



**FACULTAD DE MEDICINA**  
**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

# **Biomarcadores séricos y riesgo vascular en la enfermedad de Parkinson esporádica y familiar**

**DANIEL MACÍAS GARCÍA**

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor con mención internacional por la Universidad de Sevilla



D. Pablo Mir Rivera, Profesor Titular vinculado del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que la memoria del trabajo titulada “Biomarcadores séricos y riesgo vascular en la enfermedad de Parkinson esporádica y familiar” elaborada por Daniel Macías García, licenciado en Medicina, ha sido realizada bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad de Sevilla.

Para que así conste, firma la presente en Sevilla 15 de noviembre de 2021.

Fdo.: D. Pablo Mir Rivera



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, querría agradecer a todos mis compañeros del laboratorio 104 del IBiS su amistad y ayuda durante estos años, gracias a todos vosotros este camino ha sido más liviano, y sobretodo más alegre. También agradecer a los pacientes que participaron en este trabajo por su entrega.

Querría agradecer especialmente a mi director de tesis, Pablo Mir. Por su exigencia y su actitud siempre positiva y alentadora, recordándome que el esfuerzo merece la pena. Gracias por siempre mantener esa actitud que encuentro tan inspiradora mucho más allá de un laboratorio. Hace ya algunos años, pasando planta, me preguntaste si me interesaba la investigación... y aquí estamos. A Marta, Loli y Tere, por haberme acogido y ayudado siempre con mis dudas de genética y de la vida. Gracias por hacerme sentir menos *extranjero* en la poyata. A Piluca por enseñarme poco a poco los secretos de la genética y por esa alegría matutina contagiosa. A Miguel y Mario, con quienes he compartido largas horas de discusión de análisis, diseños y también series. A Lorena y Rocío por vuestra ayuda infinita, vuestras charlas y por ese sentido del humor; ha sido una suerte teneros al lado. A Paco, Juanfran, Pablo y Elena; gracias por acogerme entre cables sin reparos. Gracias también a todo el personal del IBiS, por hacer tan acogedor y humano un Instituto de investigación.

A mis compañeros y amigos del servicio de neurología, gracias a los cuales ir al hospital es casi más un placer que un trabajo, sobretodo si acabamos con una comida y una cerveza. Especial mención a las neurólogas: Fátima, Silvia y Astrid; gracias por enseñarme tanto, hacerme sentir enseguida uno más, y por transmitirme esa ilusión por ir a la consulta incluso un lunes por la tarde. También al nuevo fichaje Laura, tan llena de ganas e ideas tanto de neurología como de días del libro; es un placer poder ayudarte. A mi eterna tutora Irene, porque con sus risas y alegría consigue suplir nuestros ocasionales despistes. A Carmen, Jose Carlos, Aixa, Carla, Lucía, Juan Antonio, y muchos más; porque con vosotros está mi recuerdo de la facultad y residencia, tan feliz. A mi querida Blanca y a Carlos, quien siempre le hace reír. Con ella empecé mis andanzas en la neurología. ¡Qué suerte tuve de que nos cruzáramos en el camino! A todas las personas que me he ido encontrado y me acogieron en Cincinnati y, ahora, en Londres; todas me han enseñado algo provechoso.

A mis amigos por su paciencia y apoyo. En especial a Qujano y Joaquín, porque me soportan desde los 6 y hablar con ellos es como estar en casa, vivan donde vivan. A Paco, gran amigo, goliardo y co-fundador de *The Casual Penguin*. A Gabi, el *otro padre* de este trabajo, por la importancia del *estar*. Podría agradecerle infinidad de aspectos técnicos como que me enseñara qué es un *paper* o la multicolinealidad; pero quiero agradecerle que cruzara conmigo la Estepa y se quedara.

A mi hermana Laura, por siempre sacar un hueco para su hermano, ya no tan pequeño. Por guiarme, escucharme y siempre tener los mejores consejos. Gracias, es una suerte inmensa tenerte. A Jorge que hace a mi hermana tan feliz, todavía recuerdo cuando cruzamos el charco juntos y sonrío. A las pequeñas Sofía e Inés; uno piensa que tiene una familia redonda y aparecen ellas para enseñarte que puede ser mucho mejor aún. A Marina, gracias de todo corazón. Porque este trabajo llega gracias a tu apoyo. Gracias por recordarme que hay que disfrutar el camino y por hacerme creer en mi mismo cuando yo no lo veía posible. Eres fantástica.

Finalmente, querría agradecerse a mis padres, grandes artífices de que hoy esté aquí. Me han enseñado siempre a ser honesto en lo que hago y digo, responsable y persistente; pero sobretodo me han transmitido, quizás sin saberlo, el gusto por esforzarse al máximo en aquello que a uno le apasiona. Muchas gracias.

¡Muchas gracias a todos!

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS .....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	5
1.1 Epidemiología, características clínicas y hallazgos anatómo-patológicos de la enfermedad de Parkinson.....	5
1.2 Etiopatogenia de la enfermedad de Parkinson .....	10
1.2.1 Disfunción mitocondrial .....	10
1.2.2 Estrés oxidativo .....	11
1.2.3 Neuroinflamación .....	14
1.2.4 Alteración del sistema lisosomal y de autofagia .....	15
1.2.5 Alteración del metabolismo lipídico.....	18
1.2.6 Factores genéticos.....	21
1.2.7 Factores ambientales .....	29
1.3 Expresión de Heme-oxigenasa, estrés oxidativo y metabolismo de la bilirrubina.....	30
1.4 Riesgo vascular en la enfermedad de Parkinson .....	33
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	38
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	38
OBJETIVOS.....	39
3. RESUMEN DE MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
4. RESUMEN DE RESULTADOS.....	44
Increased bilirubin levels in Parkinson's disease .....	44
Serum lipid profile among sporadic and familial forms of Parkinson's disease .....	45
Increased stroke risk in Parkinson's disease patients with <i>LRRK2</i> mutations.....	46
5. PUBLICACIONES.....	47
<i>Increased bilirubin levels in Parkinson's disease</i> .....	48

<i>Serum lipid profile among sporadic and familial forms of Parkinson's disease</i> .....	56
<i>Increased stroke risk in Parkinson's disease patients with LRRK2 mutations</i> .....	71
6. DISCUSIÓN .....	95
Estudio del papel de la bilirrubina sérica en la enfermedad de Parkinson .....	96
Estudio del perfil lipídico sérico en formas esporádicas y familiares de la enfermedad de Parkinson .....	99
Estudio del papel de las características genéticas de los pacientes con enfermedad de Parkinson en su riesgo vascular .....	103
7. CONCLUSIONES .....	107
8. CONCLUSIONS .....	108
9. BIBLIOGRAFÍA .....	109

## ABREVIATURAS

EP: Enfermedad de Parkinson

Hz: Hercios

SN: Sustancia Negra

SNpc: Sustancia Negra *Pars Compacta*

CL: Cuerpos de Lewy

PL: Patología Lewy

SNC: Sistema Nervioso Central

GWAS: Genome-wide association study

ROS: Reactive Oxygen Species

ONS: Óxido nítrico sintasa

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotido fosfato forma reducida

AND: ácido desoxiribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosil trifosfato

GTP: guanosil trifosfato

RE: retículo endoplasmático

Ca<sup>2+</sup>: calcio citoplasmático

*PRKN*: gen codificante de la proteína parkina

*PINK1*: gen codificante de la proteína PTEN-induced kinase 1

*LRRK2*: gen codificante para la proteína Leucine-rich repeat kinase 2

*GBA*: gen que codifica para la proteína glucocerebrosidasa

*SNCA*: gen codificante de la proteína  $\alpha$ -sinucleína

*VPS35*: gen codificante para la proteína Vacuolar Protein Sorting 35

*DJ-1*: gen que codifica a la proteína DJ-1

HO: Heme-oxigenasa

*HMOX*: gen que codifica para la proteína heme-oxigenasa

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

LCR: líquido cefalo-raquídeo

LAMP-2A: receptores de las proteínas transmembrana asociadas a lisosomas 2A

GCasa: enzima glucocerebrosidasa

RE: retículo endoplasmático

LIMP-2: lysosomal integral membrane protein type-2

LDL: Low-density lipoprotein

HDL: High-density lipoprotein

Wnt: Wingless/Int

BHE: Barrera hemato-encefálica

LRP6: LDL receptor-related protein 6

MAO: mono-amino oxidasa

HY: Hoehn & Yahr

HRM: High-resolution melting

EP-*GBA*: enfermedad de Parkinson asociada a mutaciones en *GBA*

EP-*LRRK2*: enfermedad de Parkinson asociada a mutaciones en *LRRK2*

EP-*PRKN*: enfermedad de Parkinson asociada a mutaciones en *Parkina*

ANCOVA: Análisis de la covarianza

TOAST: Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment

OR: odds ratio

IC: Intervalos de confianza

DELD: dosis equivalente de levodopa diaria

GGT: gamma-glutamil transferasa

GPT: glutámico pirúvico transaminasa



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Epidemiología, características clínicas y hallazgos anatomo-patológicos de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente a nivel mundial, tras la enfermedad de Alzheimer. Con una edad media de aparición en la sexta década de vida, la EP está directamente relacionada con el envejecimiento y tiene mayor presencia en la población de edad avanzada. Sin embargo, también son conocidas formas de enfermedad de debut temprano con una edad de aparición de síntomas inferior a los 40 años (Phillipson y cols, 2014) (Jankovic y cols, 2020).

Actualmente, la incidencia y la prevalencia de la EP a nivel mundial son elevadas. En España, con una prevalencia estimada de 150-200 casos por cada 100000 habitantes, la EP puede llegar a tener una prevalencia del 1,5% en la población general mayor de 65 años (Benito-León y cols, 2004). Aunque el principal factor de riesgo es la edad avanzada, la incidencia de EP de inicio temprano es de un 1,5 por 100000 habitantes/años. Por ello, esta frecuente patología neurodegenerativa y su tratamiento crónico supone un problema socio-económico de primer orden para los sistemas sanitarios a nivel mundial. Se estima que tanto la incidencia como la prevalencia de la EP pueden llegar a duplicarse en las siguientes décadas (Dorsey 2018). Este crecimiento exponencial en el último medio siglo no se encuentra en relación únicamente con el envejecimiento de la población (Dorsey 2018). Otros factores fisiopatológicos aún desconocidos de la enfermedad se creen que puedan jugar un papel importante en este crecimiento y, por ello, diversos expertos han manifestado la importancia de identificar los diversos mecanismos fisiopatológicos implicados en la EP para alcanzar una medicina personalizada (Dorsey 2018; Espay y cols, 2019).

Clásicamente, la EP se describió como un síndrome neurológico que cursa con diversos síntomas (temblor en extremidades, dificultad de movimiento y para la marcha, entre otros). Los primeros criterios diagnósticos de la EP fueron establecidos por la *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank*, y requerían la presencia de temblor de reposo y de baja frecuencia (4-6 Hz) en extremidades, bradicinesia, rigidez y alteración de reflejos posturales (Hughes y cols, 1992). Se definió el término EP idiopática para este síndrome clínico con correlación anatomo-patológica, siendo la causa más frecuente de parkinsonismo degenerativo en la práctica clínica. Sin embargo, con la aparición de las formas genéticas de la enfermedad, algunas de ellas clínicamente indistinguibles de las formas idiopáticas, se ha planteado la redefinición de las distintas formas de EP. Además, actualmente se ha demostrado que la enfermedad cursa con una amplia sintomatología tanto motora como no motora. Por ello, actualmente los criterios diagnósticos clínicos aplicados son los definidos por la *Movement Disorders Society* en 2015 (Postuma y cols, 2015).

A pesar de conocerse y definirse clínicamente la enfermedad desde el siglo XIX, no fue hasta principios del siglo XX cuando Konstantin Tretiakoff confirmó e identificó en diversos estudios anatómo-patológicos la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) como característica histopatológica de la EP (Lees y cols, 2008). Posteriormente, gracias al trabajo de Arvid Carlsson y Oleh Hornykiewicz, se evidenció la relación entre el déficit dopaminérgico producido por esta neurodegeneración y los síntomas de la EP tanto en modelo animal como en humanos; lo cual dio pie al inicio del uso de la terapia con levodopa (profármaco precursor de catecolaminas como la dopamina) para los síntomas parkinsonianos (Fahn S, 2018). Finalmente, fue en los trabajos de George Cotzias donde se demostró la eficacia de la levodopa, usada en altas dosis por vía oral, para revertir la sintomatología motora en la EP (Obeso y cols, 2017)

Las manifestaciones clínicas predominantes son los síntomas motores anteriormente descritos (temblor de reposo, bradicinesia, rigidez y alteración de la marcha); siendo necesarias para el diagnóstico clínico actual la presencia de bradicinesia y al menos alguna de las otras tres manifestaciones clínicas (Postuma y cols, 2015). Sin embargo, se estima que cuando aparecen estas manifestaciones motoras ya se ha producido una pérdida de al menos el 50% de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Fearnley y cols, 1990; Fearnley y cols, 1991). Trabajos más recientes sugieren que el momento de inicio de la sintomatología motora podría estar en relación con el déficit dopaminérgico en las proyecciones estriatales de estas neuronas de la SNpc y no con el porcentaje de degeneración de las mismas (Simon DK, 2020). La sintomatología motora de la EP tiene característicamente una respuesta excelente a la terapia dopaminérgica oral, sin embargo, con la evolución de la enfermedad y la progresión de la neurodegeneración aparecen las denominadas complicaciones dopaminérgicas (Poewe y cols, 2017). Éstas se caracterizan por la pérdida transitoria del efecto terapéutico del tratamiento dopaminérgico (fluctuaciones motoras) así como por períodos con presencia de movimientos involuntarios en el paciente (discinesias inducidas por levodopa). Estas complicaciones motoras también se pueden ver acompañadas por las denominadas fluctuaciones no motoras, períodos en los que el paciente puede experimentar sintomatología no motora de diverso tipo (dolor, ansiedad, fatiga, entre otros), asociada o no a fluctuaciones de la respuesta motora al tratamiento. Estas complicaciones no motoras pueden ser de tres tipos: sensitivas, cognitivas y disautonómicas (Chaudhuri y cols, 2018)

Entre el grupo de síntomas no motores de la enfermedad destacan la hiposmia, las alteraciones del sueño como la hipersomnolencia diurna o el trastorno de conducta del sueño REM, la ansiedad, la depresión, el deterioro cognitivo, la disautonomía (incontinencia o urgencia miccional, estreñimiento, disfunción eréctil), entre otros. Algunos de estos síntomas no motores pueden aparecer de manera precoz o incluso preceder en años al inicio de la sintomatología motora clásica, como puede ser el caso de la depresión, el estreñimiento, la hiposmia o el trastorno del sueño REM (Figura 1). Por ello, desde hace décadas se ha prestado gran importancia al diagnóstico adecuado de esta sintomatología no motora, permitiendo mejorar la atención de los pacientes, la

monitorización de la progresión de su enfermedad y nuestra comprensión de la evolución de la misma (Baig y cols, 2015).

