

Tesis Doctoral

**Estudio de factores genéticos y otros marcadores
moleculares en la enfermedad de Parkinson**

Autora

María Teresa Periñán Tocino

Directores

Pablo Mir Rivera

María del Pilar Gómez Garre

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de Medicina

Sevilla, 19 de Marzo de 2022

Memoria presentada por María Teresa Perriñán Tocino para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), bajo la supervisión del Doctor Pablo Mir Rivera y la Doctora María del Pilar Gómez Garre.

María Teresa Perriñán Tocino ha recibido financiación para el contrato predoctoral del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Gobierno de España).

D. Pablo Mir Rivera, Profesor titular vinculado del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla y Dña. María del Pilar Gómez Garre, Doctora en Ciencias (Biología Molecular) e investigadora de la UGC de Neurología del Hospital Universitario Virgen del Rocío,

CERTIFICAN:

Que la memoria del trabajo titulada “Estudio de factores genéticos y otros marcadores moleculares en la enfermedad de Parkinson” elaborada por María Teresa Perriñán Tocino, graduada en Biotecnología, ha sido realizada bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Para que así conste, firman la presente en Sevilla, a 19 de Marzo de 2022.

Fdo: D. Pablo Mir Rivera

Fdo: Dña. María del Pilar Gómez Garre

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	I
INTRODUCCIÓN	1
1. EPIDEMIOLOGÍA	1
2. CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS	2
3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	3
3.1. DETERIORO COGNITIVO EN LA EP.....	5
4. ABORDAJE TERAPÉUTICO.....	6
5. ETIOLOGÍA.....	8
6. MECANISMOS PATOGENICOS.....	10
6.1. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL	10
6.2. ESTRÉS OXIDATIVO	11
6.3. NEUROINFLAMACIÓN.....	11
7. GENÉTICA DE LA EP.....	12
7.1. FORMAS AUTOSÓMICAS DOMINANTES DE LA EP	16
7.2. FORMAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS DE LA EP.....	17
7.3. FACTORES DE RIESGO GENÉTICOS DE LA EP	19
7.4. GENES ASOCIADOS CON LA EP PENDIENTES DE CONFIRMACIÓN	21
7.5. MÉTODOS PARA IDENTIFICAR LOS FACTORES GENÉTICOS.....	23
8. BIOMARCADORES EN LA EP	26
8.1. POTENCIAL PRONÓSTICO DE LOS MARCADORES CLÍNICOS.....	27
8.2. POTENCIAL PRONÓSTICO DE LOS MARCADORES DE IMAGEN	27
8.3. POTENCIAL PRONÓSTICO DE LOS MARCADORES GENÉTICOS	28
8.4. POTENCIAL PRONÓSTICO DE OTROS MARCADORES MOLECULARES.....	29
HIPÓTESIS	34
OBJETIVOS	35
DISEÑO EXPERIMENTAL	36

RESULTADOS.....	39
1. Identificación de variaciones genéticas implicadas en la fisiopatología de la EP, así como en el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP.....	39
1.1. Estudio de la implicación de los genes <i>RHOT1</i> y <i>RHOT2</i> en la fisiopatología y la edad de inicio de la EP utilizando datos de las cohortes IPDGC y AMP-PD.....	39
1.1.1. <i>Resumen de resultados</i>	39
1.1.2. <i>Publicación:</i> Periñán MT, Gómez-Garre P, Blauwendraat C, Mir P, Bandres-Ciga S. The role of RHOT1 and RHOT2 genetic variation on Parkinson disease risk and onset. <i>Neurobiol. Aging.</i> 2021; 97: 144.e1-144.e3.....	40
1.2. Estudio de la implicación del gen <i>LRP10</i> en la fisiopatología de la EP en una población del sur de España.....	41
1.2.1. <i>Resumen de resultados</i>	41
1.2.2. <i>Publicación:</i> Periñán MT, Macías-García D, Buiza-Rueda D, Guijarro-Albaladejo B, Jesús S, Adarmes-Gómez AD, Escuela R, Vigo-Ortega R, Gómez-Garre P, Mir P. Analysis of p.Tyr307Asn variant in the LRP10 gene in Parkinson's disease in southern Spain. <i>Neurobiol. Aging.</i> 2020; 93: 142.e1-142.e3.....	41
1.3. Evaluación de la asociación del gen <i>PICALM</i> con el riesgo de desarrollar deterioro cognitivo en la EP y su validación en la cohorte PPMI.....	42
1.3.1. <i>Resumen de resultados</i>	42
1.3.2. <i>Publicación:</i> Periñán MT, Macías-García D, Labrador-Espinosa MA, Jesús S, Buiza-Rueda D, Adarmes-Gómez AD, Muñoz-Delgado L, Gómez-Garre P, Mir P. Association of PICALM with Cognitive Impairment in Parkinson's Disease. <i>Mov. Disord.</i> 2021; 36(1): 118-123.....	42
2. Identificación de posibles marcadores moleculares circulantes asociados con la EP y el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP.....	43
2.1. Análisis de la expresión diferencial de miRNAs circulantes en sangre total como marcadores no invasivos en distintos subtipos de EP.....	43
2.1.1. <i>Resumen de resultados</i>	43
2.1.2. <i>Manuscrito en vías de publicación:</i> Periñán MT, Gómez-Garre P, Macías-García D, Jesús S, Buiza-Rueda D, Bonilla-Toribio M, Jimenez-Jaraba MV, Muñoz-Delgado L, Adarmes-Gómez AD, Mir P. The role of blood microRNAs and their associated pathways in LRRK2 and GBA related Parkinson's disease.....	43
2.2. Estudio de la implicación de los niveles de homocisteína en sangre, así como de polimorfismos en genes implicados en su metabolismo, con el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP.....	44
2.2.1. <i>Resumen de resultados</i>	44

2.2.2. *Manuscrito en vías de publicación:* Periñán MT, Macías-García D, Jesús S, Martín-Rodríguez JF, Muñoz-Delgado L, Jimenez-Jaraba MV, Buiza-Rueda D, Bonilla-Toribio M, Adarmes-Gómez AD, Gómez-Garre P, Mir P. Homocysteine levels, genetic background, and cognitive impairment in Parkinson's disease. 44

DISCUSIÓN 45

CONCLUSIONES 58

BIBLIOGRAFÍA 60

ABREVIATURAS

Aβ	β -amiloide
ABCA7	<i>ATP Binding Cassette Subfamily A Member 7</i>
AMP-PD	<i>Accelerating Medicines Partnership for Parkinson's Disease</i>
APOE	Apolipoproteina E
ATP13A2	<i>ATPase Cation Transporting 13A2</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> (Factor neurotrófico derivado del cerebro)
BHE	Barrera hematoencefálica
CHCHD2	<i>Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 2</i>
CL	Cuerpos de Lewy
CLU	Clusterina
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
CR1	<i>Complement receptor type 1</i>
DCL	Demencia por cuerpos de Lewy
DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i> (Ácido docosahexaenoico)
DILs	Discinesias inducidas por levodopa
DJ1	<i>Parkinsonism-associated protein DJ1</i>
DNAJC6	<i>DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C6</i>
DNAJC13	<i>DnaJ Heat Shock Protein Family Member C13</i>
DRD1	<i>Dopamine Receptor D1</i>
DRD2	<i>Dopamine Receptor D2</i>
DRD3	<i>Dopamine Receptor D3</i>
EA	Enfermedad de Alzheimer
EIF4G1	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 Gamma 1</i>
EP	Enfermedad de Parkinson
FBOX7	<i>F-Box Protein 7</i>
GBA	Glucocerebrosidasa
GIGYF2	<i>GRB10 Interacting GYF Protein 2</i>
GRIN2B	<i>Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2B</i>

GWAS	<i>Genome Wide Association Study</i> (Estudio de asociación del genoma completo)
GWLA	<i>Genome-wide linkage analysis</i> (Análisis de ligamiento del genoma)
HTRA2	<i>HtrA Serine Peptidase 2</i>
HUVR	Hospital Universitario Virgen del Rocío
ICOMT	Inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa
IMAOB	Inhibidor de la monoaminoxidasa B
IPDGC	<i>International Parkinson Disease Genomic Consortium</i>
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cell</i> (Células madre pluripotentes inducidas)
LCR	Líquido cefalorraquídeo
L-Dopa	Levodopa
LRP10	<i>LDL Receptor Related Protein 10</i>
LRRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i> (Frecuencia del alelo menor)
MAPT	<i>Microtubule Associated Protein Tau</i>
MDS	<i>Movement Disorders Society</i>
Mfn	Mitofusina
miRNA	microRNA
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i> (Imagen por resonancia magnética)
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
MTRR	Metionina sintasa reductasa
NfL	<i>Neurofilament Light chain</i> (Cadena ligera de los neurofilamentos)
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (Secuenciación de nueva generación)
NL	Neuritas de Lewy
OR	<i>Odds Ratio</i> (Razón de probabilidades)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PDBP	<i>Parkinson's Disease Biomarkers Program</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i> (Tomografía por emisión de positrones)
PICALM	<i>Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein</i>
PINK1	<i>PTEN Induced Kinase 1</i>
PLA2G6	<i>Phospholipase A2 Group VI</i>

PPMI	<i>Parkinson's Progression Markers Initiative</i>
PRKN	<i>Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>
PRS	<i>Polygenic Risk Score</i> (Puntuación de riesgo poligénico)
REM	<i>Rapid Eye Movements</i>
RHOT1	<i>Ras Homolog Family Member T1</i>
RHOT2	<i>Ras Homolog Family Member T2</i>
RIC3	<i>RIC3 Acetylcholine Receptor Chaperone</i>
RNA-seq	<i>RNA sequencing</i> (Secuenciación del ARN)
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic curve</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies reactivas de oxígeno)
SNCA	α -sinucleína
SNYJ1	<i>Synaptojanin 1</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de un solo nucleotido)
SNpc	Sustancia Negra <i>pars compacta</i>
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> (Tomografía por emisión de fotón único)
TCI	Trastorno del control de impulsos
TCN2	Transcobalamina II
TCS	<i>Transcranial Sonography</i> (Ecografía transcraneal)
TMEM230	<i>Transmembrane Protein 230</i>
UCHL1	<i>Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1</i>
UTM	Unidad de Trastornos del Movimiento
VPS35	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 35</i>
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i> (Secuenciación del exoma completo)
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i> (Secuenciación del genoma completo)

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) representa la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer (EA), y el primer trastorno del movimiento más frecuente. Clínicamente, la EP se caracteriza por tres síntomas motores cardinales: bradicinesia, temblor en reposo y rigidez muscular. Estos síntomas son el resultado principal de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* (SNpc), que conlleva un déficit de dopamina en los ganglios basales (Kalia & Lang, 2015).

1. EPIDEMIOLOGÍA

Se estima que en los países industrializados la prevalencia de la EP es del 0,3% en la población general, aumentando al 1,0% en los mayores de 60 años y al 3,0% en los mayores de 80 años. Por otro lado, la tasa de incidencia media anual estandarizada por edad es de 14 por cada 100.000 en la población general y 160 por cada 100.000 en los mayores de 65 años (Ascherio & Schwarzschild, 2016). A pesar de estos datos generales, se ha observado que la prevalencia e incidencia de la EP varía entre los diferentes estudios en función del origen étnico, la edad y/o el género de la población analizada, lo cual dificulta la comparación de las diferentes estimaciones (Kasten et al., 2007). También, se han descrito diferencias geográficas en la frecuencia de la EP, las cuales podrían deberse a factores ambientales y de riesgo genético. Aun así, la prevalencia de la EP parece ser mayor en Europa, América del Norte y América del Sur, en comparación con los países africanos, asiáticos y árabes (Kalia & Lang, 2015).

Los pacientes con EP experimentan una mayor gravedad de los síntomas a medida que avanza la enfermedad, lo que conduce a un aumento de los costes tanto directos como indirectos. En concreto, la atención hospitalaria y las residencias de ancianos suponen la mayor carga económica en Europa, mientras que los fármacos contribuyen en un porcentaje menor a los costes totales (Rodríguez-Blázquez et al., 2015). La previsión de un número creciente de pacientes, debido al aumento de la esperanza de vida, y el impacto económico asociado, subrayan la necesidad de desarrollar nuevas terapias que ayuden a prevenir, retrasar o aliviar los síntomas asociados a la EP (Hermanowicz & Edwards, 2015).

2. CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS

La característica patológica principal de la EP es la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la SNpc. La región más afectada es, típicamente, la zona ventrolateral, que contiene neuronas que proyectan al putamen del estriado dorsal. De este modo, la degeneración del sistema nigroestriatal produce una denervación del estriado que conlleva la pérdida de dopamina en esa zona (**Figura 1**) (Alexander, 2004). Aunque la afectación principal es la del sistema dopaminérgico, algunas estructuras implicadas en otros sistemas de neurotransmisión (como el locus coeruleus, el núcleo pedúnculo pontino, el núcleo basal de Meynert o los núcleos del Rafe) también se ven afectadas en la EP. La alteración del locus coeruleus produce un déficit de la vía noradrenérgica. La degeneración de las neuronas colinérgicas del núcleo pedúnculo pontino y del núcleo basal de Meynert produce un déficit en la transmisión colinérgica. La degeneración de las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del Rafe conduce a un déficit serotoninérgico (Halliday et al., 1990).

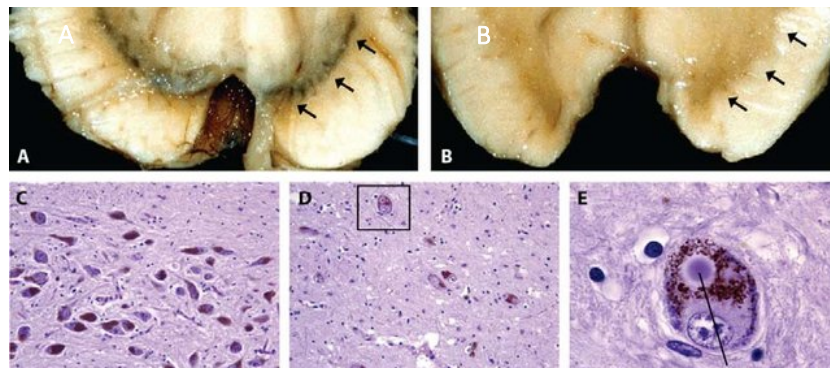


Figura 1. Degeneración de la sustancia negra en la enfermedad de Parkinson. El examen patológico de un sujeto sano muestra las neuronas dopaminérgicas pigmentadas típicas de la sustancia negra (SN) (**A**) y las neuronas dopaminérgicas inmunorreactivas para la enzima tirosina-hidroxilasa (TH) sintetizadora de dopamina (**C**). Por el contrario, la pérdida neuronal conduce a la despigmentación de la SN del paciente con enfermedad de Parkinson (**B**) y a la pérdida de neuronas dopaminérgicas inmunorreactivas para TH (**D**). Las fibrillas compuestas por polímeros insolubles de α -sinucleína se depositan en el cuerpo neuronal, formando inclusiones citoplasmáticas eosinofílicas y redondas, denominadas cuerpos de Lewy (**E**) (Figura adaptada de Mandel et al., 2010).

Otra característica distintiva de la EP es el depósito neuronal de la proteína α -sinucleína (SNCA), que en su estado mal plegado se vuelve insoluble y se agrega para formar inclusiones intracelulares conocidas como cuerpos de Lewy (CL) y neuritas de Lewy (NL), según aparezcan en el soma o en las prolongaciones de las neuronas, respectivamente. La patología de Lewy no se limita al cerebro, sino que también se puede encontrar en la médula espinal y en el sistema nervioso periférico, incluyendo el nervio vago, los ganglios simpáticos, el plexo cardiaco, el sistema nervioso entérico, las glándulas salivares, la médula suprarrenal, los nervios cutáneos y el nervio ciático (Kalia & Lang, 2015). Aunque la presencia de CL ayuda a confirmar el diagnóstico de EP, su ausencia no descarta la enfermedad. Ejemplo de ello son los casos de EP ligados a mutaciones en el gen *PRKN* o muchos casos de EP juvenil, los cuales no presentan estas inclusiones (Mata et al., 2004; Paviour et al., 2004).

3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Clásicamente, la EP ha sido considerada un trastorno motor (Postuma et al., 2015). Las características motoras en los pacientes con EP son heterogéneas, por lo que numerosos estudios han intentado establecer una clasificación de la EP en subtipos motores. Hasta el momento no se ha alcanzado un consenso, pero la propuesta más extendida consiste en clasificar la EP en los siguientes patrones clínicos: 1) predominio de temblor (formas tremóricas), 2) predominio rígido-acinético y 3) fenotipo mixto. El curso y el pronóstico de la enfermedad difieren entre estos subtipos, de forma que los pacientes con formas tremóricas a menudo se asocian con una tasa de progresión más lenta y una menor discapacidad funcional que las formas rígido-acinéticas (Kalia & Lang, 2015).

Pero la EP no sólo presenta aspectos motores, sino también numerosos síntomas no motores que incluyen anomalías sensoriales, cambios de comportamiento, trastorno del sueño REM (del inglés, *Rapid Eye Movements*), y disfunción autonómica (gastrointestinal y urinaria), así como algunos síntomas más difíciles de categorizar como cansancio. Estos síntomas no motores se presentan con frecuencia mucho antes del inicio de los síntomas motores clásicos y se asocian con una reducción en la calidad de vida de los pacientes (**Figura 2**). Recientemente, la *Internacional Parkinson and Movement Disorder Society* (MDS) ha propuesto una división de la EP temprana en tres etapas: EP preclínica (el proceso neurodegenerativo ha comenzado pero todavía no existen signos o síntomas de la

enfermedad), EP prodrómica (el proceso neurodegenerativo ha comenzado y existen signos y/o síntomas de la enfermedad, pero no cumplen criterios de EP clínica), y EP clínica (aparecen signos y/o síntomas motores definitorios) (Berg et al., 2015).

La fase prodrómica se caracteriza por la presencia de numerosos síntomas no motores, entre ellos anosmia, estreñimiento, depresión, somnolencia diurna excesiva y trastorno del sueño REM. Esta etapa puede prolongarse de 12 a 14 años antes de la aparición de los síntomas motores, por lo que supone una potencial ventana temporal durante la cual, una vez que estén disponibles las terapias modificadoras de la enfermedad, podrían administrarse para prevenir o retrasar el desarrollo y la progresión de la EP (Mahlknecht et al., 2015).

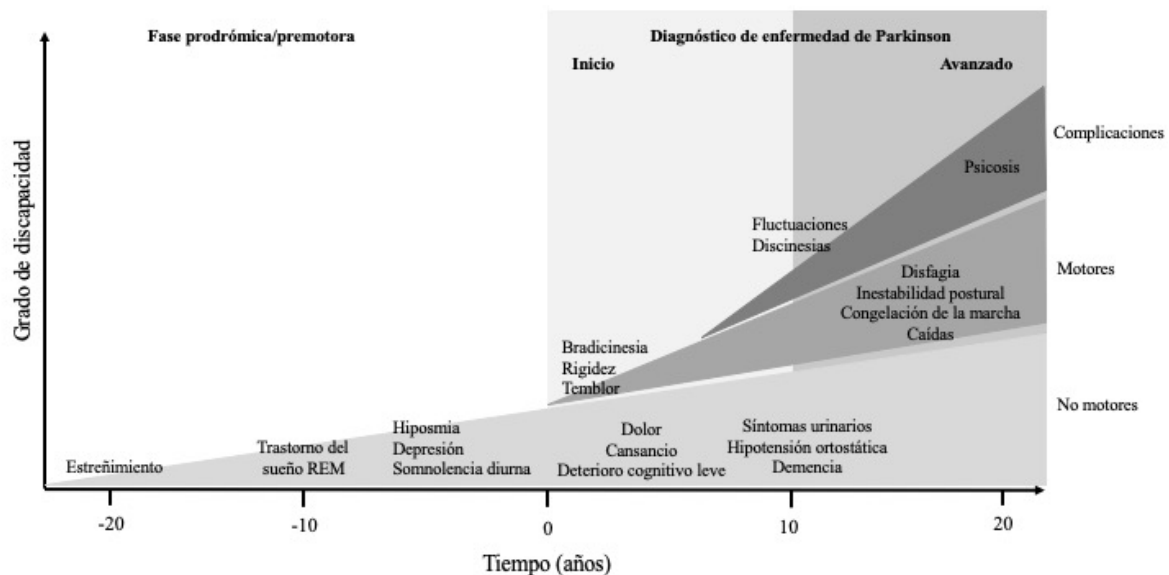


Figura 2. Síntomas clínicos y evolución temporal de la enfermedad de Parkinson. El diagnóstico de la enfermedad de Parkinson (EP) se produce con la aparición de los síntomas motores (año 0). Sin embargo, éste puede estar precedido por una fase premotora o prodrómica de más de 20 años. Esta fase prodrómica se caracteriza por una serie de síntomas no motores inespecíficos. Tras el diagnóstico, y con la progresión de la enfermedad, aparecen otros síntomas no motores que causan una discapacidad clínicamente significativa. Los síntomas motores axiales, como la inestabilidad postural, las caídas frecuentes y la congelación de la marcha tienden a ocurrir en la EP avanzada. Las complicaciones derivadas de la terapia dopaminérgica, incluidas las fluctuaciones motoras, las discinesias y la psicosis también contribuyen a la enfermedad (Figura adaptada de Kalia & Lang, 2015).

En las fases avanzadas de la EP, los síntomas motores y no motores son prominentes e incluyen no sólo síntomas axiales como la inestabilidad postural y la congelación de la marcha, sino también caídas, disfagia y trastornos del habla (**Figura 2**). Después de aproximadamente 17 años de evolución, hasta el 80% de los pacientes con EP presentan congelación de la marcha y caídas, y hasta el 50% de los pacientes reportan asfixia. Los síntomas autonómicos (como la incontinencia urinaria, el estreñimiento y la hipotensión ortostática) son características no motoras comunes en las últimas etapas de la EP. Además, la demencia es particularmente prevalente, presentándose en el 83% de los pacientes con EP con una duración de la enfermedad aproximada de 20 años (Kalia & Lang, 2015).

3.1. DETERIORO COGNITIVO EN LA EP

El deterioro cognitivo se presenta como el síntoma no motor más frecuente en la EP con escasa o nula respuesta al tratamiento dopaminérgico. No sólo puede afectar a la actividad diaria de los pacientes con EP sino también al bienestar de sus familiares (Bailey & Goldman, 2017). El deterioro cognitivo, y específicamente la demencia, ha sido clásicamente considerado una complicación tardía de la EP. No obstante, existen pruebas contundentes que demuestran que el deterioro de la función cognitiva puede ocurrir en las primeras etapas de la enfermedad.

El deterioro cognitivo leve se define como la fase inicial del proceso de deterioro cognitivo en la EP, que puede incluir disfunción ejecutiva y del lenguaje, déficits de memoria, de atención y visuoespaciales. Los criterios diagnósticos para el deterioro cognitivo leve se basan en la presencia de déficits cognitivos leves que no interfieren necesariamente con la independencia funcional y social del paciente (Litvan et al., 2012).

