarrollar una EP a lo largo de su vida, nos ofrecen la posibilidad de evaluar la enfermedad de forma prospectiva, desde los estadios más iniciales. El estudio de síntomas no motores, presentes en estas fases iniciales, la identificación de la integridad de la vía nigro-estriada evaluada mediante DAT-SPECT, o la UTC de la SN en esta población, nos puede proporcionar información relevante sobre la fase “premotora” de la EP, y podría servir para detectar marcadores clínicos, moleculares y de imagen, de evolución a EP en esta población de riesgo.

Identificar esta población en riesgo de desarrollar la EP, resultará también primordial, puesto que serían potenciales candidatos para futuros tratamientos de neuroprotección en etapas tempranas de la enfermedad, cuando la neurodegeneración no ha llegado aún a sus últimas consecuencias.

9. La EP asociada a mutaciones en *LRRK2*: un modelo diferente de neurodegeneración

Las múltiples publicaciones sobre las características de esta enfermedad han permitido conocer su extensión a nivel mundial, y su importancia como primera causa genética de EP. Quedan todavía muchos aspectos por dilucidar, especialmente la función de la proteína dardarina, y el significado fisiopatológico de las diferentes mutaciones. Un mejor conocimiento de este modelo de EP permitiría obtener resultados aplicables a la EP en general, a pesar de las diferencias observadas en la neuropatología, sin presencia de CLs en algunos casos, que obliga a explicar la degeneración de la SNc bajo otro punto de vista, cuestionando el papel de las inclusiones de α -sinucleína como marcador patógeno.

En este sentido se han diseñado modelos de neurodegeneración de la SNc en rata mediante la sobreexpresión de la mutación G2019S en *LRRK2* (Dusonchet y cols. 2011) que intenta representar la situación que padecen los pacientes con la EP. Los autores construyeron adenovirus con la secuencia de *LRRK2* con y sin la mutación, y fueron inyectados en el estriado de varios grupos de ratas adultas, obteniéndose una expresión selectiva del transgen en las neuronas dopaminérgica, tanto en el estriado como en la SNc. El análisis seriado de la SNc reveló una pérdida significativa y progresiva de neuronas dopaminérgicas exclusivamente en las ratas a las que se les inyectó el vector con la mutación G2019S, lo que sugiere que la sobre-expresión de esta mutación induce la muerte de estas neuronas DA en la rata. El estudio histológico no mostró acúmulos de α -sinucleína en la SNc en ninguno de los grupos de animales, mientras que si se observó hiperfosforilación de tau en los grupos que sobre-expresaban *LRRK2* con y sin mutación. Estos resultados indican que la hiperfosforilación de tau se correlaciona con la máxima sobreexpresión de ambos transgenes pero no con la muerte neuronal, que sólo se observó en el grupo con la mutación.

En la línea de lo expuesto en la introducción, en este trabajo de tesis doctoral queremos mostrar los resultados de los estudios realizados sobre la EP asociada a mutaciones en el gen *LRRK2*, especialmente la R1441G por su prevalencia en nuestro entorno. Hacemos referencia a los trabajos llevados a cabo durante los últimos 5 años, pero el inicio se sitúa 20 años antes, cuando comenzó el seguimiento de familias con varios miembros afectados de EP.

Hipótesis

Una serie de hechos permiten considerar la hipótesis de trabajo:

1. Las dimensiones físicas y demográficas de Gipuzkoa (700.000 habitantes en 1500 Km²), y las características sociológicas de la población autóctona, ligada al lugar de nacimiento o su cercanía a lo largo de generaciones, crean un entorno adecuado para estudios de formas familiares de EP.
2. La mutación R1441G en el gen *LRRK2* fue descrita en su origen en familias procedentes de la provincia de Gipuzkoa, siendo en esta provincia la mutación más prevalente en las formas familiares de EP.
3. La EP asociada a mutaciones en *LRRK2* tiene un fenotipo muy similar a la EP idiopática.

Estos datos constituyen un escenario donde es factible:

1. Analizar la prevalencia de la mutación R1441G, en pacientes con EP, así como en una muestra poblacional.
2. Estudiar la penetrancia de la mutación R1441G en portadores de la misma.
3. Analizar el fenotipo clínico motor y premotor de los pacientes con EP portadores de la mutación R1441G, e intentar extrapolar los resultados a la EP idiopática.
4. La existencia de portadores asintomáticos de la mutación R1441G como población de riesgo de desarrollar la EP ofrece la posibilidad de describir las manifestaciones precoces de la EP, y estudiar la validez de los biomarcadores.

Objetivos

Teniendo en cuenta las consideraciones expuestas en la introducción, y el escenario referido en la hipótesis, en este proyecto nos hemos planteado los siguientes objetivos.

1. Analizar la prevalencia de las mutaciones R1441G y G2019S entre los pacientes con EP en Gipuzkoa, y determinar la penetrancia de la mutación R1441G.
2. Realizar el estudio de caracterización clínica de los pacientes con EP portadores de la mutación R1441G en el gen *LRRK2*.
3. Descripción de los hallazgos neuropatológicos detectados en pacientes con EP asociada a la mutación R1441G.
4. Estudiar posibles marcadores precoces, en portadores de la mutación R1441G, tanto en pacientes como en sus familiares asintomáticos.
 - a) Presencia de síntomas no motores:
 - i) Signos de disfunción simpática mediante gammagrafía con MIBG
 - ii) Disfunción olfatoria
 - b) Ecogenicidad de SNc mediante ultrasonografía transcraneal en pacientes, y sus familiares asintomáticos

Material y métodos

1. Pacientes, familiares y grupo control

Los estudios que conforman esta tesis doctoral han tenido como punto de partida un diferente número de individuos en función del momento de llevarse a cabo cada estudio, y de cómo estuviera cumplimentada la base de datos en ese momento.

- Estudio de la prevalencia de las mutaciones R1441G y G2019S en nuestra serie de pacientes con EP.
- Estudio de la prevalencia geográfica de las mutaciones R1441G y G2019S en una muestra poblacional.
- Estudio de la penetrancia de la mutación R1441G.

1.1. Total de individuos de la base de datos

En la actualidad son 1232 los individuos que han contribuido al registro clínico y molecular de la base de datos de la Unidad de Trastornos del Movimiento del Servicio de Neurología del Hospital Donostia. Los datos procedentes de estos individuos han sido incluidos entre los años 1998 y 2010, distribuidos en 3 categorías:

- **Pacientes con EP según criterios de Gelb** (Gelb y cols. 1999) [800 individuos]: En su mayoría proceden del Servicio de Neurología del Hospital Donostia, hospital terciario de la provincia de Gipuzkoa, que cuenta en la actualidad con 700.000 habitantes. Este hospital dispone de una Unidad de Trastornos del Movimiento desde 2007, donde se viene realizando una labor mixta asistencial, e investigadora.
- **Familiares asintomáticos en primer grado de estos pacientes** (232 individuos): Entendemos como familiares en primer grado (FPG) los padres, hermanos o hijos del individuo probado. Serían familiares de segundo grado, abuelos, nietos, primos y tíos. Los datos sobre los familiares asintomáticos han sido obtenidos a partir del sujeto probando, siendo considerado como tal, aquel que fue estudiado en primer lugar en cada familia. Todos ellos fueron examinados por un neurólogo que certificó la ausencia de signos de parkinsonismo.

- **Grupo control con ausencia de enfermedad neurológica** (200 individuos): Los controles sanos, fueron obtenidos de acompañantes de los pacientes, sin lazos familiares, y de individuos que acudieron a las consultas generales de neurología, en los que se descartó la presencia de enfermedad neurológica.

Han colaborado de forma activa, aportando pacientes y familiares, los Servicios de Neurología de los Hospitales comarcales de la provincia de Gipuzkoa (Hospital de Mendaro y Hospital de Zumarraga), y el centro de especialidades de la comarca de Tolosa, en la misma provincia.

De manera más puntual se ha contactado con pacientes de los Servicios de Neurología del Hospital de Cruces (Vizcaya), y del Hospital Virgen de las Nieves (Granada), para realizar el estudio genético de las mutaciones R1441G y G2019S. Estos pacientes no han sido incluidos en los estudios mostrados en esta tesis.

Todos los individuos participantes en los diferentes estudios, accedieron de forma voluntaria a colaborar, después de leer y firmar el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del Hospital Donostia para cada uno de los estudios (ver anexos).

1.2. Individuos para el estudio de la prevalencia de las mutaciones R1441G y G2019S en nuestra serie de pacientes con EP

De los 800 pacientes con EP y 200 individuos sanos que figuran en la base de datos actual, el estudio se realizó durante el año 2008 sobre la muestra registrada hasta esa fecha de 418 pacientes (media±SD edad inicio, 63.8±10.9 años; rango 30-95 años), y 138 controles (media±SD edad, 75±10.2 años; rango 37-98 años).

Determinación del origen

Se valoró el lugar de nacimiento, la procedencia de las generaciones previas, y los 2 primeros apellidos de cada individuo. El criterio seguido para determinar el origen (vasco o no vasco), se basó en la procedencia de los 2 primeros apellidos de cada paciente, de acuerdo con los índices onomásticos. En algunos individuos sin estos apellidos se podía constatar la presencia de varias generaciones previas, que llevaban residiendo en esta región. Este es el caso de muchos de los individuos que sólo tenía uno de los primeros 2 apellidos vascos, que en base a estos criterios tampoco fueron considerados de este origen. Para estudiar como se había realizado la determinación del origen étnico de los pacientes en trabajos previos, y poder comparar la prevalencia obtenida, se revisaron los artículos publicados sobre la frecuencia de las mutaciones R1441G y G2019S en diferentes regiones de la península ibérica (figura 14).

1.3. Individuos para el estudio de la prevalencia geográfica de las mutaciones R1441G y G2019S en una muestra poblacional

Para el estudio de prevalencia de estas mutaciones en el gen LRRK2, se seleccionaron los municipios vecinos de Azkoitia y Azpeitia, de la provincia de Gipuzkoa (figura 9), dentro de la comarca donde se habían detectado la mayoría de las familias originales con casos de EP asociada a la mutación R1441G.

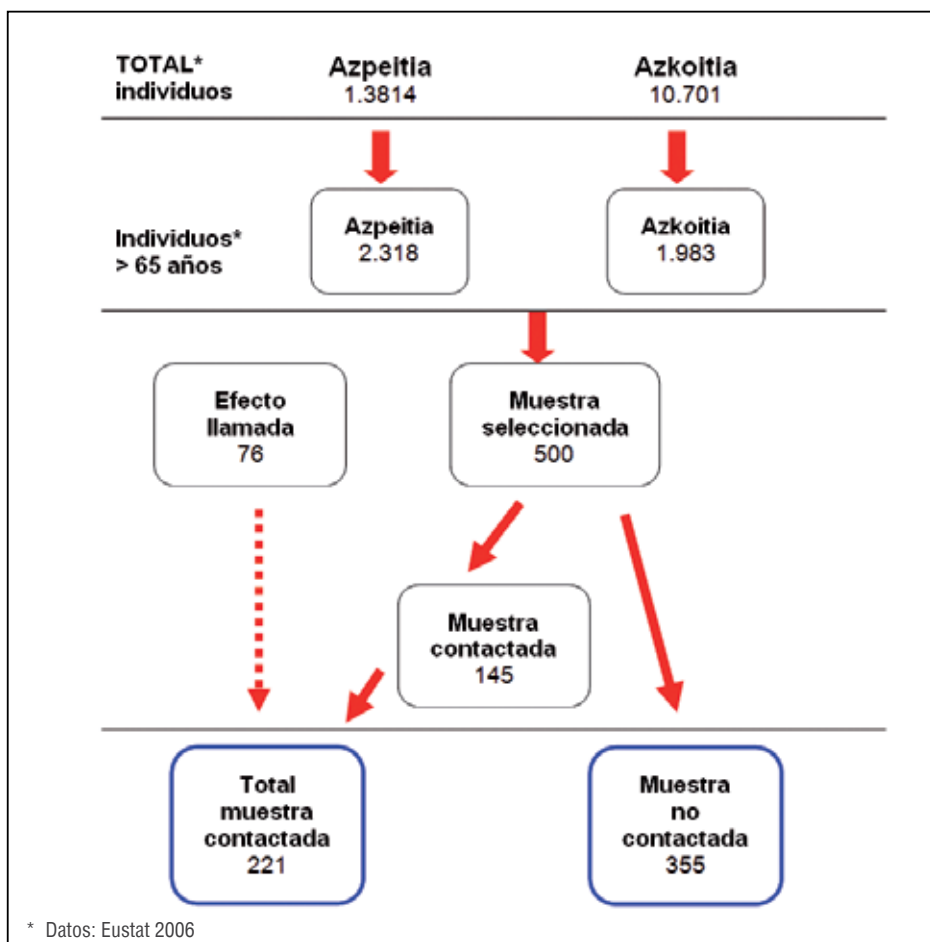
Sobre un total de 24.515 individuos censados según el registro del Instituto Vasco de Estadística (Eustat) de 2006 con todos los grupos de edad (10.701 correspondientes a Azkoitia, y 13.814 a Azpeitia), el grupo de mayores de 65 años incluía 4.301 individuos (1.983 correspondientes a Azkoitia, y 2.318 a Azpeitia). Se obtuvo una muestra al azar empleando el sistema de información asistencial *Osabide* (figura 8), perteneciente al Servicio Vasco de Salud (Osakidetza), que cubre al 98 % de la población censada en ambos municipios. Fueron seleccionados de forma aleatoria 500 individuos, con una distribución de sexos, y por grupos de edad equiparables a la distribución censal (tabla 5). El estudio se realizó entre febrero de 2009 y marzo de 2010 contactando mediante llamada telefónica, o solicitándose la cita por su médico de Atención Primaria, y se tuvo acceso a una entrevista personal con 145 individuos (29 % de la muestra aleatoria), a los cuales se realizó una anamnesis dirigida, una exploración neurológica, y una extracción de 30 cc de sangre periférica para el estudio genético de las mutaciones R1441G y G2019S en *LRRK2*, previo consentimiento informado aprobado por el comité de ética del Hospital Donostia (ver anexos).

La muestra seleccionada se vio complementada por 76 individuos, que tuvieron conocimiento del estudio a través del Centro de Salud, o como acompañantes de los individuos con los que se consiguió contactar. A los individuos contactados se les aplicó un cuestionario con datos de



FIGURA 8
Página de acceso a sistema de información asistencial *Osabide*

TABLA 5
Distribución de la muestra del estudio poblacional



filiación, se recogieron datos referentes a su posible condición con respecto a la EP (pacientes, familiar asintomático en primer o segundo orden, o sano), y se aplicaron los criterios de Gelb (Gelb y cols. 1999) para el diagnóstico de EP. Los individuos detectados con la enfermedad fueron clasificados según el fenotipo (tremórico, rígido-acinético, o mixto), y estadiados según la clasificación de Hoehn & Yahr (H&Y) [Hoehn y cols. 1967].

Los resultados de la serie contactada, fueron analizados por separado, y en el total de la muestra de 500 individuos, extrayendo la información sobre los individuos no contactados (355 individuos, 71 % del total) del historial médico proporcionado por el registro *Osabide*.



FIGURA 9
Municipios de Azpeitia y Azkoitia, y de los diferentes territorios en la provincia de Gipuzkoa.



FIGURA 10
Centro de Salud de Azkoitia (Gipuzkoa)



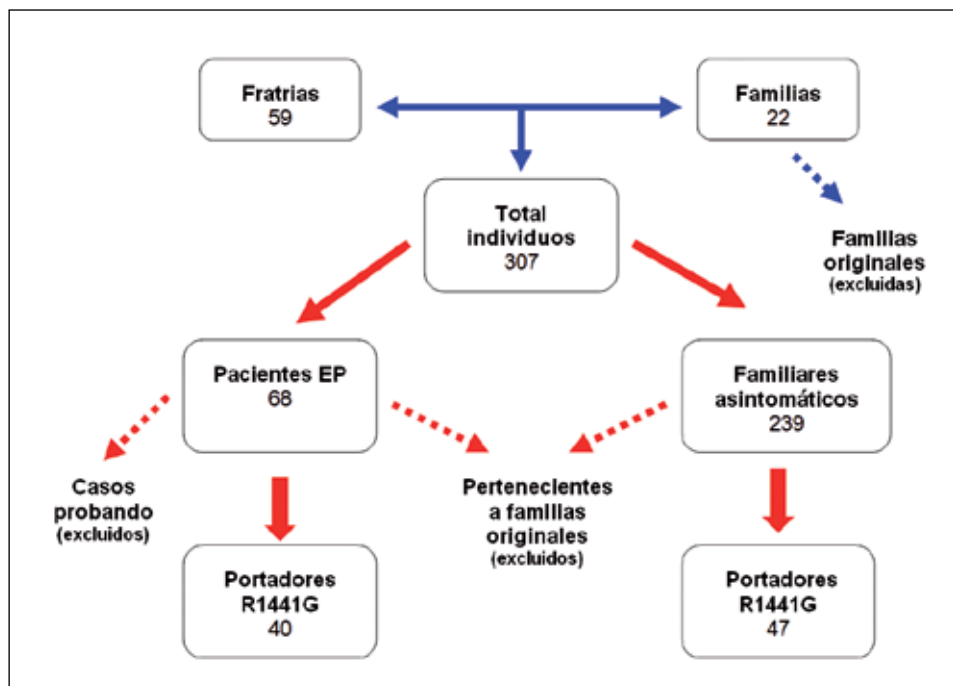
FIGURA 11
Centro de Salud de Azpeitia (Gipuzkoa)

1.4. Individuos del estudio de penetrancia de la mutación R1441G:

El estudio se realizó durante el año 2009, y la muestra estudiada incluyó 307 individuos, agrupados en 68 pacientes con EP portadores de la mutación R1441G, y 239 familiares asintomáticos. Esta muestra procedía de 22 familias en las que se había detectado al menos un paciente portador de la mutación R1441G. Para evitar los sesgos que podrían aumentar la penetrancia por una mayor predisposición al estudio de determinadas familias, se excluyeron los casos probando, y 63 individuos (28 pacientes y 35 familiares asintomáticos) que pertenecían a las primeras 4 familias estudiadas, y que colaboraron para el estudio de ligamiento, permitiendo la identificación del gen *LRRK2* (Paisán-Ruiz y cols. 2004).

En total, el estudio se realizó sobre 80 individuos portadores de la mutación R1441G. De ellos 47 eran familiares asintomáticos, y 40 pacientes, de los cuales 38 pertenecían a formas familiares de EP, mientras que 2 pacientes fueron considerados esporádicos. Definir y delimitar cada familia teniendo en cuenta un probable ancestro común (Simón-Sánchez y cols. 2006), resulta una tarea difícil. De hecho, en 3 de las 4 familias originales se ha podido detectar con posterioridad este origen común en torno al año 1700, mediante la información obtenida de las familias, y las partidas de nacimiento del registro diocesano (datos no publicados). Para poder realizar el estudio se tomó como unidad de análisis la fratría, definida como el conjunto de individuos que comparten los mismos padres biológicos. De esta forma, se separaron las 22 familias de las que procedían los 40 pacientes, en 59 fratrías.

TABLA 6
Distribución de la muestra del estudio de penetrancia



2. Obtención de datos clínicos para los diferentes estudios: protocolo clínico

Se obtuvo información de todos los pacientes a través de un cuestionario (ver anexos) donde se incluían datos de filiación, procedencia (en base al origen de los 2 primeros apellidos), ámbito rural o urbano (menos o más de 10.000 habitantes), profesión, sexo, edad actual, edad de inicio de síntomas, síntoma de inicio, simetría, respuesta a levodopa, dosis máxima de levodopa, presencia de fluctuaciones, disquinesias, distonía (y localización), síntomas de disautonomía (estreñimiento considerado como 2 ó menos deposiciones a la semana), presencia de TCREM, insomnio, hipersomnía, síndrome de piernas inquietas (SPI), y presencia o no de deterioro cognitivo (ver evaluación neuropsicológica). Para el estadiaje y valoración el grado de afectación motora se empleó la escala de H&Y, y la parte motora (III) de la UPDRS.

Se interrogó a cada paciente sobre la presencia de antecedentes familiares de EP, siendo considerada una historia familiar positiva, si hay constancia de familiares en primer o segundo grado, afectados por la enfermedad, en base a los resultados obtenidos del cuestionario adaptado de Marder (Marder y cols. 1996).

A todos los pacientes se les preguntó sobre hábitos tóxicos. Con respecto al consumo activo, previo, o pasivo de tabaco, y sobre la toma habitual de café. Se pidió información sobre exposición habitual a pesticidas-herbicidas o tóxicos industriales (cuestionario adaptado PD-RFQ).

Estudio del fenotipo clínico y curso evolutivo:

El fenotipo clínico se ha establecido a través de los datos obtenidos de los 68 pacientes con EP portadores de la mutación R1441G, y de 28 pacientes portadores de la mutación G2019S. En los casos ya fallecidos (28 individuos), se ha recogido de forma retrospectiva la información incluida en su historial médico, o mediante entrevista clínica a sus familiares.

Para considerar su curso evolutivo se han realizado evaluaciones seriadas, y análisis retrospectivo de los datos existentes, teniendo en cuenta las siguientes variables:

- Escala H&Y
- Tiempo en llegar al nivel II y IV desde el inicio de la enfermedad
- Escala UPDRS (III)
- Tiempo en presentar fluctuaciones desde el inicio de la enfermedad
- Tiempo en presentar disquinesias desde el inicio de la enfermedad
- Tiempo en presentar distonía desde el inicio de la enfermedad
- Tiempo en presentar caídas y/o dejar de salir solo a la calle
- Tiempo en desarrollar deterioro cognitivo
- Tiempo hasta el fallecimiento

Evaluación Neuropsicológica

La presencia de deterioro cognitivo se ha considerado empleando baterías y test neuropsicológicos estandarizados, que examinan la cognición global, y los 5 dominios cognitivos propuestos por la *Task Force Movement Disorders Society* (Dubois y cols. 2007; Emre y cols. 2007): Atención y memoria de trabajo, función ejecutiva, visuoespacial, lenguaje y memoria.

3. Estudio genético

Los estudios genéticos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Neurogenética del Hospital Donostia, y más recientemente en el Instituto Biodonostia. Los datos obtenidos fueron incluidos en la base de datos, con información referente a muestras de ADN, ARN y suero. De cada individuo incluido en el estudio, se obtuvo una muestra de sangre periférica (30 ml.), a partir de la cual se extrajo DNA, y en un subgrupo de pacientes RNA y suero. En todos ellos se estudió la presencia de las mutaciones R1441G y G2019S mediante el “*TaqMan single-nucleotide-polymorphism assay*” y la PCR cuantitativa StepOne (Applied Biosystems). Para asegurar el anonimato de los individuos incluidos en el estudio, tanto los datos clínicos como las muestras de sangre y DNA de cada sujeto, fueron identificados con un código. Las muestras biológicas se almacenan en forma de ADN en suspensión a -80°C en el nodo de Donostia, dentro del Biobanco Vasco de ADN.

4. Estudio neuropatológico

Hemos tenido acceso al estudio neuropatológico de un paciente con EP portador de la mutación R1441G.

La extracción, procesamiento, y primer estudio fueron realizados en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Donostia (Dra. Irune Ruiz). Con posterioridad, el estudio fue completado por el Dr. Isidre Ferrer en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Bellvitge (Barcelona).

Las secciones de parafina, de 4 micras de espesor, de las regiones seleccionadas del cerebro se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) y Klüver Barrera, o tratados con el método peroxidasa EnVision + sistema (Dako, Barcelona, España). Después del procesamiento con metanol y H₂O₂ en PBS y suero normal, las secciones se incubaron con uno de los anticuerpos primarios de la proteína glial ácida fibrilar, ubiquitina, CD68 y lectina *Lycopersicon esculentum* de microglía. Estas secciones de tejido también fueron tratadas con los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal AT8 de fosfo-tau (Innogenetics, eBioscience, Bionova, Madrid, España) a una dilución de 1:50; anticuerpo monoclonal tau anti-3R y anti-4R (Millipore,

Nombre y apellidos: Test Olfato B-SIT	Fecha:
<hr/>	
1. a) Fruta b) Canela c) Madera d) Coco	7. a) Sandía b) Cacahuete c) Rosas d) Pintura
2. a) Aguarrás b) Jabón c) Perro d) Pimienta negra	8. a) Plátano b) Ajo c) Cereza d) Aceite de motor
3. a) Aceite de motor b) Ajo c) Rosas d) Limón	9. a) Humo b) Whisky c) Piña d) Cebolla
4. a) Manzana b) Hierba c) Humo d) Uva	10. a) Rosas b) Limón c) Manzana d) Gasolina
5. a) Limón b) Chocolate c) Fresas d) Pimienta negra	11. a) Jabón b) Pimienta negra c) Chocolate d) Cacahuete
6. a) Menta b) Rosas c) Lima d) Fruta	12. a) Chocolate b) Plátano c) Cebolla d) Fruta
	TOTAL: • Normal • Deficitario • Relativ. Anormal • Anormal

FIGURA 13
Cuestionario empleado para aplicar el test de identificación olfatorial B-SIT

5.2. Gammagrafía cardíaca

Se realizó esta prueba a pacientes con EP, habiéndose aplicado previamente los criterios de exclusión: presencia de enfermedades que pudieran alterar los resultados de la gammagrafía cardíaca (cardiopatía isquémica y diabetes severa), y consumo de fármacos que pudieran interferir con la captación de MIBG en las terminales simpáticas (Solanki y cols. 1992).

La prueba se realizó en Onkologikoa de San Sebastián (Gipuzkoa) empleando en cada paciente 111 de MBq de ^{123}I -MIBG (Amersham, Malinckrodt, NL) inyectado durante 60 segundos. Los datos fueron recogidos por una gamma Millennium MPR (General Electric) a los 10 minutos (fase precoz), y a los 240 minutos (fase tardía) de la inyección del isótopo. Se obtuvo así una imagen de 3 regiones del ventrículo izquierdo en una matriz de 128×128 . El total de la muestra se empleó para el análisis cuantitativo, usando el coeficiente de captación entre corazón y mediastino (H/M) en los datos de la escintigrafía planar. Las imágenes fueron evaluadas por un investigador ajeno al fenotipo, y genotipo del individuo estudiado.

No se han descritos en la literatura valores normales de captación de MIBG, por lo que se realizó una revisión y análisis de las publicaciones más recientes sobre captación de este trazador, y se detectó que los puntos de corte descritos hasta la fecha coincidían con los considerados en nuestro trabajo. Los valores empleados como puntos de corte en nuestro estudio, tanto en la fase precoz como tardía, se eligieron de acuerdo a un trabajo de características similares, publicado por Quattrone y colaboradores, (1.69 para la fase precoz, y 1.98 para la fase tardía) [Quattrone y cols. 2008]. Los autores basaron los resultados de su estudio en un grupo control de 10 individuos sanos, familiares de pacientes, no consanguíneos, y con ausencia de signos de parkinsonismo, que fue el grupo seleccionado para comparar el resultado de la gammagrafía cardiaca con los pacientes con EP.

5.3. Ultrasonografía transcraneal de sustancia negra

El examen ultrasonográfico se realizó a través de la ventana ósea preauricular, con un equipo Premiun Toshiba Medical System (Japón), conectado a un transductor 2.0–2.5 MHz (S4 probe; Philips). La SN se identificó después de obtener la imagen en “mariposa” correspondiente al mesencéfalo. Todos los individuos fueron estudiados con el procedimiento aconsejado en las guías de UTC (Walter y cols. 2007), y fue realizado en su totalidad por 2 examinadores expertos en ultrasonografía, que desconocían el estado clínico del individuo (tanto pacientes, como familiares asintomáticos y controles) y su condición genética. El punto de corte empleado fue basado en publicaciones previas realizadas con un equipo similar, y se establecía en $0,18 \text{ cm}^2$ (Hernández Vara y cols. 2008). Fueron considerados válidos para el análisis los estudios realizados a individuos que tuvieran al menos una de las ventanas acústicas valorables.

6. Estudio estadístico

6.1. Estudio de penetrancia de la mutación R1441G

Para la estimación de la penetrancia de la mutación R1441G se emplearon las curvas de Kaplan-Meier sobre los resultados de los familiares portadores. Se empleó también un método

alternativo propuesto por Evans (Evans y cols. 2008), denominado *método de imputación*, que consistía en incluir todos los portadores y el número proporcional de familiares en primer grado que no habían sido estudiados, pero que serían portadores en base a la proporción estimada sobre los familiares estudiados. El log-rank test se empleó para comparar la penetrancia según el sexo. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando un software R 2.5.1.

6.2. Estudio de marcadores clínicos y de neuroimagen: estudio de disfunción olfatoria, gammagrafía cardíaca con MIBG, y ultrasonografía transcraneal de sustancia negra

Para determinar la distribución de variables se emplearon los test Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, y el test *t*-student para la comparación de variables. Para evaluar diferencias en las variables no paramétricas en los grupos estudiados, se emplearon los test Kruskal-wallis y U-Mann Whitney. El coeficiente de variación (CV) se calculó como el coeficiente entre la SD y la media, expresada como porcentaje. Para analizar los cambios en la frecuencia de distribución de las variables entre los portadores y no portadores de mutaciones en *LRRK2*, se aplicaron chi-square (χ^2) o el test exacto de Fisher. Mediante análisis de regresión logística se analizó la potencial relación entre disfunción olfatoria, los hallazgos de la gammagrafía cardíaca con MIBG, y la predisposición genética para la EP, en base a las mutaciones en *LRRK2*.

Los datos generales se expresaron con la media y la SD. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa SPSS 16.0 para Windows XP (Microsoft, USA). El valor de la *p* menor de 0.05 fue el nivel de significación estadística elegido.

6.3. Estudio comparativo de fenotipo clínico entre portadores de mutaciones R1441G y G2019S

Para analizar los cambios en la frecuencia de distribución de las variables entre los portadores de una y otra mutación, se aplicaron los test chi cuadrado (χ^2) o el test exacto de Fisher.

Resultados

1. Estudio de prevalencia de las mutaciones R1441G y G2019S en pacientes con EP esporádica y familiar

El estudio se realizó sobre 418 pacientes con EP y 138 controles, con los criterios previamente establecidos en la metodología. Se analizó la frecuencia de la mutación R1441G, por ser la más esperada en nuestro entorno, donde se había descrito previamente un efecto fundador, pero también la frecuencia de la mutación G2019S por ser la más prevalente a nivel mundial (tabla 7). Se compararon los resultados con los obtenidos en publicaciones previas sobre la frecuencia de ambas mutaciones en diferentes regiones de la península ibérica (figura 14).