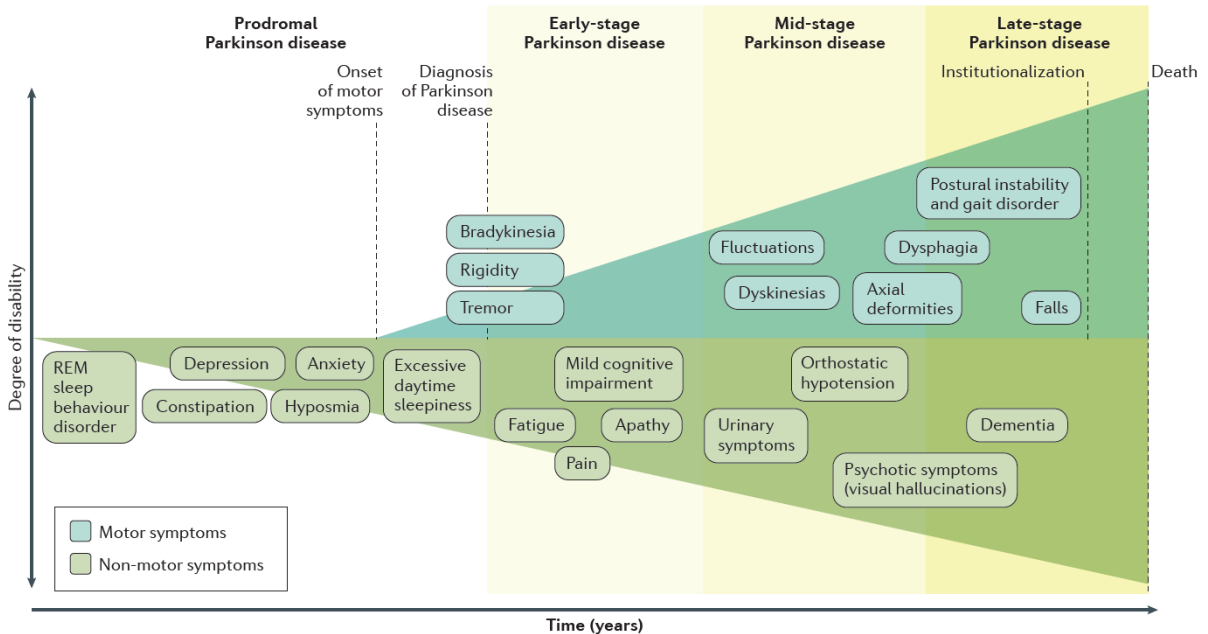


Figura 1. Curso clínico de la enfermedad de Parkinson desde la fase prodrómica a la etapa clínica motora, incluyendo las complicaciones dopaminérgicas. (tomada de Poewe y cols, 2017)

Desde el punto de vista anatómo-patológico, la enfermedad se caracteriza por la pérdida de neuronas en la SNpc, perdiendo ésta su pigmentación característica la cual es debida al depósito de neuromelanina en las neuronas dopaminérgicas. La SN es un núcleo mesencefálico anatómicamente heterogéneo con distintas áreas (*pars reticulata* y *pars compacta*) y diversas proyecciones estriatales, encontrándose en la EP una degeneración selectiva de subregiones específicas de la SN (Fearnley y cols, 1991). Además, la EP se caracteriza por la aparición de inclusiones intracitoplasmáticas denominadas cuerpos de Lewy (CL), compuestas por agregados de distintas proteínas insolubles, siendo la más frecuente y conocida la  $\alpha$ -sinucleína. El depósito anómalo de esta proteína, que de manera fisiológica participa en la regulación del tráfico vesicular en el terminal sináptico, se considera un hallazgo histopatológico característico de la EP. Por tanto, la EP se ha incluido dentro del grupo de patologías denominadas sinucleinopatías (enfermedades por depósito de  $\alpha$ -sinucleína). El conjunto de la denominada patología Lewy (PL) se compone, además de por los CL, de inclusiones denominadas neuritas de Lewy y de similares inclusiones intracitoplasmáticas también evidenciadas en astrocitos, figura 2 (McMcan y cols, 2016).

Existen algunas formas de la EP que muestran una ausencia de depósito patológico de  $\alpha$ -sinucleína en estudios histopatológicos y, a su vez, se ha descrito la existencia de PL

en autopsias de sujetos sin presencia de síntomas parkinsonianos (Forno LS, 1969; Hansen, y cols, 1990; Fearnley y cols, 1991; Klos y cols, 2006). Además, la EP se caracteriza por una afectación neuropatológica de otras regiones cerebrales, así como de otras estirpes neuronales no dopaminérgicas (Simon y cols, 2019). Por ello, aunque el proceso degenerativo de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas se encuentre en principal relación con la sintomatología motora, la afectación de otras regiones cerebrales y otras estirpes de neuronas se encuentra en probable relación con los diversos aspectos clínicos de esta patología.

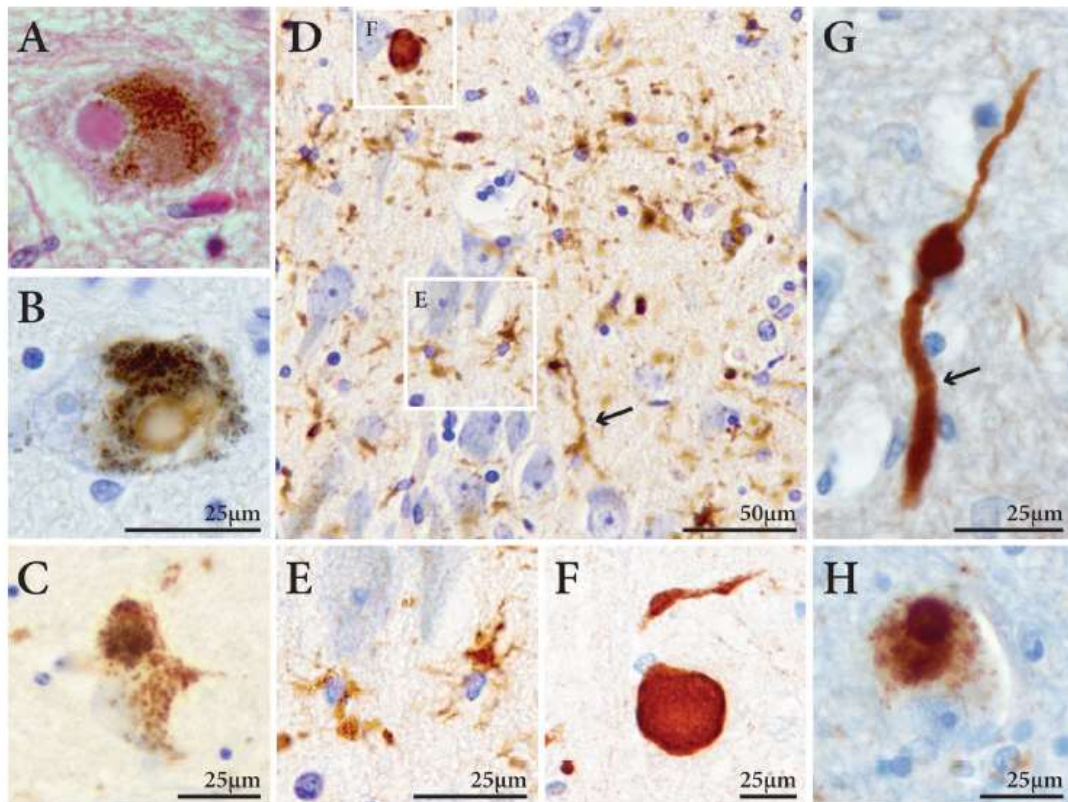


Figura 2 (tomada de McCann y cols, 2016). Patología tipo Lewy con inmunoreactividad a  $\alpha$ -sinucleína en muestras de pacientes con enfermedad de Parkinson. Cuerpo de Lewy con hematoxilina-eosina (A) y con inmunotinción para  $\alpha$ -sinucleína (B). Inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína (C-H). Neuritas de Lewy (flechas D y G). Cuerpo de Lewy en astrocitos (E).

Braak y cols, establecieron en su hipótesis sobre la etiología de la EP una clasificación anatómo-patológica de los distintos estadios de la EP según el grado de deterioro o pérdida neuronal y la localización del mismo (Braak y cols, 2003; Braak y cols, 2006). Los autores plantean la hipótesis de que las inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína se propagan desde el bulbo olfatorio y el núcleo motor dorsal del vago hasta otras neuronas de diferentes regiones cerebrales (en el tronco del encéfalo y posteriormente en la corteza cerebral), transportándose las inclusiones retrógradamente por los axones y siendo propagadas transinápticamente. La evidencia de aparición de los CL en ciertas neuronas trasplantadas en cerebros de pacientes con EP; apoyó la hipótesis de una propagación célula-célula de estas formas patológicas de  $\alpha$ -sinucleína en un modelo de enfermedad

similar a una enfermedad priónica (McCann y cols, 2016). Sin embargo, varios autores cuestionan esta hipótesis como único modelo fisiopatológico de la EP debido a diferentes aspectos como la pobre correlación entre la existencia de PL y la pérdida neuronal en series de autopsias o la escasa correlación de estadios clínicos y estadios de Braak (Surmeier y cols, 2017). Como alternativa a la hipótesis de Braak, se ha sugerido que la neurodegeneración y la PL están provocadas por mecanismos fisiopatológicos intrínsecos de la célula o propios de subconjuntos de neuronas en diversos núcleos del sistema nervioso central (SNC). Ello se basa en la posible vulnerabilidad selectiva de las neuronas deterioradas en la EP, basada en un fenotipo celular característico condicionado por diversos procesos como la edad, factores genéticos y tóxico-ambientales. Además, aunque existe cierto solapamiento entre la progresión y severidad de la PL y la neurodegeneración en estudios post-mortem de pacientes EP con distintos estadios clínicos; la severidad y las regiones selectivas afectadas por el curso de la enfermedad (neurodegeneración) sugieren un patrón de progresión distinto y no únicamente marcado por la progresión de depósito de PL (Figura 3).

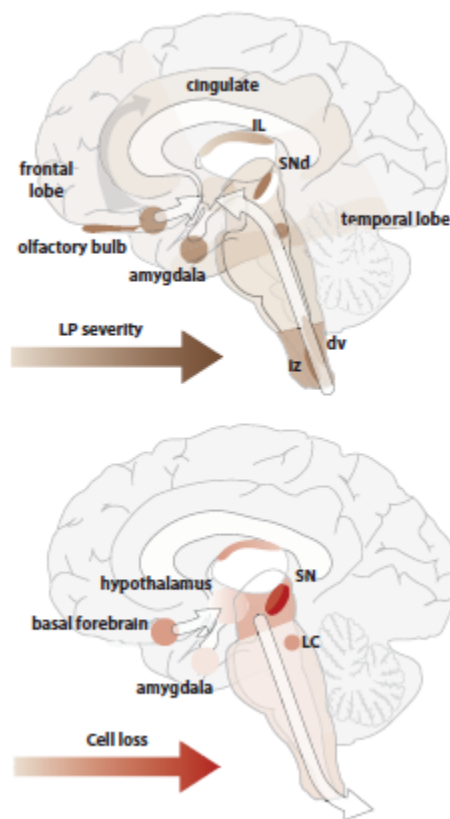


Figura 3 (tomada de Surmeier, y cols, 2017). En el esquema superior se indican las regiones que contienen patología Lewy de manera selectiva, la severidad de esta y el progresivo depósito según estudios post-mortem de pacientes en distintos estadios de enfermedad de Parkinson. En la figura inferior se muestran las regiones selectivas de pérdida de neuronas, su severidad y la progresión de esta neurodegeneración según estudios post-mortem de pacientes en distintos estadios de enfermedad.

## 1.2 Etiopatogenia de la enfermedad de Parkinson

Hoy día, no se conoce con exactitud la etiopatogenia de la EP. La gran diversidad de tipos celulares es una de las principales características que diferencia al sistema nervioso de otros sistemas del organismo; presentando las neuronas una gran variabilidad en tamaño, forma y función. Las neuronas típicamente afectas en la EP (dopaminérgicas) pueden ser particularmente vulnerables (axones prolongados con numerosas proyecciones dentríticas) a diversos factores de riesgo asociados con la neurodegeneración como la edad, variantes patogénicas en diversos genes y factores tóxicos-ambientales. Ello ha generado el concepto de la EP como una patología de etiología multifactorial donde tanto factores biológicos individuales como factores toxico-ambientales promueven a través de diversos mecanismos fisiopatológicos el desarrollo de la PL en neuronas selectivamente vulnerables, conduciendo finalmente a su degeneración. Dentro de estos mecanismos, se han propuesto como principales la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, la neuroinflamación, la alteración del sistema lisosomal y de la autofagia, así como la alteración del metabolismo lipídico, entre otros. (Simon y cols, 2020; Poewe y cols, 2017; Jankovic y cols, 2020).

### 1.2.1 Disfunción mitocondrial

Diversos estudios indican que la disfunción mitocondrial y el consecuente daño oxidativo contribuyen a la cascada de eventos que conducen a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Schapira y cols, 1990; Zhu y cols, 2010; Parker y cols, 2008; Beal MF, 2005). Concretamente, se ha demostrado el déficit del complejo mitocondrial I en análisis post-mortem de cerebros de pacientes con EP idiopática (Schapira y cols, 1989). Muchos de los genes implicados en formas familiares de la EP se creen implicados en el funcionamiento mitocondrial, tanto en los complejos mitocondriales de la cadena respiratoria como en la mitofagia o degradación de mitocondrias malfuncionantes o dañadas en la célula (Malpartida y cols, 2021). Carling y cols, han evidenciado datos de disfunción mitocondrial y lisosomal en un estudio con fibroblastos de pacientes con EP esporádica (Carling y cols, 2020). Adicionalmente, identificaron que un subgrupo de pacientes presentaba una alteración en los niveles de proteínas del complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial. Smith y cols, demostraron la disfunción mitocondrial y aumento del estrés oxidativo en células mononucleares sanguíneas de pacientes con EP de reciente inicio, asociando un aumento de la actividad glucolítica (Smith y cols, 2018). Además, las mitocondrias localizadas en los axones son particularmente vulnerables y su disfunción se cree que podría contribuir a la disfunción de transporte axonal en las proyecciones estriatales, favoreciendo las manifestaciones motoras por el consecuente déficit dopaminérgico (Jankovic y cols, 2020).

En un estudio internacional multicéntrico donde se realizó un estudio de asociación de genoma completo (*Genome-wide association study* o GWAS) se identificaron 14 genes relacionados con el funcionamiento mitocondrial asociados a un mayor riesgo de



desarrollar formas esporádicas de la EP (Billingsley KJ, y cols, 2019). Finalmente, la disfunción mitocondrial y el consecuente aumento de estrés oxidativo se ha asociado a una posible depleción y malfuncionamiento del sistema lisosomal y de autofagia, suponiendo un punto de unión entre diversos mecanismos fisiopatológicos de la EP (Guerra y cols, 2019).

Todo ello sugiere que la alteración en la regulación mitocondrial es un fenómeno común en formas esporádicas y familiares de la EP (Exner y cols, 2012), y se ha hipotetizado que las formas esporádicas de la enfermedad pueden compartir con algunas formas familiares estos mecanismos fisiopatológicos relacionados con la disfunción mitocondrial (Li y cols, 2021). Estos mecanismos podrían servir como diana terapéutica para futuros tratamientos neuroprotectores.

### 1.2.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre los niveles de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species* o ROS) producidas por las células, y la capacidad de éstas para eliminar estos residuos tóxicos capaces de dañar su integridad. Las ROS pueden generarse a partir de diferentes vías metabólicas como la interacción directa de metales con distintas especies de oxígeno (reacción de Fenton o reacción de Haber-Weiss, entre otras); o bien a través de la activación de enzimas como la óxido nítrico sintasa (ONS) o la NADPH oxigenasa (Yu BP, 1994). El origen bioquímico de la mayor parte de radicales libres requiere la activación de una molécula de oxígeno. Ejemplos de tipos de ROS son: el radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), la molécula peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o el radical perhidroxil ( $HO_2^{\bullet}$ ). El anión superóxido, que se produce por los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial, es altamente reactivo y atraviesa fácilmente la membrana interna mitocondrial, siendo reducido a peróxido de hidrógeno. Este (además de por las mitocondrias) puede ser producido por los peroxisomas, orgánulos que contienen la enzima catalasa que convierte este radical en agua evitando así su acúmulo. Cuando existe una alteración en los peroxisomas, el peróxido de hidrógeno es liberado al citosol pudiendo ser otra fuente de incremento del estrés oxidativo (Dias y cols, 2013).

El cerebro consume aproximadamente el 20% del oxígeno del organismo, y una parte significativa de éste genera ROS como consecuencia de diversas rutas metabólicas. Aunque las ROS son moléculas que desempeñan una función de señalización y regulación de transcripción de genes de manera fisiológica, su incremento puede ser nocivo para las neuronas al dañar lípidos, proteínas, ADN y ARN; contribuyendo a su degeneración (Schieber y cols, 2014). Todos los organismos han desarrollado respuestas adaptativas al estrés oxidativo que consisten en la sobreexpresión de enzimas de defensa, chaperonas y moléculas antioxidantes (Valko y cols, 2007).

El aumento del estrés oxidativo se considera uno de los principales mecanismos fisiopatológicos en la EP (Trist y cols, 2019). En el cerebro, las ROS se pueden generar, tanto en neuronas como en células gliales, por fallos en el gradiente electroquímico de la membrana mitocondrial interna que genera la síntesis de ATP (Nicholls DG, 2002). A

su vez, otras fuentes de ROS son el metabolismo de la dopamina (por la enzima monoamino oxidasa, entre otras enzimas implicadas), las NADPH oxidasas y la neuroinflamación.