En cambio, la EP con demencia incluye el deterioro de más de un dominio cognitivo, afectando significativamente a las actividades de la vida diaria de los pacientes (Emre et al., 2007). Así, las principales características clínicas de la EP con demencia son: alteración de la función ejecutiva y la velocidad de procesamiento, déficits en la memoria de trabajo y la memoria episódica, déficits de atención y deterioro de la función visuoespacial. De acuerdo con los criterios de la MDS, el diagnóstico de la EP con demencia se basa en la afectación de al menos dos de los cuatro dominios cognitivos centrales (atención, memoria, función ejecutiva y visuoespacial) (Emre et al., 2007). Algunos factores como el trastorno del sueño

REM, los trastornos de ánimo y la psicosis pueden ser comorbilidades frecuentes en la EP con demencia.

La gravedad y el patrón de los dominios afectados pueden variar entre los pacientes de EP con demencia. Esta variabilidad puede deberse a la coexistencia de neuropatologías comórbidas (como la EA) y a variaciones genéticas, cuya presencia puede contribuir a la complejidad del diagnóstico y pronóstico de la EP con demencia. A pesar de que el deterioro cognitivo leve se asocia con un mayor riesgo de desarrollar EP con demencia, no todos los pacientes exhiben el mismo perfil cognitivo o la misma tasa de progresión. En base a ello, se han propuesto dos fenotipos: el fenotipo fronto-estriatal y el fenotipo cortical posterior. En el fenotipo fronto-estriatal predomina la disfunción ejecutiva y se relaciona con los déficits dopaminérgicos y con la presencia de variaciones como p.Val158Met en el gen *COMT*. Los pacientes con EP que presentan este fenotipo son menos propensos a progresar a demencia. Por el contrario, en el fenotipo cortical posterior predominan los déficits del lenguaje, de memoria y los déficits visuoespaciales, y los pacientes presentan un mayor riesgo de progresión a EP con demencia. Este fenotipo refleja una mayor participación de sistemas no dopaminérgicos, depósitos de CL o patología de EA, así como la presencia de otras variaciones genéticas, como el alelo $\epsilon 4$ de *APOE* o el genotipo H1/H1 del gen *MAPT* (Bailey & Goldman, 2017).

Por otro lado, la edad avanzada, la duración de la enfermedad, una peor función motora, la existencia de características neuropsiquiátricas comórbidas y un peor rendimiento cognitivo al inicio de la enfermedad son variables asociadas con una mayor prevalencia de EP con demencia. Los mecanismos que conducen a un peor pronóstico en términos de progresión cognitiva en la EP son parcialmente desconocidos, pero es indiscutible que la expresión variable de la enfermedad responde a mecanismos genéticos y ambientales. De hecho, las interacciones sociales contribuyen al estado cognitivo de los pacientes con EP. La obesidad, la hipertensión y otras comorbilidades como la diabetes también explican un posible empeoramiento de la función cognitiva (Martinez-Horta & Kulisevsky, 2019).

4. ABORDAJE TERAPÉUTICO

En la actualidad, el tratamiento de la EP es exclusivamente sintomático y se basa en el reemplazo de dopamina, bien aumentando su concentración intracerebral o bien estimulando sus receptores. Las estrategias de tratamiento dependen de la edad y la

sintomatología del paciente, la fase de la enfermedad y el balance riesgo/beneficio de cada uno de los fármacos disponibles. Debido a que ninguno de estos fármacos ha demostrado ser neuroprotector o modificador de la enfermedad, no es necesario iniciar el tratamiento en el momento del diagnóstico, sino cuando los síntomas causen discapacidad o malestar en el paciente (Kalia & Lang, 2015).

Los fármacos disponibles incluyen: levodopa (L-Dopa), agonistas dopaminérgicos, inhibidores de la monoaminoxidasa B (MAO-B) e inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT), anticolinérgicos y amantadina.

La L-Dopa, precursor endógeno de la dopamina, es el fármaco más eficaz para el tratamiento de los síntomas motores. Se administra asociado a un inhibidor de la descarboxilasa periférica como carbidopa o benserazida, que previene su metabolismo periférico y reduce notablemente la aparición de náuseas. Su principal efecto secundario es que, con el tiempo, un alto porcentaje de pacientes desarrollan complicaciones motoras tales como fluctuaciones motoras y/o discinesias inducidas por L-Dopa (DILs) (Jankovic & Tan, 2020).

Los agonistas dopaminérgicos y los MAO-B se pueden usar como tratamiento coadyuvante de la L-Dopa en pacientes en fases avanzadas de la enfermedad, para reducir las complicaciones motoras y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Los agonistas dopaminérgicos también se utilizan en monoterapia en pacientes *de novo* (es decir, “aquellos que no han recibido tratamiento dopaminérgico”) con la intención de retrasar el tratamiento con L-Dopa. Los efectos secundarios más comunes de éstos incluyen hipotensión ortostática, somnolencia y alucinaciones. Además, estos fármacos pueden desencadenar alteraciones comportamentales que incluyen juego patológico, compras y alimentación compulsiva, hipersexualidad y otros trastornos del control de impulsos (TCI). Por su parte, los COMT, que disminuyen la pérdida metabólica de L-Dopa, están indicados en combinación con la L-Dopa para pacientes con fluctuaciones motoras de fin de dosis.

Los anticolinérgicos son eficaces para aliviar los síntomas motores de la EP, en especial, para el tratamiento del temblor en reposo. Sin embargo, estos fármacos pueden empeorar la función cognitiva. Para evitarlo, se administran inhibidores de la colinesterasa, que son funcionalmente opuestos a los anticolinérgicos y permiten retrasar el deterioro cognitivo (Hong et al., 2019).

Por último, la amantadina, que potencia la liberación de dopamina de las vesículas de almacenamiento, también puede utilizarse en algunos pacientes con síntomas leves que son intolerantes a la L-Dopa o a los agonistas dopaminérgicos, y además se considera el fármaco principal para el tratamiento de las DILs. La formulación de amantadina de liberación prolongada mejora también las fluctuaciones motoras (Jankovic & Tan, 2020).

En pacientes no respondedores (es decir, “aquellos que no presentan una mejoría de los síntomas con el tratamiento”), existen alternativas, como la apomorfina subcutánea en bolo o en perfusión subcutánea continua, la L-Dopa/carbidopa de administración intestinal y la estimulación cerebral profunda del núcleo subtalámico o del globo pálido interno (Dong et al., 2016).

El desarrollo de fármacos modificadores de la enfermedad que ralenticen o detengan el proceso neurodegenerativo subyacente supone un desafío para la investigación de la EP, en parte debido a la falta de biomarcadores de progresión y a una comprensión incompleta de la patogénesis de la EP. Entre las posibles terapias con mayor potencial se encuentran el uso de anticuerpos monoclonales de SNCA y la inmunización activa frente a SNCA para minimizar su acumulación y propagación. Además, se están explorando otros enfoques como el uso de fármacos que actúan a nivel de *GBA* o *LRRK2* en poblaciones de EP genéticamente definidas (Jankovic & Tan, 2020).

5. ETIOLOGÍA

Numerosos estudios han investigado los factores de riesgo y protectores en la EP, siendo la edad el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la enfermedad. De hecho, la incidencia y la prevalencia de EP aumentan casi exponencialmente con la misma, alcanzando un pico por encima de los 80 años (Driver et al., 2009). Asimismo, el género representa un factor de riesgo establecido, siendo la proporción hombre/mujer 3:2 aproximadamente (Kalia & Lang, 2015).

El riesgo de desarrollar EP está determinado por una compleja interacción de factores de riesgo ambientales y genéticos (**Figura 3**) (Pang et al., 2019).

Entre los factores ambientales que aumentan el riesgo de desarrollar EP se encuentran la exposición a pesticidas y a metales pesados, la vida rural, el consumo de agua de pozo y la ocupación agrícola (Jankovic & Tan, 2020). Las partículas en suspensión generadas por el

tráfico también se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar EP, posiblemente debido a la exposición a metales o a la inducción de procesos inflamatorios.

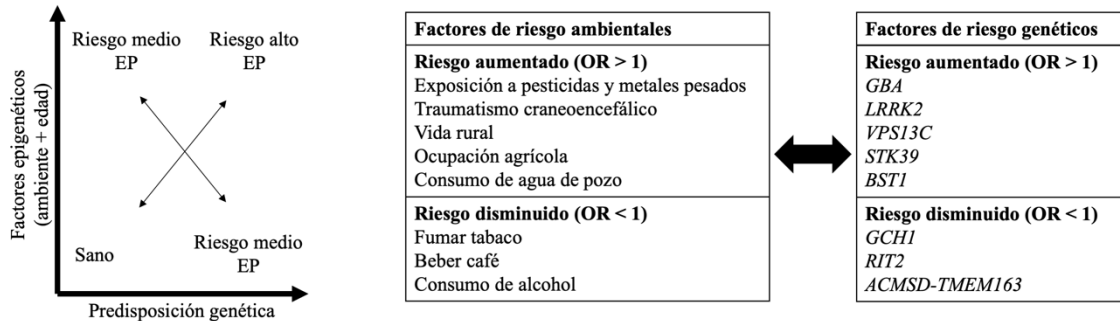


Figura 3. Factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. A la izquierda, un resumen gráfico del riesgo de enfermedad de Parkinson (EP) asociado a la predisposición genética y a factores epigenéticos como tóxicos ambientales y la edad. A la derecha, los resultados de los estudios epidemiológicos y genéticos han demostrado la existencia de factores ambientales y genéticos que incrementan ($OR > 1$) o disminuyen ($OR < 1$) el riesgo de desarrollar EP (Figura adaptada de Kalia & Lang, 2015 y Tran et al., 2020).

Además, algunos factores ambientales relacionados con el estilo de vida se han asociado de forma consistente con un menor riesgo de desarrollar EP, como son el tabaco, el consumo de café y té, dietas ricas en frutas, verduras y cereales, así como la actividad física (Jankovic & Tan, 2020). El efecto combinado de estos factores parece ser aditivo, lo que sugiere un nuevo enfoque para la prevención de la enfermedad. Se necesitan más estudios sobre el efecto sinérgico de múltiples compuestos o de la exposición a tóxicos ambientales con la predisposición genética para probar si existen dichas relaciones (Nandipati & Litvan, 2016).

Por otro lado, los traumatismos craneoencefálicos (de leves a moderados) que ocurren décadas antes del inicio de la EP se asocian también con un mayor riesgo de desarrollar EP (Jafari et al., 2013). El riesgo aumenta con la cantidad de lesiones en la cabeza y los factores de susceptibilidad genética, como el microsatélite Rep1 en la región promotora del gen *SNCA* (Goldman et al., 2015).

6. MECANISMOS PATOGÉNICOS

Los hallazgos epidemiológicos, genéticos y patológicos han supuesto en su conjunto un avance sustancial en la comprensión de la patogénesis de la EP. Se han descrito múltiples mecanismos que podrían estar implicados en la muerte neuronal, incluidos la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad y la disfunción proteosomal. Además, se ha postulado que los procesos neuroinflamatorios también podrían desempeñar un papel crucial en la patogénesis de la EP (Maiti et al., 2017).

6.1. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

La primera evidencia de la implicación de las mitocondrias en la patogénesis de la EP provino del consumo accidental de MPTP por parte de un grupo de adictos a la heroína. Éstos comenzaron a desarrollar síntomas parkinsonianos, como consecuencia de la inhibición del complejo I mitocondrial. Otros compuestos, como la rotenona y el piridaben, también actúan como inhibidores del complejo I, induciendo neurodegeneración en moscas, roedores y humanos. Estas toxinas provocan alteraciones en las mitocondrias, desencadenando defectos en la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, una reducción del movimiento de las mitocondrias, un aumento de la permeabilidad mitocondrial, así como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Se ha observado que las subunidades catalíticas del complejo I que se aíslan de las mitocondrias de la corteza frontal de los pacientes con EP se encuentran dañadas debido al ensamblaje incorrecto del complejo I (Raza et al., 2019).

La EP se asocia con la disrupción de la dinámica mitocondrial a múltiples niveles. Las mitocondrias se someten a dinámicas de fusión/fisión para mantener las mitocondrias sanas y reciclar la población defectuosa a través de la mitofagia. La vía PINK1/parkina está involucrada en el equilibrio entre fusión y fisión. Tras la despolarización de las mitocondrias o la acumulación de ROS, PINK1 no puede translocarse a la membrana mitocondrial interna por lo que permanece en la membrana externa, donde se acumula y autofosforila, conduciendo así a su activación. PINK1 activada fosforila a parkina, que a su vez se activa y ubiquitina varias proteínas de la membrana mitocondrial externa y desencadena la absorción de las mitocondrias dañadas en el autofagosoma (Grossmann et al., 2020; Larsen et al., 2018).

Otro aspecto de la dinámica mitocondrial crucial para evitar la propagación de mitocondrias dañadas o la propagación de ROS es el tráfico mitocondrial. Este transporte se encuentra altamente regulado, entregando mitocondrias a regiones activas de la célula, particularmente en neuronas metabólicamente activas. Miro1 o RHOT1, una Rho GTPasa anclada a la membrana mitocondrial externa, se encuentra implicada en la regulación de la movilidad mitocondrial a través del Ca^{2+} intracelular. De esta manera, las mitocondrias se mueven sólo cuando la concentración local de Ca^{2+} es baja, ya que cuando la concentración es alta, RHOT1 se une al Ca^{2+} y se produce el desacoplamiento de las mitocondrias de los microtúbulos. Se ha demostrado que la sobreexpresión de RHOT1 en un modelo de *Drosophila* produjo una agregación mitocondrial aberrante y la consecuente pérdida de neuronas dopaminérgicas. También, se ha visto que LRRK2 interacciona con RHOT1 para detener el transporte de mitocondrias defectuosas en neuronas derivadas de células madres pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés). Estas observaciones refuerzan el posible papel de *RHOT1* en la patología de la EP y lo convierten en un gen candidato para su estudio (Grossmann et al., 2020; Larsen et al., 2018).

6.2. ESTRÉS OXIDATIVO

El exceso de radicales libres puede causar daño a los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Está ampliamente demostrado que en la EP existe un exceso de radicales libres, responsable del deterioro de estas macromoléculas (Sanders & Greenamyren, 2013). Varios estudios han observado un acúmulo de radicales libres en cerebros *post mortem* de pacientes con EP (Parker et al., 2008; Schapira et al., 1990). También, se ha descrito una disminución de los niveles de antioxidantes en la SNpc, si bien no se conoce si esto es un defecto primario o una consecuencia del estrés oxidativo (Chang & Chen, 2020).

6.3. NEUROINFLAMACIÓN

La neuroinflamación es uno de los procesos más importantes implicados en la patogénesis de la EP. Se han detectado altas concentraciones de citoquinas inflamatorias en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en cerebros *post mortem* de pacientes con EP. También, se han descrito cambios en las células inmunitarias de la sangre, como los monocitos y las células T. Entre ellos, el cambio en el ratio de células T reguladoras y T efectoras o la aparición de células T reactivas frente a epítomos específicos de SNCA (Hirsch & Standaert, 2021).

Además, existen datos que indican que la exposición a patógenos y a tóxicos ambientales, así como la alteración en la microbiota intestinal, podrían promover la inflamación crónica en el sistema entérico, favoreciendo la agregación de SNCA y su diseminación al cerebro (Pajares et al., 2020).

7. GENÉTICA DE LA EP

Tradicionalmente, la EP fue considerada un trastorno idiopático en el que los factores ambientales y la edad eran los principales factores de riesgo. Sin embargo, desde el descubrimiento en 1997 de una variante en el gen *SNCA*, muchos otros genes se han relacionado con la EP familiar, con herencia autosómica dominante y recesiva (Billingsley et al., 2018). Sólo un 5-10% de los casos presentan formas monogénicas de la EP, mientras que la mayoría de los pacientes presentan formas no mendelianas donde los factores genéticos actúan sinérgicamente con los factores ambientales (Lunati et al., 2018).

La contribución de los factores genéticos al desarrollo de la EP se explica por la presencia de un amplio espectro de variaciones genéticas, que abarcan desde variantes comunes que confieren susceptibilidad a desarrollar EP, con un tamaño de efecto de moderado a débil, hasta formas raras altamente penetrantes, donde la presencia de la variante es suficiente para causar la enfermedad (**Figura 4**). Es por ello que el riesgo genético se divide, en términos generales, en dos categorías: variantes de alta penetrancia con baja frecuencia en la población, asociadas a la EP monogénica, y variantes comunes con un tamaño de efecto menor, asociadas aparentemente a la EP idiopática (Blauwendraat et al., 2020).

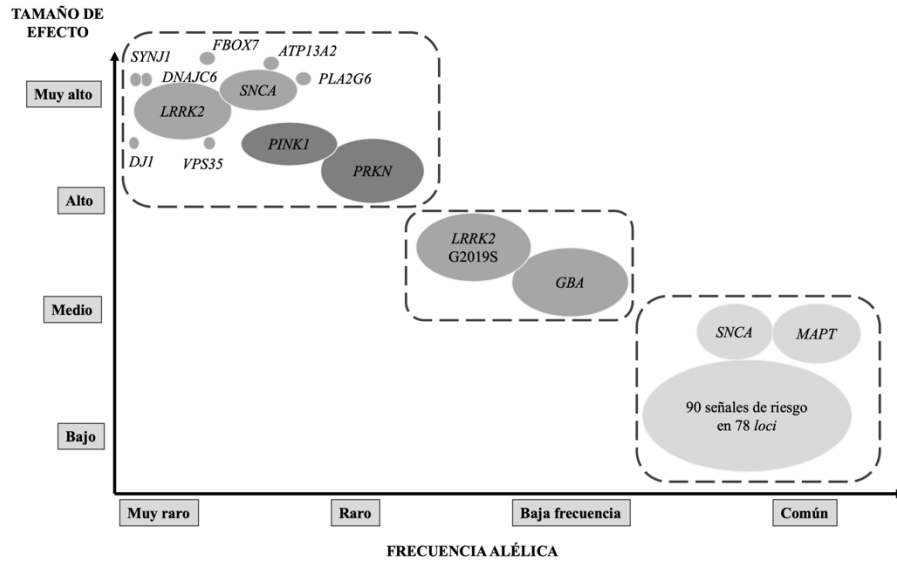


Figura 4. Bases genéticas de la enfermedad de Parkinson. Representación gráfica de variaciones genéticas con diferentes tamaños de efecto y frecuencias alélicas. El riesgo genético de enfermedad de Parkinson (EP) puede dividirse en tres grupos. Se identifica un grupo de variaciones muy raras con grandes tamaños de efecto, como son las duplicaciones o triplicaciones en el gen *SNCA*. Un ejemplo de variantes de baja frecuencia con efecto intermedio en la EP serían las variaciones en heterocigosis en *GBA* así como la variante p.Gly2019Ser en *LRRK2*. El grupo de variantes comunes de bajo riesgo incluye 90 señales independientes identificadas en un meta-análisis de GWAS de Nalls y colaboradores (Figura adaptada de Schneider et al., 2020).

Hasta la fecha, se han descrito variaciones patogénicas asociadas a la EP monogénica en más de 20 genes, la mayoría de las cuales son altamente penetrantes y a menudo causan síntomas atípicos o EP de inicio temprano (**Tabla 1**) (Blauwendraat et al., 2020). Sin embargo, la implicación de estos genes en la EP es aún objeto de debate debido a que no se disponen de estudios de replicación y/o validación funcional hasta la fecha.

Gen	Año	Mecanismo patogénico	Herencia	Frecuencia	Candidato GWAS	Familias independientes ^a	Evidencia funcional ^b	Resultados negativos ^c
<i>SNCA</i>	1997	Ganancia de función / sobreexpresión	Dominante	Muy raro	Sí	++	++	+
<i>PRKN</i>	1998	Pérdida de función	Recesivo	Raro	No	++	++	+
<i>UCHL1</i>	1998	Probable pérdida de función	Dominante	Indeterminado	No	-	+	--
<i>LRRK2</i>	2002	Ganancia de función	Dominante	Común	Sí	++	++	+
<i>PARK7</i>	2003	Pérdida de función	Recesivo	Muy raro	No	++	++	+
<i>PINK1</i>	2004	Pérdida de función	Recesivo	Raro	No	++	++	+
<i>POLG</i>	2004	Probable pérdida de función	Dominante	Raro	No	++	+	+
<i>HTRA2</i>	2005	Indeterminado	Dominante	Indeterminado	No	-	+	--
<i>ATP13A2</i>	2006	Pérdida de función	Recesivo	Muy raro	No	++	++	+
<i>FBXO7</i>	2008	Pérdida de función	Recesivo	Muy raro	No	++	++	+
<i>GIGYF2</i>	2008	Indeterminado	Dominante	Indeterminado	No	+	+	--
<i>GBA</i>	2009	Probable pérdida de función	Dominante	Común	Sí	++	++	+
<i>PLA2G6</i>	2009	Pérdida de función	Recesivo	Raro	No	++	++	+
<i>EIF4G1</i>	2011	Indeterminado	Dominante	Indeterminado	No	-	+	--
<i>VPS35</i>	2011	Pérdida de función	Dominante	Muy raro	No	++	+	+
<i>DNAJC6</i>	2012	Pérdida de función	Recesivo	Muy raro	No	++	+	+
<i>SYNJ1</i>	2013	Pérdida de función	Recesivo	Muy raro	No	++	+	+
<i>DNAJC13</i>	2014	Indeterminado	Dominante	Indeterminado	No	+	+	-
<i>TMEM230</i>	2016	Probable pérdida de función	Dominante	Indeterminado	No	-	+	-
<i>VPS13C</i>	2016	Pérdida de función	Recesivo	Raro	Sí	++	+	+
<i>LRP10</i>	2018	Pérdida de función	Dominante	Indeterminado	No	-	+	--

Tabla 1. Genes con variaciones reportadas como causativas en la enfermedad de Parkinson. ^a

En esta columna, “++” denota ≥ 4 familias reportadas, “+” denota > 2 y < 4 familias reportadas, mientras que “-” denota 1 familia reportada. ^b En esta columna, “++” denota ≥ 4 estudios donde el gen se relaciona con la enfermedad de Parkinson (EP), “+” denota ≥ 1 y < 4 estudios donde el gen se relaciona con la EP y “-” denota ningún estudio donde el gen se relacione con la EP. ^c En esta columna, “+” denota la ausencia de estudios negativos, “-” denota ≥ 1 y < 4 estudios negativos, “--” denota ≥ 4 estudios negativos (Tabla adaptada de Blauwendraat et al., 2020).

Por otra parte, la idea de que la EP idiopática surge espontáneamente o sin una causa u origen concreto es inexacta. Una gran proporción de los casos con EP idiopática son debidos a la presencia de numerosos factores de riesgo genéticos, los cuales pueden detectarse mediante estudios de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés). En 2009, se publicaron los primeros GWAS en los que se identificaron dos señales

en los *loci* *SNCA* y *MAPT* como los principales factores de riesgo de la EP (Satake et al., 2009; Simón-Sánchez et al., 2009). Desde entonces, se han realizado numerosos estudios GWAS con un número creciente de participantes procedentes de distintas poblaciones (Belin & Ran, 2014). Un meta-análisis de GWAS, que incluyó alrededor de 37.700 pacientes con EP, 18.600 casos “proxy” (es decir, “sujetos que no habían desarrollado la enfermedad pero tenían un familiar de primer grado con EP”), y 1,4 millones de controles sanos, logró identificar 90 señales de riesgo independientes asociadas a la EP idiopática (Nalls et al., 2019).