De acuerdo con los datos obtenidos, la mutación R1441G resultó más frecuente en los pacientes con EP de origen vasco (22,4% frente a 3,7%), mientras que la mutación G2019S, era significativamente más frecuente en pacientes de origen no vasco (6% frente a 1,8%) [test exacto de Fisher, $p < 0.001$]. No se detectó ningún caso de mutación R1441G en los 130 individuos de la población control estudiada, donde si existía un caso portador de la mutación G2019S. La media de edad de inicio en los pacientes portadores de la mutación R1441G (media \pm SD, 61.7 \pm 8.5 años; rango 44–80 años) era algo mayor que la observada en los portadores de la mutación G2019S (media \pm SD 58.0 \pm 11.5 años; rango 37–75 años), pero sin diferencias significativas. Comparando el total de pacientes portadores de mutaciones en *LRK2* (media \pm SD, 60.9 \pm 9.3; rango 37–80 años) con respecto a la muestra de no portadores (media \pm SD, 64.3 \pm 11.2; rango 24–89 años), las diferencias en la edad de inicio de síntomas sí eran estadísticamente significativas ($p < 0.05$, t test).

En el total de la serie estudiada de 418 pacientes con EP, el número de pacientes con edad de inicio precoz (< 50 años), es de 37 pacientes, de los cuales 5 eran portadores de la mutación R1441G (de un total de 55 portadores), y 3 de la mutación G2019S (de un total de 16 portadores).

Entre los pacientes de origen vasco (n: 219), 49 eran portadores de la mutación R1441G (22,4%), mientras que 4 lo eran de la G2019S (1,8%). En el grupo de no vascos (n: 119), 6 eran portadores de la mutación R1441G (3.0%) y 12 de la G2019S (6.0%).

De acuerdo con estos datos, la mutación R1441G se encontraba en el 46% de los casos familiares de EP, y en el 2,5% de las formas esporádicas de EP en la población de origen vasco. En la población no vasca la mutación G2019S estaba presente en el 11.1% de las formas familiares de EP, y en el 2.5% de las formas esporádicas.

TABLA 7

Características demográficas y genéticas de la población analizada para las mutaciones R1441G y G2019S

R1441G	Vasco		No vasco		Total	
	%	n/total	%	n/total	%	n/total
Total pacientes	22.4	49/219	3.0	6/199	13.1	55/418
• EP esporádico	2.5	3/119	2.5	3/118	2.5	6/237
• EP familiar	46.0	46/100	3.7	3/81	27.1	49/181
Controles	0.0	0/83	0.0	0/55	0.0	0/138

G2019S	Vasco		No vasco		Total	
	%	n/total	%	n/total	%	n/total
Total pacientes	1.8	4/219	6.0	12/199	3.8	16/418
• EP esporádico	2.5	3/119	2.5	3/118	2.5	6/237
• EP familiar	1.0	1/100	11.1	9/81	5.5	10/181
Controles	0.0	0/83	1.8	1/55	0.7	1/138

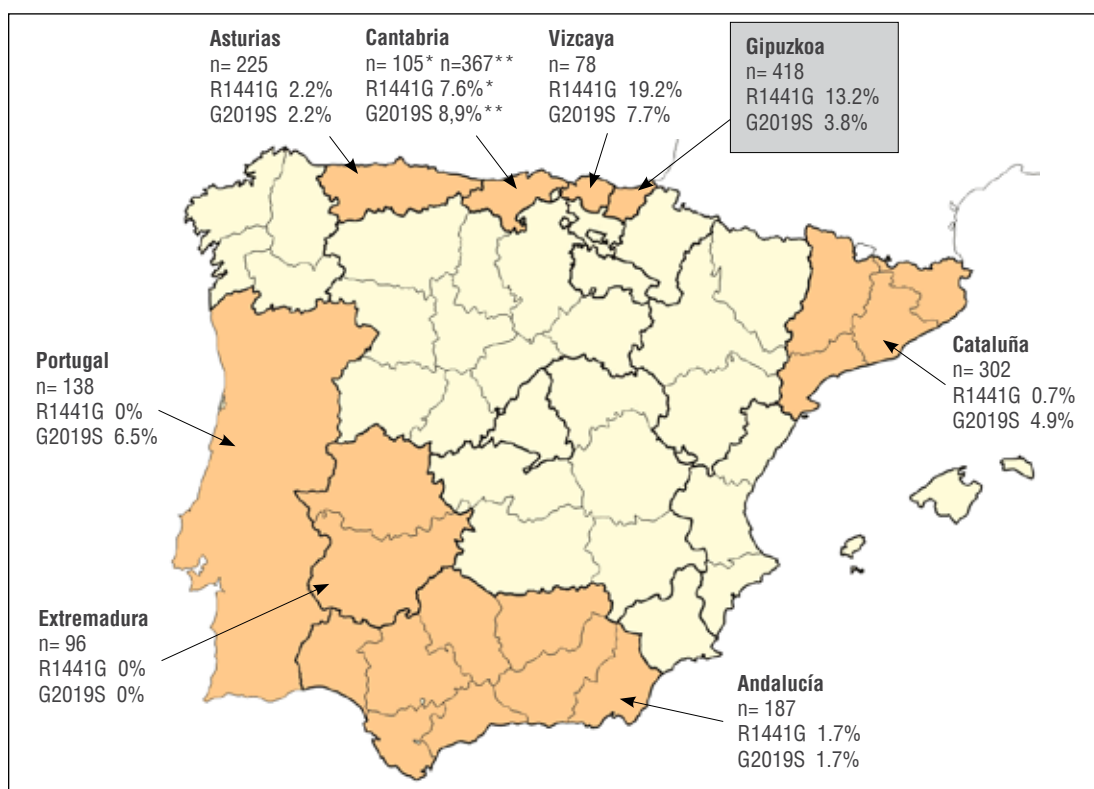


FIGURA 14

Frecuencias publicadas de las mutaciones G2019S y R1441G, en las diferentes regiones de la península ibérica de acuerdo con la literatura. Las frecuencias se expresan en número de pacientes portadores por el total de pacientes analizados en cada estudio

2. Estudio de penetrancia de la mutación R1441G

Habiéndose excluido el sesgo de los casos probando, y los pacientes pertenecientes a las familias originales empleadas para el estudio y detección inicial del gen, este estudio se realizó sobre un total de 244 individuos pertenecientes a 59 fratrías. 40 de ellos eran pacientes con EP (16.4%). Se realizó el estudio genético de la mutación R1441G a 133 individuos (54%), resultando el resultado positivo (portador) en 68 de ellos (51%). La tabla 8 muestra el número de familiares (sintomáticos o no) estudiados desde el punto de vista genético, así como el número estimado de casos que deberían ser positivos dentro del grupo de familiares no estudiados en cada cohorte, en las proporciones que determina el grupo estudiado.

La penetrancia de la mutación R1441G que se obtuvo mediante el *método convencional* de estudio, basado únicamente en los 47 familiares asintomáticos portadores, se muestra en

TABLA 8

Proporción de familiares en primer grado (FPG) sintomáticos y asintomáticos con estudio genético agrupados por edades (casos probando excluidos)

Individuos estudiados			Individuos no estudiados		
	Estudiados	R1441G+ (%)	No estudiados	R1441G+ Asumidos (%)	No. R1441G+ Asumidos (%)
Sintomáticos					
<50 años	1	1(100%)	2	100%	2
50-60 años	0		1	100%	1
60-70 años	7	7 (100%)	4	100%	4
>70 años	3	3 (100%)	1	100%	1
Total FPG	11	11 (100%)	8		8
Asintomáticos					
<50 años	34	14 (41%)	29	41%	12
50-60 años	31	15 (48%)	15	48%	7
60-70 años	20	5 (25%)	21	25%	5
>70 años	16	2 (13%)	38	13%	5
Total FPG	101	36 (36%)	103		29

TABLA 9

Penetrancia de la mutación R1441G en la EP. Estimación e intervalos de confianza por edad en los portadores, excluyendo los probandos, y comparación con el método de imputación incluyendo los probandos

Años	Portadores estudiados, probandos excluidos (n=47)		Método de imputación (n=105)		Portadores estudiados probandos incluidos (n=68)	
	Penetrancia	95% CI	Penetrancia	95% CI	Penetrancia	95% CI
50	0 %	No datos	4.5 %	(0.1-8.8)	5.1 %	(0-0.5)
55	0 %	No datos	8.8 %	(2.3-14.9)	11.6 %	(2.3-20.1)
60	0 %	No datos	20.4 %	(10.0-29.6)	23.9 %	(10.2-35.6)
65	12.8 %	(0.0-28.1)	37.9 %	(23.8-49.4)	47.8 %	(28.6-61.8)
70	50.2 %	(14.7-70.9)	55.8 %	(39.5-67.7)	64.4 %	(43.5-77.6)
75	75.1 %	(34.7-90.5)	76.1 %	(57.8-86.4)	85.8 %	(65.4-94.1)
80	83.4 %	(41.9-95.3)	85.6 %	(64.2-94.2)	92.9 %	(73.3-98.1)

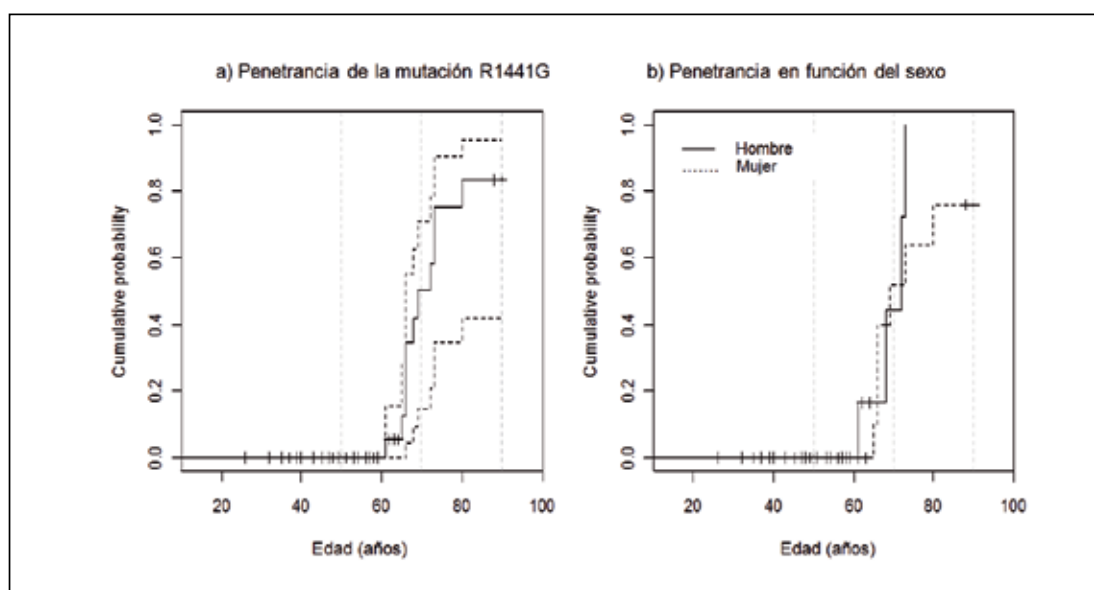


FIGURA 15

Incidencia acumulada para el total de la muestra (a), y en función del sexo (b), empleando los casos estudiados, y excluyendo los casos probando

la tabla 9 y en la figura 15. La penetrancia estimada en todo el curso evolutivo fue de 83,4% (41,9-95,3), mientras que a los 70 años era de 50,2% (14,7-70,9). Estas cifras se incrementaban hasta el 92,9% y el 64,4% respectivamente si incluíamos los casos probando. Empleando el *método de imputación* propuesto por Evans, y descrito en la metodología, la muestra final analizada incluía los 21 probandos, 47 familiares estudiados que eran portadores (11 sintomáticos

y 36 asintomáticos), y los 37 individuos no estudiados (8 sintomáticos y 29 asintomáticos), que se asumirían como portadores teniendo en cuenta la estimación derivada desde el grupo estudiado. La penetrancia final empleando este método resultó ser de 85,6%% (64,2-94,2) a los 80 años, y de 55, 8% (39,5-67,7) a los 70 años. Las diferencias que se obtuvieron también variaban según la fratría estudiada, pero el número de individuos en cada fratría (media de 5, rango 1-16) no permitía un análisis estadístico. No se obtuvieron diferencias en la penetrancia en función del sexo (log-rank test $X^2=10.3$, p-valor=0.565) [figura 15].

3. Estudio de prevalencia de las mutaciones R1441G y G2019S en una muestra poblacional

La muestra total incluía 576 individuos, distribuidos entre los 500 pertenecientes a la muestra aleatoria, y los 76 individuos que accedieron al estudio por el llamado *efecto llamada*. Se analizaron por separado los resultados obtenidos en los individuos con los que se consiguió contactar (221), formados por los 145 individuos contactados desde la muestra poblacional, y los 76 individuos del *efecto llamada*. Se analizaron también los datos clínicos registrados sobre el resto de la muestra no contactada (355), y de forma conjunta los datos sobre el total de la muestra (576 individuos) [tabla 10].

Se registraron los motivos por los cuales los individuos no accedían al estudio, con la siguiente distribución:

- No quieren acudir: 184 (51,8%)
- No se consigue contactar: 75 (21,1%)
 - 34 No contestaban al teléfono
 - 41 con número de teléfono erróneo
- Otras causas: 96 (27%)
 - No especifican la causa: 35
 - Dificultades para andar: 11
 - Referían sus familiares que el individuo era muy mayor: 5
 - Vivía en Residencia: 9
 - No entiende el estudio: 2
 - No se atreve: 2
 - Otras enfermedades: 16
 - No está en ese momento en casa: 6
 - Tiene que cuidar a los nietos: 5
 - Está ingresado o en postoperatorio: 5

Se pudo comprobar con posterioridad, que en el total de la muestra empleada, de los 75 individuos con los que no se consiguió contactar 40 estaban fallecidos, y 10 institucionalizados.

TABLA 10

Características de los individuos de la muestra contactada, distribuidos por grupos según condición

	Pacientes N: 7	Parkinsonismo n: 28	Familiares asintomáticos n: 21	Sanos n: 162
Procedencia vasca (%)	85,7%	85,7%	95,2%	93%
Ambiente Rural	7 (100%)	27 (96,4%)	19 (90,4%)	152 (93,8%)
Trabajo fábrica	2	11	7	85
Trabajo campo	0	4	2	11
Contacto tóxicos	2 (28,5%)	9 (32,1%)	7 (33,3%)	57 (35,1%)
Tabaco				
• Activo	4 (57,1%)	10 (35,7%)	4 (19%)	59 (36,4%)
• Pasivo	1	4	4	35
Café	3 (42,8%)	9 (32,1%)	11 (52,3%)	87 (53,7%)
TCE	3 (42,8%)	2 (7,1%)	3 (14,2%)	16 (9,8%)
Estreñimiento	3 (42,8%)	9 (32,14%)	5 (23,8%)	23 (14,1%)
TCREM	4 (57,4%)	2 (7,14%)	0	5 (3%)
Edad media	79,4 (62-92)	75,1 (66-86)	70,8	73,9 (52-94)
Sexos				
• Hombre/mujer	4/3	15/13	11/10	77/85
Ant. Familiares	4 (57,1%)	4 (14,2%)		
• Primer grado	3	4	12	–
• Segundo grado	1	0	9	–
Mutación R1441G	2 (28,5%)	0	2 (9,5%)	0
Mutación G2019S	0	0	0	0

Abreviaturas: TCE: traumatismo craneoencefálico, TCREM: trastorno de conducta del sueño REM

3.1. Estudio sobre los individuos contactados

Se contactó con 221 individuos: 145 (65,6%) pertenecientes a la muestra aleatoria, y 76 a través del *efecto llamada*. La distribución por sexos era de 107 hombres y 114 mujeres, y la edad media de 67,5 años

La mayoría de los individuos era de procedencia vasca (214/221, 96,8%), y se clasificaron según su condición en:

- **Pacientes:** individuos con diagnóstico ya previo de EP donde se comprobó que cumplían los criterios de Gelb (Gelb y cols. 1999): 7
- **Posible parkinsonismo:** individuos sin diagnóstico de EP, pero en los tras ser valorados por un neurólogo se describían signos aislados de parkinsonismo: 31
- **Familiares asintomáticos:** individuos que referían antecedentes familiares de EP en primer o segundo grado, sin signos de la enfermedad: 21
 - En primer grado: 12
 - En segundo grado: 9
- **Individuos “sanos”:** considerados como tal los que no tenían antecedentes familiares de EP, ni diagnóstico de EP, ni signos de parkinsonismo: 162.

3.1.1. Pacientes con diagnóstico de EP

Siete individuos tenían diagnóstico de EP realizado por un neurólogo, cumpliendo criterios de Gelb (Gelb y cols. 1999), y sin signos de atipicidad. De los 7 pacientes, 4 eran formas familiares, por la presencia de otros miembros en la familia afectados de EP. De ellos 3 con un patrón AD, y otro con familiares en segundo grado (primos maternos). En la distribución por sexos, 4 eran mujeres, y 3 hombres. 5 de los pacientes procedían de la muestra seleccionada, y 2 acudieron por el *efecto llamada*. 6 de ellos eran de procedencia vasca, y 1 de origen gallego. Todos habían vivido en ambiente rural, y sólo 2 casos podían haber estado expuestos a tóxicos industriales, coincidiendo con su trabajo en fábrica. 4 pacientes habían fumado durante más de 10 años, y 1 había sido fumador pasivo durante más de 10 años. 3 pacientes habían sido consumidores importantes de café (más de 2 cafés al día), y en 3 casos había antecedentes de TCE con al menos conmoción cerebral. La edad media en el momento de la entrevista era de 79,4 años (62-92), y presentaban una puntuación media en la escala H&Y de 2,35 (1,5-4). La edad media de inicio de la enfermedad era de 68,2 años (56-82), y el síntoma inicial era el temblor de reposo en 4 de ellos, en 2 un síndrome rígido-acinético (SRA), y en un caso un cuadro mixto. En cuanto a la sintomatología no motora, 3 presentaban estreñimiento, y 4 un cuadro compatible con TCREM.

Realizado el estudio genético de las mutaciones R1441G y G2019S, se hallaron 2 portadores de la mutación R1441G, en 2 individuos con AF de EP, y no se hallaron portadores de la mutación G2019S (tabla 10).

3.1.2. Individuos con parkinsonismo

Al margen de los 7 pacientes con diagnóstico de EP, después de la valoración de los 221 individuos contactados por un neurólogo experto en trastornos del movimiento, 31 individuos presentaban signos aislados de parkinsonismo, que no cumplían los criterios completos de Gelb (Gelb y cols. 1999) para poder ser considerados pacientes con EP. La distribución por sexos era de 15 hombres y 16 mujeres, con una edad media de 75,1 años (66-86). 28 de ellos procedían de la muestra seleccionada, y 3 habían accedido al estudio por el *efecto llamada*. Del total de 31 individuos con estos signos, en 2 de ellos se constató la toma prolongada de

Neurolépticos (Olanzapina y Clebopride) que podría justificar un SRA bilateral, y además había un caso de hipocinesia global en el contexto de una demencia tipo EA en grado moderado-grave.

Excluyendo estos 3 casos con parkinsonismo secundario, los otros 28 casos pertenecían a individuos de procedencia vasca en un 85,7%. Salvo un caso que había tenido su residencia en ambiente urbano, el resto pertenecían a un ambiente rural. En 11 casos existía el antecedente de trabajo en fábrica, y 4 habían desarrollado su trabajo en el campo. De todos ellos, 9 consideraban que podían haber estado en contacto con tóxicos industriales o pesticidas. De los 28 casos, 10 habían consumido tabaco durante al menos 10 años, y 4 se consideraban fumadores pasivos. 9 eran consumidores importantes de café, y en 2 existía el antecedente de TCE. 4 individuos tenían antecedentes familiares de EP en familiares de primer grado. En cuanto al fenotipo clínico, 17 casos presentaban un SRA, 10 casos tenían temblor de reposo, y un individuo presentaba una combinación de ambos. Como sintomatología no motora, 5 presentaban estreñimiento, y 2 un cuadro compatible con TCREM.

En ninguno de estos casos el estudio genético indicó la presencia de portadores para las mutaciones R1441G y G2019S (tabla 10).

En este momento no tenemos constancia de que alguno de estos pacientes haya sido diagnosticado de EP, pero pasados 2 años desde la valoración inicial, esta muestra de individuos va a ser nuevamente evaluada para valorar signos de progresión para el diagnóstico de la enfermedad.

3.1.3. Familiares asintomáticos

Un total de 21 individuos tenían antecedentes familiares de EP. De ellos, 12 eran en primer grado, y 9 eran de segundo grado. 17 procedían del listado aleatorizado, y 4 del llamado *efecto llamada*. El 95,2% eran de procedencia vasca, y el 90% (19/21) procedentes de ambiente rural. La distribución por sexos era de 11 hombres y 10 mujeres, con una edad media de 70,8 años (60-86). En 7 casos existía el antecedente de trabajo en fábrica y 2 habían desarrollado su trabajo en el campo. De todos ellos 7 consideraban que podían haber estado en contacto con tóxicos industriales o pesticidas. 11 eran consumidores importantes de café, y en 3 existía el antecedente de TCE. En cuanto a la sintomatología no motora 5 presentaban estreñimiento, y no se detectó ningún caso con cuadro compatible con TCREM.

Realizado el estudio genético de las mutaciones R1441G y G2019S, se hallaron 2 portadores de la mutación R1441G, en 2 individuos con AF de EP, pertenecientes a familias ya conocidas en nuestro servicio, con varios miembros afectados de EP asociada a esta mutación. No se hallaron portadores de la mutación G2019S (tabla 10).

3.1.4. Individuos “sanos”

Descartados los 7 pacientes con EP, los 31 individuos con parkinsonismo (incluyendo los 3 con parkinsonismo secundario), y los 21 familiares asintomáticos, nos encontramos con 162 individuos denominados “sanos”. La distribución por sexos indicaba un predominio femenino,

con 85 mujeres y 77 hombres, y la edad media era de 73,9 (52-94). El 75 % (130) procedían de la muestra seleccionada, y 32 casos del *efecto llamada*. Eran de origen vasco el 93 % de casos, y habían vivido la mayoría en un ambiente rural (93,8%).

En 85 casos existía el antecedente de trabajo en fábrica, y 11 habían desarrollado su trabajo en el campo. De todos ellos 57 consideraban que podían haber estado en contacto con tóxicos industriales o pesticidas. De los 162 casos, 59 habían consumido tabaco durante al menos 10 años, y 35 se consideraban fumadores pasivos. 87 eran consumidores importantes de café (más de 2 cafés al día), y en 16 existía el antecedente de TCE. Ninguno presentaba signos de parkinsonismo, y en cuanto a la sintomatología no motora 23 presentaban estreñimiento, y en 5 casos se detectó un cuadro compatible con TCREM.

En ninguno de estos casos el estudio genético indicó la presencia de portadores para las mutaciones R1441G y G2019S (tabla 10)

Además de las categorías anteriormente referidas, se han obtenido los siguientes diagnósticos de otras enfermedades neurológicas, distribuidos entre los 221 individuos contactados, sin que existiera un mayor número de diagnósticos entre los que acudieron por el *efecto llamada*, frente a los individuos con los que se consiguió contactar.

- Temblor esencial: 10
- Deterioro Cognitivo: 5
- Ictus: 6
- Cefalea: 3
- Síndrome de piernas inquietas: 1
- Miopatía: 1
- Polineuropatía: 1
- Esclerosis múltiple: 1
- Mielopatía: 2

3.2. Estudio sobre los individuos no contactados

No se pudo contactar con 355 individuos procedentes de la muestra seleccionada, por los motivos antes expuestos, pero si pudimos tener acceso a la información registrada en su historial clínico. La distribución por sexos era de 207 mujeres y 148 hombres, con una edad media de 70,38 años. Se obtuvieron los datos registrados en *Osabide*, donde figuran todos los diagnósticos asignados a cada individuo, y la toma de medicación, donde se pudo extraer referencia a tratamiento antiparkinsoniano, y de fármacos con capacidad de inducir parkinsonismo. Se “cruzarón” los datos de esta muestra no contactada con la base de datos de EP de nuestro Servicio de Neurología, y se tuvo acceso a datos adicionales tanto clínicos como moleculares cuando existían. De esta forma se pudo indicar la condición de paciente con EP, u otro parkinsonismo, o de ser familiar asintomático de otros pacientes con EP.

3.2.1. Pacientes con diagnóstico de EP

Se han detectado 6 casos registrados con diagnóstico de EP. Son todos de procedencia vasca, con predominio masculino (5/1), y con edad media de 79,1 años (76-86). Uno de ellos asociaba el diagnóstico de deterioro cognitivo. 3 de los 6 casos estaban también registrados en la base de datos de nuestra unidad, y se les había realizado estudio genético de las mutaciones R1441G y G2019S, en años previos, detectándose un caso portador de la mutación R1441G.

3.2.2. Pacientes con otros posibles parkinsonismos

En este listado aleatorizado, no figuraba ningún caso con diagnóstico de otros tipos de parkinsonismo.

3.2.3. Familiares asintomáticos

Se ha tenido constancia de 4 individuos con antecedentes familiares en primer grado de pacientes con EP asociada a la mutación R1441G (2 varones y 2 mujeres), y 2 ya habían fallecido. En 2 de estos 4 familiares se había realizado previamente el estudio de estas mutaciones, resultando ser portador uno de ellos para la mutación R1441G, también presente en otros miembros de la familia. Este individuo falleció a la edad de 91 años, sin que haya quedado registrado diagnóstico de EP, ni hay constancia de toma de medicación antiparkinsoniana a lo largo de su vida.

3.2.4. Individuos considerados “sanos”

Al margen de los 6 casos con diagnóstico de EP, y los 4 individuos detectados como familiares de pacientes con EP, el registro detectaba los siguientes diagnósticos sobre enfermedades neurológicas.

- Temblor esencial: 1
- Deterioro cognitivo: 30
 - Ictus: 19
 - Esclerosis múltiple: 1
 - Epilepsia: 2
- Mielopatía: 1
- Meningioma: 1
- Adenoma de hipófisis: 1

3.3. Resultados globales sobre el total de la muestra

3.3.1. Pacientes con diagnóstico de EP

Se detectaron 13 casos de individuos con EP (7 de la muestra contactada y 6 en el resto), que suponen el 2,2% del total de la muestra. 12 de ellos era de procedencia vasca. La

TABLA 11

Características de los pacientes con diagnóstico de EP, y de los que se ha detectado parkinsonismo, en el total de la muestra.

	EP N: 13	Parkinsonismo N: 28
Edad media	79,2 (62-92)	75,1 (66-86)
Sexos • Hombre/mujer	9/4	15/13
Procedencia vasca	92,3%	85,7%
Edad inicio*	69,5 (56-82)	–
Síntoma inicio*		
• Tremórico	7	10
• Rígido-acinético	2	17
• Mixto	1	1
Antecedentes familiares*	5/10 (50%)	4/28 (14,2%)
Mutación R1441G*	3/10	0
Mutación G2019S*	0	0

* Datos sobre 10 individuos

distribución por sexos indicaba un claro predominio de varones (9/4), y la edad media era de 79,2 (62-92).

Además de los 7 pacientes contactados, se han podido estudiar los datos tanto clínicos como moleculares de otros 3 pacientes que habían sido valorados previamente por Neurólogos del Servicio de Neurología del Hospital Donostia. Los otros 3 figuran en el registro informático con este diagnóstico, se encuentran bajo tratamiento antiparkinsoniano, y están en seguimiento por Neurólogos del Hospital de referencia en su comarca (Hospital de Zumarraga). Ninguno de ellos tenía estudio genético de las mutaciones R1441G y G2019S.

Sobre la información registrada de los 10 pacientes con los que se ha conseguido contactar (en el presente estudio, y en valoraciones previas), la edad media de inició fue de 69,5 años (56-82), con predominio del fenotipo tremórico (7 casos frente a 2 rígido-acinético, y 1 mixto). El 50% referían antecedentes familiares de EP, y el estudio genético detectó la mutación R1441G en 3 de los 10 pacientes, todos ellos pertenecientes a formas familiares, lo que supone el 30% de estos casos detectados con EP. No apareció ningún paciente portador de la mutación G2019S, al igual que en el resto de la muestra (tabla 11).

3.3.2. Total de portadores

Se han detectado 6 casos de portadores de la mutación R1441G, y ninguno de la G2019S. 4 procedían de la muestra contactada, y otros 2 habían sido valorados y estudiados previamente por

neurólogos del servicio. Los 6 individuos pertenecían a familias con EP asociada a esta mutación. 3 eran pacientes (2 de la muestra contactada, y 1 de la muestra no contactada), y 3 individuos asintomáticos (2 de la muestra contactada, y 1 de la muestra no contactada). Uno de los portadores asintomáticos tenía 81 años, y el otro es el individuo referido que falleció a los 91 años sin signos de parkinsonismo.

Los 6 portadores tanto pacientes como familiares asintomáticos suponen el 1% del total de la muestra, el 30% de los casos de EP (3 de los 10 pacientes con EP con estudio genético), el 60% de las formas familiares de EP (los 3 pacientes pertenecían a formas familiares de EP de las 5 detectadas), y los 3 portadores asintomáticos de los 25 familiares asintomáticos detectados (los 21 contactados y los 4 de la muestra no contactada) suponen el 12%.

3.3.3. Otros diagnósticos

Además de los 13 individuos con EP. Se han detectado otros 3 parkinsonismos. 2 de ellos asociado al consumo de fármacos (Olanzapina y Clebopride), y otro en el contexto de encefalopatía vascular.

Un total de 11 individuos presentaban TE, destacando que sólo en 1 de ellos estaba registrado previamente, y que en ninguno de ellos se han detectado estas mutaciones en *LRRK2*.

El diagnóstico más habitual fue deterioro cognitivo, sin poder especificarse en la mayoría de los casos el tipo. La mayoría de ellos (30 de 35) procedían del listado de individuos que no accedieron a la visita, siendo uno de los posibles motivos para no acceder al estudio, por su pérdida de autonomía. El segundo diagnóstico más frecuente fue el de ictus en 25 casos (4,23%).

