



Universidad de Sevilla

TESIS DOCTORAL

Análisis de proteínas relacionadas con estrés oxidativo en saliva y suero de enfermos de Parkinson idiopático

presentada por

FÁTIMA DAMAS HERMOSO

para optar al título de

Doctor por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2021



D. Emilio Fernández Espejo, doctor en Medicina y Cirugía, catedrático jubilado de Fisiología y Académico de la Real Academia de Medicina de Cataluña

CERTIFICA:

Que Doña Fátima Damas Hermoso, licenciada en Medicina y Cirugía y especialista en Neurología, ha realizado bajo su dirección hasta octubre de 2019, el trabajo de investigación titulado **Análisis de proteínas relacionadas con estrés oxidativo en saliva y suero de enfermos de Parkinson idiopático** y que reúne todas las condiciones necesarias para ser valorado por la Comisión Académica correspondiente y presentado a Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, se firma en Sevilla a 9 de Junio de 2021.



D. Luis Castilla Guerra, profesor asociado adscrito al Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

Que Doña Fátima Damas Hermoso, licenciada en Medicina y Cirugía y especialista en Neurología, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado **Análisis de proteínas relacionadas con estrés oxidativo en saliva y suero de enfermos de Parkinson idiopático** y que reúne todas las condiciones necesarias para ser valorado por la Comisión Académica correspondiente y presentado a Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, se firma en Sevilla a 9 de Junio de 2021.

Luis Castilla Guerra

Director y Tutor de la Tesis Doctoral



Doña **Fátima Damas Hermoso**, licenciada en Medicina y Cirugía por la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, facultativo especialista en Neurología,

HACE CONSTAR:

Que ha realizado la Tesis doctoral denominada **Análisis de proteínas relacionadas con estrés oxidativo en saliva y suero de enfermos de Parkinson idiopático**, bajo la dirección de los profesores Emilio Fernández Espejo, investigador honorario y catedrático jubilado de Fisiología y Académico de la Real Academia de Medicina de Cataluña, y Luis Castilla Guerra, profesor asociado de Medicina, ambos de la Universidad de Sevilla.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, se firma en Sevilla a 9 de Junio de 2021.

Fdo.: Fátima Damas Hermoso

Autora de la tesis doctoral

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por subvenciones al doctor Emilio Fernández Espejo de la Junta de Andalucía, Consejería de Economía, Conocimiento, Empresas y Universidad (ref. BIO127, PAIDI), Sociedad Andaluza de Neurología (ref. SUBAIA2015/006) y Red de trastornos adictivos (Ref. RD16/0001/0017, Ministerio de Innovación y Ciencia, Instituto de Salud Carlos III, Madrid).

La autora está muy agradecida a todos los pacientes y controles que participaron en este estudio. La autora agradece a Silvia Castellano y Mara Guerra (Universidad de Sevilla) y Ana Luisa Gavito (Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Hospital Universitario Regional de Málaga) su asistencia técnica; a Fernando Rodríguez de Fonseca (Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Hospital Universitario Regional de Málaga), Juan Suárez (Universidad de Málaga), y José Chacón (Hospital Infanta Luisa-Quirón, Sevilla) su apoyo y ayuda; a Guillermo Izquierdo y Eva Cuartero por permitir el uso de las instalaciones del Hospital Universitario Virgen Macarena y el Hospital Universitario Señora de Valme; José-Manuel García-Moreno (Hospital Macarena, Sevilla) y Carolina Méndez-Lucena (Hospital Valme, Sevilla) por su excelente trabajo neurológico y por recolectar suero, a Cinta Calvo Morón por el estudio DAT-SPECT de los pacientes (Hospital Macarena), y a la Dra. Maria-Isabel García-Sánchez y el Biobanco Hospitalario Macarena (National Biobank Network, Instituto de Salud Carlos III, Madrid) por su trabajo con el almacenamiento de muestras.

*A mis familiares y amigos,
por su motivación durante la realización de esta tesis.*

*Al Dr. Emilio Fernández Espejo por su dedicación en este largo y duro
camino hasta ayudarme a conseguir mi meta.*

*A mis padres y hermanas
por estar presente en cada acontecimiento de mi vida,
por apoyarme y creer en mí.*

*A mi marido
por su amor incondicional y confianza.*

A mi hijo Raúl Garrido Damas por tenerme siempre en sus ojos.

Índice de contenidos

CONTEXTO	25
RESUMEN	27
CAPITULO I- INTRODUCCIÓN	31
1.1 Enfermedad de Parkinson. Generalidades.....	31
1.2 Etiopatogenia de la enfermedad de Parkinson.....	32
1.3 Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson.....	38
1.4 La enfermedad de Parkinson y el estrés oxidativo	44
1.4.1 Estrés peroxidativo.....	44
1.4.2 Estrés por derivados de la melanina.....	48
1.4.3 Estrés oxidativo por especies reactiva de nitrógeno.....	51
1.4.4 Estrés oxidativo halogenativo.....	52
1.4.5 Las deshalogenasas.....	54
1.4.6 Estrés oxidativo y daño de la sustancia negra.....	57
1.5 Clínica de la enfermedad de Parkinson.....	58
1.5.1 Fase motora y difusa de la enfermedad.....	59
1.5.2 Fase premotora.....	63
1.6 Diagnóstico de la enfermedad de Parkinson.....	66
1.7 Tratamiento en la enfermedad de Parkinson.....	72
1.7.1 Primera línea. Tratamiento farmacológico.....	72
1.7.2 Segunda línea. Cirugía cerebral.....	75
1.7.3 Segunda línea. Apomorfina subcutánea.....	76
1.7.4 Segunda línea. Perfusión intestinal continua.....	77
1.7.5 Otras terapias.....	78
CAPITULO II- HIPÓTESIS	79
CAPITULO III- OBJETIVOS	83
CAPITULO IV - MATERIAL Y MÉTODO	85
CAPITULO V- RESULTADOS	91
CAPITULO VI-DISCUSIÓN	107
CAPITULO VII- CONCLUSIONES	115
BIBLIOGRAFIA	117
ANEXOS Y CERTIFICADOS	143

Índice de tablas

Tabla 1. Formas de EP monogénicas (modificado de Kalinderi et al. Actualización 2017)	33
Tabla 2. Principales haloperoxidasas, localizaciones corporales y principales haluros y pseudohaluros que oxidan	53
Tabla 3. Principales derivados halogenados que participan en la neurodegeneración	54
Tabla 4. Causas de Síndrome rígido-acinético	67
Tabla 5. Hallazgos característicos en RM cerebral en EP y parkinsonismos atípicos	68
Tabla 6. Hallazgos sonográficos en el diagnóstico diferencial de los parkinsonismos degenerativos	69
Tabla 7. Patrones en la neuroimagen funcional (SPECT o PET) de los principales parkinsonismos degenerativos	71
Tabla 8. Complicaciones motoras asociadas al tratamiento con levodopa	73
Tabla 9. Fármacos disponibles para la EP	75
Tabla 10. Parámetros clínicos en pacientes con EP y controles Media \pm DEM	91
Tabla 11. Contenido y ratio saliva/suero de DEHAL1 en suero y saliva en pacientes con EPI y sujetos control	92
Tabla 12. Parámetros clínicos en pacientes con EP y controles	96
Tabla 13. Contenido y relaciones saliva / suero de α Syn en suero y saliva en pacientes con EPI y sujetos control	97
Tabla 14. Parámetros clínicos en pacientes con EP y controles	102
Tabla 15. Contenido, relación saliva/suero de melanina, Tyr y LPO en suero y saliva en pacientes con EPI y sujetos de control	103

Índice de figuras

Figura 1. α -sinucleína.....	36
Figura 2. Cuerpo de Lewy.....	37
Figura 3. Esquema de los Ganglios basales.....	39
Figura 4. Esquema de la vía indirecta dopaminérgica.....	41
Figura 5. Esquema de la vía directa dopaminérgica.....	42
Figura 6. Fisiopatología de los ganglios basales en condiciones normales y en el parkinsonismo.....	43
Figura 7. Vías de la homeostasis redox del anión superóxido y el peróxido de hidrógeno que conducen a la formación final de agua.....	45
Figura 8. Vías alternativas que se activan después del fallo de H ₂ O ₂	47
Figura 9. Vía de síntesis de dopamina en neurona dopaminérgica.....	49
Figura 10. Vía de producción de la melanina.....	50
Figura 11. Esquema de la posible historia natural clínica y patológica de la EPI.....	59
Figura 12. Concentración individual de la enzima DEHAL1 en (A) suero y (B) saliva en pacientes con EP y controles.....	93
Figura 13. Correlaciones entre la enzima DEHAL1 en saliva con las escalas de (A) Hoehn-Yahr y (B) UPDRS parte III o motora, en pacientes con EPI.....	94
Figura 14. Niveles en saliva de DEHAL1 (ng/ml) en sujetos con EP temprana, avanzada o controles.....	95
Figura 15. Concentración individual de α Syn en (A) suero y (B) saliva en pacientes con EPI y sujetos de control.....	98
Figura 16. Correlaciones entre la α Syn salival y (A) UPDRS total y (B) UPDRS motor o parte III, en pacientes con EPI.....	99
Figura 17. Contenido individual de α Syn en saliva en pacientes con EPI con o sin síntomas no motores	100

Figura 18. Análisis de inmunotransferencia de (A) proteína α Syn salival y (B) proteína 3-NT- α Syn salival.....	101
Figura 19. (A) Contenido individual de melanina (pg/ml) en suero en pacientes con EPI y controles. (B) Contenido individual de hTyr (ng/ml) en suero en pacientes y controles. (C) Contenido individual de LPO (ng/ml) en suero en pacientes con EPI y controles.....	104
Figura 20. (A) Contenido de melanina individual (pg/ml) en saliva en pacientes EPI y controles. (B) Contenido individual de hTyr (ng/ml) en saliva en pacientes y controles. (C) Contenido individual de LPO (ng/ml) en saliva en pacientes con EPI y controles	105
Figura 21. Correlaciones entre (A) Tyr y duración de la EP, y (B) melanina salival y duración de la EPI en años.....	106

Relación de Siglas y Acrónimos

- AD: Agonistas de la Dopamina
- ADo: Autosómica Dominante
- AINES: Antiinflamatorios No Esteroideos
- AMS: Atrofia Multisistema
- AMP_c: Adenosín Mono-Fosfato Cíclico
- AOPP: Productos Proteicos con Oxidación Avanzada
- α Syn: α -sinucleína
- AR: Autosómica Recesiva
- ATP13A2: ATPase cation transporting 13A2
- AVD: Actividades de la Vida Diaria
- Br⁻: Bromuro
- CAT: Enzimas catalasas
- CL: Cuerpos de Lewy
- Cl⁻: Cloruro
- COX: Ciclooxygenasas
- Cu II: Oxido de Cobre
- DA: Dopamina
- DAT: Transportadores de Dopamina Activos
- DAT-SPECT: Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Único para el Transportador de Dopamina
- DaTSCAN: SPECT con Radioligando 123I-Ioflupano
- DCB: Degeneración Cortico Basal
- DCL: Demencia por Cuerpos de Lewy
- DEHAL: Deshalogenasas
- DEHAL1: Deshalogenasa tipo 1
- DNAJC6: DnaJ Heat Shock Protein Family
- DNAJC13: DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C13
- DEM: Desviación Media Estándar

- DJ1: Deglycase
- DOPA: Dihidroxifenilalanina
- DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
- ECP: Estimulación Cerebral Profunda
- EIFG4G1: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 Gamma 1
- ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
- Enk: Encefainas
- EP: Enfermedad Parkinson
- EPi: Parkinson Idiopática
- EPO: Eosinófilo-peroxidasa
- ERO: Especies Reactivas de Oxígeno
- ERN: Especies Reactivas de Nitrógeno
- Fe III: Óxido férrico
- FBXO7: F-Box protein 7
- Glu: Glutamato
- GPe: Núcleo Pálido Externo
- GPi: Globo Pálido Interno
- GPx: Glutation-Peroxidasa
- GR: Glutation Reductasa
- GSH: Glutation Reducido
- GSSG: Glutation Oxidado
- GST: Glutation-S-Transferasa
- HalPO: Haloperoxidasas
- HSA: Albúmina Sérica Humana
- HOBr: Hipobromoso
- HOHal: Ácidos Hipohalosos
- H₂O₂: Agua Oxigenada o peróxido de hidrógeno
- HOCl: Ácido Hipocloroso
- HOI: Hipoyodoso
- HOF: Hipofluoroso

- HTRA2: Serina Peptidasa 2
- hTyr: Tirosinasa Humana
- I⁻: yoduro
- I¹²³-B-CIT: 2β-carbometoxi-3β- (4-iodofenil) tropano
- ICOMT: Inhibidores de la Catecolortometiltransferasa
- IDDC: Inhibidores de la Dopamina Descarboxilasa
- IMAO-B: Inhibidores de la Monoaminoxidasa tipo B
- IYD: Yodotirosina-desyodasas
- LRRK2: Leucine-Rich Repeat Kinase 2
- L-DOPA: L-3,4 dihidroxifenilalanina
- LCR: Líquido Cefalorrquídeo
- LPO: Lactoperoxidasa
- MAO: Monoamino-Oxidasas
- MPO: Mieloperoxidasa
- MPP: Movimientos Periódicos de Piernas
- NL: Neuritas de Lewy
- NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
- NMDA: N-Metil-D-Aspartato
- NO: Óxido Nítrico
- NOS: Óxido-Nítrico Sintetasa
- NOX: NADPH-oxidasa. Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato- Oxidasa
- NST: Núcleo Subtalámico
- NSTr: Núcleo Subtalámico Reticular
- MPTP: N-metil-4-fenil-1,2,3,6tetrahidropiridina
- 3NT- αSyn: α-sinucleína nitrada
- O₂⁻: Ión superóxido
- OH: Ion Hidroxilo
- ONOO⁻: Peroxinitrito
- P: Probabilidad
- PRKN: Parkina

- PARK: Parkinson Genético
- PAIDI: Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación
- PET: Tomografía por Emisión de Positrones
- PET – FDG: Tomografía por Emisión de Positrones ¹⁸F-Fluorodesoxiglucosa
- PINK1: PTEN (Phosphatase and tensin homolog)-induced putative kinase-1
- PLA2G6 - phospholipase A2 group VI
- PRDxs: Peroxiredoxinas
- P-SH: Proteínas con Cisteínas
- P-SON: Proteínas S-Nitrosiladas
- PSP: Parálisis Supranuclear Progresiva
- RM: Resonancia Magnética
- Rpm: Revoluciones Por Minuto
- SCN: Tiocianato (seudohaluro)
- SN: Sustancia Negra
- SNpc: Sustancia Negra Par Compacta
- SNr: Sustancia Negra Reticulata
- SODs: Superóxido Dismutasas
- SOH ~: Ácido Sulfénico Proteico
- SPECT-IBF: Tomografía por Emisión de Fotón único Yodo-123 Iodobenzofurano
- SPECT-IBZM: Tomografía por Emisión de Fotón único yodo-123-Benzamina
- SPECT I¹²³-FP-CIT: Tomografía por Emisión de Fotón único Yodo 123I-Ioflupano
- SPECT-MIBG: Tomografía Emisión Fotón único 123 Metayodo-bencil-guanidina
- SPI: Síndrome de Piernas Inquietas
- SP: Sustancia P
- SUR: Unión específica del radioligando
- SYNJ1: Synaptojanin T1
- TH: Tirosina-Hidroxilasa
- TSH: Hormona estimulante del tiroides
- TPO: Tiroperoxidasa
- Tyr: Tirosina

- UCHL1: Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1
- UPDRS: Unified Parkinson`s Disease Rating Scale
- UPP: Ubiquitina-Proteasoma
- VApc: Núcleo Ventral Anterior en su subdivisión Parvocelular
- VLo: Núcleo Ventral Lateral Talámico
- VPS35: Retromer Complex Component

Contexto

Los estudios de saliva y suero de esta tesis doctoral se integran en el Proyecto titulado “Análisis de la presencia de nitro- α -sinucleína anómala en saliva de enfermos de Parkinson”, dirigido por Emilio Fernández Espejo, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, y teniendo como investigadora a Fátima Damas Hermoso. Los protocolos fueron aprobados por el Hospital Universitario Virgen Macarena (CEI Macarena, 29/10/2013), y Hospital Universitario Señora de Valme (ref. 10/05/2018), así como el Comité de Ética de Investigación de la Junta de Andalucía (PEIBA; CEI Sevilla Sur, Dictamen ref. 2017.121418738). Se obtuvieron los consentimientos informados de todos los pacientes, con el modelo oficial de Biobanco hospitalario de Sevilla. El consentimiento siguió la normativa de la Declaración de Helsinki (BMJ 1991; 302: 1194).

Resumen

La fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson idiopática (EPI) está relacionada con diversos procesos oxidativos. Esta tesis se basa en la investigación de diferentes sustancias que se hallan en saliva y suero y que participan en dichos procesos. A continuación, se expone un resumen de cada uno de los tres estudios llevados a cabo.

Estudio de la deshalogenasa tipo 1 en saliva y suero de enfermos de Parkinson idiopático.

Las enzimas deshalogenasas (DEHAL) no han sido estudiadas en los enfermos de Parkinson, y podrían estar relacionadas con los efectos de estrés oxidativo de la enfermedad. La enzima DEHAL tipo 1 (DEHAL1) es una deshalogenasa y una nitrorreductasa, actuando como enzima multifuncional redox. Se expresa en tejidos relacionados con la Enfermedad de Parkinson (EP) donde se detectan depósitos de α -sinucleína (α Syn) de neuronas positivas a tirosina hidroxilasa (TH). En este trabajo, se ha estudiado la presencia de la enzima DEHAL1 en suero y saliva. Es un estudio observacional, analítico tipo casos-controles en el que se han valorado 25 pacientes con EPI y 25 controles, se ha incluido información demográfica y características motoras y no motoras y se han empleado técnicas de *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). Los resultados indican que la enzima DEHAL1 salival se relaciona con la sanguínea (proporción \sim 1:250) y, además, en los pacientes, se correlaciona de modo inverso con escalas clínicas de la EP. De este modo, cuanto menores son los niveles de DEHAL1 en saliva, mayor es la gravedad de la enfermedad, tanto en su vertiente motora como global (valorado por las escalas Unified Parkinson's Disease Rating Scale [UPDRs] y Hoehn-Yahr respectivamente). De hecho, los niveles de DEHAL1 salival en sujetos con enfermedad avanzada (grados 2,5 a 4 de Hoehn-Yahr) son significativamente menores que los sujetos con grados tempranos (grados 1 a 2) o sujetos control. Por tanto, los resultados indican que los niveles de la enzima decrecen con el curso de la enfermedad y se relacionan con su sintomatología. Por tanto, ha de existir una progresiva reducción

funcional de la enzima que podría influir en el desarrollo de la EP, probablemente en fenómenos de estrés halogenativo/nitrativo, localizados en las glándulas salivares. Se sabe que estos dos tipos de estrés oxidativo participan en la EP, y las glándulas salivares cada vez tienen un papel más importante en la patogenia de la enfermedad.

Estudios sobre α -sinucleína nativa y nitrada en saliva y suero, y su relación con características clínicas en la enfermedad de Parkinson idiopática.

La α Syn es un posible biomarcador de la EP. Hemos valorado el contenido de α Syn en suero y saliva, y cómo los niveles de α Syn se relacionan con las características clínicas en cohortes de EPi. En este trabajo se han valorado 56 pacientes con EPi (40 muestras de suero y 27 de saliva) y 20 controles (20 muestras de cada biofluido), y se ha incluido información demográfica y características motoras y no motoras. Se han empleado técnicas bioquímicas de *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) y de inmunotransferencia o *western blotting*. Los resultados indican que a) los niveles totales de α Syn sérica no se correlacionan con ninguna característica clínica de la enfermedad, b) los niveles en suero y saliva de α Syn no se correlacionan significativamente entre sí, c) los niveles totales de α Syn salival se correlacionan positivamente con las puntuaciones de UPDRS total y motor ($p < 0.01$), y d) los niveles totales de α Syn salival son significativamente más bajos en pacientes que presentan algún síntoma no motor ($n=15$; $p < 0,0001$ respecto a los que no presentan, $n=12$); los síntomas no motores más frecuentes en los pacientes con EPi fueron el estreñimiento ($n=7$) y la depresión ($n=5$). En conclusión, los niveles séricos de α Syn carecen de utilidad para distinguir características clínicas o para predecir el diagnóstico de EP. Sin embargo, el nivel total de α Syn salival es un biomarcador de fácil acceso que podría ser útil para discernir las características clínicas y evolutivas de la enfermedad, así como la presencia de síntomas no motores, principalmente estreñimiento y depresión.

Estudio de melanina, tirosinasa humana y lactoperoxidasa en saliva y suero de enfermos de Parkinson idiopático.

Los núcleos pigmentados del cerebro contienen neuromelanina, que parece participar en la patogenia de la EP, pero se desconoce el contenido de la melanina no neuronal (melanina propiamente dicha) en suero y saliva y su papel en la EPI; igual ocurre con otras sustancias como las enzimas sintetizadoras de melanina, tirosinasa humana (hTyr) y lactoperoxidasa (LPO). De esta manera, los objetivos de este estudio fueron investigar las relaciones entre la melanina no neuronal, la hTyr y la LPO en suero y saliva, así como su relación con las características clínicas en la EPI. Es un estudio observacional, analítico tipo casos-controles en el que se han valorado 42 pacientes con EPI (25 muestras de suero y 21 de saliva) y 20 controles (20 muestras de cada biofluido), se ha incluido información demográfica y características motoras y no motoras y se han empleado técnicas de *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). Los resultados indican que se detecta melanina, hTyr y LPO en suero y saliva en todos los sujetos, tanto pacientes como controles, sin diferencias entre los grupos. En cuanto a las correlaciones clínicas, solo se observa que las concentraciones de hTyr sérica y melanina salival se correlacionan inversamente con la duración de la enfermedad ($p < 0,01$), sin ninguna correlación con otra variable clínica. Estos marcadores proteicos no se correlacionan entre sí. En conclusión, la melanina, la hTyr y la LPO están presentes en suero y saliva tanto en pacientes de EPI como controles. Los niveles séricos y salivares de estos marcadores carecen de utilidad para distinguir características clínicas o para predecir el diagnóstico de EPI. Solamente la melanina salival y la hTyr sérica podrían ser indicadores periféricos de la duración de la EPI.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad de Parkinson. Generalidades

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en nuestro país tras la enfermedad de Alzheimer. Fue descrita originalmente por James Parkinson en 1817: “movimiento trémulo involuntario, con debilidad muscular, en parte sin estar en acción o incluso afectando el normal apoyo, con tendencia al encorvamiento hacia delante y a acelerar el paso sin motivo; estando los sentidos y el intelecto intactos”.

Cada año, en España, se diagnostican unos 10.000 nuevos casos de EP, afectando al menos a 160.000 personas y a más de 7 millones de personas en todo el mundo. La prevalencia y la incidencia de la EP es muy variable. En general, en Europa y Estados Unidos, la prevalencia es más alta que en el resto de países y es relativamente uniforme. En los países asiáticos, Latinoamérica y África es inferior, especialmente en este último continente. Estas diferencias podrían deberse en parte a factores propios de la población estudiada (es decir, mayor mortalidad por menores recursos económicos).

En general, y teniendo en cuenta todo tipo de estudios, independientemente de la metodología utilizada, en países industrializados la prevalencia en la población oscila entre el 0,3% y el 1% en personas mayores de 60 años, y alcanza el 3% en las de 80 años o más, con tasas de incidencia que varían entre 0,08 y 0,18 por 1.000 personas/año (*Benito, 2018*).

Suele aparecer a partir de la 6ª década de la vida y su frecuencia aumenta con la edad. Es excepcional en edades inferiores a 30 años (EP juvenil) y poco frecuente entre los 30-40 años (EP precoz). En la mayoría de los casos, tiene un curso insidioso y progresivo durante 10-20 años hasta desencadenar una invalidez grave o la muerte.

1.2 Etiopatogenia de la enfermedad de Parkinson

La etiopatogenia es desconocida, pero se considera que es el resultado de la interacción de varios factores naturales, genéticos y ambientales.

- Factores naturales:

En condiciones, normales, tenemos una carga de 500.000 neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta. Existe una pérdida neuronal natural por el envejecimiento que comienza a los 40 años (4,7% de las células por década de forma lineal). Esta susceptibilidad a la muerte de neuronas dopaminérgicas parece estar relacionada con la producción de radicales oxidativos. No obstante, es improbable que esta pérdida por sí misma y de forma aislada sea la causa, pero sí explicaría algunos parkinsonismos farmacológicos en ancianos inducidos por fármacos antidopaminérgicos. En la EP existe un aumento de la pérdida neuronal; el 50-90% de la misma tiene lugar en los primeros años de la enfermedad. Además, los marcadores dopaminérgicos y transportadores de dopamina (DAT) manifiestan una denervación, leve sobretudo en el putamen el 1º año posdiagnóstico y moderada/intensa a los 3 años y prácticamente total a partir del 4º año.

Por otra parte, existe una “selectividad lesional” de las neuronas dopaminérgicas en la EP, afectando en mayor cuantía a la sustancia negra compacta y en menor proporción a la sustancia gris periacueductal.

Sin embargo, esta degeneración neuronal no es solo dopaminérgica, también se afectan neuronas colinérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas.

- Factores genéticos:

La mayoría de los casos son esporádicos y se estima que sólo el 8-10% de los casos tiene un origen genético. Gran parte se transmiten de forma mendeliana, pero en otros el patrón de herencia es desconocido. En algunas formas incluso todavía se desconoce el gen involucrado. Se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Formas de EP monogénicas (modificado de Kalinderi et al. Actualización 2017)

PARK	Herencia	Locus	Gen	Edad de inicio	Características Clínicas
PARK 1	ADo	4q21-22	α Syn	40-50	Inicio precoz
PARK 2	AR	6q25.2-27	Parkina	20-40	Inicio precoz
PARK 3	ADo	2p13	¿?	60	Típico
PARK 4	ADo	4q21-23	α Syn	30	Inicio precoz
PARK 5	ADo	4p13	UCLH1	50	Típico
PARK 6	AR	1p35-36	PINK1	20-40	Inicio precoz
PARK 7	AR	1p36	DJ1	20-40	Inicio precoz
PARK 8	ADo	12q12	LRRK2	>50	Típico
PARK 9	AR	1p36	ATP13A2	<20	Demencia, espasticidad
PARK 10	FR	1p32	¿?	>50	Típico
PARK 11	ADo	2q36-37	¿?	>50	Típico
PARK 12	Ligada a X	Xq21-25	¿?	>50	Típico
PARK 13	ADo/FR	2p12	HTRA2	>50	Típico
PARK 14	AR	22q13.1	PLA2G6	20-40	Distonía
PARK 15	AR	22q12-13	FBXO7	20-40	Síndrome piramidal
PARK 16	FR	1q32	¿?	>50	Típico
PARK 17	ADo	16q11.2	VPS35	>50	Típico
PARK 18	ADo	3q27.1	EIFG4G1	>50	Atípico
PARK 19	AR	1p31.3	DNAJC6	<20	Atípico
PARK 20	AR	21q22.11	SYNJ1	<20	Atípico
PARK 21	ADo	3q22.1	DNAJC13	>60	Típico

Abreviaturas: ADo: Autosómica Dominante; AR: Autosómica Recesiva; FR: Factor Riesgo. Resto de abreviaturas y nombres oficiales de los genes: véase en el apartado: Relación de Siglas y Acrónimos

Actualmente se conocen alrededor de unos 21 locus afectados. Los diferentes tipos de EP se reconocen por el acrónimo PARK. Por lo general, las formas autosómicas recesivas (AR) están asociadas a una EP de inicio juvenil, la más frecuente es la mutación del gen parkina (PRKN) que codifica a una proteína con su mismo nombre. La EP autosómica dominante (ADo) es, por lo contrario, de inicio más tardío y

patológicamente cursa con Cuerpos de Lewy (CL). La mutación en el gen Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) es la más frecuente dentro de las formas ADo.

Salvo unas pocas excepciones en algunas poblaciones, menos del 5% de todos los casos de EP son causados por mutaciones en un solo gen. Por tanto, las pruebas genéticas permitirán un diagnóstico etiológico preciso solo en la minoría de pacientes. Dado que no existe un tratamiento específico para los casos genéticos, el propósito de las pruebas genéticas en la EP está orientado fundamentalmente al paciente y sus familiares, al asesoramiento con respecto al pronóstico de la enfermedad y el riesgo genético de pacientes no afectados. Los resultados tienen implicaciones psicológicas, social y profesionales por lo que debe ser realizada por un equipo de profesionales que aporten consejo pretest y después de la prueba. En general, los estudios genéticos no son realizados en la práctica clínica habitual; pero pueden considerarse en pacientes con EP juvenil, de inicio temprano e historia familiar positiva, con determinadas manifestaciones atípicas o siempre que exista una importante historia familiar (*Müller et al., 2016*).

- Factores ambientales:

Son múltiples los factores externos que se relacionan con una menor o mayor incidencia de EP.

El tabaco y la cafeína son dos de ellos. Aunque su efecto protector no está reconocido, existe una incidencia mayor entre no fumadores y no consumidores de cafeína (existe la hipótesis de una menor capacidad de adicción en los pacientes con EP que explicaría esta posible asociación). En esta misma línea de protección, encontramos el consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y el consumo moderado de alcohol.

Por lo contrario, existe una mayor incidencia de EP en el ámbito rural. Diversos estudios (*Broussolle E y Thobois S, 2002; Kieburz W, 2013; Pezzoli G y Cereda E, 2013*) señalan el posible papel etiológico de la exposición a herbicidas o insecticidas, consumo de sustancias tóxicas como N-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), rotenona

(tóxico selectivo del complejo mitocondrial), la industrialización, historia de traumatismos craneo encefálicos previos e ingesta de aguas de pozos.

Como resultado de la intervención de estos factores naturales, genéticos y/o ambientales tiene lugar dos procesos fundamentales en esta patología:

- la acumulación de proteínas anómalas, destacando la α Syn, en la sustancia negra (cuerpos y neuritas de Lewy)
- la muerte neuronal dopaminérgica

La **α Syn** es una proteína de 140 aminoácidos, con tres regiones diferenciadas. El extremo amino terminal está cargado positivamente, el segmento hidrofóbico central y el extremo carboxilo que está cargado negativamente. Posee cuatro residuos de tirosina, uno (Y39) cerca del extremo amino y tres (Y125, Y133, e Y136) cerca del extremo carboxilo. La figura 1 muestra un esquema de la proteína. El monómero proteico adopta una conformación colapsada alrededor del centro hidrofóbico. En 2011 se detectó que la α Syn fisiológica no se encuentra en forma monomérica sino oligomérica, formando tetrámeros, y que en ellos cada cadena adopta una conformación alfa-helicoidal (Bartels et al., 2011; Wang et al., 2011). Estos tetrámeros se forman por uniones ditirosínicas entre las cadenas y con dicha disposición espacial se localiza la proteína en las neuronas (principalmente en los terminales presinápticos), pero también en líquido cefalorraquídeo, espacio extracelular neuronal y sangre (Emmanouilidou et al., 2011). En sangre el 99% se encuentra unida a la membrana de los glóbulos rojos y el resto en plasma (Barbour et al., 2008). La existencia de α Syn en diversos fluidos se relaciona con el hecho que dicha proteína puede segregarse por las neuronas al medio extracelular y transportarse de neurona en neurona, fenómeno que podría estar involucrado en la progresión de la neurodegeneración en la EP.



Figura 1. α -sinucleína. (Izquierda) estructura plegada del monómero con los residuos de tirosina en color. (Derecha) Tetrámero con cuatro moléculas de α Syn unidas entre sí por residuos de tirosina.

La principal patología molecular de la α Syn es la fosforilación, siendo sus oligómeros neurotóxicos; la α Syn anómala se pliega y forma fibrillas insolubles que se depositan en el citoplasma de las neuronas (Cuerpos de Lewy) y en las neuritas de Lewy. La α Syn mal plegada tiende a precipitar en forma de protofibrillas, que a su vez precipitan más sólidamente en forma de fibrillas, y que constituyen el núcleo del CL. La α Syn mal plegada también tiende a precipitar en agregados amorfos. La relación entre la clínica, las inclusiones proteicas anómalas y muerte neuronal es controvertida. Es bien sabido, que la clínica motora se relaciona con la pérdida neuronal pero no necesariamente con la densidad de agregados amorfos.

Los CL, descritos por este autor en 1912, son inclusiones de 5 a 25 micras de diámetro, con un núcleo denso eosinofílico rodeado por un halo pálido (Figura2). En el núcleo denso se detectan depósitos de proteínas como α Syn, parkina y microfilamentos. Aunque se ha propuesto que los CL son un mecanismo citoprotector, a través del cual la célula "aisla" proteínas tóxicas, (Hurtig *et al.*, 2000) han demostrado que cuanto mayor es el número de CL, mayor es la gravedad de la EP. Los CL se detectan en otros lugares del sistema nervioso central y periférico: como los plexos intestinales, el bulbo olfatorio, centros mesencefálicos, y glándulas salivares. Esto sugiere que estamos ante una enfermedad multisistémica, no afectando únicamente a estructuras neurológicas.

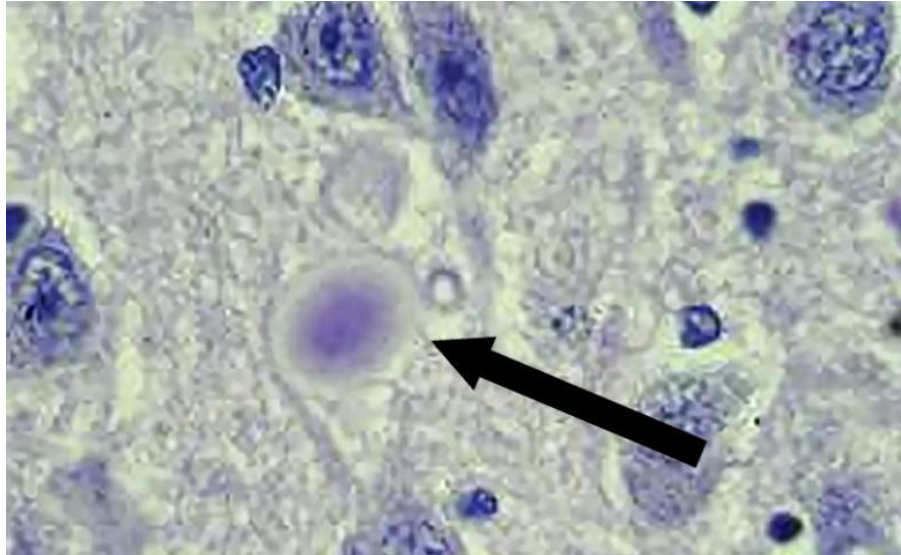


Figura 2. Cuerpo de Lewy. Neurona de sustancia negra con inclusión o cuerpo de Lewy característico, con halo claro y centro más oscuro eosinofílico. Tomado de Ellison, <https://www.brightfocus.org/alzheimers/article/it-alzheimers-disease-or-lewy-body-dementia>.