En estudios postmortem con muestras de SNpc de pacientes con EP, se demostró un incremento de estrés oxidativo y un descenso del complejo mitocondrial I y de glutatión (Sian y cols, 1994; Gu y cols, 1998). Estos hallazgos característicos de la EP, pueden reflejar un daño oxidativo en la cadena respiratoria mitocondrial. Por otro lado, se ha evidenciado daño oxidativo en otros componentes celulares como proteínas y ADN/ARN en neuronas de pacientes EP (Zhang y cols, 1999) o lípidos (Montine y cols, 2004) que conduce a la peroxidación lipídica y generación de productos tóxicos. Ello puede conducir al daño de las proteínas implicadas en diversos procesos celulares y a la alteración de las membranas lipídicas; condicionando la disfunción celular e incrementando a su vez la producción de ROS (Dias y cols, 2013).

La disfunción del retículo endoplasmático (RE) en la EP se encuentra íntimamente ligada a la alteración en la función mitocondrial, el aumento del estrés oxidativo y la disfunción lisosomal con el consecuente acúmulo de proteínas con plegamiento anómalo (entre ellas la  $\alpha$ -sinucleína). El RE regula diversas funciones dentro de la célula, siendo una de las principales la homeostasis de los niveles de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) citosólico. El RE forma una red continua intracelular compuesta por membranas que disponen de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que permiten regular sus niveles en el RE y en el citoplasma. Esta regulación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es un proceso metabólico costoso ya que requiere del uso de transportadores dependientes de ATP, conduciendo a un incremento de la actividad mitocondrial y de la generación de ROS. Cultivos de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas han demostrado que el funcionamiento de estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes conduce a un aumento del estrés oxidativo mitocondrial siendo más marcado en las dendritas que en el soma, y siendo exacerbado por la agregación de  $\alpha$ -sinucleína (Dryanovski y cols, 2013).

Hoy día no se conoce con exactitud qué factores generan una vulnerabilidad específica de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc al estrés oxidativo. Se han propuesto diversas causas por las que estas neuronas pueden ser especialmente susceptibles de ser dañadas por el estrés oxidativo. Primero, son neuronas particularmente largas con axones no mielinizados y con un alto número de sinápsis (estimándose entre 1 a 2,4 millones por neurona dopaminérgica). Ello requiere un gran consumo energético para su mantenimiento celular, con el consecuente aumento en la producción de ROS.

A diferencia de otras neuronas dopaminérgicas, las neuronas de la SNpc presentan una actividad autónoma de regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y expulsión de este a nivel extracelular, generando amplios y lentos potenciales de acción de manera regular (entre 2-4 Hz) (Surmeier y cols, 2011). Esta actividad de marcapasos propia de estas neuronas dopaminérgicas se cree que juega un papel importante en el mantenimiento de los niveles dopaminérgicos de las regiones que reciben sus proyecciones (neuronas de los ganglios de la base como el estriado). Ello conlleva un elevado gasto energético siendo un posible factor de vulnerabilidad selectiva neuronal. Estudios en sujetos sanos de edad



avanzada han evidenciado una caída de esta capacidad de marcapasos de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc asociada a la edad; sugiriendo un posible fenómeno asociado al envejecimiento o un mecanismo de defensa para disminuir su consumo energético (Branch SY, y cols, 2014).

Se ha demostrado que la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales voltaje-dependientes estimula el metabolismo de la dopamina en las neuronas de la SNpc, incrementando los niveles de dopamina citosólica y llegando a concentraciones posiblemente tóxicas (Mosharov y cols, 2009). Estos hallazgos entre otros, hicieron que se planteara la posibilidad del carácter tóxico de la dopamina y sus metabolitos citosólicos al ser una posible fuente de estrés oxidativo (Dias y cols, 2013). Sin embargo, contrario a este último argumento, estudios clínicos han demostrado que el inicio de tratamiento con levodopa (profármaco de dopamina, y actual terapia con mayor capacidad para revertir los síntomas motores de la EP) no condiciona un cambio en el curso o progresión de la enfermedad (Fahn y cols, 2004).

Existen factores genéticos que condicionan un incremento en la susceptibilidad individual ante determinados estímulos que generan un aumento de estrés oxidativo. Ejemplo de esta susceptibilidad genética es el papel que juegan determinados genes implicados en algunas formas familiares de la EP como los genes que codifican las proteínas parkina (*PRKN*) y PTEN-induced putative kinase 1 (*PINK1*) en la denominada vía metabólica *pink1-parkin*. Esta ruta metabólica se encarga principalmente de la regulación de la función mitocondrial y la mitofagia; sugiriéndose como un mecanismo de gran importancia en la etiopatogenia de la EP (Clark y cols, 2006; Malpartida y cols, 2021)

Como hemos indicado anteriormente, el desequilibrio a favor del aumento del estrés oxidativo puede estar motivado por diversos factores, tanto intrínsecos como extrínsecos (Hattori y cols, 2004). Dentro de los intrínsecos, en el análisis post-mortem de cerebros de pacientes EP se ha evidenciado una alteración de los niveles de enzimas antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión dismutasa o hemo-oxigenasa (Ambani y cols, 1975; Kish y cols, 1985; Marttila y cols, 1988; Schipper y cols, 2009). Esta última enzima se cree que juega un papel fundamental dentro de los mecanismos de defensa frente a la neurodegeneración inducidos por el incremento de ROS (Schipper y cols, 2019). Destaca por ser una enzima cuya expresión de la isoforma 1 (exclusiva del SNC) es inducible ante diversos estímulos en las células de la microglia de la SNpc, modificando su actividad para mantener el equilibrio redox celular (Schipper H, 2004).

Existen diversos factores extrínsecos, también denominados tóxico-ambientales, que se consideran que pueden influir en este desequilibrio como son la exposición a tóxicos (desde drogas sintéticas a pesticidas), la dieta, ejercicio físico o los niveles de determinadas sustancias antioxidantes. Estos factores serán descritos con mayor detalle en el apartado 1.2.7.

En conclusión, se ha demostrado el aumento del estrés oxidativo como una probable consecuencia de la disfunción mitocondrial en la SNpc de pacientes EP. Sin embargo, se desconoce si este mecanismo juega un papel inicial o tardío en la degeneración neuronal (Dias y cols, 2014). Se ha propuesto que cuando los mecanismos de defensa endógenos no pueden compensar este estrés, el acúmulo de ROS conduce a cambios neuropatológicos en las neuronas dopaminérgicas. En la actualidad aún se desconocen en su totalidad los diversos mecanismos que confieren una especial vulnerabilidad a las neuronas dopaminérgicas de SNpc ante el estrés oxidativo.

### 1.2.3 Neuroinflamación

La microglia es la principal célula inflamatoria del sistema nervioso central, actuando como los macrófagos a nivel periférico en la fagocitosis de las neuronas dañadas y liberando ROS así como citoquinas proinflamatorias (Halliday GM, 2011). Se ha demostrado la presencia de células de microglía activada y de linfocitos en la SN de pacientes con EP, en modelos animales de EP, así como en humanos con parkinsonismo inducido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (McGeer y cols, 1988; McGeer y cols, 2003; Langston y cols, 1999; Ouchi y cols, 2005). Posteriormente, se demostró y cuantificó la presencia de linfocitos tipo T (CD4 y CD8) en regiones cerebrales afectas en la EP, sin evidenciarse linfocitos de tipo B (Brochard y cols, 2008). Otros trabajos han confirmado que la neuroinflamación se encuentra asociada a los eventos patológicos ocurridos en la EP, evidenciándose un incremento en la concentración de citoquinas proinflamatorias en sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) y tejido cerebral de pacientes EP (Nagatsu y cols, 2000). En la SN de pacientes con EP, no solo se ha descrito una elevada de concentración de microglia activada, sino una capacidad reducida de regulación de astrocitos y oligodendroglia (Orr y cols, 2002). A su vez, existen trabajos científicos que evidencian en técnicas de neuroimagen la existencia de neuroinflamación en pacientes con EP (Terada y cols, 2016; Gerhard y cols, 2006). Sin embargo, se desconoce si la activación microglial es un hallazgo secundario a la degeneración o un mecanismo que contribuye al inicio de la misma (Kannarkat y cols, 2013).

Se ha evidenciado cambios en la inmunidad celular sanguínea de pacientes EP como modificaciones de monocitos y linfocitos T (Hirsch y cols, 2020). Sin embargo, se cree que la inmunidad humoral también podría participar en la activación microglial pudiendo ser las formas patológicas de  $\alpha$ -sinucleína las que inicien una respuesta de tipo inmune contribuyendo a la pérdida neuronal.

Diversos estudios han mostrado una asociación entre la EP y polimorfismos en genes clásicamente asociados a procesos inflamatorios (Hamza y cols, 2010; Nalls y cols, 2014; Zhang y cols, 2017). Hamza y cols, describieron que variantes genéticas en sistema del antígeno leucocitario humano (HLA) se asociaban con un mayor riesgo de EP esporádica de inicio tardío (Hamza y cols, 2010), hallazgo posteriormente confirmado en otras cohortes (Nalls, y cols, 2011). Además, algunos de los genes relacionados con las formas familiares de EP con herencia autosómica dominante se expresan en las células inflamatorias (Holmans y cols, 2013; Dzamko y cols, 2015). Todos estos datos pueden

sugerir una interacción entre la inflamación y la fisiopatología de la EP, implicando también a las células del sistema inmune periférico y no solo a la neuroinflamación en la SNpc. Sin embargo, hoy día todavía no existe evidencia científica suficiente como para determinar si la neuroinflamación y los factores (genéticos y ambientales) que la favorecen, son causa o inicio de la neurodegeneración de la EP (Hirsch y cols, 2020).

Finalmente, algunos estudios observacionales han apreciado un posible efecto protector de la toma de algunos tipos de anti-inflamatorios no esteroideos en estudios observacionales de casos y controles (Chen y cols, 2005). Además, el consumo de este tipo de fármacos podría asociarse a una posible disminución de la penetrancia y expresividad de variantes patogénicas en genes asociados a formas familiares de EP, como el gen que codifica para la proteína "*Leucine-rich repeat kinase 2*" o *LRRK2* (San Luciano y cols, 2020).

#### 1.2.4 Alteración del sistema lisosomal y de autofagia

Debido al estado post-mitótico de las neuronas, la elevada demanda metabólica y la morfología con numerosas conexiones; el correcto funcionamiento y supervivencia de estas células depende en gran medida de un adecuado sistema de producción de los componentes para las diversas rutas metabólicas, y de eliminación de los tóxicos resultantes.

La autofagia es un proceso de eliminación o degradación de residuos a través del cual, macromoléculas y organelas tóxicas o de deshecho son transportadas al lisosoma para generar de nuevo material celular básico como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos que serán reutilizados en nuevos procesos metabólicos. En las neuronas, la autofagia juega un papel fundamental en el mantenimiento del adecuado funcionamiento celular y, concretamente, en la eliminación de proteínas anormalmente plegadas u organelas dañadas. Dentro de los tipos de autofagia implicadas en la homeostasis celular, destacan la macroautofagia, la autofagia mediada por chaperonas y la microautofagia (Parzych y cols, 2014). Aunque morfológicamente distintas, los tres tipos concluyen con el transporte a los lisosomas de un elemento celular tóxico o dañado para su degradación y reciclado.

La macroautofagia es la forma más estudiada y tiene principalmente una función citoprotectora al eliminar organelas dañadas o innecesarias para la célula. Durante esta, macromoléculas y organelas como mitocondrias y peroxisomas son fagocitadas por vesículas especializadas, formándose una nueva vesícula de doble membrana o "autofagosoma", para fusionarse con los lisosomas y ser finalmente digerida para su eliminación y/o reciclado. Este proceso se basa en una compleja secuencia de múltiples pasos y cascada de señalizaciones celulares que va desde el proceso inicial de sensor la presencia de un elemento tóxico a eliminar, hasta la fusión de los autofagosomas con el sistema endo-lisosomal para la degradación a través de enzimas hidrolíticas (Malik y cols, 2019). Esta secuencia viene determinada por una serie de genes relacionados con la autofagia. Se ha evidenciado que la ausencia de expresión de estos genes en modelos animales favorece, durante la vida adulta, un deterioro motor progresivo y la

neurodegeneración (Hata y cols,2006; Komatsu y cols, 2006). La disregulación del proceso de inicio de la autofagia y de internalización/nucleación de organelas puede estar implicado en diversas enfermedades neurodegenerativas (Figura 4. Malik y cols, 2019). Un ejemplo de ello, son los trabajos en modelos animales y celulares de enfermedad de Huntington donde se ha evidenciado un rescate del fenotipo clínico y una reducción de agregación proteica patogénica mediante estimulación farmacológica de la autofagia (Lee y cols, 2015; Roscic y cols, 2011).

Por el contrario, la microautofagia es el tipo de autofagia menos estudiado y el papel específico de esta en la neurodegeneración es actualmente desconocido. En la microautofagia, las proteínas entran en el sistema endolisosomal por invaginaciones del endosoma y de la membrana lisosomal. La microautofagia parece estar implicada en la adecuada función del terminal sináptico, por lo que la fisiología de la sinapsis podría ser particularmente vulnerable a alteraciones de esta vía en procesos neurodegenerativos (Sharma y cols, 2012).

La autofagia inducida por chaperonas es una forma selectiva de autofagia y, a diferencia de la micro y macroautofagia, es exclusiva de células eucariotas de mamíferos. En ella, un pentapéptido expresado en determinadas proteínas citosólicas es reconocido específicamente por proteínas citoplasmáticas (chaperonas), presentados a los receptores de las proteínas transmembrana asociadas a lisosomas 2A (LAMP-2A) y, finalmente, transportados a los lisosomas para su degradación hidrolítica (Dice JF, 1990). Este tipo de autofagia degrada un amplio tipo de proteínas, entre las que destacan las enzimas glucolíticas, los factores de transcripción, las proteínas de unión a calcio y lípidos, o las proteínas implicadas en el tráfico vesicular, entre otras (Arias y cols, 2011). Esta forma específica de autofagia se cree implicada en la pérdida de neuronas dopaminérgicas descrita en la EP (Cuervo y cols, 2004). Las formas nativas de  $\alpha$ -sinucleína son procesadas por este tipo de autofagia, sin embargo, las formas patogénicas se cree que son ineficazmente degradadas por esta vía (Martinez-Vicente y cols, 2008; Cuervo y cols, 2004).

Mutaciones en genes implicados en las formas familiares de la EP, tanto autosómicas dominantes como recesivas, parecen alterar el proceso de la autofagia mediada por chaperonas (Orenstein y cols, 2013; Wang y cols, 2016) y acabar generando una disfunción mitocondrial, un incremento del estrés oxidativo y la consecuente muerte celular. La inhibición de la autofagia mediada por chaperonas se ha asociado también con el acúmulo de otros tipos de proteínas citosólicas no funcionantes en cultivos celulares, en modelos animales de  $\alpha$ -sinucleína y en muestras de tejidos de pacientes con EP, asociándose la disregulación de esta vía con la etiopatogenia de la EP (Yang y cols, 2009; Murphy y cols,2014; Alvarez-Erviti y cols, 2010). Todo ello sugiere que la alteración del procesamiento de proteínas asociadas a la EP ( $\alpha$ -sinucleína de plegamiento anómalo, entre otras) mediante este tipo de autofagia selectiva puede jugar un papel en la etiopatogenia de la enfermedad y en la progresión de la misma, al ser un mecanismo necesario para el mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas (Pitcairn y cols, 2019).