A pesar del éxito de los estudios GWAS en ampliar nuestra comprensión sobre las bases genéticas de la EP, los *loci* identificados no explican toda la variabilidad genética subyacente a la enfermedad. Dado que los *loci* identificados mediante estudios GWAS confieren un riesgo relativamente pequeño para la EP, se ha propuesto el uso de una puntuación de riesgo poligénico (PRS, por sus siglas en inglés) que permite sumar el riesgo genético global para un individuo. Se ha demostrado que, en conjunto, los 90 *loci* de susceptibilidad confieren un riesgo significativo para la EP de forma que los sujetos que se encuentran en el decil superior de riesgo genético tienen 6 veces más probabilidad de desarrollar EP que los que se encuentran en el decil inferior (Bandres-Ciga et al., 2020; Nalls et al., 2019). No obstante, como los estudios GWAS sólo permiten evaluar de manera sólida los polimorfismos comunes, el descubrimiento de nuevas variantes raras asociadas a la EP requiere de otras aproximaciones basadas en la secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés), como son la secuenciación del exoma completo (WES, por sus siglas en inglés) y del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) (Olgiati, Quadri, & Bonifati, 2016).

En los últimos años, varias iniciativas como “Parkinson’s Progression Markers Initiative” (PPMI, por sus siglas en inglés) (<https://www.ppmi-info.org/>), “Parkinson’s Disease Biomarkers Program” (PDBP, por sus siglas en inglés) (<https://pdbp-demo.cit.nih.gov/>), “Predict PD (<https://www.parkinsons.org.uk/research/predict-pd>)”, “International Parkinson Disease Genomic Consortium” (IPDGC, por sus siglas en inglés) (<https://pdgenetics.org/resources>) y “Accelerating Medicines Partnership for Parkinson’s disease” (AMP-PD, por sus siglas en inglés) (<https://www.nih.gov/research-training/accelerating-medicines-partnership-amp>) han

surgido como recursos valiosos para la investigación de la EP, ya que todos ellos conforman un biorepositorio a disposición de la comunidad investigadora para promover el descubrimiento y la validación de biomarcadores en la EP.

7.1. FORMAS AUTOSÓMICAS DOMINANTES DE LA EP

7.1.1. SNCA

El primer gen que se encontró asociado a la EP fue *SNCA*. Las mutaciones sin sentido o las variaciones en el número de copias se asocian a la EP con herencia autosómica dominante. Se ha demostrado que existe un efecto de dosis génica, de forma que los pacientes con duplicaciones en *SNCA* desarrollan EP aproximadamente una década más tarde que los portadores de triplicaciones. Los pacientes con EP asociada a mutaciones en *SNCA* suelen presentar una edad de inicio temprana y una rápida progresión de la enfermedad (Klein & Westenberger, 2012). Aunque se desconoce su función exacta, numerosas evidencias sugieren que *SNCA* puede intervenir en la regulación de la transmisión sináptica, la regulación del calcio, la homeostasis mitocondrial, la expresión génica y la fosforilación de proteínas (Minakaki et al., 2020).

7.1.2. LRRK2

Desde su descubrimiento en 2002, *LRRK2* se ha convertido en una de las dianas más estudiadas en la EP ya que las mutaciones en este gen representan una de las principales causas genéticas de la enfermedad. El gen *LRRK2* codifica para la proteína dardarina, que está involucrada en numerosos procesos biológicos, como son el crecimiento de neuritas y la morfogénesis sináptica, el tráfico transmembrana, la autofagia y la síntesis de proteínas. Se han identificado más de 100 variaciones sin sentido y con cambio de sentido, de las cuales sólo 9 se consideran patogénicas: p.Asn1437His, p.Arg1441Gly/Cys/His, p.Arg1628Pro, p.Tyr1699Cys, p.Gly2019Ser, p.Ile2020Thr y p.Gly2385Arg (Lunati et al., 2018). De ellas, la variación p.Gly2019Ser es la más prevalente, ya que está presente en el 85% de los pacientes con EP portadores de mutaciones en *LRRK2*. Se ha demostrado que la presencia de esta variante aumenta la actividad quinasa hasta 7 veces en comparación con la proteína salvaje (Iwaki et al., 2019). Su frecuencia varía según la población de estudio, representando aproximadamente el 1-5% de los casos de EP en Europa y más de un tercio de los norteafricanos. Además, constituye el 1% de los casos de EP idiopático en todo el mundo (Tolosa et al., 2020). Su penetrancia es incompleta, lo que sugiere que muchos

portadores nunca desarrollarán la enfermedad. De hecho, el riesgo de desarrollar EP para los portadores de la variación p.Gly2019Ser aumenta con la edad, de forma que el 25-42,5% de los mismos desarrollarán la enfermedad alrededor de los 80 años. Clínicamente, los pacientes con mutaciones en este gen manifiestan EP con inicio asimétrico y buena respuesta a L-Dopa. No se han descrito diferencias fenotípicas significativas entre los pacientes portadores de mutaciones en *LRRK2* y los pacientes con EP idiopática. El descubrimiento de que las variaciones patogénicas en *LRRK2* conducen a la hiperactivación del dominio quinasa de *LRRK2* han situado a este gen como candidato para el desarrollo de terapias modificadoras de la EP (Tolosa et al., 2020).

7.1.3. *VPS35*

Las mutaciones en el gen *VPS35* se asocian a formas de EP autosómica dominante de inicio tardío. La proteína codificada por este gen interviene en el transporte retrógrado de proteínas a través de la red del trans Golgi. El cambio p.Asp620Asn representa la única variante patogénica confirmada hasta la fecha. Se estima que su frecuencia en pacientes con EP familiar es de 0,1-1%. También, se han identificado otras mutaciones (p.Arg32Ser, p.Arg524Trp, p.Ile560Thr, p.His599Arg y p.Met607Val), sin embargo, la patogenicidad de éstas no ha sido aún confirmada (Hernandez et al., 2016; Williams et al., 2017).

7.2. FORMAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS DE LA EP

En la EP autosómica recesiva las mutaciones pueden aparecer en homocigosis o heterocigosis compuesta. Al contrario que las anteriores, las formas autosómicas recesivas se asocian con mayor frecuencia a EP de inicio temprano.

7.2.1. *PRKN*

Las mutaciones en el gen *PRKN*, que codifica para la proteína parkina, son la causa más frecuente de EP autosómica recesiva de inicio temprano. Éstas representan hasta el 50% de los casos familiares y un 15% de los casos idiopáticos en los pacientes menores de 40 años (Lücking et al., 2000). Hasta la fecha, se han descrito más de 130 variaciones en este gen, las cuales consisten en variaciones en el número de copias (deleciones o duplicaciones de exones), pequeñas deleciones o inserciones, así como polimorfismos de un único nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) (Castelo Rueda et al., 2021).

7.2.2. *PINK1*

El gen *PINK1* codifica para la proteína quinasa PTEN 1. Las mutaciones en este gen representan la segunda causa más común de EP autosómica recesiva de inicio temprano. La frecuencia de las variaciones en *PINK1* en pacientes con EP se sitúa en el 1-9%, con una variabilidad considerable entre los diferentes grupos étnicos. Se han detectado más de 40 mutaciones puntuales, la mayoría de ellas mutaciones con cambio de sentido o sin sentido y, en raras ocasiones, grandes deleciones. El fenotipo clínico es similar al de las variaciones en *PRKN*, aunque se ha descrito una mayor frecuencia de síntomas psiquiátricos asociados a las mutaciones en *PINK1* (Klein & Westenberger, 2012).

7.2.3. *DJI*

El gen *DJI*, que codifica para la proteína DJ-1, está presente en alrededor del 1-2% de los casos de EP de inicio precoz (Singleton et al., 2013). Sólo se han descrito un número reducido de pacientes con mutaciones puntuales y deleciones exónicas en homocigosis o heterocigosis compuesta (Klein & Westenberger, 2012).

7.2.4. *ATP13A2*

Las mutaciones en *ATP13A2*, que codifica para una ATPasa tipo P lisosomal, son responsables de una forma atípica de EP autosómica recesiva llamada síndrome de Kufor-Rakeb. Este síndrome tiene un inicio juvenil con progresión rápida de la enfermedad, acompañado de demencia, parálisis supranuclear y signos piramidales. Las mutaciones en *ATP13A2* son extremadamente raras. Se han identificado alrededor de 10 variaciones patogénicas, las cuales afectan directa o indirectamente a los dominios transmembrana de la proteína (Klein & Westenberger, 2012).

7.2.5. *DNAJC6*

Las mutaciones en el gen *DNAJC6*, que codifica para la proteína auxilina, han sido descritas como causativas de EP autosómico recesivo. Las características de la EP ligada a mutaciones en este gen son atípicas, con una edad de inicio temprana y desarrollo de psicosis. Dada su asociación a clatrina, se sugiere que la proteína auxilina se encuentra involucrada en el transporte de vesículas (Olgiati, Quadri, Fang, et al., 2016).

7.2.6. *PLA2G6*

La enzima codificada por el gen *PLA2G6* interviene en la homeostasis de la membrana celular, la función mitocondrial, la oxidación de ácidos grasos y la señalización del calcio.

Inicialmente, la disfunción de *PLA2G6* se asoció con distrofia neuroaxonal infantil, neurodegeneración con acumulación de hierro, así como con una forma de distonía-parkinsonismo. Sin embargo, más tarde se describieron mutaciones en *PLA2G6* asociadas tanto a parkinsonismo autosómico recesivo atípico como a EP de inicio temprano. Los hallazgos neuropatológicos en los casos de parkinsonismo con mutaciones en *PLA2G6* incluyen la presencia de CL en la sustancia negra y el locus coeruleus (Shen et al., 2019).

7.2.7. *FBXO7*

Las mutaciones en el gen *FBXO7* se identificaron por primera vez en un análisis de ligamiento del genoma (GWLA, por sus siglas en inglés) en familias afectadas por parkinsonismo juvenil (Shojaee et al., 2008). Poco después, se publicó un segundo estudio que confirmó la asociación de *FBOX7* con el desarrollo de parkinsonismo atípico (Fonzo et al., 2009). Las mutaciones en este gen son responsables de un trastorno conocido como síndrome parkinsoniano-piramidal. Hasta ahora, se han descrito las mutaciones p.Leu34Arg, p.Arg378Gly y p.Arg498X, así como variaciones en heterocigosis compuesta (Joseph et al., 2018).

7.2.8. *SYNJI*

El gen *SYNJI* codifica para una fosfoinositido fosfatasa implicada en la endocitosis y el reciclaje de vesículas sinápticas. El cambio p.Arg258Gln en *SYNJI* fue identificado en dos estudios publicados al mismo tiempo en dos familias, una de Sicilia y otra de Irán, con dos hermanos afectos de padres con consanguinidad (Krebs et al., 2013; Quadri et al., 2013). Las mutaciones bialélicas en *SYNJI* están asociadas con dos fenotipos: EP de inicio temprano y un trastorno neurodegenerativo severo con convulsiones intratables y tautopatías. De esta forma, los pacientes con mutaciones en *SYNJI* muestran fenotipos muy variables (Lesage et al., 2021).

7.3. FACTORES DE RIESGO GENÉTICOS DE LA EP

7.3.1. *GBA*

El gen *GBA* codifica para la glucocerebrosidasa (GCasa) y representa el principal factor de riesgo conocido para el desarrollo de EP (alrededor del 5-25% de los pacientes con EP idiopático presentan variaciones en *GBA*). Inicialmente, este gen fue descrito como causativo de la enfermedad de Gaucher con herencia autosómica recesiva. Las mutaciones en heterocigosis en *GBA* confieren un mayor riesgo de desarrollar EP, con una razón de

probabilidades (OR, por sus siglas en inglés) de 5 a 7 en todas las poblaciones estudiadas. Las más comunes son dos mutaciones puntuales en los exones 9 y 10 del gen que producen los cambios p.Asn370Ser y p.Leu444Pro, respectivamente. La frecuencia y la prevalencia de las mutaciones en *GBA* varían ampliamente entre diferentes grupos étnicos. Además, la secuenciación del gen resulta compleja por la presencia de un pseudogén con alrededor del 96% de su secuencia idéntica y que contiene algunas de las mutaciones asociadas a la enfermedad, como por ejemplo p.Leu444Pro (O'Regan et al., 2017). El mecanismo subyacente por el que las mutaciones en *GBA* pueden predisponer a desarrollar EP es aún desconocido. Entre los mecanismos propuestos se describe una relación recíproca entre los niveles de GCasa y SNCA con multitud de interacciones directas e indirectas. De hecho, existen evidencias de que la presencia de mutaciones en *GBA* conduce a la acumulación de SNCA. También, se ha descrito que la GCasa plegada de forma anormal se acumula en el retículo endoplasmático, lo que resulta en niveles reducidos de GCasa en el lisosoma y desencadena la degradación de proteínas asociada al retículo endoplasmático (O'Regan et al., 2017). A pesar de que fenotípicamente los pacientes con mutaciones en *GBA* son muy similares a los pacientes con EP idiopática, numerosas evidencias sugieren que existen características motoras, no motoras y cognitivas únicas en los portadores de *GBA*. Los pacientes con variaciones patogénicas en *GBA* presentan una edad de inicio más temprana, así como una progresión de los síntomas motores más rápida que los pacientes no portadores de mutaciones en *GBA*. Respecto a los síntomas no motores, los portadores de variaciones en *GBA* presentan una mayor gravedad de los síntomas no motores que los pacientes con EP idiopática. Varios estudios han evaluado si existen diferencias en la función cognitiva entre los pacientes con y sin mutaciones en *GBA*, demostrando que el riesgo de deterioro cognitivo es 3 veces mayor para los pacientes con mutaciones en *GBA* (O'Regan et al., 2017). De hecho, ser portador de *GBA* es actualmente el principal predictor de deterioro cognitivo en la EP (Lunati et al., 2018). Los resultados de un estudio mostraron una reducción significativa del flujo sanguíneo en determinadas regiones del cerebro asociada a la EP con mutaciones en *GBA*, particularmente en las áreas parietales y, más concretamente, en el precúneo (Goker-Alpan et al., 2012). Este patrón de alternancia del flujo sanguíneo cerebral supone una posible explicación neurobiológica del deterioro cognitivo en la EP asociada a mutaciones en *GBA*.

7.4. GENES ASOCIADOS CON LA EP PENDIENTES DE CONFIRMACIÓN

La asociación de algunos genes (*DNAJC13*, *TMEM230*, *LRP10*, *GIGYF2*, *HTRA2*, *RIC3*, *EIF4G1*, *UCHL1* y *CHCHD2*) con el desarrollo de la EP continúa siendo controvertida, por lo que resultan necesarios estudios de replicación o validación funcional (Blauwendraat et al., 2020).

7.4.1. *DNAJC13*

En 2014, Vilariño-Guëll y colaboradores identificaron la mutación p.Asn855Ser en *DNAJC13* en una familia canadiense con EP autosómico dominante (Vilariño-Güell et al., 2014). Dos pacientes de esta familia fueron considerados fenocopias al no presentar la mutación. Esta misma mutación fue descrita también en 2 familias con EP así como en 3 casos con EP idiopático procedentes de Canadá (Foo et al., 2014; Gustavsson et al., 2015). Otra mutación, p.Arg2115Leu, fue descrita en 2 pacientes con EP y 1 control sano de una familia tunecina (Vilariño-Güell et al., 2014). Los pacientes portadores de mutaciones en *DNAJC13* presentan signos asimétricos al inicio de la enfermedad, bradicinesia, temblor, rigidez, buena respuesta a L-Dopa e inestabilidad postural (Gustavsson et al., 2015). Los hallazgos neuropatológicos han puesto de manifiesto la presencia de CL, NL y degeneración de neuronas dopaminérgicas en los pacientes portadores de la mutación p.Asn855Ser (Appel-Cresswell et al., 2014). Sin embargo, la secuenciación del gen en 1938 pacientes con EP y 838 pacientes con enfermedad por CL confirmada patológicamente no logró identificar ninguna variante en el gen (Lorenzo-Betancor et al., 2015). Por tanto, la implicación de *DNAJC13* en la EP sigue siendo controvertida.

7.4.2. *TMEM230*

En 2016, Deng y colaboradores identificaron *TMEM230* como un gen causativo de EP en la misma familia canadiense en la que previamente habían identificado variaciones causativas en *DNAJC13* (Deng et al., 2018). En el mismo estudio se describió una mutación en dos pacientes no relacionados con EP de inicio temprano y otra mutación en 7 casos con EP familiar. Sin embargo, estudios posteriores que incluyeron un gran número de casos no han logrado replicar esta asociación, cuestionando su implicación en la etiología de la EP (Procopio et al., 2019; Tejera-Parrado et al., 2018; Wang et al., 2021; Yan et al., 2017).

7.4.3. *LRP10*

Un estudio GWLA en una familia italiana compuesta por 13 pacientes con EP autosómica dominante y 1 sujeto con demencia por cuerpos de Lewy (DCL) condujo a la identificación de 9 variaciones en el gen *LRP10* asociadas a EP, EP con demencia y DCL (Quadri et al., 2018). El cribado adicional del gen *LRP10* en una cohorte internacional de 660 probandos mostró 8 nuevas variaciones raras en *LRP10* potencialmente patogénicas (Quadri et al., 2018). No obstante, la replicación de esta asociación en diferentes poblaciones es inconsistente, por lo que se necesitan más estudios para confirmar la implicación de *LRP10* en la patogénesis de la EP (Gagliardi et al., 2021; Vergouw et al., 2019).

7.4.4. *GIGYF2*

En 2008, Lautier y colaboradores describieron 7 mutaciones sin sentido y 3 inserciones/deleciones en el gen *GIGYF2* en 16 pacientes con EP, no relacionados entre sí, mediante la secuenciación del gen. Como no se identificaron estas mutaciones en controles sanos, los autores argumentaron que *GIGYF2* podía ser un gen causativo de EP. Sin embargo, al menos 10 estudios de replicación han cuestionado el papel de *GIGYF2* en la EP, ya que algunas de estas mutaciones han sido reportadas también en controles sanos (Bonetti et al., 2009; Bras et al., 2009; A. Di Fonzo et al., 2009; Meeus et al., 2011; Nichols et al., 2009; Samaranch et al., 2010; Vilariño-Güell et al., 2009; Zimprich et al., 2009).

7.4.5. *HTRA2*

Strauss y colaboradores identificaron, en 2005, las mutaciones p.Ala141Ser y p.Gly399Ser en el gen *HTRA2* en pacientes con EP de una cohorte alemana (Strauss et al., 2005). Posteriormente, se descubrió que la mutación p.Gly399Ser segregaba con la EP en una familia de ascendencia turca, lo que proporcionó más evidencias sobre el papel patogénico de *HTRA2* en la EP (Unal Gulsuner et al., 2014). Sin embargo, no existen estudios de validación a gran escala, por lo que la participación de este gen en la EP monogénica sigue siendo controvertida.

7.4.6. *RIC3*

Sudhaman y colaboradores describieron por primera vez la mutación p.Pro457Thr en *RIC3* en una familia india (Sudhaman et al., 2016). Esta mutación fue reportada en 9 individuos con parkinsonismo típico a lo largo de 3 generaciones. Algunos de estos portadores también presentaban depresión, síndrome de piernas inquietas y alucinaciones auditivas. Dado que

no se han descrito otras mutaciones en *RIC3* ni otras familias con la mutación p.Pro457Thr no es posible confirmar la implicación de *RIC3* en el riesgo de desarrollar EP (Brolin et al., 2021).

7.4.7. *EIF4G1*

En 2011, un análisis GWLA encontró que las mutaciones en el gen *EIF4G1* estaban relacionadas con la EP autosómica dominante de inicio tardío (Chartier-Harlin et al., 2011). No obstante, trabajos posteriores no avalan este hallazgo, cuestionando el papel de *EIF4G1* en la EP (Lesage et al., 2012).

7.4.8. *UCHL1*

El gen *UCHL1* codifica para una proteína involucrada en la degradación de monómeros de ubiquitina. Se ha descrito una única mutación sin sentido, p.Ile93Met, en una familia alemana con EP (Leroy et al., 1998). Aunque los estudios de replicación no han logrado identificar mutaciones causativas en este gen, varios trabajos han reportado que las variantes en *UCHL1* representan un factor de riesgo para la EP (Healy et al., 2004; Miyake et al., 2012; Ragland et al., 2009).

7.4.9. *CHCHD2*

En 2015, Funayama y colaboradores identificaron una mutación, p.Thr61Ile, en el gen *CHCHD2* que segregaba con la enfermedad en una familia japonesa (Funayama et al., 2015). La misma mutación fue descrita en otra familia con EP, así como en 2 hermanos con EP (Shi et al., 2015). Koschmidder y colaboradores identificaron un paciente con EP con la mutación p.Gln126X en *CHCHD2*, sugiriendo que se trataba de una mutación patogénica ya que ésta conducía al truncamiento de la proteína (Koschmidder et al., 2016). Estudios posteriores han encontrado otras variantes raras en *CHCHD2* en pacientes con EP, pero su patogenicidad sigue siendo aún incierta.

7.5. MÉTODOS PARA IDENTIFICAR LOS FACTORES GENÉTICOS

La identificación de los factores de riesgo genéticos asociados a la EP se ha llevado a cabo a través de diversos tipos de estudios, que incluyen desde los clásicos de ligamiento y de asociación de genes candidatos, hasta las nuevas técnicas genómicas, como los *microarrays*, los estudios GWAS y la NGS (Belin & Ran, 2014).

- Los estudios de ligamiento permitieron conocer por primera vez la existencia de un componente genético en la etiología de la EP. En la actualidad, este tipo de estudios

continúa siendo una línea productiva de investigación (Quadri et al., 2018). En los estudios de ligamiento se utilizan marcadores genéticos polimórficos que se encuentran en los diferentes cromosomas para identificar la localización cromosómica del gen asociado a la enfermedad, con la base de que los marcadores cercanos al gen cosegregan con la enfermedad en la familia (Daly & Day, 2001). Los estudios de ligamiento requieren de grandes familias con numerosos miembros afectados y no afectados, siendo una buena herramienta para el estudio de enfermedades con herencia mendeliana (Klein & Westenberger, 2012). La principal desventaja de este tipo de estudios es que pueden estar involucrados muchos genes que además interaccionen entre ellos o que las variaciones de forma individual sólo aumenten moderadamente el riesgo de desarrollar la enfermedad.

- Los estudios de asociación de genes candidatos se centran en un único gen y, con frecuencia, directamente en polimorfismos significativos. En estos estudios se genotipan las muestras de ADN de casos y controles en busca de polimorfismos situados en o cerca de un gen que, según los conocimientos previos, podrían influir en la patogénesis de la EP. Estos polimorfismos a menudo no tienen un efecto directo sobre la expresión del gen o la proteína para la que codifica, pero permiten identificar genes asociados a la patología de interés. Las principales técnicas de genotipado son los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), como los ensayos Taqman y la secuenciación Sanger.
- La tecnología de *microarrays* consiste en la hibridación de una muestra diana (generalmente de ADN, pero también de ARN, proteínas o tejidos) con un conjunto de sondas de oligonucleótidos que se unen a un soporte sólido denominado chip, seguido de una medición relativa de la cantidad de ADN de la sonda que ha quedado fijada en cada diana. Aunque la aplicación más conocida de los *microarrays* es la determinación de perfiles de transcripción, también se utilizan para la detección de SNPs y de variaciones en el número de copias del genoma (Aarnio et al., 2005).
- Los estudios GWAS comparan y asocian millones de variaciones genéticas entre una población de referencia y una población con un fenotipo de interés (Broekema

et al., 2020). Estos estudios han permitido la transición de los estudios de genes candidatos a poder examinar una gran cantidad de variaciones comunes en el genoma humano, simultáneamente, y sin una hipótesis previa.