Este hecho ha permitido enumerar una teoría patogénica sobre la EP que afirma que es de origen periférico y que podría relacionarse con un patógeno “invasor”. En la EP tiene lugar una afectación del sistema nervioso autónomo en las neuronas simpáticas posganglionares de varios órganos, y de forma característica del corazón, en el que tiene lugar una denervación simpática posganglionar que ya está presente desde fases premotoras de la enfermedad. Las alteraciones vegetativas que estos pacientes presentan se podrían explicar por la existencia de CL en los núcleos vagales bulbares, en los ganglios raquídeos simpáticos del plexo cardíaco (*Iwanaga et al., 1999*), y en el sistema nervioso entérico, lo que se traduciría en una alteración del tránsito intestinal, control vesical, rectal o disfunción eréctil (*Wakabayashi et al., 1990*).

Aunque los CL son una característica significativa en la EP, no es específica; pudiendo ser encontrados en otras enfermedades (Enfermedad de Alzheimer, Demencia por CL, Esclerosis Lateral Amiotrófica, Atrofia Multisistema, Síndrome de Down, Hallervorden-Spatz). Por el contrario, hay tipos de EP como PARK2 o LRRK2 en los que no se encuentran estos CL en todos los cerebros.

1.3 Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson

Los ganglios basales están formados por un grupo de núcleos subcorticales relacionados directamente con el inicio y control de los movimientos voluntarios, del aprendizaje y de las acciones cognitivas y emocionales. Básicamente se dividen en tres formaciones: neostriado, paleostriado y núcleos suplementarios. El neostriado comprende el núcleo caudado, el putamen y el núcleo accumbens. El paleostriado incluye al globo pálido interno (GPi) y externo (GPe). Dentro de los núcleos suplementarios destacan el núcleo subtalámico (NST), sustancia negra (pars compacta [SNpc] y pars reticulata [SNr]), el área tegmental ventral, el núcleo pedúnculo pontino y el área motora mesopontina (*Wichmann T et al., 2003*). En la figura 3 se muestran los principales ganglios basales y su localización.

Dentro de los ganglios basales, el neostriado corresponde a la parte esencialmente receptora, tanto de la información cortical como de la modulación de la proyección desde los núcleos dopaminérgicos del mesencéfalo ventral. El GPi y la SNr constituyen los núcleos de salida de los ganglios basales, que conectan con el resto de núcleos funcionalmente implicados como los núcleos talámicos, el núcleo pedunculo pontino y el área motora mesopontina. De esta manera existe una red de proyecciones dopaminérgicas entre los diferentes ganglios basales. La sustancia negra compacta ventral proyecta terminaciones dopaminérgicas al putamen, mientras que la dorsolateral lo hace al caudado. El área tegmental ventral proyecta hacia región frontobasal y septal (núcleo accumbens).

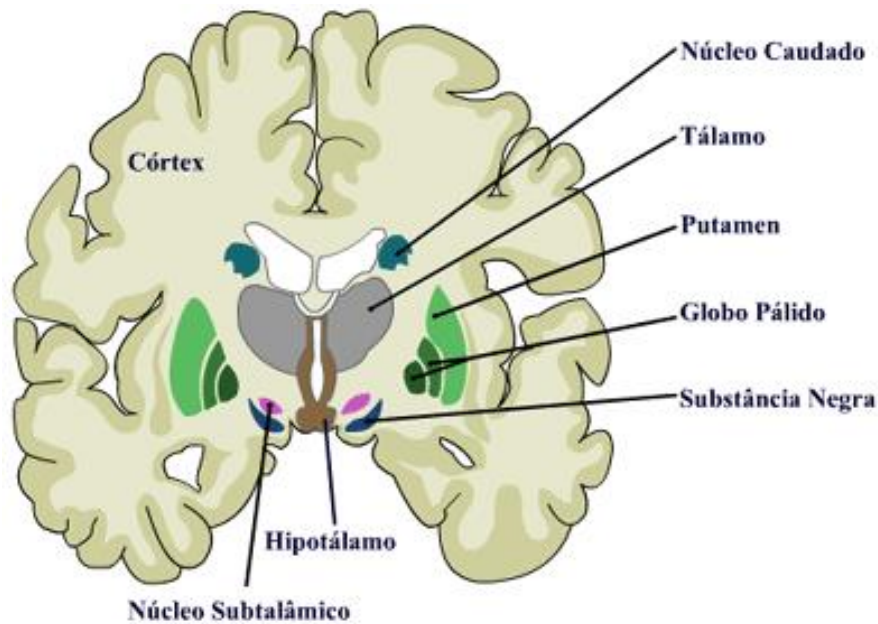


Figura 3. Esquema de los Ganglios basales. Los ganglios basales se sitúan sobre una zona denominada cuerpo estriado dividida por un haz de fibras, denominado cápsula interna . Sobre ésta se van situando los ganglios basales: el núcleo caudado , el putamen , el globo pálido , el núcleo subtalámico y la sustancia negra . En el lado interno de la cápsula interna se halla el núcleo caudado (núcleo de la cola) y en su lado externo el putamen (núcleo en forma de cáscara), junto al que se sitúa el globo pálido (una estructura triangular de color gris claro con una fina capa de sustancia blanca en su mitad que, en ocasiones, se une con el putamen para formar el núcleo lentiforme). Situado al lado del globo pálido, pero más hacia el interior, se encuentra el núcleo subtalámico y, por debajo de este, la sustancia negra.

El papel de los ganglios basales en el control motor normal no está del todo claro. La organización anatómica de los ganglios basales sugiere que el control motor normal puede considerarse como la consecuencia del equilibrio entre la actividad de las vías directa e indirecta nigroestriada sobre el complejo GPi/SNr. La activación de estas dos vías origina efectos antagónicos sobre las neuronas de dicho complejo. Así, la activación de la vía directa provoca una reducción de la actividad neuronal en el GPi/SNr, lo que desinhibe la proyección talamocortical y facilita la realización del movimiento iniciado en la corteza cerebral. Por el contrario, la activación de la vía indirecta conlleva un incremento de la actividad de las neuronas del GPi/SNr, lo que suprime el movimiento. Es importante reconocer que el tono del GPi/SNr en condiciones basales es siempre

elevado, suponiendo un papel primordial inhibitorio de los ganglios basales en el control normal del movimiento (*Rodriguez- Oroz MC, 2011*).

La dopamina (DA) ejerce un papel fundamental en el control motor normal y patológico. Como se ha comentado, la DA tiene una función doble según en la vía en la que actúe. La estimulación dopaminérgica ejerce un efecto excitador sobre los receptores D1 de la vía directa (estriado-GPi) mientras que inhibe a los receptores D2 de la vía indirecta (estriado-GPe-NST-GPi). El resultado final de déficit dopaminérgico nigroestriado es una hiperactividad del GPi/SNr y una mayor inhibición del tálamo motor (Figura 6) porque:

- Disminuye la inhibición de la vía indirecta (Figura 4).
- Disminuye la activación de la vía directa (Figura 5).

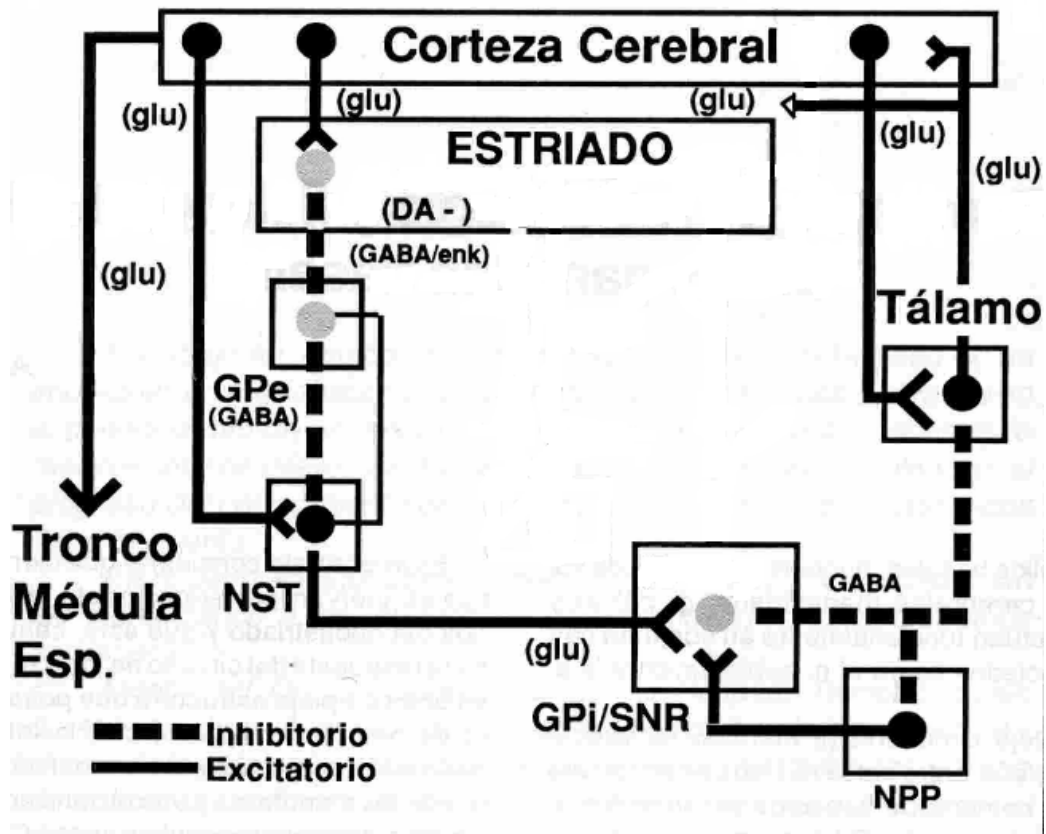


Figura 4. Esquema de la vía indirecta dopaminérgica. El circuito indirecto nace de neuronas putaminales inhibitorias mediadas por GABA y Encefalinas y van hacia GPe con proyecciones inhibitorias (región sensoriomotora del NST) y excitatorias (GPi y SNr). El resultado es una disminución de la inhibición de la vía indirecta teniendo como resultado un aumento de la supresión del movimiento.

Abreviatura: glu, glutamato; enk, encefalinas; GPe, núcleo pálido externo; GPi, núcleo pálido interno; SNr, sustancia negra reticulata; NST, núcleo subtalámico; NPP, núcleo pedúnculo pontino.

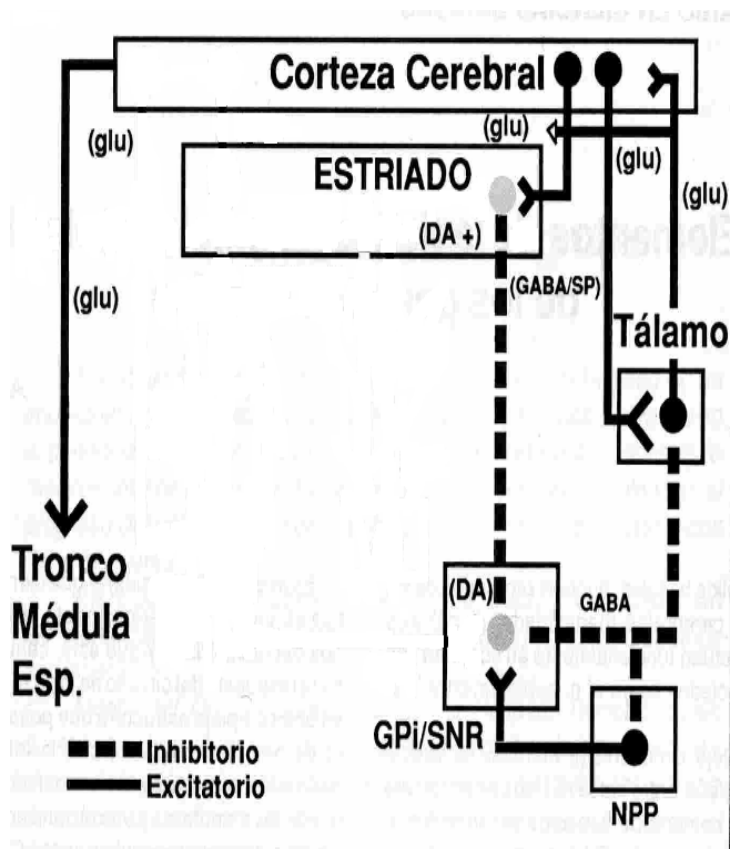


Figura 5. Esquema de la vía directa dopaminérgica. El circuito directo es una vía monosináptica inhibitoria mediada por GABA, sustancia P y dimorfina, desde putamen a GPI. El resultado es una disminución de la activación de la vía directa teniendo como resultado una disminución del movimiento.

Abreviatura: glu, glutamato; SP, sustancia P; GPI, núcleo pálido interno; SNR, sustancia negra reticulata; NST, núcleo subtalámico; NPP, núcleo pedúnculo pontino.

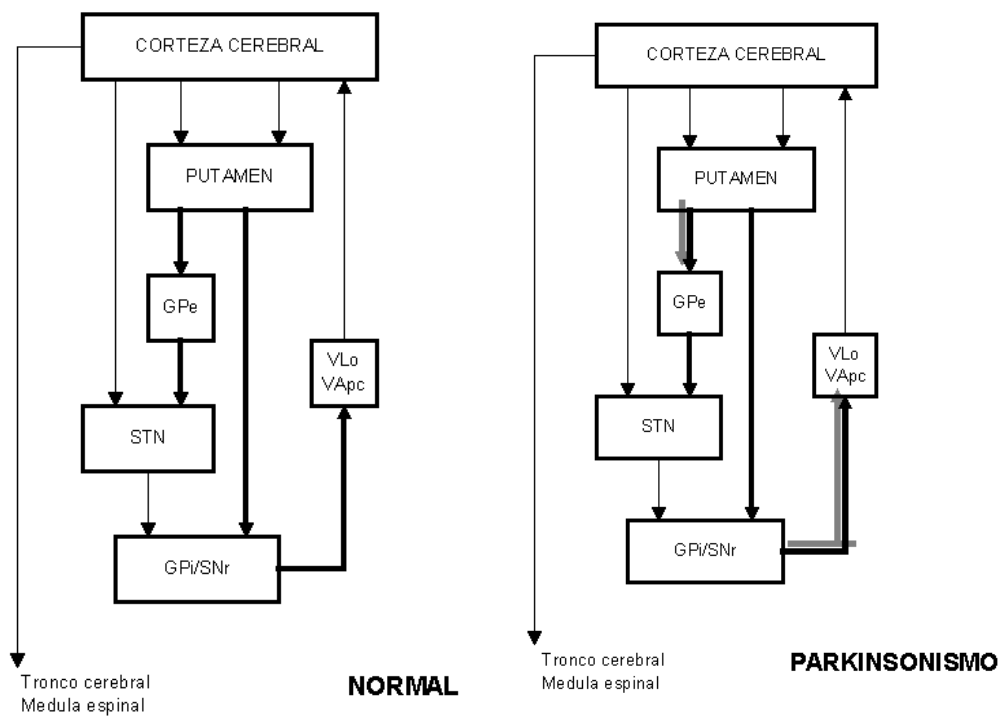


Figura 6. Fisiopatología de los ganglios basales en condiciones normales y en el parkinsonismo.

En condiciones normales se activan ambas vías dopaminérgicas obteniendo un equilibrio entre la inhibición y la activación del movimiento. Sin embargo, en la EP existe un desequilibrio con predominio fundamental de la vía indirecta debido a la disminución de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta provocando en definitiva una hiperactividad de las neuronas de salida de los GPi/SNr por estar reducida la actividad inhibitoria de las neuronas de proyecciones estriatales gabérgicas.

Abreviatura: GPe, núcleo pálido externo; GPi, núcleo pálido interno; SNr, sustancia negra reticulata; STN, núcleo subtalámico; VLo, núcleo ventral lateral talámico; VApc, núcleo ventral anterior en su subdivisión parvocelular.

1.4 La enfermedad de Parkinson y el estrés oxidativo

La muerte neuronal en la EP parece ser debida, al menos en parte, a **procesos oxidativos** (Jenner, 2003; Dias et al., 2013; Schapira et al., 2014). También influyen la neuroinflamación, el envejecimiento y otros mecanismos patogénicos. El estrés oxidativo se define como una alteración del balance entre la producción de especies reactivas oxidantes y los mecanismos de defensa antioxidante (Hallwell y Gutteridge, 1999; Jenner, 2003). Puede ser causado por un exceso de especies reactivas (donde se incluyen las especies reactivas de oxígeno (ERO), especies reactivas de nitrógeno (ERN), especies reactivas halogenadas y otras), por un defecto de los mecanismos antioxidantes, o por ambos mecanismos simultáneos (Jenner, 2003; Fernández-Espejo, 2004, 2018; Garcia-Moreno et al., 2013; Navarro-Yepes et al., 2014).

1.4.1 Estrés peroxidativo

Dentro del estrés de especies reactivas de oxígeno, destaca el estrés peroxidativo, que es el relacionado con el agua oxigenada o peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El eje principal del estrés peroxidativo es la producción excesiva o menor actividad de ERO, fundamentalmente ión superóxido (O_2^-) y H_2O_2 . El ión O_2^- es producido en la cadena electrónica de la mitocondria o a partir de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH-oxidasa [NOX] y normalmente es “limpiado” por la superóxido dismutasa (SODs) dando lugar a H_2O_2 . Luego, el H_2O_2 es catalizada en agua por medio de las enzimas antioxidantes glutathion-peroxidasa (GPx), catalasas y peroxirredoxinas. La GPx es una enzima principal del sistema glutathion, pues controla la conversión de glutathion reducido (GSH) en glutathion oxidado (GSSG). La glutathion reductasa (GR) y la glutathion-S-transferasa (GST) también participan en este sistema. Este sistema del glutathion es sumamente importante en el estado redox, y actualmente se denomina “Sistema Detoxificante y Antioxidante del glutathion” o “Sistema GSH”. Las vías oxidativas productoras H_2O_2 se representan y explican en la siguiente figura.

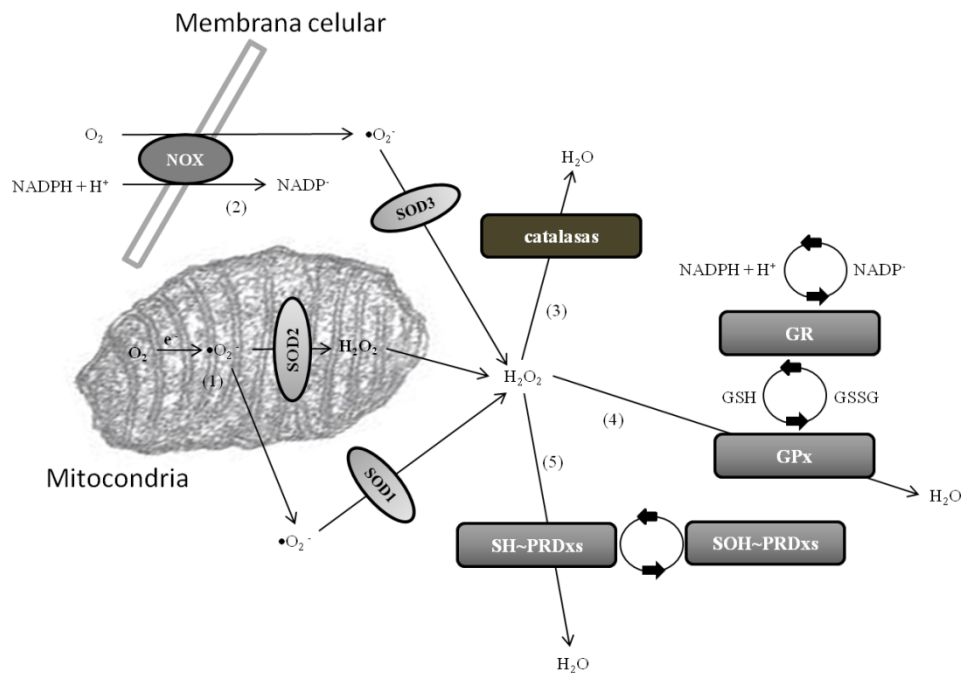


Figura 7. Vías de la homeostasis redox del anión superóxido y el peróxido de hidrógeno que conducen a la formación final de agua. La producción principal de anión superóxido ($\bullet O_2^-$) se encuentra en la matriz mitocondrial (1) o a través de las enzimas NADPH-oxidasa (NOX) (2). Los aniones superóxido se catalizan en peróxido de hidrógeno a través de varias dismutasas de superóxido (SOD): SOD1 o SOD de cobre y zinc del citosol, SOD2 o SOD de manganeso de las mitocondrias, y SOD3 o SOD extracelular. El peróxido de hidrógeno se convierte luego en agua a través de catalasas (3), glutatión-peroxidasa (GPx) (4) y peroxirredoxinas (PRDxs) (5). La glutatión-peroxidasa está integrada en el sistema de glutatión (GSH), donde NADPH actúa como donante de electrones a través de la glutatión-reductasa (GR). GSH se transforma en disulfuro de glutatión (GSSG) que desintoxica las células. Las peroxirredoxinas son tiol (SH ~) peroxidases. El peróxido de hidrógeno oxida la cisteína de los PRDx a ácido sulfénico proteico (SOH ~).
Abreviatura: NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

En la EP, los procesos de estrés oxidativo conducen a muerte neuronal, sobre todo en la sustancia negra. En resumen, las neuronas nigricas dopaminérgicas están expuestas a un ambiente muy oxidativo porque hay un exceso de radicales superóxidos, H_2O_2 , y dopamina-quinonas, productos de un metabolismo acelerado de la DA. También hay un exceso de derivados halogenados, como ácido hipocloroso, por acción de haloperoxidasas. El H_2O_2 en exceso puede dar lugar a radicales hidroxilos citotóxicos, en una reacción catalizada por hierro (reacción de Fenton). Esta reacción puede ser significativa si se reducen los niveles de glutatión o GSH, antioxidante celular, y hay exceso de hierro en forma de óxido férrico (Fe III) o de cobre en forma de óxido de cobre (Cu II), como sucede en la EP. La figura 8 describe y explica los procesos oxidativos exacerbados de estrés peroxidativo en la SN.

Como se observa, el estrés peroxidativo da lugar también a oxidación acelerada de la DA, que origina dopamina-quinonas además del normal derivado ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), sobre todo en SN y núcleos catecolaminérgicos. Estas dopamina-quinonas son tóxicas, y pueden contribuir a la muerte neuronal.

Otra posible vía de producción de dopamina-quinonas es la oxidación de la melanina, sobre todo a partir del metabolismo de la enzima tirosinasa humana (hTyr). Estas dos moléculas se estudian en esta tesis doctoral.

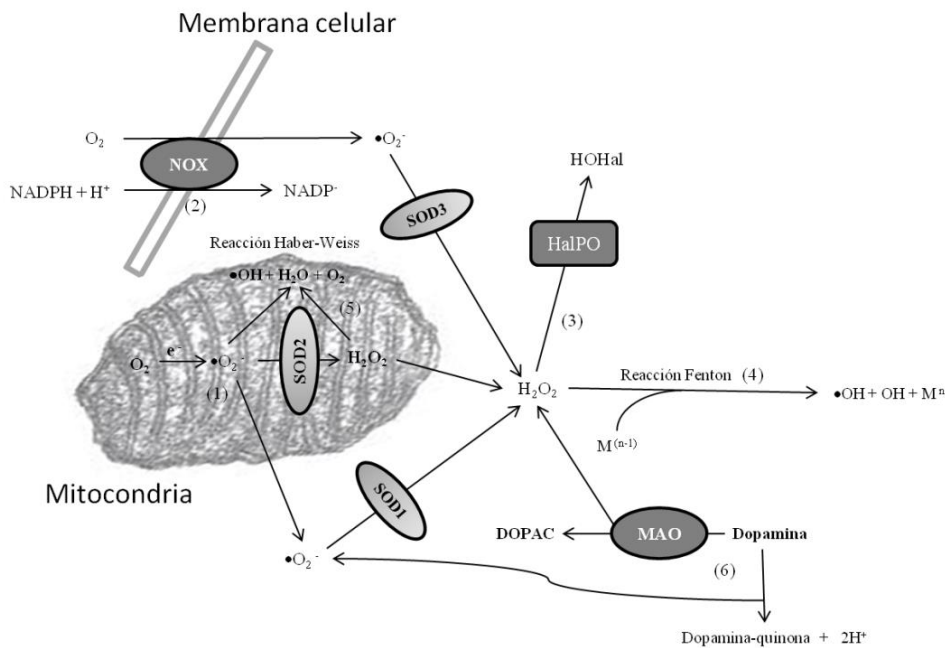


Figura 8. Vías alternativas que se activan después del fallo de H₂O₂. Como se explicó anteriormente, la producción principal de anión superóxido ($\bullet O_2^-$) se encuentra en la matriz mitocondrial (1) o a través de las enzimas NADPH-oxidasa (NOX) (2). Los aniones superóxido se catalizan en peróxido de hidrógeno a través de superóxido dismutasas (SOD). El exceso de peróxido de hidrógeno o su eliminación inadecuada conduce a la acción de haloperoxidasas (HalPO), enzimas que catalizan la formación de ácidos hipohalosos (HOHal) (3), así como a la activación de la reacción de Fenton si hay metales de transición libres (con [n-1] de estructura electrónica) (4). La reacción de Fenton conduce a la formación de especies reactivas como el ion hidroxilo ($\bullet OH$). Además, el exceso de anión superóxido y H₂O₂ dentro de las mitocondrias activa la reacción de Haber-Weiss, otra fuente de especies reactivas (5). Finalmente, en las neuronas dopaminérgicas, células que mueren en el curso de la EP, hay un metabolismo acelerado de dopamina, con sobreproducción de H₂O₂ (bajo la acción de monoamino-oxidadasas o MAO), dopamina-quinonas y $\bullet O_2^-$, todo empeorando el estrés oxidativo (6).

1.4.2 Estrés oxidativo por derivados de la melanina

La EP se caracteriza porque hay una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas pigmentadas del sistema nervioso. La pigmentación neuronal es causada por la melanina neuronal o neuromelanina. Parece ser que el Parkinson se relacionaría con exceso inicial de dopamina, neuromelanina y quinonas de dopamina (metabolito de dopamina oxidada) en las neuronas de la sustancia negra (Zecca et al. 2002; Wang et al. 2019). La producción de neuromelanina estaría exacerbada si hay exceso de DA en el citosol neuronal, y ello da lugar a derivados tipo quinonas de dopamina que inducen muerte neuronal (Sulzer et al., 2000; Hunot y Hirsch 2003; Jenner, 2003; Norris et al., 2005; Paris et al., 2007; Zecca et al., 2008; Dias et al., 2014; Schapira et al., 2014; Navarro-Yepes et al., 2014; Segura-Aguilar et al., 2014; Carballo-Carbajal et al., 2019). La melanina per se podría participar también en la patogénesis de la EP (Metodiewa y Dunford, 1991; Segura-Aguilar 1996; Reszka et al., 1998; Galzigna et al., 2000).

La **hTyr** es la enzima principal requerida para la síntesis de melanina (Körner y Pawelek 1982; Sánchez-Ferrer et al., 1995; Galzigna et al., 2000; Thompson et al., 2000; Pan et al., 2011). Su papel en el sistema nervioso y en la EP es discutido (Foley y Baxter 1958; Xu et al., 1997; Tief et al., 1998; Greggio et al., 2005; Hasegawa 2010). Dicha enzima se estudia en esta tesis doctoral.

La **tirosina** (Tyr) es uno de los veinte aminoácidos que forman las proteínas. Se clasifica como un aminoácido no esencial en los mamíferos ya que su síntesis se produce a partir de la hidroxilación de otro aminoácido: la fenilalanina. Es un precursor de las hormonas del tiroides, de las catecolaminas (adrenalina, DA, noradrenalina) y de la melanina.

En el caso de la DA, la **tirosina-hidroxilasa** (TH) es la enzima que produce la hidroxilación de la Tyr dando lugar a L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) que a su vez por carboxilación (mediada por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos) se convierte en el neurotransmisor DA como podemos observar en la figura 9.

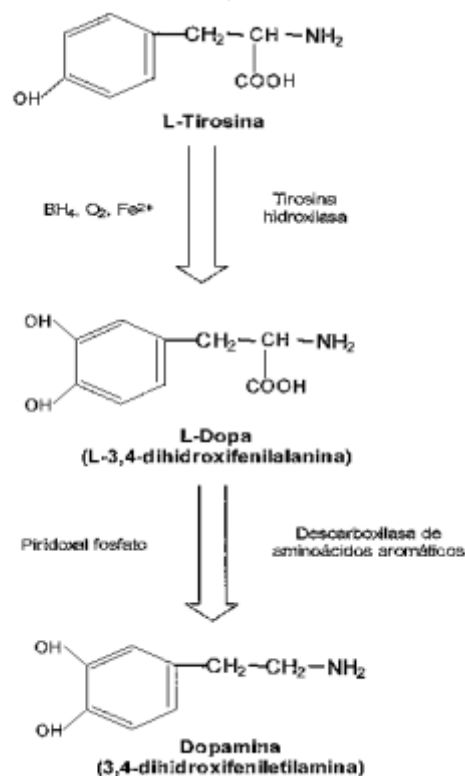


Figura 9. Vía de síntesis de dopamina en neurona dopaminérgica. La síntesis del neurotransmisor tiene lugar en las terminales nerviosas dopaminérgicas donde se encuentran en alta concentración las enzimas responsables, la TH y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o L-DOPA descarboxilasa. La hidroxilación del aminoácido L-tirosina es el punto de regulación de la síntesis de catecolaminas en el sistema nervioso central y la TH es la enzima limitante de la síntesis de la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina. La TH es una oxidasa que utiliza L-tirosina y oxígeno como sustratos y tetrahidrobiopterina como cofactor para adicionar un grupo hidroxilo al aminoácido para formar L-DOPA

Para la conversión de Tyr a melanina se requiere de la participación de la enzima hTyr, como se ha comentado. Los melanocitos normales y las neuronas pigmentadas como las de la SN, convierten la Tyr a dihidroxifenilalanina (DOPA), ésta se convierte en dopaquinona y por oxidación a melanina como muestra la figura 10. Existen dos tipos de melaninas y tres de pigmentos:

- **Eumelaninas:** Es la más común. Tienen un color negro o pardo y proporcionan una coloración oscura. Contienen azufre.
- **Feomelaninas:** son pigmentos amarillos o rojizos que aportan mayor cantidad de azufre que las eumelaninas y producen una coloración clara.
- **Tricocromos** (denominados anteriormente tricosiderinas) son pigmentos producidos por la misma ruta metabólica que la eumelanina y feomelanina pero a diferencia de ellas tienen bajo peso molecular. Se los encuentra en algunas formas de cabello pelirrojo.

La neuromelanina (eumelanina del sistema nervioso) es el pigmento oscuro presente en las neuronas que recubren cuatro núcleos del cerebro: SNpc, *locus coeruleus*, el núcleo dorsal motor del nervio vago (nervio craneal X) y la parte media del núcleo del puente de Varolio. Tanto la SN como el *locus coeruleus* pueden identificarse fácilmente en una autopsia debido a su pigmentación oscura; en los humanos este núcleo no se encuentra pigmentado en el nacimiento, sino que el pigmento aparece tras la madurez. La pérdida de color en el núcleo del cerebro se ha observado en ciertas enfermedades neurodegenerativas.

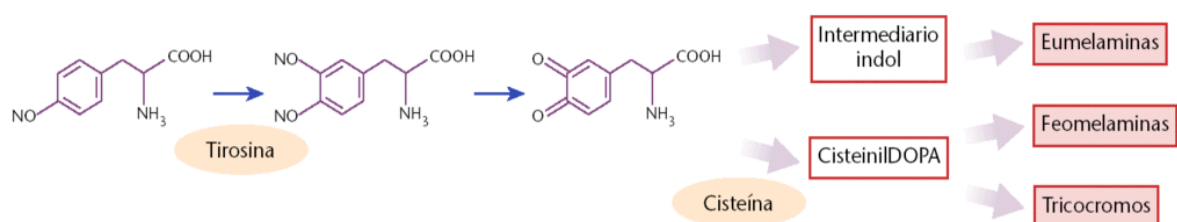


Figura 10. Vía de producción de la melanina. Tiene lugar en el interior de los melanosomas a partir de la tirosina. Una sucesión de oxidaciones de tirosina catalizada por la tirosinasa conduce a la síntesis de DOPA para producir, a continuación, un compuesto intermediario común: la dopaquinona. A partir de este punto, dos vías distintas conducen a la formación de las eumelaninas y de las feomelaninas.

1.4.3 Estrés oxidativo por especies reactivas de nitrógeno

Respecto al estrés de ERN, se debe a un exceso de producción de óxido nítrico (NO), generalmente por exceso de superóxido, otras especies reactivas o calcio citosólico que estimulen la óxido-nítrico sintetasa (NOS). El NO puede seguir diversas vías para originar ERN, y las que interesan a esta tesis doctoral y más importantes son la nitración y la S-nitrosilación.

La **nitración** es la formación de proteínas 3-nitrotirosinadas, un producto de la nitración del carbono-3 de la tirosina. El estrés nitrativo se asocia a diversas patologías (*Ischiropoulos, 2009*).