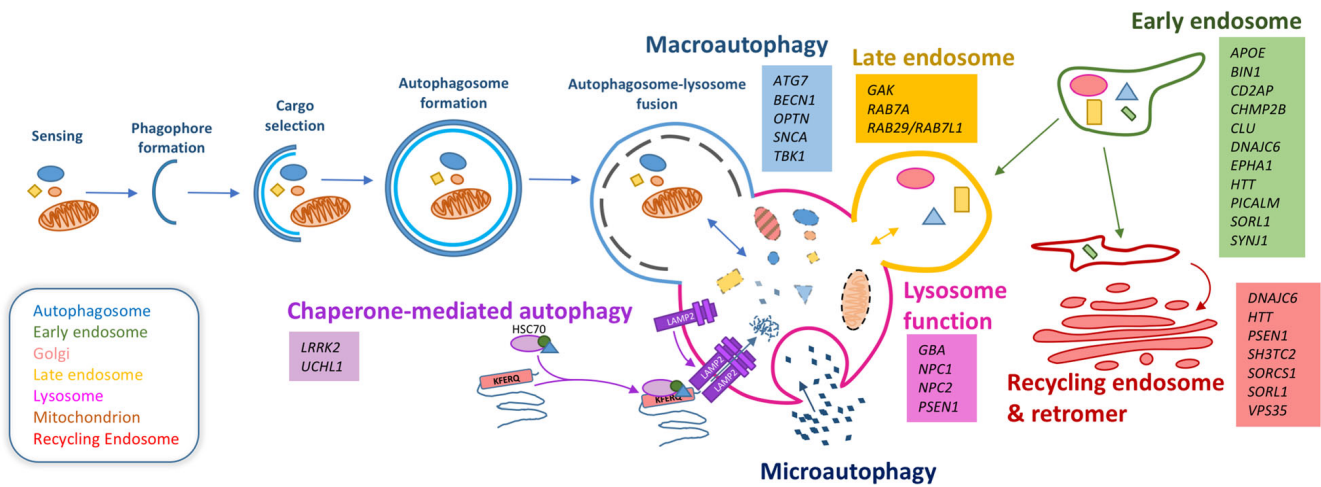


Figura 4. Mecanismos de autofagia y del sistema endo-lisosomal y la implicación en estos de diversos genes relacionados con enfermedades neurodegenerativas (adaptado de Malik y cols, 2019)

Las formas familiares de EP asociadas a mutaciones en el gen de la glucocerebrosidasa (*GBA*) se han asociado con una disfunción lisosomal y, consecuentemente, de los mecanismos de autofagia para degradación de proteínas y organelas. La enzima glucocerebrosidasa (GCasa) hidroliza la glucosilceramida en ceramida y glucosa. El déficit de esta enzima, consecuencia de diversas variantes patogénicas en *GBA*, promueve el acúmulo de glucosilceramida en el lisosoma y su disfunción. Las proteínas lisosomales como la GCasa se sintetizan en el RE. La GCasa, tras ser sintetizada, es transportada desde el RE al lisosoma específicamente por la proteína *lysosomal integral membrane protein type-2* (LIMP-2). Formaciones anómalas de enzimas lisosomales por variantes patogénicas en los genes que codifican estas enzimas pueden favorecer que estas proteínas queden retenidas en el RE y posteriormente degradadas por el sistema ubiquitina-proteosoma, en vez de realizar su función en el lisosoma. Esto conduce a una disfunción lisosomal secundaria a la ausencia parcial o total de la proteína lisosomal (Ron y cols, 2005).

Otros factores que pueden conducir a la pérdida de función proteica de la GCasa son la alteración de los co-factores y modificaciones post-transduccionales que confieren actividad catalítica a la enzima (Pitcairn y cols, 2019). Estudios en cerebros de pacientes con EP esporádica y asociada a mutaciones en *GBA* han demostrado que la expresión de la GCasa y su actividad se encuentran disminuidas en la SNpc de los pacientes (Alcalay y cols, 2015; Gegg y cols, 2012; Murphy y cols, 2014). La reducción de actividad de esta enzima se ha asociado también a la existencia de inclusiones neuronales en regiones cerebrales afectas frente a las regiones sin neurodegeneración (Bae y cols, 2014). Además, esta reducción de actividad GCasa también se ha asociado a la estabilización de oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína (formas patogénicas) en modelos animales y en neuronas

de pacientes con EP (Mazzulli y cols, 2011). Estos autores también demostraron que la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína generaba una disminución de las formas maduras de GCasa en cerebros de pacientes con EP esporádica; sugiriendo que el déficit de actividad enzimática no solo condicionaba acúmulo de oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína, sino que a través de estos agregados proteicos se inhibía el tráfico de la GCasa al lisosoma, exacerbando la disfunción lisosomal inicial. Por ello, adicionalmente a la hipótesis de pérdida de función de GCasa como mecanismo fisiopatológico inicial; se ha planteado la hipótesis de función tóxica de las formas aberrantes de GCasa que interferirían en procesos de homeostasis celular como el control de la degradación proteica en el RE, contribuyendo finalmente a la degeneración neuronal (Fernandes y cols, 2016).

A su vez, la disfunción lisosomal inducida por el depósito patogénico de  $\alpha$ -sinucleína puede interactuar con otros factores de riesgo genético que predisponen a los mecanismos fisiopatológicos característicos de la EP (Pitcairn y cols, 2019). Ejemplo de ello es la interferencia en la autofagia mediada por chaperonas de la mutación más frecuente en otro gen asociado a EP familiar (p.G2019S en *LRRK2*), impidiendo la unión de las proteínas a LAMP-2A (Orenstein y cols, 2013). La proteína *LRRK2* también se ha asociado a la fosforilación de proteínas de transporte y tráfico vesicular como rab10 o rab8 (Steger y cols, 2017). Esta familia de proteínas se ha descrito asociadas al tráfico vesicular entre el aparato de Golgi y la membrana plasmática, así como en el metabolismo y degradación de lípidos (Steger y cols, 2017; Yu y cols, 2018). Estudios de microscopía electrónica de neuronas de pacientes con EP asociada a mutaciones en *LRRK2* han demostrado un incremento de vacuolas, acúmulos lipídicos y RE aumentados (Sanchez-Danes y cols, 2012).

Además de los tipos de autofagia descritos en función de su morfología, estos mecanismos también se pueden clasificar en relación con el sustrato degradado (peroxisomas, ácidos nucleicos, lípidos, mitocondrias, ...), denominándose a esta como una autofagia selectiva. Dentro de estas formas, destacan por su relación con la etiopatogenia de la EP la mitofagia y la lipofagia. La mitofagia es el proceso por el cual mitocondrias disfuncionales son señaladas y selectivamente fagocitadas para ser degradadas tras fusionarse con los lisosomas. Como se describió anteriormente, variantes patogénicas en genes relacionados con formas familiares de EP (*LRRK2*, *PRKN* y *PINK1*) se relacionan con una disfunción en la mitofagia como uno de los principales mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad (Park y cols, 2006; Fiesel y cols, 2015; Hou y cols, 2018; Chung y cols, 2016; Bonello y cols, 2019).

### 1.2.5 Alteración del metabolismo lipídico

El cerebro es considerado el órgano más rico en lípidos del organismo. Los lípidos son biomoléculas insolubles en agua y conocidas principalmente por su papel en funciones metabólicas de almacenamiento energético. Otra de sus funciones principales es la de constituir las membranas celulares y las subregiones específicas de estas que intervienen en el anclaje de proteínas, el transporte de moléculas y la señalización celular (Holthuis y cols, 2014). Juegan un papel esencial en la fisiología de las neuronas

al ser un componente fundamental de sus membranas celulares y al estar implicados en diversos procesos (regulación de permeabilidad, señalización, etc). A su vez, se ha descrito que los lípidos desempeñan un rol importante en muchos de los mecanismos clásicamente relacionados con la neurodegeneración en la EP como los anteriormente descritos: estrés oxidativo, disfunción lisosomal, neuroinflamación o estrés del RE (Xicoy y cols, 2019). Diversas mutaciones en genes relacionados con el metabolismo lipídico se han asociado con la EP familiar y esporádica, como describiremos más adelante en el apartado correspondiente a genética de la EP.

Existen ocho clases de lípidos (ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteroides, prenoides, sacarolípidos y policétidos), sin embargo, son los 5 primeros tipos aquellos más estudiados en su relación con la EP.

Los ácidos grasos poli-insaturados se han asociado a neuroprotección en diversos modelos animales, y existe cierta evidencia en estudios epidemiológicos de que el consumo de este tipo de ácidos grasos se asocia con un menor riesgo de EP (Kamel y cols, 2014). Los glicerolípidos se encuentran formados por la unión de un grupo glicerol con uno, dos o tres ácidos grasos. El glicerolípido más estudiado en la EP es el triacilglicerol o triglicérido. Diversos estudios observacionales han demostrado niveles disminuidos de triglicéridos en pacientes con EP (Wei y cols, 2013; de Lau y cols, 2006; Fang y cols, 2019), aunque se han encontrado resultados contradictorios en formas familiares de la enfermedad (Thaler y cols, 2019). Estudios en modelo animal de  $\alpha$ -sinucleína han demostrado una reducción de los niveles séricos de lípidos en los ratones con sobre-expresión de esta proteína, concretamente, en los niveles séricos de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol (Guerreiro y cols, 2017). La sobreexpresión de rotatone y  $\alpha$ -sinucleína se ha asociado al depósito intracelular de triglicéridos, formando depósitos lipídicos tipo gotas a los que se une la  $\alpha$ -sinucleína y disminuyendo la renovación celular de los triglicéridos (He y cols, 2013; Sere y cols, 2010; Cole y cols, 2002).

Consecuentemente, se ha planteado que el depósito patológico de  $\alpha$ -sinucleína altera el metabolismo lipídico, generando un acúmulo intracelular de estos como mecanismo de neuroprotección y pudiendo ser la causa de la disminución de los niveles de triglicéridos séricos en pacientes EP (Guerreiro y cols, 2017; Sánchez Campos y cols, 2018).

El metabolismo del colesterol en el SNC parece jugar también un papel clave en el proceso neurodegenerativo de la EP (Jin y cols, 2019; Hallet y cols, 2019, Orth y cols, 2012), señalándose a oxisteroides como el 24-OH-colesterol como posibles biomarcadores séricos diagnósticos de la EP (Huang y cols, 2019). Diversos estudios han mostrado resultados controvertidos con respecto al colesterol y lipoproteínas en la EP. Un estudio de cohortes prospectivo describió un aumento del riesgo de EP en sujetos mayores de 55 años con hipercolesterolemia (Hu y cols, 2008). Sin embargo, diferentes estudios han mostrado niveles disminuidos tanto de colesterol total como de lipoproteínas de baja densidad (Low-density lipoprotein, LDL), apolipoproteína B y triglicéridos en pacientes con EP, sugiriendo un factor protector de estos lípidos para la

EP (Guo y cols, 2015; Wei y cols, 2013; de Lau y cols, 2006). Además, dos estudios prospectivos han demostrado un menor riesgo de desarrollar EP entre sujetos con hipercolesterolemia (Rozani y cols, 2018; Fang y cols, 2019), proponiéndose una posible influencia de los niveles de colesterol total y LDL en la progresión motora y el estado cognitivo de los pacientes con EP (Huang y cols, 2011; Sterling y cols, 2016). Estudios con fibroblastos de pacientes EP con mutaciones N370S en *GBA* han demostrado la existencia de un acúmulo lisosomal de colesterol, pudiendo generar los denominados cuerpos multilaminares (García-Sanz y cols, 2017). Estas estructuras son cuerpos concéntricos típicamente observados en las enfermedades por depósito lisosomal como la enfermedad de Niemann-Pick y que generan una disfunción de la endocitosis y autofagia, favoreciendo la neurodegeneración (García-Sanz y cols, 2018). Un meta-análisis de estudios GWAS en pacientes con EP demostró que los lípidos y lipoproteínas se encontraban relacionados con mecanismos fisiopatológicos responsables de la neurodegeneración como el estrés oxidativo y la disfunción lisosomal (Kleman y cols, 2017). Es interesante reseñar que los autores encontraron una etiología genética común entre el colesterol total y triglicéridos de dominios específicos de la membrana celular y la EP, sugiriendo una posible relación causal entre el metabolismo del colesterol y la EP. Posteriormente, Fang y cols, evidenciaron en un estudio epidemiológico de cohortes prospectivo que niveles elevados de colesterol total, LDL y triglicéridos se asociaban a menor riesgo de EP, demostrando además una posible relación causal entre el metabolismo del colesterol y la EP mediante análisis de randomización mendeliana (Figura 5. Fang y cols, 2019).

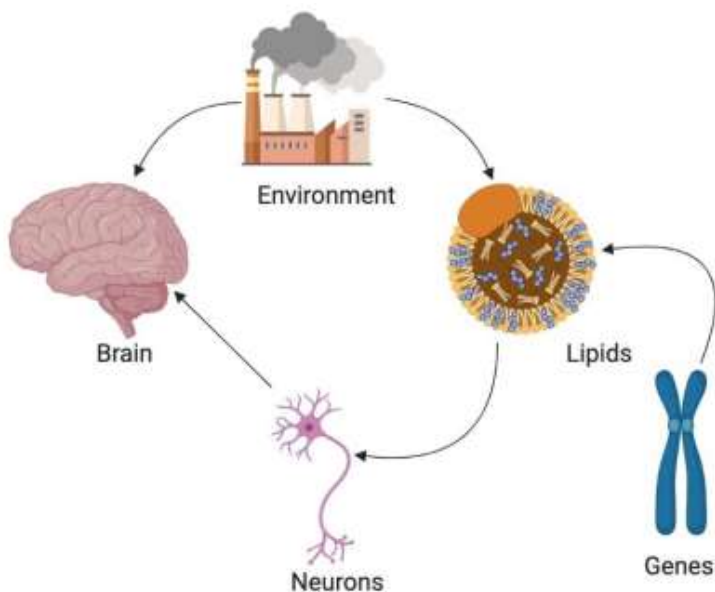


Figura 5. Relación de factores ambientales y genéticos en la alteración del metabolismo lipídico en neuronas dopaminérgicas como mecanismo fisiopatológico (tomada de Fang y cols, 2019).



Tanto los fosfolípidos como los esfingolípidos son subtipos de lípidos que tienen una especial importancia por conformar las bicapas lipídicas de las membranas celulares, interviniendo de manera principal en procesos como la endocitosis o la mitofagia (Xicoy y cols, 2019). Los esfingolípidos, como las ceramidas y cerebrósidos, destacan especialmente en su relación con la etiopatogenia de la EP al desempeñar además funciones en procesos como la apoptosis, autofagia o la respuesta inmune. Mutaciones en los genes que codifican las enzimas responsables de degradación de cerebrósidos y galactocerebrósidos han sido asociadas a un mayor riesgo de desarrollar EP. La pérdida de función de estas enzimas conduce, como hemos descrito con anterioridad, a un depósito de proteínas anómalas que no pueden eliminarse correctamente, como la  $\alpha$ -sinucleína, entre otras.

Por el contrario, se ha demostrado una alteración en la expresión de proteínas implicadas en la homeostasis de los glucolípidos en muestras de SNpc de pacientes con EP, pudiendo ser este hallazgo previo e independiente al depósito de  $\alpha$ -sinucleína (Moloney y cols, 2018). Estos resultados, junto a los anteriormente descritos, han generado la hipótesis etiológica de la EP como una lipidopatía inducida por proteínas, en vez de una proteinopatía (Fanning y cols, 2019). Esta nueva visión fisiopatológica de la patología Lewy se basa en hallazgos que describen inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína cerca de subregiones específicas de la membrana celular llamadas *lipid rafts*. Estas subregiones son microdominios específicos de las membranas celulares con un alto contenido en colesterol y esfingolípidos, que coordinan la bioactividad de los constituyentes de la membrana y las interacciones entre lípidos y proteínas (Lingwood y cols, 2010). Se ha descrito una composición lipídica alterada en los microdominios *lipid rafts* de la corteza frontal de pacientes con EP comparado con controles sanos (Fabelo y cols, 2011). Finalmente, la disfunción de las principales proteínas codificadas por los genes de las formas de EP familiar más frecuentes (como LRRK2, parkina o GCasa) se han asociado a una alteración en los microdominios *lipid rafts*, ello pudiendo favorecer la agregación proteica anómala y la neurodegeneración (Hatano y cols, 2007; Cha y cols, 2015; García-Sanz y cols, 2018).

### 1.2.6 Factores genéticos

La EP clásicamente denominada idiopática ha sido considerada durante muchos años como una enfermedad no genética. Sin embargo, con la descripción de familias con varios miembros afectados con EP y la identificación de los primeros genes asociados a la enfermedad, este concepto ha cambiado y con ello el abordaje de su estudio. El término EP familiar (o monogénica) y esporádica (o idiopática) son simplificaciones útiles para clasificar subtipos de EP atendiendo principalmente a la causa genética subyacente (Blauwendraat y cols, 2020). La mayoría de casos de EP son esporádicos, aunque se han descrito formas familiares monogénicas que pueden llegar a representar el 10% de los casos de EP a nivel mundial (Kim y cols, 2017). El estudio de estas formas ha ayudado en gran medida al mejor entendimiento de los diferentes mecanismos fisiopatológicos

implicados en la neurodegeneración asociada a la EP como ejemplificamos en apartados anteriores sobre etiopatogenia.