- La NGS ha ampliado drásticamente nuestra capacidad para examinar las variaciones genéticas, ya que permite secuenciar millones de fragmentos mediante PCR a través de sistemas que generan y detectan señales fluorescentes o eléctricas a medida que se incorporan nuevas bases de nucleótidos en una hebra complementaria a los fragmentos originales. A nivel de genoma es posible realizar estudios dirigidos a un conjunto de genes mediante paneles personalizados, pero también estudios de secuenciación del exoma o del genoma completo (Gorcenco et al., 2020). A nivel de transcriptoma se puede llevar a cabo la secuenciación del ARN.
 - Secuenciación dirigida: analiza un panel de genes implicados en la patología de estudio. Se trata de la estrategia más adecuada en enfermedades que están muy bien definidas clínicamente, para las cuales se conocen la mayoría de los genes implicados y muestran una baja heterogeneidad genética.
 - WES: analiza todas las regiones codificantes para proteínas de los genes humanos conocidos. Es más apropiada para enfermedades que presentan una mayor heterogeneidad tanto fenotípica como genética.
 - WGS: analiza el 95-98% del ADN humano. Ésta representa la técnica con mayor necesidad de procesamiento de datos ya que genera mucha información sobre variaciones genéticas en regiones fuera de los exones, cuyo conocimiento en la actualidad es limitado.
 - Secuenciación del ARN (RNA-seq, por sus siglas en inglés): lleva a cabo la detección y el análisis cuantitativo de moléculas de ARN en una muestra biológica, lo cual permite identificar los patrones de expresión de distintos genes.

Con cada nueva generación de tecnología de secuenciación se produce un aumento exponencial de datos. A medida que los conjuntos de datos son más grandes el análisis computacional se vuelve el factor limitante en la investigación. Si bien las diferentes tecnologías de secuenciación pueden generar diferentes datos de partida, la etapa final

consiste en la asignación de bases, cuyas secuencias son almacenadas en ficheros tipo FASTQ. Partiendo de estos ficheros, se llevan a cabo tres etapas de procesamiento comunes a las diferentes tecnologías de secuenciación: (1) alineación, (2) llamada de variantes, (3) filtrado y anotación. El primer paso de alineación consiste en hacer coincidir cada una de las lecturas con las posiciones del genoma de referencia humano. La alineación de secuencias resultante se almacena en ficheros de tipo SAM (mapa de secuencia) o BAM (mapa binario). El segundo paso es la llamada de variantes, que consiste en comparar las secuencias alineadas con secuencias conocidas para determinar qué posiciones se desvían de las posiciones de referencia. El tercer paso incluye el filtrado y la anotación de las variantes, que consiste en consultar la información disponible en diferentes bases de datos sobre cada una de las variantes detectadas (Dolled-Filhart et al., 2013).

Los datos de genotipado obtenidos se someten a procedimientos de control de calidad como el filtrado por frecuencia del alelo menor (MAF, por sus siglas en inglés). Además, los modelos empleados en el análisis de los datos se ajustan por determinadas covariables, e incluso se estratifican según el origen étnico de la población. Luego, se pueden hacer pruebas de asociación de *locus* único o de múltiples *loci* para identificar variaciones genéticas asociadas con un fenotipo de interés. En última instancia, las asociaciones genotipo-fenotipo identificadas deben replicarse en un conjunto de datos independiente para validar su relación.

8. BIOMARCADORES EN LA EP

Los biomarcadores han sido definidos como una característica que se debe poder medir objetivamente y ser evaluada como un indicador de un proceso biológico normal, un estado patológico o de respuesta a un tratamiento farmacológico (Atkinson et al., 2001). En el sentido más amplio, un biomarcador puede ser, por tanto, una evaluación clínica cuantificable, un ensayo bioquímico, o un parámetro de imagen. Los biomarcadores pueden utilizarse para diagnosticar la enfermedad (marcadores de diagnóstico), predecir el riesgo o la progresión de la enfermedad (marcadores de pronóstico), describir la gravedad (marcadores de estadificación), o servir de apoyo en la elección del tratamiento (marcadores terapéuticos). En el caso de la EP, la investigación y el avance en el conocimiento de los biomarcadores podría ayudar a minimizar la aparición de las complicaciones con mayor impacto en la calidad de vida de los pacientes, como las DILs,

el TCI y el deterioro cognitivo. Estos biomarcadores pueden ser marcadores clínicos, genéticos y otros marcadores moleculares, así como pruebas de neuroimagen (Miller & O'Callaghan, 2015).

8.1. POTENCIAL PRONÓSTICO DE LOS MARCADORES CLÍNICOS

Las características motoras de la EP, en particular, la bradicinesia, la rigidez muscular y el temblor en reposo, pueden considerarse los marcadores de diagnóstico clínico más importantes de la EP. De ellos, la bradicinesia es el que mejor se correlaciona con la pérdida dopaminérgica nigroestriatal. Además, estas características motoras son también cruciales para monitorizar la respuesta a la terapia sintomática. Sin embargo, dado que los síntomas motores aparecen cuando la pérdida de neuronas dopaminérgicas es elevada, no pueden ser empleados como marcadores tempranos de la enfermedad (Schapira et al., 2013).

Hace dos décadas, los investigadores empezaron a considerar el uso de sistemas de monitoreo a través de tecnología portátil como relojes, pulseras y teléfonos inteligentes, con el fin de recopilar datos valiosos sobre variables cinemáticas en un entorno no clínico, lo que potencialmente mejorará el diagnóstico y la atención clínica futura (Cova & Priori, 2018).

Además de las características motoras, las manifestaciones no motoras han recibido especial atención ya que pueden contribuir a la detección de la EP premotora o prodrómica. Varios estudios han empleado una batería de pruebas no invasivas y de bajo costo que incluyen el análisis de la agudeza del olfato y el cuestionario de detección de trastorno del sueño REM, demostrando que éstas tienen una especificidad y sensibilidad limitadas (Delenclos et al., 2016).

8.2. POTENCIAL PRONÓSTICO DE LOS MARCADORES DE IMAGEN

Se han desarrollado diversas técnicas de neuroimagen que evalúan posibles cambios estructurales, ultraestructurales, bioquímicos o del patrón de perfusión para respaldar el diagnóstico clínico de la EP. En concreto, la tomografía por emisión de fotón único (SPECT, por sus siglas en inglés), la tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés), la imagen por resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés) y la

ecografía transcraneal (TCS, por sus siglas en inglés) permiten el seguimiento no invasivo de objetivos moleculares de relevancia para el proceso neurodegenerativo.

Las imágenes moleculares mediante PET y SPECT son una herramienta poderosa para detectar cambios cerebrales *in vivo* que, junto con los trazadores metabólicos radioactivos, permiten evaluar distintas vías de neurotransmisión, así como cambios inflamatorios y metabólicos a nivel cerebral, monitorizar la gravedad y la progresión de la EP. Si bien ambas técnicas permiten el estudio de procesos biológicos *in vivo* a nivel cerebral, el PET presenta una mayor sensibilidad y una mejor resolución temporal y espacial que el SPECT. Los estudios PET y SPECT destacan por su capacidad para detectar los cambios celulares que ocurren en estadios tempranos de la EP, a menudo, mucho antes de que puedan verse cambios estructurales y de que aparezcan los síntomas motores de la enfermedad. Por otro lado, el estudio de los depósitos amiloides con imágenes PET empleando el compuesto B de Pittsburgh permite diferenciar a los pacientes de EP con y sin demencia (Delenclos et al., 2016). Además, estudios recientes con imágenes PET han proporcionado pruebas sólidas de que las DILs están asociadas con niveles sinápticos de dopamina estriatal elevados y fluctuantes (Pagano et al., 2017). También destacar que se puede detectar una pérdida de inervación simpática cardíaca en la EP. De hecho, se ha descrito una disminución de la captación del marcador I-123-metayodobencilguanidina en el SPECT cardíaco de los pacientes con EP. Además, este marcador contribuye al diagnóstico diferencial de EP y otras formas de parkinsonismo como atrofia multisistémica (Spiegel, 2010).

Los estudios de neuroimagen estructural como MRI y TCS se realizan para monitorizar cambios estructurales en el cerebro que permiten, entre otras cosas, descartar causas secundarias (como hidrocefalia, tumores o lesiones vasculares) y servir de apoyo en el diagnóstico diferencial con otros parkinsonismos. De hecho, los estudios con imágenes MRI han revelado cambios considerables en la sustancia gris y blanca en pacientes de EP con deterioro cognitivo (Hall & Lewis, 2019).

8.3. POTENCIAL PRONÓSTICO DE LOS MARCADORES GENÉTICOS

Entre los genes con variaciones que conducen a formas familiares de EP se encuentran *SNCA*, *PRKN*, *PINK1*, *DJI* y *LRRK2*, que representan el 2-3% de todos los casos de EP. Además, un meta-análisis de GWAS ha identificado 90 señales de riesgo asociadas a la EP.

Aunque el porcentaje de casos familiares supone una pequeña proporción del total de casos con EP, el valor de los estudios genéticos es inestimable ya que permiten dilucidar los mecanismos que contribuyen al diagnóstico clínico y, lo que es más importante, a identificar poblaciones de riesgo. Los sujetos con EP familiar suponen una población única en la que estudiar la eficacia de los biomarcadores en la progresión de la enfermedad desde la fase asintomática hasta la fase terminal (Delenclos et al., 2016).

Además de los *loci* genéticos asociados con la aparición de la EP, existen una multitud de factores de riesgo genéticos que influyen en la aparición de complicaciones asociadas a la progresión de la enfermedad y que podrían explicar, en parte, la gran variabilidad clínica observada; así tendríamos:

- 1) DILs: entre los genes más relevantes asociados con su desarrollo destacan los receptores de dopamina *DRD2* y *DRD3* y del factor neurotrófico *BDNF* (Kusters et al., 2018). Los pacientes con EP con variaciones en estos genes pueden ser los candidatos idóneos para aquellos tratamientos que tienen como objetivo prevenir o retrasar el inicio de las DILs.
- 2) TCI: se han descrito marcadores genéticos que pueden jugar un papel en el desarrollo del TCI, en concreto, polimorfismos en los genes *DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *HTR2A* y *GRIN2B* (Zhang et al., 2021).
- 3) Deterioro cognitivo: varios genes han sido relacionados con su desarrollo, entre los que se encuentran *GBA*, *MAPT* y *APOE*. Además, considerando que la EP con demencia y la EA comparten modificadores genéticos comunes, un posible enfoque para la identificación de genes de susceptibilidad para el deterioro cognitivo en la EP podría ser el análisis de los factores de riesgo genéticos de la EA (Wang et al., 2016). De hecho, se han identificado *loci* de susceptibilidad para la EA a través de estudios GWAS (como son *APOE*, *CLU*, *CRI*, *PICALM* y *ABCA7*), los cuales se están investigando sobre el riesgo de desarrollar deterioro cognitivo en la EP (Chung et al., 2013).

8.4. POTENCIAL PRONÓSTICO DE OTROS MARCADORES MOLECULARES

La búsqueda de biomarcadores en fluidos y tejidos corporales supone una aproximación idónea para la determinación de moléculas poco invasivas específicas de la EP. Numerosas

investigaciones han evaluado diversas fuentes para la búsqueda de este tipo de biomarcadores, como son el LCR, la sangre, la saliva y la biopsia de tejidos (Ren et al., 2015).

El LCR supone una fuente accesible de proteínas derivadas del cerebro, se encuentra separado de la sangre periférica por la barrera hematoencefálica (BHE), suministra nutrientes a los tejidos cerebrales y filtra los desechos del líquido intersticial del cerebro. Las proteínas y péptidos que reflejan las actividades derivadas del cerebro pueden difundirse al LCR, por lo que éste puede ser un medio adecuado para estudiar muchas de las modificaciones bioquímicas que ocurren en la EP. Esto, junto con el hecho de que en la EP se producen alteraciones de la BHE, hacen que el LCR pueda ser empleado para la búsqueda de nuevos marcadores moleculares relacionados con la enfermedad (Jiménez-Jiménez et al., 2014).

Los biomarcadores basados en sangre resultan idóneos ya que se trata de un fluido fácilmente accesible y supone un método mínimamente invasivo. Sin embargo, uno de los desafíos que supone el desarrollo de este tipo de biomarcadores es que no existe una conexión directa entre el cerebro y la sangre periférica, particularmente en el contexto de una BHE intacta. Además, la sangre supone una mezcla heterogénea de células, proteínas, lípidos y diversos productos metabólicos. A pesar de ello, en los últimos años se han producido numerosos avances en la búsqueda de biomarcadores sanguíneos en la EP.

La saliva es un fluido biológico que juega un papel importante en la protección y mantenimiento de la mucosa oral y los dientes a través de sus propiedades antibacterianas y antivirales. La saliva puede ser utilizada como método de diagnóstico ya que es fácil de obtener a través de un procedimiento no invasivo, su procesamiento es simple y posee un menor contenido de proteínas que la sangre. Además, la composición de la misma está regulada por el sistema nervioso autónomo, lo que sugiere que existe una relación directa entre la saliva y el sistema nervioso (Pawlik & Błochowiak, 2021).

Estudios recientes sugieren que las biopsias de glándula submandibular, esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto y piel podrían ser útiles como biomarcadores para la EP. Si bien, el tracto gastrointestinal parece ser el tejido más prometedor para la toma de biopsia, ya que alberga millones de neuronas que constituyen el sistema nervioso entérico y es fácilmente accesible mediante endoscopia (Schneider et al., 2016).

Algunos de los marcadores bioquímicos que se han propuesto para la detección temprana de la EP son el ácido úrico, el BDNF, los neurofilamentos, la neuromelanina, la homocisteína y la SNCA (Chahine et al., 2014).

El ácido úrico es un antioxidante endógeno cuya concentración en el cerebro y el suero sanguíneo es elevada, y puede prevenir el estrés oxidativo dada su capacidad para eliminar ROS y especies reactivas de nitrógeno. Los resultados de un meta-análisis mostraron que los pacientes con EP presentan niveles de ácido úrico inferiores a los controles sanos, y que esta diferencia a su vez es más acentuada en hombres que en mujeres (L. Shen & Ji, 2013). En este sentido, los niveles de ácido úrico en suero podrían servir como un potencial biomarcador para la EP.

El BDNF ha sido ampliamente estudiado con fines terapéuticos en la EP. Se encuentra implicado en la regulación de la supervivencia neuronal, de forma que una disminución en la expresión de éste en la sustancia negra se asocia con la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Además, la disminución en los niveles de BDNF se asocia con el deterioro cognitivo en los pacientes con EP (Costa et al., 2015; Leverenz et al., 2011).

Los neurofilamentos son elementos estructurales que intervienen en el mantenimiento de la forma y el tamaño neuronal, además del calibre axonal, necesarios para mantener la integridad neuronal y la conducción de los impulsos nerviosos a lo largo del axón. El aumento de los niveles de una proteína llamada cadena ligera de neurofilamentos (NfL, por sus siglas en inglés) en LCR y sangre representa un indicador de degeneración neuronal. De hecho, la degeneración progresiva de la SNpc en el curso de la EP promueve la liberación de NfL, pudiendo servir como un biomarcador para predecir el grado de neurodegeneración (Wang et al., 2020).

La neuromelanina es un pigmento oscuro, granular, presente en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y en las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus del cerebro humano. La degeneración de neuronas pigmentadas libera neuromelanina junto con otros componentes celulares, generalmente tóxicos, desencadenando un proceso neuroinflamatorio que conduce a estrés oxidativo y a procesos neurodegenerativos. Por tanto, los niveles de neuromelanina proporciona información sobre la degeneración de la sustancia negra y podría servir como un posible biomarcador para la EP (Vila, 2019).

La homocisteína es un aminoácido resultante de la desmetilación de la metionina, cuyos niveles están influenciados por factores dietéticos, así como por factores genéticos en las enzimas encargadas de su metabolismo. Algunos estudios han mostrado que alrededor del 30% de los pacientes con EP presentan un aumento de los niveles de homocisteína plasmática, pudiendo ser un factor de riesgo importante para el desarrollo de la enfermedad (Lotankar et al., 2017). Además, se ha planteado una posible relación entre los niveles de homocisteína y el deterioro cognitivo y la depresión en la EP, mediante la inducción de cambios vasculares en el cerebro. La acción neurotóxica de la homocisteína se produce a través de diferentes mecanismos, como la disfunción mitocondrial, la acumulación de radicales libres y calcio citosólico, así como la activación de la vía apoptótica (Rozycka et al., 2014).

La agregación de SNCA es una de las principales características anatomopatológicas de la EP. Diversos estudios han detectado SNCA en LCR, saliva, suero, orina y en el tracto gastrointestinal de pacientes con EP. Sin embargo, los resultados del análisis de expresión diferencial de SNCA en LCR de pacientes con EP y controles sanos son contradictorios. Asimismo, no se ha podido establecer una correlación entre los niveles de SNCA y la gravedad de la enfermedad (Delenclos et al., 2016).

En las últimas décadas han surgido estrategias no dirigidas, como la aplicación de técnicas ómicas, para identificar moléculas que difieren entre pacientes con EP y controles sanos. Varios estudios metabolómicos han observado una disminución de los niveles de ácido úrico y un aumento del glutatión en pacientes con EP respecto a sujetos sanos. Estos hallazgos, pese a que requieren de estudios de validación, sugieren que la metabolómica es una técnica prometedora para la identificación de biomarcadores en la EP. Por otro lado, los experimentos de transcriptómica estudian la expresión simultánea de miles de genes de una muestra determinada, permitiendo la identificación de patrones de expresión específicos de una condición. Numerosos estudios han mostrado que el perfil de expresión de determinados microRNAs (miRNAs) se encuentra alterado en la EP. No obstante, estos resultados son inconsistentes debido a la existencia de numerosas limitaciones, como son el empleo de diferentes diseños y condiciones experimentales, diferentes fuentes de tejido y tamaños muestrales, así como el uso de cohortes con características clínicas específicas y

con diferentes estrategias terapéuticas (Delenclos et al., 2016). Todo esto ha dificultado la identificación o validación de miRNAs biológicamente relevantes.

Así pues, a pesar de que los resultados obtenidos a través de diferentes técnicas tiene un importante valor potencial, estos enfoques aún no han logrado dilucidar ningún biomarcador útil en la EP (Delenclos et al., 2016).

HIPÓTESIS

El diagnóstico de la EP es fundamentalmente clínico y se realiza en base a la anamnesis y la exploración neurológica del paciente. Los síntomas motores representan la base de dicho diagnóstico. Dado que no existen pruebas diagnósticas estandarizadas, la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico temprano y/o la progresión de la EP representa una necesidad urgente para el manejo óptimo de la enfermedad. Teniendo en cuenta que en la EP se ven alterados diferentes procesos biológicos, la hipótesis general fue que el estudio de factores de riesgo genéticos y otros marcadores moleculares implicados en la EP contribuiría a la comprensión de las bases moleculares de la patología, permitiendo la identificación de posibles nuevos biomarcadores de la enfermedad. Además, la combinación de biomarcadores podría contribuir al conocimiento y a su aplicación en medicina personalizada, modificando el modelo de la práctica clínica actual.

Las hipótesis específicas fueron las siguientes:

- Variaciones en genes involucrados en la homeostasis mitocondrial podrían estar asociadas a un mayor riesgo de desarrollar EP.
- Variaciones en genes implicados en el tráfico intracelular de APP podrían constituir un factor de riesgo genético para el desarrollo de EP.
- Variaciones en genes asociados con el riesgo de desarrollar EA podrían estar relacionadas con el riesgo de desarrollar deterioro cognitivo en la EP.
- Determinados factores circulantes, como la expresión de miRNAs o los niveles de homocisteína en sangre, podrían servir como potenciales biomarcadores para la EP.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue la identificación de factores de riesgo genéticos y otros marcadores moleculares que contribuyeran a la etiopatogenia de la EP, así como al desarrollo de deterioro cognitivo como una complicación asociada. Para alcanzar este objetivo, se emplearon diferentes cohortes, entre ellas, una cohorte nacional del sur de España (Sevilla) y varias cohortes internacionales (PPMI, IPDGC y AMP-PD).

Para alcanzar este objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

O1.- Identificar variaciones genéticas implicadas en la fisiopatología de la EP, así como en el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP. Para la consecución de este objetivo se plantearon los siguientes sub-objetivos (SO):

SO.1.1.- Estudiar la implicación de los genes *RHOT1* y *RHOT2*, que codifican para dos proteínas implicadas en el tráfico mitocondrial, en la fisiopatología y la edad de inicio de la EP utilizando datos de las cohortes IPDGC y AMP-PD.

SO.1.2.- Estudiar la implicación del gen *LRP10*, propuesto como responsable de ciertas formas de EP familiar, en la fisiopatología de la EP en una población del sur de España.

SO.1.3.- Evaluar la asociación del gen *PICALM*, un gen de riesgo de la EA, con el riesgo de desarrollar deterioro cognitivo en la EP y su validación en la cohorte PPMI.

O2.- Identificar posibles marcadores moleculares circulantes asociados con la EP y el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP. Para la consecución de este objetivo se plantearon los siguientes sub-objetivos (SO):

SO.2.1.- Analizar la expresión diferencial de miRNAs circulantes en sangre total como marcadores no invasivos en distintos subtipos de EP.

SO.2.2.- Determinar si los niveles de homocisteína en sangre, así como la presencia de determinados polimorfismos en genes implicados en su metabolismo, se asocian con el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para alcanzar los objetivos propuestos, se estableció el diseño experimental que se refleja en la **Figura 5**.

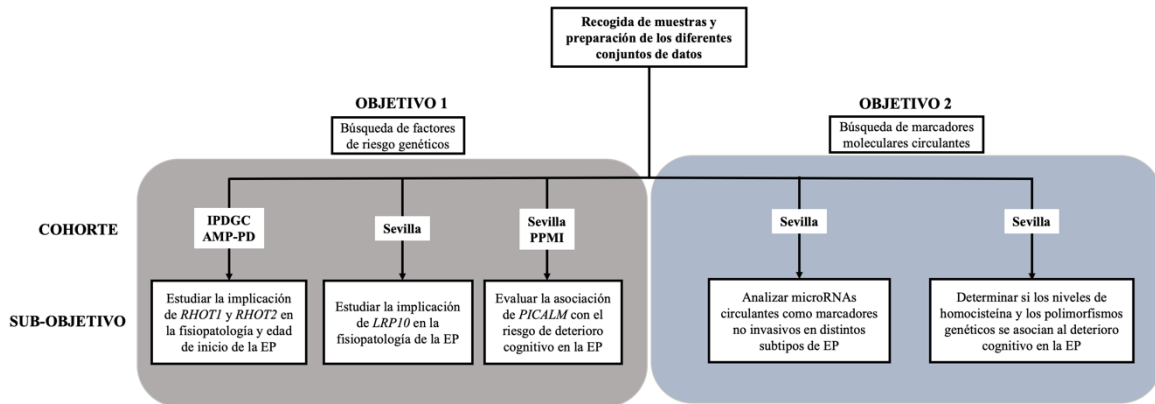


Figura 5. Esquema del diseño experimental seguido en la Tesis Doctoral para la consecución de los objetivos propuestos. El objetivo 1 consistió en identificar variaciones genéticas implicadas en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson (EP) y el desarrollo de deterioro cognitivo como una complicación asociada. Para ello, se estudiaron 4 genes como factores de riesgo genéticos de la EP utilizando una cohorte de pacientes con EP y controles sanos procedentes del sur de España (Sevilla), así como 3 cohortes internacionales: IPDGC, AMP-PD y PPMI. En el objetivo 2 se investigaron marcadores moleculares potencialmente asociados con el desarrollo de EP y/o el desarrollo comórbido de deterioro cognitivo. Para ello, se analizó la expresión diferencial de microRNAs en diferentes subtipos de EP, así como la asociación de los niveles de homocisteína y de variaciones en genes relacionados con su metabolismo con el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP, empleando en ambos estudios la cohorte de pacientes y controles sanos del sur de España.