La **S-Nitrosilación** es la incorporación de grupos NO a otra molécula en residuos de cisteína. Generalmente se debe a la exposición a trióxido de nitrógeno en presencia de GSH o a otras proteínas nitrosiladas (trans-nitrosilación). El NO se une a residuos sulfidrilos/tioles de proteínas con cisteínas (P-SH) formándose S-nitrosotioles (P-SNO). Se sabe que existe una S-nitrosilación fisiológica de alrededor de 171 proteínas plasmáticas, lo que sugiere que hay un estado redox basal de nitrógeno. El estrés de ERN daría lugar a la S-nitrosilación de nuevas proteínas o exceso de S-nitrosilación de otras. Este estrés también se asocia a alteración de la estructura y funcionalidad proteica, así como a diversas patologías (*Lipton et al., 1993; Stamler, 1994; Nakamura y Lipton, 2011*). La S-nitrosilación es mediada por nitrosilasas, y es un mecanismo reversible generalmente controlado por denitrosilasas, tiorredoxinas o el GSH (*Anand y Standler, 2012; Benhar et al., 2008*). El estrés S-nitrosilativo se puede detectar porque hay incremento de **proteínas S-nitrosiladas (P-SNO)** o alteraciones de las enzimas nitrorreductasas. La DEHAL1 es una enzima nitrorreductasa que se estudia en esta tesis doctoral.

La nitración es importante en la patogénesis de la EP, pues afecta a las proteínas muy relacionadas con la enfermedad como la α Syn. La α -sinucleína nitrada (3NT- α Syn) es un importante candidato a biomarcador para el estrés nitrativo en la EP, y se estudia en esta tesis doctoral. El metabolismo acelerado de la DA también genera varios agentes nitrativos y puede inducir la agregación de α Syn (*Xu et al., 2002*). Las inclusiones de α Syn en los cerebros de EP pueden marcarse con anticuerpos anti-3-nitrotirosina, lo que

indica que la α Syn es objetivo de nitración (Trojanowski et al. 2008). Esta proteína contiene 140 aminoácidos con cuatro residuos de Tyr (Tyr-39, Tyr-125, Tyr-133, Tyr-136), que se nitrán fácilmente, y se sabe que los aminoácidos nitrados pueden modificar la actividad funcional de la proteína. Por lo tanto, el exceso de nitración de los residuos de tirosina de α Syn reduce su unión a las vesículas y la tasa de degradación (Hodara et al., 2004). La nitración de los residuos Tyr-39 y Tyr-125/136 aumenta la agregación de α Syn, un hecho que se considera importante en la patogénesis de la EP porque la conversión de α Syn soluble en forma agregada insoluble es un factor crucial en esta enfermedad (Yanamandra et al., 2012).

1.4.4 Estrés oxidativo halogenativo

Un tipo de estrés oxidativo de interés para esta tesis doctoral es el halogenativo. Siguiendo la definición clásica, el estrés halogenativo sería causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas halogenadas, y los sistemas de defensa deshalogenantes. Las reacciones de halogenación están mediadas principalmente por las haloperoxidasas, un grupo de enzimas que catalizan la conversión de H_2O_2 en oxiácidos halogenados como el ácido hipocloroso, tras la incorporación de halógenos (Harrison y Schultz, 1976; Dunforb, 1999).

Las fuentes enzimáticas de H_2O_2 más importantes son la NADPH oxidasa (presente en fagocitos sanguíneos, microglía, neuronas y endotelio vascular), monoamino-oxidasas o MAO (MAO-A de neuronas, MAO-B glial y neuronal), ciclo-oxigenasas (COX), y xantino-oxidasas. Los oxiácidos halogenados principales son el ácido hipocloroso (HOCl), hipobromoso (HOBr), hipoyodoso (HOI) e hipofluoroso (HOF).

Diferentes haloperoxidasas median distintos procesos de halogenación. La tabla 2 muestra las principales haloperoxidasas y su localización. Las haloperoxidasas de las células blancas sanguíneas y microglia, en concreto, la MPO y la eosinófilo-peroxidasa (EPO), median la formación de HOCl y HOBr como mecanismos defensivos del organismo. La TPO media la formación de HOI, y está presente en la glándula tiroides, glándulas salivares e intestinales. La LPO cataliza la formación de HOI e HOBr en mucosas y líquidos corporales como saliva y leche, e incluso LCR (Fernández-Espejo y Jiménez-Caballero, 2019). La LPO es una enzima de interés para esta tesis doctoral, y se estudian

sus niveles en saliva y suero. La LPO, además de ser una haloperoxidasa, induciendo derivados halogenados, puede participar en la síntesis de derivados peroxidados de la dopamina como la melanina.

Los oxiácidos halogenados reaccionan a su vez con aminoácidos, proteínas, lípidos y aminas biógenas, dando productos halogenados. Los oxiácidos son degradados principalmente por deshalogenasas (Harrison y Schultz, 1976; Dunforb, 1999; Witko-Sarsat et al., 2003; Yap et al., 2007; Curtis et al., 2011). Entre los aminoácidos halogenados, aquellas que se derivan de Tyr son de sumo interés para la EP, como clorotirosinas o yodotirosinas, pues estas sustancias han demostrado toxicidad sobre neuronas de DA (Scholz et al., 2008; Garcia-Moreno et al., 2013). Los aminoácidos clorados, como clorocisteína o clorolisina, también dañan las neuronas de DA al alterar las proteínas de membrana (Robaszkiewicz et al., 2008). Dentro de la familia de proteínas halogenadas destacan las proteínas modificadas por hipoclorito y los productos proteicos con oxidación avanzada o AOPP (en inglés *advanced oxidation protein products*). Las proteínas modificadas por hipoclorito suelen sufrir procesos de cloración en residuos de cisteínas. Las AOPP presentan residuos ditirosínicos clorados que forman puentes cruzados, como característica principal (Witko-Sarsat et al., 1996, 1998).

Tabla 2. Principales haloperoxidasas, localizaciones corporales y principales haluros y pseudohaluros que oxidan

<i>Haloperoxidasa</i>	<i>Localización</i>	<i>Haluros y pseudohaluros que oxidan</i>
Mieloperoxidasa (MPO)	Neutrófilos, macrófagos, microglia	Cl ⁻ , I ⁻ , SCN ⁻ , Br ⁻
Eosinófilo-peroxidasa (EPO)	Eosinófilos, mucosa intestinal	Cl ⁻ , I ⁻ , SCN ⁻ , Br ⁻
Lactoperoxidasa (LPO)	Glándulas salivares, glándulas lacrimares, mucosa gástrica, mucosa intestinal, células ductales de la mama, cerebro	I ⁻ , SCN ⁻ , Br ⁻
Peroxidasa salivar (SPO)	Glándulas salivares y lacrimares	I ⁻ , SCN ⁻ , Br ⁻
Tiroperoxidasa (TPO)	Tiroides, tejidos extratiroideos	I ⁻ , Br ⁻

Abreviatura: Cl⁻: cloruro; Br⁻: bromuro; I⁻: yoduro; SCN⁻: tiocianato (pseudohaluro).

Los oxiácidos halogenados también pueden reaccionar con lípidos, dando lugar a moléculas altamente oxidantes, así como con aminas biógenas, alterando de esta forma su funcionalidad. La acción sobre lípidos es de amplio espectro, y es capaz de modificar lípidos vitales para el sistema nervioso (*Nusshold et al., 2010*). Así, la acción sobre el colesterol da lugar a halohidrininas de colesterol y colesterol diclorinado. La acción sobre fosfolípidos da lugar a halohidrininas y haloaminas. La acción sobre las glicero-fosfoetanolaminas da lugar a aldehídos grasos halogenados altamente oxidantes. Los principales derivados halogenados, y que se relacionan con la neurodegeneración, se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Principales derivados halogenados que participan en la neurodegeneración

<i>Tipo de molécula</i>	<i>Derivado halogenado</i>
Aminoácidos	Cloro-tirosinas, yodo-tirosinas, cloro-cisteína, cloro-lisina
Proteínas	Proteínas modificadas por hipoclorito, productos proteicos con oxidación avanzada o AOPP, proteínas oxidadas en metioninas
Lípidos	Halohidrininas de colesterol, colesterol diclorado, halohidrininas de fosfolípidos, haloaminas, clorohidrininas, 2-clorohexadecanal

1.4.5 Las deshalogenasas

En la generación del estrés halogenativo existe una descompensación entre la formación de compuestos halogenados y la actividad de los mecanismos deshalogenantes. Entre los mecanismos deshalogenantes se encuentra el sistema del glutatión, ya descrito, y otros, como por ejemplo las enzimas catalasas (CAT) y DEHAL. Estas enzimas tipo DEHAL participan en la degradación de oxiácidos de halógenos a hidrácidos, y también en la degradación de haloaminas y haloaminoácidos.

Dentro de las deshalogenasas, destacamos las yodotirosina-desyodasas (IYD). Estas enzimas presentan 2 isoformas principales DEHAL1 y 1B, y pertenecen al grupo de enzimas oxidorreductasas, codificadas por el gen *IYD* en humanos (*Fernández-Espejo, 2019*). Además del dominio deshalogenasa, la DEHAL1 posee un dominio nitrorreductasa, cuya actividad depende de la flavina como grupo protéico (*Iglesias et al., 2014; Moreno et al., 2008*). La DEHAL1 se encarga de la liberación del yoduro a partir

de mono y diyodotirosina, proceso que permite la reutilización del yoduro en el proceso de síntesis de las hormonas tiroideas. También actúa en tejidos extratiroideos, como las glándulas salivares.

La DEHAL1 nativa se encuentra anclada en la membrana celular mediante una única secuencia N-terminal, y emplea el NADPH reductor de forma indirecta a través de la acción coordinada de una reductasa (Moreno y Visser, 2010). DEHAL1 se sitúa en el cromosoma 6 humano, y se organiza en 6 exones. Su máxima expresión se encuentra en el tiroides, aunque también lo hace, en niveles más bajos, en hígado y riñón y fluido gastrointestinal (en esta tesis doctoral se estudia en la saliva). El ARNm de DEHAL1 se regula por el nucleótido adenosín monofosfato cíclico (AMP_c) estimulado por la hormona estimulante del tiroides (TSH), así como por la administración de yoduro. Existen varias en el ARNm de DEHAL1 generadas por splicing alternativo. La isoforma A, que es la más abundante en el tiroides, codifica la proteína con actividad desyodasa, mientras que las isoformas B y C, generan formas inactivas (Iglesias et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, en los procesos de estrés halogenativo se produce tanto un exceso de compuestos oxidantes como un déficit en los mecanismos de protección frente a los mismos. La alteración de la acción deshalogenante resulta de interés, ya que algunos aminoácidos halogenados, como yodotirosina, parecen ser sustancias con toxicidad sobre las neuronas dopaminérgicas (Fernández-Espejo y Bis-Humbert, 2018). En esta tesis doctoral se estudia los niveles de DEHAL1 en suero y saliva de pacientes con EP y su relación con variables clínicas.

Es preciso resaltar que en los pacientes de EP se detectan anomalías de interés relacionadas con el manejo y metabolismo de halógenos. Ejemplo de ello son, el incremento en la actividad y/o niveles de haloperoxidasas como TPO y LPO, así como disfunción de DEHAL (Choi et al., 2005; Yap et al., 2007; Nushold et al., 2010; Navarro-Yepes et al., 2014; Fernández Espejo et al., 2014; Fernández Espejo, 2106). Las TPO y LPO sintetizan halotirosinas, utilizando haloácidos como hipoyodito o hipoclorito como intermediarios y dadores de halógenos (Navarro-Yepes et al., 2014; Choi et al., 2005; Fernández Espejo et al., 2014). Las DEHAL degradan halotirosinas y haloácidos (Choi et al., 2005; Moreno y Visser, 2010; Iglesias et al., 2014). En modelos animales de

párkinson, la eliminación de la MPO mejora el cuadro motor y lesional nigroestriado (Choi et al., 2005).

En la EP se ha determinado una cantidad elevada de MPO en el tejido cerebral de los enfermos (Choi et al., 2005; Teissman, 2014) o de TPO en suero y de LPO en LCR (Fernández Espejo et al., 2014, 2019). Otros autores han postulado incluso que la LPO podría detectarse en tejido cerebral (Everse y Coates, 2004). Como se ha comentado, la LPO puede inducir derivados peroxidados de la DA, como la melanina, la cual, puede participar también en la patogénesis de la EP (Metodiewa and Dunford, 1991; Segura-Aguilar 1996; Reszka et al., 1998; Galzigna et al., 2000). En esta tesis doctoral se estudia la presencia de LPO en suero y saliva de enfermos de EP.

Los pacientes de Parkinson sufren también de estrés halogenativo, principalmente clorado, a nivel cerebral y diversos fluidos, caracterizado por el exceso de productos proteicos halogenados, 3-clorotirosina y proteínas y aminos modificadas por hipoclorito (Choi et al., 2005; Yap et al., 2007; Nushold et al., 2010; García-Moreno et al., 2013). La fuente enzimática principal de agua oxigenada es la NADPH oxidasa. Se sabe que la NADPH oxidasa está regulada al alza en la EP (Gao et al., 2003). De hecho, la hiperactividad de esta enzima facilita la degeneración en modelos animales de EP como el de rotenona y el de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina o MPTP (Gao et al., 2003). Entre los productos proteicos halogenados, destacan las AOPP. Las AOPP se detectan en casi 1/3 de pacientes de EP en el LCR, cuando es indetectable en sujetos sanos (García-Moreno et al., 2013). Las AOPP se pueden conjugar con la albúmina sérica humana (HSA) dando lugar a aductos AOPP-HSA. Estos aductos pueden estimular la producción de factores inflamatorios a través de la “activación” de neutrófilos, monocitos y linfocitos. La rotura anómala de las proteínas halogenadas, mediada por un sistema ubiquitina-proteosoma alterado, podría dar lugar a su vez a amidas tóxicas para las neuronas (Mani et al., 2007).

Un reciente artículo, pone de manifiesto que el HOCL puede reaccionar con la dopamina, y precipitar en forma de agregados clorados similares a la neuromelanina (Jeitner et al., 2015). Además, el HOCl da lugar a cloro-dopamina, sustancia tóxica al menos para el ratón pues daña la SN de un modo similar al de la MPTP (Jeitner et al,

2016). Es conocido que en ratones tratados con MPTP, los niveles de proteínas modificadas por hipoclorito se incrementan en el tejido cerebral (*Choi et al., 2005*).

También nuestro grupo de investigación ha aportado otros datos de la existencia de estrés halogenativo en los pacientes, pues el 30% de los pacientes estudiados muestran niveles elevados de TPO en suero (*Fernández Espejo et al., 2014*). La tiroperoxidasa media la síntesis de yodotirosinas y yodoproteínas, aunque no se han detectado aumentos de estas moléculas yodadas en suero o LCR de los pacientes. La TPO es abundante en la glándula tiroidea, la cual, ha sido vinculada con la EP por varios autores. Así se ha detectado una mayor prevalencia de disfunción tiroidea en los pacientes de EP, y es frecuente detectar denervación simpática en la tiroides, un “sello” de la enfermedad que ocurre en diversos órganos de la economía (*García-Moreno y Chacón, 2002; Matsui et al., 2005; Tandeter et al., 2001; Tipre y Goldstein, 2005*). También la TPO sérica puede tener un origen extratiroideo glandular. Conviene recordar que en la EP existe denervación simpática en tejidos glandulares como las glándulas salivares (*Del Tredici y Braak, 2012*). Es posible que un exceso de TPO, ácido hipoyodoso y derivados yodados pueda afectar el curso de la EP.

1.4.6 Estrés oxidativo y daño de la sustancia negra

El estrés oxidativo, en sus diversas vertientes, ocasiona daño en proteínas, lípidos, ADN/ARN y glúcidos en SN. Así los niveles de proteínas nitradas y carboniladas, marcadores de oxidación proteica, están aumentados más de dos veces en la sustancia negra de enfermos de EP. Los niveles de hidroperóxidos lipídicos, marcadores de oxidación de lípidos, están aumentados diez veces. La 8-hidroxiguanosina, un marcador de ARN y ADN oxidado, también está aumentada en la SN más de tres veces.

El fuerte estrés oxidativo en la SN (y otras estructuras) lleva a un plegamiento anormal de proteínas como la α Syn y la parkina (*Wang et al., 2010*). La pérdida de α SYN (que precipita en forma de cuerpos y neuritas de Lewy) también altera la normal función vesicular llevando a un exceso de DA intracelular, que contribuiría a aumentar el estrés oxidativo. Además, la acumulación de α Syn anormal puede saturar y perjudicar la función de la vía de la UPP, que como se ha dicho anteriormente, es un sistema celular

que normalmente degrada proteínas anómalas, mal plegadas o dañadas. La neurodegeneración se puede explicar por el estrés oxidativo y el plegamiento anormal de α Syn que conduce a su agregación y la alteración de la UPP, aunque otros mecanismos como disfunción mitocondrial, citotoxicidad e inflamación parece ser que también participan. El estudio de posibles alteraciones en los niveles de proteínas como la α Syn, es un parámetro de estudio de gran relevancia para discernir las posibles causas de la enfermedad y la consecución de una terapéutica eficaz.

1.5 Clínica de la enfermedad de Parkinson

La clínica de la EP se puede dividir en dos grandes grupos: *la motora y premotora*. La motora es la que comúnmente define a la EP. En esta fase destacamos la acinesia/bradicinesia, el temblor, la rigidez y los trastornos posturales (Hoehn M et al., 1967). Al inicio la afectación es unilateral, posteriormente se hace bilateral, afecta a tronco, comienzan el deterioro cognitivo y la dependencia física/psíquica y finalmente se alcanza un grado de demencia con invalidez que culmina con el fallecimiento. Esta fase motora y progresiva se corresponde con los diferentes estadios de Hoehn-Yahr (ver Anexos). Además, existe una correlación entre la clínica y la neuropatología (Del Tredici K et al., 2002), siendo diferente en la fase premotora y motora como muestra la figura 11.

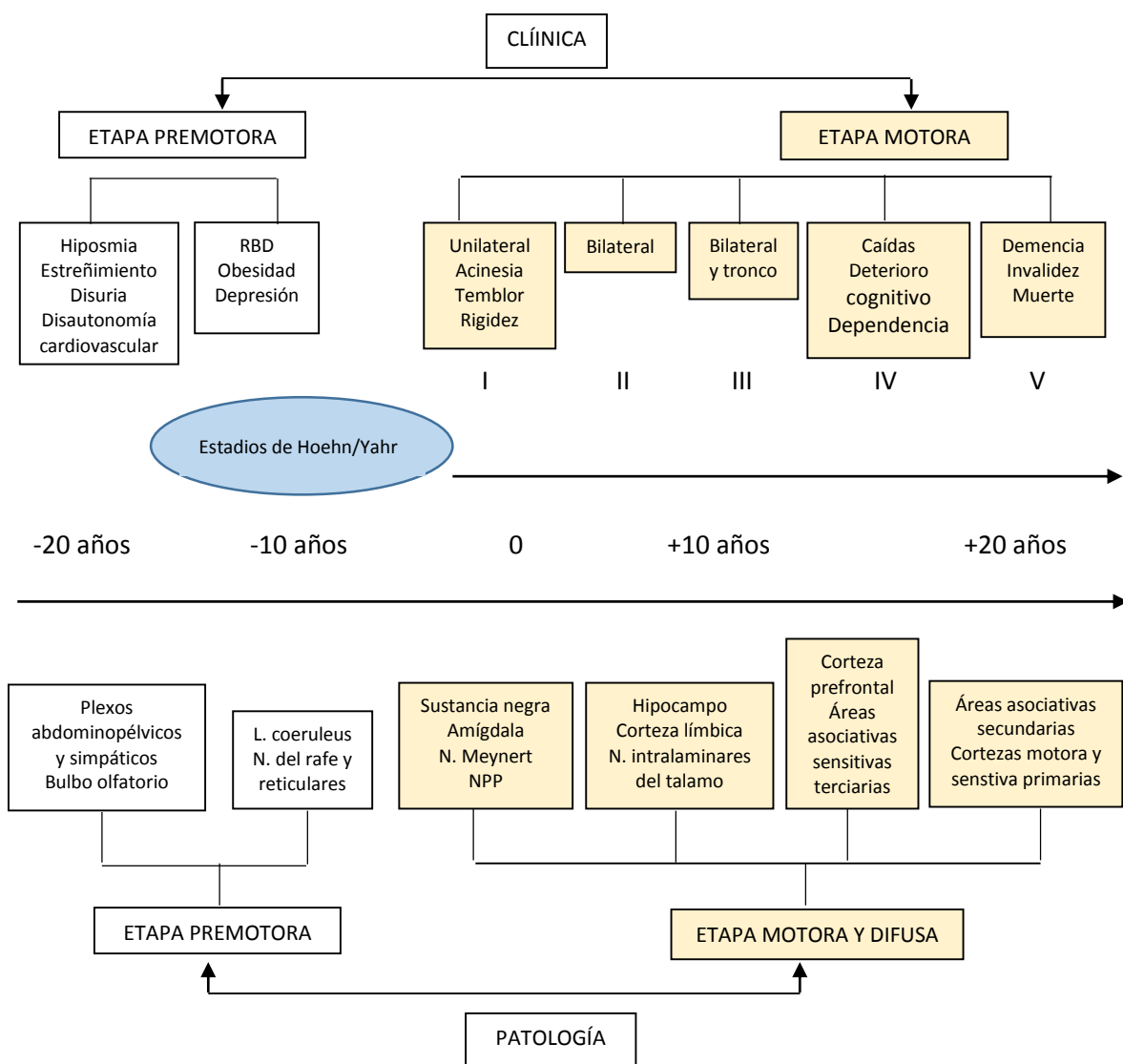


Figura 11. Esquema de la posible historia natural clínica y patológica de la EPI. (Tomado de Zarranz J.J. Neurología. ELSEVIER, 6ª Ed. 2018).

Abreviatura: NPP, núcleo pedúnculo pontino

1.5.1 Fase motora y difusa de la enfermedad.

Al inicio pueden ser muy insidiosos, ambiguo y retrasar el diagnóstico de la enfermedad. Las zonas que se principalmente se afectan son diferentes a las de la fase premotora. Entre ellas destaca la SN (principal afectación en los síntomas cardinales como el temblor y la acinesia), el hipocampo y corteza prefrontal (responsables del deterioro

cognitivo asociado), la corteza límbica (relacionada con los trastornos de comportamiento) y las áreas asociativas secundarias junto con la corteza motora y sensitiva (promotoras de las apraxias) (Maetzler W et al., 2009).

Temblor. Es el signo más típico y más fácilmente reconocido de la enfermedad. El temblor de reposo a 4-6Hz es la forma más frecuente de presentación, y durante su evolución ocurre hasta en el 70% de los casos. Se produce por una contracción alternante de músculos agonistas y antagonistas.

Es principalmente distal, afecta sobretodo a extremidades superiores y, con menor frecuencia, labios, mentón, lengua y extremidades inferiores. Es característico que desaparezca con el movimiento y que vuelva a aparecer con el reposo posterior. El clásico temblor de “contar monedas” se produce por un deslizamiento del dedo pulgar de la mano sobre los otros dedos. El temblor cefálico es raro en la EP por lo que es útil para el diagnóstico diferencial con el temblor esencial (Rizzo G et al., 2016).

Puede verse afectado por diversas circunstancias y aumentar con el nerviosismo o al realizar movimientos repetidos con el miembro contralateral. Es más evidente en miembros superiores durante la marcha. Suele desaparecer durante el sueño. Conforme la enfermedad progresa, se hace más persistente y aumenta de amplitud.

Muchos pacientes presentan además temblor postural o de acción a 6-8hz, suele ser de grado leve-moderado y se observa sobre todo en estadios avanzados.

Rigidez. Es la resistencia pasiva al desplazamiento de las articulaciones. Encontramos diferentes tipos: “en tubo de plomo” (aquella sostenida durante todo el desplazamiento o movimiento completo) y “en rueda dentada” (entrecortada en diente de sierra, combinación de rigidez y temblor).

Suele ser más evidente en los segmentos distales de las extremidades (muñecas y tobillos). El paciente debe estar completamente relajado para su exploración. Si a pesar de conseguir esta situación, no se objetiva la rigidez en la exploración, podemos pedir al paciente que ejecute movimientos de activación con la extremidad contralateral (abrir y cerrar la mano) para detectar un aumento de tono muscular.

Bradicinesia. Se define como la lentitud en la ejecución del movimiento, con la reducción progresiva de la amplitud y velocidad de los movimientos repetitivos. Se asocia frecuentemente a la rigidez, disminución de la voz, inesprexividad facial, reducción del parpadeo, micrografía y reducción de braceo durante la deambulaci3n.

Las maniobras que com3nmente se utilizan para su exploraci3n son la apertura y cierre del pu3o, la pronosupinaci3n de la mu3eca, el golpeteo con los dedos de la mano en una superficie, el contar oponiendo el pulgar a los dem3s dedos de la mano y la maniobra de tapping Miller-Fisher (oponer y separar el pulpejo del dedo pulgar al del dedo 3ndice consiguiendo m3xima amplitud del movimiento). Para los miembros inferiores se solicita al paciente que golpee el suelo con la planta del pie intentando levantarlo al menos un palmo. M3s distalmente se examina la capacidad de golpeteo en el suelo con la punta de los dedos o con el tal3n dejando la parte opuesta del pie fija. En todas estas exploraciones deben evaluarse no s3lo la rapidez de ejecuci3n del movimiento, sino tambi3n su amplitud y ritmicidad.

Podemos hacer referencia a diferentes t3rminos en funci3n del grado y tipo de afectaci3n (*Rizzo G et al., 2016*): la acinesia ser3a la dificultad para iniciar un movimiento y, por tanto, la ausencia del mismo; la hipocinesia ser3a la disminuci3n de la amplitud del movimiento; la acronocinesia, la p3rdida del ritmo y, con ello, la dificultad para realizar movimientos simult3neos y secuenciales; y la bradicinesia, propiamente dicha, ser3a la lentitud de los mismos.

Trastornos posturales. Los trastornos posturales no suelen ser evidentes en fases precoces. El paciente tiende a optar una postura en flexi3n del cuello y tronco, los brazos tambi3n est3n ligeramente flexionados y m3s pegados al cuerpo. Normalmente son un signo de enfermedad avanzada, pero se puede ver en fases iniciales. Sin embargo, en otras ocasiones, si la desviaci3n del tronco (s3ndrome torre de Pisa) o del cuello hacia delante (anterocolis) son muy marcadas y precoces pueden ser un s3ntoma de parkinsonismo plus como la atrofia multisistema (AMS). Se denomina camptocormia a la postura de flexi3n casi total por la cintura durante la bipedestaci3n (pero si el paciente se acuesta, la espalda se extiende por completo). Est3 presente entre el 6-20% de los

enfermos, y se relaciona con la gravedad de la enfermedad y con otras manifestaciones como caídas y deterioro cognitivo.

Trastornos de la marcha. Suele haber dificultad para iniciar y cesar la marcha. Los pasos son cortos y se pueden acelerar sin control (festinación) sobre todo si es pendiente hacia abajo. Los giros son fragmentados y se acompañan de inestabilidad y posibles caídas. Las caídas suelen ser hacia adelante cuando el paciente festina o se quedan los pies pegados al suelo (fenómeno de imantación), o hacia atrás cuando gira o se incorpora de una silla. Los trastornos graves suelen ser síntomas tardíos. Su aparición precoz nos debe hacer pensar en otros parkinsonismos (*Postuma RB et al., 2015*) como la parálisis supranuclear progresiva (PSP). Se pueden acentuar al atravesar una puerta, cruzar un paso de peatones o un pasillo estrecho.

Otros síntomas menos característicos son (*Maetzler W et al., 2009*):

Anomalías oculares. Entre ellas destacan: el reflejo glabellar inagotable, el cierre involuntario de los párpados (befaroespasma y/apraxia ocular), sacadas hipométricas, dificultades para la convergencia y mirada conjugada vertical hacia arriba. Las anomalías oculomotoras graves nos deben hacer pensar en un parkinsonismo plus.

Acatisia. Necesidad imperiosa de moverse que incapacita al paciente para aguantarse en una postura durante más de unos segundos, sea sentado, de pie o en la cama. Se acompaña de un constante desasosiego o ansiedad. Es leve al inicio de la enfermedad, pero intensa en las fases avanzadas sobre todo en los periodos off o durante la noche. También es muy frecuente en los parkinsonismos por neurolépticos.

Trastornos del habla. Entre ellos destacamos la hipofonía, palilalia y taquifemia. De forma genérica, el lenguaje de los pacientes con EP consiste en una voz baja con una articulación imprecisa y con estallidos de lenguaje rápido alternando con periodos de silencio. En algunos pacientes la taquifemia puede incluso empeorar con la levodopa.

Trastornos del control de impulsos. Suelen verse como complicaciones a diversos tratamientos en la EP (agonistas dopaminérgicos, levodopa o estimulación cerebral profunda). Se manifiesta con comportamientos inadecuados como ludopatía, hiperfagia, hipererotismo, promiscuidad sexual y cleptomanía. Su explicación fisiopatológica es la disfunción dopaminérgica en el sistema frontoestriatal especialmente el izquierdo.

Psicosis. Se manifiestan como alucinaciones visuales, ideas delirantes, falsos reconocimientos, agresividad y agitación. Se debe fundamentalmente a la disfunción de los circuitos de las funciones ejecutivas, del sistema mesolímbico y las cortezas asociativas visuoespaciales. Suelen ocurrir en estadios avanzados y como resultados de varios factores como trastornos del sueño, depresión y deterioro cognitivo.

Demencia. Aproximadamente el 80% de los pacientes con más de 15-20 años de evolución presenta una demencia subcortical. Los principales factores de riesgo para la demencia son: edad avanzada, depresión mayor y acinesia como rasgo predominante. Sin embargo, la aparición de demencia precoz debe hacer sospechar de un parkinsonismo plus, la demencia por CL (DCL). Ambas entidades forman parte del mismo proceso patológico, pero con diferencias genéticas y neuropatológicas (*Rizzo G et al., 2016*). La DCL suele ser una sinucleinopatía mientras que la demencia de EP suele ser multifactorial (enfermedad vascular, degeneraciones neuronales como EA, farmacológica, extensión de α SYN a la corteza cerebral). Hay que tener en cuenta que una densidad elevada de CL y NL, no se corresponde con un mayor riesgo de demencia (*Postuma RB et al., 2015*).

1.5.2 Fase premotora

Estudios SPECT con el radioligando ^{123}I -loflupano, específico del transportador de dopamina (DAT), indican que la EP es una enfermedad de larga duración. Después de un análisis cuidadoso de la caída exponencial del principal parámetro SPECT, el SUR o *specific uptake ratio*, hay un acuerdo que existe una fase premotora que comienza de 4 a 10 años antes de la aparición de síntomas motores. Esta fase se caracteriza por la

presencia de alteraciones no motoras, o “premotoras”, de baja intensidad, en las que destaca el estreñimiento, hiposmia/anosmia, desorden del sueño, o disfunciones sexuales (Fearnley and Lees 1991; Schwarz et al 2004; Reichman, 2017). Muchas manifestaciones clínicas premotoras son de naturaleza vegetativa, y sugieren una afectación temprana del sistema nervioso autónomo (disfagia, disartria, hipotensión ortostática, sialorrea, etc) (Fahn y Halliday, 2011). En esta tesis se valoran síntomas no motores y su relación con diversas moléculas relacionadas con estrés oxidativo y la EP. Para ello, se ha empleado una escala premotora que recoge los síntomas no motores más frecuentes (ver Anexos).

Por otra parte, la caída exponencial de la señal SPECT también indica que hay una fase prodrómica antes de la premotora, que comienza hasta 20 años antes del diagnóstico motor (Schwarz et al 2004). Esta fase estaría libre de síntomas clínicos, pero el daño neuronal ya se ha iniciado. En realidad, cuando aparecen los déficits motores que llevan al paciente a ver al médico, la muerte neuronal en la sustancia negra es superior ya al 50%.

Los síntomas premotores más comunes son los siguientes:

Fatiga. Es muy común la fatiga o el cansancio excesivo con esfuerzos leves. Se acentúa con el calor y se puede combinar con la somnolencia diurna.

Alteraciones vegetativas. El “fallo disautonómico puro” es un síndrome que tiene como base una sinucleinopatía y que con el tiempo puede evolucionar hacia una EP, AMS o incluso una demencia. El primer trastorno disautonómico es la pérdida de arritmia sinusal respiratoria por denervación cardíaca junto con la hipotensión ortostática que no suelen ser sintomáticas. En ocasiones son causas de síncope y se relacionan con mayor frecuencia con la AMS. La disautonomía cardíaca en EP es posganglionar y se detecta una denervación cardíaca en el SPECT-MIBG y preganglionar en la AMS (SPECT-MIBG normal). La hiperactividad del detrusor también es frecuente provocando polaquiuria con urgencia miccional. Como complicaciones, encontramos las infecciones urinarias de repetición, cólicos renales y el reflujo vesicouretral. La sialorrea se debe a la hipocinesia de la deglución. La seborrea se debe al aumento de la secreción grasa del

sudor por alteración de las glándulas sudoríparas, pero también como consecuencia del tratamiento con levodopa. El estreñimiento es casi universal en la EP junto con la gastroparesia; si bien pueden estar presentes antes que la sintomatología motora, también pueden ser consecuencia del tratamiento con levodopa. La disfunción eréctil es frecuente, pero no es tan precoz ni tan intensa como en la AMS.

Trastornos afectivos. La ansiedad y depresión son los más comunes. Ambos trastornos pueden ser reflejo de las alteraciones neuroquímicas (serotoninérgicos) de la enfermedad como reactivos a las limitaciones propias de la enfermedad.

Hiposmia. Es uno de los síntomas más característicos y puede preceder en varios años a los motores. Desde fases muy precoces, hay depósitos de α Syn en el bulbo olfatorio, pero la anosmia se correlaciona mejor con la pérdida neuronal en la vía olfatoria central. Rara vez el paciente lo expresa de forma espontánea.