Otros diagnósticos fueron:

- Síndrome de piernas inquietas: 1 (0,16%)
- Cefalea: 3 (0,5%)
- Mielopatía: 3 (0,5%)
- Esclerosis Múltiple: 2 (0,33%)
- Epilepsia: 2 (0,5%)
- Miopatía: 1 (0,16%)
- Poli neuropatía: 1 (0,16%)
- Meningioma 1 (0,16%)
- Adenoma de hipófisis 1 (0,16%)

4. Fenotipo clínico y curso evolutivo de las mutaciones R1441G y G2019S

Se ha establecido el fenotipo clínico de la EP asociada a la mutación R1441G en base a los datos obtenidos de 68 pacientes portadores de esta mutación, y de 28 pacientes con EP asociada a la mutación G2019S.

La tabla 12 muestra de forma descriptiva las características de cada grupo de pacientes, y la comparación entre ambos.

En la tabla 13 se describe el curso evolutivo en función de los parámetros descritos, y el estudio comparativo entre pacientes con ambas mutaciones.

4.1. Características clínicas de los pacientes con EP asociada a la mutación R1441G

4.1.1. Procedencia y edad

Los pacientes con EP asociada a la mutación R1441G son en un 94 % de procedencia vasca. Tienen AF de EP en el 91 % de casos. La distribución por sexos indica un 48,5 % de varones. La edad media actual de la muestra es de 74,6 años, con una edad media de inicio de la enfermedad de 61,8 años, y 12,7 años de tiempo de evolución.

4.1.2. Síntomas motores, escalas, medicación, y complicaciones

El fenotipo clínico es asimétrico en su inicio en el 89 % de los casos. El temblor de reposo unilateral es el síntoma de inicio en el 60 % de pacientes, mientras que el 27,7 % debuta con un síndrome rígido-acinético (SRA). En un 7,7 % el debut es con un cuadro mixto (temblor y SRA), y el síntoma inicial era el trastorno de la marcha en 4,6 % de los pacientes. La dosis media de L-dopa que había empleado a lo largo de su evolución cada paciente es de 875 mg/día, con buena respuesta clínica en todos los casos. Los pacientes tenían reflejada en el momento del estudio una puntuación media de 2,91 en la escala H&Y, y de 23,9 en la parte motora de la escala UPDRS (III).

Las complicaciones motoras se presentan con los siguientes porcentajes:

- Las fluctuaciones motoras están presentes en el 63,5 % de los pacientes, y se inician a una media de 7,8 años desde el comienzo de los síntomas.
- Las discinesias se presentan en el 56,5 % de pacientes, y se inician a una media de 8,3 años desde el comienzo de los síntomas.
- Los signos distónicos están presentes en el 22,6 % de casos, y se inician a una media de 6 años desde el comienzo de los síntomas.

4.1.3. Síntomas no motores

En el momento de la exploración presentan signos de deterioro cognitivo en diferente grado el 35,9 % de pacientes, alucinaciones el 4,8 %, y depresión el 31,3 %. Otros síntomas no motores aparecen con las siguientes cifras de prevalencia: Hipotensión ortostática 11,3 %, estreñimiento 30,6 %, síntomas de disfunción genitourinaria 19,4 %, insomnio 16,1 %, TCREM 11,5 %, hipersomnia 4,8 %, hiposmia 36 % (sobre 44 estudiados), y ningún caso con SPI.

4.1.4. Análisis comparativo con la mutación G2019S

En las tablas 12, 13 y 14 se muestran las características demográficas y clínicas de los pacientes con EP asociada a ambas mutaciones.

Son estadísticamente significativas ($p < 0,005$) las diferencias observadas entre ambos grupos en los siguientes apartados:

- Procedencia vasca 94 % de casos en la mutación R1441G, frente al 28,6 % en la mutación G2019S
- Presencia de alucinaciones: 4,8 % en la mutación R1441G, frente al 29,2 % en la mutación G2019S.
- Trastornos genitourinarios: 10,4 % de las pacientes con la mutación R1441G frente al 43,5 % en los portadores de la G2019S.

TABLA 12

Cuadro comparativo de los pacientes portadores de las mutaciones R1441G y G2019S

	Mutación R1441G N:68	Mutación G2019S N: 28	P
Procedencia vasca	94 %	28,6%	0,000
Antecedentes familiares	91 %	76 %	0,061
Sexo (H/M)	48,5%	46,4%	1,000
Edad	74,6	71,3	0,30
Edad inicio	61,8	58,1	1,04
Tiempo evolución	12,7	12,8	4,6
Respuesta levodopa	100%	95,7%	0,271
Dosis levodopa	875 mg/d	978 mg/d	0,84
H&Y	2,91	2,95	0,326
UPDRS (III)	23,9	28,2	0,076

TABLA 13

Características de los síntomas motores en pacientes portadores de mutaciones R1441G y G20119S

	Mutación R1441G N:68	Mutación G2019S N: 28	P
Síntoma inicio			
• Temblor	60 %	73,9%	0,509
• SRA	27,7%	17,4%	
• Mixto	7,7%	8,7 %	
• T. Marcha	4,6%	0%	
Asimetría (si/no)	89%	100%	0,182
Fluctuaciones	63,5%	69,6%	0,799
Discinesias	56,5%	56,5%	1.00
Distonía	22,6%	26,1%	0,777

TABLA 14

Características de los síntomas no motores en pacientes portadores de mutaciones R1441G y G2019S

	Mutación R1441G N:68	Mutación G2019S N: 28	P
Deterioro cognitivo	35,9%	38,5%	0,814
Alucinaciones	4,8%	29,2%	0,004
Depresión	31,3%	21,7%	0,435
Hipotensión	11,3%	26,1%	0,104
Estreñimiento	30,6%	43,5%	0,308
Genito-urinario	19,4%	43,5%	0,048
Insomnio	16,1%	26,1%	0,353
TCREM	11,5%	30,4%	0,051
Hipersomnia	4,8%	12,5%	0,342
SPI	0%	4,3%	0,271
Cáncer	14,5%	17,4%	0,742
Otros fenotipos	Trastorno marcha 3	PSP 1	

4.2. Curso evolutivo en pacientes portadores de R1441G y G2019S

4.2.1. Tiempo en aparición de complicaciones motoras

El 63,5% de los pacientes portadores de la mutación R1441G presentan fluctuaciones a lo largo de su enfermedad, que se inician a una media de 7,2 años desde el comienzo de la misma. El 56,5% tienen discinesias de aparición a los 8,33 años desde el inicio, y en el 22,6% se registraron signos distónicos en OFF, de aparición a los 6 años. Con respecto a la mutación G2019S, presentan fluctuaciones el 69,6% de las pacientes a los 7,0 años del inicio de la enfermedad, discinesias el 56,5% a los 8,31 años, y signos de distonía el 26,1% a los 8,4 años.

4.2.2. Tiempo en modificar la puntuación en la escala H&Y

En la mutación R1441G el estadio II en esta escala se alcanza a los 4,8 años desde el inicio de la enfermedad (cuya media en los portadores de esta mutación es 61,8 años), y el estadio IV a los 12,9 años. En la mutación G2019S el estadio II se alcanza a los 5,4 años del inicio de los síntomas (edad media de inicio 58,1 años), y el estadio IV a los 14,7 años.

4.2.3. Tiempo en adquirir otras complicaciones

En la mutación R1441G la presencia de caídas se inicia a los 11,6 años, el paciente deja de salir solo a la calle a los 13 años, inicia deterioro cognitivo a los 13,6 años, y en los casos fallecidos el *exitus* acontece a los 13,9 años. Con la mutación G2019S las caídas se inician a los 15,1 años,

TABLA 15

Curso evolutivo de los pacientes con EP asociada a las mutación R1441G y a la mutación G2019S. Tiempo en años para alcanzar las diferentes situaciones desde el inicio clínico.

Tiempo para alcanzar (años)	Mutación R1441G N:68	Mutación G2019S N: 28	P
Fluctuaciones	7,2	7,0	0,822
Discinesias	8,33	8,31	0,984
Distonía	6,0	8,4	0,424
Estadio II H&Y	4,8	5,4	0,416
Estadio IV H&Y	12,9	14,7	0,477
Caídas	11,6	15,1	0,211
Dejar salir	13,0	15,2	0,372
Deterioro cognitivo	13,6	11,5	0,534
Fallecimiento	13,9	17,6	0,287

el paciente deja de salir solo a la calle a los 15,2 años, inicia deterioro cognitivo a los 11,5 años, y en los casos fallecidos el *exitus* se registra a los 17,6 años.

4.2.4. Estudio comparativo con la mutación G2019S

En ninguna de las variables previas se encuentran diferencias significativas entre pacientes portadores de una u otra mutación.

5. Estudio neuropatológico

5.1. Caso Clínico

El caso descrito a nivel neuropatológico pertenece a un hombre que a los 69 años comienza con temblor de reposo en su mano derecha. Aunque no presentaba antecedentes claros de EP en la familia, su madre, de origen vasco (Durango-Vizcaya), había sufrido temblor de las extremidades superiores, y torpeza en la marcha, de inicio en edad avanzada.

La exploración neurológica mostraba temblor de reposo, bradicinesia y rigidez en el miembro superior derecho. Su lenguaje, la facies, la motilidad ocular, la marcha y la estabilidad postural eran normales. Fue diagnosticado de EP de predominio tremórico en un estadio I de H&Y, y se inició tratamiento con L-dopa, 300 mg al día, y trihexifenidilo 4 mg al día, con buena respuesta. El tratamiento anticolinérgico fue retirado a los 5 años por presencia de estreñimiento y retención urinaria.

Durante los siguientes 10 años, la enfermedad progresó lentamente, con leve alteración del lenguaje, y presencia de hipomimia. El temblor de reposo, la bradicinesia y la rigidez en las extremidades derechas empeoró, y aparecieron signos de afectación también en hemicuerpo izquierdo. Se asoció entonces tratamiento con cabergolina 3 mg al día. A los 12 años del inicio de la enfermedad, presentaba importante alteración de la marcha con inestabilidad postural (H&Y en estadio III). Se aumentó la dosis de L-dopa a 600 mg, y aparecieron fluctuaciones motoras, y discinesias diarias de predominio en pie izquierdo, así como una anomalía postural en tronco con clara anteflexión. A los 15 años del inicio de la enfermedad, el paciente necesitaba ayuda para caminar (H&Y en estadio IV). El estudio molecular reveló la presencia de la mutación R1441G en el gen *LRKK2*.

A los 18 años de la enfermedad, cuando el paciente tenía 86 años, mostraba signos de deterioro cognitivo leve, con una puntuación en *minimal scale* (MMS) de 27/30. Afectado de una infección respiratoria, e insuficiencia cardíaca, requirió ingreso hospitalario, mostrando un cuadro delirante, y murió en diciembre de 2006.

5.2. Hallazgos neuropatológicos

Los cambios patológicos observados en el paciente estudiado, portador de la mutación R1441G se limitaban a la SN. La pérdida de neuronas fue moderada, y acompañada por depósitos de neuromelanina libres en el neuropilo, junto con leve astrogliosis y microgliosis, como se revela con H&E y Klüver Barrera, GFAP e inmunohistoquímica CD68. No se detectó depósito de tau con 3 repeticiones (3R), tau 4R y fosfo-tau (AT8 anticuerpo). No se encontraron CL ni NL. La Inmunohistoquímica de α -sinucleína, α -sinucleína fosforilada, y α -sinucleína nitrada fue negativa. Los únicos depósitos anormales reseñables, fueron procesos de inflamación neuronal α B-inmunorreactivas, con contenido granular fino compacto, e inclusiones α B cristalina positivos (figura 17).



FIGURA 16
Despigmentación de sustancia negra

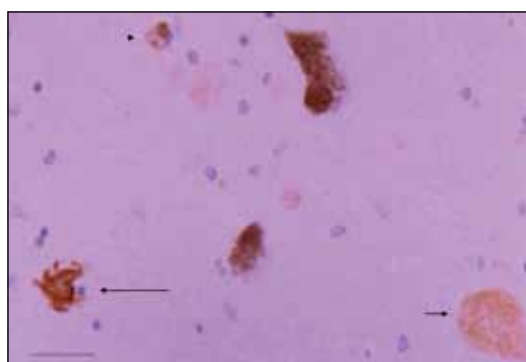
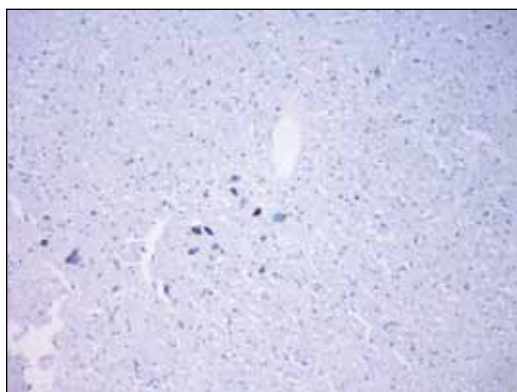
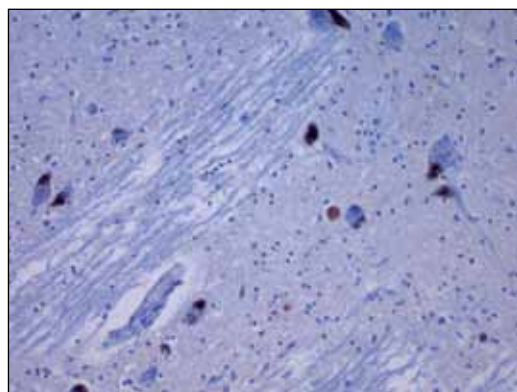


FIGURA 17
Procesos de inflamación neuronal alfabcrystalina (flecha), con contenido granular fino, e inclusiones positivas para alfaBcrystalina (flecha larga), junto con pérdida moderada de neuronas pigmentadas, y gránulos libres de neuromelanina (punta de flecha) en el neuropilo. Sección de parafina, inmunohistoquímica α B-crystalina con hematoxilina. Bar = 25 micras



a

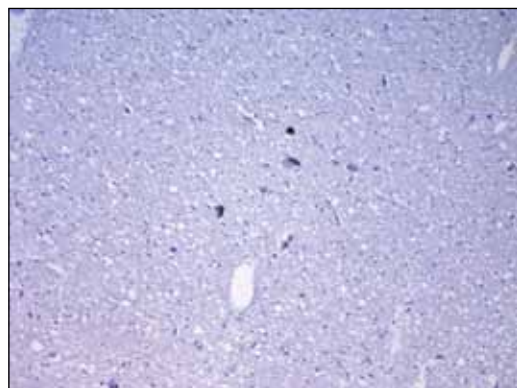


b

a) **FIGURA 18**
Inmunocitoquímica. Alfasinucleína (-)

b) **FIGURA 19**
Inmunocitoquímica. Ubiquitina (-)

c) **FIGURA 20**
Inmunocitoquímica. Tau (-)



c

6. Estudio de marcadores clínicos en portadores de la mutación R1441G

6.1. Estudio de disfunción olfatoria

Este estudio se realizó sobre 190 pacientes con EP, empleando la versión abreviada (B-SIT) del test de identificación olfatoria diseñado por la Universidad de Pensilvania (UPSIT). De ellos, 104 eran varones, y 86 mujeres, con una edad media de $70,0 \pm 9,7$ años. Con respecto a la condición genética, 146 no eran portadores de mutaciones en *LRRK2*, y 44 si presentaban mutaciones en este gen. 39 de ellos eran portadores de la mutación R1441G, y 5 de la mutación G2019S (tabla 16). Se evaluaron las principales variables clínicas según la condición de portador o no de mutaciones en *LRRK2*.

Se observó un inicio de la enfermedad más temprano en portadores de las mutaciones R1441G o G2019S (59,4 años en portadores, frente a 62, 8 en no portadores), y una mayor duración de la enfermedad (7,4 años frente a 9,2 años en no portadores). La prevalencia de los

TABLA 16

Características clínicas en pacientes con EP dependiendo de su carga genética, evaluado a través del test de identificación olfatoria B-SIT (n=190), y de la gammagrafía cardiaca con MIBG (I123-metaiodobencilguanidina) [n=90]

	No portadores en <i>LRRK2</i> (n=146)	Portadores en <i>LRRK2</i> (n=44)	Valor de p ^a
Sexo (Hombre/mujer)	81 / 65	23 / 21	0.732 ^b
Edad media (años)	70.3 ± 9.8	70.0 ± 9.6	0.700
Edad inicio EP (años)	62.8 ± 11.0	59.4 ± 8.5	0.036
Duración de la EP (años)	7.4 ± 5.6	9.2 ± 6.2	0.003
Escala Hoehn and Yahr (H&Y)	2.1 ± 0.8	2.0 ± 0.7	0.372
UPDRS (III)	13.4 ± 7.5	13.3 ± 5.8	0.629
Temblo al inicio (si / %)	110 (75.3%)	34 (77.3%)	0.844 ^b
Síntomas no motores (si / %)			
Estreñimiento	75 (51.4%)	15 (34.1%)	0.106 ^b
TCREM	62 (42.5%)	5 (11.4%)	<0.001 ^b
Disfunción olfatoria			
Normal	37 (25.3%)	28 (63.6%)	<0.001 ^b
Deficit	56 (38.4%)	9 (20.5%)	
Relativamente anormal	18 (12.3%)	4 (9.1%)	
Anormal	35 (24.0%)	3 (6.8%)	
MIBG H/M ratio	n=63	N=27	
Imagen precoz	1.49 ± 0.28	1.75 ± 0.38	0.004
Imagen diferida	1.32 ± 0.27	1.57 ± 0.38	<0.001

Abreviaturas: H/M ratio, corazón/mediastino ratio; UPDRS (III) Unified Parkinson Disease Rating Scale, parte motora; TCREM trastorno de conducta del sueño REM.

Los datos se muestran como media ± desviación estándar (DE).

^a p valor para la comparación de grupos usando el test no paramétrico U-Mann Whitney

^b p valor es obtenido a través del test chi cuadrado

síntomas no motores, como el estreñimiento, y el TCREM, fue más alta en el grupo de no portadores (75 y 62 % respectivamente, frente a 15 y 5 % en portadores). No se observaron diferencias en la discapacidad entre ambos grupos en función de la escala H&Y, y las puntuaciones en la escala UPDRS (III), ni en la presencia de temblor de reposo como síntoma de inicio (tabla 16).

Los pacientes con déficit olfatorio (n = 125) tenían una edad de inicio de la enfermedad más tardío (72,3 ± 8,2 años), frente a los pacientes con función olfatoria normal (n = 65, 65,7 ± 11,0 años), p = 0,004. La disfunción olfatoria también fue distribuida de manera diferente entre ambos sexos (p = 0,009). Un total de 77 varones (74 %) tenían alteraciones en el olfato, mientras que 48 mujeres (56 %) presentaban esta alteración.

De los 44 portadores de las mutaciones en *LRRK2* (36 %), 16 presentaron hiposmia, mientras que 110 de los 146 (75 %) de los no portadores tenían déficit del olfato (tabla 17).

TABLA 17

Distribución de la frecuencia de disfunción olfatoria en función de la carga genética en pacientes con EP (n=190)

	Distribución de frecuencias		P valor ^a	Modelo logístico		
	No portadores en <i>LRRK2</i>	Portadores en <i>LRRK2</i>		OR	95 % IC	P valor
Disfunción olfatoria	110 (75 %)	16 (36 %)	<0.001			
No disfunción	36 (25 %)	28 (64 %)		8.3	3.5 – 19.4	<0.001

Abreviaturas: IC intervalo de confianza; OR, odds ratio. El valor de ^ap se obtuvo por medio del test exacto de Fisher.

Las variables del modelo logístico fueron codificadas como 0: Disfunción olfatoria y 1: no alteración olfatoria, y 0: *LRRK2* no portadores, y 1: *LRRK2* portadores. El modelo logístico fue ajustado por duración de enfermedad y sexo.

Así, la presencia de la función olfatoria normal aumentaba (OR: 8,3; IC95 %: 3,5 a 18,40, $p < 0,001$) la posibilidad de presentar estas mutaciones en *LRRK2* ajustados los datos por la duración de la enfermedad y el sexo (tabla 17).

6.2. Estudio de función simpática mediante escintigrafía cardíaca con MIBG

Excluidos los pacientes con criterios de exclusión (descritos en material y métodos), el estudio se realizó en 90 pacientes (46 hombres y 44 mujeres; edad media: 71,3 ± 8,1 años). Esta muestra incluyó 27 portadores de mutaciones en *LRRK2* (23 R1441G, y 4 G2019S), y 63 no portadores (tabla 16). El análisis estadístico se realizó en los 84 casos en los cuales se habían completado todas las variables.

Los portadores de mutaciones en *LRRK2* presentaron una captación de MIBG tanto precoz como tardía mayor, en comparación con el grupo de no portadores (tabla 16). Doce de los 25 (48 %) portadores presentaron una baja captación cardíaca en el estudio precoz. En el grupo de los pacientes no portadores, 47 de 59 (80 %) presentan esta captación baja (tabla 18). Se obtuvieron resultados similares en la captación tardía, pero no alcanzó significación estadística (tabla 18). La presencia de una captación normal de MIBG, tanto precoz como tardía, aumenta en 7,2 (95 % CI: 2.2-23.3) y 4.2 (95 % CI: 0,9 a 18.7) respectivamente, la posibilidad de presentar estas mutaciones en *LRRK2*, ajustados los datos por duración de la enfermedad y género (tabla 18).

TABLA 18

Diferencias en la distribución de la captación cardíaca de MIBG (¹²³I-metaiodobenzilguanidine) en función de la carga genética (n=90).

		Distribución de frecuencias		Valor de p ^a	Modelo logístico		
		<i>LRRK2</i> no portador	<i>LRRK2</i> portador		OR	95 % IC	P valor
Precoz H/M ratio	Baja	47 (80 %)	12 (20 %)	0.008			
	Normal	12 (48 %)	13 (52 %)		7.2	2.2 – 23.3	0.001
Tardío H/M ratio	Baja	55 (73 %)	20 (27 %)	0.118			
	Normal	4 (44 %)	9 (56 %)		4.2	0.9 – 18.7	0.057

Abreviaturas: IC, intervalo de confianza; H/M ratio, corazón/mediastino ratio; OR, odds ratio.

Valor de ^ap obtenido mediante el test exacto Fisher.

Las variables del modelo logístico fueron codificadas como 0: valores bajos de captación, y 1: captación normal. 0: *LRRK2* no portadores, y 1: *LRRK2* portadores. El modelo logístico fue ajustado por duración de enfermedad y género.

Teniendo en cuenta el total de la muestra, el 71% (n = 61) y el 90% (n = 77) de los pacientes respectivamente, presentaron valores bajos de captación tanto precoz como tardía. Los pacientes con valores bajos de captación de MIBG precoz, presentaban una mayor puntuación en las escala H&Y, y UPDRS (III), y un mayor tiempo de evolución de la enfermedad ($p < 0,05$). No se observaron diferencias para las principales variables clínicas entre los grupos de captación baja y normal, en la fase tardía ($p > 0,05$).

Se analizó la relación entre el deterioro olfatorio y la captación de MIBG mediante el análisis de la distribución de frecuencias de estas alteraciones (tabla 19), mostrando que el 82% (n=49) de los pacientes con disfunción olfatoria también tenían reducida la captación precoz de MIBG ($p=0,001$). Esta prevalencia fue del 92% (n = 55) analizando la captación tardía y el deterioro olfatorio, también con significación estadística ($p = 0,001$).

Se obtuvieron resultados similares en el análisis del deterioro olfatorio y la captación de MIBG, en función del tipo de mutación en *LRK2*. La muestra de portadores de la mutación G2019S es reducida, pero en ella 2 de los 5 pacientes estudiados (40%) presentaron hiposmia, y 2 de los 4 pacientes (50%) presentaron captación reducida de MIBG en fase precoz.

TABLA 19

Relación entre deficit olfatorio y captación cardiaca de MIBG, mediante el análisis de la distribución de frecuencias (n=90)

	Precoz H/M ratio		Valor p^a	Tardío H/M ratio		Valor p^a
	Bajo	Alto		Bajo	Alto	
Disfunción olfatoria	49 (82%)	10 (18%)	0.001	55 (92%)	8 (8%)	0.001
No disfunción	14 (46%)	17 (54%)		13 (48%)	14 (52%)	

Abreviaturas: MIBG, 123 I-metaiodobenzylguanidine; H/M ratio, corazón mediastino ratio.

Valor de p obtenido mediante el test exacto Fisher.

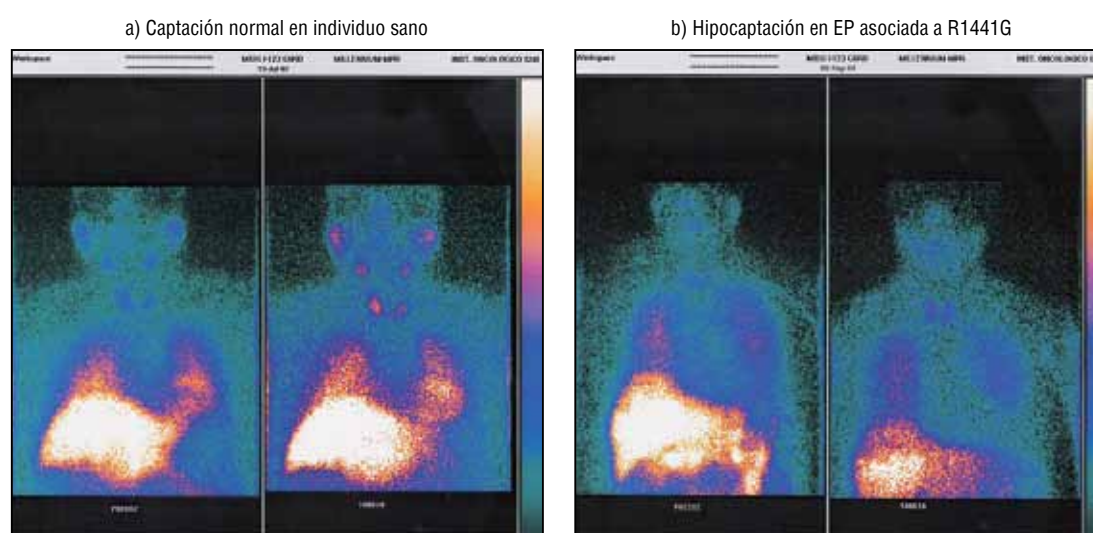


FIGURA 21

Imágenes de gammagrafía cardiaca con MIBG, en fase precoz y tardía, en un individuo sano (a), y en paciente con EP asociada a mutación R1441G (b)

7. Estudio de marcadores de imagen en portadores de la mutación R1441G

7.1. Estudio de vía nigroestriada mediante ultrasonografía transcraneal

El estudio mediante UTC se realizó en un total de 173 pacientes con EP. 150 pacientes tenían una ventana acústica adecuada en al menos un lado (hombres: 93 mujeres: 57; edad media: 67,0 ± 9,7 años). En este grupo de pacientes 118 no eran portadores de mutaciones en *LRRK2*, y 32 eran portadores, 24 de ellos con la mutación R1441G, y 8 con la G2019S (tabla 20). También se estudiaron 33 familiares asintomáticos (18 portadores de mutaciones en *LRRK2*, y 15 no portadores), y 37 individuos pertenecientes al grupo control.

En los pacientes con EP no se observaron diferencias entre sexo y edad con respecto al grupo control, ni en estas variables junto con el inicio de la enfermedad, duración de la enfermedad, discapacidad expresada por las escalas H&Y, y la puntuación en la escala motora UPDRS (III) entre portadores y no portadores de mutaciones en *LRRK2*. Tampoco existían diferencias en las variables demográficas, en familiares asintomáticos en función de la carga genética. Los valores de UTC fueron similares, entre portadores y no portadores de mutaciones en *LRRK2*, tanto en pacientes como familiares asintomáticos (tabla 20), y siempre por encima de los valores observados en el grupo control. Para la comparación entre grupos se empleó la T de Student con los siguientes resultados (figura 22):

TABLA 20

Características clínicas dependiendo de la carga genética en pacientes con EP y en familiares asintomáticos a los que se realiza ultrasonografía transcraneal (UTC)

	Controles (n=37)	Pacientes con EP (n=150)		Familiares asintomáticos (n=33)		Valor de p ^a	Valor de p ^b
		<i>LRRK2</i> no portadores (n=118)	<i>LRRK2</i> portadores (n=32)	<i>LRRK2</i> no portadores (n=15)	<i>LRRK2</i> portadores (n=18)		
Sexo (hombre/mujer)	25/12	73 / 45	20 / 12	11 / 4	12 / 6	0.706	0.878
Edad media (años)	67,2 (40-89)	68.5 ± 10.0	66.6 ± 9.3	49.6 ± 12.7	48.5 ± 9.1	0.351 ^c	0.771 ^c
Edad inicio (años)	--	61.8 ± 10.7	58.3 ± 9.3	-	-	0.101	-
Duración de la enfermedad (años)	--	6.7 ± 5.1	8.3 ± 6.1	-	-	0.129	-
H&Y	--	2.04 ± 0.80	2.02 ± 0.70	-	-	0.887	-
UPDRS (III)	--	12.5 ± 7.3	12.7 ± 8.0	-	-	0.889	-
UTC Derecho	0,14	0,17 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,14. ± 0,04	0,15. ± 0,04	0.195	0.599
UTC Izquierdo	0,13	0,17 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,14. ± 0,03	0,14 ± 0,04	0.925	0.863
	2/37 (5,4%)						

Abreviaturas: UTC, Ultrasonografía transcraneal.

Datos mostrados como media ± desviación estándar (SD).

^a p valor para comparación entre no portadores y portadores en pacientes con enfermedad de Parkinson mediante test Student t.

^b p valor para comparación entre no portadores y portadores en familiares asintomáticos mediante test Student t.

^c p valor obtenido mediante test chi cuadrado.

a) UTC en Paciente con EP idiopática.



b) UTC en familiar asintomático portador de mutación R1441G



FIGURA 22
Imágenes de Ultrasonografía tras craneal (UTC) en paciente con EP sin mutación (a), y en un familiar asintomático portador de la mutación R1441G (b).

- UTC Derecho:
 - Control frente a familiares asintomáticos, $p=0.223$
 - Control frente a pacientes con EP, $p<0.001$
 - Familiares asintomáticos frente a pacientes con EP, $p=0.006$
- UTC Izquierdo:
 - Control frente a familiares asintomáticos, $p=0.248$
 - Control frente a pacientes con EP, $p<0.001$
 - Familiares asintomáticos frente a pacientes con EP, $p=0.001$.