Para la consecución del **objetivo 1**, se emplearon los datos GWAS de la cohorte IPDGC así como los datos WGS de la iniciativa AMP-PD para estudiar la implicación de las variaciones en *RHOT1* y *RHOT2* en la fisiopatología y la edad de inicio de la EP. Los datos GWAS incluyeron un total de 14671 casos de EP y 17667 controles sanos, mientras que los datos WGS incluyeron 1647 casos de EP y 1050 controles sanos, todos ellos de ascendencia europea. Se anotaron las variantes usando ANNOVAR y se empleó el test exacto de Fisher para analizar las diferencias en sus frecuencias alélicas con la herramienta PLINK v1.9. Se investigó la agregación de variaciones de baja frecuencia sobre el riesgo de

EP utilizando RVTESTS para las pruebas de carga. Por último, se evaluaron los estadísticos resumen de los últimos meta-análisis de EP y edad de inicio de la EP (Blauwendraat et al., 2019; Nalls et al., 2019).

Por otra parte, se estudió el gen *LRP10*, propuesto como causativo de EP autosómico dominante, en una cohorte de 679 pacientes con EP y 1217 controles sanos procedentes de la Unidad de Trastornos del Movimiento (UTM) del Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR) (Sevilla, España). Dado que la variante p.Tyr307Asn había sido la única replicada en varias cohortes de ascendencia europea, nuestro estudio se centró en el genotipado de esta variante mediante ensayos TaqMan en pacientes con EP y controles sanos.

Por último, se estudió la implicación de la variante rs3851179 en *PICALM* en el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP, así como su interacción genética con *APOE*. Para ello, se genotiparon las variantes rs429358 y rs7412 del gen *APOE* y la variante rs3851179 del gen *PICALM* en una cohorte de 712 pacientes con EP procedentes de la UTM del HUVR (Sevilla, España) mediante ensayos TaqMan. Se estudió la asociación de *PICALM*, y de la interacción genética *PICALM-APOE*, con el deterioro cognitivo en la EP mediante modelos de regresión logística utilizando PLINK v1.07. La asociación de *PICALM* con el deterioro cognitivo se evaluó mediante análisis de regresión de Cox utilizando la herramienta R v3.6.3. Para la validación de los resultados, se empleó la cohorte PPMI en la que se incluyeron un total de 231 pacientes con EP.

Para la consecución del **objetivo 2**, se estudió el perfil de expresión de miRNAs candidatos, previamente relacionados con EP en la literatura, en 18 pacientes con EP *de novo*, 34 pacientes con EP idiopática, 10 pacientes con EP portadores de la mutación p.Gly2019Ser en *LRRK2*, 13 pacientes con EP portadores de mutaciones en *GBA* y 43 controles sanos. Para ello, se emplearon muestras de sangre completa de la cohorte de pacientes con EP y controles sanos procedentes de la UTM del HUVR (Sevilla, España). El análisis cuantitativo de la expresión de miRNAs se llevó a cabo en tarjetas microfluídicas TaqMan customizadas en un equipo ViiA7 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Se

utilizó el software Thermo Fisher Cloud v1.0 para el análisis de expresión diferencial de los miRNAs candidatos. La visualización de los datos de expresión se realizó con un mapa de calor o *heat map* con el paquete “pheatmap” en R v3.6.3. Además, se llevó a cabo el análisis de correlación de Spearman para examinar la asociación de los miRNAs con las variables demográficas y/o clínicas. Se construyeron curvas ROC (del inglés, *Receiver Operating Characteristic*) y se obtuvo el área bajo la curva para evaluar la sensibilidad y especificidad de estos miRNAs. Por último, la determinación de las rutas biológicas asociadas a los miRNAs se realizó con la herramienta online mirPath v.3.

Por último, se estudió la relación entre la hiperhomocisteinemia y el deterioro cognitivo en la EP. Para ello, un total de 246 pacientes con EP procedentes de la UTM del HUVR (Sevilla, España) fueron incluidos en el análisis de casos-controles. Se utilizaron los niveles de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 determinados en el laboratorio de análisis del HUVR. Además, se realizó un meta-análisis de acuerdo con la declaración PRISMA (del inglés, *Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses*). Asimismo, se genotiparon, mediante ensayos TaqMan, polimorfismos en genes implicados en el metabolismo de la homocisteína en la cohorte de pacientes con EP procedente de la UTM del HUVR (Sevilla). Dichos polimorfismos fueron: rs1801133 y rs1801131 en el gen *MTHFR*, rs4680 en el gen *COMT*, rs1801394 en el gen *MTRR* y rs1801198 en el gen *TCN2*. Para analizar la asociación entre el deterioro cognitivo y los niveles de homocisteína en la EP se utilizó un modelo de regresión logística multivariante empleando la herramienta R v3.6.3. Por otro lado, la asociación entre los polimorfismos genéticos y los niveles de homocisteína se evaluó mediante modelos de regresión lineal multivariantes usando PLINK v1.07. Para determinar la relación entre los polimorfismos genéticos y el deterioro cognitivo se emplearon modelos de regresión logística multivariantes.

RESULTADOS

1. Identificación de variaciones genéticas implicadas en la fisiopatología de la EP, así como en el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP.

1.1. Estudio de la implicación de los genes *RHOT1* y *RHOT2* en la fisiopatología y la edad de inicio de la EP utilizando datos de las cohortes IPDGC y AMP-PD.

1.1.1. Resumen de resultados

En este trabajo se analizó si las variaciones en los genes *RHOT1* y *RHOT2* se asociaban con el riesgo y la edad de inicio de la EP, utilizando datos de genotipado a gran escala y secuenciación del genoma completo de las cohortes IPDGC y AMP-PD.

En los datos GWAS se identificaron un total de 62 variantes en el gen *RHOT1*, todas ellas intrónicas. Además, se detectaron 17 variantes en *RHOT2*, incluidas 4 variantes sin sentido. Tras explorar los estadísticos resumen derivados del último meta-análisis de GWAS de EP (Nalls et al., 2019) y de edad de inicio de EP (Blauwendraat et al., 2019) no se encontró una asociación significativa entre las variaciones en los genes *RHOT1* y *RHOT2* y el riesgo o la edad de inicio de EP. La evaluación del efecto agregado de las variantes de baja frecuencia no mostró una relación entre los genes *RHOT1* y *RHOT2* y el riesgo de EP.

Por su parte, en los datos WGS se identificaron un total de 973 variantes en *RHOT1*, de las cuales 10 eran variantes codificantes, incluidas 4 variantes sinónimas y 6 variantes no sinónimas. En el gen *RHOT2* se detectaron 118 variantes, de las cuales 48 era variantes codificantes, incluidas 25 variantes sinónimas y 23 variantes no sinónimas. No se demostró un enriquecimiento significativo para ninguna de las variantes en *RHOT1* ni en *RHOT2* en los pacientes con EP respecto a los controles sanos. De manera similar, los genes *RHOT1* y *RHOT2* no mostraron un efecto acumulativo consistente sobre el riesgo de EP.

Los resultados derivados de este trabajo no proporcionaron pruebas suficientes para confirmar que *RHOT1* y *RHOT2* contribuyan de forma significativa a la etiología de la EP en la población europea.

- 1.1.2.** *Publicación:* Periñán MT, Gómez-Garre P, Blauwendraat C, Mir P, Bandres-Ciga S. The role of RHOT1 and RHOT2 genetic variation on Parkinson disease risk and onset. *Neurobiol. Aging.* 2021; 97: 144.e1-144.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.07.003>.

1.2. Estudio de la implicación del gen *LRP10* en la fisiopatología de la EP en una población del sur de España.

1.2.1. Resumen de resultados

En este trabajo se investigó el papel de la variante c.919T>A (p.Tyr307Asn) en el gen *LRP10* en la cohorte de pacientes con EP y controles sanos del sur de España.

Se reportaron 3 portadores heterocigotos de la variante p.Tyr307Asn en *LRP10* en la cohorte de estudio: 1 paciente con EP y 2 controles sanos. La frecuencia de la variante fue de 0,001 en pacientes con EP y 0,001 en controles sanos. El paciente con EP fue diagnosticado a los 36 años y presentaba características no motoras como depresión, fluctuaciones motoras y distonía; sin embargo, tenía preservada la función cognitiva. Pese a que el paciente no presentaba historia familiar de EP, su padre fue diagnosticado de EA a los 80 años. Por su parte, los controles sanos portadores de la variante p.Tyr307Asn tenían 56 y 68 años, respectivamente. El primer sujeto control no tenía historia familiar de EP, sin embargo, su tío materno estaba diagnosticado de EA. El segundo control sano tampoco presentaba historia familiar de EP pero sí tenía una hermana que desarrolló EA a los 70 años de edad.

Los resultados mostraron que la variante p.Tyr307Asn en el gen *LRP10* tenía una baja penetrancia y un papel limitado en la EP. Sin embargo, el hecho de que los 3 portadores de la variante p.Tyr307Asn tuviesen un familiar, de primer o segundo grado, con EA planteó un posible papel para esta variante en el riesgo de desarrollar demencia.

1.2.2. Publicación: Perrián MT, Macías-García D, Buiza-Rueda D, Guijarro-Albaladejo B, Jesús S, Adarmes-Gómez AD, Escuela R, Vigo-Ortega R, Gómez-Garre P, Mir P. Analysis of p.Tyr307Asn variant in the *LRP10* gene in Parkinson's disease in southern Spain. *Neurobiol. Aging.* 2020; 93: 142.e1-142.e3. 10.1016/j.neurobiolaging.2020.04.007.

1.3. Evaluación de la asociación del gen *PICALM* con el riesgo de desarrollar deterioro cognitivo en la EP y su validación en la cohorte PPMI.

1.3.1. Resumen de resultados

En este trabajo se investigó si la variante rs3851179 en el gen *PICALM* y su interacción genética con *APOE* se asociaban con el riesgo de desarrollar deterioro cognitivo en la EP. Se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de los genotipos entre los pacientes con EP con y sin deterioro cognitivo (TT vs. CC + CT, OR = 0,309, 95% IC 0,122-0,785, $p = 0,041$) en la cohorte del sur de España. También, se demostró que el genotipo TT de la variante rs3851179 tenía un efecto protector significativo frente al desarrollo de deterioro cognitivo (HR = 0,397, $p = 0,044$). Tras estratificar la cohorte de estudio según el estado del alelo $\epsilon 4$ de *APOE*, se encontró una asociación significativa para el genotipo TT de la variante rs3851179 sólo en los sujetos portadores de *APOE* $\epsilon 4(-)$ (TT vs. CC + CT, OR = 0,241, 95% IC 0,074-0,788, $p = 0,037$). Los resultados del estudio de replicación mostraron diferencias significativas en la frecuencia de la variante rs3851179 (TT vs. CC + CT, OR = 0,305, 95% IC 0,098-0,951, $p = 0,041$). Además, se replicó el efecto protector del genotipo TT frente al desarrollo de deterioro cognitivo (HR = 0,290, $p = 0,037$). Por último, la estratificación de la cohorte de replicación según el estado de *APOE* $\epsilon 4$ no reveló ninguna asociación significativa ni en los portadores de *APOE* $\epsilon 4(-)$ ni de *APOE* $\epsilon 4(+)$ ($p > 0,05$).

Los resultados derivados de este trabajo mostraron que el polimorfismo rs3851179 en el gen *PICALM* estaba asociado con el riesgo de desarrollar deterioro cognitivo en la EP.

1.3.2. Publicación: Periñán MT, Macías-García D, Labrador-Espinosa MA, Jesús S, Buiza-Rueda D, Adarmes-Gómez AD, Muñoz-Delgado L, Gómez-Garre P, Mir P. Association of *PICALM* with Cognitive Impairment in Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* 2021; 36(1): 118-123.10.1002/mds.28283.

2. Identificación de posibles marcadores moleculares circulantes asociados con la EP y el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP.

2.1. Análisis de la expresión diferencial de miRNAs circulantes en sangre total como marcadores no invasivos en distintos subtipos de EP.

2.1.1. Resumen de resultados

En este trabajo se analizó la expresión diferencial de miRNAs candidatos y las rutas biológicas asociadas en muestras de sangre completa procedentes de distintos subtipos de EP para comprender las diferencias biológicas subyacentes entre la EP asociada a la mutación p.Gly2019Ser en *LRRK2*, la EP asociada a mutaciones en *GBA* y la EP idiopática. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de miRNAs en el subgrupo de pacientes con EP asociado a *LRRK2* frente a los pacientes con EP idiopática (miR-195-5p, miR-1-3p y miR-223-3p), así como en el subgrupo de pacientes con EP asociado a *GBA* frente a los pacientes con EP idiopática (miR-19b-3p, miR-181c-3p, miR-195-5p, miR-223-3p, miR-3613-3p, miR-214-3p y miR-23a-3p). El análisis de enriquecimiento predijo una serie de rutas KEGG (del inglés, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) relacionadas con la biosíntesis y el metabolismo de ácidos grasos, así como la biosíntesis de glucoesfingolípidos, entre otras, que podían ser dianas potenciales de los miRNAs diferencialmente expresados.

Así, el análisis comparativo de miRNAs en distintos subtipos de EP permitió identificar una serie de miRNAs expresados diferencialmente en la EP asociada a la mutación p.Gly2019Ser en *LRRK2* y la EP asociada a mutaciones en *GBA*.

2.1.2. Manuscrito en vías de publicación: Periñán MT, Gómez-Garre P, Macías-García D, Jesús S, Buiza-Rueda D, Bonilla-Toribio M, Jimenez-Jaraba MV, Muñoz-Delgado L, Adarmes-Gómez AD, Mir P. The role of blood microRNAs and their associated pathways in *LRRK2* and *GBA* related Parkinson's disease.

2.2. Estudio de la implicación de los niveles de homocisteína en sangre, así como de polimorfismos en genes implicados en su metabolismo, con el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP.

2.2.1. Resumen de resultados

En este trabajo se estudió la asociación entre los niveles de homocisteína así como de polimorfismos en genes implicados en su metabolismo y el deterioro cognitivo en la EP.

El estudio de casos-controles mostró que el aumento de los niveles de homocisteína se asociaba con el deterioro cognitivo en la EP tras corregir por posibles covariables como la dosis equivalente de L-Dopa diaria total. Los resultados del meta-análisis respaldaron la asociación positiva entre los niveles de homocisteína y el deterioro cognitivo en la EP. Desde el punto de vista genético, el genotipo TT de la variante rs1801133 en el gen *MTHFR* se asoció con un aumento de los niveles de homocisteína en los pacientes con EP, mientras que el genotipo CC de la variante rs1801131 en el gen *MTHFR* se relacionó con un aumento de la concentración de ácido fólico. Sin embargo, los polimorfismos de estudio no se asociaron significativamente con el deterioro cognitivo en los pacientes con EP.

Los resultados derivados de este trabajo mostraron que el aumento de los niveles de homocisteína representa un factor de riesgo para el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP.

2.2.2. Manuscrito en vías de publicación: Perriñán MT, Macías-García D, Jesús S, Martín-Rodríguez JF, Muñoz-Delgado L, Jimenez-Jaraba MV, Buiza-Rueda D, Bonilla-Toribio M, Adarmes-Gómez AD, Gómez-Garre P, Mir P. Homocysteine levels, genetic background, and cognitive impairment in Parkinson's disease.

DISCUSIÓN

Pese a los notables avances en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la EP, su etiología sigue siendo aún desconocida. Esta limitación hace que la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico o de progresión de la enfermedad sea especialmente compleja. Así, mientras que en otras patologías muchas decisiones en la práctica clínica se basan en los biomarcadores disponibles, todavía no se han desarrollado ni validado ningún biomarcador útil para el manejo de los pacientes con EP.

A pesar del progreso en la disección de los factores genéticos y ambientales que contribuyen a la etiología de la EP de forma independiente, el estudio de la convergencia de estas interacciones gen-ambiente sigue siendo un terreno poco explorado. Se ha determinado que, mientras que la herencia de ciertos genes, como *LRRK2*, puede conducir inevitablemente a las manifestaciones clínicas y patológicas características de la EP, otros requieren de la exposición a tóxicos ambientales para desencadenar el proceso neurodegenerativo. Dada la heterogeneidad genética de la EP, el estudio de los portadores de mutaciones en los genes *GBA* y *LRRK2* representa una excelente oportunidad para conocer más acerca de la interacción entre el genoma y el exposoma, lo cual es crucial para desarrollar enfoques predictivos y preventivos.

Un aspecto clave a considerar desde el punto de vista genético es el desafío de la diversidad genética. Esta falta de diversidad implica que el riesgo genético descrito para la EP podría no ser generalizable a nivel mundial. Ejemplo de ello es la ausencia de las señales correspondientes a los *loci* *MAPT* y *GBA* en el mayor estudio GWAS realizado en pacientes asiáticos con EP. De esta forma, es probable que aún no se hayan descrito muchos factores de riesgo genéticos específicos de población.

En este trabajo, se ha demostrado la implicación del gen *PICALM* en el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP, así como los niveles de homocisteína plasmática y la expresión de miRNAs circulantes como marcadores relacionados con la EP. Con ello, se pretende ayudar al conocimiento de las bases fisiopatológicas de esta enfermedad y contribuir en la identificación de biomarcadores de diagnóstico o progresión de EP.

A continuación, se discuten los aspectos específicos de los resultados obtenidos en los diferentes trabajos científicos presentados.

1. Identificación de variaciones genéticas implicadas en la fisiopatología de la EP, así como en el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP.

1.1. Estudio de la implicación de los genes *RHOT1* y *RHOT2* en la fisiopatología y la edad de inicio de la EP utilizando datos de las cohortes IPDGC y AMP-PD.

El objetivo de nuestro trabajo fue explorar el papel de *RHOT1* y *RHOT2* sobre el riesgo y la edad de inicio de la EP a través del análisis de grandes conjuntos de datos procedentes de IPDGC y AMP-PD, las cuales suponen dos de las cohortes públicas más grandes de casos de EP y controles disponibles en la actualidad. Nuestro estudio no encontró evidencias para apoyar la hipótesis de que *RHOT1* y *RHOT2* sean genes causativos o modificadores de EP en la población europea, ya que no se mostró un enriquecimiento significativo de los alelos de riesgo en los genes *RHOT1* y *RHOT2* en los pacientes con EP. Tampoco se observó un efecto acumulativo de las variaciones genéticas sobre el riesgo de EP cuando se realizaron los análisis de carga con variantes de baja frecuencia.

La asociación entre el gen *RHOT1* y el riesgo de EP se propuso por primera vez cuando se describió una interacción entre las proteínas Miro, PINK1 y parkina (Xinnan Wang et al., 2011). PINK1 y parkina son dos de las principales proteínas implicadas en la EP autosómica recesiva, las cuales participan en la regulación del transporte axonal mitocondrial (Bogaerts et al., 2008). El primer estudio genético que se llevó a cabo fue el de Anvret y colaboradores en 2012, en el cual se estudió la asociación de 5 variaciones localizadas en la región funcional de las proteínas Miro1 y Miro2 (codificadas por *RHOT1* y *RHOT2*, respectivamente) con la EP en una población sueca (Anvret, 2012). Tres de estas variaciones estaban localizadas en el gen *RHOT1* (p.Glu486Glu, p.Thr256Ser y p.Cys350Leu), mientras que las dos restantes (p.Arg245Gln y p.Asn236Asn) se encontraban en *RHOT2*. Sin embargo, ninguna de estas variantes se encontró asociada con la EP. Posteriormente, Berenguer-Escuder y colaboradores describieron las variaciones p.Arg272Gln, p.Thr351Ala, p.Arg450Cys y p.Thr610Ala en *RHOT1* en 4 pacientes con EP (Berenguer-Escuder et al., 2019). Mientras que p.Arg272Gln, p.Thr351Ala y p.Arg450Cys estaban localizadas en los dominios proteicos altamente conservados de *RHOT1*, la variante p.Thr610Ala estaba ubicada en el extremo C-terminal de la proteína. El modelado de

proteínas por homología demostró que las 4 variantes se localizaban en la superficie de la proteína expuestas al citosol, sugiriendo la posible implicación de éstas en la dinámica mitocondrial.

La variante p.Thr610Ala en el gen *RHOT1* fue la única identificada en los datos WGS, sin embargo, el alelo de riesgo estaba ausente en nuestra cohorte de casos y controles. Como ha sido discutido por Blauwendraat y colaboradores (Blauwendraat et al., 2018), considerando que el riesgo de desarrollar EP es del 1,3-2% (en función del sexo) (Elbaz et al., 2002), uno esperaría que ~1300 individuos de la población europea no finlandesa de gnomAD desarrollara EP. La variante p.T610A ha sido identificada en tan sólo 3 individuos de un total de 64336 incluidos en la base de datos gnomAD, lo que representaría alrededor del ~0,005% de todos los casos estimados de EP. Por tanto, dada la baja frecuencia de esta variante, el hecho de no haberla identificado en ninguno de los casos y controles de nuestra cohorte, no nos permite descartar por completo un posible efecto sobre el riesgo de EP.

Pese a que *RHOT1* y *RHOT2* comparten alrededor del 60% de homología de secuencias, las diferencias descritas en sus cinéticas de interacción podrían indicar roles relacionados pero divergentes en la función mitocondrial (Bocanegra et al., 2020). Los resultados de Hsieh y colaboradores en 2019 demostraron que Miro1 y Miro2 contribuyen de forma desigual al transporte bidireccional de las mitocondrias en las neuronas. Se mostraron evidencias de que Miro1 se encuentra más implicado en la mediación de la mitofagia que Miro2 (Hsieh et al., 2019). Además, la proteína que se ha relacionado con la EP es Miro1, ya que ésta interacciona con PINK1 y parkina. En esta misma línea, el estudio de Anvret y colaboradores (Anvret, 2012), así como los resultados derivados de nuestro estudio, no han observado un enriquecimiento significativo de los alelos de riesgo en el gen *RHOT2* en los pacientes con EP. Dado que Miro1 y Miro2 se expresan diferencialmente dentro de las células y los tejidos, es necesario llevar a cabo estudios adicionales para esclarecer las funciones que desempeñan ambas proteínas en la función mitocondrial y el papel de cada una de ellas sobre la etiología de la EP.