Trastornos cognitivos. Son frecuentes en los estadios iniciales de la enfermedad. Afecta sobre todo a funciones frontales siendo la clínica muy diversa como retraso en la integración y ejecución de órdenes y pensamientos aunque las respuestas sean correctas, dificultades en la planificación, ejecución e iniciación de conductas voluntarias, disminución de la fluencia verbal y alteración del aprendizaje y del recuerdo.

Dolor y trastornos sensitivos. Aunque no hay afectación del sistema nervioso periférico, es frecuente observar alteraciones sensitivas cinestésicas. Más del 50% refieren dolor, entumecimiento, parestesias en brazos, piernas o espalda. El dolor es de tipo musculoesquelético (bursitis, tendinitis, algias generalizadas) diferenciándolo del distónico (en periodos off o distonías de la enfermedad).

Alteraciones visuales. Algunas alteraciones en la agudeza visual, contraste o color, son precoces, subclínicas, y asociadas a alteraciones dopaminérgicas retinianas. Posteriormente comienzan con alteraciones visuales centrales como la percepción de objetos, integración visuoespacial, movimiento de las caras, etc.

Alteraciones del sueño. El sueño tiende a estar fragmentado en fases precoces de la enfermedad. Es frecuente el sueño REM sin atonía, base del trastorno de conducta del sueño REM (sueños vívidos asociados con comportamientos simples o complejos durante el sueño REM), que puede preceder en años a la sintomatología motora. Con el avance de la enfermedad, el sueño REM se reduce y son muy frecuentes los movimientos periódicos de piernas y síndrome de piernas inquietas. Además, la calidad del sueño es baja por coexistencia de diferentes factores: calambres, distonías off, nicturia.

1.6 Diagnóstico de la enfermedad de Parkinson

El diagnóstico de la EP es fundamentalmente clínico. Habitualmente se realiza con retraso dada la sutil e inespecífica presentación clínica que puede tener al inicio. En la tabla 4 se muestra las principales patologías con las que se hace su diagnóstico diferencial (*Südemeyer M et al., 2011*). Desde el punto de vista **clínico**, la herramienta más usada es la escala UPDRS (ver Anexos) que permite valorar y cuantificar los signos y síntomas de la EP. Valora el estado motor, cognitivo y las actividades de la vida diaria del paciente (AVD). Se suele usar junto a otras escalas como la de Hoehn y Yahr y la Schwab y England que estiman etapa motora y dependencia en las AVD del paciente respectivamente (ver Anexos).

La UPDRS consta de 4 partes:

- I. Cognición, estado de ánimo y conducta
- II. Actividades de la vida diaria
- III. Examen motor
- IV. Complicaciones del tratamiento en la última semana

La tercera parte, que corresponde al examen motor, es la más empleada en las consultas de práctica clínica habitual. El resto de información se suele obtener en la anamnesis que se realiza durante la entrevista médica.

Sin embargo, en muchas ocasiones nos ayudamos de las **pruebas complementarias** que nos aproximan al diagnóstico con una gran fiabilidad, aunque el diagnóstico definitivo es anatomopatológico. Fundamentalmente estas pruebas complementarias nos permiten excluir otras causas *parkinsonianas* (Südemeyer M et al., 2011).

Tabla 4. Causas de Síndrome rígido-acinético

ETIOLOGIA DEL SINDROME RIGIDO ACINÉTICO
<p><u>PRIMARIO</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad de Parkinson idiopático • Enfermedad de Parkinson genéticamente determinada • Otras enfermedades neurodegenerativas <ul style="list-style-type: none"> ○ Atrofia multisistema ○ Parálisis supranuclear progresiva ○ Degeneración corticosubcortical ○ Atrofias palidales progresivas ○ Neurodegeneración con acumulación de hierro ○ Enfermedad Huntington ○ Enfermedad de Alzheimer y otras demencias ○ Parkinsonismo-distonía hereditarios ○ Complejo parkinsonismo-demencia-escleroris lateral amiotrófica de Guam ○ Demencia fronto-temporal/Parkinson (genes MAPT, PGN, FUS) ○ Ataxias dominantes (SCA2 y SCA3)
<p><u>SECUNDARIO</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Postencefalítico • Iatrogénico (farmacológico) • Tóxicos exógenos: manganeso, monóxido de carbono, MPTP, metanol, mercurio • Parkinsonismo del Caribe • Vascular • Encefalopatía postramática crónica • Metabólico: hipoparatiroidismo y calcificaciones hereditarias de los ganglios basales • Encefalopatía portosistemática • Enfermedad de Wilson

Hoy en día, la neuroimagen convencional como la tomografía computarizada (TC craneal) y la resonancia magnética (RM) craneales son las más utilizadas, como se ha comentado antes, para el diagnóstico diferencial con otros parkinsonismos como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Hallazgos característicos en RM cerebral en EP y parkinsonismos atípicos

	EPI	AMS	PSP
RM CONVENCIONAL			
Normal	++	-	-
Atrofia putaminal	-	++	++
Halo hiperintenso putaminal	+	++	+
Hipodensidad putaminal	-	++	-
Atrofia pontina y cerebelo-vermiana	-	++	+
Cambios de señal en protuberancia o pedúnculo cerebeloso medio, incluido el signo de la cruz y/o del santiaguino	-	++	-
Atrofia mesencefálica, incluyendo signos indirectos (silueta del pingüino o colibrí)	-	-	+
PLANIMETRÍA			
Reducción del diámetro mesencefálico anteroposterior	-	+	++
Reducción de la proporción entre área mesencefálica y pontina	-	-	+++
IMÁGENES POTENCIADAS EN DIFUSIÓN			
Aumento de la difusividad putaminal	-	+++	++
Aumento de la difusividad del pedúnculo cerebeloso superior	-	-	+++
RM DE 3 TESLAS			
Hipodensidad putaminal	+	+++	+

Nuevos equipos (RM de alto campo) o técnicas especiales (imágenes con susceptibilidad ponderada o cuantificación de neuromelanina en la SN) parecen prometedores, pero se requieren protocolos estandarizados para aumentar su precisión diagnóstica.

Otra técnica que se utiliza (que requiere personal muy cualificado) es la ecografía transcraneal en la que la SN tiene una importante hiperecogenicidad por acumulación de hierro. Observando este dato en el 87-90% de los pacientes con EPI y en el 8-10% de los sujetos sanos, con una sensibilidad del 90% y especificidad del 82%. Sin embargo, es útil para diferenciar la EPI el temblor esencial con una sensibilidad del 75-91% y una especificidad del 84-94% (Niñerola-Baizán A et al., 2018). Los pacientes con temblor esencial que tienen este signo en la ecografía transcraneal tienen un riesgo relativo de 7 para desarrollar EPI a los 6 años. Varios trabajos han mostrado utilidad para el diagnóstico diferencial con otros parkinsonismos plus. Los hallazgos sonográficos más relevantes se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Hallazgos sonográficos en el diagnóstico diferencial de los parkinsonismos degenerativos.

Hallazgos sonográficos
La hiperecogenicidad de la SN sugiere EPI frente a PSP o AMP
La hiperecogenicidad del núcleo lenticular sugiera AMS o PSP frente a EPI
La dilatación del tercer ventrículo sugiere PSP frente a AMS
La dilatación del tercer ventrículo, junto a normoecogenicidad del a SN, sugiero PSP frente DCB (tercer ventrículo normal e hiperecogenicidad de la SN)
La dilatación del tercer ventrículo, junto a hiperecogenicidad de la SN bilateral sugiere DCL

La tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) se han empleado para el estudio del sistema dopaminérgico pre- y postsináptico, mediante el desarrollo de radiotrazadores específicos que permiten estudiar distintos aspectos de la función dopaminérgica. Los radiotrazadores con afinidad por moléculas que participan en la síntesis de dopamina y por los transportadores de dopamina evalúan la neurona presináptica o nigroestriatal. Los radiotrazadores con afinidad por los receptores dopaminérgicos valoran la integridad de las neuronas postsinápticas. Se ha demostrado que el DaT está presente

exclusivamente en las neuronas que sintetizan dopamina, y por ello es considerado como un marcador específico de estas neuronas en el sistema nervioso central.

De los radiotrazadores de DaT utilizados en SPECT, el I^{123} -FP-CIT (yodo 123I-loflupano) es el más común (DaTSCAN). Estima la densidad de DaT en las terminales del estriado (caudado y putamen), siendo un marcador indirecto de degeneración de la vía nigroestriatal. En los sujetos sanos ofrece una imagen característica del estriado “en forma de comilla”, mientras que en pacientes con EP se va perdiendo de forma asimétrica y progresiva “la cola” (putamen) con mayor preservación de las cabezas de los caudados (Niñerola-Baizán A et al., 2018).

En el PET uno de los más utilizados es la fluorodopa (marcador de la síntesis de dopamina en la terminal dopaminérgica). Ambos detectan un defecto dopaminérgico presináptico pero sin poder distinguir entre los diferentes “parkinsonismos presinápticos” como la EP, AMS o PSP (Morrish PK et al., 1996).

Mediante otros ligandos como yodo-123 iodobenzofurano (SPECT-IBF) y yodo-123-benzamina (SPECT-IBZM) se puede evaluar la densidad de receptores D2 postsinápticos (estriatales). Estos receptores están intactos en la EP pero reducidos en otros parkinsonismos como AMS, PSP o DCB.

Las técnicas de neuroimagen funcional también permiten el estudio del metabolismo cerebral mediante PET con ^{18}F -Fluorodesoxiglucosa (FDG). En la EPI existe un hipermetabolismo del núcleo lenticular (en la porción dorsolateral del putamen), tálamo, protuberancia, cerebelo y corteza sensitivomotora (se normaliza tras el tratamiento dopaminérgico o con la estimulación cerebral profunda). En la AMS se observa un marcado hipometabolismo del putamen, protuberancia y cerebelo; mientras que en la PSP el hipometabolismo se encuentra principalmente en el córtex frontal medial y dorsal, mesencéfalo y protuberancia, además de caudado, putamen y tálamo. En la DCB se observa un hipometabolismo cortical frontoparietal y estriatal y talámico contralateral al hemisferio más afectado. Esta prueba se realiza únicamente en investigación (Escamilla-Sevilla F et al., 2017).

Podemos observar un resumen de los hallazgos en las diferentes pruebas neurofuncionales en la tabla 7.

Tabla 7. Patrones en la neuroimagen funcional (SPECT o PET) de los principales parkinsonismos degenerativos.

ESTUDIO	Sistema dopaminérgico presináptico	Sistema dopaminérgico postsináptico D2	Metabolismo
PATOLOGIA			
EPI	Hipocaptación	Captación normal o aumentada	Hipercaptación
AMS	Hipocaptación	Hipocaptación	Hipocaptación
PSP	Hipocaptación	Hipocaptación	Hipocaptación
DCB	Hipocaptación	Captación normal o reducida	Hipocaptación

La gammagrafía cardíaca también se puede utilizar para el diagnóstico diferencial de otros parkinsonismos. Sin embargo, en la práctica clínica habitual no se lleva a cabo de forma rutinaria. Como se ha comentado anteriormente, se observa una denervación en el SPECT-MIBG en la EP y no muestra alteración en los parkinsonismos. Desde hace décadas, numerosos estudios han confirmado que hay una afectación autonómica cardíaca precoz en la EPI al igual que en otras sinucleopatías, como la demencia con CL. Sin embargo, no es patognomónica, pues puede ocurrir en otras entidades neurológicas (ataxia cerebelo-espinal tipo2), sistémicas (diabetes, hipertensión arterial, cardiopatía isquémica, polineuropatías) o por fármacos (betabloqueantes, trazodona, antidepresivos tricíclicos...).

El LCR es otra fuente de estudio (*Fernández Espejo E et al.,2016*). Se han descritos dos hallazgos importantes (objetos de estudio y mención en esta tesis):

- El nivel total reducido de la α Syn nativa en la EP
- La detección elevada de α Syn anómala (fosforilada) en la EP y otras sinucleinopatías

Estos parámetros actualmente solo se utilizan en investigación. Además, se trata de una prueba invasiva que de momento no se realiza de forma rutinaria.

1.7 Tratamiento en la enfermedad de Parkinson

1. 7.1 Primera línea. Tratamiento farmacológico

La mayoría de los fármacos desarrollados hasta el momento para la EP apuntan a la señalización de la DA con el fin de aliviar los síntomas motores, motivo de consulta de los pacientes con EP. El patrón oro para el tratamiento de los síntomas motores es la levodopa, un precursor de la DA, y lo ha sido desde su introducción a principios de los años 60. Desafortunadamente, el uso a largo plazo de la levodopa (5-10años) no evita la progresión de la enfermedad, siendo ineficaz para algunos síntomas que no responden al estímulo dopaminérgico, asociándose, en general, con complicaciones que pueden resultar incapacitantes (*Scottish Intercollegiate Guidelines Network, 2010*).

Se han desarrollado diferentes agonistas de la dopamina (AD) que proporcionan un control moderado de los síntomas motores y muestran la disminución de la frecuencia de complicaciones motoras. De este modo, y en dependencia de la edad y otros factores del sujeto, se recomiendan los AD para la EP en fase temprana, y, a medida que la EP progresa y alcanza las fases moderada y severa, realizar un tratamiento combinado de levodopa y otros fármacos (*Escamilla-Sevilla F et al., 2017*).

Levodopa. También conocida como L-dopa, es un precursor del neurotransmisor DA. Posee la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, mientras que la DA no la posee, haciéndola ideal como tratamiento para la depleción de la DA endógena en la EPI. Sin embargo, la L-dopa puede ser convertida a DA en el sistema nervioso periférico por la DA carboxilasa antes de alcanzar el sistema nervioso central. Por lo tanto, es administrada en combinación con inhibidores de la DA descarboxilasa (IDDC) para evitar la conversión prematura (*Tomlison CL et al.,2010*). Los IDDC no pueden atravesar la barrera hematoencefálica, de manera que se inhibe la conversión periférica pero no en el sistema nervioso central. Al administrarse junto con la L-dopa, permiten el tratamiento con dosis menores de L-dopa. No se asocian efectos adversos propios a los IDDC. Los efectos adversos comunes de la L-dopa son las complicaciones motoras como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Complicaciones motoras asociadas al tratamiento con levodopa

<p><u>Desgaste:</u> el tratamiento inicial con levodopa DA proporciona 8 horas de alivio sintomático; no obstante, puede haber un efecto de “desgaste” antes de la siguiente dosis. Después de varios años de uso y progresión de la enfermedad, el “desgaste” ocurre más rápidamente tras la administración de la dosis</p>
<p><u>Fluctuaciones motoras:</u> algunos pacientes pueden experimentar fluctuaciones súbitas en el control motor, que pueden no estar relacionadas con el momento de la toma. Este fenómeno se denomina fluctuación motora impredecible o fenómeno “on-off”</p>
<p><u>Discinesias:</u> algunos pacientes experimentan movimientos involuntarios anormales (discinesias), de los cuales hay múltiples tipos, tales como corea o distonía. Los episodios de discinesia corresponden a picos, depresiones (o ambos) de las concentraciones plasmáticas de levodopa, y se observan entre los 5-10 años de tratamiento</p>

Inhibidores de la catecol-orto-metiltransferasa (ICOMT). Los ICOMT inhiben la acción de la catecolortometiltransferasa, enzima que degrada neurotransmisores, entre ellos la dopamina. Se administran siempre en combinación con L-dopa/IDDC para prolongar su vida media, pero no se recomienda como monoterapia. Han demostrado ser efectivos para el tratamiento de las complicaciones motoras del tratamiento con L-dopa por lo tanto son una herramienta adyuvante en la EP avanzada (*Talati R et al, 2009*). Los efectos adversos incluyen orina oscura (anaranjada) y exacerbación de los efectos de la L-dopa.

Agonistas dopaminérgicos (AD). Son pequeñas moléculas que activan directamente los receptores de dopamina, compensando los bajos niveles de dopamina disponibles en el cerebro de un paciente con EP. Se clasifican en dos tipos: ergóticos y no ergóticos. Los AD ergos fuertes son los primeros en desarrollarse, actúan sobre múltiples receptores y provocan importantes efectos secundarios. Los AD no ergóticos se desarrollaron posteriormente, actúan sobre menos tipos de receptores y producen menos efectos adversos. Los AD ofrecen un control moderado de los síntomas motores de la EP y se

asocian en menor grado con complicaciones motoras por lo que son una buena opción para fases precoces y en monoterapia (*Poewe WH et al., 2007*). En general, se usan como tratamiento de primera línea para sujetos jóvenes con EP en fase inicial y como tratamiento coadyuvante en la EP en fase avanzada. Los efectos adversos más frecuentes son: náuseas, edema, hipotensión ortostática sintomática, somnolencia, trastornos en control de impulsos y alucinaciones.

Inhibidores de la monoaminoxidasa tipo B (IMAO-B). Este grupo farmacológico inhibe la acción de las enzimas monoaminoxidasa tipo B, responsables de la degradación de la dopamina. La mayoría de las guías consideran que los IMAO-B mejoran los síntomas motores por lo que pueden utilizarse en monoterapia en fase iniciales o como adyuvante en fases tardías. Los posibles efectos adversos son cefalea, depresión, confusión, estimulante y exacerbación de los efectos adversos de levodopa (*Talati R et al, 2009*).

Amantadina. Es un agonista débil de los receptores de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato). No se conoce su mecanismo de acción en la EP, pero podría modular indirectamente la señalización de dopamina mediante la unión y atenuación de los receptores de glutamato NMDA. Parece eficaz como tratamiento adyuvante a L-dopa/IDDC. Los principales efectos adversos son alucinaciones, confusión, livedo reticularis, náuseas, edema en miembros inferiores, xerostomía, estreñimiento y visión borrosa.

Anticolinérgicos. Son pequeñas moléculas que atenúan la señalización de la acetilcolina y fueron los primeros antiparkinsonianos disponibles. Los científicos postulan que el equilibrio entre acetilcolina y dopamina es importante para el control motor. Debido a que las concentraciones de dopamina caen en los pacientes con EP, la señalización excesiva de acetilcolina contribuye a los síntomas de EP. Aunque la mayoría de las guías recomienda tentativamente los anticolinérgicos como monoterapia o en combinación en fase precoz, si bien advierten que el balance beneficio/efectos secundarios puede ser desfavorable en muchos casos. Los posibles efectos adversos son de tipo cognitivo, entre otros (*Scottish Intercollegiate Guidelines Network, 2010*).

El resumen del manejo de las diferentes opciones farmacológicas en la EP se muestra en la tabla 9

Tabla 9. Fármacos disponibles para la EP

FÁRMACO	MONOTERAPIA	ADYUVANTE	INDICACIÓN
LEVODOPA/IDDC			
Levodopa/carbidopa	Si	Si	Todos los síntomas motores
Levodopa/benserazida	Si	Si	
AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS			
Pramipexol	Si	Si	Todos los síntomas motores
Rotigotina	Si	Si	
IMAO-B			
Selegilina	Si	Pocos datos	Síntomas precoces, leves y fluctuaciones no motoras
Rasagilina	Si	Si	
Safinamida	-	Si	Adyuvante a Levodopa
ICOMT			
Entacapona	-	Si	Fluctuaciones motoras
Tolcapona	-	Si	
Opicapona	-	Si	
INESPECÍFICOS			
Amantadina	Pocos datos	Probable	Disfunción de la marcha y discinesia

1.7.2 Segunda línea. Cirugía cerebral

Ningún método quirúrgico puede curar la EP. La cirugía no puede retrasar la progresión de la enfermedad o regenerar las células nerviosas dañadas. Los pacientes con EP candidatos para la cirugía son generalmente aquellos con síntomas y signos graves, debilitantes o con efectos graves inducidos por la medicación. La estimulación cerebral profunda (ECP) es la técnica estereotáctica actualmente disponible en el manejo de la EP y permite aliviar la gravedad de los síntomas de temblor, distonía,

rigidez, lentitud de los movimientos y trastornos de la marcha asociados con la EP. La ECP se basa en la implantación quirúrgica de un dispositivo médico que envía una estimulación eléctrica hacia áreas determinadas cerebrales para coordinar el movimiento, concretamente al NST y al GPi, si bien algunos estudios han demostrado eficacia sobre el núcleo ventral intermedio del tálamo. En general es preferible la ECP sobre NST ya que requiere una menor dosis diaria de medicación dopaminérgica y la eficacia sobre los síntomas motores es mayor. Los beneficios adicionales de la ECP son la eliminación de la oscilación rítmica anormal entre la corteza y los ganglios basales, y el aumento del flujo sanguíneo cerebral, estimulando la neurogénesis (*Moro E et al., 2016; Volkman J et al., 2013*).

1.7.3 Segunda línea. Apomorfina subcutánea

La apomorfina es un agonista dopaminérgico no ergótico que se sintetiza a partir de la morfina pero sin las propiedades narcóticas, analgésicas o adictivas. No es efectiva por vía oral al ser ampliamente metabolizada por el hígado, por lo que se utiliza vía subcutánea con elevada biodisponibilidad. Pasa rápidamente la barrera hematoencefálica y actúa sobre los receptores dopaminérgicos D1 y D2. Su afinidad por D2 es tan potente como la levodopa. Está indicada en cualquier paciente con EP que presenta fluctuaciones motoras y no motoras con el tratamiento oral (*Borgemeester RW et al., 2016*). Existen dos modalidades de administración: en inyecciones intermitentes con pluma (eficaces para reducir los períodos off en pacientes con fluctuaciones motoras y no motoras esporádicas) o como perfusión continua subcutánea (para mejorar las fluctuaciones motoras y no motoras y discinesias en pacientes con EP avanzada). Se precisa adiestramiento del paciente y su cuidador. Como efectos secundarios típicos de la apomorfina destacan (*Todorova A et al., 2015*):

- Nódulos subcutáneos en la zona de inyección: son el efecto secundario más frecuente y limitante del uso de la apomorfina a largo plazo. Generalmente son leves y de fácil manejo, pero en ocasiones se pueden complicar (paniculitis o abscesos). Su aparición se

previene con higiene escrupulosa, rotación en los puntos de inyección, masaje de la zona de punción y aplicación de cremas antinódulos.

- Anemia hemolítica autoinmunitaria: infrecuente pero potencialmente grave, por lo que se aconseja realizar un test de Coombs previo al inicio del tratamiento y de forma periódica cada 3-6 meses.

1.7.4 Segunda línea. Perfusión intestinal continua

La perfusión intestinal continua de levodopa-carbidopa consiste en una suspensión acuosa que se administra de forma continua directamente en el duodeno distal/yeyuno proximal (*Poewe W et al., 2015*). La medicación se almacena en casetes conectados a una bomba de perfusión externa y a una sonda gastroduodenal colocada mediante gastrostomía endoscópica percutánea. Mejora la biodisponibilidad de levodopa obteniéndose así unos niveles plasmáticos más estables respecto a la administración oral. Se programa para permitir una dosificación individual generalmente de unas 16 horas. Está indicada en pacientes con EP avanzada que presenta fluctuaciones motoras que no responden a la medicación oral convencional mejorando su calidad de vida (*Poewe W et al., 2015; Lew MF et al., 2015*).

Las complicaciones más frecuentes tienen lugar en la primera semana tras el inicio del tratamiento y están relacionadas con el procedimiento quirúrgico (dolor y distensión abdominal, enrojecimiento del estoma, estreñimiento, flatulencia, dolor orofaríngeo). La propia técnica quirúrgica tiene sus riesgos como el neumoperitoneo, peritonitis y las neumonías aspirativas. Hay que tener en cuenta las complicaciones de los dispositivos que se utilizan como migración u obstrucción de la sonda, rotura de las conexiones y fallo de la bomba. Al aumentar la biodisponibilidad de la levodopa, pueden aparecer síntomas similares al tratamiento con levodopa oral (psicosis, alucinaciones, discinesias, hipotensión ortostática) que solo requieren un ajuste de la dosis. Otra complicación a tener en cuenta es la polineuropatía aguda (pseudo Guillain-Barré rápidamente progresivas y graves) o crónica (sensitiva, distal, leve y lentamente progresiva); pueden aparecer a la semana o hasta 3 años más (*Merola A et al., 2016*). La fisiopatología no está muy clara, pero parece que en las crónicas hay asociado un

déficit de vitaminas B12 y B6, niveles altos de homocisteína y dosis altas de levodopa; en las agudas pueden intervenir también factores metabólicos, pero sobretodo mecanismos inflamatorios.

1.7.5 Otras terapias

Una terapia más reciente es el uso de ultrasonidos aplicados en un punto del cerebro a alta intensidad y focalizados con el objetivo de una ablación térmica. Es el llamado **High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU)**. Se empezó utilizando en temblor esencial pero después se empezaron a tratar pacientes con EP seleccionando el NST. La ventaja es que no es una intervención quirúrgica, los efectos secundarios son poco frecuentes y el beneficio es casi inmediato. Sin embargo, algunos expertos consideran que se trata de una intervención ablativa y que no permite ajustes como la terapia con ECP. Aunque solo se aplicaba unilateralmente por el riesgo de eventos adversos, se está empezando a aplicar bilateralmente en dos tiempos (Fox SH et al., 2018; Verschuur CVM et al., 2019). Puede ser una buena opción en pacientes con EP asimétrica, tremórica, con más de 70 años o contraindicación para la intervención quirúrgica.

Finalmente, otra posibilidad es la **radiocirugía con Gamma Knife**. El objetivo de la radiocirugía es la producción de una lesión necrótica predecible mediante dosis muy elevadas de radiación ionizante, similar a lo que se logra con la radiofrecuencia (Verschuur CVM et al., 2019). Aunque su uso está menos extendido, los resultados son buenos cuando es aplicada por un equipo con experiencia.

CAPÍTULO II - HIPÓTESIS

La EP es un trastorno neurodegenerativo progresivo en el que tiene lugar una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas, en la que influye, entre otros mecanismos, los procesos oxidativos (*Jenner, 2003; Dias et al, 2013; Schapira et al., 2014*). El estrés oxidativo se define como una alteración del balance entre la producción de especies reactivas oxidantes y los mecanismos de defensa antioxidante (*Hallwell y Gutteridge, 1999; Jenner, 2003*). En esta tesis nos centramos en diferentes tipos de estrés oxidativo que pueden participar en la fisiopatología de la EP y en diversas moléculas implicadas en el mismo.

Una de ellas son las enzimas DEHAL, deshalogenasas hasta ahora no estudiadas en los enfermos de Parkinson, que podrían tener un papel importante en relación al estrés oxidativo de la enfermedad. La enzima DEHAL tipo 1 o DEHAL1 se expresa en tejidos relacionados con la EP donde se detectan depósitos de α Syn y degeneración de neuronas positivas a TH, como son las glándulas y pared gastrointestinales (*Del Tredici et al, 2010; Devic et al, 2011; Beach et al, 2013*). Su máxima expresión se encuentra en el tiroides, aunque también lo hace, en niveles más bajos, en hígado y riñón, además del tracto gastrointestinal.

La α Syn es otra proteína que estudiamos ampliamente. Se puede encontrar en los fluidos corporales y es un componente importante de las inclusiones de Lewy (*Shi et al, 2014; Goldman et al, 2018*). Estos fluidos corporales incluyen LCR, plasma, suero y saliva, entre otros. Sus niveles en dichos fluidos biológicos pueden ser un candidato prometedor en el diagnóstico de EP en función de la especificidad y la sensibilidad (*Atik et al, 2016*). El LCR y el suero sanguíneo son fluidos que están en contacto cercano con el tejido cerebral, y son buenos "testigos" de los procesos neurodegenerativos (*Kroksveen et al, 2011; Mollenhauer et al, 2016; Goldman et al, 2018*). La saliva, un fluido de fácil acceso, es una fuente interesante de biomarcadores en la EP, porque la patología por CL se ha observado en las glándulas salivares (*Del Tredici y Braak, 2012; Adler et al, 2014; Vilas et al, 2016*). Los estudios demuestran consistentemente que los niveles

totales de α Syn en LCR se reducen en pacientes con EP respecto a los controles, lo que podría relacionarse con el proceso de degeneración y muerte neuronal en los núcleos catecolaminérgicos (*Shi et al, 2011; Mollenhauer et al, 2008, 2011, 2013; Hong et al, 2010; Kang et al, 2013; Fernández et al, 2013; Andersen et al, 2017; Goldman et al, 2018*). Por otro lado, los niveles de α Syn en plasma/suero y saliva en la EP han arrojado resultados contradictorios (*Barbour et al, 2008; Devic et al, 2011; Fernández et al. 2013; Stewart et al, 2014; Shi et al, 2014; Kang et al, 2016; Vivacqua et al, 2016, 2019; Goldman et al, 2018; Cao et al, 2019*). Solo un estudio ha investigado las correlaciones entre el LCR, el plasma y la α Syn salivar en la EP (*Goldman et al, 2018*). Este estudio llamado BioFIND informa que los niveles de α Syn en LCR, plasma y saliva no están correlacionados entre sí. Varios estudios han examinado la relación de α Syn de plasma/suero y salival, con las características clínicas motoras y no motoras de la EP como la estadificación de Hoehn-Yahr o las escalas UPDR, con resultados contradictorios (*Tokuda et al, 2006; Devic et al, 2011; Vivacqua et al, 2016; Goldman et al, 2018; Cao et al, 2019*). Sin embargo, hasta la fecha, ningún estudio ha examinado la relación entre la α Syn salival y en plasma y las características no motoras o de neuroimagen de la EPi. Es de destacar que síntomas como la hiposmia, el estreñimiento o la depresión pueden anteceder en años a los síntomas motores (*Reichmann, 2017*), y sería de gran interés estudiar también su relación con los niveles de α Syn en los fluidos biológicos.

Respecto a la degeneración neuronal catecolaminérgica que tiene lugar en la EP, debemos hablar de las neuronas pigmentadas que contienen dopamina. Dicha pigmentación es causada por la neuromelanina, y la muerte neuronal de DA en la EP se relaciona con una disminución del contenido de neuromelanina en la SN (*Zecca et al. 2002; Wang et al. 2019*). La síntesis de neuromelanina está impulsada por el exceso de dopamina en el citosol de las neuronas de dopamina, y se cree que la síntesis excesiva de neuromelanina podría desempeñar un papel en la neurodegeneración parkinsoniana (*Sulzer et al. 2000; Hunot y Hirsch 2003; Jenner 2003; Norris et al. 2005; Paris et al. 2007; Zecca et al. 2008; Dias et al. 2014; Schapira et al, 2014; Navarro-Yepes et al, 2014; Segura-Aguilar et al, 2014; Carballo-Carbajal et al, 2019*). Además de la neuromelanina, el cuerpo contiene melanina no neuronal o melanina propiamente dicha, que se

produce en los melanocitos e incluso en los plexos coroideos. Esta melanina se detecta principalmente en la piel, la mucosa, el cabello y la sangre. Sin embargo, no se conoce bien el papel que representa su presencia en suero y saliva en la EP. Además, las anomalías en la melanina se correlacionan con cánceres de piel como el melanoma, el cual se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer neurodegeneración parkinsoniana (*Pan et al. 2011*).

La hTyr es la enzima principal requerida para la síntesis de melanina (*Körner y Pawelek 1982; Sánchez-Ferrer et al. 1995; Galzigna et al. 2000; Thompson et al. 2000; Pan et al. 2011*). En el sistema nervioso, hTyr parece no participar en la síntesis de neuromelanina, y de hecho hay albinos sin hTyr funcional pero con neuromelanina en la SN (*Foley y Baxter 1958*). Además, la presencia de hTyr en los núcleos pigmentados del sistema nervioso central es *controvertida* (*Xu et al. 1997; Tief et al. 1998; Greggio et al. 2005; Hasegawa 2010*). Algunos autores han detectado la proteína hTyr en el cerebro humano (*Miranda et al. 1984*), pero no otros (*Ikemoto et al, 1998; Tribl et al. 2007*). La hTyr parece no estar relacionada con la EP (*Greggio et al. 2005*), aunque es llamativo que la pérdida de función hTyr en el albinismo se ha asociado a un mayor riesgo de EP (*Lubbe et al. 2016*).

La síntesis de melanina podría ser llevada a cabo en el cerebro humano y en la periferia por enzimas distintas de la hTyr. Por ejemplo, las enzimas con actividad peroxidasa como la LPO y la DA beta-monooxigenasa podrían participar en la formación de melanina y neuromelanina (*Metodiewa y Dunford, 1991; Segura-Aguilar 1996; Reszka et al.1998; Galzigna et al.2000*). Con respecto a la LPO, se encuentra principalmente en las secreciones de las glándulas exocrinas, como la leche, las lágrimas y la saliva, donde protege contra bacterias y hongos (*Bafort et al. 2014*), y está relacionada con la "línea de defensa halogenativa". El exceso de actividad de LPO podría dar lugar a un aumento de radicales libres de melanina y estrés halogenativo (*Reszka et al. 1998*). Se ha encontrado que esta haloperoxidasa está elevada en el LCR de pacientes con EP, y se ha propuesto que participa en la neurodegeneración parkinsoniana (*Everse y Coates 2004; Fernández-Espejo, 2019*). En esta tesis doctoral se estudia el papel de estas enzimas relacionadas con la melanina y posiblemente con la EP, tanto en saliva como suero, dos fluidos periféricos.

Las hipótesis que se plantean en esta tesis doctoral son:

1. Las enzimas oxirreductasas, en particular la DEHAL1, contribuyen a la generación del estrés oxidativo en la EP y pueden relacionarse con las características clínicas y diferentes estadios de la EP.
2. La presencia de α Syn y sus niveles en suero y saliva son un marcador sensible e importante en la EPi. Además, se correlacionan con las características clínicas y diferentes estadios de la EP.
3. Existe una asociación entre los niveles de melanina no neuronal, hTyr y LPO en suero y saliva con las características clínicas y diferentes estadios de la EP.

CAPÍTULO III - OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es:

“Evaluar la presencia, importancia e implicación de los diferentes tipos de estrés oxidativo en la fisiopatología de la EP, así como analizar el comportamiento de diversas sustancias proteicas que participan en algún tipo de estrés oxidativo en el sistema nervioso central y correlacionarlo con las diferentes características clínicas y evolutivas de la enfermedad”.