Se observó un mayor número de casos con hiperecogenicidad en pacientes con EP en la UTC derecha ($n=76$, 50% vs $n=9$, el 27%; $p=0,021$), UTC izquierda ($n=74$, 49% vs $n=7$, el 22%, $p=0,006$), y en ambos lados ($n=101$, 66% vs $n=11$, el 34%, $p=0,001$) en comparación con los familiares asintomáticos, y el grupo control.

En los pacientes con EP, los valores del UTC derecho ($r=0,21$, $p=0,012$) e izquierdo ($r=0,19$, $p=0,020$) se correlacionaron de forma positiva con la escala H&Y, de forma que los valores más altos se detectaron en pacientes con puntuaciones más altas. No se observó esta correlación con las puntuaciones de la escala UPDRS (III).

En el grupo de pacientes portadores de mutaciones en *LRRK2*, 23 de los 32 (72%) presentaron valores altos en la UTC, mientras que el 75 de 117 (64%) de los no portadores presentaban esta hiperecogenicidad (tabla 21).

TABLA 21

Diferencias en la distribución de frecuencias en los valores de la UTC en función de la carga genética en pacientes con EP, y en familiares asintomáticos

		Pacientes EP		p^a	Familiares asintomáticos		p^b
		<i>LRRK2</i> no portadores	<i>LRRK2</i> portadores		<i>LRRK2</i> no portadores	<i>LRRK2</i> portadores	
UTC Dcho	Baja	60 (52%)	14 (45%)	0.516	11 (73%)	13 (72%)	0.943
	Alta	56 (48%)	17 (55%)		4 (27%)	5 (28%)	
UTC Izdo	Baja	59 (51%)	15 (50%)	0.933	11 (73%)	14 (82%)	0.538
	Alta	57 (49%)	15 (50%)		4 (27%)	3 (18%)	
UTC Ambas	Baja	42 (36%)	9 (28%)	0.916	10 (67%)	11 (65%)	0.538
	Alta	75 (64%)	23 (72%)		5 (33%)	6 (35%)	

Abreviaturas: UTC, Ultrasonografía transcraneal.

p^a y p^b valores obtenidos mediante test exacto de Fisher para pacientes con EP y familiares asintomáticos respectivamente

En los familiares asintomáticos portadores de mutaciones en *LRRK2*, 6 de 17 (35%), presentaban valores aumentados en la UTC. En el grupo de familiares asintomáticos no portadores, 5 de los 15 (33%) presentan estos hallazgos, y en el grupo control 2 de 37 (5,4%). En el grupo de familiares asintomáticos la UTC, no mostró diferencias entre los portadores de mutaciones en *LRRK2*, y el grupo de no portadores en (tabla 21), tanto en el lado derecho como en el izquierdo.

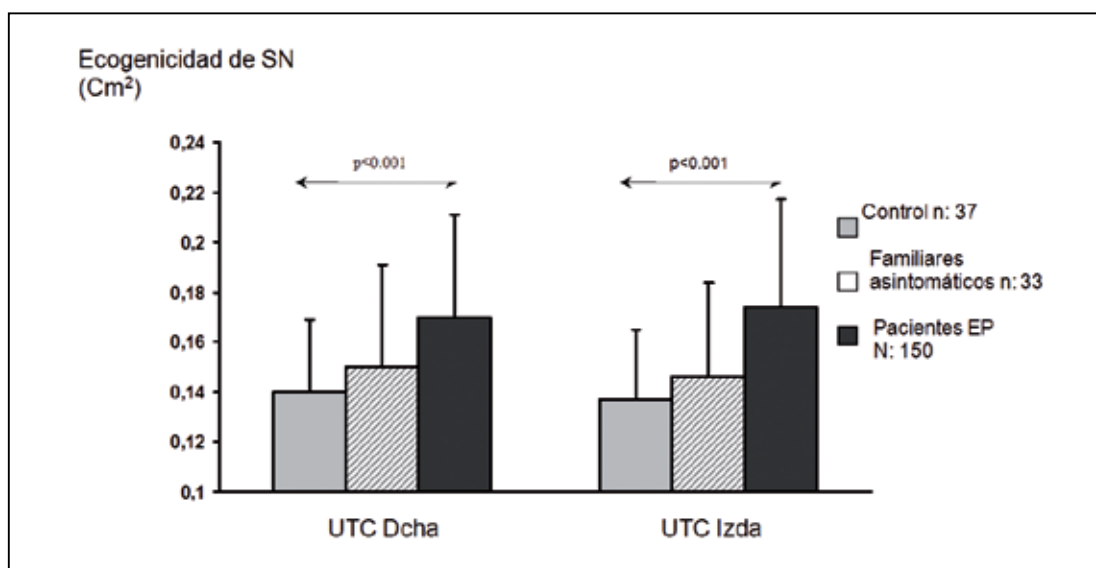


FIGURA 23

Área de ecogenicidad de SN en función de los grupos (controles, familiares asintomáticos, y pacientes con EP). La comparación entre grupos ha sido realizada mediante ANOVA

Discusión

A pesar de que la etiopatogenia de la EP no es completamente conocida, existe un claro consenso en considerar el componente genético como una parte importante, a veces como causa única y en otras ocasiones interactuando con un componente ambiental en gran parte desconocido. El descubrimiento de la EP asociada a mutaciones en *LRRK2* ha contribuido a plantear nuevos conceptos en esta enfermedad. En la población vasca se identificó una mutación, la R1441G (Paisán-Ruiz y cols. 2004) que si bien se ha descrito de forma puntual también en otras áreas de la península ibérica, tiene su principal núcleo en la provincia de Gipuzkoa.

En este trabajo de tesis doctoral discutimos los resultados de varios estudios que intentan resolver cuestiones relacionadas con la mutación R1441G, incluyendo datos relacionados con la mutación G2019S también presente en nuestra serie.

- Analizamos la prevalencia de la mutación R1441G en nuestro entorno, y el peso de la EP asociada a mutaciones en *LRRK2* en la EP en general.
- Mostramos el significado del estatus de portador de la mutación R1441G en individuos asintomáticos, desde el punto de vista de su penetrancia para ayudar en un consejo genético más certero.
- Definimos el fenotipo clínico de la EP asociada a mutaciones en *LRRK2*, y en especial de la mutación R1441G.
- Aportamos el primer estudio neuropatológico de un paciente con EP portador de la mutación R1441G.
- Analizamos posibles marcadores precoces de la enfermedad, tanto a nivel clínico como de neuroimagen, sobre el modelo de pacientes portadores de la mutación R1441G.
- Describimos líneas futuras en el estudio de la EP basándonos en nuestra muestra de pacientes y familiares asintomáticos portadores de mutaciones en *LRRK2*.

1. Prevalencia de las mutaciones R1441G y G2019S

1.1. Prevalencia en nuestra serie: determinar su origen étnico

Se realizó el estudio sobre una serie de 418 pacientes con EP que residían en el País Vasco, y en su mayoría en Gipuzkoa. La muestra analizada era de procedencia vasca en el 63 % de los casos, lo que representaba bien la población del País Vasco en cuanto a su origen étnico (47 % de los pacientes de origen no vasco en nuestra cohorte, y el 55 % de los individuos del País Vasco, según el Instituto Nacional de Estadística (www.ine.es)).

Nuestros datos sugieren que las mutaciones en *LRRK2* son una causa importante de EP en nuestra comunidad (la mutación R1441G en el 22 % de casos, y la G2019S en el 1,8%), y especialmente entre los casos de EP familiar donde la prevalencia de la mutación R1441G asciende hasta el 46 %.

En este trabajo se ha querido destacar la importancia de determinar el origen étnico de los pacientes. Hasta la fecha no se había estudiado la prevalencia de estas mutaciones en una muestra mayoritariamente vasca, determinando bien su origen. Conviene destacar que incluso se había considerado de forma errónea la frecuencia real de estas mutaciones, en un artículo publicado por Healy y colaboradores en 2008 (Healy y cols. 2008). En este trabajo los autores describían una prevalencia de la mutación G2019S en población vasca del 0%, pero no habían definido la forma de determinar el origen de los individuos. Los resultados en este estudio eran muy diferentes a las descripciones previas sobre esta población, con una frecuencia de la mutación G2019S del 7,7% en el estudio de González y colaboradores (González y cols. 2007). Nuestro estudio tenía como objetivo determinar la prevalencia de las mutaciones R1441G y G2019S diferenciando bien el origen de los individuos, y permitió además demostrar que la mutación G2019S también está presente en una serie de individuos del País Vasco, aunque no se determine su origen, llegando al 3,8% del total de la serie de pacientes con EP, frente a lo referenciado por Healy y colaboradores (Healy y cols. 2008).

Las mutaciones en *LRRK2*, especialmente la G2019S, son la causa genética de EP más frecuente en diferentes poblaciones europeas (Di Fonzo y cols. 2005; Kachergus y cols. 2005; Lesage y cols. 2005; Ferreira y cols. 2007; Pérez-Pastene y cols. 2007), pero mostrando una gran variabilidad. De esta forma, no se han descrito portadores de la mutación G2019S en una larga serie de pacientes de origen griego (Papapetropoulos y cols. 2008), y la frecuencia es baja en población alemana donde no supera el 0,5% (Moller y cols. 2008). Frente a estos estudios, se encuentran la descripciones de alta prevalencia publicada en judíos Ashkenazi (Orr-Urtreger y cols. 2007), y en población norteafricana Bereber (Hulihan y cols. 2008), con frecuencias que ascienden hasta el 14,8% y 30% respectivamente.

En nuestro estudio, la prevalencia de la mutación G2019S en población no vasca es del 6,0%, similar a la publicada en el resto de la población española (3.3. %, 2.2 %, 4.30 %, 7.7 %, 8,7 %) [Healy y cols. 2008; Mata y cols. 2006; Gaig y cols. 2006; González-Fernández y cols. 2007; Sierra y cols. 2011], pero la frecuencia baja al 1,8% entre los pacientes de origen vasco.

Con respecto a la mutación R1441G, las descripciones realizadas hasta la fecha han demostrado una asociación con la población vasca, en base a un efecto fundador por la presencia de un haplotipo común (Simón-Sánchez y cols. 2006). Sin embargo, no todos los casos de portadores de la mutación R1441G en nuestra muestra estudiada eran de procedencia vasca. De hecho, en el primer análisis de nuestra muestra, también se detectó la mutación R1441G en 6 pacientes de los 199 de origen no vasco. Dos de ellos sin ningún apellido vasco, y 4 con sólo uno de ellos. La mutación R1441G ha sido descrita previamente en población no vasca, con frecuencias similar a la obtenido en nuestro estudio en Asturias por Mata y colaboradores (Mata y cols. 2006) (2,2%, n = 225), con frecuencias más bajas en Cataluña por Gaig y colaboradores (Gaig y cols. 2006) (0,7% n = 302), y en el sur de España (Gao y cols. 2009) (1,7%, n=187). En el estudio catalán, se detectaron 2 pacientes portadores de esta mutación, uno con origen cercano a Asturias, mientras que en el otro no había antepasados de origen vasco. El estudio andaluz detectó 3 casos con la mutación R1441G que compartían el mismo haplotipo que los casos detectados en pacientes de origen vasco. Los casos detectados de individuos de origen no vasco portadores de esta mutación, tanto en este estudio como en otras descripciones más ocasionales, probablemente tengan un ascendente vasco no conocido, que pudo emigrar años antes y que ha perdido su apellido a lo largo de los siglos, teniendo en cuenta el efecto fundador de la mutación R1441G alrededor del siglo VII (Mata y cols. 2009).

Autores previos habían sugerido un gradiente geográfico de esta mutación, puesto que las regiones de Asturias, Cantabria y País Vasco están en el norte de la Península Ibérica, mientras que Cataluña se encuentra en el noreste, Andalucía en el sur, y otras regiones como Extremadura (Morán y cols. 2010) y Portugal (Ferreira y cols. 2007) no se detectaron casos con la mutación R1441G. En el trabajo de Mata y colaboradores (Mata y cols. 2006) no se precisaba el origen exacto de los portadores de la mutación R1441G, pero si se describía un haplotipo común con el resto de los portadores de origen vasco, que publicado previamente por Simón y colaboradores (Simón-Sánchez y cols. 2006). En nuestro estudio la frecuencia de la mutación R1441G entre pacientes con EP de origen vasco (22,4%) resultó ser más alta que la descrita por Paisán-Ruiz en la primera descripción (8%) [Paisán-Ruiz y cols. 2004].

En base a estos resultados, y a publicaciones previas (González-Fernández y cols. 2007), y a pesar de no haber sido analizado el gen de forma completa, la población en el País Vasco se sitúa entre aquellas de mayor prevalencia a nivel mundial de las mutaciones en *LRRK2*, especialmente por el peso de la mutación R1441G. Concretamente, en nuestro estudio sobre la población de Gipuzkoa, y determinando bien su origen étnico, el 46% de los pacientes pertenecientes a formas familiares de EP son portadores de la mutación R1441G. Además, las cifras de prevalencia de la mutación G2019S son similares a las descritas en otras poblaciones europeas.

De este estudio se puede concluir la importancia de tener en cuenta el origen étnico de los pacientes, cuando se quiere estudiar y comparar la prevalencia de las mutaciones R1441G y G2019S entre pacientes con EP, ya que los resultados varían si la determinación no ha sido correcta, por los sesgos derivados de la heterogeneidad de las poblaciones. Ambas mutaciones son frecuentes en el País Vasco, y especialmente la R1441G en Gipuzkoa, con la relevancia que supone para el diagnóstico, y el consejo genético en los casos de EP familiar.

1.2. Prevalencia de la mutaciones R1441G y G2019S en una muestra poblacional: Azpeitia y Azkoitia

De la misma forma que resultaba obligado conocer la frecuencia de estas mutaciones en nuestra serie de pacientes, es importante también determinar su prevalencia en la poblacional general.

Partimos de la hipótesis que considera la imponente carga genética mencionada previamente en nuestra serie de pacientes con EP, para poder justificar una posible mayor prevalencia de esta enfermedad en nuestro entorno. Conviene destacar que contábamos con los resultados de un estudio epidemiológico publicado en 2004 por Bergareche y colaboradores, (Bergareche y cols. 2004) con una metodología *puerta a puerta*, realizado en los municipios de Irún y Hondarribia en la comarca del Bidasoa dentro de la provincia de Gipuzkoa. En este trabajo no se apreciaban diferencias en la prevalencia de esta enfermedad, con respecto a referencias previas en otras regiones de Europa. Los resultados de este estudio epidemiológico no descartaban la hipótesis referida inicialmente. A pesar de las reducidas dimensiones físicas y demográficas de Gipuzkoa (700.000 habitantes en 1500 Km²), pudimos determinar que la mayoría de casos de EP familiar recogidos durante los últimos 12 años no procedían de la región estudiada por estos autores. Tanto las 4 familias originales, que sirvieron para la identificación de la mutación R1441G, como la mayoría de las registradas con posterioridad, también asociadas a esta mutación, proceden de municipios del centro de Gipuzkoa en un área aproximada de 50 km de diámetro. Se seleccionaron por ello los municipios vecinos de Azpeitia y Azkoitia pertenecientes a la comarca Urola-Costa dentro de esta área, donde podríamos comprobar con mayor fiabilidad el planteamiento del trabajo, y determinar así la prevalencia de la mutación R1441G (además de la G2019S) en este entorno, y su posible influencia en una hipotética mayor prevalencia de EP, en base sobre todo a estas formas familiares de EP.

Este estudio muestra una prevalencia de portadores de la mutación R1441G, y de pacientes con EP que inicialmente, y con las limitaciones del estudio podría esperarse en función de la hipótesis previa. Se detectaron 6 individuos portadores de la mutación R1441G (1,8% del total de la muestra contactada), y 13 pacientes con EP (2,2% del total de la muestra). Esta frecuencia es mayor que la descrita por Bergareche y colaboradores (Bergareche y cols. 2004) en los otros 2 municipios guipuzcoanos, sin olvidar que la metodología empleada en ambos estudios fue diferente. El estudio de Bergareche y colaboradores era un estudio *puerta a puerta*, y el realizado por nosotros un registro de casos.

Se pudo obtener información completa, tanto clínica como molecular, de 10 de los 13 pacientes detectados, y existía un predominio de formas familiares (50%), y la presencia de la mutación R1441G en 3 de ellos (30 % de los casos), todos ellos pertenecientes a estas formas familiares.

Los datos obtenidos de la muestra contactada y la información recogida del resto de la muestra seleccionada, si sugieren que la prevalencia de la mutación R1441G en el entorno estudiado (1,8%), está por encima de la prevalencia esperada en la población general, y la prevalencia de pacientes con EP (2,2%) se encuentra también por encima de las cifras habitualmente descritas. Este estudio de una muestra aleatorizada perteneciente a municipios seleccionados no permitió acceder al 100% de los individuos, en su primera fase, por lo que los resultados deben interpretarse con precaución.

De este trabajo también se pueden extraer y analizar otros resultados que no eran el objetivo primario, y que se pueden destacar aunque no se haya contactado con el total de la muestra. De esta forma, llama la atención, aunque es un resultado esperable, la diferencia en la frecuencia de algunos diagnósticos si la muestra ha sido valorada por un neurologo o si los datos son únicamente extraídos de un registro. La prevalencia de TE es un ejemplo que pudo detectarse en 10 de los 155 individuos de la muestra contactada, mientras que sólo figuraba como diagnóstico en 1 de los 355 individuos de la muestra no contactada. Esta diferencia indica el infradiagnóstico de este signo cuando no ha sido valorado el total de la muestra por un neurólogo. Además de esta diferencia en frecuencias, conviene destacar como ninguno de los 10 casos estudiados era portador de estas mutaciones en *LRRK2*. Así, aunque sólo se hayan estudiados las mutaciones R1441G y G2019S, y el número de casos sea escaso, estos resultados podrían tener valor dentro del estudio de los mecanismos fisiopatogénicos que podrían unir la EP y el TE, y que podrían tener una base distinta si se comprobaran estos mismos resultados en una serie más amplia.

También en relación con el infradiagnóstico de algunas enfermedades, una situación similar podría darse con signos parkinsonianos de leve intensidad, indicativos de una fase inicial de una EP, u otras enfermedades que cursan con parkinsonismo. De esta forma, de la misma manera que en los 155 individuos de la muestra contactada se pudieron detectar signos de parkinsonismo en 31 individuos cuando fueron valorados por un neurólogo, también podrían haber sido diagnosticados estos signos en mayor número entre los 355 individuos que no accedieron a una valoración directa por el especialista. Parte de ellos podrían corresponder con una EP, y de esta forma la prevalencia de la EP en esta muestra sobre una población seleccionada sería aún mayor de la detectada, e hipotéticamente un porcentaje de ellos serían portadores de la mutación R1441G si extrapolamos los datos obtenidos sobre los casos estudiados hasta la fecha (3 de los 10 pacientes con estudio genético).

2. Penetrancia de la mutación R1441G

Con las cifras de prevalencia descritas en los apartados previos, el siguiente paso era determinar el significado real de ser portador de estas mutaciones en *LRRK2*, en cuanto al riesgo de desarrollar la enfermedad. Resultaba especialmente importante establecer la penetrancia de la mutación R1441G, por su frecuencia en nuestro entorno, y por no haber sido estudiada hasta la fecha. En este estudio se estimó la penetrancia de la mutación R1441G por medio de los datos obtenidos de 59 fratrías (57 pertenecientes a EP familiar, y 2 a EP esporádica), pertenecientes a 20 familias en las que se habían detectado portadores de esta mutación, habiendo sido excluidos los individuos pertenecientes a las 4 familias originales estudiadas en la primera publicación donde se descubrió esta mutación (Paisán-Ruiz, y cols 2004).

En esta muestra, con un total de 40 pacientes con EP y 204 familiares asintomáticos, todos los pacientes eran portadores de la mutación. No se encontró ninguna fenocopia (individuos con EP no portadores de la mutación aunque pertenezcan a familias donde el resto de casos con EP

si son portadores), a diferencia de publicaciones previas de EP asociada a otras mutaciones en *LRRK2* (Latourelle y cols. 2008). En la muestra estudiada predominaban los casos de EP familiar, y como se ha explicado en la metodología del estudio, resultaba en ocasiones difícil establecer diferencias entre ellas por la presencia de ancestros comunes según nos remontábamos años atrás, y sobre la base de los estudios que indicaban un efecto fundador de esta mutación en el entorno (Simón-Sánchez y cols. 206; Mata y cols. 2009). Se consideró por ello conveniente agrupar a los individuos en fratrías que permitían además un manejo más fácil por presentar un menor número de miembros.

En estudios basados en formas familiares, puede existir un sesgo de selección debido a la mayor predisposición a colaborar de las familias con varios familiares afectados. Teniendo en cuenta que ello podría suponer una sobreestimación en las cifras de penetrancia, y para reducir esta variabilidad en el reclutamiento, en la muestra total de las 59 fratrías se incluyeron también las formas esporádicas de EP, y el total de los familiares (244), incluyendo individuos con y sin estudio genético.

Se realizó el cálculo con el denominado *método convencional*, en el que se tenían en cuenta sólo los individuos a los que se les había hecho el estudio genético, y la penetrancia detectada fue del 83,4%. Cuando se realizó el cálculo en el total de la muestra, incluyendo también los familiares sin estudio genético, el resultado era similar (85,6%). Este método fue denominado de *imputación proporcional*, y ya había sido empleado en estudios de penetrancia de factores de riesgo genético relacionados con el cáncer (Evans y cols. 2008).

Resulta difícil comparar las cifras de penetrancia obtenidas en este estudio con las publicadas previamente en relación con la mutación G2019S, fundamentalmente por las diferencias en el diseño de los diferentes estudios, y por la gran variabilidad de resultados encontrados con esta mutación. Si consideramos sólo los estudios de penetrancia de la mutación G2019S en formas familiares de EP, sin incluir los casos esporádicos, destaca el trabajo de Latourelle y colaboradores (Latourelle y cols. 2008), que confirmó una penetrancia global del 67% para esta mutación. En este estudio se discutía también el papel de posibles factores de susceptibilidad genética que podrían modificar la penetrancia de las mutaciones en *LRRK2*, y podrían también justificar el fenómeno de fenocopias detectadas en su trabajo. En otros estudios la penetrancia descrita es bastante menor. En el estudio de Goldwurm y colaboradores (Goldwurm y cols. 2007), la penetrancia de la mutación G2019S excluyendo también los casos probando, en individuos de menos de 65 años, era similar a la referida en nuestro estudio sobre la mutación R1441G, pero a los 80 años era claramente menor, no alcanzando el 33% frente al 83,4% descrito en nuestra serie. Recientemente Sierra y colaboradores sobre la población de Cantabria, donde han descrito una alta prevalencia de esta mutación en una serie consecutiva de 367 pacientes con EP (8,7%), la penetrancia no llega al 50% a los 80 años (Sierra y cols. 2011).

No se han publicado estudios comparativos de penetrancia entre las diferentes mutaciones en *LRRK2*. Sólo Healy y colaboradores (Healy y cols. 2008), compararon los resultados de la mutación G2019S con los obtenidos en otras mutaciones, estimando una penetrancia más baja en los portadores de G2019S, pero teniendo en cuenta que las otras mutaciones estaban insuficientemente representadas en este estudio.

Comparando la incidencia acumulada de EP por género, no hubo diferencias significativas en la penetrancia de la mutación R1441G entre hombres y mujeres, lo que sugería un riesgo similar de la EP en ambos sexos (figura 15). En algunos estudios con la mutación G2019S (Latourelle y cols. 2008), tampoco se había encontrado diferencias significativas en función del género, al contrario de las descripciones clásicas de prevalencia de la EP, que generalmente registran una mayor número de casos de la enfermedad en los hombres (Shulman y cols. 2002; Van Den Eeden y cols. 2003; Benito-León y cols. 2004). Estos datos podrían sugerir que los factores modificadores de la penetrancia en las mutaciones en *LRRK2* no se relacionan con el género

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la penetrancia de la mutación R1441G en nuestra muestra fue baja por debajo de los 60 años, sin haber registrado ningún caso en la muestra estudiada a esta edad; el 12,8% a los 65 años; 50,2% a los 70 años, y aumentaba hasta el 83,4% a los 80 años. En este estudio, se observó un incremento constante en la penetrancia dependiente de la edad, especialmente en el intervalo de 60-70 años (de 12,8 a 50,2%). En este rango se encuentra la edad de inicio de la enfermedad en los portadores de la mutación R1441G, tanto en los estudios previos realizados por nuestro grupo con una media de 60,9 años (Paisán-Ruiz y cols. 2004; Simón-Sánchez y cols. 2006), como en el estudio actual con una edad media de inicio de 62,3 años.

La penetrancia de la mutación R1441G estimada a través del estudio de las diferentes fratrias nos ofrece una información de gran importancia para ayudar en el consejo genético, exclusivamente para indicar el riesgo de desarrollar la enfermedad en cada grupo de edad, pero con la cautela de no poder indicar aspectos pronósticos en base al tipo de fenotipo clínico. Tanto los valores de penetrancia, como el fenotipo clínico varían en función de la fratría analizada. En algunas, la penetrancia es del 100% a los 70 años, mientras que en otras existen portadores asintomáticos después de los 80 años de edad. Así mismo, se aprecian diferencias entre fratrias también a nivel clínico, aunque sean pertenecientes a la misma familia. De esta forma los familiares de la misma fratría tienen una forma de debut, un fenotipo clínico, y un curso clínico bastante homogéneo, que va cambiando si lo comparamos con fratrias cada vez más alejadas dentro del árbol genealógico (datos no publicados).

Esta variabilidad en la presentación clínica observada en este y otros estudios, que puede determinar unas cifras de penetrancia también variables, hace imprescindible determinar los potenciales factores que pueden actuar como modificadores de la penetrancia, de la edad de inicio, y del fenotipo clínico entre los portadores de la mutación R1441G. Para comprender esta variabilidad, la investigación deberá centrarse en el análisis de los factores de susceptibilidad genética conocidos (Blázquez y cols. 2006; De Silva y cols. 2002; Farrer y cols. 2006; Maragarone y cols. 2004). Resulta igualmente importante determinar el papel de otros factores genéticos adicionales, sus interacciones con un determinado ambiente, y el papel de las modificaciones epigenéticas (Marqués y cols. 2011). De esta forma, el estudio de las fenocopias podría tener un valor añadido. En nuestra serie no hemos detectado fenocopias, pero su descripción en familias con otras mutaciones en *LRRK2* (Latourelle y cols. 2008), si bien puede representar una mera coincidencia de una enfermedad frecuente como la EP idiopática en una familia con la mutación, también sugiere que en algunas de estas familias otros factores genéticos o ambientales podrían influir en el desarrollo de la enfermedad.

Se han identificado también familias en las que coexisten mutaciones en *LRRK2* y en otros genes que causan formas monogénicas de EP, como el gen de la parkina (Dächsel y cols. 2006; Marras y cols. 2010) o el gen GIGYF2 (Lautier y cols. 2008), o bien con el número de repeticiones CAG/CAA de la ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2) [Charles y cols 2007], o del haplotipo H1 del gen tau (Golub y cols. 2008), también asociado a un riesgo mayor para desarrollar una EP. Al margen, de estas situaciones puntuales, aún no se conoce ningún factor genético o ambiental que modifiquen la expresión clínica de la EP asociada a estas mutaciones en *LRRK2*, y que pueda justificar una penetrancia tan variable en algunos casos como es la mutación G2019S. Dentro de estos posibles factores modificadores de la expresión clínica, destaca la alta prevalencia descrita de las mutaciones en el gen GBA (Gan-Or y cols 2008). En diferentes grupos étnicos como los judíos Ashkenazi (Aharon-Peretz y cols. 2004) el riesgo de desarrollar EP en los portadores es 7 veces superior a la población control, por lo que su estudio en portadores de las mutaciones en *LRRK2* podría resultar relevante.

3. Fenotipo clínico y curso evolutivo de las mutaciones R1441G y G2019S

Las primeras descripciones de la EP asociada a la mutación R1441G, sobre una muestra pequeña de pacientes (Paisán-Ruiz y cols. 2004; Paisán-Ruiz y cols. 2005; Simón-Sánchez y cols. 2006), mostraban características muy similares a los resultados obtenidos en el trabajo actual, sobre una muestra significativamente más amplia. En estas primeras publicaciones, pudimos comprobar una edad de inicio alrededor de los 60 años, predominando el temblor de reposo asimétrico como síntoma de inicio (Paisán-Ruiz y cols. 2004; Paisán-Ruiz y cols. 2005). Estos trabajos indicaban un curso clínico lentamente progresivo, con excelente respuesta al tratamiento dopaminérgico, y los pacientes desarrollaban fluctuaciones motoras y discinesias a los años de inicio del tratamiento, con presencia casi nula de deterioro cognitivo.

En el trabajo actual se han recopilado datos clínicos del total de la muestra, constituida por 68 pacientes portadores de la mutación R1441G, y 28 pacientes portadores de la mutación G2019S.

Los pacientes con EP portadores de la mutación R1441G son en su mayoría de origen vasco (94%), la mayoría de casos se encuadran en el contexto de una EP familiar (AF en 91% de casos), y con una edad de inicio de 61,8 años, superponible a la descrita hasta la fecha.

En este trabajo los síntomas motores no difieren de los habitualmente descritos en la EP idiopática. Predomina el temblor de reposo asimétrico como síntoma de inicio (60%), y están presentes las complicaciones motoras clásicas, fluctuaciones (63,5%), y discinesias (56,5%), en el plazo de tiempo habitual en la EP idiopática. Destaca la presencia de distonía a lo largo de la enfermedad en el 22,6% de los casos, de predominio en miembros inferiores, especialmente en extensión del primer dedo de uno de los pies, siendo el síntoma de debut en algunos casos, y un signo característico, y muy homogéneo en algunas familias.