En resumen, aunque la disfunción mitocondrial juega un papel importante en el riesgo y la aparición de la EP, nuestros resultados no aportan suficientes evidencias para confirmar el papel de los genes *RHOT1* y *RHOT2* como principales contribuyentes a la etiología de la EP en la población europea.

1.2. Estudio de la implicación del gen *LRP10* en la fisiopatología de la EP en una población del sur de España.

El gen *LRP10* ha sido propuesto como un nuevo gen causativo de EP autosómico dominante. En él, la variante p.Tyr307Asn ha sido la única replicada en varias cohortes europeas. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la variante p.Tyr307Asn en el gen *LRP10* en pacientes con EP y controles sanos procedentes del sur de España. Se identificaron 3 portadores de la variante p.Tyr307Asn: 1 paciente con EP y 2 controles sanos. Considerando que los 3 portadores no presentaban antecedentes familiares de EP, concluimos que p.Tyr307Asn tenía una penetrancia baja en nuestra población.

El gen *LRP10* codifica para una proteína implicada en el tráfico vesicular entre la membrana plasmática y el aparato de Golgi, y que a su vez co-localiza con VPS35. La proteína LRP10 también interacciona con las proteínas GGA, involucradas en la agregación de SNCA. Mas allá, LRP10 se ha implicado en el metabolismo de APOE así como en el tráfico y procesamiento de la proteína precursora de β -amiloide ($A\beta$), pudiendo influir en la homeostasis de $A\beta$ (Vergouw et al., 2020).

En línea con nuestros resultados, la variante p.Tyr307Asn fue descrita en 1 paciente holandés con EP así como en 2 de sus hijos sanos (Vergouw et al., 2019). Tesson y colaboradores también describieron esta variante en 2 pacientes con EP procedentes de una familia francesa, sin embargo sus 2 familiares también afectados de EP no la presentaban (Tesson et al., 2018). Los autores del estudio justificaron este hallazgo con la idea de que ambos pacientes fuesen fenocopias, ya que no tenían ninguna otra variación genética relacionada con la EP.

Por otro lado, nuestra población de controles sanos representa la mayor cohorte de controles en la que se ha estudiado la variante p.Tyr307Asn del gen *LRP10*. Además, nuestro estudio es el primero en describir la presencia de esta variante en controles sanos sin antecedentes familiares de EP.

Cabe destacar que los 3 portadores de la variante p.Tyr307Asn identificados en nuestro estudio tenían un familiar de primer o segundo grado con EA. La actividad alterada de LRP10 ha sido descrita como un factor de riesgo potencial para la EA (Brodeur et al., 2012). Ejemplo de ello es la pérdida en los niveles de LRP10 observada en el tejido

cerebral *post mortem* de pacientes con EA. El examen de este tejido en algunos portadores de la variante p.Tyr307Asn afectados por EP, EP con demencia o DCL ha mostrado una gran cantidad de CL en todo el cerebro así como un grado leve/moderado de patología de EA (Quadri et al., 2018). Un estudio de Vergow y colaboradores describió 2 variaciones en el gen *LRP10* en 2 pacientes con demencia y patología de Lewy, así como otra variante en un paciente con demencia y parkinsonismo asociado sin patología de Lewy (Vergouw et al., 2020). La primera, p.Gly453Ser, fue identificada en un paciente con diagnóstico clínico de DCL y patología de EA/DCL en la autopsia. La segunda variante, p.Arg151Cys, se identificó en un paciente con diagnóstico clínico de EA y diagnóstico neuropatológico de DCL. La tercera variante, p.Gly326Asp, fue identificada en un paciente con diagnóstico clínico de parkinsonismo y EA, y patología de EA pura en la autopsia. Asimismo, el paciente con la variante p.Gly453Ser presentaba otra variante, p.Gly1741Arg, en el gen *ABCA7*. Las variantes raras en el gen *ABCA7* se consideran un factor de riesgo tanto de EA como de EP, pudiendo haber contribuido a la patología mixta de EA/DCL en este paciente. Con todo esto, concluimos que la variante p.Tyr307Asn podría tener un papel en la demencia, pudiendo ocurrir una confluencia de SNCA con patología de tipo EA. Se necesitan más estudios para confirmar el papel de la variante p.Tyr307Asn en la susceptibilidad a la demencia.

Una limitación del estudio fue la falta de muestras de ADN de los familiares para llevar a cabo estudios de cosegregación, que serían idóneos para esclarecer la patogenicidad de esta variante. También, la falta de seguimiento de los portadores asintomáticos de la variante p.Tyr307Asn, lo cual nos conduciría a estimaciones más precisas sobre la evolución de estos sujetos.

Como conclusión, hemos identificado la variante p.Tyr307Asn del gen *LRP10* en nuestra cohorte del sur de España, no sólo en pacientes con EP sino también en controles sanos. Este hecho, junto con la ausencia de una historia familiar positiva de EP, podría sugerir que se trata de una variante de baja penetrancia con un papel limitado en la EP.

1.3. Evaluación de la asociación del gen *PICALM* con el riesgo de desarrollar deterioro cognitivo en la EP y su validación en la cohorte PPMI.

El gen *PICALM* representa un factor de riesgo genético para la EA de inicio tardío. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar la implicación de *PICALM* y su interacción genética con *APOE* en el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que *PICALM* podría modular el riesgo de deterioro cognitivo en la EP, tanto en la cohorte del sur de España como en la cohorte de validación PPMI. Concretamente, el genotipo TT de la variante rs3851179 en *PICALM* mostró un efecto protector significativo frente al deterioro cognitivo en la EP. Tras ajustar por *APOE*, el análisis estadístico demostró que la asociación entre la variante rs3851179 y el deterioro cognitivo en la EP sólo fue significativa en los pacientes no portadores del alelo $\epsilon 4$ de *APOE* en la cohorte del sur de España. Sin embargo, la interacción genética *PICALM-APOE* no logró ser replicada en la cohorte PPMI.

A pesar de la superposición del deterioro cognitivo en la EA y la EP, el papel del polimorfismo rs3851179 en *PICALM* en el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP aún no ha sido abordado en profundidad (Barrett et al., 2016; Y. qin Wang et al., 2016). El primer estudio en reportar dicha asociación fue el de Barret y colaboradores, en el que se demostró que el alelo T aumentaba el riesgo de deterioro cognitivo en los pacientes con EP mayores de 70 años procedentes de la cohorte de estudio PROGENI/GenePD (disponible en dbGaP) (Barrett et al., 2016). Sin embargo, los resultados del estudio no fueron corregidos por comparaciones múltiples. Estos resultados contrastan con nuestros hallazgos, en los que observamos que el genotipo TT tuvo un efecto protector significativo frente al riesgo de deterioro cognitivo en ambas cohortes de pacientes con EP, extendiendo el papel de *PICALM* no sólo a los pacientes de EP mayores de 70 años.

La mayoría de los estudios se han centrado en definir el papel de *PICALM* en la EP (Chung et al., 2013; Gao et al., 2011; Kalinderi et al., 2012; Santos-Rebouças et al., 2017). Santos-Rebouças y colaboradores realizaron un estudio de casos-controles en una población brasileña de 174 pacientes con EA de inicio tardío, 166 pacientes con EP de inicio tardío y 176 controles sanos, en el que mostraron que el alelo T de la variante rs3851179 representaba un factor protector significativo para la EP con una OR similar a la EA

(Santos-Rebouças et al., 2017). No obstante, la interacción entre *PICALM* y *APOE* sólo fue evaluada en la cohorte de pacientes con EA, observando una asociación significativa del alelo T de la variante rs3851179 en *PICALM* con el subgrupo *APOE* ε4(-).

En los últimos años, los análisis funcionales han investigado la relación entre el gen *PICALM* y la EP. Se ha propuesto que este gen participa en el mecanismo de endocitosis mediado por clatrina, esencial para el mantenimiento de la transmisión sináptica (Kalinderi et al., 2012). También, se ha propuesto que *PICALM* interviene en el tráfico de sinaptobrevina (también llamada VAMP2), crucial para la función neuronal (Harel et al., 2008).

Nuestros hallazgos sugieren otra posible explicación para la asociación de *PICALM* con la EP a través de la relación del polimorfismo rs3851179 con el deterioro cognitivo. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios longitudinales en la EP coinciden en que el depósito anormal de Aβ está relacionado con el desarrollo de deterioro cognitivo (Leaver & Poston, 2015). *PICALM* participa en la endocitosis mediada por clatrina, implicada en algunas vías como la formación y eliminación de proteínas Aβ y tau a través de autofagia (Moreau et al., 2014; Zhao et al., 2015). En línea con esto, se ha demostrado que el alelo T de la variante rs3851179 en *PICALM* conduce a un aumento de la expresión de *PICALM* y, como consecuencia, se produce un aumento del aclaramiento de Aβ en comparación con el alelo no protector, lo que sugiere un vínculo entre *PICALM* y la proteína Aβ en la EP (Parikh et al., 2014). Esta explicación está en línea con una interacción genética *APOE-PICALM* asociada al deterioro cognitivo en la EP ya que *APOE* también ha demostrado estar implicado en la regulación del aclaramiento de Aβ del cerebro (Mouchard et al., 2019).

Los hallazgos del estudio presentan algunas limitaciones. La primera de ellas es que la función cognitiva no fue evaluada en el momento del diagnóstico de la EP en nuestra cohorte del sur de España, por lo que no pudimos evaluar si la variante rs3851179 en *PICALM* podía afectar al curso del deterioro cognitivo en la EP. Además, no se empleó la misma escala cognitiva para determinar la función cognitiva de los pacientes. En su lugar, se emplearon una batería de escalas que, a pesar de que todas ellas estaban internacionalmente aceptadas, no nos permitió ajustar los análisis por las puntuaciones obtenidas en las mismas. Del mismo modo, el nivel de educación no se registró durante la evaluación clínica de los pacientes de la cohorte del sur de España, por lo que no pudimos

ajustar por esta variable al analizar las asociaciones. De esta forma, resaltamos la necesidad de llevar a cabo estudios adicionales con un mayor tamaño muestral y en poblaciones étnicamente diferentes para confirmar la relación entre la variante rs3851179 en el gen *PICALM* y la función cognitiva en la EP y su posible interacción genética con *APOE*.

2. Identificación de posibles marcadores moleculares circulantes asociados con la EP y el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP.

2.1. Análisis de la expresión diferencial de miRNAs circulantes en sangre total como marcadores no invasivos en distintos subtipos de EP.

La EP representa la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, sin embargo, los mecanismos implicados en la patogénesis de la enfermedad son parcialmente desconocidos. Una mejor comprensión del perfil de expresión de miRNAs encargados de regular la expresión génica podría contribuir al descubrimiento de nuevos procesos biológicos. El objetivo de nuestro trabajo fue analizar el perfil de 29 miRNAs candidatos y las rutas biológicas asociadas en diferentes subgrupos de EP (EP *de novo*, EP idiopática, EP asociada a la mutación p.Gly2019Ser en *LRRK2* y EP asociada a mutaciones en *GBA*). Se demostró una alteración en la expresión de miRNAs en la EP asociada a la mutación p.Gly2019Ser en el gen *LRRK2* y la EP asociada a mutaciones en *GBA*. Los miRNAs expresados diferencialmente se encontraban implicados en rutas relacionadas con la biosíntesis y el metabolismo de ácidos grasos, así como la biosíntesis de glucoesfingolípidos, entre otras.

Las rutas significativamente alteradas en la EP asociada a la mutación p.Gly2019Ser en *LRRK2* identificadas en nuestro estudio fueron la biosíntesis y el metabolismo de ácidos grasos, así como la biosíntesis de glucoesfingolípidos. Pese a la falta de estudios de lipidómica extensos en modelos celulares o animales de *LRRK2*, diferentes líneas de evidencia sugieren una implicación de *LRRK2* en el metabolismo de lípidos y/o en las rutas de señalización de lípidos (Fais et al., 2021). Estudios recientes han observado un aumento de los niveles de bis(monoacilglicero)fosfato (BMP) en la orina de portadores de *LRRK2*

frente a sujetos no portadores, así como niveles de BMP ligeramente aumentados en pacientes con EP portadores de mutaciones en *LRRK2* frente a pacientes no portadores (Alcalay et al., 2020). BMP es un glicerofosfolípido cargado negativamente que se localiza en las membranas endosómicas y lisosomales, y se piensa que está involucrado en la degradación de los glucoesfingolípidos y en el transporte del colesterol (Akgoc et al., 2015). También, se ha demostrado que SNCA modifica su estructura en presencia de ácido araquidónico y ácido docosahexónico (DHA, por sus siglas en inglés), que se liberan tras la hidrólisis de los glicerofosfolípidos, adoptando su conformación α -helicoidal (Broersen et al., 2006; De Franceschi et al., 2009). DHA representa el 60% de los ácidos grasos esterificados con glicerofosfolípidos en la membrana plasmática, lo que lo convierte en un factor influyente en la agregación de SNCA (Lukiw & Bazan, 2008). Todas estas evidencias son, por tanto, consistentes con los hallazgos de nuestro estudio.

En cuanto a *GBA*, algunas de las rutas significativamente alteradas fueron la biosíntesis y el metabolismo de ácidos grasos, la biosíntesis de glucoesfingolípidos, la proteólisis mediada por ubiquitina, la señalización hippo, además de la señalización TGF- β , la adhesión focal, la señalización FoxO y la orientación axonal, entre otras. Curiosamente, algunas de estas rutas han sido identificadas también en un estudio transversal en el que se analizaron los niveles de expresión de miRNAs en pacientes con enfermedad de Gaucher y controles sanos (Pawliński et al., 2021). Así, a pesar de que algunas de estas vías ya estén descritas involucradas en la patogénesis de la EP asociada a mutaciones en *GBA*, otras suponen una potencial ventana para futuras investigaciones (Belarbi et al., 2020).

Por otro lado, nuestro estudio demostró que los pacientes con EP *de novo* presentaban una expresión significativamente menor de miR-1-3p que los pacientes con EP idiopática, sugiriendo que la terapia dopaminérgica podría desempeñar un papel regulando los niveles de expresión del mismo (Margis et al., 2011). Cabe destacar que miR-1-3p también se encontró diferencialmente expresado entre los pacientes con mutaciones en *LRRK2* y los pacientes con EP idiopática, siendo, según nuestro conocimiento, el primer estudio que describe una asociación entre miR-1-3p y el gen *LRRK2*. En línea con nuestros hallazgos, los resultados de un estudio demostraron que algunos genes asociados con la fisiopatología de la EP como *BDNF*, *GCHI*, *IGF1* y *CDC42* estaban regulados por miR-1-3p. El estudio

de interacción entre proteínas estableció que los genes *CDC42*, *BDNF*, *IGF1* y, particularmente, *LRRK2* presentaban una asociación funcional fuerte (Rath & Patri, 2020).

En resumen, hemos estudiado el perfil de expresión diferencial de miRNAs candidatos en distintos subtipos de EP de forma no invasiva. Sin embargo, los hallazgos del estudio presentan algunas limitaciones. Entre ellas, el pequeño tamaño muestral de la cohorte de estudio, así como la falta de seguimiento longitudinal de los pacientes. Otras limitaciones importantes fueron la falta de estudios de validación de miRNAs en otra cohorte de pacientes y de estudios funcionales que nos permitiesen validar los resultados de los procesos biológicos enriquecidos.

Hasta ahora, se han investigado diferentes fuentes para la detección de miRNAs circulantes en pacientes con EP, las cuales todas ellas tienen sus ventajas e inconvenientes (Da Silva et al., 2016). En nuestro estudio se consideró usar como material de partida sangre completa ya que ésta no se encuentra sesgada por la lisis celular y por su capacidad para ser utilizada directamente de la muestra original. Como la sangre completa puede verse afectada por el intercambio de sustancias con los tejidos adyacentes, así como por los cambios en la expresión celular, los niveles de miRNAs en sangre no son estrictamente representativos de los niveles de miRNAs en tejidos directamente relacionados con la EP como el cerebro. Es por ello que sería necesario determinar si los resultados obtenidos en este estudio se replican en otros tejidos y fluidos corporales como son el LCR y el tejido cerebral.

En resumen, nuestro estudio identificó una alteración en la expresión de miRNAs candidatos en la EP asociada a la mutación p.Gly2019Ser en el gen *LRRK2* y la EP asociada a mutaciones en *GBA*. Los miRNAs expresados diferencialmente se encontraban implicados en rutas relacionadas con la biosíntesis y el metabolismo de ácidos grasos, así como la biosíntesis de glucoesfingolípidos, entre otras. Sin embargo, se necesitan más estudios para replicar las asociaciones descritas y, por consiguiente, esclarecer las diferencias biológicas subyacentes.

2.2. Estudio de la implicación de los niveles de homocisteína en sangre, así como de polimorfismos en genes implicados en su metabolismo, con el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP.

El deterioro cognitivo se considera una de las principales manifestaciones no motoras de la EP. El objetivo de nuestro trabajo fue analizar la correlación entre los niveles de homocisteína y de polimorfismos en genes implicados en su metabolismo con el deterioro cognitivo en la EP. Nuestro estudio de casos-contróles, así como el meta-análisis posterior mostró una asociación entre los niveles de homocisteína y el deterioro cognitivo en la EP. Desde el punto de vista genético, el genotipo TT de la variante rs1801133 en *MTHFR* se asoció con un aumento de homocisteína en los pacientes con EP, mientras que el genotipo CC de la variante rs1801131 en *MTHFR* se asoció con un aumento de la concentración de folato. Sin embargo, los SNPs estudiados no se asociaron con el deterioro cognitivo en la EP.

Numerosos datos clínicos respaldan el papel de la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo del deterioro cognitivo. La homocisteína puede ejercer un efecto tóxico en las neuronas a través de mecanismos como el estrés oxidativo, daño en el ADN y alteración en la expresión de los receptores NMDA, conduciendo a una desregulación en la homeostasis de calcio, la función mitocondrial, la autofagia neuronal y la apoptosis (Ji et al., 2019). Además, la homocisteína puede alterar la función endotelial y la permeabilidad de la BHE, pudiendo desencadenar un accidente cerebrovascular isquémico (Kamath et al., 2006). De hecho, niveles elevados de homocisteína plasmática pueden ocasionar lesiones vasculares, que dan lugar al deterioro de la función cognitiva (Huang et al., 2017).

El aumento de los niveles de homocisteína observado en nuestra cohorte de pacientes con deterioro cognitivo es consistente con la literatura. Aun así, un número reducido de trabajos no han logrado demostrar esta relación (Annamaki et al., 2008; Camicioli et al., 2009; Rodríguez-Oroz et al., 2009). Los resultados de un estudio empleando una cohorte española no encontraron evidencias de asociación entre los niveles de homocisteína plasmática y el deterioro cognitivo en la EP (Rodríguez-Oroz et al., 2009). Las diferencias observadas con nuestro estudio podrían explicarse por las herramientas de detección empleadas para evaluar la función cognitiva. Rodríguez-Oroz y colaboradores evaluaron la función cognitiva utilizando la escala MMSE (del inglés, *Mini Mental State Examination*), pero también la escala *Blessed Dementia Rating Scale*, la cual no estaba incluida en nuestra batería de herramientas de evaluación cognitiva. Annamaki y colaboradores tampoco encontraron una correlación entre los niveles de homocisteína y el rendimiento

neuropsicológico en una cohorte de 40 pacientes con EP (Annamaki et al., 2008). Igualmente, Camicioli y colaboradores observaron que los niveles de homocisteína no se correlacionaban con la medida global de cognición en una cohorte canadiense de 51 pacientes con EP (Camicioli et al., 2009). En particular, los autores que no lograron encontrar esta asociación emplearon cohortes de tamaño muestral pequeñas (n=40 y n=50, respectivamente), lo que explicaría las inconsistencias observadas con respecto a nuestro estudio.

El meta-análisis realizado confirmó la asociación entre los niveles de homocisteína y el deterioro cognitivo en la EP. Los resultados del meta-análisis podrían servir para guiar la estimación del tamaño muestral de estudios observacionales futuros, así como de estudios preclínicos y clínicos. Una limitación importante es que no se pudo identificar la causa de la heterogeneidad significativa observada. Teniendo en cuenta que algunos de los estudios analizaron pocas características específicas de la EP, no pudimos evaluar otros factores que podrían haber contribuido a la heterogeneidad observada. Algunos factores del estilo de vida, como los hábitos dietéticos y el ejercicio físico, pueden influir en el metabolismo de la homocisteína (Herrmann et al., 2003; Konstantinova et al., 2007). Por ello, las investigaciones futuras deberían abordar la contribución de estos factores a la heterogeneidad observada.

Entre las causas genéticas de la hiperhomocisteinemia, el gen *MTHFR* está involucrado en el metabolismo de la homocisteína y la metionina, así como en los procesos de metilación. Aunque se han descrito varios polimorfismos en este gen, la variante rs1801133 es la más estudiada debido a su impacto funcional. Varios estudios han abordado la asociación entre la variante rs1801133 y el aumento de los niveles de homocisteína en los pacientes con EP. Nuestros resultados están en línea con los publicados por Bialecka y colaboradores, los cuales demostraron que el SNP rs1801133 era el determinante genético principal del aumento de homocisteína en los pacientes con EP (Bialecka et al., 2012). Por otro lado, nuestros resultados mostraron la implicación de la variante rs1801131 en los niveles de folato en los pacientes con EP. Este es el primer estudio, según nuestro conocimiento, en el que la variante rs1801131 en *MTHFR* se relaciona con los niveles de folato en la EP.

Son escasos los trabajos que han investigado la asociación de factores genéticos implicados en el metabolismo de la homocisteína con la disfunción cognitiva en los pacientes con EP

(Bialecka et al., 2012; Hoogland et al., 2010; Rodriguez-Oroz et al., 2009). Hasta la fecha, no se ha demostrado una asociación significativa entre el deterioro cognitivo y los polimorfismos en genes implicados en el metabolismo de la homocisteína en el riesgo de EP. En línea con estos resultados, nuestro estudio no logró identificar una asociación entre los polimorfismos de estudio y el deterioro cognitivo en la EP.

Cabe destacar que un estudio de casos-controles empleando la cohorte *Health in Men* concluyó que los hombres con el genotipo TT de la variante rs1801133 en *MTHFR* tenían un 46% más de probabilidad de desarrollar deterioro cognitivo que aquellos con el genotipo CC (Ford et al., 2012). Además, un meta-análisis ha demostrado el papel de este polimorfismo en la EA en poblaciones asiáticas. Esta asociación, en cambio, no fue replicada en poblaciones caucásicas (Hua et al., 2011). Por ello, sería interesante analizar el papel de la variante rs1801133 en poblaciones con EP de mayor tamaño muestral así como en poblaciones étnicamente diferentes para determinar su frecuencia entre los diferentes grupos étnicos.

Los hallazgos del estudio presentan algunas limitaciones. La primera de ellas fue que no se empleó la misma escala cognitiva para evaluar a todos los pacientes. Sin embargo, todas las escalas utilizadas estaban internacionalmente aceptadas y nos permitieron diferenciar con éxito a los pacientes con EP con y sin deterioro cognitivo. Otra limitación fue el pequeño tamaño muestral de la cohorte de estudio, pero los resultados del meta-análisis reforzaron la asociación descrita en el estudio de casos-controles.