En base a este objetivo, planteamos unos objetivos secundarios:

1. Analizar la actividad de las enzimas DEHAL1 y correlacionarlo con las diferentes características clínicas y evolutivas de la enfermedad.
2. Analizar la actividad de la α Syn nativa y nitrada y correlacionarlo con las diferentes características clínicas y evolutivas de la enfermedad.
3. Analizar la actividad de la melanina no neuronal, hTyr y LPO y correlacionarlo con las diferentes características clínicas y evolutivas de la enfermedad.

CAPÍTULO IV- MATERIAL Y MÉTODO

- **Selección de muestra**

Planteamos un estudio observacional, analítico tipo casos-contróles de práctica clínica. Los pacientes y controles fueron seleccionados de forma aleatoria en los hospitales Macarena y Valme de Sevilla, dando su consentimiento informado para ser incluidos. Los pacientes fueron seleccionados de la Unidad de Trastornos del Movimiento de Neurología, diagnosticados de EP por neurólogos expertos en base a criterios clínicos y de neuroimagen (señal de ganglios basales en DAT-SPECT). Todos los pacientes estaban en tratamiento farmacológico en función de sus necesidades clínicas consistente en uno o más agentes dopaminérgicos, tenían una duración de la enfermedad > 3 años y una edad de aparición entre los 40 y 75 años. Para excluir las formas hereditarias de parkinsonismo, se descartaron aquellos pacientes con familiares con EP, menores de 40 años o con síntomas atípicos, siguiendo las recomendaciones de una guía española para neurólogos de la EP (Escamilla-Sevilla y Olivares-Romero 2018).

Los sujetos controles, libres de trastornos neurológicos conocidos, fueron seleccionados de voluntarios sometidos a anestesia intradural en la Unidad de Anestesia del hospital Macarena, bajo la supervisión del Dr. Ángel Martín de Pablos, doctor anesthesiólogo. Todos los sujetos controles fueron operados por fractura de cadera, hernia umbilical o cirugía perianal. La anestesia y la cirugía en sí no tuvieron impacto en los parámetros de biofluidos a analizar, porque todos los fluidos corporales se obtuvieron antes del procedimiento quirúrgico. También hubo controles procedentes de familiares de los pacientes, que no tuvieran alteración neurológica conocida o familiar de primer grado con EP. Los controles fueron agrupados por edad y sexo con los sujetos con EP, y fueron excluidos si tenían un familiar de primer grado con EP.

En el **estudio de DEHAL1** se obtuvieron 25 muestras de pacientes de EPI y 25 sujetos controles. Por motivos técnicos y de metodología (niveles alto de hemoglobina en saliva, recogida defectuosa, escasa cantidad), se aceptaron finalmente solo 15

muestras de suero y 20 de saliva de pacientes y 20 muestras tanto de saliva como de suero de los sujetos controles.

En el **estudio de α Syn nativa y 3-NT- α Syn**, se obtuvieron 40 muestras de suero y 27 de saliva de pacientes y 20 muestras (suero y saliva) de los sujetos controles.

En el **estudio de melanina, hTyr y LPO** se obtuvieron 25 muestras de suero y saliva de pacientes, pero se descartaron 4 muestras de saliva debido a una alta concentración de hemoglobina o problemas técnicos. De esta manera, se aceptaron finalmente 25 muestras de suero y 21 de saliva de pacientes y 20 muestras tanto de saliva como de suero de los sujetos controles.

- **Información demográfica y clínica**

La información demográfica se obtuvo directamente de los pacientes. Se incluyó edad, sexo, índice de masa corporal, educación (años) y tratamiento antiparkinsoniano (levodopa, AD y otros). No se incluyeron las personas que presentaban enfermedades hepáticas, renales, cardiovasculares o hematológicas, cáncer, trastornos autoinmunes o SIDA (los marcadores de suero y saliva pueden estar alterados en tales condiciones). Además, se excluyeron a aquellos sujetos que fueran fumadores, bebedores excesivos de alcohol o café, según los criterios especificados a continuación. El índice de "Fumar" se definió como el *fumador actual* que consumía cigarrillos a diario o los *fumadores ocasionales* que consumían cigarrillos menos que a diario. El abuso de alcohol se definió como beber > 210 g de alcohol por semana. Beber café se definió como la ingesta diaria de café con más de 300 mg de cafeína al día (por ejemplo, tres tazas de 45-60 ml de café expreso).

- **Datos clínicos de la EP**

Los datos clínicos incluyeron la estadificación de Hoehn-Yahr modificada, la Escala de calificación de la EP unificada UPDRS, la escala modificada de Schwab-England de actividades de la vida diaria, y un cuestionario no motor realizado para esta tesis doctoral y que se presenta en anexos (*Hoehn y Yahr, 1967; Schwab-England, 1969; Fahn*

y Elton, 1987; Fahn, 2003; Reichmann, 2017). Las escalas UPDRS se pasaron en su totalidad (parte I-II-III-IV). El cuestionario no motor incluyó síntomas como hiposmia/anosmia, estreñimiento, depresión, dolor/dolor de cabeza, trastornos urinarios/sexuales y trastornos del sueño. Se preguntó a los pacientes si sufrían o no uno o más síntomas no motores en el momento de la entrevista y antes del inicio de los síntomas motores. Se evaluaron también la edad de comienzo de la enfermedad, el año de primeros síntomas no motores y la duración de la enfermedad en años, según el primer síntoma motor referido por el paciente.

Los estudios de referencia Dat-SPECT se realizaron de acuerdo con un protocolo estandarizado en el Servicio de Medicina Nuclear del Hospital (*De Bonilla-Damiá et al, 2011*). Se utilizó el DaTSCAN, que ha demostrado ser una herramienta de diagnóstico para clasificar el grado de pérdida de células dopaminérgicas. El 123I-Ioflupano tiene una alta afinidad de unión por el transportador presináptico de dopamina. Se calculó la unión específica del radioligando o la relación de absorción específica (SUR) en el estriado dorsal, caudado y *putamen* (*Morano y Seibyl, 2003; Schwarz et al, 2004; Crespo et al, 2008; Maetzler et al, 2009; Varrone y Halldin, 2010; Fang et al, 2015; Niñerola-Bazán et al, 2018*).

- **Recolección de muestras**

Todos los fluidos corporales se obtuvieron de 9:00 a 11:00 a.m.

- **Recolección de suero**

Se recogió suero sanguíneo por punción de la vena cefálica. Se recogieron 5 ml de sangre en tubos recubiertos de gel para inducir la coagulación de la sangre y para obtener suero (Becton Dickinson Vacutainer, Tubo de suero con activador de coágulo, cat. 368380). El suero se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos para separar las células coaguladas y atrapadas, y luego se congeló inmediatamente a -80°C en alícuotas de 0,5 ml.

- **Recolección de saliva**

Se ha seguido el siguiente protocolo:

Precauciones previas a la recolección

1. Entre 30-60 minutos antes de la toma de la muestra no ingerir alimentos ni bebidas.
2. No fumar ni mascar chicles 30 minutos antes de la toma de la muestra.
3. Evitar productos de cosmética en los labios y zona peribucal el día de la toma.

Pasos para la recolección

1. Sostener el tubo en posición vertical con una mano
2. Llenar el recipiente con saliva (sin contar la espuma) hasta alcanzar la señal del tubo (aproximadamente 2ml)
3. Utilizar el tapón para cerrar el tubo herméticamente

Se recogieron 3 ml de saliva en tubos de polipropileno Greiner Bio-One de 5 ml (Fisher Scientific), y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos para precipitar las células. Posteriormente, se congelaron alícuotas de 0,5 ml cada una de la porción líquida a -80°C. La concentración de hemoglobina en una nueva alícuota de saliva de 0,5 ml se cuantificó según lo recomendado (*Kang et al. 2013; Goldman et al. 2018*), con una técnica ELISA (kit de detección colorimétrica de hemoglobina, cat. #EIAHGBC, ThermoFisher Scientific). Aquellas muestras con concentración de hemoglobina > 1200 mg / ml fueron descartadas.

• **Análisis de bioespecímenes**

Las alícuotas de suero y saliva, recuperadas del biobanco de Hospitales de Sevilla, se descongelaron y fueron sonicadas con solución homogeneizadora (NaCl 150 mM, HEPES 50 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, leupeptina 0,6 µM, y Triton X-100 al 1%, pH 7,4). Con el fin de evitar diferencias por localización y uso del análisis, el estudio se hizo en muestras no descongeladas previamente, en el mismo laboratorio y con el mismo personal técnico.

En el **estudio de la DEHAL1**, se ha evaluado dicha enzima por medio de kits ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se ha empleado el kit “Human Iodotyrosine Dehalogenase 1 (IYD) Elisa kit, number MBS7217967, de MyBioSource. Cada muestra se analizó por duplicado con cada kit ELISA (suero, dilución 1/200; saliva, sin dilución).

Para el **estudio de α Syn nativa y 3-NT- α Syn**, el contenido de α Syn en los fluidos se evaluó con un kit de ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas disponible comercialmente (kit ELISA de α Syn humana, cat. YHB0151Hu, Shanghai Yehua Biological Technology Co., Ltd., China), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada muestra se analizó por duplicado con cada kit ELISA. Hasta la fecha, no existen kits ELISA para cuantificar la 3-NT- α Syn por lo que solo se evaluó con inmunotransferencia tipo Western. Las muestras se lisaron en glicerol al 10%, NaCl 137 mM y Tris HCl 20 mM pH 7,5, que contenía inhibidores de peptidasa (aprotinina y leupeptina 1 μ g / ml, PMSF 1 mM). Los niveles de proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford. Las muestras se hirvieron y las alícuotas que contenían 25 μ g de proteína cada una se sometieron a electroforesis en gel de SDS/poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF. El inmunomarcaje se realizó con anticuerpos primarios para α Syn nativa (anticuerpo monoclonal contra α SYN, ThermoFischer Scientific, Invitrogen, Syn211, cat. #32-1800), 3-NT- α Syn (anticuerpo anti-nitro- α/β -sinucleína, clon nSyn12, cat. 36-011, Merck) y β -actina como proteína de control (anticuerpo anti-beta actina, gato A5316, Merck). Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa con quimioluminiscencia mejorada y autorradiografía. Las densidades de banda de los autoradiogramas resultantes se cuantificaron utilizando el programa Scion Image para PC (NIH, EE. UU.). La densidad de las bandas de proteínas se midió en unidades arbitrarias de Scion. Los valores se dan como proporción de la densidad de la banda 3-NT- α Syn versus la densidad de la banda control de β -actina.

Para el **estudio de melanina, hTyr y LPO en saliva y suero** de enfermos de EPI, las concentraciones de melanina, hTyr y LPO se evaluaron con kits ELISA o de inmunoadsorción ligados a enzimas disponibles en el mercado (kit ELISA de melanina

humana, cat. CSB-E14051h, Cusabio Biotech Co., EE. UU.; Kit ELISA para hTyr, cat. SEA238Hu, Cloud-Clone Corp., EE. UU.; kit ELISA para LPO, cat. SEA296Hu, Cloud-Clone Corp., EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada muestra se analizó por duplicado (suero, dilución 1/200; saliva, sin dilución).

- **Análisis estadístico**

Las comparaciones de variables dicotómicas se llevaron a cabo con la prueba de χ^2 . Se compararon dos grupos de variables cuantitativas con la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney si la distribución era no paramétrica. La normalización de los datos se verificó con la prueba de Shapiro-Wilk. Las correlaciones entre dos variables dependientes se llevaron a cabo con la prueba de Pearson o la prueba de Spearman en distribución no paramétrica. Para evaluar la relación entre los niveles de las proteínas estudiadas como la α Syn y el riesgo de EPI al ajustar otras covariables, se realizaron análisis de regresión logística que controlan la edad, el sexo y la educación. Las covariables fueron los niveles de la proteína estudiada en suero o saliva, y la EPI fue la variable de resultado. La inclusión de otras covariables se basó en un valor de $p < 0,05$ en el análisis univariado. Se utilizó el software Minitab 16-Addlink para el análisis estadístico (AddLink software Científico, Madrid). Para los 3 experimentos, los examinadores eran “ciegos” durante el análisis estadístico.

- **Aspectos éticos**

Se obtuvieron formularios de consentimiento informado de todos los sujetos. Todos los protocolos fueron aprobados por los consejos internos de ética y científicos de la Universidad de Sevilla (CEI 27/05/2010), Hospital Universitario Valme (ref. 10/05/2018), Hospital Universitario Macarena (CEI Macarena, 29/10 / 2013), y el Comité de Ética en Investigación de la Junta de Andalucía (PEIBA; CEI Sevilla Sur, ref.2017121418738). El consentimiento de los sujetos se obtuvo de acuerdo con la Declaración de Helsinki (BMJ 1991; 302: 1194). Los documentos se presentan en Anexos.

CAPÍTULO V. RESULTADOS

1. Estudio de la deshalogenasa tipo 1 en saliva y suero de enfermos de Parkinson idiopático.

- Parámetros de la población

Los parámetros demográficos y clínicos de las poblaciones se recogen en la tabla 10. No hubo diferencias significativas entre pacientes y controles en los parámetros comunes.

Tabla 10. Parámetros demográficos y clínicos en pacientes con EP y controles

Parámetro	EP (n=25)	Control (n=25)	P
Edad (años)	63,9±12,4	65,3±14,5	NS
Sexo, varones n (%)	11 (44)	10 (40)	NS
Índice de masa corporal	24,8±5	25,12±5,5	NS
Años de educación	17,1±3,2	17,3±3,6	NS
Duración de la EP (años)	9,3±2,5		
Edad de comienzo de la EP (años)	57,3±11		
Escala de Hoehn-Yahr	2,3±0,8		
Schwab-England modificado	86±15		
UPDRS parte III (fase on)	25,6±14		
UPDRS total (I-III) (fase on)	42±23		
UPDRS parte IV	2,2±3,7		

Media ± DEM. Abreviaturas: EP, enfermedad de Parkinson; NS, no significativo; UPDRS, Unified Parkinson's Disease Rating Scale; DEM, desviación estándar de la media; P, probabilidad.

- **Contenido de DEHAL1 en saliva y suero**

Los niveles de DEHAL1 en suero y en saliva de enfermos de EP y de controles se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Contenido y ratio saliva/suero de DEHAL1 en suero y saliva en pacientes con EPi y sujetos control

Contenido en fluido			
	Epi	Control	P
DEHAL1 sérica (ng/ml)	4333,12±1452 (n=15)	4432,8±857,2 (n=20)	NS
DEHAL1 salivar (ng/ml)	21,4±5,4 (n=20)	23,2±6,1 (n=20)	NS
Ratio saliva/suero			
	Epi	Control	
DEHAL1	0,0049±0,002	0,0044±0,002	NS

Media ± Desviación estándar. Abreviaturas: EPi, enfermedad de Parkinson idiopática; DEHAL1, Deshalogenasa tipo 1; NS, no significativo; P, probabilidad.

Los niveles de DEHAL1 en saliva y suero indican que no hay diferencias significativas entre grupos. Según los valores de la ratio saliva/suero, los niveles de la enzima en suero sanguíneo son unas 250 veces superiores a los de saliva, tanto en pacientes como controles. Los valores individuales de DEHAL1 en saliva y suero en los pacientes de EP y en controles se presentan en la figura 12.

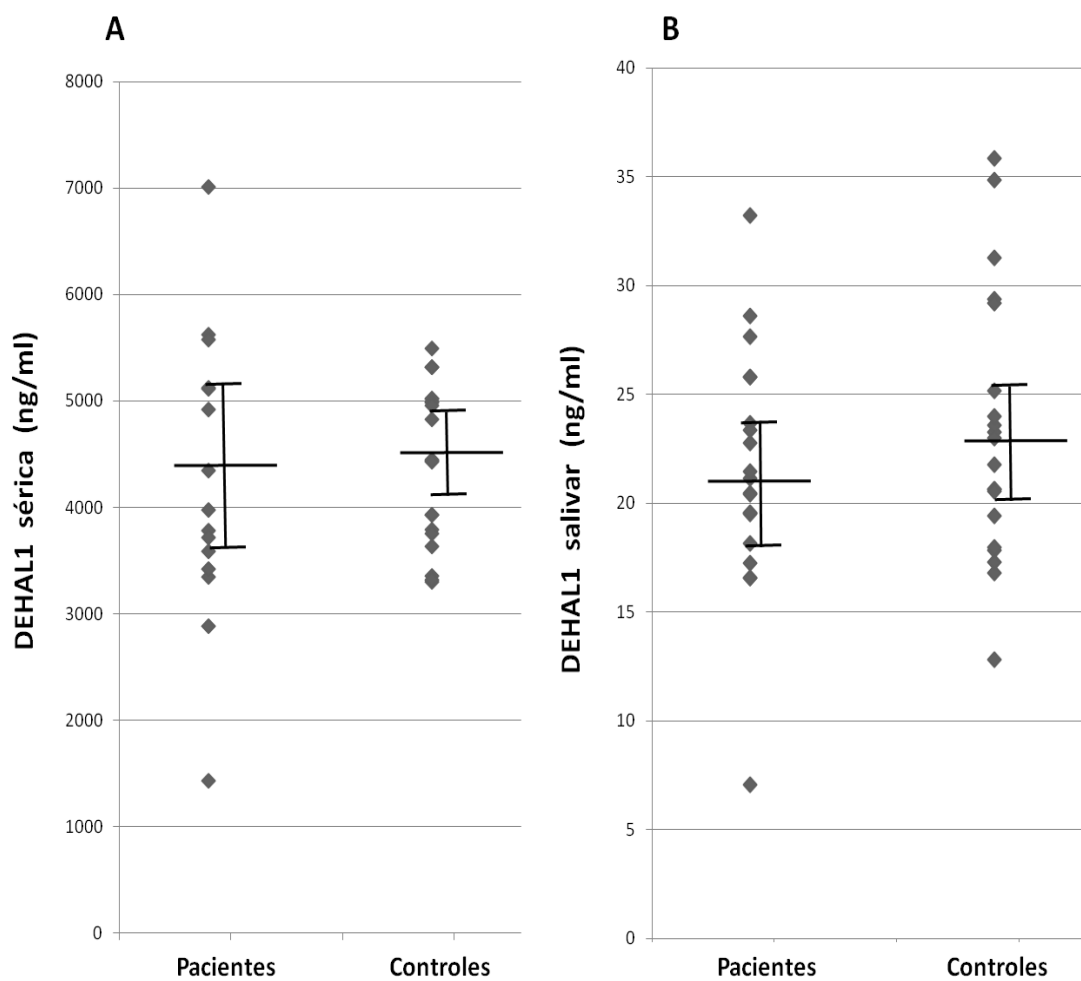


Figura 12. Concentración individual de la enzima DEHAL1 en (A) suero y (B) saliva en pacientes con EP y controles. Número de participantes: pacientes (suero, 15; saliva, 20), controles (20 de cada grupo de biofluidos). Abreviaturas: DEHAL1, Deshalogenasa tipo 1. La media y la DEM se representan con líneas continuas.

- **Correlaciones clínicas**

Se observó una correlación de Pearson positiva entre los valores de DEHAL1 en saliva y los de suero ($r=0,314$, $p<0,05$). Ello indica que los niveles de DEHAL1 de la saliva dependen de los niveles en suero sanguíneo. La relación entre ellas, como se ha dicho, es de $\sim 1:250$.

Respecto a las escalas clínicas, se observó una correlación negativa y significativa entre los niveles de DEHAL1 en saliva con la escala de Hoehn-Yahr ($r=-0,605$, $p<0,01$) y la escala UPDRS parte III ($r=-0,291$, $p<0,05$). Estas correlaciones se representan en la figura 13. Ello indica que los niveles de DEHAL1 en saliva se relacionan con la clínica motora de la enfermedad de un modo inverso, o lo que es lo mismo, los niveles salivares de DEHAL1 disminuyen progresivamente a mayor gravedad de la enfermedad. No se detectaron otras correlaciones clínicas de la DEHAL1 salival, así como de los niveles de DEHAL1 en suero sanguíneo.

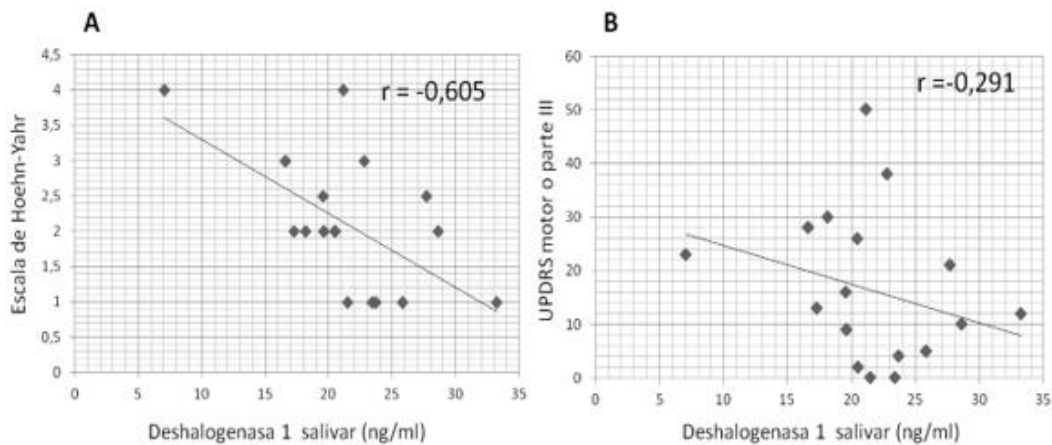


Figura 13. Correlaciones entre la enzima DEHAL1 en saliva con las escalas de (A) Hoehn-Yahr y (B) UPDRS parte III o motora, en pacientes con EPi. DEHAL1 en saliva se correlaciona de modo negativo con los valores de Hoehn-Yahr ($r=-0,605$, $p<0,01$) y con UPDRS motora ($r=-0,291$, $p<0,05$). Abreviaturas: UPDRS, Unified Parkinson's Disease Rating Scale. Número de participantes, 20.

Se analizó con más detalle las diferencias respecto a la escala de Hoehn-Yahr. Los pacientes se dividieron en dos grupos, EP temprana (grados 1 a 2, n=8) y EP avanzada (grados 2,5 a 4, n=12). Se encontró una diferencia significativa ($p<0,05$) entre los valores de EP avanzada ($18,7\pm 6,4$ ng/ml; media \pm DEM) respecto a EP temprana ($22,9\pm 4,5$ ng/ml) y controles ($23,2\pm 6,4$ ng/ml). Se concluye que los niveles de DEHAL1 disminuyen con el avance de la enfermedad, y son significativamente menores en los sujetos con grados avanzados de deterioro. Ello se representa en la figura 14.

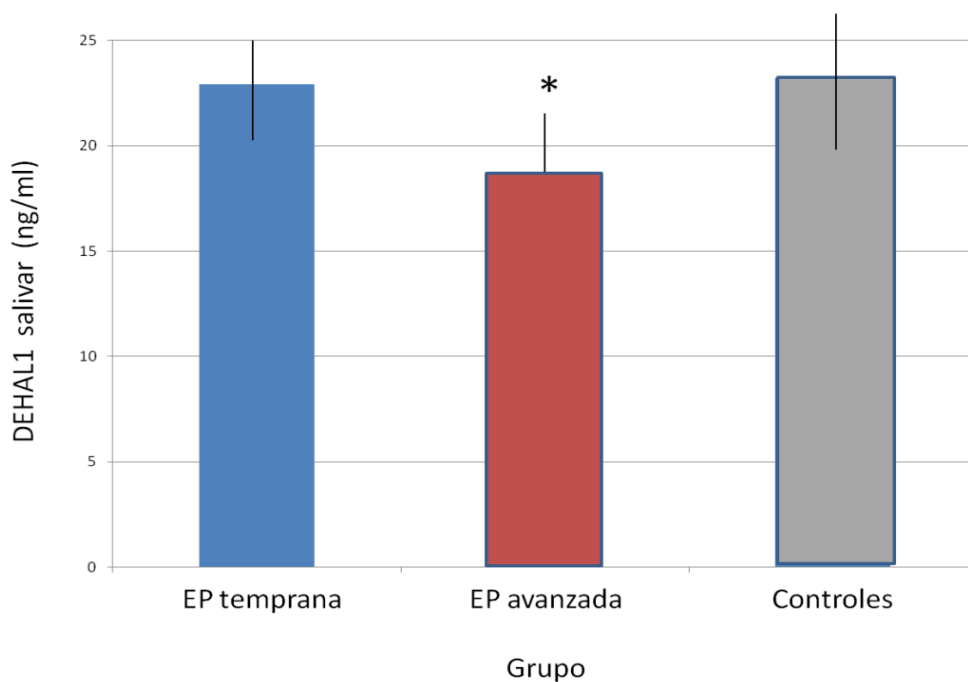


Figura 14. Niveles en saliva de DEHAL1 (ng/ml) en sujetos con EP temprana, avanzada o controles. Se observa una disminución significativa en sujetos con EP avanzada (grados 2,5 a 4 de Hoehn-Yahr). Media \pm DEM. * $p<0,05$ respecto a EP temprana y controles. *Número de participantes: pacientes (EP temprana, 8; EP avanzada, 12), controles, 20.*

2. Estudios sobre α -sinucleína nativa y nitrada en saliva y suero, y su relación con características clínicas en la enfermedad de Parkinson idiopática

- Características de los participantes

Las características demográficas y clínicas principales no fueron diferentes entre los controles y los pacientes con EP (Tabla 12).

Tabla 12. Parámetros clínicos en pacientes con EP y controles

Clinical parameters	EP (n=56)	Control (n=20)	P
Edad (Años)	63,2±15	59.6±17	NS
Género, masculino n (%)	30(53,5)	8 (40)	NS
Índice de masa corporal	24,3±2	24,4±3,5	NS
Educación (años)	17,1±3,2	17,4±3,3	NS
L-Dopa n (%)	14 (25)		
Dosis de L-Dopa (mg por día)	439±75		
Agonista dopaminérgico n (%)	21 (37,5)		
Duración de la enfermedad (años)	11,4±7,5		
Edad al inicio de la EP (años)	55,8±12,9		
Etapa Hoehn-Yahr	2,2±0,8		
Schwab-Inglaterra modificada	84±20		
UPDRS parte III (on)	22,8±14		
UPDRS total (I-III) (on)	36,3±23		
UPDRS parte IV	1,1±2,3		

Media ± DEM. Abreviaturas: EP, enfermedad de Parkinson; NS, no significativo; UPDRS, Escala de calificación de la enfermedad de Parkinson unificada; P, probabilidad.

- **αSyn en pacientes con EP y controles**

Los niveles de αSyn nativa en suero y en saliva de enfermos de EP y de controles se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Concentración en suero y saliva y ratio saliva/suero de αSyn en pacientes con EPI y sujetos control

Concentración de αSyn			
	EPI	Control	P
Suero (pg/ml)	102421±44317 (n=40)	109643±40868 (n=20)	NS
Saliva (pg/ml)	367,7±91 (n=27)	362,5±79 (n=20)	NS
Ratio saliva/suero			
	Epi	Control	
αSyn nativa	0,005±0,001	0,003±0,002	NS

Media ± DEM. Abreviaturas: EPI, enfermedad de Parkinson idiopática; αSyn, α-sinucleína; NS, no significativo; P, probabilidad.

Los niveles de αSyn en suero y saliva no difirieron entre pacientes y controles. No se encontró correlación entre el contenido de αSyn en suero y saliva ($r = .038$, NS). Los valores individuales de la concentración de αSyn en suero y saliva se presentan en la figura 15.

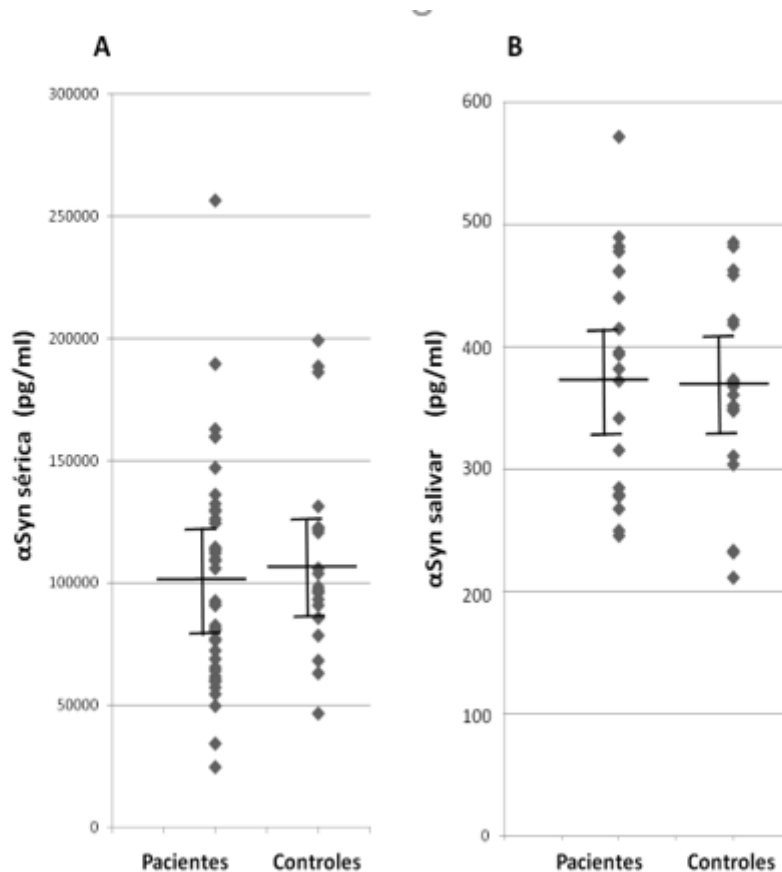


Figura 15. Concentración individual de α Syn en (A) suero y (B) saliva en pacientes con EPI y sujetos de control. La media y la desviación estándar se representan con líneas continuas. Abreviatura: α Syn, α -sinucleína. Número de participantes: pacientes (suero, 40; saliva, 27), controles (20 de cada grupo de biofluidos)

- **Correlaciones clínicas de α Syn sérico y salival**

Las ratios α Syn nativa de saliva/suero fueron en pacientes de $\sim 1:200$ y en controles de $\sim 1:300$, lo que confirma su falta de correlación. No se encontraron correlaciones estadísticas entre los niveles séricos de α Syn y los parámetros clínicos. En la saliva, se encontró que el nivel de α Syn salival estaba correlacionado con la puntuación motora UPDRS o parte III ($r = +0.542$, $p = 0.0062$) y el UPDRS total ($r = +0.524$, $p = 0.0086$), como se muestra en la Figura 16. La correlación positiva indica que hay un incremento progresivo de los niveles de α Syn salival con el deterioro motor de la enfermedad, pero sin llegar a existir diferencias significativas.

Se observó en la saliva (n=27) que la presencia (n = 15) o ausencia (n = 12) de algún síntoma no motor de los estudiados está altamente correlacionada con los niveles de α Syn salival ($r = 0.669$, $p < 0.0001$). Se empleó la escala de síntomas no motores desarrollada (ver anexos). Se encontró que los niveles de α Syn salival eran significativamente más bajos en pacientes que informaron sobre la presencia de síntomas no motores que en los restantes (con síntomas no motores, $308,2 \pm 42$ pg/ml; sin síntomas no motores, $425,9 \pm 89$ pg/ml; $t = 4,5439$, $p < 0.0001$). Los niveles individuales de α Syn en la saliva en estos dos grupos de pacientes se muestran en la Figura 17.

Con respecto a los subgrupos de pacientes con síntomas no motores (n=15), el número de pacientes que sufren cada uno de ellos fue el siguiente: estreñimiento, n= 8; depresión, n= 7; hiposmia, n= 2; dolor/dolor de cabeza, n= 3. Los niveles de α Syn en los dos subgrupos con mayor número de participantes fueron los siguientes: estreñimiento, $301,2 \pm 49$ pg / ml; depresión, $310,6 \pm 42$ pg / ml; ambos grupos $p < 0,001$ versus pacientes sin síntomas no motores y controles).

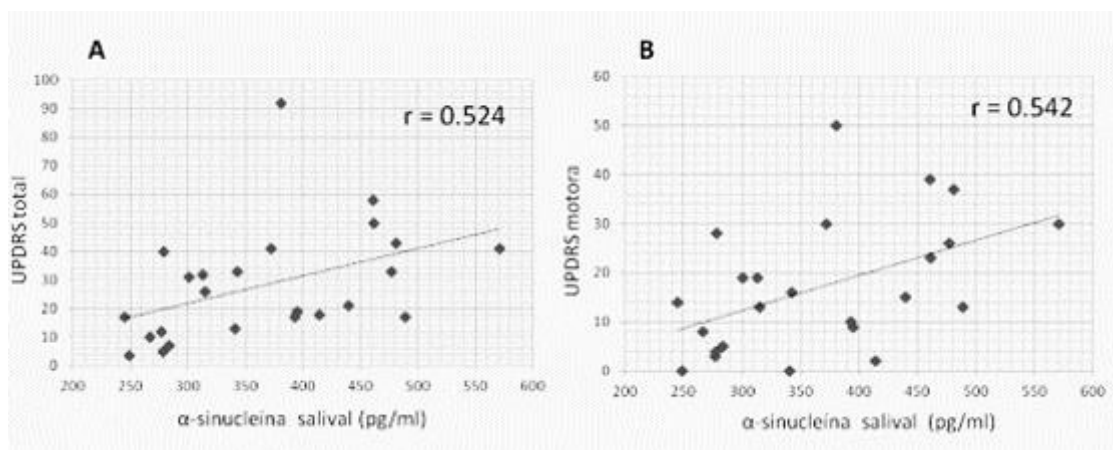


Figura 16. Correlaciones entre la α Syn salival y (A) UPDRS total y (B) UPDRS motora o parte III, en pacientes con EPi. Abreviaturas: UPDRS, escala unificada de clasificación de la enfermedad de Parkinson. Número de participantes: pacientes, 27; controles, 20.