Conviene destacar los resultados del estudio de la sintomatología no motora, por su posible valor como marcador clínico precoz. Algunos síntomas como la disfunción olfatoria, y la afectación simpática medida mediante la captación cardiaca de MIBG, junto con otros síntomas no motores como la presencia de estreñimiento, y TCREM se describieron en pacientes con EP asociada a las mutaciones R1441G y G2019S, y se hizo un análisis comparativo frente a pacientes con EP idiopática (Ruiz-Martínez y cols. 2011), donde se apreciaba que en los portadores de estas mutaciones en *LRRK2* todos estos síntomas se veían menos representados. Deben considerarse estos resultados teniendo en cuenta que el TCREM fue registrado por anamnesis, sin confirmación mediante un estudio polisomnográfico. Esta menor representación de los síntomas no motores indica una enfermedad de curso menos agresivo, o al menos con menor extensión. La ausencia de CL en el estudio neuropatológico referido podría también correlacionarse con este fenotipo de menor expresión clínica extranigrica.

En este trabajo se han estudiado también las posibles diferencias clínicas entre las mutaciones R1441G y G2019S, inicialmente asociadas ambas a una EP con las características de la EP idiopática clásica. Además de las diferencias esperadas en cuanto a la procedencia, destaca una edad de inicio algo menor en la mutación G2019S, y un tiempo de evolución similar en ambas mutaciones, pero en la mutación R1441G con una puntuación menor en la escala UPDRS (III), y con menos necesidad diaria de L-dopa, lo que podría indicar una evolución menos agresiva. Desde el punto de vista motor, en ambas mutación el fenotipo de inicio es tremórico, asimétrico, con buena respuesta a L-dopa, y con presencia de fluctuaciones, disquinesias y distonias en un porcentaje similar, y tras un periodo de latencia parecido. Con respecto a los síntomas no motores, menos frecuentes en ambas mutaciones frente a la EP idiopática, se ha observado una menor presencia en la mutación R1441G, salvo en los signos depresivos, pero sólo de forma significativa en los trastornos genitourinarios (10,4 % frente al 43,5 % en los portadores de la G2019S), y rozando la significación en el TCREM (11,5 % frente al 30,4 % en portadores de G2019S).

Hasta la fecha en los pacientes portadores de R1441G se había descrito una menor presencia de signos de deterioro cognitivo, incluso pasados más de 15 años desde el inicio de la enfermedad (Paisán-Ruiz y cols. 2005; Simón-Sánchez y cols. 2006). En este trabajo hemos recogido datos de un mayor número de pacientes portadores de esta mutación, así como de la mutación G2019S, y señalado signos de deterioro cognitivo, ya sean detectados en la consulta, referidos por sus familiares, o registrados en el historial médico de los casos fallecidos. De esta forma, en la actualidad se han detectado signos de deterioro cognitivo en diferente grado en el 35 % de los pacientes portadores de la mutación R1441G y en el 38,5 % de los portadores de la mutación G2019S (*Estanga y cols. Manuscrito en preparación*), con diferencias no estadísticamente significativas en la edad de inicio, algo anterior en la mutación R1441G, donde la edad media de inicio de la enfermedad es algo más tardía. En publicaciones previas con la mutación G2019S (Di Fonzo y cols. 2005; Nichols y cols. 2005), también se había descrito una frecuencia menor de deterioro cognitivo con respecto a la EP idiopática. En este contexto de resultados similares entre ambas mutaciones, destaca sin embargo la presencia significativamente menor de alucinaciones visuales bien estructuradas en los portadores de la mutación R1441G (4,8 % frente al 29,2 % en la mutación G2019S). Los test neuropsicológicos más dirigidas al estudio de la función de regiones

posteriores, y a funciones visuoespaciales, no han detectado diferencias entre los portadores de ambas mutaciones (*resultados no mostrados*), por lo que no se ha podido correlacionar esta menor presencia de alucinaciones en los portadores de la mutación R1441G con el rendimiento en este tipo de tareas, como posible rasgo diferencial entre ambas mutaciones. En el estudio neuropsicológico que hemos completado a 28 pacientes portadores de la mutación R1441G y a 6 pacientes con la G2019S no hemos encontrado diferencias en ninguna de las variables estudiadas (*Estanga y cols. Manuscrito en preparación*).

Además de describir el fenotipo de la enfermedad, teníamos interés en perfilar su curso evolutivo, teniendo en cuenta las referencias previas que indicaban una EP con evolución más benigna, y ver si podía existir algún factor diferencial entre las mutaciones R1441G y G2019S. Las complicaciones motoras como hemos mencionado, ocurren con igual frecuencia y latencia tras el inicio de la enfermedad en las 2 mutaciones. Otras complicaciones que afectan directamente a las actividades de la vida diaria, como la presencia de caídas, la necesidad de salir a la calle acompañado, y el deterioro cognitivo, se corresponden con el tiempo en llegar al estadio IV de H&Y, y tampoco muestran diferencias significativas entre ambas mutaciones.

En resumen, el perfil clínico de la EP asociada a la mutación R1441G, es muy similar al descrito habitualmente en la EP idiopática, con una menor frecuencia de algunos síntomas no motores, y con presencia de signos de deterioro cognitivo en un porcentaje más bajo que en la EP idiopática, pero mayor del descrito previamente, y con escasa presencia de alucinaciones. Comparando ambas mutaciones, el fenotipo motor es muy similar, con diferencias significativas en algunos síntomas no motores que se muestran menos representados en la mutación R1441G. En base al fenotipo se pueden establecer pocas diferencias, pero si indicativas de un patrón más homogéneo en la mutación R1441G que podría justificar la mayor penetrancia descrita, y con un curso evolutivo algo más benigno que la mutación G2019S, que aún así sigue siendo mejor que el descrito en la EP idiopática.

4. Estudio Neuropatológico

En los últimos años hemos tenido acceso al estudio neuropatológico de 3 pacientes portadores mutaciones en el gen *LRRK2*, 2 de la R1441G y 1 de la G2019S. Los 3 casos presentaban una EP típica que cumplían los criterios clínicos comúnmente aceptados para su diagnóstico (Hughes y cols. 2002). En este momento sólo disponemos del estudio completo de uno de los portadores de la mutación R1441G donde no se han detectados depósitos de α -sinucleína en forma de CL. Los resultados preliminares de otro de los portadores de esta mutación tampoco indican presencia de estos acúmulos, y sólo muestra degeneración nigroestriatal (*manuscrito en preparación*).

El fenotipo y la evolución del paciente estudiado son similares a la descripción clínica de Gaig y colaboradores, en el único caso español estudiado hasta la fecha con la mutación G2019S, donde al igual que en nuestro caso sólo se ha descrito una degeneración nigral pura (Gaig y cols. 2007).

En el estudio histológico de nuestro paciente únicamente se apreciaba una leve pérdida neuronal nigroestriada, sin la presencia de inclusiones positivas para α -sinucleína en forma de CL o NL. Los únicos depósitos anormales detectados, fueron signos de inflamación neuronal en SNC con contenido granular fino, e inclusiones α B cristalina positivos, aunque sin un claro significado patológico.

Se han publicado hasta la fecha varios estudios neuropatológicos de cerebros de pacientes con EP asociada a mutaciones en *LRRK2* (tabla 3). Trece de los 15 cerebros estudiados procedían de portadores de la mutación G2019S (Gilks y cols. 2005; Ross y cols. 2006; Giasson y cols. 2006; Gaig y cols. 2007), y mostraban la despoblación neuronal de la SNC, con la presencia característica de CL en la SNC, el locus coeruleus, e incluso en la corteza entorrinal. En los otros 2 pacientes con la mutación G2019S, sólo se apreciaba degeneración nigral inespecífica, sin presencia de inclusiones de α -sinucleína. Previamente se había descrito un paciente con EP portador de la mutación G2019S con ovillos neurofibrilares tau positivos (Rajput y cols. 2006), y en un individuo control asintomático portador de esta mutación, fallecido a los 68 años, sin antecedentes familiares de EP, no se habían encontrado signos de neurodegeneración (Ross y cols. 2006). Se han publicado también descripciones histopatológicas diversas, al igual que fenotipos no siempre de EP. Ross y colaboradores describieron el estudio de una mujer de 89 años, portadora de la mutación G2019S, donde se identificó únicamente la neuropatología característica de la EA (Ross y cols. 2006), y se ha publicado, un caso de síndrome cortico-basal (SCB), y afasia progresiva primaria que asociaba la mutación G2019S (Chen-Plotkin y cols. 2008). En relación con fenotipos diferentes a la clásica EP, en nuestra serie clínica únicamente destaca un paciente portador de la mutación G2019S, que aunque en su inicio tenía un temblor de reposo en pierna, en el primer año de evolución empieza a mostrar signos de atipicidad, y cumple los criterios clínicos de una PSP probable (Litvan y cols. 1996). Frente a este caso, y otros descritos de portadores de esta mutación, no hemos detectado ningún portador de la mutación R1441G con fenotipo de EA, PSP, u otros parkinsonismos atípicos, por lo que podemos indicar de nuevo que el fenotipo de esta mutación se comporta de una manera más homogénea.

Esta variabilidad en los resultados histopatológicos, también se ha observado en pacientes portadores de otras mutaciones en *LRRK2*. En la primera familia descrita con EP asociada al PARK8, (“*Sagamihara kindred*”), los pacientes eran portadores de la mutación I2020T (Funayama y cols. 2005; Hasegawa y cols. 1997). Se describió en ellos únicamente degeneración nigral pura en la SNC, sin presencia de CL, ni NL. En un paciente portador de la mutación R1441C, la SNC mostraba una marcada pérdida neuronal sin inclusiones de α -sinucleína, pero sí con inclusiones de ubiquitina. En otros dos individuos de la misma familia con criterios clínicos de EP, en uno de ellos la neuropatología era compatible con DCL, y en el otro caso se apreciaban inclusiones tau positivas (Zimprich y cols. 2004a). En un estudio de tres individuos portadores de la mutación Y1699C, existía degeneración inespecífica de SNC, con inclusiones neuronales de ubiquitina en dos de los casos, mientras que en el tercero se apreciaban CL (Kham y cols. 2005). En el primer estudio neuropatológico de un paciente portador de la mutación Ile1371Val, se describían los hallazgos característicos de la EP, con presencia de CL (Giordana y cols. 2007). También en los pacientes con mutaciones en el gen *PRKN*, se ha descrito únicamente degeneración nigral pura, sin inclusiones de α -sinucleína (Mori y cols. 1998; Khan y cols. 2003).

La ausencia de CL α -sinucleín positivos en esta y otras descripciones de pacientes portadores de mutaciones en *LRRK2* puede entenderse desde diferentes planteamientos. Algunos autores consideran esta histopatología, como un posible marcador de una pérdida neuronal más lenta, que podría justificar la evolución clínica menos agresiva observada en nuestro caso. La EP ya sea asociada a una mutación patógena, o de origen idiopático tiene en común el fenotipo clínico acorde con los criterios para su diagnóstico, y a nivel morfológico la degeneración neuronal en la SNC. A pesar de ello, tanto esta descripción como previas en pacientes con otras mutaciones en *LRRK2*, muestran una heterogeneidad en los resultados del estudio neuropatológico que podría sugerir que gran parte de los cambios patológicos que hasta la fecha se han considerado esenciales, podrían no serlo tanto. En los últimos años se han postulado diferentes hipótesis fisiopatogénicas, basadas en una agregación anormal, y un posterior depósito de un α -sinucleína, con efecto tóxico en las zonas donde se deposita. En los pacientes portadores de mutaciones en *LRRK2* donde no se han descrito estas inclusiones, el mecanismo de muerte neuronal debería justificarse por otro mecanismo, que sin embargo afecta igualmente a la vía nigroestriada, y determina un similar fenotipo clínico. Es posible que los CLs sean un epifenómeno de la toxicidad de otras proteínas anormales implicadas en la patogénesis de la neurodegeneración, en el contexto del envejecimiento y de factores genéticos y ambientales.

Con esta variabilidad histopatológica observada en este y otros casos de mutaciones en *LRRK2*, además de cuestionar el papel esencial de los CLs en el mecanismo patogénico de la enfermedad, se podría cuestionar el valor del estadiaje de Braak y colaboradores (Braak y cols. 2003), en las formas genéticas de EP.

5. Marcadores clínicos en portadores de la mutación R1441G

5.1. Estudio del olfato y función simpática mediante gammagrafía cardíaca con MIBG

Como se ha mencionado en la introducción, algunos síntomas no motores se presentan en fases tempranas de la enfermedad, por lo que su detección podría tener valor en sí mismo como marcador clínico de la EP. En este trabajo se estudiaron el olfato y la función simpática, en una serie de pacientes portadores de las mutaciones R1441G y G2019S. Nuestro estudio determinó que estos pacientes presentaban menos hiposmia, y menos denervación simpática cardíaca que otros pacientes con EP sin ninguna mutación conocida, y una evolución clínica similar.

Hasta la fecha se han descrito diferentes formas de afectación de la capacidad olfatoria en estudios previos de pacientes con EP portadores de mutaciones en *LRRK2* (Berg y cols. 2005; Healy y cols. 2008; Markopoulo y cols. 1997; Khan y cols. 2005; Silveira-Moriyama y cols. 2008). En los últimos años se ha extendido la hipótesis que defiende la participación de la vía olfatoria como paso crítico para el desarrollo de la patología relacionada con la EP. De esta forma, en cerebros de algunos individuos sin EP, se ha visto afectada esta vía sin asociar todavía anomalías en

la SNc (Braak y cols. 2003; Bloch y cols. 2006; Santpere y cols. 2009), pero no se ha demostrado hasta la fecha, que la afectación de la vía olfatoria preceda siempre a la pérdida neuronal en la SN, como cabría esperar según las descripciones de Braak (Braak y cols. 2003)

Silveira-Moriyama y colaboradores (Silveira-Moriyama y cols. 2008), estudiaron el olfato empleando la versión de 40 ítems del test UPSIT, en pacientes portadores de la mutación G2019S y en un grupo de controles sanos, obteniendo una menor puntuación los pacientes portadores de esta mutación. Los resultados en los portadores asintomáticos de la mutación G2019S eran iguales a los observados en el grupo de controles sanos, dentro del rango normal. En este trabajo, los autores tuvieron acceso al estudio postmortem de 4 casos autopsiados en los que se detectaron depósitos de α -sinucleína en rинencefalo. En otros casos de pacientes con formas familiares de EP, como la asociada a mutaciones en *SNCA*, se han descrito algunos pacientes con resultado normal después de un completo estudio del olfato, empleando tanto técnicas de detección como de identificación olfatoria (Bostantjopoulou y cols. 2001).

Las diferentes capacidades olfatorias (detección e identificación) se han descrito alteradas hasta en un 75% de los pacientes con EP (Haehner y cols. 2007). En este sentido, los datos publicados hasta la fecha son similares a los observados en nuestro estudio, dentro de la serie de pacientes con EP sin ninguna mutación conocida. Sin embargo, el grupo de pacientes portadores de mutaciones en el gen *LRRK2* mostraban hiposmia en un porcentaje significativamente menor, mostrando alteración el 36% de casos.

Teniendo en cuenta los resultados de este estudio, y la ausencia de inclusiones de α -sinucleína en el caso descrito y en otros portadores de mutaciones en *LRRK2*, es posible que exista otra forma de progresar en la EP asociada las mutaciones en *LRRK2*, y se podría cuestionar una vez más el modelo de CLs como mecanismo fisiopatogénico, y el estadiaje de Braak y colaboradores para los portadores de estas mutaciones. El estadio premotor, incluyendo la hiposmia, el estreñimiento, el TCREM o la depresión quedaría definido en esta clasificación en base a las alteraciones neuropatológicas detectadas en la zona caudal del tronco cerebral y bulbo olfatorio, en las fases I y II de Braak. En nuestro trabajo, los portadores de estas mutaciones mostraban menos presencia de estos síntomas no motores, en base a la anamnesis, y después del estudio del olfato mediante el test B-SIT, y de la actividad simpática, mediante la gammagrafía cardiaca con MIBG.

En el estudio de la vía simpática mediante la gammagrafía cardiaca con MIBG, los resultados son similares a los descritos por Quattrone y colaboradores (Quattrone y cols. 2008). En el trabajo de estos autores, se describió un resultado normal en el 50% de los pacientes portadores de la mutación G2019S, lo que sugería que la denervación simpática cardíaca se producía con menos frecuencia en la EP asociada a esta mutación que en los casos de EP idiopática. En estudios como el de Nagayama y colaboradores (Nagayama y cols. 2005) realizados sobre una gran serie de pacientes con EP idiopática, se demuestra que la captación de MIBG en la gammagrafía cardiaca es menor en los pacientes con la enfermedad más avanzada, indicando así una captación miocárdica de MIBG inversamente proporcional a la gravedad de la EP. En nuestro trabajo también pudimos detectar una correlación similar. Los pacientes con valores bajos de captación, presentaban mayor puntuación en las escala H&Y, y UPDRS (III), y una enfermedad que llevaba un mayor tiempo de evolución.

La identificación de los síntomas no motores en fases precoces de la enfermedad, ha cambiado nuestra forma de entender la progresión de la enfermedad, pero quedan todavía varios aspectos por discutir:

- Los síntomas de disfunción autonómica no están siempre presentes en la EP.
- La patología Lewy en ganglios y plexos autonómicos periféricos, no siempre se correlaciona con la presencia de los síntomas clínicos.
- La presencia de CL en los ganglios simpáticos y en los nervios simpáticos posganglionares en el corazón (Braune y cols. 2001), podría indicar que la patología con CL puede causar una importante denervación simpática cardíaca, y justificar así la baja captación de MIBG. Falta por conocer la naturaleza y composición de los CL en el sistema nervioso autónomo para interpretar estos hallazgos.
- No se dispone de datos acerca de los cambios moleculares presentes en las etapas temprana y tardía de la patología Lewy en el sistema nervioso autónomo periférico.
- Se dispone de escasa información acerca de los primeros cambios moleculares en el bulbo olfatorio, que se ven afectados en algunos cerebros, sin que todavía presenten afectación en la SNC (Haehner y cols. 2004; Bloch y cols. 2006).
- No hay información sobre la patología molecular en todas estas regiones, en ciertos casos de EP asociados a las mutaciones en *PRKN* y *LRRK2*.

En la EP asociada a mutaciones en el gen *PRKN* se han descrito casos con una captación cardíaca normal de MIBG (Suzuki y cols. 2005). El examen post mortem en estos individuos reveló, que la tinción con tirosina hidroxilasa (TH) en las fibras nerviosas del epicardio permanecía conservada en los pacientes con mutaciones en homocigosis en este gen. Por el contrario, en los pacientes con EP idiopática, además de presentar CL, las fibras nerviosas se habían reducido de forma acusada, o estaban ausentes. Estos hallazgos sugerían la integridad de la vía simpática cardíaca en la EP asociada a mutaciones en parkina, y una posible asociación con la ausencia de CLs en estos casos. Los resultados de nuestro estudio, con menor afectación en la gammagrafía con MIBG en los portadores, también podrían relacionarse con la ausencia de CL observados en el caso descrito y en otros previos.

Se ha descrito la asociación entre la alteración del olfato, y el desarrollo futuro de EP (Klein y cols. 2007) en un estudio prospectivo de base poblacional, cuyos resultados sugerían que la hiposmia podría preceder hasta en 4 años al desarrollo de los síntomas motores de la enfermedad. De esta forma, una línea futura que se deriva de nuestro trabajo, es determinar el valor predictivo del estudio del olfato, y de la vía simpática mediante la captación cardíaca de MIBG en una serie de pacientes con EP asociada a mutaciones en *LRRK2*. Un resultado normal en el test de identificación olfatoria B-SIT en un paciente que presenta una EP con un fenotipo típico, donde es frecuente encontrar hiposmia, aumenta la probabilidad de que esta EP esté asociada con estas mutaciones en el gen *LRRK2*, por lo que podría ser un motivo para indicar el estudio molecular en estos pacientes, especialmente si hay presencia de antecedentes familiares de la enfermedad. A la vista de resultados, iguales conclusiones se pueden derivar del estudio de la vía simpática, y de esta forma una captación normal de MIBG aumenta la posibilidad de que la EP esté asociada con estas mutaciones.

El estudio de estos síntomas no motores en pacientes con EP asociada a estas mutaciones, nos permite aproximar el valor que tienen estas pruebas como marcador precoz en portadores asintomáticos de las mismas. Con los resultados obtenidos en este estudio, estudiar la vía olfatoria y la vía simpática mediante la gammagrafía cardiaca con MIBG en portadores asintomáticos, puede resultar poco rentable en la búsqueda de marcadores de riesgo de evolución a una EP. De igual forma, si consideramos la presencia de otros síntomas no motores descritos en esta trabajo, como el TCREM, y el estreñimiento, también menos representados en los pacientes con EP asociada a mutaciones en *LRRK2*, si bien estos resultados deben considerarse con mayor cautela, por no tener un estudio polisomnográfico que confirme la sospecha clínica de TCREM.

Teniendo en cuenta la importancia que supone disponer de marcadores precoces de la EP con este componente genético, el estudio debería ir dirigido a evaluar áreas o sistemas que si han demostrado pérdida de actividad, y en este sentido la vía dopaminérgica nigroestriatal que define el perfil motor de la enfermedad. El PET o el DATSCAN pueden resultar más eficaces en estadios preclínicos por estar dirigidas a estas áreas donde existe una degeneración neuronal demostrada, al margen de la ausencia de CLs.

6. Marcadores de imagen

6.1. Estudio de vía nigroestriada mediante ultrasonografía transcraneal (UTC)

La UTC es una técnica inócua, y de bajo coste que permite visualizar la SN con relativa sencillez. La sensibilidad de esta técnica como prueba diagnóstica, ha sido sin embargo cuestionada por estar sometida a la subjetividad del que la lleva a cabo, y por las diferencias observadas en los diferentes estudios según la tecnología empleada, y el punto de corte determinado.

A pesar de las publicaciones que indican el valor diferencial de los hallazgos ultrasonográficos en pacientes, y en individuos sanos, hasta la fecha no se ha podido determinar con seguridad su valor como posible marcador de la enfermedad en etapas presintomáticas, en portadores de las principales mutaciones asociadas a la EP.

Nuestro estudio mostraba que los pacientes con EP portadores de las mutaciones R1441G o G2019S en el gen *LRRK2*, presentaban una hiperecogenicidad de la SN similar a la observada en pacientes con EP sin mutaciones conocidas, y un perfil clínico similar. Teniendo en cuenta que en la EP el dato objetivo que define su fenotipo motor, es la pérdida neuronal en la SNc, ya sea una EP asociada a estas mutaciones o una EP idiopática, los resultados de la UTC vendrían a reflejar esta situación, independientemente de la carga genética del paciente.

Se han publicado previamente estudios que miden la ecogenicidad de la SN en pacientes con EP asociada a mutaciones en *LRRK2* (Hagenah y cols. 2007; Hedrich y cols. 2006; Berg y cols. 2002). Schweitzer y colaboradores (Schweitzer y cols. 2007) compararon los resultados obtenidos en siete portadores de mutaciones en este gen, con los obtenidos en pacientes con EP idiopática. En este artículo se muestra un aumento significativo del área de ecogenicidad en los pacientes

portadores en comparación con los controles sanos, aunque no tan intensa como la obtenida en pacientes con EP sin carga genética. En este mismo trabajo, sobre otros subtipos monogénicos de la EP, (*SNCA*, *PRKN*, *PINK1* y *DJ-1*), se obtuvieron los mismos resultados frente a casos con EP idiopática. En otro estudio realizado en portadores de mutaciones en *LRRK2*, cuatro de los cinco pacientes estudiados mostraron hiperecogenicidad (Berg y cols. 2005b). Por último, Hedrich K y colaboradores (Hedrich y cols. 2006) describieron este mismo signo ecográfico en dos hermanas portadoras de una mutación en este gen.

Los valores obtenidos en nuestra serie de portadores de mutaciones en *LRRK2*, se correspondían con los obtenidos en estos estudios previos, donde no se observaban diferencias frente a los pacientes con EP idiopática. Esto implicaría que los posibles mecanismos patogénicos implicados en este hallazgo ecográfico, y el posible papel del metabolismo del hierro descrito previamente en la EP idiopática, podrían estar presentes de forma similar también en la EP asociada a estas mutaciones. La UTC permitiría detectar este hecho común patogénico, relacionado con la pérdida neuronal en la SNc, independientemente del componente genético asociado, y al margen también de la presencia o no de inclusiones de sinucleína.

En este trabajo se utilizó un ecógrafo de gama media, y el punto de corte se situó en cifras inferiores a las publicadas habitualmente (0,20 cm) [Berg y cols. 2005a; Berg y cols 2005b]. A pesar de las limitaciones de la técnica, con la metodología empleada en nuestro estudio, la diferencia de resultados entre el grupo de pacientes con EP, y el grupo de familiares asintomáticos (portadores o no de mutaciones en *LRRK2*), y el grupo control fue estadísticamente significativa.

Uno de los objetivos de este estudio era determinar el potencial de la UTC de SN, como posible marcador de cambios preclínicos en la EP, con la hipótesis de que en los portadores de mutaciones en *LRRK2* esta hiperecogenicidad podría apreciarse de forma precoz, de la misma forma que se había determinado en portadores de mutaciones en *PRKN* (Zecca y cols. 2005). La UTC en estos pacientes con EP podría ser por ello un método no invasivo de cribado en la identificación de signos precoces de degeneración nigroestriatal. Los hallazgos ecográficos en la SN se han estudiado también en correlación con otros posibles marcadores precoces, como la hiposmia, o la gammagrafía cardiaca con MIBG. Iwanami y colaboradores (Iwanami y cols. 2010) no encontraron correlación entre la disfunción olfatoria y los resultados de la UTC, en pacientes que además presentaban TCREM, como signo de posible evolución a EP. En relación con la reducción de captación cardiaca de MIBG, en el trabajo de Kajimoto y colaboradores (Kajimoto y cols. 2009) se presentaron resultados similares, sin obtener correlación con el área de ecogenicidad de SN, en pacientes con EP idiopática.

Nuestros resultados en pacientes con EP mostraron una hiperecogenicidad de la SN en la misma proporción en portadores, y no portadores. En los grupos de familiares asintomáticos (portadores o no), la proporción de individuos que mostraban hiperecogenicidad de SNc era superior al 40%, independientemente de su estado portador, y siempre con una diferencia significativamente mayor que la observada en el grupo control (5,6%), con resultados similares al 8-10% descritos previamente en población general (Becker y cols. 1995, Berg y cols 1999). Otros estudios en familiares asintomáticos de pacientes con EP, en este caso sin carga genética, mostraban resultados similares (Ruprecht-Dörfler y cols. 2003), pudiendo correlacionarse estos hallazgos con los resultados de los estudios epidemiológicos que estiman que el riesgo de desarrollar

una EP en la población general es del 0,1% (Benito-León y cols. 2004), pero 2.4 veces superior en sus familiares de primer grado (Marder y cols. 2003). Previamente también se había publicado la hiperecogenicidad de SN, como posible factor de riesgo epidemiológico, en pacientes con antecedentes familiares de EP, en un estudio sobre una amplia serie de 1.120 individuos (Schweitzer y cols. 2007). De la misma forma que este estudio, nuestros resultados podrían indicar también una posible predisposición genética en los familiares de primer grado de pacientes con EP para mostrar este hallazgo ecográfico sugestivo de afectación nigroestriatal. Teniendo en cuenta que no hemos observado diferencias entre nuestros familiares asintomáticos sean o no portadores de estas mutaciones en *LRRK2*, esta predisposición otorgada sólo por el hecho de ser familiar de un paciente con EP, sería independientemente de la carga genética relacionada con las mutaciones R1441G y G2019S en *LRRK2*, y podría sugerir la existencia de otros factores genéticos implicados en la configuración del fenotipo clínico en portadores de mutaciones en este gen.

En conclusión, este estudio en portadores de mutaciones en el gen *LRRK2* muestra resultados similares a los obtenidos previamente en pacientes con EP idiopática, por lo que el hipotético papel fisiopatogénico del depósito de hierro que justificaría la hiperecogenicidad, podría ser similar en ambos subtipos de EP. Este método no invasivo podría ser válido para detectar esta afectación nigroestriatal en pacientes con EP y sus familiares de primer grado, donde existiría una vulnerabilidad selectiva en esta área, determinada genéticamente, sin que las mutaciones R1441G y G2019S actúen como un factor diferencial entre ambos grupos.

7. Líneas futuras

Describimos algunas líneas de trabajo que hemos iniciado en los últimos años, o que serán iniciadas en un futuro cercano, sobre aspectos que consideramos podrán ser relevantes para un mejor conocimiento de la EP asociada a mutaciones en *LRRK2* y de la EP en general. Incluimos trabajos de investigación liderados por nuestro grupo, y registros internacionales multicéntricos.

7.1. Marcadores moleculares: estudio de los miRNA

Los micro RNAs (miRNAs) se definen como secuencias endógenas cortas no codificantes de RNA que participan en la regulación de la expresión génica. Se ha propuesto que estas moléculas actúan sobre los RNA ya procesados, uniéndose a ellos de manera específica, e impidiendo su unión al ribosoma, y por tanto su traducción, regulando de esa manera la expresión de genes (Berezikov y cols. 2006). Siguiendo las recientes evidencias que proponen los miRNAs como un factor regulador de la neurodegeneración, nos planteamos analizar la alteración de sus niveles de expresión en sangre periférica de pacientes con EP asociada a las mutaciones en el gen *LRRK2*, y a sus familiares portadores asintomáticos, con el fin de poder establecer el valor de los mismos como biomarcadores moleculares de la enfermedad, o modificadores de su penetrancia.

7.2. Factores genéticos modificadores: Estudio de mutaciones en *GBA*

Como hemos mencionado en la introducción, recientemente, se ha descrito la asociación entre las mutaciones del gen *GBA* y la EP en poblaciones americanas, europeas y asiáticas, siguiendo un patrón no mendeliano. Existen pocos estudios con una valoración clínica detallada de los pacientes, y en ningún trabajo previo se ha valorado la actividad de la *GBA* en relación con las mutaciones en *LRRK2*, y la posible variabilidad clínica de los pacientes. En un proyecto recientemente iniciado, proponemos estudiar en esta población homogénea, la prevalencia de la mutación de la *GBA*, y realizar una detallada descripción clínica. También se valorará la utilidad de la determinación de la actividad de *GBA* en leucocitos de sangre periférica, como biomarcador en la EP.