El envejecimiento es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la EP, sin embargo, tanto factores ambientales como genéticos pueden modificar este riesgo y su progresión. Dentro de los factores genéticos asociados a mayor riesgo para la EP existen desde variantes patogénicas con una alta penetrancia hasta variantes que condicionan un pequeño incremento del riesgo asociado al envejecimiento. Estas se clasifican en: variantes poco frecuentes y con un gran efecto patogénico (típicamente asociadas a formas monogénicas/familiares de la EP) y, variantes mucho más frecuentes y con un efecto pequeño en el riesgo de desarrollo de enfermedad, usualmente identificadas en formas esporádicas de EP. El componente hereditario en la EP debido a la variabilidad genética común en la población se estima en un 22% (Blauwendraat y cols, 2020). El empleo de nuevas técnicas de secuenciación (secuenciación de exoma y secuenciación de genoma completo) ha permitido identificar hasta la fecha actual 90 variantes de riesgo para EP independientes (Nalls y cols, 2019) en diversos loci y más de 20 genes asociados a la EP (Tabla 1).

La asociación de algunos de estos genes con la EP se encuentra todavía en debate por resultados contradictorios entre diferentes estudios poblacionales, sin embargo, otros (*LRRK2*, *PRKN*, *GBA* o *PINK1*, entre otros) han sido ampliamente estudiados en distintas poblaciones ayudando a entender algunos de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la neurodegeneración de la enfermedad. Se ha demostrado que estos genes que condicionan formas familiares de EP son también genes candidatos en las formas esporádicas de EP (Singleton y cols, 2013); sin embargo, es necesario estudiar si los mecanismos fisiopatológicos de formas monogénicas están también implicados en las formas esporádicas de la enfermedad. Con idea de la búsqueda de una medicina de precisión para pacientes con EP, se ha propuesto que las subcategorías de la EP necesitarían estar basadas en la fisiopatología subyacente (determinada por la genética y/o biomarcadores de mecanismos fisiopatológicos), encontrándose por ejemplo formas de la EP relacionadas con mitofagia, con la autofagia o con disfunción lisosomal, entre otras (Blauwendraat y cols, 2020).

	Mutation	Note	Year of discovery	Proposed disease mechanism	Inheritance	Frequency	Nominated by GWAS	Multiple independent families reported*	Functional evidence†	Negative reports published‡	Confidence as actual PD gene§	
	SNCA	Missense or multiplication	Often with dementia	1997, 2003	Gain of function or overexpression	Dominant	Very rare	Yes	++	++	+	Very high
	PRKN	Missense or loss of function	Often early onset	1998	Loss of function	Recessive	Rare	No	++	++	+	Very high
	UCHL1	Missense	--	1998	Loss of function?	Dominant	Unclear	No	--	+	--	Low
	PARK7	Missense	Often early onset	2003	Loss of function	Recessive	Very rare	No	++	++	+	Very high
	LRRK2	Missense	--	2004	Gain of function	Dominant	Common	Yes	++	++	+	Very high
	PINK1	Missense or loss of function	Often early onset	2004	Loss of function	Recessive	Rare	No	++	++	+	Very high
	POLG	Missense or loss of function	Atypical PD	2004	Loss of function?	Dominant	Rare	No	++	+	+	High
	HTRA2	Missense	--	2005	Unclear	Dominant	Unclear	No	--	+	--	Low
	ATP13A2	Missense or loss of function	Atypical PD	2006	Loss of function	Recessive	Very rare	No	++	++	+	Very high
	FBXO7	Missense	Often early onset	2008	Loss of function	Recessive	Very rare	No	++	++	+	Very high
	GIGYF2	Missense	--	2008	Unclear	Dominant	Unclear	No	+	+	--	Low
	GBA	Missense or loss of function	--	2009	Likely loss of function	Dominant (incomplete penetrance)	Common	Yes	++	++	+	Very high
	PLA2G6	Missense or loss of function	Often early onset	2009	Loss of function	Recessive	Rare	No	++	++	+	Very high
	EIF4G1	Missense	--	2011	Unclear	Dominant	Unclear	No	--	+	--	Low
	VPS35	Missense	--	2011	Loss of function	Dominant	Very rare	No	++	+	+	Very high
	DNAJC6	Missense or loss of function	Often early onset	2012	Loss of function	Recessive	Very rare	No	++	+	+	High
	SYNJ1	Missense or loss of function	Often atypical PD	2013	Loss of function	Recessive	Very rare	No	++	+	+	High
	DNAJC13	Missense	Same family as TMEM230	2014	Unclear	Dominant	Unclear	No	+	+	--	Low
	TMEM230	Missense	Same family as DNAJC13	2016	Loss of function?	Dominant	Unclear	No	--	+	--	Low
	VPS13C	Missense or loss of function	--	2016	Loss of function	Recessive	Rare	Yes	++	+	+	High
	LRP10	Missense or loss of function	--	2018	Loss of function?	Dominant	Unclear	No	--	+	--	Low

GWAS=genome-wide association study. PD=Parkinson's disease. \*In this column, ++ denotes ≥4 families reported; + denotes ≥2 and <4 families reported; -- denotes 1 family reported; -- denotes no reported families. †In this column, ++ denotes ≥4 disease-related reports; + denotes ≥1 and <4 disease-related reports; -- denotes no disease-related reports. ‡Reports that could not replicate the finding that this gene is a PD gene. In this column, + denotes no negative reports; -- denotes ≥1 and <4 negative reports; -- denotes ≥4 negative reports. §Sum of the scores in the three preceding columns, with each + adding 1 and each - subtracting 1; very high denotes a score of ≥5; high denotes a score of 4; medium denotes a score of 2 or 3; low denotes a score of <1.

Table: Mutations that have been reported to cause Parkinson's disease

Tabla 1. Mutaciones que han sido descritas como asociadas a la enfermedad de Parkinson (tomado de Blauwendraat y cols, 2020).

A continuación, describiremos las formas familiares o monogénicas de la EP más frecuentes y estudiadas.

#### 1.2.6.1 EP familiar con patrón de herencia autosómica dominante.

Dentro de este tipo de EP destacan las formas asociadas a mutaciones en los siguientes genes:

- a) Mutaciones en heterocigosis en el gen *SCNA* (gen codificante de  $\alpha$ -sinucleína): Polymeropoulos y cols, describieron en 1996 una familia con EP de herencia autosómica dominante asociada al locus 4q21-23, posteriormente

identificándose la variante A53T del gen *SCNA* (Polymeropoulos y cols, 1996; Polymeropoulos y cols, 1997). Otras variantes patogénicas han sido descritas desde entonces (A30P; E46K; H50Q y G51D) en diversas poblaciones europeas (Zarranz y cols, 2004; Krüger y cols, 1998; Proukakis y cols, 2013; Lesage y cols, 2013). Sin embargo, la influencia de estas mutaciones en la incidencia general de EP es baja; siendo una causa rara de EP, al ser variantes poco frecuentes (Chan y cols, 1998; Scott y cols, 1999). Son formas de EP con un curso clínico más agresivo y mayor deterioro cognitivo, mostrando una penetrancia muy alta (Papadimitriou y cols, 2016). Duplicaciones y triplicaciones de este gen, y no sólo mutaciones puntuales, también se han asociado con un mayor riesgo de EP tanto en formas familiares como esporádicas (Chartier-Harlin y cols, 2004; Singleton y cols, 2003; Ahn y cols, 2008; Ibañez y cols, 2004). A pesar de que el mecanismo fisiopatológico por el que mutaciones en *SNCA* inducen la neurodegeneración se desconoce en su totalidad, se considera que es a través de una ganancia de función existiendo un efecto de la dosis génica en el riesgo de EP (Kim y cols, 2017). Mutaciones en *SCNA* influyen en diversos mecanismos como la disfunción mitocondrial y la alteración de mecanismos de degradación proteica que conducen a un aumento del estrés del RE y a una disfunción lisosomal (Kasten y cols, 2013).

- b) Mutaciones en heterocigosis en el gen *LRRK2* (Leucine-rich repeat kinase 2): Este gen, que contiene 51 exones, codifica la proteína LRRK2 o dardarina. Descrito por primera vez en 2004 (Zimprich y cols, 2004; Paisán-Ruiz y cols, 2004), es la forma más prevalente asociada a la EP de herencia autosómica dominante (más del 10% de formas familiares autosómica dominante). Se han descrito 6 variaciones causantes de enfermedad, siendo la Gly2019Ser (G2019S) la más frecuentemente descrita en diferentes poblaciones (Gao y cols, 2009). La función de la proteína LRRK2 no se conoce en su totalidad, así como sus interacciones y los mecanismos fisiopatológicos por los que su alteración conduce a la EP. Contiene diversos dominios funcionales, incluyendo un dominio con actividad quinasa. Se considera el aumento de actividad de este dominio el principal mecanismo por el que se incrementa el riesgo de EP, ya que se ha asociado a degeneración nigroestriatal y formación de patología tipo Lewy (Kim y cols, 2017). Este aumento de actividad quinasa ha sido descrito con algunas variantes patogénicas, como la G2019S, sin embargo, otras vías metabólicas pueden estar también implicadas. Algunos de estos mecanismos pueden ser la disfunción mitocondrial o la fosforilación por LRRK2 de proteínas (como las enzimas Rab GTPasas) implicadas en funciones de señalización y transporte endolisosomal (Delcambre y cols, 2020; Berwick y cols, 2019; Ysselstein D, y cols, 2019; Yu y cols, 2018). La baja penetrancia descrita en portadores de la variante patogénica más común de *LRRK2* (G2019S) obliga a pensar que pueden haber otros factores que modulen la degeneración de neuronas dopaminérgicas en

estos sujetos (Lee y cols, 2017; Lüth y cols, 2020). Se ha propuesto otros mecanismos a través de los cuales *LRRK2* también podría intervenir en la fisiopatología de la EP como son la neuroinflamación y la alteración del metabolismo lipídico (Cabezudo y cols, 2020; Hatano y cols, 2007). Modelos animales de *LRRK2* han evidenciado cambios en el perfil lipídico (Baptista y cols, 2013), mientras que en portadores de variantes *LRRK2* se han demostrado niveles mayores de triglicéridos séricos (Thaler y cols, 2020) y un aumento de interleuquina 1- $\beta$  comparado con controles sanos (Dzamko y cols, 2016). Los mismos autores encontraron un aumento de interleuquina-8 en LCR de pacientes con EP asociada a mutaciones en *LRRK2* comparada con formas esporádicas de EP, hallazgo que apoya el papel de la neuroinflamación en las formas de EP asociadas a *LRRK2*.

Actualmente, existen en curso ensayos clínicos en fase I/II con inhibidores de la actividad quinasa *LRRK2* como posibles terapias génicas en pacientes con EP asociada a mutaciones en *LRRK2*. Sin embargo, alteraciones de esta actividad quinasa mediante inhibición farmacológica ha evidenciado alteraciones sistémicas (alteraciones pulmonares, renales o metabólicas) en modelos animales de estas formas de EP (Baptista y cols, 2020). En base a ello, se ha hipotetizado sobre la expresión de este gen no solo a nivel del SNC sino a nivel periférico y de otros órganos (Ferrazza y cols, 2016; Rocha y cols, 2020). En esta línea, estudios en modelo animal de *LRRK2* ha evidenciado que variantes patogénicas en este gen inducen represión de la ruta metabólica Wnt (Wingless/Int) /  $\beta$ -cateninas (Berwick y cols, 2012). Esta vía metabólica interviene en diversas funciones como la formación y homeostasis ósea, así como en la integridad de la barrera hemato-encefálica (BHE) tras lesiones isquémicas cerebrales; entre otras (Song y cols, 2021; Baron y cols, 2013). La interacción de *LRRK2* con la vía Wnt/ $\beta$ -cateninas y sus proteínas (como, por ejemplo, LDL receptor-related protein 6 o LRP6) puede suponer otro posible mecanismo a través del cual, mutaciones en *LRRK2* favorecen la neurodegeneración. (Berwick y cols, 2019).

c) Mutaciones en heterocigosis en el gen *GBA*:

Mientras las mutaciones en homocigosis en este gen conducen a la enfermedad de Gaucher (enfermedad por depósito lisosomal de inicio en edad infantil), la presencia de variantes patogénicas en heterocigosis se consideran actualmente el principal factor de riesgo genético para la EP (Kim y cols, 2017). Inicialmente se describió la presencia de síntomas parkinsonianos en pacientes con enfermedad de Gaucher y la incidencia elevada de EP en sus familiares (Neudorfer y cols, 1996; Aharon-Peretz, y cols, 2005). Numerosos estudios han demostrado el aumento de riesgo de EP en portadores en heterocigosis de variantes patogénicas en *GBA* en distintas poblaciones (Jesús y cols, 2016; Huang y cols, 2011; Wu y cols, 2007; Neumann y cols, 2009; Sidransky y cols, 2009), pero

especialmente en judíos ashkenazi (Alcalay y cols, 2014). Con una penetrancia incompleta, esta aumenta con la edad y se estima que puede encontrarse entre 8-30% a los 80 años (Anheim y cols, 2012). A nivel clínico, los pacientes con EP asociada a mutaciones en *GBA* presentan un fenotipo motor similar a la EP esporádica (Brockmann y cols, 2015; Oeda y cols, 2015), con buena respuesta a levodopa pero con un mayor riesgo de síntomas no motores como el deterioro cognitivo (Jesús y cols, 2016; Alcalay y cols, 2012; Cilia y cols, 2016). Además, se ha descrito un posible mayor riesgo para complicaciones dopaminérgicas tipo discinesias inducidas por levodopa y para síntomas disautonómicos (Jesús y cols, 2016; Brockmann y cols, 2011). La progresión de la enfermedad y de la neurodegeneración asociada también se ha descrito como mayor; sin embargo, existe controversia sobre la posible disminución en la supervivencia de pacientes con estas formas de EP comparada con formas de EP esporádica u otras formas monogénicas de la enfermedad (Brockmann y cols, 2015; Thaler y cols, 2018). Tanto el riesgo a desarrollar EP como el fenotipo de la misma, puede depender del tipo de mutación en *GBA* y de su severidad funcional (Gan-Or y cols, 2015). Entre las variantes patogénicas más frecuentes descritas destacan la L444P y la N370S (Gan-Or y cols, 2015), siendo estas mutaciones tipo *missense*. Recientemente, se ha demostrado que variantes frecuentes no codificantes en *GBA* influyen en la edad de inicio de la enfermedad en estos pacientes (Schierding y cols, 2020); expandiendo el papel que juega *GBA* en la EP. A nivel fisiopatológico, ya se ha descrito la relevancia en el buen funcionamiento del sistema lisosomal y de aclaramiento de proteínas de la enzima GCasa (codificada por *GBA*, y cuya función se ve alterada en portadores de variantes patogénicas). El principal mecanismo fisiopatológico considerado en esta forma genética de EP es la disminución de actividad de la enzima lisosomal y su repercusión en el sistema lisosomal y de autofagia (Alcalay y cols, 2015). Sin embargo, en estudios postmortem de cerebros de pacientes EP con mutación *GBA* no se evidenció depósito lisosomal, hallazgo que va en contra de la hipótesis que considera la EP asociada a *GBA* como una variante de enfermedad por depósito lisosomal (Gegg y cols, 2015). Sin embargo, estudios en fibroblastos de pacientes EP con mutaciones N370S en *GBA* han demostrado la existencia de un acúmulo lisosomal de colesterol, pudiendo generar los denominados cuerpos multilaminares y yendo a favor de la implicación del metabolismo de lípidos en la etiopatogenia de esta forma de EP (García-Sanz y cols, 2020).

- d) Mutaciones en heterocigosis el gen *VPS35* (Vacuolar Protein Sorting 35 o *VPS35*): Inicialmente identificadas en 2011 en familias europeas con EP de herencia autosómica dominante, la frecuencia de mutación es baja en EP familiar tanto en población asiática como europea (Kim y cols, 2017). La proteína *VPS35* se localiza en el endosoma y realiza funciones de control retrógrado del tráfico vesicular (principalmente proteínas) desde el endosoma

al aparato de Golgi; sin embargo, también se ha planteado que puede realizar funciones de control vesicular en la mitocondria (Cutillo y cols, 2020). La alteración del sistema de degradación de proteínas tóxicas (como formas patológicas de  $\alpha$ -sinucleína) se ha propuesto como el principal mecanismo fisiopatológico en esta forma familiar de EP (Rahman y cols, 2019).