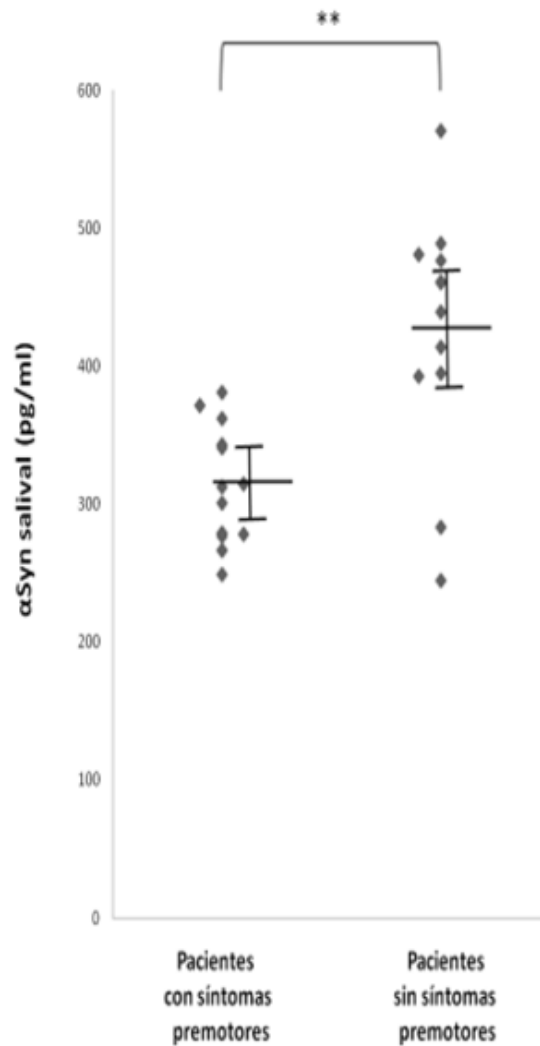


Figura 17. Contenido individual de α Syn en saliva en pacientes con EPI con o sin síntomas no motores. Abreviaturas: α Syn, α -sinucleína.

- **Análisis de inmunotransferencia de α Syn nativa y 3-NT- α Syn en saliva**

La transferencia Western reveló la presencia de 3-NT- α Syn en la saliva, aparte de la proteína nativa, tanto en pacientes como controles (Figura 17). No se encontraron diferencias significativas en las ratios de densidad de α Syn/ β -actina y 3-NT- α Syn/ β -actina entre pacientes y controles, como se muestra en la Figura 18. Los valores fueron: ratio de α Syn/ β -actina (unidades Scion), pacientes, $0,61 \pm 0,1$; controles, $0,58 \pm 0,1$; ratio de 3-NT- α Syn/ β -actina, pacientes, $0,34 \pm 0,1$; controles, $0,32 \pm 0,1$; media \pm DEM).

El monómero α Syn posee una masa molecular de ~ 14.4 kDa; sin embargo, las bandas de proteína α Syn y 3-NT- α Syn se detectaron en puntos de masa molecular que varían de 50 a 75 kDa, lo que sugiere que la molécula α Syn nitrada está presente como una molécula tetramérica. No se detectaron correlaciones clínicas entre la densidad de bandas de α Syn nativa y 3-NT- α Syn y los parámetros clínicos evaluados.

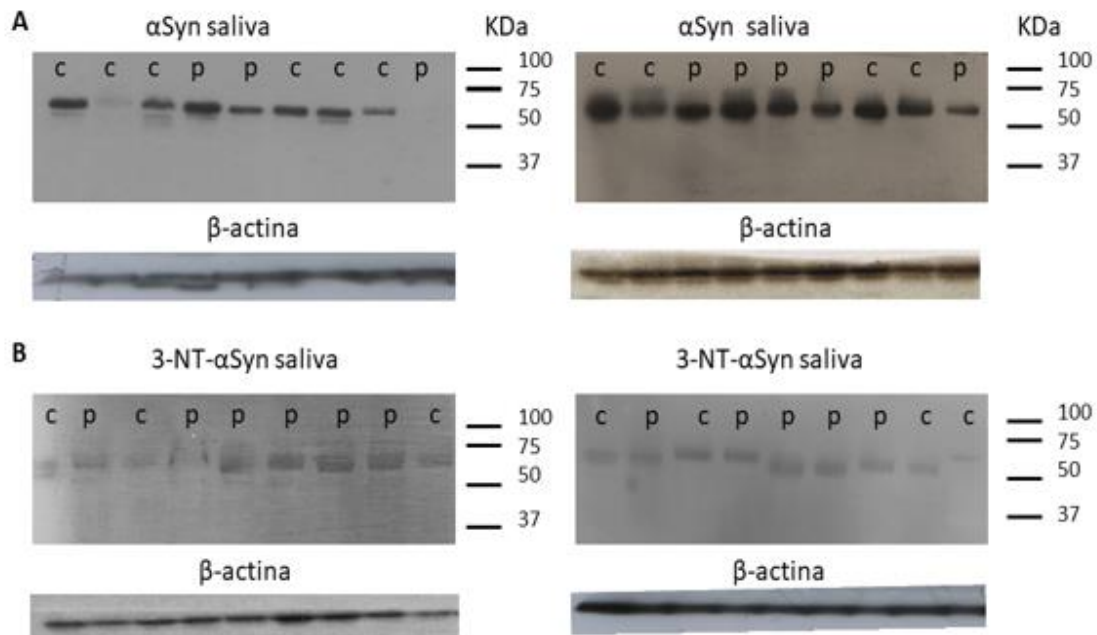


Figura 18. Análisis de inmunotransferencia de (A) proteína α Syn salivar y (B) proteína 3-NT- α Syn salival. (A) Dos inmunotransferencias representativas de controles y pacientes con EPI después de la inmunotinción contra la proteína α Syn y β -actina sérica. (B) Dos inmunotransferencias representativas de controles y pacientes con EPI después de la inmunotinción contra la proteína salival 3-NT- α Syn y β -actina. *Abreviaturas: α Syn, α -sinucleína; 3-NT- α Syn, 3-nitrotirosina α -sinucleína; EPI, enfermedad parkinson idiopático; c, control; p, paciente con EP.*

3. Estudio de melanina, tirosinasa humana y lactoperoxidasa en saliva y suero de enfermos de Parkinson idiopático

- **Características de los participantes**

No se encontraron diferencias significativas entre las características clínicas y demográficas de los controles y los pacientes con EP, como se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Parámetros clínicos en pacientes con EP y controles

Parámetros clínicos	EP (n=42)	Control (n=20)	P
Edad (años)	64,5±15	65,3±14,5	NS
Género, masculino n (%)	20(42)	8 (40)	NS
Índice de masa corporal	24,1±3	24,2±3,5	NS
Educación (años)	17,2±3,1	17,3±3,5	NS
L-Dopa n (%)	29 (60)		
Dosis de L-Dopa (mg por día)	608,3±72		
Agonista dopaminérgico n (%)	19 (40)		
Duración de la enfermedad (años)	12±7,4		
Edad al inicio de la EP (años)	56,6±13		
Etapa Hoehn-Yahr	2,2±0,8		
Schwab-England modificada	81±23		
UPDRS parte III (fase ON)	21,2±14,9		
UPDRS total (I-III) (fase ON)	34±23		
UPDRS parte IV	1,3±2,6		

Media ± DE. Abreviaturas: EP, enfermedad de Parkinson; NS, no significativo; UPDRS, Escala de calificación de la enfermedad de Parkinson unificada; P, probabilidad

- **Contenido sérico y salival de melanina, hTyr y LPO**

Se detectó melanina en todos los biofluidos, y no se encontró que sus niveles fueran significativamente diferentes entre los pacientes con EP y los controles. En cuanto a la hTyr, se encontraron niveles tanto en suero como en saliva, dato importante pues no se detecta en tejido cerebral humano según diversos autores. Además, se encontró que los niveles de suero y saliva de hTyr eran similares en pacientes y controles. Por otra parte, la LPO estaba presente en todos los fluidos. No se encontró que los niveles de LPO en suero y saliva fueran diferentes entre pacientes y controles. Las ratios saliva/suero de todas las moléculas fueron similares en pacientes y controles, como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Contenido, ratio saliva/suero de melanina, hTyr y LPO en suero y saliva en pacientes con EPI sujetos de control

Suero	Epi	Control	
Melanina (pg / ml)	89,75±25,8	78,65±31,1	NS
Tirosinasa (pg / ml)	6,588±2,528	5,511±3,005	NS
LPO (ng / ml)	1.024±412	951,2±394	NS
Saliva			
Melanina (pg / ml)	160,78±26	169,7±22,8	NS
Tirosinasa (pg / ml)	5,070±3,933	4,457±1,684	NS
LPO (ng / ml)	7,08±4,3	7,67±4,1	NS
Relación saliva/suero			
Melanina	1,81±0,85	2,43±0,96	NS
Tirosinasa	1,23±0,74	1,21±1,05	NS
LPO	0,014±0,02	0,011±0,01	NS

Media ± DE. Abreviaturas: EPI, enfermedad de Parkinson idiopática; LPO, lactoperoxidasa; NS, no significativo.

Los niveles individuales en suero y saliva de melanina, hTyr y LPO se presentan en las figuras 19 y 20 respectivamente. Se observa que no hay diferencias significativas entre pacientes y controles.

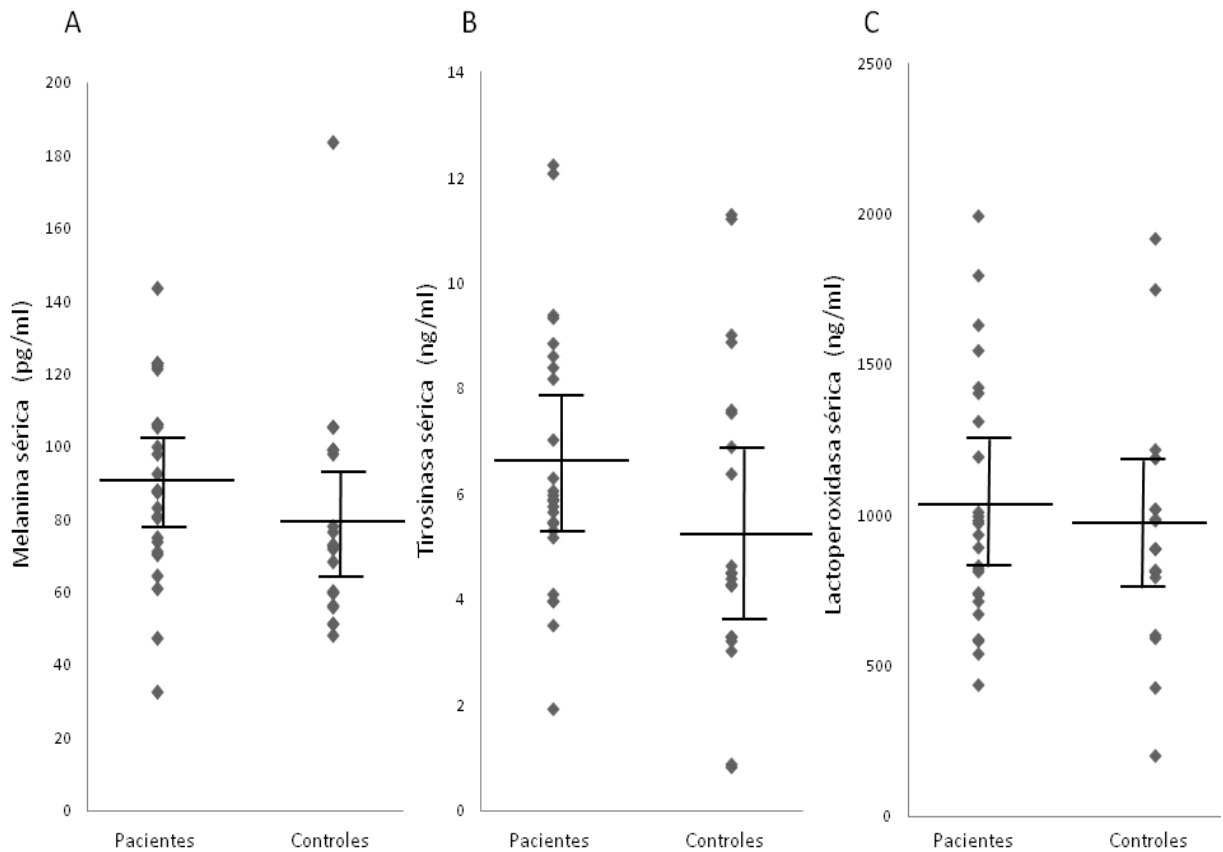


Figura 19. (A) Contenido de melanina individual (pg /ml) en suero en pacientes con EPI y controles. (B) Contenido individual de hTyr (ng /ml) en suero en pacientes y controles. (C) Contenido individual de LPO (ng/ml) en suero en pacientes con EPI y controles.

Número de participantes: pacientes, 25; controles, 20. La media y la DEM se representan con líneas continuas.

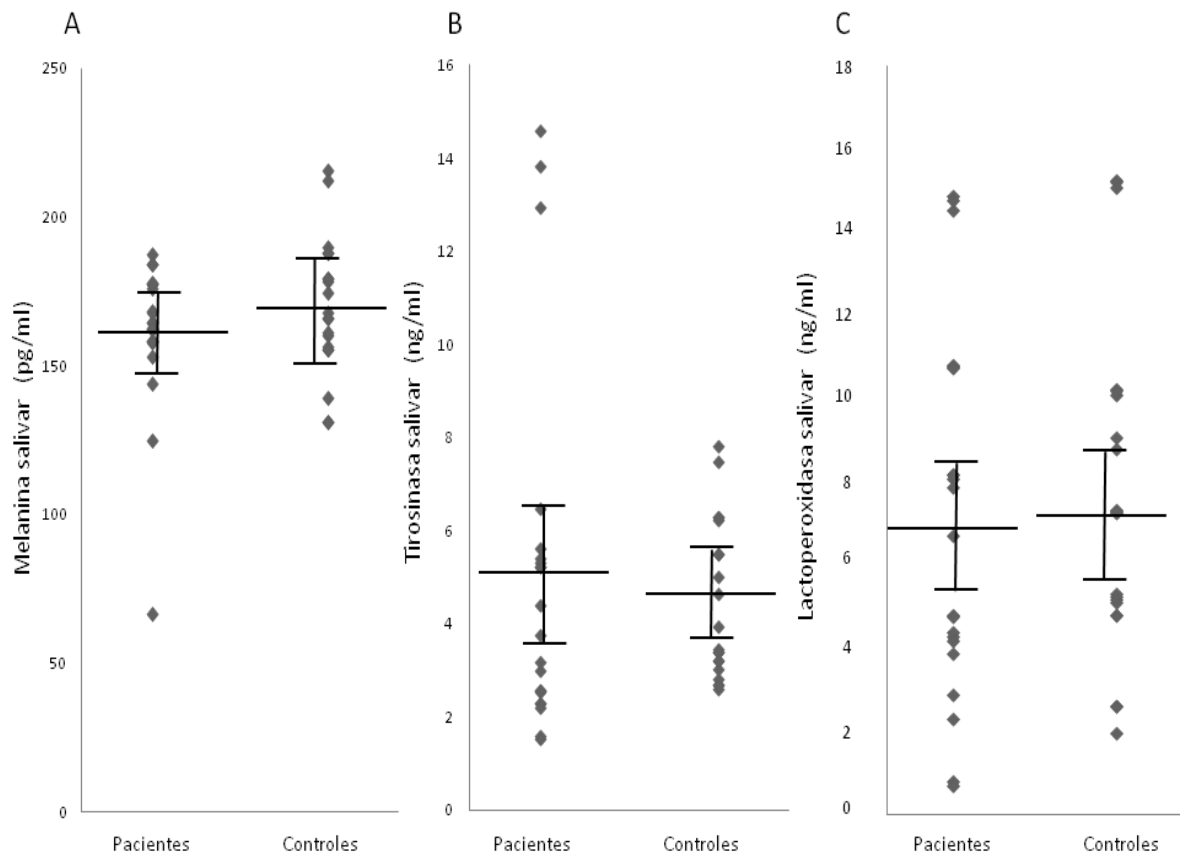


Figura 20. (A) Contenido de melanina individual (pg/ml) en saliva en pacientes con EPI y controles. (B) Contenido individual de hTyR (ng/ml) en saliva en pacientes y controles. (C) Contenido individual de LPO (ng/ml) en saliva en pacientes con EPI y controles.
Número de participantes: pacientes, 21; controles, 20. La media y la desviación estándar se representan con líneas continuas.

- **Correlaciones clínicas**

La concentración de hTyr en suero sanguíneo se correlacionó inversamente con la duración de la enfermedad en años (r de Pearson= -0,524, $p < 0,01$), como se muestra en la figura 21A. Además, se encontró que la melanina en la saliva se correlacionaba negativamente con la duración de la enfermedad ($r = -0,688$, $p < 0,01$), como se muestra en la figura 21B. No se encontraron otras correlaciones clínicas. Tampoco se encontraron correlaciones entre sí de las tres proteínas tanto en suero como en saliva.

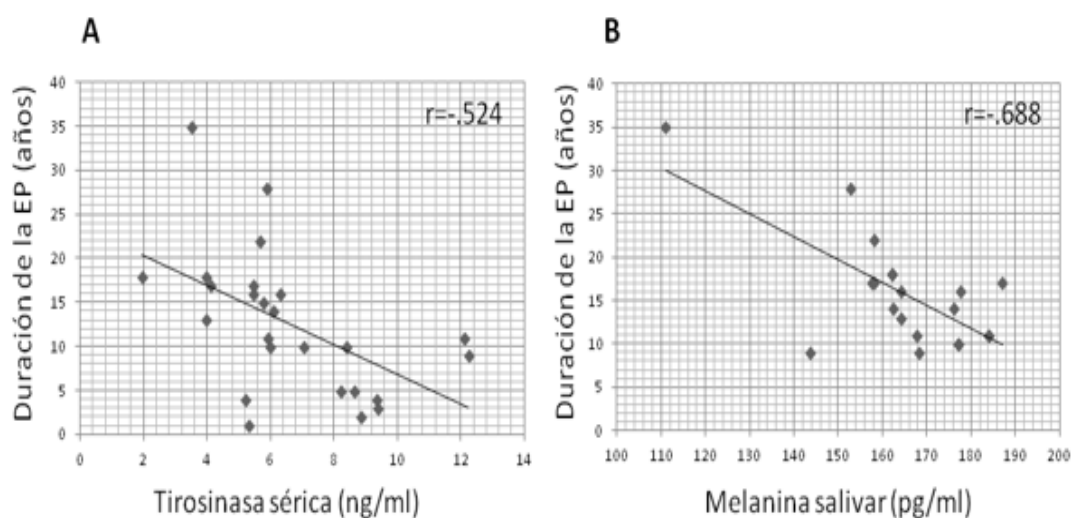


Figura 21. Correlaciones entre (A) Tyr y duración de la EPI, y (B) melanina salival y duración de la EPI en años. El número de muestras: tirosinasa sérica, 25; melanina salival, 21.

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN

Estudio de la deshalogenasa tipo 1 en saliva y suero de enfermos de Parkinson idiopático

Resultado principal: Los niveles de DEHAL1 en saliva se correlacionan de modo inverso con escalas clínicas en pacientes de EPI

Los resultados indican que la enzima DEHAL1 procede principalmente del fluido sanguíneo y, además, en los pacientes se relaciona con escalas clínicas de la EP. Así, cuanto menores son los niveles de DEHAL1 en saliva, mayor es la gravedad de la enfermedad medida con las escalas UPDRS III y Hoehn-Yahr. Los resultados clínicos indican que la enzima DEHAL1 en saliva se relaciona de modo inverso con el deterioro motor de la EP. De hecho, los niveles de DEHAL1 salival en sujetos con enfermedad avanzada (grados 2,5 a 4 de Hoehn-Yahr) son significativamente menores que los sujetos con grados tempranos (grados 1 a 2) o sujetos controles.

La enzima DEHAL1 es una deshalogenasa y una nitrorreductasa, o sea, una enzima redox multifuncional que participa tanto en el catabolismo de deshalogenación como en el de desnitración (*García-García et al, 2012; Navarro-Yepes et al, 2013; Fernández Espejo, 2017*). Nuestros resultados indicarían que existiría una progresiva alteración funcional de la enzima que influye en el desarrollo de la EP, mediante fenómenos de estrés halogenativo y nitrativo a nivel de las glándulas salivares. Su cuantificación en saliva tendría utilidad como marcador biológico útil para predecir la gravedad clínica de la enfermedad.

De hecho, las glándulas salivares y la saliva juegan un papel cada vez más importante en la búsqueda de marcadores de la EP (*Goldman et al, 2018*). Las glándulas expresan agregados de α Syn nativa y anómala (fosforilada, glucosilada, etc.) y poseen CL (*Del Tredici et al, 2010; Beach et al, 2013; Vilas et al, 2016; Iranzo et al, 2017*). Se cree actualmente que las glándulas salivares participan de algún modo en el desarrollo de la

enfermedad (*Braak et al, 2003; Beach et al, 2010; Devic et al, 2011; Del Tredici y Braak, 2012*).

Otro tema de estudio importante sería la alteración de la acción deshalogenante de DEHAL1 en saliva, con el colateral aumento de productos yodados como las yodatirosinas. De hecho, en el grupo del profesor Fernández Espejo se ha observado que las yodotirosinas son sustancias con toxicidad sobre las neuronas dopaminérgicas (*Fernández-Espejo y Bis-Humbert, 2018*).

Estudios sobre α -sinucleína nativa y nitrada en saliva y suero, y su relación con características clínicas en la enfermedad de Parkinson idiopática.

Resultado principal: El nivel de α Syn nativa salival, no de la sérica, es útil para discernir características clínicas de la enfermedad, así como la presencia de sintomatología no motora

En este estudio buscamos discernir las relaciones entre los niveles totales de α Syn nativa y nitrada en suero y saliva en pacientes con EPI y explorar la posible conexión del contenido de α Syn nativa y nitrada con características clínicas específicas de la enfermedad.

Primero, no se encontraron diferencias entre los niveles séricos de α Syn nativa y nitrada entre pacientes y controles. Aunque los datos sobre los niveles séricos de α Syn nativa en la literatura son contradictorios, otros autores ya han observado que no hay diferencias en este parámetro (*Barbour et al, 2008; Atik et al, 2016; Goldman et al, 2018*). También se encontró que el contenido de α Syn salival es similar en pacientes y controles parkinsonianos, lo que es consistente con muchos otros estudios (*Devic et al.2011; Stewart et al 2014; Kang et al. 2016; Goldman et al.2018; Cao et al. 2019*). Los datos sobre la presencia de α Syn nitrada en la saliva son novedosos, aunque no se

observó que hubiera diferencia entre pacientes y controles. Ello indica que hay α Syn nitrada en la saliva de sujetos sin EP, y que no hay estrés nitrativo en la saliva de los pacientes, que afecte a la molécula de α Syn.

La ratio saliva/suero de la α Syn nativa es \sim 1:200 en pacientes y \sim 1:300 en sujetos control, indicando que dichas moléculas no se correlacionan entre sí entre los sujetos control y los pacientes. Este resultado es interesante porque el origen de la α Syn salival no se conoce. Dado que la α Syn puede ser segregada por neuronas (*Lee et al, 2005*), es posible que la secreción de la α Syn a la saliva proceda de las terminaciones axónicas. Si hay una alteración de origen nervioso en los pacientes, ello explicaría que la ratio sea mayor en ellos si la α Syn nativa procede de las terminaciones nerviosas. Nuestros datos apoyan la hipótesis que la α Syn nativa de la saliva procede probablemente de la innervación nerviosa de las glándulas salivares.

Con respecto a las correlaciones clínicas, los niveles séricos de α Syn no se correlacionaron con ninguna característica clínica, de acuerdo también con numerosos estudios (*Goldman et al, 2018; Cao et al. 2019*). Por lo tanto, la α Syn en suero no es útil como biomarcador para distinguir la gravedad de la enfermedad.

Sin embargo, ello no ocurre con la α Syn salival. Es de destacar, entre los resultados obtenidos, que la α Syn total salival se correlacionó directamente con las puntuaciones de la UPDRS parte III o motora y la total, así como con la presencia/ausencia de síntomas no motores. La mayoría de los autores no han detectado correlaciones entre α Syn salival y características clínicas con las escalas usuales, excepto Vivacqua y colaboradores (2016) que detectan correlaciones con UPDRS. Nuestros resultados concuerdan con estos últimos autores, quizás por similitud en las metodologías o en las características de las muestras empleadas. Podría ser que la α Syn salival se relacionara de algún modo en la sintomatología parkinsoniana de más gravedad, sobre todo motora. Como se ha comentado previamente, las glándulas salivares y la saliva juegan un papel cada vez más importante en la patología de la EPi (*Braak et al, 2003; Beach et al, 2010; Devic et al, 2011; Del Tredici y Braak, 2012*), y las

glándulas salivares expresan agregados de α Syn nativa y anómala (fosforilada, glucosilada, etc) (*Del Tredici et al, 2010; Beach et al, 2013; Vilas et al, 2016; Iranzo et al, 2017*).

Por otra parte, esta tesis revela, por primera vez en la medida de nuestro conocimiento, que los niveles bajos de α Syn salival están asociados con la presencia de síntomas no motores en los pacientes. Los niveles reducidos de α Syn salival podrían indicar alguna conexión entre la clínica no motora de la EP y las alteraciones que causa la enfermedad en las glándulas salivares. En este contexto, los agregados de Lewy con α Syn se observan en las glándulas salivares en la EP (*Del Tredici y Braak, 2012; Adler et al, 2014; Vilas et al, 2016*) y en otras patologías como el trastorno del sueño REM, considerado como un trastorno no motor temprano de la EP (*Iranzo et al, 2006, 2017; Fernández Espejo, 2017*). Entre los síntomas no motores, el estreñimiento y la depresión son los más frecuentes.

En definitiva, según nuestros datos, la cuantificación de α Syn en la saliva tendría utilidad como marcador biológico útil para predecir características clínicas no motoras de la enfermedad, como depresión y estreñimiento, y posiblemente para el tratamiento etiopatogénico. Dado que la saliva es un fluido de fácil acceso, la disponibilidad de biomarcadores de α Syn salival puede considerarse alta.

Estudio de melanina, tirosinasa humana y lactoperoxidasa en saliva y suero de enfermos de Parkinson idiopático.

Resultado principal: La melanina salival y la hTyr en suero están asociadas con la duración de la enfermedad

Bien conocida es la importancia de la neuromelanina en la EP, pero se sabe muy poco acerca del papel de la melanina propiamente dicha en la EPI. Teniendo en consideración que hTyr es la enzima principal requerida para la síntesis de melanina (Körner y Pawelek 1982; Sánchez-Ferrer et al. 1995; Galzigna et al. 2000; Thompson et al. 2000; Pan et al. 2011), y que otras enzimas pueden participar en dicha síntesis como la LPO, se han analizado las relaciones entre la melanina no neuronal, la hTyr y la LPO en suero y saliva, así como su relación con las características clínicas en la EPI.

Este estudio revela que el contenido de melanina en biofluidos es similar en pacientes con respecto a los controles, y no se encuentran asociaciones de melanina con las características clínicas de la EPI. Por lo tanto, parece que la melanina en suero y saliva no desempeña ningún papel en la patogénesis de la EP, en contraste con el papel bien conocido de la neuromelanina a nivel del sistema nervioso (Zecca et al. 2002; Wang et al. 2019). Se cree que los niveles elevados de neuromelanina y de sus derivados dopaminocromos juegan un papel en la neurodegeneración dopaminérgica (Dias et al, 2013, Schapira et al. al., 2014; Navarro-Yepes et al, 2014), y pueden inducir activación microglial y neuroinflamación (Hunot and Hirsch, 2003; Segura-Aguilar et al, 2014). Ello no ocurre con la melanina periférica.

La única correlación que encontramos en nuestro estudio fue una relación inversa entre los niveles de melanina en saliva y la duración de la enfermedad. La melanina propiamente dicha se ha propuesto como neuroprotectora contra tóxicos dopaminérgicos (Zecca et al, 2008b), y podría participar también en la patogénesis de la EP (Metodiewa y Dunford, 1991; Segura-Aguilar, 1996; Reszka et al. 1998; Galzigna et al. 2000). No está claro el significado de dicha reducción, pero si hay afectación de las

glándulas salivares con el curso de la enfermedad como se sabe, ello podría afectar al contenido de melanina salival.

Respecto a la hTyr, se ha comentado que es la enzima principal requerida para la síntesis de melanina (*Körner y Pawelek 1982; Sánchez-Ferrer et al. 1995; Galzigna et al. 2000; Thompson et al. 2000; Pan et al. 2011*). En el sistema nervioso, hTyr parece no participar en la síntesis de neuromelanina, y de hecho hay albinos sin hTyr funcional pero con neuromelanina en la sustancia negra (*Foley y Baxter 1958*). Por tanto, la hTyr cerebral parece no estar relacionada con la EP (*Greggio et al. 2005*), aunque es llamativo que la pérdida de función de hTyr general en el albinismo se ha asociado a un mayor riesgo de EP (*Lubbe et al. 2016*). Este hecho podría relacionarse con la hTyr fuera del sistema nervioso, la cual hemos estudiado en suero y saliva. Los resultados indican que la hTyr sérica guarda cierta relación con un parámetro clínico, que es el tiempo de evolución de la EP. Como ocurre con la melanina salival, no está claro el significado de este decremento de hTyr sérica con el curso de la enfermedad. Como se ha dicho, la hTyr general se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer la EP, y podría existir una relación entre esta enzima y el curso de la enfermedad. Esto requiere más estudios.

Respecto a la LPO, esta enzima se relaciona con los mecanismos de síntesis de melanina y neuromelanina y con el estrés peroxidativo (*Metodiowa y Dunford, 1991; Segura-Aguilar, 1996; Rezka et al, 1998*). La LPO es principalmente una molécula antimicrobiana, de carácter halogenativo/peroxidativo, y en los procesos de peroxidación facilita la síntesis de radicales oxidativos y derivados de melanina (*Dexter et al, 1986, 1989; Galzigna et al, 2000; Buhmann et al, 2004; Shamoto-Nagai et al, 2007; Bafort et al, 2014; Navarro-Yepes et al, 2014; Martin de Pablos et al, 2015*). Por ejemplo, produce dopaminocromos desde la melanina, que son moléculas oxidantes que aceleran la progresión de la enfermedad y facilitan la agregación de la α Syn (*Norris et al, 2005; Paris et al, 2007*). Por su relación con derivados oxidativos de la melanina y el estrés peroxidativo, ha sido estudiada en esta tesis. No se ha observado ningún cambio del contenido de LPO en suero o saliva en los pacientes, ni ninguna correlación con parámetros clínicos. Ello indica que la LPO sérica y salival no intervienen en la

sintomatología de la EP. Finalmente, los niveles de melanina, hTyr o LPO en suero y saliva no están correlacionados entre sí, indicando que no hay un origen común entre estas moléculas.

En conclusión, se ha observado en el estudio que los niveles de melanina salival y la hTyr en suero se reducen con el progreso de la EP, lo que sugiere que podrían ser indicadores periféricos útiles para valorar la progresión de la EP. mi

Limitaciones y fortaleza del estudio

Finalmente, es necesario señalar que los estudios descritos en esta tesis doctoral tienen algunas limitaciones que deben reconocerse. En nuestro estudio no podemos inferir causalidad, porque es un diseño de casos-controles. El tamaño muestral fue relativamente pequeño, y la generalización de los resultados del estudio está limitada por él. Además, los sesgos de selección e información hacen carecer de correlaciones clínico-patológicas por lo que impiden las asociaciones neuropatológicas. Sin embargo, las fortalezas de nuestro estudio incluyen una población de pacientes que fue cuidadosamente seleccionada, estudiada con una valoración completa, sistemática y exhaustiva de la situación clínica de su enfermedad, tratando de evitar cualquier fuente de sesgo, y la medición simultánea de proteínas y enzimas a través de varias fuentes de biofluidos.

CAPÍTULO VII - CONCLUSIONES

1. Los niveles de DEHAL1 salival y sérica en pacientes y controles son similares. Por tanto, no son marcadores válidos para el diagnóstico de la EP.
2. La enzima DEHAL1 de la saliva se correlaciona con la enzima DEHAL1 sérica, siendo la relación saliva/sangre $\sim 1:250$ en todos los sujetos. Ello indica que la enzima DEHAL1 de la saliva es formada a partir de la sangre, y, por tanto, no se afecta con la enfermedad.
3. Hay una correlación inversa entre el contenido de DEHAL1 en saliva, la escala de Hoehn-Yahr y el déficit motor en la EP medido por la escala UPDRS parte III. Existiendo una disminución progresiva de la cantidad y actividad de la DEHAL1 (hasta ahora no valoradas en estudios previos), lo que posiblemente influya en la sintomatología motora de la EP, siendo de utilidad como biomarcador para predecir o discernir la gravedad clínica de la enfermedad.
4. Los niveles de α Syn nativa séricos y salivares son similares en pacientes y controles, por lo que no serían marcadores válidos para el diagnóstico de la EP.
5. Los niveles de α Syn nativa en suero y saliva no están correlacionados entre sí, siendo moléculas de distinto origen.
6. Se demuestra la presencia de 3-NT- α Syn en saliva (estudiada por primera vez en la EP) tanto en pacientes como controles, sin diferencias entre ambos grupos por lo cual, no constituiría un marcador válido para el diagnóstico de la EP.
7. La α Syn nativa y la 3-NT- α Syn salival se detectan con una masa molecular de 50 a 75 kDa, lo cual indica que se encuentran en forma tetramérica en la saliva, no monomérica ni dimérica. El significado biológico de este hecho no es conocido.
8. Hay una correlación directa entre los niveles de α Syn nativa salival y la sintomatología motora y global medida por la escala UPDRs. Existiendo un aumento paralelo de los niveles de α Syn en relación a la gravedad de la EP.

9. Los niveles salivares de α Syn son significativamente más bajos en pacientes que presentan síntomas no motores que en aquellos sin dichos síntomas, independientemente del estadio de la EP.
10. Por tanto, el nivel salival de α Syn sería un indicador de fácil acceso, útil para discernir la gravedad clínica motora y la presencia/ausencia de síntomas no motores. Siendo los síntomas no motores más correlacionados con sus niveles, según nuestro estudio, el estreñimiento y la depresión.
11. No se han detectado diferencias en los niveles de melanina, hTyr o LPO en suero ni saliva entre pacientes y controles. No son marcadores válidos para el diagnóstico de la EP. Además, no encontramos correlaciones entre los niveles de estos marcadores.
12. La melanina salival y la hTyr sérica tienen una correlación inversa con la duración de la EP, y por tanto podrían ser indicadores de los años de evolución de la EP.