7.3. Marcadores neuropsicológicos¹

Alteraciones psiquiátricas (apatía, depresión, ansiedad) y cognitivas (disfunción ejecutiva) se han sugerido como síntomas no motores ya presentes en las fases iniciales de la EP, incluso antecediendo la aparición de los síntomas motores, en la fase “premotora” de la enfermedad (Chaudhuri y cols. 2006). Actualmente se considera que determinadas alteraciones neuropsicológicas (ciertas características de personalidad, como la baja búsqueda de nuevas sensaciones, disfunciones neurocognitivas o anomalías en el control visuomotor), pueden constituir un marcador precoz de la enfermedad, con capacidad predictiva sobre el devenir cognitivo del paciente. Así, el rendimiento en velocidad de procesamiento (Frías y cols. 2007), el déficit y fluctuación en la atención (Taylor y cols. 2008; Emre. 2007), la disfunción ejecutiva, especialmente la flexibilidad mental y la inhibición de respuestas inadecuadas (Woods y cols. 2003) o la memoria verbal (Aarsland y cols. 2009) se asocia con mayor declive cognitivo en pacientes con EP. De la misma forma, se han propuesto diversas pruebas neuropsicológicas con valor predictivo del deterioro cognitivo, como la fluidez verbal semántica, la copia de pentágonos insertados y el Wisconsin Card Sorting Test (WCST). Además del déficit exclusivamente cognitivo, recientes hallazgos informan de disfunción en la cognición social (reconocimiento de expresiones faciales, toma de decisiones y teoría de la mente), viéndose ésta perjudicada incluso en la fase “premotora” de la enfermedad.

En el último año, hemos empezado a definir de forma reglada el perfil neuropsicológico de pacientes con EP, portadores o no de mutaciones en el gen *LRRK2*, así como de sus familiares en primer grado, con esta misma diferenciación genética. Uno de los objetivos de este estudio es analizar la presencia de síntomas neuropsicológicos en estos familiares asintomáticos, portadores de las mutación R1441G y G2019S, y de esta forma establecer su valor como marcador precoz de la enfermedad, y las diferencias entre formas genéticas y no genéticas de EP.

¹ Este proyecto fue ganador de la 2ª edición de los premios de Investigación de la Federación Española de Parkinson (2009)

7.4. Estudio de factores ambientales²

La heterogeneidad en la forma de presentación de la EP, y en las tasas de penetrancia de determinadas mutaciones, nos lleva a plantear hipótesis sobre los posibles factores modificadores tanto desde el punto de vista genético como ambiental. Como hemos mencionado con anterioridad, en los pacientes portadores de mutaciones en el gen *LRRK2*, el estudio de factores ambientales, puede realizarse con menos sesgos, y sus resultados podrían ser extrapolables a la EP idiopática, sin carga genética conocida, donde esta variabilidad fenotípica acontece de forma similar.

En un trabajo de colaboración con un proyecto internacional, liderado desde la Universidad de Toronto, hemos iniciado el estudio de los factores ambientales y hábitos, que pueden modificar la expresividad clínica y la penetrancia de la EP asociada a las mutaciones R1441G y G2019S en *LRRK2*.

7.5. Estudio de síntomas no-motores e integridad de la vía nigroestriatal en portadores asintomáticos de mutaciones en el gen *LRRK2*: Estudio ASAP³

En colaboración con el Hospital Clinic de Barcelona, en los últimos 2 años venimos realizando el estudio en familiares asintomáticos de pacientes con EP, y portadores de la mutación R1441G ó G2019S, de síntomas motores y no motores, así como la valoración de la integridad de la vía nigro-estriada mediante DATSCAN. Está previsto analizar estos datos en 50 familiares asintomáticos portadores de estas mutaciones, en 50 familiares asintomáticos sin mutaciones, y en 50 controles pareados por edad y sexo. El DATSCAN se realizará en los 50 familiares asintomáticos portadores de mutaciones, y en los 50 controles. En el estudio los investigadores se mantienen ciegos al estado genético (portador versus no portador de la mutación) y a la condición familiar (pariente de un paciente con EP versus control), utilizando el siguiente procedimiento estandarizado: 1) historia médica y neurológica y examen neurológico, 2) evaluación del olfato, 3) evaluación de la función autonómica, 4) evaluación del sueño, 5) evaluación neuropsiquiátrica, 6) evaluación de la personalidad, 7) evaluación cognitiva, 8) test motores, y 9) DAT SPECT con 123I-loflupano. Está previsto finalizar este estudio en el próximo año, y los resultados clínicos preliminares están en fase de análisis y de redacción para su publicación.

² Proyecto FIS concedido en edición de 2010.

³ Proyecto FIS y del Gobierno Vasco concedidos en edición de 2010.

Una ampliación de este estudio, con la inclusión de material biológico (fibroblastos y LCR) ha sido recientemente financiada para los próximos 2 años por la Michael J. Fox Fundation.

7.6. Estudio de formas mendelianas de EP⁴

En el último año estamos participando en un estudio multicéntrico europeo denominado MEFOPA (*mendelian forms of Parkinson's disease*), coordinado por el Dr. Thomas Gasser de la Universidad de Tuebingen (Alemania). Nuestros datos clínicos sobre pacientes con EP asociada a las mutaciones R1441G y G2019, así como los portadores de mutaciones en parkina están siendo analizados en conjunto con los pertenecientes a otros centros.

7.7. Estudios epigenéticos

A pesar de que los pacientes con EP asociada a mutaciones en *LRRK2* muestran un fenotipo compatible con la EP clásica, con las diferencias descritas en su sintomatología no motora, hay aspectos todavía sin dilucidar, especialmente en la variabilidad clínica inter e intrafamiliar. En condiciones donde la carga genética y los factores ambientales se muestran homogéneos, los estudios epigenéticos pueden resultar de especial importancia. Nuestro grupo está empezando a diseñar los primeros estudios en este sentido.

⁴ Proyecto financiado por Grant Europeo en edición de 2010 (241791).

Conclusiones finales

Este trabajo nos permite extraer las siguientes conclusiones:

1. La mutación R1441G es responsable de casi el 50% de los casos de EP familiar de origen vasco, en Gipuzkoa. La mutación G2019S es tan prevalente como en otras series en población europea, especialmente en población de origen no vasco, tanto de casos familiares como esporádicos.
2. La mutación R1441G podría justificar un mayor prevalencia de EP en los dos municipios de la comarca estudiada (Urola Costa).
3. La EP asociada a la mutación R1441G presenta un fenotipo clínico similar a la EP idiopática, con algunos signos diferenciales, como la menor frecuencia de síntomas no motores.
4. Los hallazgos neuropatológicos del paciente con EP asociada a la mutación R1441G demuestran ausencia de CLs, como signo diferencial, y plantea la posibilidad de otro mecanismo fisiopatológico que justifique la pérdida neuronal en SNc.
5. Los marcadores clínicos o de imagen que pueden tener valor en el diagnóstico presintomático en la EP, pueden tener una menor rentabilidad en portadores asintomáticos de la mutación R1441G.
 - a) La disfunción olfatoria, y la detección de disfunción simpática medida mediante gammagrafía cardiaca con MIBG, se ve menos afectada en los pacientes con EP asociada a la mutación R1441G.
 - b) Los hallazgos de la ultrasonografía de la SN en familiares asintomáticos de pacientes portadores, no muestra diferencias con respecto a los familiares asintomáticos no portadores, lo que indicaría que la carga genética asociada a esta mutación no es un factor diferencial único, y que existen otros factores que lo determinan.
6. Con los datos existentes se avala el hecho de que la afectación de la SNc, como circunstancia clave para el desarrollo de la EP se puede alcanzar por diferentes caminos, no siendo la afectación “premotora” o la presencia de CL requerimientos imprescindibles.

Referencias bibliográficas

1. Publicaciones

Parte de este estudio ha sido previamente publicado por el autor de la tesis, y otros miembros del grupo. Presentamos las referencias más destacadas, y los artículos directamente relacionados:

1.1. Referencias previas de miembros del grupo

- Paisán-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, van der Brug M, López de Munain A, Aparicio S, Martínez Gil A, Khan N, Johnson J, **Ruiz Martínez J**, Nicholl D, Martí Carrera I, Sáenz Peña A, de Silva R, Lees A, Martí-Massó JF, Pérez-Tur J, Wood NW and Singleton AB. Cloning of the gene containing mutations that cause *PARK-8* linked Parkinson's disease. *Neuron*. 2004;44:595-600.
- Bergareche A, De La Puente E, López de Munain A, Sarasqueta C, de Arce A, Poza JJ, Martí-Massó JF. Prevalence of Parkinson's disease and other types of Parkinsonism. A door-to-door survey in Bidasoa, Spain. *J Neurol*. 2004;251:340-5
- Paisán-Ruiz C, Sáenz A, López de Munain A, Martí I, Martínez Gil A, et al. Familial Parkinson's disease: clinical and genetic analysis of four Basque families. *Ann Neurol*. 2005;57:365-372
- Martí Massó J. F, Paisán Ruiz C, Simón J, Martí I, Aparicio S, **Ruiz-Martínez J**, Martínez Gil A, Singleton A. B, Perez Tur J, and Lopez de Munain A. Parkinson's Disease Related to the Basque Dardarin Mutation. *Neurology*. 2005;Suppl 1 (64), A168.
- Paisán-Ruiz C, Lang AE, Kawarai T, Sato C, Salehi-Rad S, Fisman GK, Al-Khairallah T, St George-Hyslop P, Singleton A, Rogaeva E: *LRRK2* gene in Parkinson disease: Mutation analysis and case control association study. *Neurology* 65:696–700, 2005.
- Pérez-Tur J, Martí Massó JF: Clinical and molecular findings in *LRRK2* Spanish and UK families. Presented at the Movement Disorder Society, Berlin, June 7, 2005.
- Simón-Sánchez, Martí Massó JF, Sánchez-Met JV, Paisán-Ruiz C, Martínez-Gil A, **Ruiz-Martínez J**, Saenz A, Singleton AB, López de Munain A, Perez-Tur J. Parkinson's disease due to the R1441G mutation in Dardarin: a founder effect in the Basques. *Mov Disord*. 2006;21:1954-1959.
- Martí Massó JF: Autosomal dominant familial Parkinson's disease. Presented at 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Kyoto, Japan, October 28–November 2, 2006.

1.2. Artículos directamente relacionados

Gorostidi A, **Ruiz-Martínez J**, de Munain AL, Alzualde A, and Masso JF. *LRRK2* G2019S and R1441G mutations associated with Parkinson's disease are common in the Basque Country, but relative prevalence is determined by ethnicity. *Neurogenetics*. 2009;10:157-159.

Martí-Massó JF, **Ruiz-Martínez J**, Bolano MJ, Ruiz I, Gorostidi A, Moreno F *et al*. Neuropathology of Parkinson's disease with the R1441G mutation in *LRRK2*. *Mov Disord* 2009; 24: 1998-2001.

Ruiz-Martínez J, Gorostidi A, Ibañez B, Alzualde A, Otaegui D, Moreno F, López de Munain A, Bergareche B, Gómez-Esteban JC, Martí Massó JF. Penetrance in Parkinson's disease related to the *LRRK2* R1441G mutation in the Basque Country (Spain). *Mov Disorders* 2010;25:2340-5

* Premio Novartis a la mejor publicación en Trastornos del Movimiento 2011

Ruiz-Martínez J, Gorostidi A, Goyenechea E, Alzualde A, Poza JJ, Rodríguez F, Bergareche A, Moreno F, López de Munain A, Martí Massó JF. Olfactory deficits and Cardiac ¹²³I-MIBG, in Parkinson's disease related to the *LRRK2* R1441G and G2019S mutations. *Mov Disord* 2011, May 24

2. Bibliografía

Quedan señaladas (PDF) las referencias que disponen del artículo completo en formato PDF en el disco que se adjunta con cada ejemplar de la tesis.

Aarsland D, Marsh L, Schrag A. Neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2009;24:2175-86. [PDF](#)

Aasly Jo, Toft M, Fernanadez-Mata I, Kachergus J, Hulihan M, White LR, et al. Clinical features of *LRRK2*-associated Parkinson's disease in central Norway. *Ann Neurol*. 2005;762-75. [PDF](#)

Abasolo-Osinaga E, Abecia-Inchaurregui LC, Fernández-Díaz E, Barcenilla-Laguna A, Bañares-Onraita T. The prevalence and pharmacological cost of Parkinson's disease in Spain. *Rev Neurol*. 2006;43:641-5. [PDF](#)

Abbas N, Lücking CB, Ricard S, Dürr A, Bonifati V, De Michele G, et al. A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Hum Mol Genet*. 1999;8:567-74. [PDF](#)

Abbott RD, Petrovitch H, White LR, et al. Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology*. 2001;57:456-462. [PDF](#)

Abbott RD, Ross GW, White LR, et al. Environmental, life-style, and physical precursors of clinical Parkinson's disease: recent findings from the Honolulu-Asia Aging Study. *J Neurol*. 2003;250(Suppl 3):30-9. [PDF](#)

Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW. The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003;54:283-6. [PDF](#)

Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the Glucocerebrosidase Gene and Parkinson's Disease in Ashkenazi Jews. *New England Journal of Medicine*. 2004;351:1972-7. [PDF](#)

Alcalay RN, Mejia-Santana H, Tang MX, Rosado L, Verbitsky M, Kisselev S, et al. Motor phenotype of *LRRK2* G2019S carriers in early-onset Parkinson disease. *Arch Neurol*. 2009;66:1517-22. [PDF](#)

Athanassiadou A, Voutsinas G, Psiouri L, Lero E, Polymeropoulos MH, Ilias A, et al. Genetic analysis of

- families with Parkinson disease that carry the Ala53Thr mutation in the gene encoding alpha-synuclein. *Am J Hum Genet.* 1999;65:555-8. [PDF](#)
- Bandopadhyay R**, Kingsbury AE, Cookson MR, Reid MR, Evans IM, Hope AD, et al. The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. *Brain* 2004;127(Pt 2):420-30. [PDF](#)
- Becker G**, Seufert J, Bogdahn U, Reichmann H, Reiners K. Degeneration of substantia nigra in chronic Parkinson's disease visualized by transcranial color-coded real-time sonography. *Neurology* 1995;45:182-184. [PDF](#)
- Becker C**, Jick SS, Meier CR. Use of antihypertensives and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 2008;70(16 Pt 2):1438-1444. [PDF](#)
- Begg CB**. On the use of familial aggregation in population-based case probands for calculating penetrance. *Journal of the National Cancer Institute* 2002;94:1221-1226. [PDF](#)
- Behnke S**, Double KL, Duma S, Broe GA, Guenther V, Becker G, et al. Substantia nigra echomorphology in the healthy very old: correlation with motor slowing. *Neuroimage* 2007;34:1054-1059. [PDF](#)
- Benito-Leon J**, Bermejo-Pareja F, Morales-González JM, Porta-Etessam J, Trincado R, Vega S, et al. Incidence of Parkinson's disease and parkinsonism in the three elderly population of central Spain. *Neurology* 2004;62:734-741. [PDF](#)
- Berezikov E**, Thuemmler F, van Laake LW, Kondova I, Bontrop R, Cuppen E, Plasterk RH. Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nat Genet.* 2006;38:1375-7. [PDF](#)
- Bergareche A**, De La Puente E, López de Munain A, Sarasqueta C, de Arce A, Poza JJ, Martí-Massó JF. Prevalence of Parkinson's disease and other types of Parkinsonism. A door-to-door survey in Bidasoa, Spain. *J Neurol.* 2004;251:340-5. [PDF](#)
- Berg D**, Becker G, Zeiler B, Tucha O, Hofmann E, Preier M, et al. Vulnerability of the nigrostriatal system as detected by transcranial ultrasound. *Neurology* 1999;53:1026-1031. [PDF](#)
- Berg D**, Roggendorf W, Schröder U, Klein R, Tatschner T, Benz P, et al. Echogenicity of the substantia nigra: association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury. *Arch Neurol.* 2002;59:999-1005. [PDF](#)
- Berg D**, Merz B, Reiners K, Naumann M, Becker G. Five-year follow-up study of hyperechogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2005;20:383-5. [PDF](#)
- Berg D**. In vivo detection of iron and neuromelanin by transcranial sonography—a new approach for early detection of substantia nigra damage. *J Neural Transm.* 2006;113:775-80. [PDF](#)
- Berg D**, Schweitzer K, Leitner P, Zimprich A, Lichtner P, Belcredi P, et al. Type and frequency of mutations in the *LRRK2* gene in familial and sporadic Parkinson's disease. *Brain* 2005;128:3000-3011. [PDF](#).
- Betarbet R**, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000;3:1301-1306.
- Blazquez L**, Otaegui D, Saenz A, Paisán-Ruiz C, Emparanza JI, Ruiz-Martínez J, et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele in familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurosci.Lett.* 2006;406:235-239. [PDF](#)
- Bloch A**, Probst A, Bissig H, Adams H, Tolnay M. Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006;32:284-295.
- Bonifati V.**, Rizzu P., van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003;299:256-9.
- Bonifati V.**, Breedveld G.J., Squitieri F, Vanacore N, Brustenghi P, Harhangi BS, et al. Localization of autosomal recessive early-onset parkinsonism to chromosome 1p36 (PARK7) in an independent dataset. *Ann Neurol.* 2002;51:253-6. [PDF](#).
- Bostantjopoulou S**, Katsarou Z, Papadimitriou A, Veletza V, Hatzigeorgiou G, Lees A. Clinical features of parkinsonian patients with the alpha-synuclein (G209A) mutation. *Mov Disord.* 2001;17:847-8. [PDF](#).

- Bower JH**, Maraganore DM, Peterson BJ, McDonnell SK, Ahlskog JE, Rocca WA. Head trauma preceding PD: a case-control study. *Neurology* 2003;60:1610-1615. [PDF](#)
- Braak H**, Del TK, Rub U, Rob A.I. de Vos b, Ernst N.H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197-211. [PDF](#)
- Braune S**. The role of cardiac metaiodobenzylguanidine uptake in the differential diagnosis of parkinsonian syndromes. *Clin Auton Res.* 2001;11:351-355. [PDF](#)
- Braune S**, Reinhardt M, Bathmann J, Krause T, Lehmann M, Lücking CH. et al. Impaired cardiac uptake of meta (123I) Metaiodobenzylguanidine in Parkinson's disease with autonomic failure. *Acta Neurol Scand.* 1998;97:307-314
- Brettschneider J**, Petzold A, Sussmuth SD, Landwehrmeyer GB, Ludolph AC, Kassubek J, et al. Neurofilament heavy-chain NfH (SMI35) in cerebrospinal fluid supports the differential diagnosis of Parkinsonian syndromes. *Mov Disord.* 2006;21:2224-2227. [PDF](#)
- Burn DJ**, Rowan EN, Allan LM, Molloy S, O'Brien JT, McKeith IG. Motor subtype and cognitive decline in Parkinson's disease, Parkinson's disease with dementia, and dementia with Lewy bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77:585-9. [PDF](#)
- Chan CS**, Gertler TS, Surmeier DJ. Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 2009;32:249-256.
- Chan LL**, Rumpel H, Yap K, Lee E, Loo HV, Ho GL et al. Case control study of diffusion tensor imaging in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:1383-1386.
- Charles P**, Camuzat A, Benammar N et al. Are interrupted SCA2 CAG repeat expansions responsible for parkinsonism? *Neurology* 2007;69:1970-1975. [PDF](#)
- Chartier-Harlin MC**, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, y cols. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004;364:1167-9. [PDF](#)
- Chaudhuri KR**, Healy DG, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 2006;5:235-45. [PDF](#)
- Chen H**, Zhang SM, Hernan MA, Schwarzschild MA, Willett WC, Colditz GA, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 2003;60:1059-1064. [PDF](#)
- Chen JF**, Xu K, Petzer JP, Staal R, Xu YH, Beilstein M, et al. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2001;21:RC14
- Chen-Plotkin AS**, Yuan W, Anderson C, McCarty Wood, Hurting HI, Clark CM, Miller BL, Lee Y, Trojanowski JQ, Grossman M, Van Deerlin VM. Corticobasal syndrome and primary progressive aphasia as manifestations of *LRRK2* gene mutations. *Neurology* 2008;70:521-527. [PDF](#)
- Choi J**, Levey AI, Weintraub ST, Rees HD, Gearing M, Chin LS, et al. Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J. Biol. Chem* 2004;279:13256-13264.
- Clark LN**, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S et al. Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology* 2007;69:1270-7. [PDF](#)
- Claveria LE**, Duarte J, Sevillano MD, Pérez-Sempere A. Cabezas C, Rodriguez F et al. Prevalence of Parkinson's disease in Cantalejo, Spain. A door-to-door survey. *Mov Disord.* 2002;17:242-9. [PDF](#).
- Courbon F**, Brefel-Courbon C, Thalamas C, Alibelli MJ, Berry I, Montastruc JL, et al. Cardiac MIBG scintigraphy is a sensitive tool for detecting cardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2003;18:890-897. [PDF](#).
- Cubo E**, Alvarez E, Morant C, de Pedro-Cuesta J, Martínez-Martín P, Génova et al. Burden of disease related to Parkinson's disease in Spain in the year 2000. *Mov Disord.* 2005;20:1481-7. [PDF](#)
- Dächsel JC**, Mata IF, Ross OA et al. Digenic parkinsonism: investigation of the synergic effects of *PRKN* and *LRRK2*. *Neurosci Lett.* 2006;410:80-84. [PDF](#)

- Davidson C.** Pallido-Pyramidal disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1954;13:50-9
- Deng H, Le W, Guo Y, Hunter CB, Xie W, Janjkkovic J.** Genetic and clinical identification of Parkinson's disease patients with *LRRK2* G2019S mutation. *Ann Neurol.* 2005;57:933-4. [PDF](#)
- De Silva SR, Hardy J, Crook J, Khan N, Graham EA, Morris CM, et al.** The tau locus is not significantly associated with pathologically confirmed sporadic Parkinson's disease. *Neurosci.Lett.* 2002;330:201-203. [PDF](#)
- Deslandes A, Moraes H, Ferreira C, Veiga H, Silveira H, Mouta R, et al.** Exercisa and mental health: many reasons to move. *Neuroepyschobilogy* 2009;59:191-8. [PDF](#)
- De Michele G, Filla A, Volpe G, De Marco V, Gogliettino A, Ambrosio G, et al.** Environmental and genetic risk factors in Parkinson's disease: a case-control study in southern Italy. *Mov Disord.* 1996;11:17-23.
- Di Fonzo A, Rohe CF, Ferreira J, Chien HF, Vacca L, Stocchi F, et al.** A frequent *LRRK2* gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* 2005;365:412-5. [PDF](#)
- Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Correia Guedes L, et al.** *FBXO7* mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology.* 2009;72:240-5. [PDF](#)
- Doty RL, Stern MB, Pfeiffer C, Gollomp SM, Hurtig HI.** Bilateral olfactory dysfunction in early stage treated and untreated idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:138-142.
- Double KL, Reyes S, Werry EL, Halliday GM.** Selective cell death in neurodegeneration: why are some neurons spared in vulnerable regions?. *Prog Neurobiol.* 2010 Nov;92(3):316-29.
- Dubois B, Burn D, Goetz C, et al.** Diagnostic procedures for Parkinson's disease dementia: recommendations from the movement disorder society task force. *Mov Disord* 2007; 22: 2314-2324. [PDF](#)
- Dusonchet J, Kochubey O, Stafa K, Young SM Jr., Zufferey R, Moore DJ, et al.** A rat model of progressive nigral neurodegeneration induced by the Parkinson's disease-associated G2019S mutation in *LRRK2*. *J Neurosci.* 2011;31:907-12.
- Edwards YH, Fox MF, Hinks LJ, Thompson RJ, Day IN.** The gene for human neurone specific ubiquitin C-terminal hydrolase (*UCHL1*, *PGP9.5*) maps to chromosome 4p14. *Am Hum Genet.* 1991;55(Pt 4): 273-8
- El-Agnaf, O.M., Walsh, D.M., Allsop, D.** Soluble oligomers for the diagnosis of neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol.* 2003;2:461-462. [PDF](#)
- Elbaz A, Grigoletto F, Baldereschi M, Breteler MM, Manubens-Bertran JM, Lopez-Pousa S, et al.** Familial aggregation of Parkinson's disease: a population-based case-control study in Europe. *EUROPARKINSON Study Group. Neurology.* 1999;10;52:1876-82.
- Emre M, Aarsland D, Brown R, et al.** Clinical Diagnostic Criteria for Dementia Associated with Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2007; 22(12):1689-1707. [PDF](#)
- Emre M.** Treatment of dementia associated with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2007;13 Suppl 3:S457-61. [PDF](#)
- Evans DG, Shenton A, Woodward E, Laloo F, Howell A, Maher ER, et al.** Penetrance estimates for *BRCA1* and *BRCA2* based on genetic testing in a Clinical Cancer Genetics service setting: risks of breast/ovarian cancer quoted should reflect the cancer burden in the family. *BMC.Cancer* 2008;8:155. [PDF](#)
- Farrer MJ.** Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet.* 2006;7:306-318.
- Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang DS, Hulihan M, et al.** Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol.* 2004;55:174-9. [PDF](#)
- Fearnley JM, Lees AJ.** Ageing and Parkinson's disease: SN regional selectivity. *Brain.*1991;114:2283-2301.
- Ferreira JJ, Guedes LC, Rosa MM, Coelho M, van Doeselaar M, Schweiger D, et al.** High prevalence of *LRRK2* mutations in familial and sporadic Parkinson's disease in Portugal. *Mov Disord.* 2007;22:1194-201. [PDF](#)
- Fleming L, Mann JB, Bean J, Briggie T, Sánchez-Ramos JR.** Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides. *Ann Neurol.* 1994;36:100-103.

- Frias CM de**, Dixon RA, Fisher N, Camicioli R. Intraindividual variability in neurocognitive speed: a comparison of Parkinson's disease and normal older adults. *Neuropsychologia*. 2007;45:2499-507.
- Funayama M**, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F, et al. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann.Neurol*. 2002;51:296-301. [PDF](#).
- Funayama M**, Hasegawa K, Ohta E, Kawashima N, Komiyama M, Kowa H, et al. An *LRRK2* mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. *Ann Neurol*. 2005;57:918–21. [PDF](#)
- Gaenslen A**, Unmuth B, Godau J, Liepelt I, Di Santo A, Schweitzer KJ, et al. The specificity and sensitivity of transcranial ultrasound in the differential diagnosis of Parkinson's disease: a prospective blinded study. *Lancet Neurol*. 2008;7:417-24. [PDF](#)
- Gaig C**, Ezquerro M, Martí MJ, Muñoz E, Valldeoriola F, Tolosa E. *LRRK2* mutations in Spanish patients with Parkinson disease: frequency, clinical features, and incomplete penetrance. *Arch Neurol*. 2006;63:377-82. [PDF](#)
- Gaig C**, Martí MJ, Ezquerro M, Rey MJ, Cardozo A, Tolosa E. G2019S *LRRK2* Mutation causing Parkinson's disease without Lewy bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:626-628. [PDF](#)
- Gan-Or Z**, Giladi N, Rozovski U et al. Genotype-phenotype correlations between *GBA* mutations and Parkinson's disease risk and onset. *Neurology* 2008;70:2277-2283. [PDF](#)
- Gao X**, Chen H, Fung TT, Logroscino G, Scharzschild MA, HU FB, et al. Prospective study of dietary pattern and risk of Parkinson's disease. *Am J Clin Nutr*. 2007;86;1486-94. [PDF](#)
- Gao X**, Chen H, Choi HK, Curham G, Scharzschild MA, Ascherio A. Diet, urate, and Parkinson's disease risk in men. *Am J Epidemiol*. 2008;167:831-8. [PDF](#)
- Gao X**, Martín ER, Liu Y, Mayhew G, Vance JM, Scott WK. Genome-wide linkage screen in familial Parkinson disease identifies loci on chromosomes 3 and 18. *Am J Hum Genet*. 2009;84:499-504. [PDF](#)
- Gao L**, Gómez-Garre P, Díaz-Corrales FJ, Carrillo F, Carballo M, Palomino A, et al. Prevalence and clinical features of *LRRK2* mutations in patients with Parkinson's disease in southern Spain. *Eur J Neurol*. 2009;16:957-60. [PDF](#)
- Gasser T**. Genetics of Parkinson's disease. *Clin Genet*. 1998; 54(4): 259-65.
- Gasser T**, Muller, Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, et al. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nature Genetics* 1998;18:262-265. [PDF](#)
- Gasser T**. Genetics of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*. 2005;18:363-369, 2005
- Gelb DJ**, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol*. 1999;56:33-9.
- George JM**. The synucleins. *Genome Biol* 2002;3: Rewiev3002.
- Giasson BI**, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, et al. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 2000;290:985–989. [PDF](#)
- Giasson BI**, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, et al. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 2000;290:985–989. **Giordana MT**, D'Agostino C, Albani G, Mauro A, Di Fonzo A, Antonini A, et al. Neuropathology of Parkinson's disease associated with the *LRRK2* Ile1371Val mutation. *Mov Disord*. 2007;22: 275-278. [PDF](#)
- Giasson BI**, Covy JP, Bonini NM, Hurtig HI, Farrer MJ, Trojanowski JQ, et al. Biochemical and pathological characterization of *LRRK2*. *Ann Neurol*. 2006;59:315–22. [PDF](#)
- Gibb WK**, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of the idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51:745-752
- Gilks WP**, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, Jain S, Singleton A, Lees AJ, et al. A common *LRRK2* mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 2005;365:415-6. [PDF](#)
- Giordana MT**, D'Agostino C, Albani G, Mauro A, Di Fonzo A, Antonini A, et al. Neuropathology of Parkinson's disease associated with the *LRRK2* Ile1371Val mutation. *Mov Disord*. 2007;22: 275-278. [PDF](#)