#### 1.2.6.2 EP familiar con patrón de herencia autosómica recesiva.

Dentro de las formas de EP familiar con patrón de herencia autosómica recesiva, destacan las siguientes:

- a) Mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta en *PRKN* o *Parkin* (gen que codifica la proteína parkina): es la causa más frecuente de EP con patrón autosómico recesivo, siendo especialmente prevalente en aquellos pacientes con edad de inicio de enfermedad inferior a 30-40 años (Tejera-Parrado y cols, 2020). En 1998 se identificó el gen y la proteína (Kitada y cols, 1998), siendo posteriormente confirmada su implicación en formas familiares de EP en diferentes poblaciones (Lücking y cols, 1998; Hendrich y cols, 2002; Marder y cols, 2010), demostrándose un mayor riesgo de mutaciones en *PRKN* en población caucásica hispana (Marder y cols, 2010). Además, se ha descrito en formas esporádicas de EP de inicio muy temprano o juvenil (Jeon y cols, 2001; Dawson y cols, 2010). A nivel fenotípico, destaca una sintomatología motora típica de EP, de curso progresivo lento, típicamente asociando distonía de miembros inferiores y, según algunos estudios, menor riesgo de complicaciones como deterioro cognitivo o disautonomía (Doherty y cols, 2013). A nivel histopatológico, se ha demostrado en estudios postmortem de pacientes EP con mutaciones en *PRKN* la neurodegeneración mesencefálica (SNpc) y en el Locus Coeruleus, sin una existencia de PL significativa siendo incluso en ocasiones ausente (Pramstaller y cols, 2005; Doherty y cols, 2013).

La parkina es una proteína tipo E3 ubiquitina-ligasa cuya principal función es la transferencia de ubiquitina a distintas proteínas diana. Por tanto, desempeña una función importante en el funcionamiento mitocondrial y del sistema ubiquitin-proteosoma (Yao y cols, 2009; Kim y cols, 2017). La ausencia de neuropatología asociada a  $\alpha$ -sinucleína en estos pacientes, hace que se plantee la hipótesis sobre una fisiopatología diferente a la de las formas esporádicas (Ahlskog y cols, 2009). Se ha propuesto que la disfunción mitocondrial, concretamente en la mitofagia, puede jugar un papel principal en la fisiopatología de las formas recesivas de EP (Rub y cols, 2017).

- b) Mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta en *PINK1* (PTEN-induced kinase 1 o PINK1): es la segunda causa más frecuente de EP de herencia autosómica recesiva a nivel global. Fenotípicamente presenta similitudes con los pacientes EP por mutaciones en *PRKN*, como la edad de inicio de EP temprana (< 40 años), la progresión lenta y una buena respuesta a levodopa mantenida en el

tiempo. Inicialmente esta forma de EP autosómica recesiva fue descrita en una familia italiana (Valente y cols, 2001), y posteriormente identificado el gen (Valente y cols, 2004). La frecuencia de mutaciones en *PINK1* en EP esporádica de inicio temprano se ha estimado entre el 4 y 7 % (Bonifati y cols, 2005). *PINK1* codifica la proteína PINK1, una proteína mitocondrial que participa en la señalización de organelas dañadas, jugando un papel fundamental en la activación de la mitofagia (Rub y cols, 2017); por ello se ha planteado como principal mecanismo fisiopatológico implicado en la neurodegeneración observada en estos pacientes.

- c) Mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta en *DJ-1* (gen que codifica a la proteína DJ-1): las deleciones o mutaciones puntuales en homocigosis en *DJ-1* causan formas de EP familiares autosómicas recesivas de inicio temprano (Bonifati y cols, 2003).

DJ-1 es una proteína pequeña expresada de manera ubicua y conformando homodímeros en el citoplasma, la mitocondria y el núcleo. Su principal función es actuar como sensor ante un incremento de estrés oxidativo, a través de un residuo cisteína situado en el dímero, y que protege a la célula frente a ROS (Dolgacheva y cols, 2019). Además de neutralizar la formación de estas ROS y el incremento de estrés oxidativo, la proteína DJ-1 también tiene actividad chaperona, proteasa y de regulación de función mitocondrial, entre otras (Guzman y cols, 2010; Biosa y cols, 2017). Se han encontrado formas inactivas de DJ-1 en muestras de pacientes con EP esporádica, sugiriendo la posible implicación de la disfunción de esta proteína en la fisiopatología, no solo en formas familiares, sino de formas esporádicas de EP (Ariga y cols, 2013). Fenotípicamente, estos pacientes presentan una EP con buena respuesta a levodopa e inicio temprano (edad de inicio < 40 años) (Kim y cols, 2017). La frecuencia de mutaciones en este gen es rara, oscilando entre 0-1% en cohortes de pacientes con EP de inicio temprano (0,8% en EP familiar y 0,4% en casos de EP esporádica) (Kilarski y cols, 2012).

- d) Otros genes de menor incidencia son: el gen codificante para la proteína F-Box Protein 7 (*FBXO7*); el gen codificante para la proteína ATPase Cation Transporting 13A2 (*ATP13A2*); o el gen que codifica para la fosfolipasa A2-β (*PLA2G6*) (Gómez-Garre y cols, 2014; Park y cols, 2015; Tejera-Parrado y cols, 2020).

La alteración de las proteínas codificada por los principales genes asociados a formas autosómicas recesivas de EP (*PRKN*, *DJ-1* o *PINK1*) se han relacionado con la disfunción mitocondrial como principal desencadenante de la cascada de estrés oxidativo y con un acúmulo de hierro, que condicionarán neurodegeneración en neuronas especialmente susceptibles como las dopaminérgicas de la SNpc en el mesencéfalo. Además, el complejo PINK1-Parkina, a través de su relación con la mitofagia, se ha relacionado con una función de protección tisular frente a isquemia



vascular tanto en el sistema nervioso como a nivel sistémico (Tang y cols. 2018; He y cols. 2018; Livingston y cols. 2019; Wen y cols. 2020).

Recientemente, la Sociedad Internacional de EP y trastornos del movimiento (*International Parkinson and Movement Disorders Society*) ha propuesto una nueva nomenclatura unificada para todos los trastornos del movimiento de origen genético, donde aquellos genes asociados a formas familiares de EP se denominan con el prefijo "PARK-" junto al nombre del gen (PARK-*SNCA*, PARK-*LRRK2*, PARK-*GBA*, PARK-*Parkin* o PARK-*DJ1*; entre otros) (Marras y cols, 2016). Actualmente, esta nueva nomenclatura propuesta para consenso internacional convive con la denominación clásica de las formas monogénicas de la enfermedad.

### 1.2.7 Factores ambientales

En cuanto a los factores ambientales o tóxicos-metabólicos que pueden influir en la fisiopatología de la EP, se cree que son diversos los que pueden alterar estos mecanismos celulares anteriormente explicados en individuos con una susceptibilidad genética determinada favoreciendo finalmente la neurodegeneración (McNaught y cols, 2006; Cohen y cols, 1994; Berg y cols, 2006).

Dentro de estos mecanismos, el aumento del estrés oxidativo genera una cascada de reacciones celulares que supone un aumento de depósito de hierro, así como disfunción mitocondrial y energética. Cuando los mecanismos de defensa endógenos no pueden resistir este estrés, los cambios neuropatológicos pueden acumularse en las neuronas dopaminérgicas, las cuales son especialmente susceptibles al déficit energético y estrés oxidativo (Kristal y cols, 2001; Lamensdorf y cols, 2000). El desequilibrio a favor del aumento del estrés oxidativo puede estar motivado por factores intrínsecos y extrínsecos. Entre los factores extrínsecos que han demostrado en estudios aumentar el estrés oxidativo, destaca la exposición a tóxicos como el MPTP, rotatone y paraquat (Betarbet y cols, 2000; Ascherio y cols, 2006). Determinadas sustancias con poder antioxidante como el ácido úrico, carotenoides, vitaminas C y E; podrían tener un efecto neuroprotector al modular el daño neuronal provocado por el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Palacios y cols, 2011; Jesús y cols, 2013; Gaenslen y cols, 2008; Etminan y cols, 2005; Zhang y cols, 2002; Miyake y cols, 2011). Sin embargo, diversos estudios han evaluado la posibilidad de emplear estas moléculas como terapias neuroprotectoras (israpidina, inosina, co-enzima Q10, quelantes de hierro, entre otras) sin demostrar ninguna de ellas una capacidad para modificar la progresión de la EP (STEADY-PD III investigators, 2020; Schwarzschild y cols, 2019; Negida y cols, 2016; Martin-Bastida A, 2017). Los resultados de ensayos con quelantes de hierro muestran en pacientes EP una disminución en el depósito de hierro en las secuencias de neuroimagen específicas para ello, sin una mejoría significativa en la progresión clínica de los pacientes (Martin-Bastida A, 2017). Otros aspectos como la neuroinflamación se ha planteado que pueda influenciar en la respuesta, proponiéndose un abordaje terapéutico que combine diversos fármacos para potenciar sus efectos (Elkouzi y cols, 2019). Como se especificó con anterioridad es posible que el uso de anti-inflamatorios

no esteroideos pueda modificar el curso de la enfermedad o la expresión de la misma en algún subgrupo de pacientes (San Luciano y cols, 2020).

Otros elementos como la dieta o el sedentarismo y la obesidad se han asociado a un mayor estrés oxidativo y con un mayor riesgo de EP (Alcalay y cols, 2012; Okubo y cols, 2012). Sin embargo, no se ha evidenciado relación entre el consumo dietético de lípidos (dieta rica en colesterol y/o grasas) y una variación en el riesgo de EP según un meta-análisis que incorporaba estudios prospectivos y casos-control (Wang y cols. 2015).

### 1.3 Expresión de Heme-oxigenasa, estrés oxidativo y metabolismo de la bilirrubina

En humanos y otros mamíferos, la degradación intracelular del grupo heme es catalizada por la familia de enzimas HO. Estas enzimas se localizan en el RE donde, asociadas al complejo NADPH-citocromo P450 reductasa, oxidan el grupo heme produciendo biliverdina, hierro libre (ion ferroso) y monóxido de carbono. La biliverdina es, a su vez, degradada por la biliverdina reductasa en bilirrubina (Figura 6) (Schipper y cols, 2009; Schipper y cols, 2015). En mamíferos existen dos isoformas de HO: la HO1 y la HO2. Mientras que la segunda isoforma (HO2), en cerebros normales, tiene una expresión amplia y ubicua en neuronas de todo el neuroeje de los mamíferos; la isoforma HO1 es expresada selectivamente por poblaciones aisladas de neuronas y neuroglia, localizadas en cerebelo (células de Purkinje), tálamo, hipotálamo, tronco del encéfalo, giro dentado y corteza cerebral (Schipper y cols, 2004). Se ha descrito que el número de células de neuroglia que presentan inmunorreactividad para HO1 aumenta progresivamente con el envejecimiento en los cerebros humanos normales (Hirose y cols, 2003).

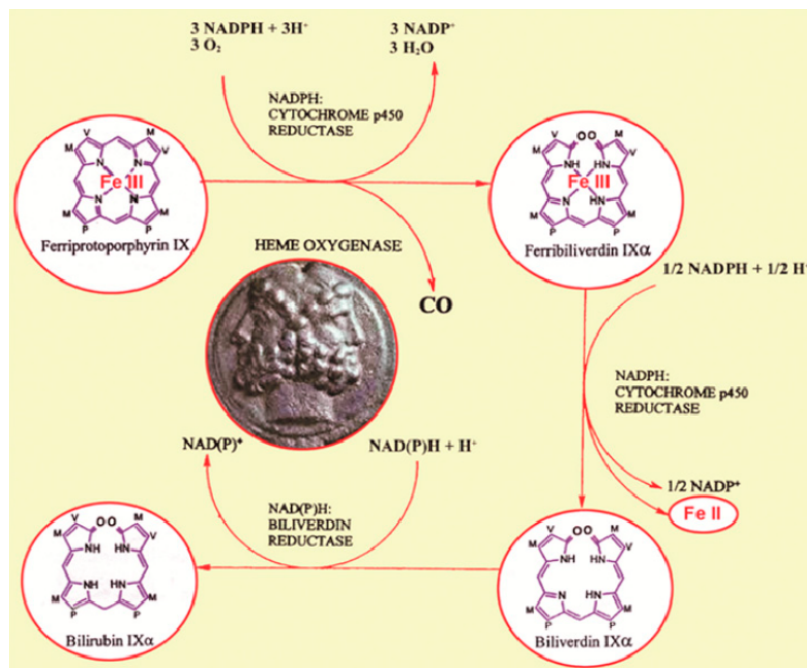


Figura 6. Vía catabólica del grupo Heme (adaptado de Schipper y cols, 2015). La degradación de este grupo da como productos: ión ferroso (Fe<sup>2+</sup>), CO y biliverdina/bilirrubina; pudiendo tener tanto efectos pro-oxidantes como antioxidantes simbolizando el doble efecto que tiene sobre la supervivencia celular la expresión de la HO.

El gen *ho-1* (*HMOX1*) se encuentra en el cromosoma 22 (cr 22q12) y contiene 4 intrones y 5 exones. Además de un promotor de 500 pares de bases, presenta en su región de regulación distintos elementos de respuesta (activator protein 1 and 2, nuclear factor kappa B, hipoxia-inducible factor 1 binding sites, heat shock consensus sequences, metal response elements, cadmium response elements and stress response elements) que proporcionan la capacidad de inducibilidad de este gen por diferentes sustancias pro-oxidantes y estímulos inflamatorios como el grupo heme,  $\beta$ -amiloide, dopamina,  $H_2O_2$ , metales pesados, luz ultravioleta, Th1 citoquinas, prostaglandinas, óxido nítrico; entre otros (Schipper y cols, 2009; Schipper y cols, 2004).

En estudios postmortem, se ha demostrado que la expresión de HO1 es similar en la SN de sujetos sanos y EP, pero en pacientes afectados de la enfermedad se ha visualizado que las neuronas dopaminérgicas con CL, presentan una expresión mayor de HO1 (Schipper y cols, 2004). Así como en los astrocitos de la SN de pacientes con EP, donde se ha demostrado un aumento significativo de la expresión de HO1 con respecto a astrocitos de la misma localización en sujetos de edad similar, hipotetizándose que sustancias pro-oxidantes (derivadas de dopamina, MPTP, neurotoxinas) inducen el aumento de expresión de esta enzima (HO1) promoviendo el acúmulo de hierro (independiente de la vía de la transferrina) y el consecuente déficit en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y déficit energético, descrito en áreas cerebrales en enfermos de Parkinson (Schipper y cols, 2015; Hirose y cols, 2003; McNaught y cols, 2006; Yamamoto y cols, 2010; Youn y cols, 2014; Rubinsztein DC, 2006; Scotter y cols, 2014).

Se ha demostrado a nivel experimental que la inducción de HO1 a nivel neural y otros tejidos tiene, en un primer momento, efecto citoprotector por su acción antioxidante y al evitar el depósito proteico anómalo, mecanismo fisiopatológico de importancia en procesos neurodegenerativos (Yamamoto y cols, 2010; Rubinsztein, 2006). Sin embargo, la inducción repetida o crónica, principalmente en astrocitos, promueve la cascada de cambios citopatológicos que consisten en aumento de estrés oxidativo, depósito de hierro, disfunción mitocondrial y de la macroautofagia característicos de enfermedades neurodegenerativas, figura 7 (Schipper y cols, 2015; Stahnke y cols, 2007). El depósito de hierro en células gliales que sobreexpresan HO1 es independiente del sistema de transferrina (fundamental para la movilización de hierro en la mayoría de tejidos de mamíferos) jugando éste escaso papel en el acúmulo patológico de este metal en áreas cerebrales de pacientes afectados de EP (Schipper y cols, 1999; Schipper y cols, 2004; Zukor y cols, 2009). El depósito de hierro en astrocitos favorece también la bioactivación no enzimática de pro-neurotoxinas (MPTP) a neurotoxinas dopaminérgicas (MPP+) por bloqueo de la enzima mono-amino oxidasa (MAO). Estas neurotoxinas (MPP+) y otros radicales libres (ROS) generados a nivel del astrocito podrían salir al espacio extracelular y producir el consecuente daño celular en neuronas vulnerables (Schipper y cols, 2004; Zukor y cols, 2009).