BIBLIOGRAFÍA

Adler CH, Dugger BN, Hinni ML, Lott DG, Driver-Dunckley E, Hidalgo J, Henry-Watson J, Serrano G, Sue L.I, Nagel T, Duffy A, Shill H.A, Akiyama H, Walker DG, Beach TG. Submandibular gland needle biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *Neurology*. 2014; 82: 858-864.

Anand P, Stamler JS. Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. *J Mol Med (Berl)*. 2012; 90:233-244.

Andersen AD, Binzer M, Stenager E, Gramsbergen JB. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson's disease - a systematic review. *Acta Neurol Scand*. 2017; 135:34-56.

Arnhold J, Panasencko OM, Schiller J, Vladimirov YuA, Arnold K. The action of hypochlorous acid on phosphatidylcholine liposomes in dependence on the content of double bonds. Stoichiometry and NMR analysis. *Chem Phys Lipids*. 1995; 78: 55-64.

Atik A, Stewart T, Zhang J. Alpha-Synuclein as a Biomarker for Parkinson's Disease. *Brain Pathol*. 2016; 26:410-408.

Bafort F, Parisi O, Perraudin JP and Jijakli MH. Mode of action of lactoperoxidase as related to its antimicrobial activity: a review. *Enz. Res*. 2014; ID 517164.

Banerjee RK, Datta AG. Gastric peroxidase - localization, catalytic properties and possible role in extrathyroidal thyroid hormone formation. *Acta Endocrinol*. 1981; 96: 208-214.

Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*. 2011; 477:107- 110.

Barbour R et al. Red blood cells are the major source of alphasynuclein in blood. *Neurodegener Dis*. 2008; 5:55-59.

Beach TG, Adler CH, Dugger BN, Serrano G, Hidalgo J, Henry-Watson J, Shill HA, Sue LI, Sabbagh MN, Akiyama H; Arizona Parkinson's Disease Consortium. Submandibular gland biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013; 72:130-136.

Beach TG, et al. Arizona Parkinson's Disease Consortium. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* 2010; 119: 689-702.

Benhar M, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS. Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science.* 2008; 320:1050-1054.

Benito-León J. Epidemiología de la enfermedad de Parkinson en España y su contextualización mundial. *Revista de Neurología.* 2018; 66: 125-134

Biomarker Discovery, Kang U.J. Cerebrospinal fluid, plasma, and saliva in the BioFIND study: Relationships among biomarkers and Parkinson's disease Features. *Mov. Disord.* 2018; 33: 282-288.

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.* 2010; 32: 284-295.

Borgemeester RW, Drent M, van Laar T. Motor and non-motor outcomes of continuous subcutaneous apomorphine infusion in 125 Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat Disord.* 2016; 23: 17-22.

Braak H, et al. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol.* 2002; 249 Suppl 3:III/1-5.

Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett.* 2006; 396: 67-72.

Braak H, Sastre M, Bohl JR, de Vos RA, Del Tredici K. Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol*, 2007; 113:421-429.

Broussolle E, Thobois S. Genetic and environmental factors of Parkinson's disease. *Rev Neurol.* 2002; 158: 11-23.

Buhmann C, Arlt S, Kontush A, Möller-Bertram T, Sperber S, Oechsner M, Stuerenburg HJ, Beisiegel U. Plasma and CSF markers of oxidative stress are increased in Parkinson's disease and influenced by antiparkinsonian medication. *Neurobiol. Dis.* 2004; 15: 160-170.

Cao Z, Wu Y, Liu G, Jiang Y, Wang X, Wang Z, Feng T. α -Synuclein in salivary extracellular vesicles as a potential biomarker of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2019; 696:114-120

Carballo-Carbajal I, Laguna A, Romero-Giménez J, Cuadros T, Bové J, Martínez-Vicente M, Parent A, Gonzalez-Sepulveda M, Peñuelas N, Torra A, Rodríguez-Galván B, Ballabio A, Hasegawa T, Bortolozzi A, Gelpi E, Vila M. Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis. *Nat. Commun.* 2019; 10: 973.

Choi DK, Pennathur S, Perier C, Tieu K, Teismann P, Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Vonsattel JP, Heinecke JW, Przedborski S. Ablation of the inflammatory enzyme myeloperoxidase mitigates features of Parkinson's disease in mice. *J Neurosci.* 2005; 25:6594-600

Crespo C, Gallego J, Cot A, Falcón C, Bullich S, Pareto D, Aguiar P, Sempau J, Lomeña F, Calviño F, Pavía J, Ros D. Quantification of dopaminergic neurotransmission SPECT studies with ¹²³I-labelled radioligands. A comparison between different imaging systems and data acquisition protocols using Monte Carlo simulation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008; 35:1334-1342.

Curtis MP, Hicks AJ, Neidigh JW. Kinetics of 3-chlorotyrosine formation and loss due to hypochlorous acid and chloramines. *J Chem Res Toxicol*. 2011;24: 418-428.

De Bonilla-Damiá A, Calvo-Morón C, De La Riva-Pérez PA, Iglesias-Jerez R, Molina-Mora M, Castro-Montaña J. [Detection by SPECT-CT scan with (99m) Tc-(V) DMSA of bone metastases in patient with medullary thyroid cancer]. *Rev Esp Med Nucl*. 2011; 30: 365-367.

Del Tredici K, Braak H. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012; 27:597-607.

Del Tredici K., Braak H. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. *Mov. Disord*. 2012; 27: 597-607.

Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and idiopathic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2010; 119:703-713.

Del Tredici K, Rüb U, De Vos RA, Bohl JR, Braak H. Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002; 61:413-426.

Devic I, Hwang H, Edgar JS, Izutsu K, Presland R, Pan C., Goodlett DR, Wang Y, Armaly J, Tumas V, Zabetian CP, Leverenz JB, Shi M, Zhang J. Salivary α -synuclein and DJ-1: potential biomarkers for Parkinson's disease. *Brain*. 2011; 134(Pt7), e178.

Dexter DT, Carter CJ, Agid F, Agid Y, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD. Lipid peroxidation as cause of nigral cell death in Parkinson's disease. *Lancet*. 1986; 2: 639-640.

Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 1989; 2: 381-389.

Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J. Parkinson Dis*. 2013; 3: 461-491.

Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Wszolek ZK, Litvan I. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol*. 2009; 8:1150-1157.

Donadio V et al. A new potential biomarker for dementia with Lewy bodies: Skin nerve α -synuclein deposits. *Neurology*. 2017; 89:318-326.

Dubois B, Galasko D, Gauthier S, Goetz CG, Gomez-Tortosa E, Halliday G, Hansen LA, Hardy J, Iwatsubo T, Kalaria RN, Kaufer D, Kenny RA, Korczyn A, Kosaka K, Lee VM, Lees A, Litvan I, Lodos E, Lopez OL, Minoshima S, Mizuno Y, Molina JA, Mukaetova-Ladinska EB, Pasquier F, Perry RH, Schulz JB, Trojanowski JQ, Yamada M; Consortium on DLB. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology*. 2005; 65:1863-1872.

Dunforb HB. Myeloperoxidase and eosinophil peroxidase: phagocytosis and microbial killing, Dunforb HB, editor. En: *Heme Peroxidases*, Wiley: Nueva York. 1999; pp. 349-385.

Emmanouilidou E et al. Assessment of α -synuclein secretion in mouse and human brain parenchyma. *PLoS One*. 2011; 6:e22225.

Escamilla-Sevilla F, Olivares-Romero J. Recomendaciones en la práctica clínica en la Enfermedad de Parkinson. Grupo Andaluz de Trastornos del Movimiento & Editorial Glosa, Sevilla. 2017

Everse J, Coates PW. The cytotoxic activity of lactoperoxidase: enhancement and inhibition by neuroactive compounds. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 37: 839-849.

Edwards LL, Quigley EM, Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: frequency and pathophysiology. *Neurology.* 1992; 42:726-732.

Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 1991; 114: 2283-2301.

Fang YH, Chiu SC, Lu CS, Yen TC, Weng YH. Fully Automated Quantification of the Striatal Uptake Ratio of [(99m) Tc]-TRODAT with SPECT Imaging: Evaluation of the Diagnostic Performance in Parkinson's Disease and the Temporal Regression of Striatal Tracer Uptake. *Biomed Res Int.* 2015; 461625

Fahn S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 991: 1-14

Fahn S, Elton RL. Recent developments in Parkinson's disease. Vol 2. Macmillan Health Care information: Florham Park NJ.1987; 153-164

Fahn S, Halliday GM. Lesions associated with the Classic Triad of Parkinsonian motor features. En: Halliday G, Barker RA, Rowe DB. Eds. Non-dopamine lesions in Parkinson's disease. Oxford University Press: Oxford. 2011; p3-17.

Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 1991; 114: 2283-2301.

Fernández-Espejo E. Is there a halo-enzymopathy in Parkinson's disease? *Neurologia*. 2019; doi: 10.1016/j.nrl.2018.12.008. [Epub ahead of print]

Fernández-Espejo E. Pathogenesis of Parkinson's disease: prospects of neuroprotective and restorative therapies. *Molecular Neurobiology*. 2004; 29: 15-30.

Fernández-Espejo E. ¿Es el párkinson una haloenzimopatía? *Neurología*, en prensa. 2019; 10.1016/j.nrl.2018.12.008.

Fernández-Espejo E, Bis-Humbert C. Excess amounts of 3-iodo-L-tyrosine induce Parkinson-like features in experimental approaches of Parkinsonism. *Neurotoxicology*. 2018; 67:178-189.

Fernández Espejo E, Damas Hermoso F, García Moreno JM, Chacón J, Martín de Pablos A. El análisis de suero, líquido cefalorraquídeo y saliva indica que pacientes de Parkinson idiopático sobreexpresan PARK9 y presentan alteraciones de tipo halogenante y ATPásico. *Actas de la LXVIII Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología*. 2016; 8501, p. 36.

Fernández E, García-Moreno JM, Martín de Pablos A, Chacón J. May the thyroid gland and thyroperoxidase participate in nitrosylation of serum proteins and sporadic Parkinson's disease? *Antioxid Redox Signal*. 2014; 21:2143-2148.

Fernández E, García-Moreno JM, Martín de Pablos A, Chacón J. May the evaluation of nitrosative stress through selective increase of 3-nitrotyrosine proteins other than nitroalbumin and dominant tyrosine-125/136 nitrosylation of serum α -synuclein serve for diagnosis of idiopathic Parkinson's disease? *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19:912-918.

Fernández-Espejo E, Jiménez-Caballero M. Halogenation and Parkinson's disease. En: Phelps, Vladimir (editor). *Understanding halogenation*. Nueva York: Nova Science Publishers. 2019; 1-24. ISBN: 978-1-53615-947-949.

Fernández HH, Standaert DG, Hauser RA, et al. Levodopa-carbidopa intestinal gel in advanced Parkinson's disease patients. *J Parkinson Dis.* 2015; 5: 165-174.

Foley JM, Baxter D. On the nature of pigment granules in the cells of the locus coeruleus and substantia nigra. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1958; 17: 586-598.

Fox SH, Katzenschlager R, Lim SY, Barton B, Sepp K, et al. International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2018; 33: 1248-1266.

Fuchs D, Chiodi F, Albert J, Asjö B, Hagberg L, Hausen A, Norkrans G, Reibnegger G, Werner ER, Wachter H. Neopterin concentrations in cerebrospinal fluid and serum of individuals infected with HIV-1. *AIDS.* 1989; 3: 285-288.

Gao HM, Liu B, Hong JS. Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 2003; 23:6181-6187.

García-Moreno JM, Chacón J. Hipotiroidismo enmascarado por enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol.* 2002; 35: 741-742.

García-Moreno JM, Martín de Pablos A, García-Sánchez MI, Méndez-Lucena C, Damas-Hermoso F, Rus M, Chacón J, Fernández Espejo E. May serum levels of advanced oxidized protein products serve as a prognostic marker of disease duration in patients with idiopathic Parkinson's disease? *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18: 1296-1302.

Galzigna L, De Iuliis A, Zanatta L. Enzymatic dopamine peroxidation in substantia nigra of human brain. *Clin. Chim. Acta.* 2000; 300: 131-138.

Ghebremedhin E, Del Tredici K, Langston JW, Braak H. Diminished tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the cardiac conduction system and myocardium in Parkinson's disease: an anatomical study. *Acta Neuropathol.* 2009; 118:777-784.

Giasson BI, Duda JE, Murray VI, Chen Q, Souza J M, Hurtig H I, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*. 2000; 290: 985-989.

Goldman JG, Andrews H, Amara A, Naito A, Alcalay RN, Shaw LM, Taylor P, Xie T, Tuite P, Henchcliffe C, Hogarth P, Frank S, Saint-Hilaire MH, Frasier M, Arnedo V, Reimer AN, Sutherland M, Swanson-Fischer C, Gwinn K; Fox Investigation of New Biomarker Discovery, Kang UJ. Cerebrospinal fluid, plasma, and saliva in the BioFIND study: Relationships among biomarkers and Parkinson's disease Features. *Mov Disord*. 2018; 33:282-288.

Goldstein DS, Holmes C, Lopez GJ, Wu T, Sharabi Y. Cardiac sympathetic denervation predicts PD in at-risk individuals. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017; S1353-8020: 30360-30367.

Gonzalez-Aparicio R et al. The systemic administration of oleoylethanolamide exerts neuroprotection of the nigrostriatal system in experimental Parkinsonism. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014; 17:455-468.

Gonzalez-Aparicio R, Flores JA, Tasset I, Tunez I, Fernandez-Espejo E. Mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene present reduced number of dopamine neurons in the substantia nigra without altering motor behavior or dopamine neuron decline over life. *Neuroscience*. 2011; 186:161-169.

Good P.F, Hsu A, Werner P, Perl DP, Olanow CW, Protein nitration in Parkinson's disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 1998; 57: 338-342.

Greggio E, Bergantino E, Carter D, Ahmad R, Costin GE, Hearing VJ, Clarimon J, Singleton A, Eerola J, Hellström O, Tienari PJ, Miller DW, Beilina A, Bubacco L and Cookson MR. Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 2005; 93: 246-256.

Harrison JE, Schultz J. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem.* 1976; 251: 1371-1374

Hasegawa T. Tyrosinase-expressing neuronal cell line as in vitro model of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2010; 11: 1082-1089.

Hazen SL, D'Avignon A, Anderson MM, Hsu FF, Heinecke JW. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to oxidize alpha-amino acids to a family of reactive aldehydes. Mechanistic studies identifying labile intermediates along the reaction pathway. *J Biol Chem.* 1998; 273: 4997–5005.

Hodara R, Norris EH, Giasson BI, Mishizen-Eberz AJ, Lynch DR, Lee VM, Ischiropoulos H. Functional consequences of α -synuclein tyrosine nitration: diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 47746-47753.

Hoehn M, Yahr M. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology.* 1967; 17: 427-442.

Hoy A, Leininger-Muller B, Kutter D, Siest G, Visvikis S. Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2002; 40: 2-8.

Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1992; 55: 181-184.

Hunot S, Hirsch EC. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 2003; 53: S49-S60.

Hurtig HI, Trojanowski JQ, Galvin J, Ewbank D, Schmidt M.L, Lee VM, Clark CM, Glosser G, Stern MB, Gollomp SM, Arnold SE. Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology.* 2000; 54:1916-21.

Iglesias A, García-Nimo L, Cocho de Juan JA, Moreno JC. Towards the pre-clinical diagnosis of hypothyroidism caused by iodotyrosine deiodinase (DEHAL1) defects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014; 28:151-159.

Ikemoto K, Nagatsu I, Ito S, King RA, Nishimura A, Nagatsu T. Does tyrosinase exist in neuromelanin-pigmented neurons in the human substantia nigra? *Neurosci. Lett.* 1998; 253: 198-200.

Iranzo A, Molinuevo JL, Santamaría J, Serradell M, Martí MJ, Valldeoriola F, Tolosa E. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study. *Lancet Neurol.* 2006; 5:572-577.

Iranzo A, Stefani A, Serradell M, Martí MJ, Lomeña F, Mahlknecht P, Stockner H, Gaig C, Fernández-Arcos A, Poewe W, Tolosa E, Högl B, Santamaria J; SINBAR (Sleep Innsbruck Barcelona) group. Characterization of patients with longstanding idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurolog.* 2017; 89:242-248.

Iwanaga K et al. Lewy body-type degeneration in cardiac plexus in Parkinson's and incidental Lewy Body diseases. *Neurology.* 1999; 52:1269-1271.

Jeitner TM, Kalogiannis M, Krasnikov BF, Gomlin I, Peltier MR, Moran GR. Linking Inflammation and Parkinson Disease: Hypochlorous Acid Generates Parkinsonian Poisons. *Toxicol Sci.* 2016; 151:388-402.

Jeitner TM, Kalogiannis M, Patrick PA, Gomolin I, Palaia T, Ragolia L, Brand D, Delikatny EJ. Inflaming the diseased brain: a role for tainted melanins. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1852:937-950.

Jeitner TM, Xu H, Gibson GE. Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by the myeloperoxidase products, hypochlorous acid and mono-N-chloramine. *J Neurochem.* 2005; 92: 302-310.

Jellinger KA. Neuropathological spectrum of synucleinopathies. *Mov Disord.* 2003; 18 Suppl 6: S2-12.

Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 2003; 53:26-36.

Jensen PH, Zhang J. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain.* 2010; 133(Pt 3):713-26.

Kalinderi K, Bostantjopoulou S, Fidani L. The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects. *Acta Neurol Scand.* 2016; 134:314-326.

Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts LJ. 2^o, Ischiropoulos H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* 2012; 52: 1-6.

Kang JH, Irwin DJ, Chen-Plotkin AS, et al. Parkinson's Progression Markers Initiative, Association of cerebrospinal fluid β -amyloid 1-42, T-tau, P-tau181, and α -synuclein levels with clinical features of drug-naïve patients with early Parkinson disease. *JAMA Neurol.* 2013; 70:1277-1287.

Kang W, Chen W, Yang Q, Zhang L, Zhang L, Wang X, Dong F, Zhao Y, Chen S, Quinn TJ, Zhang J, Chen S, Liu J. Salivary total α -synuclein, oligomeric α -synuclein and SNCA variants in Parkinson's disease patients. *Sci Rep.* 2016; 6:28143.

Kantarci OH, Atkinson EJ, Hebrink DD, McMurray CT, Weinshenker BG. Association of a myeloperoxidase promoter polymorphism with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2000; 105:189-194.

Kiebertz W. Parkinson's Disease: Evidence for Environmental Risk Factors. *Mov disord* 2013; 28: 8-13.

Körner A, Pawelek J. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science*. 1982; 217: 1163-1165.

Kroksveen AC, Opsahl JA, Aye TT, Ulvik RJ, Berven F.S. Proteomics of human cerebrospinal fluid: discovery and verification of biomarker candidates in neurodegenerative diseases using quantitative proteomics. *J. Proteomics*. 2011; 74: 371-388.

Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet*. 1998; 18: 106-108.

Lee HJ, Patel S, Lee SJ. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci*. 2005; 25:6016-6024

Lee SJ, Desplats P, Lee HJ, Spencer B, Masliah E. Cell-to-cell transmission of α -synuclein aggregates. *Methods Mol Biol*. 2012; 849:347-359.

Lew MF, Slevin JT et al. Initiation and dose optimization for levodopa-carbidopa intestinal gel: insights from phase 3 clinical trials. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015; 21: 742-748.

Lipton SA et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds, *Nature*. 1993; 364: 626-632.

Ludin SM, Steiger UH, Ludin HP. Autonomic disturbances and cardiovascular reflexes in idiopathic Parkinson disease. *Arch Neurol*, 1987; 235:10-15.

Maetzler W, Liepelt I, Berg D. Progression of Parkinson's disease in the clinical phase: potential markers. *Lancet Neurol*. 2009; 8:1158-1171.

Majerus PM, Courtois PA. Susceptibility of *Candida albicans* to peroxidase-catalyzed oxidation products of thiocyanate, iodide and bromide. *J Biol Buccale*. 1992; 20:241-245.

Mani AR, Ippolito S, Moreno JC, Visser TJ, Moore KP. The metabolism and dechlorination of chlorotyrosine in vivo. *J Biol Chem*. 2007; 282:29114-29121.

Martin de Pablos A., Córdoba-Fernández A. and Fernández-Espejo E. Analysis of neurotrophic and antioxidant factors related to midbrain dopamine neuronal loss and brain inflammation in the cerebrospinal fluid of the elderly. *Exp. Gerontol*. 2018; 110: 54-60.

Martin de Pablos A, Garcia-Moreno JM and Fernández E. Does the Cerebrospinal Fluid Reflect Altered Redox State But Not Neurotrophic Support Loss in Parkinson's Disease? *Antioxid. Redox Signal*. 2015; 23: 893-898.

Matsui H, Udaka F, Oda M, Kubori T, Nishinaka K, Kameyama M. Metaiodobenzylguanidine (MIBG) scintigraphy at various parts of the body in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Auton Neurosci*. 2005; 119:56-60.

McKeith IG, Consortium on DLB. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology*. 2005; 65:1863-1872.

Merlet P et al. Pronostic value of cardiac metaiodobenzylguanidine image in patients with heart failure. *J Nucl Med*. 1992; 33:471-477.

Merola A, Romagnolo A, Zibetti M, et al. Peripheral neuropathy associated with levodopa-carbidopa intestinal infusión: a long-term prospective assessment. *Eur J Neurol*. 2016; 23: 501-509.

Metodiewa D, Dunford HB. Involvement of lactoperoxidase in the peroxidative degradation of serotonin: a potential pathway for indolaminergic melanin formation. *Biochem. Int.* 1991; 23: 183-191.

Miranda M, Botti D, Bonfigli A, Ventura T, Arcadi A. Tyrosinase-like activity in normal human substantia nigra. *Gen. Pharmacol.* 1984; 15: 541-544.

Moreno JC, Klootwijk W. Mutations in the Iodotyrosine Deiodinase Gene and Hypothyroidism. *N Engl J Med.* 2008; 358:1811-1818.

Moreno JC, Visser TJ. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to iodotyrosine deiodinase (DEHAL1) gene mutations. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 322:91-98.

Mollenhauer B, Cullen V, Kahn I, Krastins B, Outeiro TF, Pepivani I, Ng J, Schulz-Schaeffer W, Kretschmar HA, McLean PJ, Trenkwalder C, Sarracino DA, Vonsattel JP, Locascio JJ, El-Agnaf OM, Schlossmacher MG. Direct quantification of CSF alpha-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration. *Exp Neurol.* 2008; 213:315-325.

Mollenhauer B, Locascio JJ, Schulz-Schaeffer W, Sixel-Döring F, Trenkwalder C, Schlossmacher MG. α -Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. *Lancet Neurol.* 2011; 10:230-240.

Mollenhauer B, Parnetti L, Rektorova I, Kramberger MG, Pikkarainen M, Schulz-Schaeffer WJ. Biological confounders for the values of cerebrospinal fluid proteins in Parkinson's disease and related disorders. *J Neurochem.* 2016; 139: 290-317.

Mollenhauer B, Trautmann E, Taylor P, Manninger P, Sixel-Döring F, Ebentheuer J, Trenkwalder C, Schlossmacher MG. Total CSF α -synuclein is lower in de novo Parkinson patients than in healthy subjects. *Neurosci Lett.* 2013; 532:44-48.

Morano GN, Seibyl JP. Technical overview of brain SPECT imaging: improving acquisition and processing of data. *J Nucl Med Technol.* 2003; 31:191-195.

Morrish PK, Sawle GW, Brooks DJ. An [¹⁸F] dopa-PET and clinical study of the rate of progression in Parkinson's disease. *Brain.* 1996; 119: 585-91.

Moro E, Schupbach M, Wachter T, et al. Referring Parkinson's disease patients for deep brain stimulation: a RAND/UCLA appropriateness study. *J Neurol.* 2016; 263: 112-119.

Müller T, Baas H, Kassubek J, et al. Laboratory assessments in the course of Parkinson's disease: a clinician's perspective. *J Neural Trasm (Vienna).* 2016; 123:65-71.

Nagra RM, Becher B, Tourtellotte WW, Antel JP, Gold D, Paladino T, Smith RA, Nelson JR, Reynolds WF. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1997; 78:97-107.

Nakamura T, Lipton SA. Redox modulation by S-nitros(yl)ation contributes to protein misfolding, mitochondrial dynamics, and neuronal synaptic damage in neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ.* 2011, 18:1478-1486.

Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, Khalimonchuk O, del Razo LM, Quintanilla-Vega B, Pappa A, Panayiotidis MI, Franco R. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid. Redox Signal.* 2014; 21: 66-85.

Ness DK, Foley GL, Villar D, Hansen LG. Effects of 3-iodo-L-tyrosine, a tyrosine hydroxylase inhibitor, on eye pigmentation and biogenic amines in the planarian, *Dugesia dorotocephala*. *Fundam Appl Toxicol.* 1996; 30: 153-161.

Nusshold C, Kollroser M, Köfeler H, Rechberger G, Reicher H, Ullen A, Bernhart E, Waltl S, Kratzer I, Hermetter A, Hackl H, Trajanoski Z, Hrzenjak A, Malle E, Sattler W. Hypochlorite modification of sphingomyelin generates chlorinated lipid species that

induce apoptosis and proteome alterations in dopaminergic PC12 neurons in vitro. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48:1588-1600.

Norris E.H., Giasson B.I., Hodara R., Xu S., Trojanowski J.Q., Ischiropoulos H, Lee V.M. Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 21212-21219.

Niñerola-Baizán A, Gallego J, Cot A, Aguiar P, Lomeña F, Pavía J, Ros D. Optimization of the reconstruction parameters in [(123)I] FP-CIT SPECT. *Phys Med Biol.* 2018; 63:085009.

Pan T, Li X, Jankovic J. The association between Parkinson's disease and melanoma. *Int. J. Cancer.* 2011; 128: 2251-2260.

Paris I, Cardenas S, Lozano J, Perez-Pastene C, Graumann R, Riveros A, Caviedes P, Segura-Aguilar J. Aminochrome as a preclinical experimental model to study degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neurotox. Res.* 2007; 12: 125-134.

Papadimitriou A, Veletza V, Hadjigeorgiou GM, Patrikiou A, Hirano M, Anastasopoulos I. Mutated α -synuclein gene in two Greek kindreds with familial PD: incomplete penetrance? *Neurology.* 1999; 52: 651-654.

Parkkinen L, Kauppinen T, Pirttilä T, Autere JM, Alafuzoff I. Alpha-synuclein pathology does not predict extrapyramidal symptoms or dementia. *Ann Neurol.* 2005; 57: 82-91.

Pezzoli G, Cereda E. Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson's disease. *Neurology.* 2013; 80: 2035-41.

Poewe WH, Antonini A. Novel formulations and modes of delivery of levodopa. *Mov Disord.* 2015; 30: 114-120.

Poewe WH, Rascol O, Quinn N, et al. Efficacy of pramipexole and transdermal rotigotine in advanced Parkinson's disease: a double-blind, double-dummy, randomized controlled trial. *Lancet Neurol.* 2007; 6: 475-476.

Postuman RB, Berg D, Stern, et al. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disords.* 2015; 30: 1591-1599.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbeand LI, Nussbaum LR. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 1997; 276: 2045-2047.

Qureshi GA, Baig S, Bednar I, Södersten P, Forsberg G, Siden A. Increased cerebrospinal fluid concentration of nitrite in Parkinson's disease. *Neuroreport.* 1995; 6: 1642-1644.

Reichmann H. Pre-motor Diagnosis of Parkinson's Disease. *Neurosci Bull.* 2017; 33:526-534.

Reszka KJ, Matuszak Z, Chignell CF. Lactoperoxidase-catalyzed oxidation of melanin by reactive nitrogen species derived from nitrite (NO₂⁻): an EPR study. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 25: 208-216.

Reynolds WF, Rhees J, Maciejewski D, Paladino T, Sieburg H, Maki RA, Masliah E. Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 1999; 155:31-41.

Rizzo G, Copetti M, Arcuti S, et al. Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease. A systematic review and meta-analysis. *Neurology.* 2016; 86: 1-11.

Robaszkiewicz A, Bartosz G, Soszyński M. N-chloroamino acids cause oxidative protein modifications in the erythrocyte membrane. *Mech Ageing Dev.* 2008; 129: 572-579.

Rodríguez-Oroz MC. Fisiopatología de los ganglios basales en el control motor. En Obeso JA, Trinidad-Herrero M, Sánchez-Andrés JV, Micheli F (eds). *Máster de Trastornos del Movimiento. Mod A.* Barcelona: Viguera Editores. 2011; 3Cap-3b; 1-36

Roskoski R Jr, Wilgus H, Vrana KE. Inactivation of tyrosine hydroxylase by pterin substrates following phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol.* 1990; 38:541-546.

Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López JN, García-Cánovas F and García-Carmona F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1995; 1247: 1-11.

Schapira AH, Olanow CW, Greenamyre JY and Bezdard E. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet.* 2014; 384: 545-555.

Schwab RS, England AC. *Third Symposium on Parkinson's disease.* E. And S. Livingstone: Edinburgh. 1969; 152-157.

Schwarz J, Storch A, Koch W, Pogarell O, Radau PE, Tatsch K. Loss of dopamine transporter binding in Parkinson's disease follows a single exponential rather than linear decline. *J Nucl Med.* 2004; 45:1694-1697.

Scholz J, Toska K, Luborzewski A, Maass A, Schünemann V, Haavik J, Moser A. Endogenous tetrahydroisoquinolines associated with Parkinson's disease mimic the feedback inhibition of tyrosine hydroxylase by catecholamines. *FEBS J.* 2008; 275: 2109-2121.

Segura-Aguilar J. Peroxidase activity of liver microsomal vitamin D 25-hydroxylase and cytochrome P450 1A2 catalyzes 25-hydroxylation of vitamin D3 and oxidation of dopamine to aminochrome. *Biochem. Mol. Med.* 1996; 58: 122-129.

Segura-Aguilar J, Paris I, Muñoz P, Ferrari E, Zecca L, Zucca FA. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 2014; 129: 898-915.

Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Hashizume Y, Yoshida M, Osawa T, Riederer P, Naoi M. In parkinsonian substantia nigra, α -synuclein is modified by acrolein, a lipid-peroxidation product, and accumulates in the dopamine neurons with inhibition of proteasome activity. *J. Neural Transm.* 2007; 114: 1559-1567.

Shin J, Park SH, Shin C, Kim JH, Yun TJ, Kim HJ, Jeon B. Submandibular gland is a suitable site for alpha synuclein pathology in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2019; 58:35-39.

Shi M, Bradner J, Hancock AM, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, Jankovic J, Zabetian CP, Kim HM, Leverenz JB, Montine TJ, Ghingina C, UJ, Cain KC, Wang Y, Aasly J, Goldstein D, Zhang J. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Ann Neurol.* 2011; 69:570-80.

Shi M, Liu C, Cook TJ, Bullock KM, Zhao Y, Ghingina C, Li Y, Aro P, Dator R, He C, Hipp MJ, Zabetian CP, Peskind ER, Hu SC, Quinn JF, Galasko DR, Banks WA, Zhang J. Plasma exosomal α -synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2014; 128:639-650.

Singleton A, Toga AW., Chowdhury S, Mollenhauer B, Trojanowski JQ and Shaw LM. Parkinson's Progression Markers Initiative, Association of cerebrospinal fluid β -amyloid 1-42, T-tau, P-tau181, and α -synuclein levels with clinical features of drug-naive patients with early Parkinson disease. *JAMA Neurol.* 2013; 70: 1277-1287.

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett.* 1998; 251: 205-208.

Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide, *Cell.* 1994; 78: 931-936.

Stern MB, Lang A, Poewe W. Toward a redefinition of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2012; 27: 54-60.

Stewart T, Sui YT, Gonzalez-Cuyar LF, Wong DT, Akin DM, Tumas V, Aasly J, Ashmore E, Aro P, Gingham C, Korff A, Zabetian CP, Leverenz JB, Shi M, Zhang J. Cheek cell-derived α -synuclein and DJ-1 do not differentiate Parkinson's disease from control. *Neurobiol Aging.* 2014; 35:418-20.

Strzepa A, Pritchard KA, Dittel BN. Myeloperoxidase: A new player in autoimmunity. *Cell Immunol.* 2017; 317:1-8.

Sulzer D, Bogulavsky J, Larsen KE, Behr G, Karatekin E, Kleinman MH, Turro N, Krantz D, Edwards RH, Greene LA, Zecca L. Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97: 11869-11874.

Südemeyer M, Antke C, Zizet T, et al. Diagnostic accuracy of combined FP-CIT, IBZM, and MIBG scintigraphy in the differential diagnosis of degenerative parkinsonism: a multidimensional statistical approach. *JNucl Med.* 2011; 52:733-773.

Talati R, Reinhart K, Baker W, et al. Pharmacology of advanced Parkinson's disease: a meta-analysis of COMT inhibitors and MAO-B inhibitors. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009; 15: 500-505.

Tandeter H, Levy A, Gutmanand G, Shvartzman P. Subclinical thyroid disease in patients with Parkinson's disease. *Arch Gerontol Geriatr.* 2001; 33: 295-300.

Teismann P. Myeloperoxidase in the neurodegenerative process of Parkinson's disease. *Dtsch Med Wochenschr.* 2014; 139:99-102.

Thomas EL. Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: nitrogen-chlorine derivatives of bacterial components in bactericidal action against *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1979; 23:522-531.

Thompson CM, Capdevila JH and Strobel HW. Recombinant cytochrome P450 2D18 metabolism of dopamine and arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; 294: 1120-1130.

Tipre DN, Goldstein DS. Cardiac and extracardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease with orthostatic hypotension and in pure autonomic failure. *J Nucl Med.* 2005; 46: 1775-1781.

Tief K, Schmidt A, Beermann F. New evidence for presence of tyrosinase in substantia nigra, forebrain and midbrain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1998; 3: 307-310.

Todorova A, Samuel M, Brown RG, Chaudhuri KR. Infusion therapies and development of impulse control disorders in advanced Parkinson's Disease: clinical experience after 3 years`follow-up. *Clin Neuropharmacol.* 2015; 28: 132-134.