- Godau J**, Herfurth M, Kattner B, Gasser T, Berg D. Increased serum insulin-like growth factor 1 in early idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:536-538. [PDF](#)
- Goetz CG**, Chmura TA, Lanska DJ. The history of Parkinson's disease. Part 2 of the MSD-sponsored History of Movement Disorders exhibit, Barcelona, June 2000. *Mov Disord.* 2001;16:156-61. [PDF](#)
- Golbe LI**, Di Iorio G, Bonavita V, Miller DC, Duvoisin RC. A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1990;27:276-82
- Goldstein DS**, Holmes CS, Dendi R, Bruce SR, Li ST. Orthostatic hypotension from sympathetic denervation in Parkinson's disease. *Neurology* 2002;58:1247-1255. [PDF](#)
- Goldwurm S**, Zini M, Mariani L, Tesei S, Miceli R, Sironi F, et al. Evaluation of *LRRK2* G2019S penetrance: relevance for genetic counseling in Parkinson disease. *Neurology* 2007;68:1141-1143. [PDF](#)
- Golub Y**, Berg D, Calne DB, et al. Genetic factors influencing age at onset in *LRRK2*-linked Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009;15:539-541. [PDF](#)
- Gómez-Esteban JC**, Lezcano E, Zarranz JJ, González C, Bilbao G, Lambarri I, Rodríguez O, Garibe J. Outcome of bilateral deep brain subthalamic stimulation in patients carrying the R1441G mutation in the *LRRK2* dardarin gene. *Neurosurgery* 2008;62:857-863. [PDF](#)
- Gonera EG**, Van't Hof M, Berger HJC, van Weel C, Horstink MW, et al. Symptoms and duration of the premotor phase in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1997;12:871-6. [PDF](#)
- González-Fernández MC**, Lezcano E, Ross OA, Gómez-Esteban JC, Gomez-Busto F, Velasco F. *LRRK2*-associated parkinsonism is a major cause of disease in Northern Spain. *Parkinsonism Relat Disord.* 2007;13:509-15. [PDF](#)
- Gorostidi A**, Ruiz-Martínez J, López de Munain A, Alzualde A, and Martí Massó JF. *LRRK2* G2019S and R1441G mutations associated with Parkinson's disease are common in the Basque Country, but relative prevalence is determined by ethnicity. *Neurogenetics.* 2009;10:157-159. [PDF](#)
- Gowers W**. A manual of the diseases of the nervous system. Philadelphia, Blakiston's Son & Co. 1900
- Guevara CA**, Blain CR, Stahl D, Lythgoe DJ, Leigh PN, Parker GJ. Quantitative magnetic resonance spectroscopic imaging in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy. *Eur J Neurol.* 2010;17:1193-1202. [PDF](#)
- Gupta D**, Saini J, Kesavadas C, Sarma PS, Kishore A, Utility of susceptibility-weighted MRI in differentiating Parkinson's disease and atypical parkinsonism. *Neuroradiology* 2010 Apr 1.
- Guttman M**, Burkholder J, Kish SJ, Hussey D, Wilson A, DaSilva, et al. [¹¹C]RTI-32 PET studies of the dopamine transporter in early dopa-naïve Parkinson's disease: implications for the symptomatic threshold. *Neurology.* 1997;48:1578-83. [PDF](#)
- Haehner A**, Hummel T, Hummel C, Sommer U, Junghanns S, Reichmann H, et al. Olfactory loss may be a sign of idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2007;22:839-42. [PDF](#)
- Haensch CA**, Lerch H, Jörg J, Idermann S. Cardiac denervation occurs independent of orthostatic hypotension and impaired heart rate variability in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related disorders.* 2009;15:134-7. [PDF](#)
- Hagenah JM**, Becker B, Bruggemann N, Djarmati A, Lohmann K, Sprenger A, et al. Transcranial sonography findings in a large family with homozygous and heterozygous PINK1 mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79:1071-1074. [PDF](#)
- Hagenah JM**, König I R, Becker B, Hilker R, Kasten M, Hedrich K, et al. Substantia nigra hyperechogenicity correlates with clinical status and number of Parkin mutated alleles. *J Neurol.* 2007;254:1407-1413. [PDF](#)
- Hagenah JM**, König I, Sperner J, Wessel L, Seidel G, Condefer K, et al. Life-long increase of substantia nigra hyperechogenicity in transcranial sonography. *Neuroimage* 2010;51:28-32. [PDF](#)
- Hague S**, Rogaeva, Sperner J, Wessel L, Seidel G, Condefer K, et al. Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation. *Ann Neurol.* 2003;54:271-4. [PDF](#)

- Hampshire DJ**, Roberts E, Crow Y, Bond J, Mubaidin A, Wriekat AL, et al. Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36. *J Med Genet.* 2001;38:680-2. [PDF](#)
- Harhangi BS**, Farrer MJ, Lincoln S, Bonifati V, Meco G, De Michele G, et al. The Ile93Met mutation in the ubiquitin carboxy-terminal-hydrolase-L1 gene is not observed in European cases with familial Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 1999;270:1-4. [PDF](#)
- Hasegawa K**, Funayama M, Matsuura N, Furusawa H, Sakai F, Kowa H, et al. Analysis of alpha-synuclein, parkin, tau, and UCH-L1 in a Japanese family with autosomal dominant parkinsonism. *Eur Neurol.* 2001;46: 20-4.
- Hasegawa K**, Kowa H. Autosomal dominant familial Parkinson disease: older onset of age, and good response to levodopa therapy. *Eur Neurol.* 1997;38 (Suppl 1):39-43.
- Healy DG**, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, et al. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of *LRRK2*-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol.* 2008;7:583-90. [PDF](#)
- Hering R**, Strauss K. M, Tao X, Bauer A, Voitalla D, Mietz EM, et al. Novel homozygous p.E64D mutation in DJ1 in early onset Parkinson disease (PARK7). *Hum Mutat* 2004;24:321-9. [PDF](#)
- Hernan MA**, Takkouche B, Caamano-Isorna F, Gestal-Otero JJ. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2002;52:276-284. [PDF](#)
- Hernández Vara J**, Rubiera del Fueyo M, Lorenzo Bosquet C, Castell Conesa J, Molina Cateriano CA, et al. Usefulness of transcranial sonography in Parkinson's disease. A comparative study using 123I-FP-CIT SPECT. *Med Clin (Barc).* 2008 13;131:285-9. [PDF](#).
- Hedrich K**, Winkler S, Hagenah J, Kabacki K, Kasten M, Schwinger E, et al. Recurrent *LRRK2* (PARK8) mutations in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2006;21:1506-1510. [PDF](#)
- Hernández D**, Paisán-Ruiz C, McLernerney-Leo O et al. Clinical and positron emission tomography of Parkinson's disease caused by *LRRK2*. *Ann Neurol.* 2005;57:453-6. [PDF](#)
- Hicks AA**, Pétursson H, Jónsson T, Stefánsson H, Jóhannsdóttir HS, Sainz J. A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2002;52:549-55. [PDF](#).
- Hirsch EC**, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 2009;8:382-397. [PDF](#)
- Hoehn MM**, y Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967; 17:427-42.
- Horowitz G**, Greenberg J. Pallido-pyramidal syndrome treated with levodopa. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1975;38:238-40
- Hu G**, Bidel S, Jousilahti P, Antikainen R, Tuomilehto J. Coffee and tea consumption and the risk of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2007;22:2242-2248. [PDF](#)
- Hu FY**, Xi J, Guo J, Yu LH, Liu L, He XH et al. Association of the glucocerebrosidase N370S allele with Parkinson's disease in two separate Chinese Han populations of mainland China. *Eur J Neurol.* 2010;17:1476-8. [PDF](#)
- Hughes AJ**, Daniel S, Kilford L, Lees AJ., et al. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases [see comments]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:181-4. [PDF](#)
- Hughes AJ**, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, Lees A.J. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* 2002;125:861-870. [PDF](#)
- Hulihan MM**, Ishihara-Paul L, Kachergus J, Warren L, Amouri R, Elango R, et al. *LRRK2* Gly2019Ser penetrance in Arab-Berber patients from Tunisia: a case-control genetic study. *Lancet Neurol.* 2008;7:591-4. [PDF](#)
- Ibanez P**, Bonnet AM, y cols. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004;364:1169-71. [PDF](#)
- Iijima M**, Osawa M, Momose M, Kobayakawa T, Saito S, Iwata M, et al. Cardiac sympathetic degeneration correlates with olfactory function in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2010;;25:1143-9. [PDF](#)

- Infante J**, Rodríguez E, Combarros O, Mateo I, Fontalba A, Pascual J et al. *LRRK2* G2019S is a common mutation in Spanish patients with late-onset Parkinson's disease. *Neurosci.Lett.* 2006;395:224-226. [PDF](#)
- Iranzo A**, Molinuevo JL, Santamaria J, Serradell M, Martí MJ, Valldeoriola F, et al. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study. *Lancet Neurol.* 2006;5:572-7. [PDF](#)
- Ishibashi K**, Saito Y, Murayama S, Kanemaru K, Oda K, Ishiwata K, et al. Validation of cardiac (123)I-MIBG scintigraphy in patients with Parkinson's disease who were diagnosed with dopamine PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:3-11. [PDF](#)
- Ishikawa A** y Tsuji S. Clinical analysis of 17 patients in 12 Japanese families with autosomal-recessive type juvenile parkinsonism. *Neurology* 1996;47:160-6. [PDF](#)
- Iwanaga K**, Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tomita I, Satoh H, Takashima H, et al. Lewy body-type degeneration in cardiac plexus in Parkinson's and incidental Lewy body diseases. *Neurology* 1999;52:1269-1271.
- Iwanami M**, Miyamoto T, Miyamoto M, Hirata K, Takada E. Relevance of substantia nigra hyperechogenicity and reduced odor identification in idiopathic REM sleep behavior disorders. *Sleep Medicine* 2010;11:361-365. [PDF](#)
- Iwai A.**, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, et al. The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 1995;14:467-75.
- Jones JM**, Albin RL, Feldman EL, Simin K, Schuster TG, Dunnick WA, et al. *mnd2*: a new mouse model of inherited motor neuron disease. *Genomics.* 1993;16:669-77.
- Jones JM**, Datta P, Srinivasula SM, Ji W, Gupta S, Zhang Z, et al. Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of *mnd2* mutant mice. *Nature.* 2003;425:721-7.
- Kachergus J**, Mata IF, Hulihan M, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, et al. Identification of a novel *LRRK2* mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *Am J Hum Genet.* 2005;76:672-680. [PDF](#)
- Kajimoto Y**, Miwa H, Okawa-Izawa M, Hironishi M, Kondo T. Transcranial sonography of the substantia nigra and MIBG myocardial scintigraphy: complementary role in the diagnosis of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009;15:270-272. [PDF](#)
- Karamohamed S**, DeStefano AL, Wilk JB, Shoemaker CM, Golbe LI, Mark MH, et al. A haplotype at the *PARK3* locus influences onset age for Parkinson's disease: the GenePD study. *Neurology.* 2003;61:1557-61. [PDF](#)
- Katzenschlager R**, Lees AJ. Olfaction and Parkinson's syndromes: its role in differential diagnosis. *Curr Opin Neurol.* 2004;17:417-423. [PDF](#)
- Keränen T**, Kaakkola S, Sotaniemi K, Laulumaa V, Haapaniemi T, Jolma T et al. Economic burden and quality of life impairment increase with severity of PD. *Parkinsonism Relat Disord.* 2003;9:163-8. [PDF](#)
- Khan NL**, Jain S, Lynch JM, Pavese N, Abou-Sleiman P, Holton JL, et al. Mutations in the gene *LRRK2* encoding dardarin (*PARK8*) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data. *Brain* 2005;128:2786-2796. [PDF](#)
- Khan NL**, Graham E, Critchley P, Schrag AE, Wood NW, Lees AJ, et al. Parkin disease: a phenotypic study of a large case series. *Brain* 2003;126:1279-92. [PDF](#)
- Kim JS**, Lee PH, Lee KS, Park JW, Kim YI, Chung YA et al. Cardiac (123I) metaiodobenzylguanidine scintigraphy for vascular parkinsonism. *Mov Disord.* 2006;21:1990-1994. [PDF](#)
- Kitada, T.**, Asakawa, S Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998;392:605-8.
- Klein C**, Lohmann-Hedrich K. Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 2007;20:453-464. [PDF](#)
- Kobe B** y Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol.* 2001;11:725-32.

- Kruger R**, Kuhn W, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* 1998;18:106-8.
- Kupsch A**, Sautter J, Schwarz J, Riederer P, Gerlach M, Oertel WH. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in non-human primates is antagonized by pretreatment with nimodipine at the nigral, but not at the striatal level. *Brain Research* 1996;741:185-196.
- Latourelle JC**, Sun M, Lew MF, Suchowersky O, Klein C, Golbe LI, et al. The Gly2019Ser mutation in *LRRK2* is not fully penetrant in familial Parkinson's disease: the GenePD study. *BMC.Med.* 2008;6:32. [PDF](#)
- Langston JW**, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983;219: 979-80.
- Lautier C**, Goldwurm S, Dürr A, Giovannone B, Tsiras WG, Pezzoli G. Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2008;82:822-33. [PDF](#)
- Lazzarini A.** M, Myers R. H, Zimmerman T. R Jr, Mark M. H, Golbe L. I, Sage J. I. et al. A clinical genetic study of Parkinson's disease: evidence for dominant transmission. *Neurology* 1994;44:499-506.
- Lee P**, Kim JW, Bang OY, Joo IS, Yoon SN, Huh K. Cardiac 123I-MIBG scintigraphy in patients with essential tremor. *Mov Disord.* 2006a;21:1235-1238. [PDF](#)
- Lee PH**, Kim JS, Shim DH, Yoon SN, Huh K. Cardiac 123I-MIBG scintigraphy in patients with drug induced parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psych.* 2006b;77:372-374. [PDF](#)
- Lees AJ**, Hardy J, Resevev T. Parkinson's disease. *Lancet* 2009;373:2055-66. [PDF](#)
- Leroy E**, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998;395:451-2.
- Lesage S**, Ibanez P, Lohmann E, Pollak P, Tison F, Tazir M, et al. G2019S *LRRK2* mutation in French and North African families with Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2005;58:784-7. [PDF](#)
- Lesage S**, Brice A.. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet.* 2009 April 15, 2009;18(R1):R48-59. [PDF](#)
- Li SC**, Schoenberg BS, Wang CC, Cheng XM, Rui DY, Bolis CL, et al. A prevalence survey of Parkinson's disease and other movement disorders in the People's Republic of China. *Arch Neurol.* 1985;42:655-7.
- Li YJ**, Scott WK, Hedges DJ, Zhang F, Gaskell PC, Nance MA. Age at onset in two common neurodegenerative diseases is genetically controlled. *Am J Hum Genet.* 2002;70:985-93. [PDF](#)
- Liang JC**, Chen HR, Chiu CC, Liou SF, Chen IJ, Yeh JL. Protective effect of labedipinedilol-A, a novel dihydropyridine-type calcium channel blocker, on myocardial apoptosis in ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 2006;79:1248-1256
- Lin MT**, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006;443:787-795. [PDF](#)
- Lincoln S**, Vaughan J, Wood N, Baker M, Adamson J, Gwinn-Hardy K, et al. Low frequency of pathogenic mutations in the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase gene in familial Parkinson's disease. *Neuroreport* 1999;10:427-9.
- Litvan I**, Agid Y, Calne D, Campbell G, Dubois B, Duvoisin RC, et al. Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): Report of the NINDS-SPSP International Workshop. *Neurology* 1996;47:1-9. [PDF](#)
- Liu Y**, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT Jr, et al. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 2002;111:209-18. [PDF](#)
- Ludolph C**, J. Kassubek J, Landwehrmeyer BG, Mandelkow E, Mandelkow EM, Burn DJ, et al. Tauopathies with parkinsonism: clinical spectrum, neuropathologic basis, biological markers, and treatment options. *Eur J Neurol.* 2009;16:297-309. [PDF](#)
- Maita C**, Tsuji S, Yabe I, Hamada S, Ogata A, Maita H, et al. Secretion of DJ-1 into the serum of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 2008;431:86-9. [PDF](#)

- Manning-Bog AB**, McCormack AL, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA, et al. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 2002;277:1641-4. [PDF](#)
- Marek K**, Innis R, van Dyck C, et al. [123I]B-CIT SPECT imaging assessment of the rate of Parkinson's disease progression. *Neurology* 2001;57:2089 -2094. [PDF](#)
- Maraganore DM**, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin MC, Gasser T, Krüger R, et al. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann.Neurol.* 2004;55:512-521. [PDF](#)
- Maraganore DM**, Farrer MJ, Hardy JA, Lincoln SJ, McDonnell SK, Rocca WA., et al. Case-control study of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease. *Neurology* 1999;53:1858-60.
- Marder K**, Levy G, Louis ED, Mejia-Santana H, Cote L, Andrews H, et al. Accuracy of family history data on Parkinson's disease. *Neurology* 2003;61:18-23. [PDF](#)
- Markopoulou K**, Larsen KW, Wszolek EK, Denson MA, Lang AE, Pfeiffer RF et al. Olfactory dysfunction in familial parkinsonism. *Neurology* 1997;49:1262-1267. [PDF](#)
- Marques SC**, Oliveira CR, Pereira CM, Outeiro TF. Epigenetics in neurodegeneration: A new layer of complexity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011 Mar; 35(2): 348-55.
- Marras C**, Klein C, Lang AE, et al. *LRRK2* and Parkin mutations in a family with parkinsonism-Lack of henotype-phenotype corelation. *Neurobiol Aging* 2010;31:721-722. [PDF](#)
- Mata IF**, Ross OA, Kachergus J, Huerta C, Ribacoba R, Moris G, et al. *LRRK2* mutations are a common cause of Parkinson's disease in Spain. *Eur J Neurol.* 2006;13:391-4. [PDF](#)
- Mata IF**, Taylor JP, Kachergus J, Hulihan M, Huerta C, Lahoz C et al. *LRRK2* R1441G in Spanish patients with Parkinson's disease. *Neurosci.Lett.* 2005;382:309-311. [PDF](#)
- Mata IF**, Hutter CM, González-Fernández MC, de Pancorbo MM, Lezcano E, Huerta C, et al. *LRRK2* R1441G-related Parkinson's disease: evidence of a common founding event in the seventh century in Northern Spain. *Neurogenetics.* 2009;10:347-53. [PDF](#)
- Mata IF**, Lockhart PJ, Farrer MJ. Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2004;1:127-33. [PDF](#)
- Marder K**, Levy G, Louis ED, Mejia-Santana H, Cote L, Andrews H et al. Familial aggregation of early- and late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;54:507-513. [PDF](#)
- Marder K**, Tang MX, Mejia H, Alfaro B, Cote L, Louis E, et al. Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: A community-based study. *Neurology* 1996;47:155-160.
- Martí-Massó JF**, Ruiz-Martínez J, Bolano MJ, Ruiz I, Gorostidi A, Moreno F et al. Neuropathology of Parkinson's disease with the R1441G mutation in *LRRK2*. *Mov Disord.* 2009;24:1998-2001. [PDF](#)
- Martí-Massó JF**, Poza JJ. Cinnarizine-induced parkinsonism: ten years later. *Mov Disord.* 1998 May;13(3):453-6. [PDF](#)
- Matsumine H**, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, Tanaka H, Ishikawa A, Nakagawa-Hattori et al. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet.* 1997;60:588-96. [PDF](#)
- Marttila RJ**, Kaprio J, Koskenvuo M, and Rinne UK. Parkinson's disease in a nationwide twin cohort. *Neurology* 1988;38:1217-1219.
- Mattson MP**. Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann Intern Med.* 2003;129:441-4. [PDF](#)
- Mattson MP**, Duan W, Wan R, Guo Z. Prophylactic activation of neuroprotective stress response pathways by dietary and behavioural manipulations. *NeuronRx* 2004;1:111-6 [PDF](#)
- Mellick GD**, Gartner CE, Silburn PA, Battistutta D. Passive smoking and Parkinson disease. *Neurology* 2006;67:179-180. [PDF](#)
- Michell AW**, Lewis SJ, Foltynie T, Barker RA. Biomarkers and Parkinson's disease. *Brain* 2004;127:1693–1705. [PDF](#)

- Minnati L**, Grisoli M, Carella F, De Simone T, Bruzzone MG, Savoiaro M. Imaging degeneration of the substantia nigra in Parkinson's disease with inversion-recovery MR imaging. *Am J Neuroradiol*. 2007;28:309-313. [PDF](#)
- Mínguez-Castellanos A**, Chamorro CE, Escamilla-Sevilla F, Ortega-Moreno A, Rebollo AC, Gomez-Rio, et al. Do alpha-synuclein aggregates in autonomic plexuses predate Lewy body disorders?: a cohort study. *Neurology*. 2007;68:2012-8. [PDF](#)
- Mitsumoto A y Nakagawa Y**. DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res*. 2001;35:885-93.
- Miyake Y**, Sasaki S, Tanaka K, Fukushima W, Kiyohara C, Tsuboi Y, et al. Dietary fat intake and risk of parkinson's disease: a case-control study in Japan. *J. Neurol Sci*. 2010;288:117-22. [PDF](#)
- Mogi M**, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M. et al. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett*. 1994;180:147-150. [PDF](#)
- Mollenhauer B**, Bibl M, Esselmann H, Steinacker P, Trenkwalder C, Wiltfang J, et al. Tauopathies and synucleinopathies: do cerebrospinal fluid beta-amyloid peptides reflect disease-specific pathogenesis? *Journal of Neural Transmission* 2007;114:919-927. [PDF](#)
- Moller JC**, Rissling I, Mylius V, Hoft C, Eggert KM, Oertel WH. The prevalence of the G2019S and R1441C/G/H mutations in *LRRK2* in German patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2008;15:743-5. [PDF](#)
- Momose Y**, Murata M, Kobayashi K, Tachikawa M, Nakabayashi Y, Kanazawa I., et al. Association studies of multiple candidate genes for Parkinson's disease using single nucleotide polymorphisms. *Ann Neurol*. 2002;51:133-6. [PDF](#)
- Morán JM**, Castellanos-Pinedo F, Casado-Naranjo I, Durán-Herrera C, Ramírez-Moreno JM, et al. Genetic screening for the *LRRK2*, G2019S and R1441 codon mutations in Parkinson's disease patients from Extremadura, Spain. *Rev Neurol*. 2010;50:591-4. [PDF](#)
- Morens DM**, Grandinetti A, Reed D, White LR, Ross GW. Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue?. *Neurology* 1995;45: 1041-51.
- Mori H**, Kondo T, Yokochi M, Matsumine H, Nakagawa-Hattori Y, Miyake T, et al. Pathological and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* 1998;51:890-2. [PDF](#)
- Morrish PK**, Rakshi JS, Bailey DL, Sawle GV, Brooks DJ. Measuring the rate of progression and estimating the preclinical period of Parkinson's disease with [¹⁸F]dopa PET. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.1998;64:314-319. [PDF](#)
- Morris CM**, O'Brien K, Gibson AM, Hardy JA, Singleton AB. Polymorphism in the human DJ-1 gene is not associated with sporadic dementia with Lewy bodies or Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2003;352:151-3. [PDF](#)
- Nagayama H**, Hamamoto M, Ueda M, Nagashima J, Katayama Y. Reliability of MIBG myocardial scintigraphy in the diagnosis of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:249-251. [PDF](#)
- Najim al-Din AS**, Wriekat A, Mubaidin A, Dasouki M, Hiari M. Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome. *Acta Neurol Scand*. 1994;89:347-52.
- Nicoletti G**, Lodi R, Condino F, Tonon C, Fera F, Malcelli E, et al. Apparent diffusion coefficient measurements of the middle cerebellar peduncle differentiate and progressive supranuclear palsy. *Brain* 2006;129:2679-268. [PDF](#)
- Nichols WC**, Pankratz N, Marek DK, Pauciuolo MW, Elsaesser VE, Halter CA, et al. Mutations in *GBA* are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology* 2009 January 27, 2009;72:310-6. [PDF](#)
- Nichols WC**, Pankratz N, Hernandez D, Paisán-Ruiz C, Jain S, Halter CA, et al. Genetic screening for a single common *LRRK2* mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet* 2005;365:410-2. [PDF](#)
- Nishioka K**, Vilariño-Güell C, Cobb SA, Kachergus JM, Ross OA, Wider C, et al. Glucocerebrosidase mutations

- are not a common risk factor for Parkinson disease in North Africa. *Neurosci Lett.* 2009;477:57-60. [PDF](#)
- Ohrfelt A**, Grognet P, Andreassen N, Wallin A, Vanmechelen E, Blennow K et al. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein in neurodegenerative disorders—a marker of synapse loss? *Neurosci Lett.* 2009;450:332–335. [PDF](#)
- Oka H**, Yoshioka M, Onouchi K, Morita M, Mochio S, Suzuki M et al. Impaired cardiovascular autonomic function in Parkinson’s disease with visual hallucinations. *Mov Disord.* 2007;22:1510-1514. [PDF](#)
- Olanow CW**, Stern MB, Sethi K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. *Neurology* 2009;72:S1-136. [PDF](#)
- Orimo S**, Ozawa E, Nakade S, Sugimoto T, Mizusawa H. (123)I-metaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy in Parkinson’s disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;67:189-94. [PDF](#)
- Orr-Urtreger A**, Shifrin C, Rozovski U, Rosner S, Bercovich D, Gurevich T, et al. The *LRRK2* G2019S mutation in Ashkenazi Jews with Parkinson disease: is there a gender effect? *Neurology* 2007;69:1595-602. [PDF](#)
- Ostremova N**, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J et al. a-synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *Journal of Neuroscience* 1999;19:5782-5791. [PDF](#)
- Ozelius LJ**, Senthil G, Saunders-Pullman R, Ohmann E, Deligtisch A, Tagliati M, et al. *LRRK2* G2019S as a cause of Parkinson’s disease in Ashkenazi Jews. *N.Engl.J.Med.* 2006;354:424-425. [PDF](#)
- Paisán-Ruiz C**, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, van der Brug M, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson’s disease. *Neuron* 2004;44:595-6. [PDF](#)
- Paisán-Ruiz C**, Sáenz A, López de Munain A, et al. Familial Parkinson’s disease : clinical and genetic analysis of four Basque families. *Ann Neurol.* 2005;57:365-372. [PDF](#).
- Paisán-Ruiz C**, Bhatia KP, Li A, Hernandez D, Davis M, Wood NW, et al, Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* 2009;65:19 –23. [PDF](#)
- Pankratz N**, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, et al. Parkinson Study Group. Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations. *Am J Hum Genet.* 2002;71:124-35. [PDF](#)
- Papapetropoulos S**, Adi N, Shehadeh L, Bishopric N, Singer C, Argyriou AA, Chroni E. Is the G2019S *LRRK2* mutation common in all southern European populations?. 2008. *J Clin Neurosci.* 2008;15:1027-30. [PDF](#)
- Pérez-Pastene C**, Cobb SA, Díaz-Grez F, et al. *LRRK2* mutations in South America: A study of Chilean Parkinson’s disease. *Neurosci Lett.* 2007;422:193-7. [PDF](#)
- Piccini P**, Burn D. J, Ceravolo R, Maraganore D, and Brooks D. J. The role of inheritance in sporadic Parkinson’s disease: evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins. *Ann Neurol.* 1999;45:577-582. [PDF](#)
- Piccini P**, Morrish P. K, Turjanski N, Sawle G. V, Burn D. J, et al. Dopaminergic function in familial Parkinson’s disease: a clinical and 18F-dopa positron emission tomography study. *Ann Neurol.* 1997;41:222-229. [PDF](#)
- Polymeropoulos MH**, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, et al. Mapping of a gene for Parkinson’s disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 1996;274:1197-1199.
- Polymeropoulos MH**, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson’s disease. *Science* 1997;276:2045-2047.
- Ponsen MM**, Stoffers D, Booij J, et al. Idiopathic Hyposmia as a premotoral sign of Parkinson’s Disease. *Ann Neurol.* 2004; 56: 173-81. [PDF](#)
- Poskander DC**, y Schwab RS. Cohort analysis of Parkinson’s disease: evidence for a single etiology related to subclinical infection about 1920. *Journal of Chronic Disorders* 1963;16: 961-73.
- Powers KM**, Smith-Weller T, Franklím GM, Longstreth WT Jr, Checkoway H. Dietary fats, cholesterol and iron as risk factors for Parkinson’s disease. *Parkinsonism relat Disord.* 2009;1:47-52. [PDF](#)

- Priyadarshi A**, Khuder SA, Schaub EA, Shrivastava S. A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology* 2000;21:435-440.
- Quattrone A**, Bagnato A, Annesi G et al. Myocardial ¹²³metaiodobenzylguanidine uptake in genetic Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2008;23:21-27. [PDF](#)
- Quik M**, O'Leary K, Tanner CM. Nicotine and Parkinson's disease: implications for therapy. *Mov Disord.* 2008;23:1641-1652. [PDF](#)
- Rajput A**, Dickson DW, Robinson CA, et al. *LRRK2* G2019S, and tau neuropathology. *Neurology* 2006;67:1506–8. [PDF](#)
- Ramirez A**, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, et al Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in *ATP13A2*, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet.* 2006;38:1184-91. [PDF](#)
- R Development Core Team 2007.** R. A language and environment for statistical computing. 2010. R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Ref Type: Generic
- Ridley AJ.** Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 2001;11:471-7.
- de Rijk MC**, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, et al. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 2000;54(11 Suppl 5):S21-3.
- Ribeiro MJ**, Vidaihet M, Loc'h C, Dupel C, Nguyen JP, Ponchant M et al. Dopaminergic function and dopamine transporter binding assessed with positron emission tomography in Parkinson's disease. *Arch Neurol.* 2002;59:580-586. [PDF](#)
- Rizzu P**, Hinkle DA, Zhukareva V, Bonifati V, Severijnen LA, Martínez D, y cols. DJ-1 colocalizes with tau inclusions: a link between parkinsonism and dementia. *Ann Neurol.* 2004 ;55:113-8. [PDF](#)
- Rodnitzky RL.** Can calcium antagonists provide a neuroprotective effect in Parkinson's disease? *Drugs* 1999;57:845-849.
- Rodriguez-Oroz MC**, Lage PM, Sánchez-Mut J, Lamet I, Pagonabarraga J, Toledo JB, et al. Homocysteine and cognitive impairment in Parkinson's disease: a biochemical, neuroimaging, and genetic study. *Mov Disord.* 2009 Jul 30;24(10):1437-44 [PDF](#)
- Ross GW**, Abbott RD, Petrovitch H, Morens DM, Grandinetti A, Tung KH, y cols. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *Jama* 2000; 283: 2674-9. [PDF](#)
- Ross GW**, Petrovitch H, Abbott RD, Tanner CM, Popper J, Masaki K, Launer L, et al. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2008;63:167-173. [PDF](#)
- Ross OA**, Toft M, Whittle AJ, et al. *LRRK2* and Lewy body disease. *Ann Neurol.* 2006;59:388–93. [PDF](#)
- Ruiz-Martínez J**, Gorostidi A, Ibañez B, Alzualde A, Otaegui D, Moreno F, et al. Penetrance in Parkinson's disease related to the *LRRK2* R1441G mutation in the Basque Country (Spain). *Mov Disord.* 2010;25:2340–5. [PDF](#)
- Ruiz-Martínez J**, Gorostidi A, Goyenechea E, Alzualde A, Poza JJ, Rodriguez F, et al. Olfactory deficits and Cardiac ¹²³I-MIBG, in Parkinson's disease related to the *LRRK2* R1441G and G2019S mutations. *Mov Disord.* 2011 May 24. [PDF](#).
- Ruprecht-Dörfler P**, Berg D, Tucha O, Benz P, Meier-Meitingner M, Alders GL, et al. Echogenicity of the substantia nigra in relatives of patients with sporadic Parkinson's disease. *Neuroimage.* 2003;18:416–422. [PDF](#)
- Saaksjarvi K**, Knekt P, Rissanen H, Laaksonen MA, Reunanen A, Mannisto S. Prospective study of coffee consumption and risk of Parkinson's disease. *Eur J Clin Nutr.* 2008;62:908-915.
- Saiki S**, Hirose G, Sakai K, Kataoka S, Hori A, Saiki M, Kaito M et al. Cardiac ¹²³I-MIBG scintigraphy can assess the disease severity and phenotype of PD. *J Neurol Sci.* 2004;220:105-111. [PDF](#)
- Saha S**, Guillily MD, Ferree A, Lanceta J, Chan D, Ghosh J, et al. *LRRK2* modulates vulnerability to mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci.* 2009;29:9210-9218. [PDF](#)