En resumen, nuestro estudio de casos-controles demostró que el aumento de homocisteína se asociaba con el deterioro cognitivo en la EP. Los resultados del meta-análisis respaldaron la asociación positiva entre los niveles de homocisteína y el deterioro cognitivo en la EP. Desde el punto de vista genético, no se encontró una asociación entre los polimorfismos en genes implicados en el metabolismo de la homocisteína y el deterioro cognitivo en la EP. Por ello, se requieren de estudios a gran escala en poblaciones étnicamente diferentes para esclarecer el papel del gen *MTHFR* en el deterioro cognitivo en la EP.

CONCLUSIONES

1. No se encontró una asociación entre las variaciones en los genes *RHOT1* y *RHOT2*, ni un efecto acumulativo de las mismas, con el riesgo o la edad de inicio de EP, por lo que estos genes no parecen ser causativos o modificadores de la enfermedad en la población europea.
2. Se han identificado 3 portadores de la variante p.Tyr307Asn en el gen *LRP10*, 1 paciente con EP y 2 controles sanos, de los cuales ninguno de ellos presentaban antecedentes familiares de EP, cuestionando la implicación de p.Tyr307Asn en la enfermedad.
3. El hecho de que los 3 portadores de la variante p.Tyr307Asn en el gen *LRP10* tuviesen un familiar, de primer o segundo grado, con EA sugiere la implicación de esta variante en el riesgo de desarrollar demencia.
4. El genotipo TT de la variante rs3851179 en el gen *PICALM* mostró un efecto protector estadísticamente significativo frente al desarrollo de deterioro cognitivo en la EP, tanto en la cohorte del sur de España como en la cohorte de validación PPMI.
5. La asociación entre la variante rs3851179 y el deterioro cognitivo sólo fue significativa en los pacientes no portadores del alelo $\epsilon 4$ de *APOE* en la cohorte del sur de España. Sin embargo, la interacción genética *PICALM-APOE* no logró ser replicada en la cohorte de validación PPMI.
6. Se identificó un perfil de miRNAs expresados diferencialmente en la EP asociada a la mutación p.Gly2019Ser en el gen *LRRK2*, así como en la EP asociada a mutaciones en *GBA*.
7. Los miRNAs expresados diferencialmente en la EP asociada a la mutación p.Gly2019Ser en el gen *LRRK2* y en la EP asociada a mutaciones en *GBA* se asociaron a rutas relacionadas con la biosíntesis y el metabolismo de los ácidos grasos, así como la biosíntesis de glucoesfingolípidos.
8. Los niveles de homocisteína se asociaron con el riesgo de desarrollar deterioro cognitivo en la EP tanto en el estudio de casos-contróles como en el meta-análisis.
9. El genotipo TT de la variante rs1801133 en el gen *MTHFR* se asoció con un aumento de los niveles de homocisteína, mientras que el genotipo CC de la variante rs1801131 en *MTHFR* se asoció con una mayor concentración de folato.

10. No se encontró una asociación entre los polimorfismos en genes relacionados con el metabolismo de la homocisteína y el deterioro cognitivo en la EP.

BIBLIOGRAFÍA

- Aarnio, V., Paananen, J., & Wong, G. (2005). Analysis of microarray studies performed in the neurosciences. *J Mol Neurosci.* 27 (3): 261-268.
<https://doi.org/10.1385/JMN:27:3:261>.
- Akgoc, Z., Sena-Esteves, M., Martin, D. R., Han, X., D'Azzo, A., & Seyfried, T. N. (2015). Bis(monoacylglycerol)phosphate: A secondary storage lipid in the gangliosidoses. *J Lipid Res.* 56 (5): 1006-1013. <https://doi.org/10.1194/jlr.M057851>.
- Alcalay, R. N., Hsieh, F., Tengstrand, E., Padmanabhan, S., Baptista, M., Kehoe, C. *et al.* (2020). Higher Urine bis(Monoacylglycerol)Phosphate Levels in LRRK2 G2019S Mutation Carriers: Implications for Therapeutic Development. *Mov Disord.* 35 (1): 134-141. <https://doi.org/10.1002/mds.27818>.
- Alexander, G. E. (2004). Biology of Parkinson's disease: Pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues Clin Neurosci.* 6 (3): 259-280. <https://doi.org/10.31887/dcns.2004.6.3/galexander>.
- Annamaki, T., Pessala-Driver, A., Hokkanen, L., & Murros, K. (2008). Uric acid associates with cognition in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 14 (7): 576-578. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2007.11.001>.
- Anvret, A., Ran, C., Westerlund, M., Sydow, O., Willows, T., Olson, L. *et al.* (2012). Genetic Screening of the Mitochondrial Rho GTPases MIRO1 and MIRO2 in Parkinson's Disease. *Open Neurol J.* 6: 1-5.
<https://doi.org/10.2174/1874205x01206010001>.
- Appel-Cresswell, S., Rajput, A. H., Sossi, V., Thompson, C., Silva, V., McKenzie, J. *et al.* (2014). Clinical, positron emission tomography, and pathological studies of DNAJC13 p.N855S Parkinsonism. *Mov Disord.* 29 (13): 1684-1687.
<https://doi.org/10.1002/mds.26019>.
- Ascherio, A., & Schwarzschild, M. A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol.* 15 (12): 1257-1272.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7).
- Atkinson, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F. *et al.* (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 69 (3): 89-95.

- <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>.
- Bailey, M., & Goldman, J. G. (2017). Characterizing Cognitive Impairment in Parkinson's Disease. *Semin Neurol.* 37 (2): 167-175. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1601894>.
- Bandres-Ciga, S., Diez-Fairen, M., Kim, J. J., & Singleton, A. B. (2020). Genetics of Parkinson's disease: An introspection of its journey towards precision medicine. *Neurobiol Dis.* 137: 104782. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104782>.
- Barrett, M. J., Koepfel, A. F., Flanigan, J. L., Turner, S. D., & Worrall, B. B. (2016). Investigation of Genetic Variants Associated with Alzheimer Disease in Parkinson Disease Cognition. *J Parkinson Dis.* 6 (1): 119-124. <https://doi.org/10.3233/JPD-150706>.
- Belarbi, K., Cuvelier, E., Bonte, M. A., Desplanque, M., Gressier, B., Devos, D. *et al.* (2020). Glycosphingolipids and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener.* 15 (1): 59. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00408-1>.
- Ran, C., & Belin, A. (2014). The genetics of Parkinson's disease: review of current and emerging candidates. *Research and Reviews in Parkinsonism.* 2014 (4): 63-75. <https://doi.org/10.2147/jprls.s38954>.
- Berenguer-Escuder, C., Grossmann, D., Massart, F., Antony, P., Burbulla, L. F., Glaab, E. *et al.* (2019). Variants in Miro1 cause alterations of ER- mitochondria contact sites in fibroblasts from parkinson's disease patients. *J Clin Med.* 8 (12): 2226. <https://doi.org/10.3390/jcm8122226>.
- Berg, D., Postuma, R. B., Adler, C. H., Bloem, B. R., Chan, P., Dubois, B. *et al.* (2015). MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord.* 30 (12): 1600-1611. <https://doi.org/10.1002/mds.26431>.
- Białecka, M., Kurzawski, M., Roszmann, A., Robowski, P., Sitek, E. J., Honczarenko, K. *et al.* (2012). Association of COMT, MTHFR, and SLC19A1(RFC-1) polymorphisms with homocysteine blood levels and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Pharmacogenet Genomics.* 22 (10): 716-724. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835693f7>.
- Billingsley, K. J., Bandres-Ciga, S., Saez-Atienzar, S., & Singleton, A. B. (2018). Genetic risk factors in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* 373 (1): 9-20. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2817-y>.

- Blauwendraat, C., Heilbron, K., Vallerga, C. L., Bandres-Ciga, S., von Coelln, R., Pihlstrøm, L. *et al.* (2019). Parkinson's disease age at onset genome-wide association study: Defining heritability, genetic loci, and α -synuclein mechanisms. *Mov Disord.* 34 (6): 866-875. <https://doi.org/10.1002/mds.27659>.
- Blauwendraat, C., Kia, D. A., Pihlstrøm, L., Gan-Or, Z., Lesage, S., Gibbs, J. R. *et al.* (2018). Insufficient evidence for pathogenicity of SNCA His50Gln (H50Q) in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 64: 159.e5-159.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.12.012>.
- Blauwendraat, C., Nalls, M. A., & Singleton, A. B. (2020). The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 19 (2): 170-178. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30287-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30287-X).
- Bocanegra, J. L., Fujita, B. M., Melton, N. R., Cowan, J. M., Schinski, E. L., Tamir, T. Y. *et al.* (2020). The MyMOMA domain of MYO19 encodes for distinct Miro-dependent and Miro-independent mechanisms of interaction with mitochondrial membranes. *Cytoskeleton.* 77 (3-4): 149-166. <https://doi.org/10.1002/cm.21560>.
- Bogaerts, V., Theuns, J., & Van Broeckhoven, C. (2008). Genetic findings in Parkinson's disease and translation into treatment: A leading role for mitochondria? *Genes Brain Beh.* 7 (2): 129-151. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00342.x>.
- Bonetti, M., Ferraris, A., Petracca, M., Bentivoglio, A. R., Dallapiccola, B., & Valente, E. M. (2009). GIGYF2 variants are not associated with Parkinson's disease in Italy. *Mov Disord.* 24 (12): 1867-1868. <https://doi.org/10.1002/mds.22640>.
- Bras, J., Simán-Sánchez, J., Federoff, M., Morgadinho, A., Januario, C., Ribeiro, M. *et al.* (2009). Lack of replication of association between GIGYF2 variants and Parkinson disease. *Hum Mol Genet.* 18 (2): 341-346. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn340>.
- Brodeur, J., Thériault, C., Lessard-Beaudoin, M., Marcil, A., Dahan, S., & Lavoie, C. (2012). LDLR-related protein 10 (LRP10) regulates amyloid precursor protein (APP) trafficking and processing: Evidence for a role in Alzheimers disease. *Mol Neurodegener.* 7: 31. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-31>.
- Broekema, R. V., Bakker, O. B., & Jonkers, I. H. (2020). A practical view of fine-mapping and gene prioritization in the post-genome-wide association era. *Open Biol.* 10 (1): 190221. <https://doi.org/10.1098/rsob.190221>.

- Broersen, K., Van Den Brink, D., Fraser, G., Goedert, M., & Davletov, B. (2006). α -synuclein adopts an α -helical conformation in the presence of polyunsaturated fatty acids to hinder micelle formation. *Biochemistry*. 45 (51): 15610-15616.
<https://doi.org/10.1021/bi061743l>.
- Brolin, K., Bandres-Ciga, S., Leonard, H., Makarious, M. B., Blauwendraat, C., Mata, I. F. *et al.* (2021). RIC3 variants are not associated with Parkinson's disease in large European, Latin American, or East Asian cohorts. *Neurobiol Aging*. 109: 264-268.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.08.009>.
- Camicioli, R. M., Bouchard, T. P., & Somerville, M. J. (2009). Homocysteine is not associated with global motor or cognitive measures in nondemented older Parkinson's disease patients. *Mov Disord*. 24 (2): 176-182. <https://doi.org/10.1002/mds.22227>.
- Castelo Rueda, M. P., Raftopoulou, A., Gögele, M., Borsche, M., Emmert, D., Fuchsberger, C. *et al.* (2021). Frequency of Heterozygous Parkin (PRKN) Variants and Penetrance of Parkinson's Disease Risk Markers in the Population-Based CHRIS Cohort. *Front Neurol*. 12: 706145. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.706145>.
- Chahine, L. M., Stern, M. B., & Chen-Plotkin, A. (2014). Blood-based biomarkers for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 20 (0 1): S99-S103.
[https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(13\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70025-7).
- Chang, K. H., & Chen, C. M. (2020). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Antioxidants*. 9 (7): 597. <https://doi.org/10.3390/antiox9070597>.
- Chartier-Harlin, M. C., Dachsel, J. C., Vilarinho-Güell, C., Lincoln, S. J., Leprêtre, F., Hulihan, M. M. *et al.* (2011). Translation initiator EIF4G1 mutations in familial parkinson disease. *Am J Hum Genet*. 89 (3): 398-406.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.08.009>.
- Chung, S. J., Jung, Y., Hong, M., Kim, M. J., You, S., Kim, Y. J. *et al.* (2013). Alzheimer's disease and Parkinson's disease genome-wide association study top hits and risk of Parkinson's disease in Korean population. *Neurobiol Aging*. 34 (11): 2695.e1-2695.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.022>.
- Costa, A., Peppe, A., Carlesimo, G. A., Zabberoni, S., Scalici, F., Caltagirone, C. *et al.* (2015). Brain-derived neurotrophic factor serum levels correlate with cognitive performance in parkinson's disease patients with mild cognitive impairment. *Front*

- Behav Neurosci.* 9: 253. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00253>.
- Cova, I., & Priori, A. (2018). Diagnostic biomarkers for Parkinson's disease at a glance: where are we? *J Neural Transm.* 125 (10): 1417-1432. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1910-4>.
- Da Silva, F. C., Da Rosa Iop, R., Vietta, G. G., Kair, D. A., Gutierrez Filho, P. J. B., De Alvarenga, J. G. S. *et al.* (2016). MicroRNAs involved in Parkinson's disease: A systematic review. *Mol Med Rep.* 14 (5): 4015-4022. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5759>.
- Daly, A. K., & Day, C. P. (2001). Candidate gene case-control association studies: Advantages and potential pitfalls. *Br J Clin Pharmacol.* 52 (5): 489-499. <https://doi.org/10.1046/j.0306-5251.2001.01510.x>.
- De Franceschi, G., Frare, E., Bubacco, L., Mammi, S., Fontana, A., & de Laureto, P. P. (2009). Molecular Insights into the Interaction between α -Synuclein and Docosahexaenoic Acid. *J Mol Biol.* 394 (1): 94-107. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.008>.
- Delenclos, M., Jones, D. R., McLean, P. J., & Uitti, R. J. (2016). Biomarkers in Parkinson's disease: Advances and strategies. *Parkinsonism Relat Disord.* 22 (S1): S106-S110. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.09.048>.
- Deng, H., Fan, K., & Jankovic, J. (2018). The role of TMEM230 gene in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 8 (4): 469-477. <https://doi.org/10.3233/JPD-181421>.
- Di Fonzo, A., Fabrizio, E., Thomas, A., Fincati, E., Marconi, R., Tinazzi, M. *et al.* (2009). GIGYF2 mutations are not a frequent cause of familial Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 15 (9): 703-705. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2009.05.001>.
- Dolled-Filhart, M. P., Lee, M., Ou-Yang, C. W., Haraksingh, R. R., & Lin, J. C. H. (2013). Computational and bioinformatics frameworks for next-generation whole exome and genome sequencing. *Scientific World Journal.* 2013: 730210. <https://doi.org/10.1155/2013/730210>.
- Dong, J., Cui, Y., Li, S., & Le, W. (2016). Current Pharmaceutical Treatments and Alternative Therapies of Parkinson's Disease. *Curr Neuropharmacol.* 14 (4): 339-355. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666151120123025>.

- Driver, J. A., Logroscino, G., Gaziano, J. M., & Kurth, T. (2009). Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. *Neurology*, 72 (5): 432-438. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000341769.50075.bb>.
- Elbaz, A., Bower, J. H., Maraganore, D. M., McDonnell, S. K., Peterson, B. J., Ahlskog, J. E. *et al.* (2002). Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J Clin Epidemiol*, 55 (1): 25-31. [https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(01\)00425-5](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(01)00425-5).
- Emre, M., Aarsland, D., Brown, R., Burn, D. J., Duyckaerts, C., Mizuno, Y. *et al.* (2007). Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 22 (12): 1698-1707. <https://doi.org/10.1002/mds.21507>.
- Fais, M., Dore, A., Galioto, M., Galleri, G., Crosio, C., & Iaccarino, C. (2021). Parkinson's disease-related genes and lipid alteration. *Int J Mol Sci*. 22 (14): 7630. <https://doi.org/10.3390/ijms22147630>.
- Fonzo, A. D., Dekker, M. C. J., Montagna, P., Baruzzi, A., Yonova, E. H., Guedes, L. C. *et al.* (2009). FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology*, 72 (3): 240-245. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000338144.10967.2b>.
- Foo, J. N., Liang, H., Tan, L. C., Au, W. L., Prakash, K. M., Liu, J. *et al.* (2014). DNAJ mutations are rare in Chinese Parkinson's disease patients and controls. *Neurobiol Aging*. 35 (4): 935.e1-935.e2. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.018>.
- Ford, A. H., Flicker, L., Hankey, G. J., Norman, P., Van Bockxmeer, F. M., & Almeida, O. P. (2012). Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and cognitive impairment: The health in men study. *Mol Psychiatry*. 17 (5): 559-566. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.18>.
- Funayama, M., Ohe, K., Amo, T., Furuya, N., Yamaguchi, J., Saiki, S. *et al.* (2015). CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: A genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol*. 14 (3): 274-282. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70266-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70266-2).
- Gagliardi, M., Procopio, R., Nicoletti, G., Morelli, M., D'Amelio, M., Quattrone, A. *et al.* (2021). Analysis of the LRP10 gene in patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies from Southern Italy. *Neurol Sci*. 42 (1): 305-308. <https://doi.org/10.1007/s10072-020-04747-1>.

- Gao, J., Huang, X., Park, Y. Y., Hollenbeck, A., & Chen, H. (2011). An exploratory study on CLU, CR1 and PICALM and Parkinson disease. *PLoS One*. 6 (8): e24211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024211>.
- Goker-Alpan, O., Masdeu, J. C., Kohn, P. D., Ianni, A., Lopez, G., Groden, C. *et al.* (2012). The neurobiology of glucocerebrosidase-associated parkinsonism: A positron emission tomography study of dopamine synthesis and regional cerebral blood flow. *Brain*. 135 (8): 2440-2448. <https://doi.org/10.1093/brain/aws174>.
- Goldman, S. M., Umbach, D. M., Kamel, F., & Tanner, C. M. (2015). Head injury, α -synuclein Rep1 and Parkinson's disease: A meta-analytic view of gene-environment interaction. *Eur J Neurol*. 22 (7): e75. <https://doi.org/10.1111/ene.12694>.
- Gorcenco, S., Ilinca, A., Almasoudi, W., Kafantari, E., Lindgren, A. G., & Puschmann, A. (2020). New generation genetic testing entering the clinic. *Parkinsonism Relat Disord*. 73: 72-84. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2020.02.015>.
- Grossmann, D., Berenguer-Escuder, C., Chemla, A., Arena, G., & Krüger, R. (2020). The Emerging Role of RHOT1/Miro1 in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Front Neurol*. 11: 587. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00587>.
- Gustavsson, E. K., Trinh, J., Guella, I., Vilariño-Güell, C., Appel-Cresswell, S., Stoessl, A. J. *et al.* (2015). DNAJC13 genetic variants in parkinsonism. *Mov Disord*. 30 (2): 273-278. <https://doi.org/10.1002/mds.26064>.
- Hall, J. M., & Lewis, S. J. G. (2019). Neural Correlates of Cognitive Impairment in Parkinson's Disease: A Review of Structural MRI Findings. *Int Rev Neurobiol*. 144: 1-28. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2018.09.009>.
- Halliday, G. M., Li, Y. W., Blumbergs, P. C., Joh, T. H., Cotton, R. G. H., Howe, P. R. C. *et al.* (1990). Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 27 (4): 373-385. <https://doi.org/10.1002/ana.410270405>.
- Harel, A., Wu, F., Mattson, M. P., Morris, C. M., & Yao, P. J. (2008). Evidence for CALM in Directing VAMP2 Trafficking. *Traffic*. 9 (3): 417-429. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00694.x>.
- Healy, D. G., Abou-Sleiman, P. M., & Wood, N. W. (2004). Genetic causes of Parkinson's disease: UCHL-1. *Cell Tissue Res*. 318 (1): 189-194. <https://doi.org/10.1007/s00441->

004-0917-3.

- Hermanowicz, N., & Edwards, K. (2015). Parkinson's disease psychosis: symptoms, management, and economic burden. *Am J Manag Care*. 21 (10S): S199-S206.
- Hernandez, D. G., Reed, X., & Singleton, A. B. (2016). Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. *J Neurochem*. 139 (S1): 59-74.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13593>.
- Herrmann, M., Schorr, H., Obeid, R., Scharhag, J., Urhausen, A., Kindermann, W. *et al.* (2003). Homocysteine increases during endurance exercise. *Clin Chem Lab Med*. 41: 1518-1524. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2003.233>.
- Hirsch, E. C., & Standaert, D. G. (2021). Ten Unsolved Questions About Neuroinflammation in Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 36 (1): 16-24.
<https://doi.org/10.1002/mds.28075>.
- Hong, C. T., Chan, L., Wu, D., Chen, W. T., & Chien, L. N. (2019). Antiparkinsonism anticholinergics increase dementia risk in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 65: 224-229.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.06.022>.
- Hoogland, J., De Bie, R. M. A., Williams-Gray, C. H., Muslimović, D., Schmand, B., & Post, B. (2010). Catechol-O-methyltransferase val158met and cognitive function in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 25 (15): 2550-2554.
<https://doi.org/10.1002/mds.23319>.
- Hsieh, C. H., Li, L., Vanhauwaert, R., Nguyen, K. T., Davis, M. D., Bu, G. *et al.* (2019). Miro1 Marks Parkinson's Disease Subset and Miro1 Reducer Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models. *Cell Metab*. 30 (6): 1131-1140.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.023>.
- Hua, Y., Zhao, H., Kong, Y., & Ye, M. (2011). Association between the MTHFR gene and Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Int J Neurosci*. 121 (8): 462-471.
<https://doi.org/10.3109/00207454.2011.578778>.
- Huang, C. F., Wang, W. N., Sun, C. C., Wang, Y. Q., Li, L., Li, Y. *et al.* (2017). Echinocystic acid ameliorates hyperhomocysteinemia-induced vascular endothelial cell injury through regulating NF- κ B and CYP1A1. *Exp Ther Med*. 14 (5): 4174-4180.
<https://doi.org/10.3892/etm.2017.5097>.