Tokuda T, Salem SA, Allsop D, Mizuno T, Nakagawa M, Qureshi MM, Locascio JJ, Schlossmacher MG, El-Agnaf OM. Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 349:162-166.

Tribl F, Arzberger T, Riederer P and Gerlach M. Tyrosinase is not detected in human catecholaminergic neurons by immunohistochemistry and Western blot analysis. *J. Neural Transm. suppl.* 2007; 51-55.

Trojanowski JQ, Goedert M, Iwatsubo T and Lee VM. Fatal attractions: abnormal protein aggregation and neuron death in Parkinson's disease and Lewy body dementia. *Cell. Death Differ.* 1998; 5: 832-827.

Tzikas S, Schlak D, Sopova K, Gatsiou A, Stakos D, Stamatelopoulos K, Stellos K, Laske C. Increased myeloperoxidase plasma levels in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis.* 2014; 39:557-564.

Van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 7617-7625.

Varrone A, Halldin C. Molecular imaging of the dopamine transporter. *J Nucl Med.* 2010; 51: 1331-1334.

Verschuur CVM, Suwijn SR, Boe JA, Post B, van Hilten JJ, et al. Randomized Delayed-Start Trial of Levodopa in Parkinson's Disease. *N Engl J Med.* 2019; 380: 315-324.

Vilas D, Iranzo A, Tolosa E, Aldecoa I, Berenguer J, Vilaseca I, Martí C, Serradell M, Lomeña F, Alós L, Gaig C, Santamaria J, Gelpi E. Assessment of α -synuclein in submandibular glands of patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a case-control study. *Lancet Neurol.* 2016; 15:708-718.

Vivacqua G, Latorre A, Suppa A, Nardi M, Pietracupa S, Mancinelli R, Fabbrini G, Colosimo C, Gaudio E, Berardelli A. Abnormal Salivary Total and Oligomeric Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease. *PLoS One.* 2016; 11: 0151156.

Vivacqua G, Suppa A, Mancinelli R, Belvisi D, Fabbrini A, Costanzo M, Formica A, Onori P, Fabbrini G, Berardelli A. Salivary alpha-synuclein in the diagnosis of Parkinson's disease and Progressive Supranuclear Palsy. *Parkinsonism Relat Disord.* 2019; 63:143-148.

Vogt W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18: 93-105.

Volkman J, Albanese A, Antonini A, et al. Selecting deep brain stimulation or infusion therapies in advanced Parkinson's disease: an evidence-based review. *J Neurol.* 2013; 260: 2701-2714.

Wakabayashi K, Takahashi H, Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. *Acta Neuropathol (Ber).* 1990; 79:581-583.

Wang J, Huang Z, Li Y, Ye F, Wang C, Zhang Y, Cheng X, Fei G, Liu K, Zeng M, Zhong C and Jin L. Neuromelanin-sensitive MRI of the substantia nigra: An imaging biomarker to differentiate essential tremor from tremor-dominant Parkinson's disease. *Parkinsons. Relat. Disord.* 2019; 58: 3-8.

Wang W et al. A soluble α -synuclein construct forms a dyad tetramer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108:17797-17802.

Wichmann T, DeLong MR. Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 2003; 91:9-18.

Wilson H, Dervenoulas G, Pagano G, Koros C, Yousaf T, Picillo M, Polychronis S, Simitsi A, Giordano B, Chappell Z, Corcoran B, Stamelou M, Gunn RN, Pellecchia MT, Rabiner EA, Barone P, Stefanis L and Politis M. Serotonergic pathology and disease burden in the

premotor and motor phase of A53T α -synuclein parkinsonism: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* 2019; 18: 748-759.

Winter J, Ilbert M, Graf PCF, Özcelik D, Jakob U. Bleach Activates a Redox-Regulated Chaperone by Oxidative Protein Unfolding. *Cell.* 2008; 135: 691–701.

Winterbourn CC. Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite. *Biochim Biophys Acta.* 1985; 840: 204–210.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996; 49:1304-1313.

Witko-Sarsat V, Gausson V, Nguyen AT, Touam M, Drüeke T, Santangelo F, Descamps-Latscha B. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int.* 2003; 64:82-91.

Witko-Sarsat V, Nguyen Khoa T, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products: oxidative stress markers and mediators of inflammation in uremia. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 1998; 28: 321-341.

Xu J, Kao SY, Lee FJ, Song W, Jin LW, Yankner BA. Dopamine-dependent neurotoxicity of α -synuclein : a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat. Med.* 2002; 8: 600-606.

Xu Y, Stokes AH, Freeman WM, Kumer SC, Vogt BA and Vrana KE. Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra. *Brain Res.* 1997; 45: 159-162.

Yasuda S, Yasuda T, Liu MY, Shetty S, Idell S, Boggaram V, Suiko M, Sakakibara Y, Fu J, Liu MC (2011) Sulfation of chlorotyrosine and nitrotyrosine by human lung endothelial and epithelial cells: role of the human SULT1A3. *Toxicol Appl Pharmacol* 251:104-109.

Yap YW, Whiteman M, Cheung NS. Chlorinative stress: an under appreciated mediator of neurodegeneration? *Cell Signa*. 2007; 19: 219-228.

Zakrzewska-Pniewska B, Styczynska M, Podlecka A, Samocka R, Peplonska B, Barcikowska M, Kwiecinski H. Association of apolipoprotein E and myeloperoxidase genotypes to clinical course of familial and sporadic multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2004; 10:266-271.

Zecca L, Casella L, Albertini A, Bellei C, Zucca FA, Engelen M, Zadlo A, Szewczyk G, Zareba M and Sarna T. Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 2008; 106:1866-1875.

Zecca L, Bellei C, Costi P, Albertini A, Monzani E, Casella L, et al., New melanic pigments in the human brain that accumulate in aging and block environmental toxic metals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008b; 105:17567-17572.

Zecca L, Fariello R, Riederer P, Sulzer D, Gatti A and Tampellini D. The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEBS Lett*. 2002; 510: 216-220.

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADOS

Estudios de suero y saliva

DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D/D^a: Ramón Morillo Verdugo como secretario/a del CEI Sevilla Sur

CERTIFICA

Que este Comité refrendará de oficio en la reunión celebrada en el día 28/11/2017 la propuesta de (No hay promotor/a asociado/a) para realizar el estudio de investigación titulado:

Título del estudio:	Análisis de la presencia de nitro-alfa-sinucleína anómala en saliva de enfermos de Parkinson. (Nitro-alfaSYN y Parkinson)
Protocolo, Versión:	1
HIP, Versión:	1
CI, Versión:	1

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Lo que firmo en a 14/12/2017

D/D^a: Ramón Morillo Verdugo , como Secretario/a del CEI Sevilla Sur



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPANTES



Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
CONSEJERÍA DE SALUD

v.04

FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Este documento sirve para que usted otorgue su consentimiento para donar sus muestras biológicas, o las del sujeto al que representa, al Biobanco indicado, establecimiento público, sin ánimo de lucro, dependiente de la Consejería de Salud/del Servicio Andaluz de Salud, que acoge colecciones de muestras biológicas concebidas con fines diagnósticos, de investigación biomédica o docencia, y organizadas como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino, donde serán conservadas hasta que se agoten por su uso, salvo que usted solicitara su eliminación. Las muestras biológicas son un excelente elemento para la investigación de enfermedades. A través de dichas investigaciones se podrán obtener datos que permitirán mejorar el conocimiento sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de multitud de enfermedades.

Esta hoja de información puede contener palabras que usted no entienda. Por favor, pídale al profesional sanitario que le explique la información que no comprenda. Tómese el tiempo necesario para decidir si quiere o no donar su muestra biológica y consulte a personas de su confianza si lo desea. Para consultas que desee plantear posteriormente, podrá dirigirse al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. Dirección: Parque Tecnológico Ciencias de la Salud. Centro de Investigación Biomédica. Avda. del Conocimiento s/n · 18100 Armilla · Granada · España · Correo electrónico: biobanco.sspa@juntadeandalucia.es

Las muestras biológicas donadas y sus datos clínicos asociados se utilizarán de conformidad con lo establecido en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica (en adelante Ley de Investigación biomédica).

Es posible que la información obtenida de las investigaciones en las que se utilicen sus muestras no le genere un beneficio directo, pero habrá contribuido al avance de la medicina y del conocimiento de diversas enfermedades, lo que supondrá, sin duda, un beneficio para la sociedad.

La donación es voluntaria y altruista, por lo que usted no tendrá derecho alguno sobre los resultados que pudieran derivarse de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras, de conformidad con la normativa vigente. Su decisión de donar o no, no afectará negativamente a su asistencia sanitaria.

Existe un apartado en el consentimiento en el que podrá decidir si quiere que sus muestras se conserven de forma codificada (en cuyo caso se identifican con un código que protege su identidad) o anonimizada (eliminandose de forma irreversible toda vinculación con su identidad).

Sus muestras y los datos asociados a las mismas sólo se cederán a terceros que las utilicen en investigación biomédica o docencia de manera anónima o disociada. Si, por la naturaleza del proyecto de investigación en el que se utilizara su muestra se necesitaran datos clínicos adicionales, el Biobanco coordinaría la obtención de los mismos, siempre que la muestra no hubiera sido anonimizada.

1. LO QUE USTED DEBE SABER:

1.1. Obtención de las muestras

Las muestras serán obtenidas durante el procedimiento médico-quirúrgico al que va a someterse o se ha sometido durante su proceso asistencial, o a través de un procedimiento expreso para obtenerla, según lo indicado en el apartado del consentimiento referente a la obtención de muestras.

En el caso de que usted done las muestras obtenidas durante un procedimiento médico-quirúrgico asistencial, no existe ningún inconveniente adicional derivado de la donación de las mismas.

Si, por el contrario, las muestras fueran extraídas expresamente para la donación para investigación biomédica podrían existir inconvenientes vinculados con la obtención de las mismas, de las que será convenientemente informado en la hoja de información del procedimiento correspondiente.

1.2. Utilización de las muestras

1
Ejemplar para el Paciente



Usted autoriza a que las muestras donadas sean utilizadas en investigación biomédica o docencia, pudiendo establecer restricciones a su utilización.

Las muestras sólo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación científicamente avalados, que cumplan las exigencias legales y los principios éticos que rigen la investigación en salud y que sean autorizados por los órganos competentes, de conformidad con lo establecido en la normativa vigente.

Cuando, por razones de salud, usted o su familia lo necesiten, podrán hacer uso de las muestras, siempre que no se hayan agotado o eliminado y no se encuentren anonimizadas.

1.3. Información relacionada con las muestras

Si lo solicita, el Biobanco le facilitará la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras donadas, si éstas no hubieran sido anonimizadas.

Al donar sus muestras al Biobanco, en este momento puede no saberse el lugar de realización de los análisis. El Biobanco mantiene un registro detallado del lugar de realización de los análisis realizados.

La información que se obtenga puede tener implicaciones para sus familiares, por lo que debe transmitirles dicha información.

1.4. Posibilidad de ponerse nuevamente en contacto

Puede que sea necesario ponerse en contacto nuevamente con usted, con el fin de recabar datos o muestras adicionales, o proporcionarle la información relevante para su salud, salvo que haya solicitado que las muestras sean anonimizadas.

1.5. Protección de datos y confidencialidad de la información

La información proporcionada en este apartado será aplicable siempre que sus muestras no se encuentren anonimizadas.

Los datos personales recabados serán confidenciales y tratados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y su normativa de desarrollo, y la Ley de Investigación biomédica.

Sus datos de carácter personal serán incorporados a un fichero automatizado, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, cuya titularidad corresponde al Servicio Andaluz de Salud. Sólo los responsables del Biobanco podrán identificar a quién corresponde cada muestra o dato, si no está anonimizada.

Podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, oposición y cancelación de sus datos personales, reconocidos en la citada Ley Orgánica 15/1999, con las limitaciones establecidas en dicha Ley. Para ello, deberá dirigirse a la Dirección General de Asistencia Sanitaria del Servicio Andaluz de Salud, Avenida de la Constitución, núm. 18, de Sevilla.

1.6. Derecho de revocación del consentimiento

Salvo que sus muestras se encuentren anonimizadas, podrá revocar o retirar, en cualquier momento, el consentimiento prestado. Para ello, deberá dirigirse al Biobanco, pudiendo solicitar la eliminación o la anonimización de las muestras.

Los efectos de la revocación no se extenderán a los resultados de las investigaciones llevadas a cabo con anterioridad.

1.7. Información relativa a análisis genéticos

Salvo que usted manifieste lo contrario en el apartado dedicado al consentimiento, se podrán realizar análisis genéticos.

Excepto si sus muestras son anonimadas, tiene derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, así como de la información relativa a su salud derivada de dichos análisis.

Si no desea recibir dicha información y ésta fuera necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar o a un representante. La comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para evitar tal perjuicio.

1.8. Otras consideraciones

Una vez informado/a de los aspectos relacionados anteriormente en este documento, si decide donar dichas muestras deberá firmar el consentimiento informado para la donación.

ANEXO B – ESCALAS DE HOEHN-YAHR, UPDRS, SCHWAB-ENGLAND y NO-MOTORA

ESCALA DE HOEHN-YAHR	
ESTADIO 0	No hay signos de enfermedad
ESTADIO 1	Enfermedad unilateral
ESTADIO 2	Enfermedad bilateral, sin alteración del equilibrio
ESTADIO 3	Enfermedad bilateral leve o moderada con inestabilidad postural, físicamente independiente
ESTADIO 4	Incapacidad grave, capaz de caminar o permanecer de pie sin ayuda
ESTADIO 5	Permanece en silla de rueda o encamado si no tiene ayuda

ESCALA UPDRS
<u>I. ESTADO MENTAL. COMPORTAMIENTO Y ESTADO DE ANIMO</u> (En la semana previa. Historia)
1. ALTERACION DEL INTELECTO:
<p>0 = Nula.</p> <p>1 = Leve, Falta de memoria evidente, con recuerdo parcial de los acontecimientos, sin otras dificultades.</p> <p>2 = Pérdida moderada de memoria, con desorientación y dificultad moderada para la resolución de problemas más complejos. Alteración funcional discreta, pero evidente en el hogar con necesidad de recordarle ocasionalmente las cosas.</p> <p>3 = Pérdida grave de memoria con desorientación temporal y, con frecuencia, espacial. La capacidad para resolver problemas está muy alterada.</p> <p>4 = Pérdida grave de memoria, conservando solamente la orientación personal. Incapacidad para elaborar juicios o resolver problemas. Requiere mucha ayuda para mantener el cuidado personal. No se puede quedar solo</p>
2. TRASTORNOS DEL PENSAMIENTO (Por demencia o intoxicación por fármacos):
<p>0 = No hay.</p> <p>1 = Ensueños vívidos.</p> <p>2 = Alucinaciones «benignas», conservando la capacidad de discernir.</p> <p>3 = Alucinaciones o delirios de ocasionales a frecuentes. Sin capacidad de discernir. Pueden interferir con las actividades diarias.</p> <p>4 = Alucinaciones o delirios persistentes o psicosis florida. Incapaz de cuidar de sí mismo.</p>
3. DEPRESIÓN:
<p>0 = No hay.</p> <p>1 = Períodos de tristeza o sentimientos de culpa mayores de lo normal, aunque nunca mantenidos durante días o semanas.</p> <p>2 = Depresión mantenida (1 semana o más).</p>

<p>3 = Depresión mantenida con síntomas vegetativos (insomnio, anorexia, pérdida de peso, pérdida de interés).</p> <p>4 = Depresión mantenida, con síntomas vegetativos y pensamientos o intento de suicidio.</p>
<p>4. MOTIVACIÓN-INICIATIVA:</p>
<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Menos pujante de lo habitual; más pasivo.</p> <p>2 = Pérdida de iniciativa o desinterés en cuanto a actividades opcionales (no rutinarias).</p> <p>3 = Pérdida de iniciativa o desinterés en las actividades de cada día (rutinarias).</p> <p>4 = Aislado, apartado; pérdida total de la motivación.</p>
<p>PUNTUACIÓN TOTAL SUBESCALA I: /16.</p>
<p><u>II. ACTIVIDADES DE LA VIDA DIARIA</u></p>
<p>5. LENGUAJE:</p>
<p>0 = Normal</p> <p>1 = Discretamente alterado. No hay dificultad para entender</p> <p>2 = Moderadamente alterado. A veces hay que pedirle que repita algo.</p> <p>3 = Muy alterado. Hay que pedirle con frecuencia que repita.</p> <p>4 = Ininteligible la mayor parte del tiempo.</p>
<p>6. SALIVACIÓN:</p>
<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Exceso de saliva en la boca, discreto pero evidente; puede haber babeo durante la noche.</p> <p>2 = Moderado exceso de saliva; puede haber mínimo babeo.</p> <p>3 = Marcado exceso de saliva con cierto grado de babeo.</p> <p>4 = Marcado babeo; requiere constantemente gasa o pañuelo.</p>
<p>7. DEGLUCIÓN:</p>
<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Rara vez se atraganta.</p> <p>2 = Se atraganta ocasionalmente.</p> <p>3 = Requiere dieta blanda.</p> <p>4 = Requiere alimentación por sonda nasogástrica o gastrostomía.</p>
<p>8. ESCRITURA:</p>
<p>0 = Normal</p> <p>1 = Discretamente lenta o pequeña.</p> <p>2 = Moderadamente lenta o pequeña; todas las palabras son legibles.</p> <p>3 = Muy alterada; no son legibles todas las palabras.</p> <p>4 = La mayoría de las palabras son ilegibles.</p>
<p>9. CORTAR ALIMENTOS Y MANEJAR CUBIERTOS:</p>
<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Algo lento y torpe, pero no necesita ayuda.</p> <p>2 = Puede cortar la mayoría de los alimentos, aunque con torpeza y lentitud; necesita cierta ayuda.</p> <p>3 = Le tienen que cortar los alimentos, pero aún puede alimentarse con lentitud.</p> <p>4 = Necesita ser alimentado.</p>

10. VESTIDO:
<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Algo lento, pero no requiere ayuda.</p> <p>2 = Requiere ayuda en ocasiones para abotonarse, introducir los brazos por las mangas.</p> <p>3 = Requiere bastante ayuda, puede hacer algunas cosas solo.</p> <p>4 = Incapacitado.</p>
11 HIGIENE:
<p>0 = Normal</p> <p>1 = Algo lento, pero no necesita ayuda.</p> <p>2 = Necesita ayuda para ducharse o bañarse, o es muy lento en las actividades higiénicas</p> <p>3 = Requieren ayuda para lavarse, cepillarse los dientes, peinarse, ir al retrete.</p> <p>4 = Sonda de Foley u otras ayudas mecánicas.</p>
12 DAR VUELTAS EN CAMA Y AJUSTAR LA ROPA DE CAMA:
<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Algo lento y torpe, pero no precisa ayuda.</p> <p>2 = Puede volverse solo o ajustar las sábanas, pero con gran dificultad.</p> <p>3 = Puede iniciar la acción, pero no puede volverse o ajustar las sabanas solo.</p> <p>4 = Incapacitado.</p>
13. CAÍDAS (Sin relación con el fenómeno de "congelación"):
<p>0 = Ninguna.</p> <p>1 = Rara vez.</p> <p>2 = Se cae ocasionalmente (menos de una vez al día).</p> <p>3 = Se cae un promedio de una vez al día.</p> <p>4 = Se cae más de una vez al día.</p>
14. "CONGELACIÓN" AL CAMINAR:
<p>0 = No hay.</p> <p>1 = Rara vez aparece «congelación» al caminar; puede haber titubeo al inicio.</p> <p>2 = «Congelación» ocasional al caminar.</p> <p>3 = «Congelación» frecuente. A veces se cae por causa de este fenómeno.</p> <p>4 = Caídas frecuentes por «congelación».</p>
15. CAMINAR:
<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Leve dificultad. Puede no balancear los brazos o puede tender a arrastrar las piernas.</p> <p>2 = Dificultad moderada, pero requiere poca o ninguna ayuda.</p> <p>3 = Trastorno grave de la marcha que requiere ayuda.</p> <p>4 = No puede caminar, incluso con ayuda.</p>
16. TEMBLOR:
<p>0 = Ausente.</p> <p>1 = Discreto; infrecuentemente presente. No resulta molesto para el paciente.</p> <p>2 = Moderado; molesto para el paciente.</p> <p>3 = Intenso; interfiere con muchas actividades.</p> <p>4 = Marcado; interfiere la mayoría de las actividades.</p>
17. SINTOMAS SENSORIALES RELACIONADOS CON EL PARKINSONISMO

<p>0 = Normal 1 = Ocasionalmente tiene entumecimiento, hormigueo o dolorimiento discreto. 2 = Con frecuencia tiene entumecimiento, hormigueo o dolorimiento discreto; no resulta penoso. 3 = Frecuentes sensaciones dolorosas 4 = Dolor extremo.</p>
<p>PUNTUACION TOTAL SUBESCALA II: /52</p>
<p>III. EXPLORACIÓN DE ASPECTOS MOTORES</p>
<p>18. LENGUAJE:</p>
<p>0 = Normal. 1 = Pérdida discreta de expresión, dicción y/o volumen. 2 = Monótono; farfullado, pero comprensible; moderadamente alterado. 3 = Muy alterado, difícil de comprender. 4 = Ininteligible.</p>
<p>19. EXPRESIÓN FACIAL:</p>
<p>0 = Normal. 1 = Mínima hipomimia; podría ser una cara inexpressiva («cara de póker») normal. 2 = Disminución discreta, pero claramente anormal, de la expresión facial. 3 = Hipomimia moderada; labios separados la mayor parte del tiempo. 4 = Cara «de máscara» o expresión fija con pérdida acusada o completa de la expresión facial; labios separados más de 6 mm.</p>
<p>20. TEMBLOR DE REPOSO EN MMSS:</p>
<p>0 = Ausente. 1 = Discreto e infrecuentemente presente. 2 = Discreto en amplitud y persistente, o de amplitud moderada pero presente sólo de forma intermitente. 3 = De amplitud moderada y presente la mayor parte del tiempo. 4 = De gran amplitud y presente la mayor parte del tiempo.</p>
<p>21. TEMBLOR DE REPOSO EN MMII:</p>
<p>0 = Ausente. 1 = Discreto e infrecuentemente presente. 2 = Discreto en amplitud y persistente, o de amplitud moderada pero presente sólo de forma intermitente. 3 = De amplitud moderada y presente la mayor parte del tiempo. 4 = De gran amplitud y presente la mayor parte del tiempo.</p>
<p>22. TEMBLOR DE ACCION O POSTURAL DE LAS MANOS:</p>
<p>0 = Ausente. 1 = Leve; presente con la acción. 2 = De amplitud moderada; presente con acción. 3 = De amplitud moderada al mantener la postura en el aire; así como con la acción. 4 = De gran amplitud; interfiere la alimentación.</p>
<p>23. RIGIDEZ AXIAL: (Valorada según el movimiento pasivo de las grandes articulaciones, con el paciente relajado y sentado).</p>

<p>0 = Ausente.</p> <p>1 = Discreta o detectable solamente cuando se activa por movimientos en espejo o de otro tipo.</p> <p>2 = Discreta a moderada.</p> <p>3 = Intensa pero se consigue con facilidad el movimiento en toda su amplitud.</p> <p>4 = Muy intensa; la amplitud del movimiento se logra con dificultad.</p>
<p>24. RIGIDEZ EN MMSS: (Valorada según el movimiento pasivo de las grandes articulaciones, con el paciente relajado y sentado. No considerar la rigidez «en rueda dentada»):</p>
<p>0 = Ausente.</p> <p>1 = Discreta o detectable solamente cuando se activa por movimientos en espejo o de otro tipo.</p> <p>2 = Discreta a moderada.</p> <p>3 = Intensa, pero se consigue con facilidad el movimiento en toda su amplitud.</p> <p>4 = Muy intensa; la amplitud del movimiento se logra con dificultad.</p>
<p>25. RIGIDEZ EN MMII. (Valorada según el movimiento pasivo de las grandes articulaciones, con el paciente relajado y sentado. No considerar la rigidez «en rueda dentada»):</p>
<p>0 = Ausente.</p> <p>1 = Discreta o detectable solamente cuando se activa por movimientos en espejo o de otro tipo.</p> <p>2 = Discreta a moderada.</p> <p>3 = Intensa, pero se consigue con facilidad el movimiento en toda su amplitud.</p> <p>4 = Muy intensa; la amplitud del movimiento se logra con dificultad.</p>
<p>26. GOLPETEO DE LOS DEDOS. (El paciente golpea el pulgar con el índice en rápida sucesión y con la mayor amplitud posible; realizar con cada mano por separado).</p>
<p>0 = Normal (15/5 segundos).</p> <p>1 = Enlentecimiento discreto y/o reducción de la amplitud (11-14/5 segundos).</p> <p>2 = Moderadamente alterado. Fatigoso de manera evidente y precoz. Puede haber detenciones ocasionales en el movimiento (7-10/5 segundos).</p> <p>3 = Muy alterado. Frecuentes titubeos al iniciar los movimientos o detenciones mientras se realiza el movimiento (3-6/5 segundos).</p> <p>4 = Apenas puede realizar la acción (0-2/5 segundos).</p>
<p>27. MOVIMIENTOS ALTERNANTES CON LAS MANOS. (El paciente abre y cierra las manos rápida sucesión con la mayor amplitud posible).</p>
<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Discreto enlentecimiento y/o reducción de la amplitud.</p> <p>2 = Alteración moderada. Fatigoso de manera evidente y precoz. Puede haber detenciones ocasionales en el movimiento.</p> <p>3 = Muy alterados. Frecuentes titubeos al iniciar los movimientos o detenciones mientras se realizan los movimientos.</p> <p>4 = Apenas puede realizarlos.</p>
<p>28. MOVIMIENTOS RAPIDOS ALTERNANTES DE MMSS. (movimientos de pronación-supinación de las manos, en sentido vertical, con la mayor amplitud posible y simultáneamente con ambas manos):</p>
<p>0 = Normal</p> <p>1 = Discreto enlentecimiento y/o reducción en amplitud.</p>

<p>2 = Moderadamente alterados. Fatigoso de manera evidente y precoz. Puede haber ocasionales detenciones en el movimiento.</p> <p>3 = Muy alterados. Frecuentes titubeos al iniciar los movimientos o detenciones mientras se realizan los movimientos.</p> <p>4 = Apenas puede realizarlos.</p>
<p>29. AGILIDAD CON LOS MMII. (El paciente golpea con el talón en rápida sucesión levantando el pie entero del suelo; la amplitud del movimiento debe ser alrededor de 7,5 cm.):</p>
<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Discreto enlentecimiento y/o reducción en amplitud.</p> <p>2 = Moderadamente alterada. Fatigosa de manera evidente y precoz. Puede haber ocasionales detenciones en el movimiento.</p> <p>3 = Muy alterada. Frecuentes titubeos al iniciar los movimientos o detenciones mientras se realiza el movimiento.</p> <p>4 = Apenas puede realizar la acción.</p>
<p>30. LEVANTARSE DE LA SILLA. (El paciente intenta levantarse de una silla de madera o metal de respaldo recto, con los brazos cruzados ante el pecho):</p>
<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Lento, o puede necesitar más de un intento.</p> <p>2 = Tiene que impulsarse con los brazos en la silla.</p> <p>3 = Tiende a caer hacia atrás y puede tener que intentarlo más de una vez, pero puede conseguirlo sin ayuda.</p> <p>4 = Incapaz de levantarse sin ayuda.</p>
<p>31. POSTURA:</p>
<p>0 = Erecta normal.</p> <p>1 = Postura no muy erecta, discretamente encorvada; podía ser normal en una persona mayor.</p> <p>2 = Postura moderadamente encorvada, claramente anormal. Puede inclinarse discretamente a un lado</p> <p>3 = Postura muy encorvada, con cifosis. Puede inclinarse moderadamente a un lado.</p> <p>4 = Flexión marcada con alteración postural extrema.</p>
<p>32. MARCHA:</p>
<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Camina lentamente; pueden arrastrar los pies, con paso cortos, pero sin festinación ni propulsión.</p> <p>2 = Camina con dificultad, pero no requiere ayuda o muy escasa. Puede haber festinación, pasos cortos o propulsionados.</p> <p>3 = Trastornos graves de la marcha que requieren ayuda.</p> <p>4 = No puede caminar, incluso con ayuda.</p>
<p>33. ESTABILIDAD POSTURAL. (respuesta al desplazamiento súbito posterior producido por un tirón de los hombros mientras el paciente permanece en bipedestación con los ojos abiertos y los pies discretamente separados; el paciente esta avisado):</p>
<p>0 = Normal.</p> <p>1 = Retropulsión, pero se recupera sin ayuda.</p> <p>2 = Ausencia de respuesta postural; se caería si no le sujetara el examinador.</p>

3 = Muy inestable; tiende a perder el equilibrio espontáneamente. 4 = Incapaz de permanecer en pie sin ayuda.
34. BRADIQUINESA E HIPOQUINESIA. (Combina lentitud, titubeo, disminución del braceo, pequeña amplitud y pobreza de movimiento, en general):
0 = No hay. 1 = Mínima lentitud que da al movimiento un carácter deliberado; podría ser normal en algunas personas. Amplitud posiblemente reducida. 2 = Lentitud y pobreza de movimientos, en grado leve, que es claramente anormal. Como alternativa, cierto grado de reducción en la amplitud. 3 = Lentitud, pobreza o pequeña amplitud de movimientos moderada. 4 = Lentitud, pobreza o pequeña amplitud de movimientos marcada.
PUNTUACIÓN TOTAL SUBESCALA III: /68.
<u>IV. COMPLICACIONES DEL TRATAMIENTO</u> (En la semana previa. Historia)
A). DISCINESIAS:
35. DURACIÓN. ¿Qué proporción del día vigil están presentes las discinesias?
0 = Ninguna. 1 = 1-25% del día. 2 = 26-50% del día. 3 = 51-75% del día. 4 = 76-100% del día.
36. INCAPACIDAD. ¿Hasta qué punto son incapacitaciones las discinesias? (Información por historia; puede ser modificado por exploración en la consulta)
0 = No incapacitan en absoluto. 1 = Discretamente incapacitantes. 2 = Moderadamente incapacitantes. 3 = Importantemente incapacitantes. 4 = Completamente incapacitantes.
37. DISCINESIAS DOLOROSAS. ¿Son dolorosas las discinesias?
0 = No son dolorosas. 1 = Discretamente. 2 = Moderadamente. 3 = Importantemente. 4 = Marcadamente.
38. PRESENCIA DE DISTONIA MATUTINA:
0 = No. 1 = Sí.
B). FLUCTUACIONES CLÍNICAS:
39. ¿Hay PERÍODOS OFF PREDECIBLES en relación temporal con las dosis de medicación?
0 = No. 1 = Sí.
40. Hay PERÍODOS OFF IMPREDECIBLES en relación temporal con las dosis de medicación?

0 = No. 1 = Sí.
41. ¿Hay PERÍODOS OFF DE INSTAURACIÓN SÚBITA? (P. ej.: en unos segundos):
0 = No. 1 = Sí.
42. ¿Qué PROPORCIÓN DEL DÍA vigil está el paciente en OFF, de promedio?
0 = Ninguna. 1 = 1-25% del día. 2 = 26-50% del día. 3 = 51-75% del día. 4 = 76-100% del día.
C). OTRAS COMPLICACIONES:
43. ¿TIENE EL PACIENTE ANOREXIA, NAUSEAS O VOMITOS?
0 = No 1 = Sí.
44. ¿TIENE EL PACIENTE TRASTORNOS DEL SUEÑO?
0 = No 1 = Sí.
45. ¿TIENE EL PACIENTE ORTOSTATISMO SINTOMATICO?
0 = No. 1 = Sí.
PUNTUACIÓN TOTAL SUBESCALA IV: /23
UPDRS TOTAL: /159.

ESCALA DE SCHWAB-ENGLAND
100% Completamente independiente. Capaz de realizar todas las tareas sin lentitud, dificultad o alteraciones. Esencialmente normal. No aprecia ninguna dificultad.
90% Completamente independiente. Capaz de realizar todas las tareas con cierto grado de lentitud, dificultad o alteración. Puede tardar el doble. Comienza a ser consciente de sus dificultades.
80% Completamente independiente para realizar la mayor parte de las tareas. Tarda el doble. Consciente de sus dificultades y lentitud.
70% No es totalmente independiente. Mayor dificultad con ciertas tareas. En algunas tarda tres o cuatro veces el tiempo habitual. Tiene que invertir gran parte del día en realizar las tareas.
60% Cierta grado de dependencia. Puede realizar la mayor parte de las tareas, pero con mucha lentitud y mucho esfuerzo. Errores; algunas tareas imposibles.
50% Más dependiente. Ayuda para la mitad de las actividades. Más lento, etc. Dificultades con todo.
40% Muy dependiente. Puede ayudar en todas las tareas, pero pocas las logra hacer solo.
30% Con esfuerzo, de vez en cuando hace unas pocas actividades solo o las empieza solo. Necesita mucha ayuda.
20% No hace nada solo. Puede ayudar algo en algunas actividades. Muy inválido.
10% Totalmente dependiente, indefenso. Completamente inválido.
0% No mantiene adecuadamente funciones vegetativas como la deglución, función vesical o intestinal. Encamado.

ESCALA NO-MOTORA	
TRASTORNOS NEUROPSIQUIATRICOS	SINTOMAS GASTROINTESTINALES
Deterioro cognitivo	Estreñimiento
Apatía	Sialorrea
Ansiedad	Disfagia
Depresión	Rinorrea
Psicosis	Pérdida de peso
DISFUNCIÓN AUTONOMICA	SINTOMAS SENSORIALES
Transpiración inapropiada	Dolor "difuso"
Síntomas urinarios	Dolor distónico
Hipotensión ortostática	Dolor músculo-esquelético
Síncope	Parestesias
Disfunción sexual	Hiposmia
Disfunción vesical	Anosmia
TRASTORNOS DEL SUEÑO	OTROS
Somnolencia diurna	Fatiga
Insomnio	Malestar general
Alteraciones del circo circadiano	Diplopía
Trastornos del sueño REM	Disartria
SPI y MPP	Seborrea