- Santamaria J**, Tolosa E, Valles A. Parkinson's disease with depression: a possible subgroup of idiopathic parkinsonism. *Neurology*.1986;36:1130-3.
- Santpere G**, Ferrer I. *LRRK2* and neurodegeneration. *Acta Neuropathol*. 2009;117:227-246. [PDF](#)
- Satake W**, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo, et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet*. 2009;41:1303-7. [PDF](#)
- Satoh J** y Kuroda Y. A polymorphic variation of serine to tyrosine at codon 18 in the ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 gene is associated with a reduced risk of sporadic Parkinson's disease in a Japanese population. *J Neurol Sci* 2001;189:113-7.
- Schapira AH**, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1989;1:1269.
- Schoenberg BS**, Osuntokun BO, Adeuja AO, Bademosi O, Nottidge V, Anderson DW, et al. Comparison of the prevalence of Parkinson's disease in black populations in the rural United States and in rural Nigeria: door-to-door community studies. *Neurology* 1988;38:645-6.
- Schüpbach M**, Lohmann E, Anheim M, Lesage S, Czernecki V, Yaici S, Worbe Y, Charles P, Welter ML, Pollak P, Dürr A, Agid Y, Brice A: Subthalamic nucleus stimulation is efficacious in patients with Parkinsonism and *LRRK2* mutations. *Mov Disord*. 22:119–122, 2007. [PDF](#)
- Schweitzer KJ**, Behnke S, Liepelt I, Wolf B, Grosser C, Godau J, et al. Cross-sectional study discloses a positive family history for Parkinson's disease and male gender as epidemiological risk factors for substantia nigra hyperechogenicity. *J Neural Transm*. 2007;114:1167-1171. [PDF](#)
- Schweitzer KJ**, Brüssel T, Leitner P, Krüger R, Bauer P, Voitalla D, et al. Transcranial ultrasound in different monogenetic subtypes of Parkinson's disease. *J Neurol*. 2007;254:613-6. [PDF](#)
- Scott WK**, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Lyons K et al. Complete genomic screen in Parkinson disease: evidence for multiple genes. *JAMA*. 2001;286:2239-44. [PDF](#)
- Seppi K**, Scherfler C, Donnemiller E, de Groot T, Virgolini I, Schocke MF, Goebel G, et al. Topography of dopamine transporter availability in progressive supranuclear palsy: a voxelwise [123I]beta-CIT-SPECT analysis. *Arch Neurol*. 2006;63:1154-1160. [PDF](#)
- Shi Q** y Tao E. An Ile93Met substitution in the UCH-L1 gene is not a disease-causing mutation for idiopathic Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:312-3.
- Shi Y**. Study on the prevalence of Parkinson's disease in Hongkou District, Shanghai. *Chin J Epidemiol*. 1987;4:205-9
- Siderowf A**, Stern MB. Preclinical diagnosis of Parkinson's disease: are we there yet?. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2006;6:295-301.
- Sierra M**, González-Aramburu I, Sánchez-Juan P, Sánchez-Quintana C, Polo JM, Berciano J, et al. High frequency and reduced penetrance of *LRRK2* g2019S mutation among Parkinson's disease patients in Cantabria (Spain). *Mov Disord*. 2011;26:2343–2346. [PDF](#)
- Silveira-Moriyama L**, Guedes LC, Kingsbury A et al. Hyposmia in G2019S *LRRK2*-related parkinsonism: clinical and pathologic data. *Neurology* 2008;71:1021-6. [PDF](#)
- Simón-Sánchez J**, Martí-Massó JF, Sánchez-Mut JV, Paisán-Ruiz C, Martínez-Gil A, Ruiz-Martínez J, et al. Parkinson's disease due to the R1441G mutation in Dardarin: a founder effect in the Basques. *Mov Disord*. 2006;21:1954-9. [PDF](#)
- Simón-Sánchez J**, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet*. 2009;41:1308-12. [PDF](#)
- Singleton AB**, Farrer M, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003;30: 841. [PDF](#)
- Solanki KK**, Bomanji J, Moyes J et al. A pharmacological guide to medicines which interfere with the biodistribution of radiolabelled meta-iodobenzylguanidine (MIBG). *Nucl Med Commun*. 1992;13:513-521.

- Solano SM**, Miller DW, Augood SJ, Young AB, Penney JB. Expression of alpha-synuclein, parkin, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 mRNA in human brain: genes associated with familial Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2000;47:201-10. [PDF](#)
- Spiegel J**, Mollers MO, Jost WH et al. FP-CIT and MIBG scintigraphy in early Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2005;20:552-561. [PDF](#)
- Spiegel J**, Hellwig D, Farmakis G et al. Myocardial sympathetic degeneration correlates with clinical phenotype of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2007;22:1004-1008. [PDF](#)
- Spillantini MG**, Divane A, Goedert M. Assignment of human alpha-synuclein (*SNCA*) and beta-synuclein (*SNCB*) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics* 1995;27: 379-81. [PDF](#)
- Spillantini MG**, Schmidt ML., Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M.. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;388:839-40.
- Spitz M**, Rozenberg R, Pereira Lda V, Reis Barbosa E. Association between Parkinson's disease and glucocerebrosidase mutations in Brazil. *Parkinsonism Related Disord*. 2008;14:58-62. [PDF](#)
- Strauss KM**, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg, et al. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2005;14:2099-111. [PDF](#)
- Sun QY**, Guo JF, et al. Glucocerebrosidase Gene L444P mutation is a risk factor for Parkinson's disease in Chinese population. *Mov Disord*. 2010;25:1005-11. [PDF](#)
- Suzuki M**, Hattori N, Orimo S, Fukumitsu N, Abo M, Kono Y, et al. Preserved myocardial [123I] metaiodobenzylguanidine uptake in autosomal recessive juvenile parkinsonism: first case report. *Mov Disord*. 2005;20:634-636. [PDF](#)
- Takahashi H**, Ohama E, Suzuki S, Horikawa Y, Ishikawa A, Morita T, et al. Familial juvenile parkinsonism: clinical and pathologic study in a family. *Neurology* 1994;44(3 Pt 1): 437-41
- Tan EK** and Skipper LM. Pathogenic mutations in Parkinson disease. *Hum.Mutat*. 2007;28:641-653. [PDF](#)
- Tanner CM**. Advances in environmental epidemiology. *Mov Disord*. 2010;25 Suppl 1:S58-62. [PDF](#)
- Tanner CM**, Ottman R, Goldman S. M, Ellenberg J, Chan P, Mayeux R, and Langston J. W. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA* 1999 1999;281:341-346. [PDF](#)
- Taylor JP**, Rowan EN, Lett D, O'Brien JT, McKeith IG, Burn DJ. Poor attentional function predicts cognitive decline in patients with non-demented Parkinson's disease independent of motor phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:1318-23. [PDF](#)
- Teunissen CE**, Petzold A, Bennett JL, Berven FS, Brundin L., Comabella M, et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology* 2009;73:1914-1922. [PDF](#)
- Tissingh G**, Berendse HW, Bergmans P et al. Loss of olfaction in de novo and treated Parkinson's disease: possible implications for early diagnosis. *Mov Disord*. 2001;16:41-46. [PDF](#)
- Toft M**, Pielsticker L, Ross OA, Aasly JO, and Farrer MJ. Glucocerebrosidase gene mutations and Parkinson disease in the Norwegian population. *Neurology* 2006;66:415-417. [PDF](#)
- Tolosa E**, Compta Y, Gaig C. The premotor phase of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2007;13 Suppl:S2-7. [PDF](#)
- Tomiyama H**, Li Y, Funayama M, v Hasegawa K, Yoshino H, Kubo S, et al. Clinicogenetic study of mutations in *LRRK2* exon 41 in Parkinson's disease patients from 18 countries. *Mov Disord*. 2006;21:1102-1108. [PDF](#)
- Unoki M** y Nakamura Y. Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* 2001;20:4457-65. [PDF](#)
- Valente EM**, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, et al. Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1. *Science* 2004a;15: 15. [PDF](#)
- Valente EM**, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, et al. Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet*. 2001;68:895-900. [PDF](#)

- Valente EM**, Brancati F, Ferraris A, Graham EA, Davis MB, Breteler MM, et al. Park6-linked parkinsonism occurs in several european families. *Ann Neurol.* 2002;51:14-8. [PDF](#)
- Valente EM**, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V, et al. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol.* 2004b;56: 336-41. [PDF](#)
- Van Den Eeden**, S. K., C. M. Tanner, et al. (2003). Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol.* 2003;157:1015-1022. [PDF](#)
- Vander-Borghet TM**, Sima AA, Kilbourn MR, Desmond TJ, Kuhl DE, Frey KA. [3H]methoxytetraabenazine: a high specific activity ligand for estimating monoaminergic neuronal integrity. *Neuroscience* 1995;68:955-962.
- van Dijk KD**, Teunissen CE, Drukarch B, Jimenez CR, Groenewegen HJ, Berendse HW, et al. Diagnostic cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson's disease: A pathogenetically based approach. *Neurobiology of Disease* 2010;39:229–241. [PDF](#)
- van Duijn CM**, Dekker MC y cols. Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet.* 2001; 69:629-34. [PDF](#)
- Van laere K**, Clerinx K, D'Hondt E, de Groot T, Vanderberghe W. Combined striatal binding and cerebral influx analysis of dynamic 11C-raclopride PET improves early differentiation between multiple-system atrophy and Parkinson's disease. *J Nucl Med.* 2010;51:588-595
- Venderova K**, Kabbach G, Abdel-Messih E, Zhang Y, Parks RJ, Imai Y, et al. Leucine-Rich Repeat Kinase 2 interacts with Parkin, DJ-1 and PINK-1 in a Drosophila melanogaster model of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2009;18:4390-4404. [PDF](#)
- von Campenhausen** et al. Costs of illness and care in Parkinson's disease: an evaluation in six countries. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2011;2:180-91. [PDF](#)
- Wakabayashi K**, Takahashi H, Ohama, Takeda S, Ikuta F. Lewy bodies in the visceral autonomic nervous system in Parkinson's disease. In: Narabayashi H, Nagatsu N, Yanagisawa N, Mizuno Y, editors. *Advances in neurology* New York: Lippincott-Raven;1993. p 609-612
- Walter U**, Behnke S, Eyding J, Niehaus L, Postert T, Seidel G, et al. Transcranial brain parenchyma sonography in movement disorders: state of the art. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33:15–25.
- Walter U**, Klein C, Hilker R, Benecke R, Pramstaller PP, Dressler D. Brain Parenchyma Sonography Detects Preclinical Parkinsonism *Mov Disord.* 2004;19:1445-9. [PDF](#)
- Waragai M**, Wei J, Fujita M, Nakai M, Ho GJ, Masliah E, et al. Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;345:967–972.
- Weidong Le**, Tianhong Pan, Maosheng Huang, Pingyi Xu, Wenjie Xie, Wen Zhu, et al. Decreased NURR1 gene expression in patients with Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 2008;273:29–33. [PDF](#)
- West A**, Farrer M, Petrucelli L, Cookson M, Lockhart P, Hardy J. Identification and characterization of the human parkin gene promoter. *J Neurochem.* 2001;78:1146-52. [PDF](#)
- Wilkinson KD**, Lee KM, Deshpande S, Duerksen-Hughes P, Boss JM, Pohl J. The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* 1989;246: 670-3.
- Winter** et al. Longitudinal study of the socioeconomic burden of Parkinson's disease in Germany. *Eur J Neurol.* 2010 Sep;17:1156-63. [PDF](#)
- Wirdefeldt K**, Gatz M, Challing et al. No evidence for heritability of Parkinson's disease in Swedish twins. *Neurology* 2004;63:305-311. [PDF](#)
- Wood NW**. Genetic risk factors in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1998;44(3 Suppl 1): S58-62.
- Woods SP**, Tröster AI. Prodromal frontal/executive dysfunction predicts incident dementia in Parkinson's disease. *J Int Neuropsychol Soc.* 2003;9:17-24
- Wszolek Z**, Pfeiffer B, Fulgham JR, Parisi JE, Thompson BM, Uitti RJ, et al. Western Nebraska family (family D) with autosomal dominant parkinsonism. *Neurology.* 1995;45:502-5. [PDF](#)

- Wszolek Z**, Vieregge O, Uitti RJ, Gasser T, Yasuhara O, McGeer P, et al. German-Canadian family (family A) with parkinsonism, amyotrophy, and dementia-longitudinal observations. *Parkinsonism Related Disord.* 1997;3:125-39. [PDF](#)
- Wszolek Z**, Pfeiffer RF, Tsuboi Y, Uitti RJ, McComb RD, Stoessl AJ, et al. Autosomal dominant parkinsonism associated with variable synuclein and tau pathology. *Neurology.* 2004;62:1619-22. [PDF](#)
- Yoshino H**, Tomiyama H, Tachibana N, Ogaki K, Li Y, Funayama M, Hashimoto T, et al. Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism. *Neurology.* 75(15):1356-1361, October 12, 2010. [PDF](#)
- Yoshita M**, Taki J, Yamada M. A clinical role for [(123)I]MIBG myocardial scintigraphy in the distinction between dementia of the Alzheimer's-type and dementia with Lewy bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71:583-588. [PDF](#)
- Zarranz JJ**, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol.* 2004;55:164-73. [PDF](#)
- Zecca L**, Berg D, Arzberger T, Ruprecht P, Rausch WD, Musicco M, et al. In vivo detection of iron and neuromelanin by transcranial sonography: a new approach for early detection of substantia nigra damage. *Mov Disord* 2005;20:1278-1285. [PDF](#)
- Zhen Hong**, Min Shi, Kathryn A. Chung, Joseph F. Quinn, Elaine R. Peskind, Douglas Galasko, et al. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease *Brain* 2010;133:713-726. [PDF](#)
- Zimprich A**, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, et al. Mutations in *LRRK2* cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004a;44:601-7. [PDF](#)
- Zimprich A**, Muller-Myhsok B, Farrer M, Leitner P, Sharma M, Hulihan M, et al. The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval. *Am.J.Hum.Genet.* 2004;74:11-19. [PDF](#)

Anexos

1. Informes de evaluación por el comité de ética de los diferentes proyectos

Se adjuntan las valoraciones realizadas por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Donostia, a los proyectos presentados relacionados con el tema de tesis.

- 1.1. Análisis del valor predictivo de pruebas de diagnóstico en la Enfermedad de Parkinson: Estudio de una cohorte de pacientes con mutaciones en *LRRK2*
 - * FIS 2006
- 1.2. Síntomas no-motores e integridad de la vía nigroestriatal en portadores asintomáticos de mutaciones en el gen *LRRK2*
 - * FIS 2009
 - * Gobierno Vasco 2009
- 1.3. Factores ambientales y hábitos que influyen en la penetrancia y expresividad de la enfermedad de Parkinson asociada a mutaciones en *LRRK2*/dardarina
 - * FIS 2010



Pº Dr. Beguiristain, s/n
20014 Donostia-San Sebastián

San Sebastián, 19 de Diciembre de 2006

El Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Donostia,

CERTIFICA que en el día de la fecha ha evaluado el Proyecto de Investigación
cuyo investigador principal es José Félix Marti-Masso y titulado:

***“Análisis del valor predictivo de pruebas de diagnóstico presintomático en la
Enfermedad de Parkinson: Estudio de una cohorte de pacientes con mutación en
LRRK2.”***

Resultando APROBADO según consta en Acta 11/06.

Presidente del Comité Ético de
Investigación Clínica



Pº Dr. Beguiristain, s/n
20014 Donostia-San Sebastián

San Sebastián, 18 de Febrero de 2009

El Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Donostia,

CERTIFICA que el Proyecto de Investigación cuyo investigador principal es
Javier Ruiz Martínez y titulado:

***“Síntomas no-motores e integridad de la vía nigroestriatal en portadores
“asintomáticos” de mutaciones en el gen LRRK2”***

Ha sido evaluado por este CEIC decidiendo dar su aprobación al mismo.



Fdo.: Jose Ignacio Emparanza

Presidente del Comité Ético de
Investigación Clínica



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL ÁREA SANITARIA DE GIPUZKOA

D. JOSÉ IGNACIO EMPARANZA KNÖRR, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Área Sanitaria de Gipuzkoa,

CERTIFICA

Que este Comité Ético de Investigación Clínica del Área Sanitaria de Gipuzkoa ha recibido el Proyecto de Investigación titulado:

“Factores ambientales y hábitos que influyen en la penetrancia y expresividad de la enfermedad de Parkinson asociada a mutaciones en LRRK2/dadarina”

Resultado aprobado según consta en acta nº 4/2010

Lo que firmo en San Sebastián, a 14 de Abril 2010

A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Emparanza", with a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo.: Jose Ignacio Emparanza

Presidente del CEIC del
Hospital Donostia

2. Consentimiento informado para estudio genético

2.1. Hoja de Consentimiento informado para estudio genético en EP

<p>El abajo firmante _____, o en su defecto D. _____ en calidad de familiar responsable/cuidador/tutor legal <i>(tachese lo que no proceda)</i> del paciente/control <i>(tachese lo que no proceda)</i>,</p>		
<p>AUTORIZO a la toma de una muestra biológica de de sangre y/o saliva para el estudio de marcadores genéticos relacionados con la enfermedad de Parkinson.</p>		
<p>DECLARO conocer que esta investigación pretende descubrir la existencia de marcadores genéticos (alteraciones en genes) que sean causa o hayan facilitado el desarrollo de la enfermedad de Parkinson en mi persona, independientemente de que de los resultados de esta investigación no se deriven beneficios concretos para el tratamiento de la enfermedad o su prevención en terceros.</p>		
<p>DECLARO haber sido informado de los pormenores, compromisos y objetivos del estudio y haber recibido la información por parte de</p>		
<p>DECLARO haber sido informado que no existen riesgos significativos derivados de la venopunción para la extracción de sangre o del cepillado de la mucosa bucal.</p>		
<p>CONOZCO que mi participación en el estudio es voluntaria, pudiendo abandonar el estudio sin necesidad de dar explicaciones y sin que ello repercuta en el cuidado médico que recibo o deba recibir en el futuro por parte de los promotores del estudio. Este abandono podrá implicar si es mi deseo la destrucción de las muestras biológicas ya almacenadas y de los resultados obtenidos hasta la fecha si ese fuese mi deseo.</p>		
<p>ENTIENDO que los promotores del estudio están obligados a guardar una estricta confidencialidad de los datos obtenidos, que no podrán ser conocidos por terceros ajenos a la investigación desarrollada por el Servicio de Neurología del Hospital DONOSTIA</p>		
<p>AUTORIZO a que los datos puedan ser tratados informáticamente de acuerdo a las restricciones de la Ley de Protección de Datos y siempre que el personal que maneje los mismo sea personal sanitario o investigador obligado por el secreto profesional.</p>		
<p>Me RESERVO el derecho tanto de conocer como el de no conocer los resultados de la investigación o de decidir si procede de acuerdo con los principios de autonomía y beneficencia la posibilidad de revelarlos a familiares directos míos en su interés o el de sus descendientes.</p>		
En , a de		de 200
Paciente/control	Testigo	Cuidador/tutor

2.2. Hoja de información para el paciente, familiar, o control dentro del estudio genético en EP

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa de causa no bien conocida que es la causa de torpeza motora, temblor y rigidez en más de un 1% de la población mayor de 65 años. Hasta la fecha se conoce que aproximadamente un 10% de los casos son casos familiares y que existen 6 genes implicados en su aparición. Recientemente se ha conocido que un nuevo gen denominado dardarina puede ser causa de la enfermedad tanto en casos familiares (esto es, con más de un miembro afectado en la familia) como en casos aparentemente esporádicos.

El conocimiento de si estos factores juegan un papel en el desarrollo de su enfermedad o en la de otros pacientes puede reportar una mejora en el conocimiento general de la enfermedad de Parkinson, en la búsqueda de tratamientos eficaces para la misma o en la aplicación profiláctica de terapias neuroprotectoras actualmente bajo investigación que pudiesen impedir el desarrollo de la misma tanto en Vd como en sus familiares.

Vd. como afecto de una enfermedad de Parkinson, tratada en este Servicio puede si lo desea participar en este estudio, permitiendo que analicemos la presencia de alteraciones en estos genes u otros que pudiesen descubrirse que justificasen la aparición o desarrollo de la enfermedad de Parkinson.

El método empleado para estudiar la dotación genética es la extracción del ADN a partir de células circulantes de la sangre (tras punción en la vena cubital) o eventualmente a partir de las células de la mucosa bucal obtenidas tras un leve cepillado de la cavidad oral.

En el momento actual la información obtenida no permite establecer predicciones fiables acerca del devenir futuro de la enfermedad en Vd ya que este tipo de estudios sólo tienen un valor tras la acumulación de muchos datos individuales.

En el caso de que por los resultados del estudio pudiera derivarse alguna medida terapéutica o preventiva adicional a las que ya está tomando, de interés para Vd o para sus familiares, Vd podrá decidir en todo momento y sin restricción ninguna si desea conocer los resultados del estudio o no.

En todo momento, podrá ampliar la información referente a este estudio contactando con el Dr. Martí Massó investigador coordinador de este estudio, o con Dr. Ruiz-Martínez o Dr. López de Munain en el teléfono 943-007027 del Servicio de Neurología del Hospital DONOSTIA.

3. Plantilla de obtención de datos clínicos de pacientes, familiares asintomáticos, e individuos del estudio poblacional

3.1. Registro de datos clínicos de pacientes, familiares, o controles

DATOS CLÍNICOS					
					Fecha:
FILIACIÓN					
Nombre y apellidos:			Médico:		
Teléfono:					
F. nacimiento:		Edad Actual:		Sexo:	
Diestro / Zurdo					
<u>Procedencia:</u> <i>Vasco</i>		<i>No vasco</i>		<u>Habitat:</u> <i>Rural</i> <i>Urbano</i>	
<u>Contacto Tóxicos:</u> <i>SÍ</i> <i>NO</i>				<u>Profesión:</u> <i>Casa</i> <i>Oficina</i> <i>Campo</i> <i>Fábrica</i>	
<u>Condición:</u> <i>Paciente</i> <i>Familiar asintomático</i>		<i>Control</i>			
AN. FAMILIARES					
No	Sí	Tipo:	Edad fallecimiento Padre:	Madre:	
CLÍNICA:					
Edad inicio:		Edad Diagnóstico:		Tiempo evolución (desde inicio):	
H&Y actual :		UPDRS (III): (ON OFF)		Tratamiento:	
Respuesta a L-dopa:		Buena irregular mala		Indeterminada	
SÍNTOMAS			Otros		
Temblor reposo	<i>Sí</i>	<i>No</i>	Fluctuaciones	<i>Sí</i>	<i>No</i>
Temblor postural	<i>Sí</i>	<i>No</i>	Disquinesias	<i>Sí</i>	<i>No</i>
Temblor ortostático	<i>Sí</i>	<i>No</i>	Deterioro cognitivo	<i>Sí</i>	<i>No</i>
Hipocinesia	<i>Sí</i>	<i>No</i>			
Rigidez	<i>Sí</i>	<i>No</i>			
Dolor	<i>Sí</i>	<i>No</i>	Impotencia.	<i>Sí</i>	<i>No</i>
Asimetría	<i>Sí</i>	<i>No</i>	Presíncopes	<i>Sí</i>	<i>No</i>
Inestabilidad	<i>Sí</i>	<i>No</i>	Síncopes	<i>Sí</i>	<i>No</i>
T. Marcha	<i>Sí</i>	<i>No</i>	Estreñimiento	<i>Sí</i>	<i>No</i>
Distonia	<i>Sí</i>	<i>No</i>	Incontinencia Ur	<i>Sí</i>	<i>No</i>
D. Cognitivo	<i>Sí</i>	<i>No</i>	T. Sueño	<i>Sí</i>	<i>No</i>
Topografía: ESD ESI	EID	EII	Cuello	Cara	Otra
ENCUESTA HáBITOS					
Tabaco:			TCE (con connción)		
Fumador activo:		Fumador pasivo		No	
No		No		Sí	Nº episodios
Sí	Nº Años:	Sí		Cafeína (café):	No Sí
Cigarros / d:				Años / tazas	

3.2. Registro de datos clínicos de individuos en el estudio epidemiológico

ESTUDIO POBLACIONAL. EP-09						
Fecha:/...../.....						
Lugar:.....						
FILIACIÓN						
Nombre:.....						
Apellido 1: Apellido 2:						
F. Nacimiento:...../...../..... Edad:.....						
Lugar nacimiento:.....Procedencia: <i>Vasco</i> <i>No vasco</i>						
Hábitat: <i>Rural</i> <i>Urbano</i>						
RELACIÓN CON EP						
Condición: <i>Sano</i> <i>Familiar asintomático</i> <i>Paciente</i>						
Antecedentes familiares EP: <i>No</i> <i>Sí</i> Tipo:.....						
EPIDEMIOLOGICO						
Estreñimiento: <i>Sí</i> <i>No</i>						
T. conducta del REM: <i>Sí</i> <i>No</i>						
Profesión: <i>Casa</i> <i>Oficina</i> <i>Fábrica</i> <i>Campo</i>						
Fármacos:.....						
Tóxicos ambientales (<i>pesticidas, industria</i>) <i>Sí</i> <i>No</i>						
Tabaco: <i>Activo</i> <i>Pasivo</i>						
Café: <i>Sí</i> <i>No</i>						
TCE (<i>con conmovión</i>): <i>Sí</i> <i>No</i>						
EXPLORACIÓN <i>Normal</i> <i>Dudoso parkinsonismo</i> <i>EP</i>						
Si EP: <i>- Tremórico</i> <i>Rígido-acinético</i> <i>Ambos</i>						
<i>- H&Y:</i> 0 1 1,5 2 3 4 5						

4. Carta de información para participar en el estudio epidemiológico

Donostia, 3 de Febrero de 2009

Estimado ciudadano/a

Su nombre ha sido seleccionado de una forma aleatoria a través del registro Osabide, por cumplir en este momento dos características: tener más de 65 años cumplidos, y tener fijada su residencia en los municipios de Azpeitia y Azkoitia.

Por medio de esta carta nos ponemos en contacto con usted para explicarle de antemano, un proyecto para el cual le solicitamos su absoluta y completamente voluntaria colaboración.

En los últimos años se han emprendido muchos estudios dirigidos a entender como y porque se desarrollan una serie de enfermedades que se han denominado neurodegenerativas, porque afectan al sistema nervioso, y degeneran de una forma progresiva. En este grupo se incluyen enfermedades de las cuales habrá oído hablar, como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, pero también otras enfermedades similares tienen cabida a pesar de ser menos habituales (otras demencias y trastornos que afectan al movimiento). Desde el Servicio de Neurología del Hospital Donostia, y bajo la dirección del Dr. José Félix Martí Massó se han liderado en los últimos 20 años muchos estudios que han logrado aumentar el conocimiento sobre las múltiples preguntas que estas enfermedades plantean, y que se resolverán en la medida que estas investigaciones continúen.

En este momento hemos emprendido un estudio que se centra en conocer la frecuencia con que se encuentran estas enfermedades en la comarca en la que usted reside, que no resulta casual sino fruto de otras investigaciones en las que se ha detectado la presencia de una mayor frecuencia de formas familiares de estas enfermedades en esta región, que han dado como resultado el descubrimiento de alteraciones genéticas causales y que podrían ser exclusivas de este entorno. Con la subvención del Departamento de Sanidad del Gobierno vasco, y después de haber sido aprobado este trabajo por el comité de ética del Hospital Donostia, queremos iniciar este estudio que tendrá una duración de 2 años, y para el cual necesitamos la colaboración de personas residentes en estos municipios, que hayan cumplido los 65 años, seleccionadas al azar a través del registro poblacional que existe en el programa Osabide (registro de individuos pertenecientes al programa de salud de atención primaria. Osakidetza)

Su colaboración implicará una valoración neurológica realizada por un neurólogo, en un día convenido en su propio municipio, y una extracción sanguínea.

- Con la exploración neurológica se intentarán detectar signos de padecer estas enfermedades, (que pueden estar ya diagnosticadas y seguidas en consulta por otro neurólogo), presentes de forma muy leve y casi inapreciable, (en cuyo caso se le facilitará la forma de continuar su seguimiento con otro compañero), o ausentes.
- El análisis de sangre se realizará a todos los que hayan accedido a ser visitados, tengan o no síntomas de la enfermedad. Se realizará entonces un estudio genético anónimo de las alteraciones que como he mencionado son frecuentes en su entorno, de cuyos resultados no tendrá conocimiento ni el grupo de investigadores, ni usted mismo, salvo que tenga expreso deseo de que así sea y nos lo haga constar.

Entiendo que a pesar de la sencillez que implica (menos de media hora, en su municipio, en el día convenido) le pueden asaltar dudas que intentaremos resolverle por teléfono en el número que se le indica, o en una entrevista personal. Recuerdo el carácter voluntario de su colaboración, y el interés del estudio exclusivamente dirigido al fin para el cual ha sido subvencionado.

Agradezco de antemano su colaboración.