Como describimos con anterioridad, la disfunción de sistemas de eliminación de proteínas anómalas y autofagia contribuyen a la formación de agregados proteicos y, probablemente, a la de cuerpos de inclusión intracelulares en la EP (Rubinsztein D, 2006;

Scotter y cols, 2014). Hallazgos experimentales sugieren que el aumento de expresión de HO1 en la SNpc de EP favorece la degradación de  $\alpha$ -sinucleína evitando sus agregados proteicos (Schipper y cols, 2019; Stahnke y cols, 2007). Igualmente, este aumento de expresión de HO1 modula la homeostasis de esteroides y lípidos favoreciendo la reparación neuronal y la neuroplasticidad (Schipper y cols, 2004; Zukor y cols, 2009).

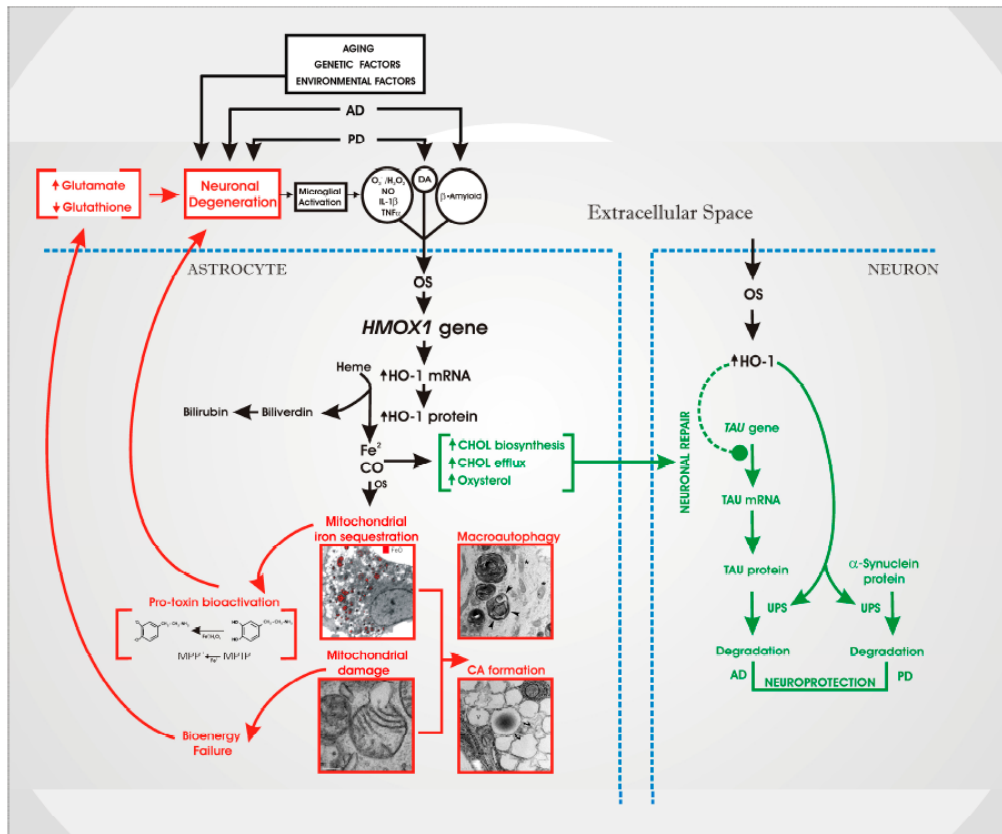


Figura 7. Papel de la enzima Heme-oxigenasa 1 en enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad (Imagen tomada de Schipper y cols, 2015).

La bilirrubina a nivel intracelular tiene un papel dual con una actividad concentración-dependiente (Ostrow y cols, 2004). En situaciones con niveles de bilirrubina intracelular bajos, actúa como un potente antioxidante. Sin embargo, un incremento de concentraciones intracelulares puede tener un efecto tóxico. Por ello, es necesario mantener adecuados niveles de bilirrubina/biliverdina a nivel intracelular que permitan el efecto antioxidante del pigmento ante incrementos de ROS por diferentes estímulos (Gazzin y cols, 2012). Existe un equilibrio dinámico entre los niveles de bilirrubina plasmática y las concentraciones de bilirrubina en tejidos extravasculares (Watchko y cols, 2013).

La bilirrubina sérica puede actuar como un eficiente antioxidante en plasma y a nivel extracelular (Stocker y cols, 1987; Llesuy y cols, 1994; Ziberna, y cols, 2016). Desde que se conoce la capacidad de inducción de HO1 por elementos de estrés oxidativo (degradando el grupo heme en los productos anteriormente descritos) se ha sugerido que, en personas con función hepática normal, los niveles de bilirrubina plasmática

pueden servir como marcador de nivel de expresión de HO1 a nivel celular (McCarty M, 2013). Sin embargo, el papel de la bilirrubina sérica en la EP ha sido escasamente estudiado, mostrando resultados controvertidos en las últimas décadas (Scigliano y cols, 1997; Qin y cols, 2014).

Se han relacionado niveles de bilirrubina total sérica con el pronóstico de pacientes con cardiopatía isquémica revascularizada (Yao y cols, 2015), planteándose que su efecto antioxidante conllevaría un mejor pronóstico. Igualmente, se ha sugerido que la bilirrubina podía jugar un papel protector para enfermedades cardiovasculares y neurológicas (Stojanov y cols, 2013, Zelenka y cols, 2016; Peng y cols, 2012). Hace décadas se describió la existencia de niveles elevados de bilirrubina en pacientes de EP comparados con controles sanos (Scigliano y cols, 1997). Posteriormente, han sido publicados estudios que van en línea con estos hallazgos, planteando que los niveles de bilirrubina en plasma pueden diferenciar pacientes con EP de sujetos sanos (Moccia y cols, 2015), sin llegar a encontrarse una clara relación con las manifestaciones motoras y no motoras, tan importantes estas últimas en el diagnóstico temprano. Estos hallazgos se han puesto en relación con la posible sobreexpresión enzimática (HO1) en el SNC de pacientes con EP ante el aumento del estrés oxidativo. Contrariamente a esta hipótesis, en una cohorte pequeña de 34 pacientes con EP donde se estudiaron marcadores séricos por técnicas metabolómicas se identificó una disminución significativa de la ratio biliverdina/bilirrubina comparado con controles (con niveles disminuidos de bilirrubina sérica), correlacionándolo además con la gravedad de la enfermedad (Hatano y cols, 2016). En esta línea, un estudio observacional en población china encontró una disminución de niveles de bilirrubina en pacientes con EP (Qin y cols, 2014).

Finalmente, se ha descrito una asociación entre los polimorfismos del gen *HMOX1* y un mayor riesgo de desarrollar EP en población europea (Ayuso y cols, 2014), lo cual se ha planteado como una posible explicación entre las diferencias en niveles plasmáticos de bilirrubina entre EP y controles sanos. Apoyando el papel que juega HO1 en la EP, Song y cols, identificaron un incremento en los niveles de expresión de HO1 en saliva de pacientes con EP comparada con controles sanos, especialmente en aquellos pacientes en estadios leves de la enfermedad, de manera independiente a la edad y el tratamiento (Song y cols, 2018).

#### 1.4 Riesgo vascular en la enfermedad de Parkinson

El riesgo a desarrollar eventos vasculares en la EP ha sido ampliamente estudiado durante las últimas décadas mediante diversos estudios epidemiológicos y observacionales (tanto retrospectivos como prospectivos). Algunos trabajos describían la influencia de la presencia de ictus y/o infarto de miocardio en la mortalidad de pacientes con EP y otros síndromes parkinsonianos (Ben-Shlomo y cols, 1995; Pennington y cols, 2010; Driver y cols, 2008). Otros estudios han intentado clarificar si la EP es un factor de riesgo para el desarrollo de eventos cardio- o cerebro-vasculares.

Mientras algunos autores no encontraron diferencias entre pacientes y controles en relación a la incidencia acumulada de ictus o encontraron una discreta reducción del riesgo de ictus en pacientes EP (Levine y cols, 1992; Nataraj y cols, 2005); otros describieron un aumento en el riesgo de ictus isquémico (Becker y cols, 2010; Patel y cols, 2011; Huang y cols, 2013; Li y cols, 2018).

Con respecto a los eventos cardiovasculares en pacientes con EP, estudios con grandes cohortes encontraron resultados contradictorios (Becker y cols, 2010; Li y cols, 2018; Liang y cols, 2015). Un estudio prospectivo en población taiwanesa mostró un aumento del riesgo de infarto de miocardio en pacientes EP, mientras que estudios epidemiológicos en población europea no han demostrado diferencias en el riesgo de evento cardiovascular entre pacientes EP y controles. Un meta-análisis reciente, que incluye 11 estudios, concluye que la EP se asocia con un aumento de riesgo de ictus isquémico; sin embargo, los autores no encontraron relación entre el diagnóstico de EP y un mayor riesgo de evento cardiovascular o mayor mortalidad de causa cardiovascular (Alves y cols, 2020), figura 8.

La relación entre los denominados factores de riesgo cardiovascular clásicos (hipertensión arterial, diabetes, hiperlipemia o tabaquismo) y la EP ha sido estudiada en numerosos estudios observacionales. Mientras se ha demostrado en repetidos estudios epidemiológicos una relación inversa entre el consumo de tabaco y la EP (Potashkin y cols, 2020); la relación entre la diabetes o la hipertensión con la EP es contradictoria. La mayoría de estudios de cohortes demuestran un modesto incremento del riesgo de EP tras el diagnóstico de diabetes, mientras la mayoría de los estudios de casos y controles no encuentran asociación o muestran incluso una disminución del riesgo de EP en diabéticos. Esta discordancia de efectos entre estudios se ha evidenciado en diversos meta-análisis (Yue y cols, 2016; Lu y cols, 2014; Cereda y cols, 2011). Se han planteado como posibles explicaciones, la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas o un sesgo de supervivencia asociado a una mayor mortalidad entre los pacientes diabéticos.

Los estudios que han descrito la relación de la hipertensión arterial tampoco han mostrado resultados sugestivos de una relación causal evidente. Diversos estudios tipo caso-control encontraron resultados contradictorios (Vikdahl y cols, 2015; Savica y cols, 2012; Miyake y cols, 2010; Becker y cols, 2008; Powers y cols, 2006; Scigliano y cols, 2006; Paganini-Hill 2001; McCann y cols, 1998), mientras que un estudio de cohortes encontró un incremento de riesgo de EP en mujeres hipertensas (Qiu y cols, 2011). Sin embargo, otros dos estudios observacionales no encontraron asociación alguna (Grandinetti y cols, 1994; Simon y cols, 2007). Finalmente, un estudio caso-control en población china encontró un incremento de riesgo de EP en hipertensos (Ng y cols, 2021). Estos resultados no pudieron replicarse en el meta-análisis que realizaron los mismos autores, sugiriendo una influencia de las diferencias étnicas en estas divergencias.

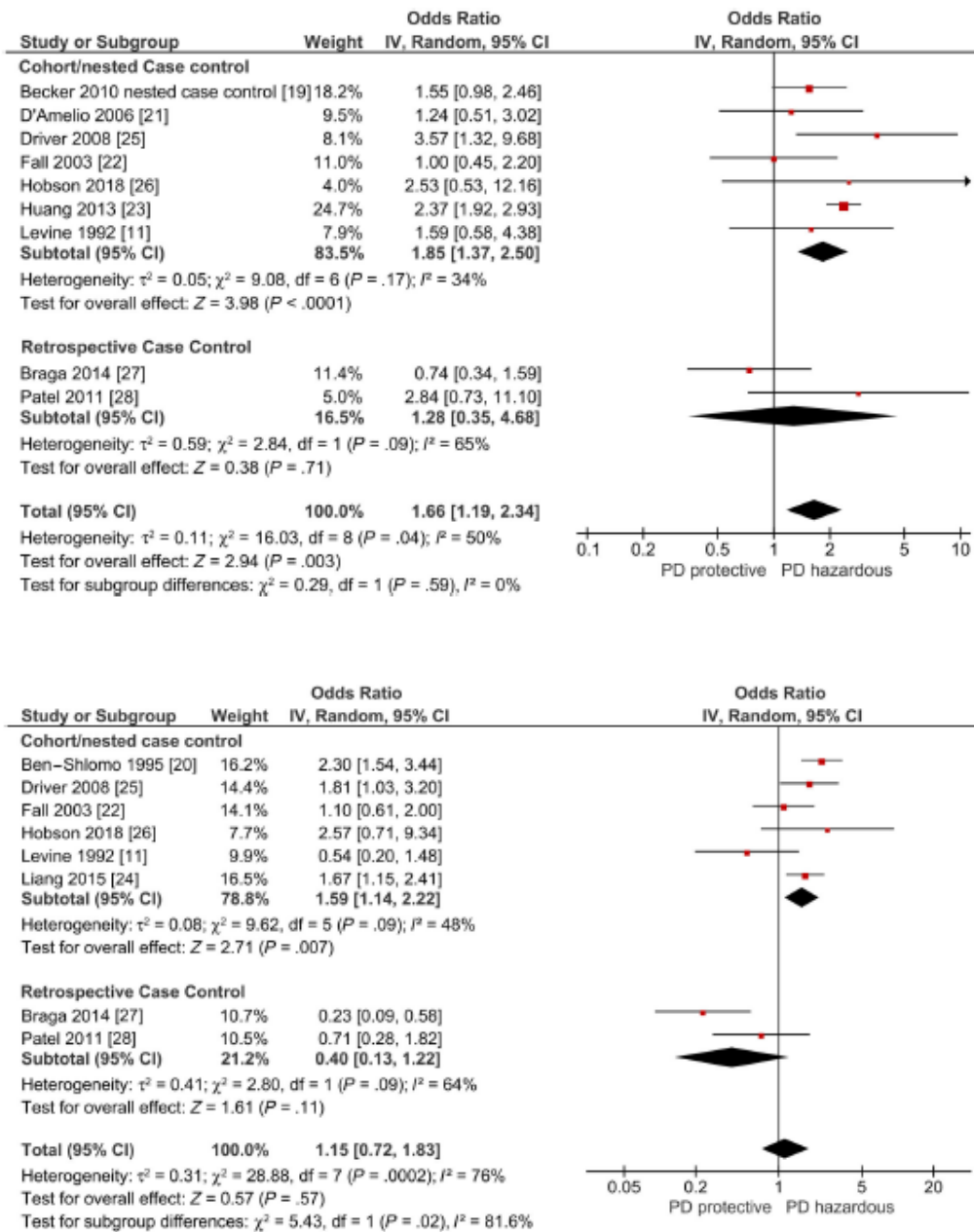


Figura 8. Forest plot resultantes del meta-análisis de riesgo vascular en pacientes con enfermedad de Parkinson (tomado de Alves y Cols, 2020). En el gráfico superior se muestra el forest plot para ictus isquémico y en el gráfico inferior para infarto de miocardio.

La relación del metabolismo del colesterol y la EP ya ha sido descrita previamente en este trabajo, sin embargo, expondremos la relación entre el uso de estatinas (inhibidores de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa y principal terapia farmacológica para la hipercolesterolemia) y el riesgo de EP.