- Iwaki, H., Blauwendraat, C., Leonard, H. L., Kim, J. J., Liu, G., Maple-Grødem, J. *et al.* (2019). Genomewide association study of Parkinson's disease clinical biomarkers in 12 longitudinal patients' cohorts. *Mov Disord.* 34 (12): 1839-1850. <https://doi.org/10.1002/mds.27845>.
- Jafari, S., Etminan, M., Aminzadeh, F., & Samii, A. (2013). Head injury and risk of Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 28 (9): 1222-1229. <https://doi.org/10.1002/mds.25458>.
- Jankovic, J., & Tan, E. K. (2020). Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. *J Neurol, Neurosurg Psychiatry.* 91 (8): 795-808. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322338>.
- Ji, Y., Lyu, P., Jin, W., Li, X., Li, X., & Dong, Y. (2019). Homocysteine: A modifiable culprit of cognitive impairment for us to conquer? *J Neurol Sci.* 404: 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.07.015>.
- Jiménez-Jiménez, F. J., Alonso-Navarro, H., García-Martín, E., & Agúndez, J. A. G. (2014). Cerebrospinal fluid biochemical studies in patients with Parkinson's disease: Toward a potential search for biomarkers for this disease. *Front Cell Neurosci.* 8: 369. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00369>.
- Joseph, S., Schulz, J. B., & Stegmüller, J. (2018). Mechanistic contributions of FBXO7 to Parkinson disease. *J Neurochem.* 144 (2): 118-127. <https://doi.org/10.1111/jnc.14253>.
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease - The Lancet. *The Lancet.* 386 (9996): 896-912. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3).
- Kalinderi, K., Bostantjopoulou, S., Katsarou, Z., Clarimón, J., & Fidani, L. (2012). Lack of association of the PICALM rs3851179 polymorphism with Parkinson's disease in the Greek population. *International Journal of Neuroscience.* 122 (10): 502-605. <https://doi.org/10.3109/00207454.2012.697083>.
- Kamath, A. F., Chauhan, A. K., Kisucka, J., Dole, V. S., Loscalzo, J., Handy, D. E. *et al.* (2006). Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice. *Blood.* 107 (2): 591-593. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2506>.
- Kasten, M., Chade, A., & Tanner, C. M. (2007). Epidemiology of Parkinson's disease. In *Handb Clin Neurol.* 83: 129-151. [https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(07\)83006-5](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(07)83006-5).
- Klein, C., & Westenberger, A. (2012). Genetics of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb*

- Perspect Med.* <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.021>.
- Konstantinova, S. V., Emil Vollset, S., Berstad, P., Ueland, P. M., Drevon, C. A., Refsum, H. *et al.* (2007). Dietary predictors of plasma total homocysteine in the hordaland homocysteine study. *Br J Nutr.* 98: 201-210.
<https://doi.org/10.1017/S0007114507691788>.
- Koschmidder, E., Weissbach, A., Brüggemann, N., Kasten, M., Klein, C., & Lohmann, K. (2016). A nonsense mutation in CHCHD2 in a patient with Parkinson disease. *Neurology.* 86 (6): 577-579. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002361>.
- Krebs, C. E., Karkheiran, S., Powell, J. C., Cao, M., Makarov, V., Darvish, H. *et al.* (2013). The sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive parkinsonism with generalized seizures. *Hum Mutat.* 34 (9): 1200-1207.
<https://doi.org/10.1002/humu.22372>.
- Kusters, C. D. J., Paul, K. C., Guella, I., Bronstein, J. M., Sinsheimer, J. S., Farrer, M. J. *et al.* (2018). Dopamine receptors and BDNF-haplotypes predict dyskinesia in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 47: 39-44.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.11.339>.
- Larsen, S. B., Hanss, Z., & Krüger, R. (2018). The genetic architecture of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* 373 (1): 21-37.
<https://doi.org/10.1007/s00441-017-2768-8>.
- Leaver, K., & Poston, K. L. (2015). Do CSF Biomarkers Predict Progression to Cognitive Impairment in Parkinson's disease patients? A Systematic Review. *Neuropsychol Rev.* 25 (4): 411-423. <https://doi.org/10.1007/s11065-015-9307-8>.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E. *et al.* (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature.* 395 (6701): 451-452.
<https://doi.org/10.1038/26652>.
- Lesage, S., Condroyer, C., Klebe, S., Lohmann, E., Durif, F., Damier, P. *et al.* (2012). EIF4G1 in familial Parkinson's disease: Pathogenic mutations or rare benign variants? *Neurobiol Aging.* 33 (9): 2233.e1-2233.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.006>.
- Lesage, S., Mangone, G., Tesson, C., Bertrand, H., Benmahdjoub, M., Kesraoui, S. *et al.* (2021). Clinical Variability of SYNJ1-Associated Early-Onset Parkinsonism. *Front*

- Neurol.* 12: 648457. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.648457>.
- Leverenz, J. B., Stennis Watson, G., Shofer, J., Zabetian, C. P., Zhang, J., & Montine, T. J. (2011). Cerebrospinal fluid biomarkers and cognitive performance in non-demented patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 17 (1): 61-64. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2010.10.003>.
- Litvan, I., Goldman, J. G., Tröster, A. I., Schmand, B. A., Weintraub, D., Petersen, R. C. *et al.* (2012). Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines. *Mov Disord.* 27 (3): 349-356. <https://doi.org/10.1002/mds.24893>.
- Lorenzo-Betancor, O., Ogaki, K., Soto-Ortolaza, A. I., Labbe, C., Walton, R. L., Strongosky, A. J. *et al.* (2015). DNAJC13 p.Asn855Ser mutation screening in Parkinson's disease and pathologically confirmed Lewy body disease patients. *Eur J Neurol.* 22 (9): 1323-1325. <https://doi.org/10.1111/ene.12770>.
- Lotankar, S., Prabhavalkar, K. S., & Bhatt, L. K. (2017). Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. *Neurosci Bull.* 33 (5): 585-597. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0183-5>.
- Lücking, C. B., Dürr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T. *et al.* (2000). Association between Early-Onset Parkinson's Disease and Mutations in the Parkin Gene. *N Engl J Med.* 342 (21): 1560-1567. <https://doi.org/10.1056/nejm200005253422103>.
- Lukiw, W. J., & Bazan, N. G. (2008). Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J Nutr.* 138 (12): 2510-2514. <https://doi.org/10.3945/jn.108.096016>.
- Lunati, A., Lesage, S., & Brice, A. (2018). The genetic landscape of Parkinson's disease. *Rev Neurol.* 174 (9): 628-643. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.08.004>.
- Mahlknecht, P., Seppi, K., & Poewe, W. (2015). The concept of prodromal Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 5 (4): 681-697. <https://doi.org/10.3233/JPD-150685>.
- Maiti, P., Manna, J., Dunbar, G. L., Maiti, P., & Dunbar, G. L. (2017). Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Transl Neurodegener.* 6: 28. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0099-z>.
- Mandel, S. A., Morelli, M., Halperin, I., & Korczyn, A. D. (2010). Biomarkers for

- prediction and targeted prevention of Alzheimer's and Parkinson's diseases: Evaluation of drug clinical efficacy. *EPMA J.* 1 (2): 273-292.
<https://doi.org/10.1007/s13167-010-0036-z>.
- Margis, R., Margis, R., & Rieder, C. R. M. (2011). Identification of blood microRNAs associated to Parkinson's disease. *J Biotechnol.* 152 (3): 96-101.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.023>.
- Martinez-Horta, S., & Kulisevsky, J. (2019). Mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 126 (7): 897-904. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02003-1>.
- Mata, I. F., Lockhart, P. J., & Farrer, M. J. (2004). Parkin genetics: One model for Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 13 (1): R127-R133.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddh089>.
- Meeus, B., Nuytemans, K., Crosiers, D., Engelborghs, S., Pals, P., Pickut, B. *et al.* (2011). GIGYF2 has no major role in Parkinson genetic etiology in a Belgian population. *Neurobiol Aging.* 32 (2): 308-312.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.02.016>.
- Miller, D. B., & O'Callaghan, J. P. (2015). Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. *Metabolism.* 64 (3): S40-S46. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.030>.
- Minakaki, G., Krainc, D., & Burbulla, L. F. (2020). The Convergence of Alpha-Synuclein, Mitochondrial, and Lysosomal Pathways in Vulnerability of Midbrain Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease. *Front Cell Dev Biol.* 8: 580634.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.580634>.
- Miyake, Y., Tanaka, K., Fukushima, W., Kiyohara, C., Sasaki, S., Tsuboi, Y. *et al.* (2012). UCHL1 S18Y variant is a risk factor for Parkinson's disease in Japan. *BMC Neurology.* 12: 62. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-12-62>.
- Moreau, K., Fleming, A., Imarisio, S., Lopez Ramirez, A., Mercer, J. L., Jimenez-Sanchez, M. *et al.* (2014). PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. *Nat Commun.* 5: 4998. <https://doi.org/10.1038/ncomms5998>.
- Mouchard, A., Boutonnet, M. C., Mazzocco, C., Biendon, N., & Macrez, N. (2019). ApoE-fragment/A β heteromers in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Scientific Reports.* 9: 3989. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40438-4>.

- Nalls, M. A., Blauwendraat, C., Vallerga, C. L., Heilbron, K., Bandres-Ciga, S., Chang, D. *et al.* (2019). Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol.* 18 (12): 1091-1102. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30320-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30320-5).
- Nandipati, S., & Litvan, I. (2016). Environmental exposures and Parkinson's disease. *Int J Environ Res Public Health.* 13 (9): 881. <https://doi.org/10.3390/ijerph13090881>.
- Nichols, W. C., Kissell, D. K., Pankratz, N., Pauciulo, M. W., Elsaesser, V. E., Clark, K. A. *et al.* (2009). Variation in GIGYF2 is not associated with Parkinson disease. *Neurology.* 72 (22): 1886-1892. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000346517.98982.1b>.
- O'Regan, G., Desouza, R. M., Balestrino, R., & Schapira, A. H. (2017). Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease. *J Parkinsons Dis.* 7 (3): 411-422. <https://doi.org/10.3233/JPD-171092>.
- Oligati, S., Quadri, M., & Bonifati, V. (2016). Genetics of movement disorders in the next-generation sequencing era. *Mov Disord.* 31 (4): 458-470. <https://doi.org/10.1002/mds.26521>.
- Oligati, S., Quadri, M., Fang, M., Rood, J. P. M. A., Saute, J. A., Chien, H. F. *et al.* (2016). DNAJC6 Mutations Associated with Early-Onset Parkinson's Disease. *Ann Neurol.* 79 (2): 244-256. <https://doi.org/10.1002/ana.24553>.
- Pagano, G., Yousaf, T., & Politis, M. (2017). PET Molecular Imaging Research of Levodopa-Induced Dyskinesias in Parkinson's Disease. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 17 (11): 90. <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0794-2>.
- Pajares, M., I Rojo, A., Manda, G., Boscá, L., & Cuadrado, A. (2020). Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells.* 9 (7): 1687. <https://doi.org/10.3390/cells9071687>.
- Pang, S. Y. Y., Ho, P. W. L., Liu, H. F., Leung, C. T., Li, L., Chang, E. E. S. *et al.* (2019). The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 8: 23. <https://doi.org/10.1186/s40035-019-0165-9>.
- Parikh, I., Fardo, D. W., & Estus, S. (2014). Genetics of PICALM expression and Alzheimer's disease. *PLoS One.* 9 (3): e91242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091242>.

- Parker, W. D., Parks, J. K., & Swerdlow, R. H. (2008). Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Res.* 1189: 215-218.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.10.061>.
- Paviour, D. C., Surtees, R. A. H., & Lees, A. J. (2004). Diagnostics considerations in juvenile parkinsonism. *Mov Disord.* 19 (2): 123-135.
<https://doi.org/10.1002/mds.10644>.
- Pawlik, P., & Błochowiak, K. (2021). The role of salivary biomarkers in the early diagnosis of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Diagnostics.* 11 (2): 371.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics11020371>.
- Pawliński, Ł., Polus, A., Tobór, E., Sordyl, M., Kopka, M., Solnica, B. *et al.* (2021). MiRNA expression in patients with Gaucher disease treated with enzyme replacement therapy. *Life.* 11 (1): 2. <https://doi.org/10.3390/life11010002>.
- Postuma, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W. *et al.* (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 30 (12): 1591–1601. <https://doi.org/10.1002/mds.26424>.
- Procopio, R., Gagliardi, M., Nicoletti, G., Morelli, M., Annesi, G., & Quattrone, A. (2019). Analysis of the TMEM230 gene in familial Parkinson's disease from south Italy. In *Journal of the Neurological Sciences.* 404: 16-18.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.07.017>
- Quadri, M., Fang, M., Picillo, M., Olgiati, S., Breedveld, G. J., Graafland, J. *et al.* (2013). Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset parkinsonism. *Hum Mutat.* 34 (9): 1208-1215. <https://doi.org/10.1002/humu.22373>.
- Quadri, M., Mandemakers, W., Grochowska, M. M., Masius, R., Geut, H., Fabrizio, E. *et al.* (2018). LRP10 genetic variants in familial Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol.* 17 (7): 597-608. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30179-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30179-0).
- Ragland, M., Hutter, C., Zabetian, C., & Edwards, K. (2009). Association between the ubiquitin carboxyl-terminal esterase 11 gene (UCHL1) S18Y variant and parkinson's disease: A huge review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 170 (11): 1344-1357.
<https://doi.org/10.1093/aje/kwp288>.
- Rath, S. N., & Patri, M. (2020). Understanding miRNA based gene regulation in

- Parkinson's disease: An in silico approach. *International Journal Bioautomation*. 24 (1): 15-28. <https://doi.org/10.7546/ijba.2020.24.1.000555>.
- Raza, C., Anjum, R., & Shakeel, N. ul A. (2019). Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sci*. 226: 77-90. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.057>.
- Ren, R., Sun, Y., Zhao, X., & Pu, X. (2015). Recent advances in biomarkers for Parkinson's disease focusing on biochemicals, omics and neuroimaging. *Clin Chem Lab Med*. 53 (10): 1495-1506. <https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0783>.
- Rodríguez-Blázquez, C., Forjaz, M. J., Lizán, L., Paz, S., & Martínez-Martín, P. (2015). Estimating the direct and indirect costs associated with Parkinson's disease. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 15 (6): 889-911. <https://doi.org/10.1586/14737167.2015.1103184>.
- Rodríguez-Oroz, M. C., Lage, P. M., Sanchez-Mut, J., Lamet, I., Pagonabarraga, J., Toledo, J. B. *et al.* (2009). Homocysteine and cognitive impairment in Parkinson's disease: A biochemical, neuroimaging, and genetic study. *Mov Disord*. 24 (10): 1437-1444. <https://doi.org/10.1002/mds.22522>.
- Rozycka, A., Jagodzinski, P., Kozubski, W., Lianeri, M., & Dorszewska, J. (2014). Homocysteine Level and Mechanisms of Injury in Parkinson's Disease as Related to MTHFR, MTR, and MTHFD1 Genes Polymorphisms and LDopa Treatment. *Curr Genomics*. 14 (8): 534-542. <https://doi.org/10.2174/1389202914666131210210559>.
- Samaranch, L., Lorenzo, E., Pastor, M. A., Riverol, M., Luquin, M. R., Rodríguez-Oroz, M. C. *et al.* (2010). Analysis of the GIGYF2 gene in familial and sporadic Parkinson disease in the Spanish population. *Eur J Neurol*. 17 (2): 321-325. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2009.02812.x>.
- Sanders, L. H., & Greenamyren, J. T. (2013). Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radic Biol Med*. 62: 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.003>.
- Santos-Rebouças, C. B., Gonçalves, A. P., dos Santos, J. M., Abdala, B. B., Motta, L. B., Laks, J. *et al.* (2017). rs3851179 Polymorphism at 5' to the PICALM Gene is Associated with Alzheimer and Parkinson Diseases in Brazilian Population. *NeuroMolecular Med*. 19 (2-3): 293-299. <https://doi.org/10.1007/s12017-017-8444-z>.

- Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M. *et al.* (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet.* 41 (12): 1303-1307.
<https://doi.org/10.1038/ng.485>.
- Schapira, A. H.V., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1990). Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease. *J Neurochem.* 54 (3): 823-827. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x>.
- Schapira, Anthony H.V., McDermott, M. P., Barone, P., Comella, C. L., Albrecht, S. *et al.* (2013). Pramipexole in patients with early Parkinson's disease (PROUD): A randomised delayed-start trial. *Lancet Neurol.* 12 (8): 747-755.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70117-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70117-0).
- Schneider, S. A., Boettner, M., Alexoudi, A., Zorenkov, D., Deuschl, G., & Wedel, T. (2016). Can we use peripheral tissue biopsies to diagnose Parkinson's disease? A review of the literature. *Eur J Neurol.* 23 (2): 247-261.
<https://doi.org/10.1111/ene.12753>.
- Schneider, Susanne A., Hizli, B., & Alcalay, R. N. (2020). Emerging Targeted Therapeutics for Genetic Subtypes of Parkinsonism. *Neurotherapeutics.* 17 (4): 1378-1392.
<https://doi.org/10.1007/s13311-020-00920-8>.
- Shen, L., & Ji, H. F. (2013). Low uric acid levels in patients with Parkinson's disease: Evidence from meta-analysis. *BMJ Open.* 3 (11): e003620.
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-003620>.
- Shen, T., Hu, J., Jiang, Y., Zhao, S., Lin, C., Yin, X. *et al.* (2019). Early-onset parkinson's disease caused by pla2g6 compound heterozygous mutation, a case report and literature review. *Front Neurol.* 10: 915. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00915>.
- Shi, C. H., Mao, C. Y., Zhang, S. Y., Yang, J., Song, B., Wu, P. *et al.* (2015). CHCHD2 gene mutations in familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 38: 217.e9-217.e13. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.040>.
- Shojaee, S., Sina, F., Banihosseini, S. S., Kazemi, M. H., Kalhor, R., Shahidi, G. A. *et al.* (2008). Genome-wide Linkage Analysis of a Parkinsonian-Pyramidal Syndrome Pedigree by 500 K SNP Arrays. *Am J Hum Genet.* 82 (6): 1375-1384.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.05.005>.

- Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Bras, J. M., Sharma, M., Gibbs, J. R., Berg, D. *et al.* (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet.* 41 (12): 1308-1312. <https://doi.org/10.1038/ng.487>.
- Singleton, A. B., Farrer, M. J., & Bonifati, V. (2013). The genetics of Parkinson's disease: Progress and therapeutic implications. *Mov Disord.* 28 (1): 14-23. <https://doi.org/10.1002/mds.25249>.
- Spiegel, J. (2010). Diagnostic and pathophysiological impact of myocardial MIBG scintigraphy in parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* 2010: 295346. <https://doi.org/10.4061/2010/295346>.
- Strauss, K. M., Martins, L. M., Plun-Favreau, H., Marx, F. P., Kautzmann, S., Berg, D. *et al.* (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 14 (15): 2099-2111. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi215>.
- Sudhaman, S., Muthane, U. B., Behari, M., Govindappa, S. T., Juyal, R. C., & Thelma, B. K. (2016). Evidence of mutations in RIC3 acetylcholine receptor chaperone as a novel cause of autosomal-dominant Parkinson's disease with non-motor phenotypes. *J Med Genet.* 53 (8): 559-566. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103616>.
- Tejera-Parrado, C., Jesús, S., López-Ruiz, A., Buiza-Rueda, D., Bonilla-Toribio, M., Bernal-Bernal, I. *et al.* (2018). TMEM230 in Parkinson's disease in a southern Spanish population. *PLOS One.* 13 (5): e0197271. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197271>.
- Tesson, C., Brefel-Courbon, C., Corvol, J. C., Lesage, S., Brice, A., Agid, Y. *et al.* (2018). LRP10 in α -synucleinopathies. *Lancet Neurol.* 17 (12): 1034. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30400-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30400-9).
- Tolosa, E., Vila, M., Klein, C., & Rascol, O. (2020). LRRK2 in Parkinson disease: challenges of clinical trials. *Nat Rev Neurol.* 16 (2): 97-107. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0301-2>.
- Tran, J., Anastacio, H., & Bardy, C. (2020). Genetic predispositions of Parkinson's disease revealed in patient-derived brain cells. *npj Parkinsons Dis.* 6: 8. <https://doi.org/10.1038/s41531-020-0110-8>
- Unal Gulsuner, H., Gulsuner, S., Mercan, F. N., Onat, O. E., Walsh, T., Shahin, H., Lee, M. K., Dogu, O., Kansu, T., Topaloglu, H., Elibol, B., Akbostanci, C., King, M. C.,

- Ozcelik, T., & Tekinay, A. B. (2014). Mitochondrial serine protease HTRA2 p.G399S in a kindred with essential tremor and Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111 (51): 18285-18290. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419581111>.
- Vergouw, L. J. M., Geut, H., Breedveld, G., Kuipers, D. J. S., Quadri, M., Rozemuller, A. J. M. *et al.* (2020). Clinical and Pathological Phenotypes of LRP10 Variant Carriers with Dementia. *J Alzheimers Dis*. 76 (3): 1161-1170. <https://doi.org/10.3233/JAD-200318>.
- Vergouw, L. J. M., Ruitenber, A., Wong, T. H., Melhem, S., Breedveld, G. J., Criscuolo, C. *et al.* (2019). LRP10 variants in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies in the South-West of the Netherlands. *Parkinsonism Relat Disord*. 65: 243-247. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.05.037>.
- Vila, M. (2019). Neuromelanin, aging, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 34 (10): 1440-1451. <https://doi.org/10.1002/mds.27776>.
- Vilariño-Güell, C., Rajput, A., Milnerwood, A. J., Shah, B., Szu-Tu, C., Trinh, J. *et al.* (2014). DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet*. 23 (7): 1794-1801. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt570>.
- Vilariño-Güell, C., Ross, O. A., Soto, A. I., Farrer, M. J., Haugarvoll, K., Aasly, J. O. *et al.* (2009). Reported mutations in GIGYF2 are not a common cause of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 24 (4): 619-620. <https://doi.org/10.1002/mds.22451>.
- Wang, H. Z., Wang, W. H., Shi, H. C., Han, L. J., & Pan, P. L. (2020). Cerebrospinal fluid and blood levels of neurofilament light chain in Parkinson disease: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 99 (31): e21458. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000021458>.
- Wang, Xiaobo, Whelan, E., Liu, Z., Liu, C. F., & Smith, W. W. (2021). Controversy of TMEM230 Associated with Parkinson's Disease. *Neuroscience*. 453: 280-286. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.11.004>.
- Wang, Xinnan, Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y. L., Selkoe, D. *et al.* (2011). PINK1 and Parkin target miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell*. 147 (4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.018>.
- Wang, Y. Q., Tang, B. S., Yang, Y., Cui, Y. T., Kang, J. F., Liu, Z. H. *et al.* (2016). Relationship between Alzheimer's disease GWAS-linked top hits and risk of

- Parkinson's disease with or without cognitive decline: A Chinese population-based study. *Neurobiol Aging*. 39: 217.e9-217.e11.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.024>.
- Williams, E. T., Chen, X., & Moore, D. J. (2017). VPS35, the retromer complex and Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 7 (2): 219-233. <https://doi.org/10.3233/JPD-161020>.
- Yan, W., Tang, B., Zhou, X., Lei, L., Li, K., Sun, Q. *et al.* (2017). TMEM230 mutation analysis in Parkinson's disease in a Chinese population. *Neurobiol Aging*. 49: 219.e1-219.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.10.007>.
- Zhang, J. F., Wang, X. X., Feng, Y., Fekete, R., Jankovic, J., & Wu, Y. C. (2021). Impulse Control Disorders in Parkinson's Disease: Epidemiology, Pathogenesis and Therapeutic Strategies. *Front Psychiatry*. 12: 635494.
<https://doi.org/10.3389/fpsyt.2021.635494>.
- Zhao, Z., Sagare, A. P., Ma, Q., Halliday, M. R., Kong, P., Kisler, K. *et al.* (2015). Central role for PICALM in amyloid- β blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nat Neurosci*. 18 (7): 978-987. <https://doi.org/10.1038/nn.4025>.
- Zimprich, A., Schulte, C., Reinthaler, E., Haubenberger, D., Balzar, J., Lichtner, P. *et al.* (2009). PARK11 gene (GIGYF2) variants Asn56Ser and Asn457Thr are not pathogenic for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 15 (7): 532-534.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2009.01.005>.