Se ha planteado que esta terapia podría tener tanto una capacidad neuroprotectora como aceleradora de la clínica parkinsoniana, debido a que existen resultados



contradictorios que pueden resultar difíciles de interpretar en conjunto. Diversos estudios observacionales (estudios de casos y controles y de cohortes) han demostrado una relación inversa entre la toma de estatinas y el diagnóstico de EP, sugiriendo un posible efecto neuroprotector (Lin y cols, 2016; Gao y cols, 2012; Wahner y cols, 2008; Ritz y cols, 2010), y apoyando esta asociación dos metanálisis (Sheng y cols, 2016; Bai y cols, 2015). Sin embargo, existe riesgo de sesgos de publicación y heterogeneidad en ambos meta-análisis. La mayoría de los estudios antes citados tienen una aproximación epidemiológica, donde el diagnóstico de EP viene dado por registros poblacionales y el de estatinas por prescripción farmacéutica y no por consumo confirmado. Además, mientras algunos encuentran resultados en sujetos menores de 60 años (Gao y cols, 2012), otros solo en mujeres de edad avanzada (Lee y cols, 2013), en población diabética (Lin y cols, 2016) o únicamente con algún tipo de estatina. Por el contrario, otros trabajos (prospectivos de cohortes y estudios de casos-controles) han demostrado una mayor incidencia de diagnóstico de EP entre consumidores de estatinas (Huang y cols, 2015; Liu y cols, 2017; Jeong y cols, 2019). Estos autores explican que esta relación puede responder a la relación inversa descrita entre niveles elevados de colesterol total (así como de LDL) y EP. Supone difícil establecer una relación causal entre la toma de estatinas y la EP, ya que como describen los autores en algunos estudios el aumento de riesgo para EP aparece exclusivamente con una toma corta de estatinas (< 1 años), mientras que en otros trabajos únicamente en aquellos de toma mantenida (> 5 años o dosis altas). Igualmente, describen que podría existir un riesgo únicamente asociado a algún tipo de estatina (concretamente del tipo lipofílicas: atorvastatina, simvastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina) (Liu y cols, 2017). Un meta-análisis que agrupa los trabajos en función de aquellos que ajustan en su modelo estadístico según niveles de colesterol, mostró que la correlación entre la toma de estatinas y el diagnóstico de EP estaba condicionada por los niveles de colesterol (Bykov y cols, 2017). Por ello, concluyen que el aparente efecto protector de las estatinas en el riesgo de EP puede estar condicionado por la indicación de toma de estatinas (hiperlipemia) y no por la propia acción del fármaco, ya que este efecto no se observa en aquellos estudios que tienen en cuenta los niveles de colesterol en el modelo de análisis estadístico. Como expusimos con anterioridad, los niveles séricos de colesterol total y lipoproteínas (como LDL) se han descrito como disminuidos en la EP encontrándose una relación de causalidad en estudios de randomización mendeliana (Fang y cols, 2019). Estos estudios buscan inferir una posible asociación causal entre una exposición y un evento o enfermedad, usando información genética de ambos. En el contexto de estudios de secuenciación tipo GWAS, los estudios de randomización mendeliana normalmente comparan dos conjuntos de datos independientes, uno representando la exposición y otro el evento de interés. Esta comparación aporta una visión sobre la causalidad del efecto en el evento o enfermedad estudiada (Blauwendraat y cols, 2019). Finalmente, dos estudios con esta misma aproximación no encontraron una relación de causalidad entre el consumo de estatinas y el riesgo/protección frente a la EP (Williams y cols, 2020; Liu y cols, 2021)



Por todo lo anteriormente expuesto, se ha planteado que puedan existir otros factores, distintos a los factores de riesgo vascular clásicos implicados en la relación entre la patología cerebrovascular y la EP. Ejemplo de estos mecanismos propuestos son el estrés oxidativo, la neuroinflamación o la alteración del metabolismo lipídico y proteico, entre otros (Potashkin y cols, 2020).

Estudios en modelos animales de EP han concluido en un posible efecto cardioprotector de proteínas implicadas en formas monogénicas recesivas de la EP, como parkina, PINK1 o DJ1 (Mukherjee y cols, 2015). Otros autores sugieren que variantes del gen *LRRK2* contribuyen al daño neuronal post-isquémico y promueven la neuroinflamación (Kim y cols, 2017; Kim y cols, 2020). Finalmente, un estudio GWAS demostró que ciertos genes asociados a ictus isquémico y EP eran compartidos, apoyando la idea de mecanismos moleculares comunes entre ambos trastornos neurológicos (Lang y cols, 2019). Por el contrario, otros autores han estudiado el riesgo vascular (objetivado mediante el síndrome metabólico) en formas familiares de EP (pacientes con EP y mutaciones en *GBA* y *LRRK2*), sin encontrar diferencias con las formas esporádicas (Thaler y cols, 2020). Sin embargo, actualmente se desconoce la implicación de los mecanismos fisiopatológicos de las formas familiares de la EP en el riesgo vascular de estos pacientes, y si estos desempeñan un papel también en el riesgo vascular de los pacientes con EP esporádica.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS DE TRABAJO

La EP es una enfermedad entendida como de origen multifactorial y fenotípicamente heterogénea. Desde el punto de vista fisiopatológico es interesante conocer qué mecanismos subyacen en estos pacientes con idea de obtener un mejor entendimiento de la etiología de la enfermedad. Existen mecanismos, como el estrés oxidativo, claramente relacionados con la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas y siendo posiblemente uno de los mecanismos comunes a las distintas formas de EP. Sin embargo, estrategias terapéuticas en pacientes con EP frente a estos mecanismos comunes no han demostrado hasta la fecha eficacia en la modificación del curso de enfermedad. Otros mecanismos fisiopatológicos como la alteración del metabolismo lipídico pueden estar implicados predominantemente en formas familiares específicas de la EP frente a formas esporádicas, sirviendo para identificar posibles biomarcadores y dianas terapéuticas específicas. Consecuentemente, se ha planteado la importancia y utilidad de identificar biomarcadores periféricos específicos de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes de la neurodegeneración, que permitan monitorizar futuras terapias de medicina personalizada.

Nuestra hipótesis se basa en la existencia de biomarcadores séricos diagnósticos de la EP relacionados con diversos mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad. Considerándose los niveles de bilirrubina sérica un posible biomarcador de estrés oxidativo, planteamos la posible existencia de diferencias en los niveles séricos de bilirrubina entre pacientes con EP y controles sanos. Además, debido a las posibles diferencias en mecanismos fisiopatológicos implicados en las formas esporádicas y familiares de la EP, planteamos que el perfil lipídico sérico podría variar entre los pacientes con las distintas formas de la enfermedad. Por último, como consecuencia de estas diferencias en la etiopatogenia de la enfermedad, el riesgo vascular hasta la fecha descrito en la EP podría diferir entre los diversos subtipos de pacientes con EP, pudiendo tener implicaciones en nuestra práctica clínica diaria.

Para obtener una visión del papel de biomarcadores séricos en relación con el estrés oxidativo y metabolismo lipídico en la etiopatogenia de la EP, así como la influencia de la etiopatogenia de las formas familiares de EP en el riesgo vascular, se plantean los siguientes objetivos.

## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es ampliar el conocimiento existente en la etiopatogenia de la EP mediante identificación de biomarcadores séricos relacionados con el estrés oxidativo y el metabolismo lipídico. De igual modo, se plantea profundizar en el estudio del metabolismo lipídico y riesgo vascular en la EP y analizar si, en nuestra población, estos se ven influenciados por las características genéticas de los pacientes diferenciándose entre formas esporádicas y familiares de la enfermedad. Para ello, nos proponemos analizar biomarcadores moleculares séricos como la bilirrubina total y el perfil lipídico, así como registrar los diversos eventos vasculares en los pacientes con EP de nuestra población y correlacionarlos con sus características clínicas y genéticas.

Para conseguir estos objetivos, se plantean objetivos específicos:

- Estudiar los niveles de bilirrubina total sérica en pacientes con EP y controles sanos.
- Analizar si existe una relación entre los niveles de bilirrubina total sérica y la progresión/severidad de los pacientes con EP.
- Analizar si existe una relación entre los niveles de bilirrubina total sérica y el tratamiento dopaminérgico en los pacientes con EP.
- Estudiar el perfil lipídico sérico (colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas de alta /baja densidad) en pacientes con EP comparado con controles sanos.
- Estudiar si el perfil lipídico sérico (colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas de alta /baja densidad) difiere entre las formas esporádicas y las formas familiares más frecuentes de la EP, así como con controles sanos.
- Estudiar la prevalencia de factores de riesgo vascular y eventos vasculares (ictus isquémico y cardiopatía isquémica) en pacientes con EP esporádica y familiar.
- Analizar si las características, gravedad y edad de evento vascular se ven influenciadas por la etiología genética de los pacientes con EP.

### 3. RESUMEN DE MATERIAL Y MÉTODOS

#### Increased bilirubin levels in Parkinson's disease

En este trabajo se incluyeron 420 pacientes con EP (56% varones, con una edad media:  $64 \pm 12$  años) y 435 controles sanos (47% varones, con una edad media:  $58 \pm 17$  años). Los pacientes incluidos eran pacientes con EP en seguimiento en la Unidad de Trastornos del Movimiento del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, España. Los controles sanos fueron individuos voluntarios de los centros de salud de la misma área geográfica a la que pertenecían los pacientes EP y sin parentesco con estos. El diagnóstico de EP se realizó en base a los criterios “*United Kingdom Parkinson's Disease Society Brian Bank criteria*” (Hughes y cols, 1992). Se consideró como criterio de exclusión cualquier condición que pudieran alterar las concentraciones de bilirrubina sérica (tratamiento con hipolipemiantes y/o quimioterápicos; alcoholismo; enfermedad hepática activa; anemia hemolítica reciente o historia de cirugía biliar o cólicos biliares). En el grupo de controles sanos, se excluyeron además aquellos individuos con cualquier problema neurológico.

Se recogieron datos demográficos y clínicos de los individuos de ambos grupos de estudio. La severidad de la EP se cuantificó mediante la escala modificada de Hoehn & Yahr (HY), clasificándose la población de pacientes EP en tres grupos según su estadio HY (grupo 1: HY 1-2; grupo 2= HY 2,5-3); y grupo 3= HY 4-5). Se recogió información del tipo de terapia dopaminérgica y de la dosis equivalente diaria de levodopa de cada paciente. La determinación de bilirrubina total, perfil hepático, renal y hemograma se realizó en sangre periférica y se analizó en el laboratorio de nuestro hospital.

Los niveles de bilirrubina total sérica, hemoglobina y marcadores de función hepática se analizaron y compararon entre grupos mediante un modelo de regresión lineal multivariante ajustado por sexo y la edad. De manera adicional, comparamos los niveles de bilirrubina sérica entre ambos grupos en un modelo multivariante ajustado también por los niveles de enzimas hepáticas y hemoglobina. Los datos demográficos se compararon usando el test estadístico Chi-cuadrado.

Se analizó la relación entre los niveles de bilirrubina sérica y las características de la enfermedad en el grupo EP (duración y severidad de EP, tratamiento dopaminérgico) mediante un modelo de regresión lineal ajustado por posibles variables confusoras. Se consideró un valor  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo. Los análisis fueron realizados usando el software estadístico IBM SPSS versión 24.0. El estudio fue aprobado por el comité de ética de nuestro hospital y todos los individuos incluidos firmaron un consentimiento informado.

## Serum lipid profile among sporadic and familial forms of Parkinson's disease

En este trabajo se incluyeron 403 pacientes EP, clasificados en 3 subgrupos: 342 EP esporádica, 30 EP asociada a mutaciones en *GBA* (EP-*GBA*) y 31 EP asociados a mutaciones en *LRRK2* (EP-*LRRK2*). Además, se incluyó un grupo de controles sanos con 654 sujetos. Todos los individuos incluidos eran caucásicos para evitar influencias étnicas en el perfil lipídico. Los pacientes EP fueron reclutados de la Unidad de Trastornos del Movimiento del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla (España). El diagnóstico de EP se realizó siguiendo los criterios *Movement Disorder Society Clinical Diagnostic Criteria* (Postuma y cols. 2015). Los controles sanos fueron reclutados de la misma área geográfica que los pacientes EP y no fueron considerados para el estudio si tenían alguna enfermedad neurodegenerativa, historia familiar de EP o una variante patogénica en los genes *GBA* o *LRRK2*. Los pacientes con EP esporádica no se consideraron para el estudio si tenían variantes patogénicas en los genes asociados a formas familiares de EP. Recibir tratamiento con terapias modificadoras de los niveles séricos de lípidos fue considerado criterio de exclusión para todos los individuos del estudio, y la existencia de historia familiar de EP fue criterio de exclusión para los pacientes con EP esporádica. Se obtuvo consentimiento informado del comité de ética de nuestro hospital y consentimiento informado de los participantes en el estudio.

Se realizó una evaluación clínica y entrevista para recogida de los datos demográficos, completándose estos mediante revisión retrospectiva de sus antecedentes médicos cuando fue necesario. Los niveles séricos de colesterol total, lipoproteínas y triglicéridos fueron determinados en sangre periférica en el laboratorio de nuestro hospital.

Se realizó la extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica de los individuos mediante métodos estandarizados y automatizados (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche, Maxwell 16 System, Promega Corporation, Madison, WI, USA; MagNA Pure LC, Roche Diagnostics, Indianapolis) siguiendo protocolos establecidos. El análisis de los genes *GBA* y *LRRK2* se realizó usando una combinación de High-resolution melting (HRM) y secuenciación ADN, procedimientos descritos en anteriores trabajos de nuestro grupo (Jesus y cols, 2016; Gao y cols, 2009).

Las variables categóricas se compararon entre grupos mediante el test estadístico Chi-cuadrado y/o test exacto de Fisher. Inicialmente comparamos el perfil lipídico sérico entre el total de pacientes EP y controles sanos mediante regresión lineal multivariante ajustado por sexo y edad. La homogeneidad de varianza se analizó mediante el test estadístico de Levene. Posteriormente, comparamos el perfil lipídico sérico entre los distintos subgrupos de EP y controles sanos mediante el análisis de covarianza (ANCOVA), considerando la edad y el sexo como covariables. Tras ello, empleamos análisis post-hoc para la realización de comparaciones múltiples entre grupos. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software estadístico IBM SPSS (versión 26.0

para Windows; IBM, Armonk NY) y el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.). Se consideró un valor de p inferior a 0,05 como estadísticamente significativo.

#### Increased stroke risk in Parkinson's disease patients with *LRRK2* mutations

En este trabajo se incluyeron pacientes con EP esporádica y las principales formas familiares de EP (EP-*GBA*; EP-*LRRK2*; y EP asociada a mutaciones en *Parkina* o EP-*PRKN*) en seguimiento en las consultas de la Unidad de Trastornos del Movimiento del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla (España). Adicionalmente, se incluyeron sujetos control de la misma área geográfica que los pacientes, sin antecedente de enfermedad neurodegenerativa, historia familiar de EP, ni mutación en los genes asociados a formas de EP. La EP fue diagnosticada siguiendo los criterios actualizados de la *Movement Disorder Society* (Postuma y cols. 2015). Pacientes con mutaciones en otros genes asociados a EP distintos a los considerados no se incluyeron en el estudio. Todas las variantes genéticas fueron clasificadas de acuerdo a la *American Society of Human Genetics guidelines*; y todos los sujetos incluidos fueron de origen caucásico para evitar influencias étnicas en el riesgo vascular analizado.

Se incluyó una cohorte con 1108 individuos, divididos en 5 grupos: 362 EP esporádica, 38 EP-*GBA*, 36 EP-*LRRK2*, 23 EP-*PRKN* y 649 controles. Se realizó una evaluación clínica en nuestro centro, con recogida retrospectiva de datos demográficos y de riesgo vascular, completándose estos con datos de los registros médicos de los individuos en los casos necesarios. Para considerar la presencia de eventos vasculares sintomáticos (tanto cerebrovasculares o ictus isquémicos, como cardiovasculares o cardiopatía isquémica) fue necesario haber tenido un diagnóstico por un especialista médico (en neurología o cardiología, respectivamente). Además, para el diagnóstico de ictus isquémico, fue necesaria la presencia de hallazgos radiológicos confirmatorios en una prueba de neuroimagen. Se clasificaron los tipos de ictus isquémico según la clasificación internacional *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST)*, en 4 categorías: infarto lacunar, aterotrombótico, cardioembólico y criptogénico; añadiéndose la categoría accidente isquémico transitorio. El estudio fue aprobado por el comité de ética local de nuestro hospital y, los participantes firmaron consentimiento informado.

El análisis genético de *GBA*, *LRRK2* y *PRKN* se realizó según los procedimientos indicados anteriormente.

Se usaron los test estadísticos de Chi-cuadrado y/o test exacto de Fisher para comparar variables categóricas entre grupos. Se aplicaron modelos de regresión logística multivariante para analizar la relación entre el riesgo vascular (presencia de ictus isquémico y presencia de cardiopatía isquémica) y los distintos grupos de estudio, controlando por posibles variables confusoras. Se utilizaron los odds ratio (OR) ajustados, junto a intervalos de confianza (IC) al 95%, para estimar el riesgo de un evento vascular en los grupos EP comparado con controles. Se utilizaron análisis de supervivencia mediante regresión de Cox para analizar la asociación entre los grupos de

estudio y la existencia de un evento vascular como un acontecimiento tiempo-dependiente, censurando por edad de última visita o edad de fallecimiento. Estos análisis para la variable ictus isquémico se repitieron en un análisis confirmatorio, para el cual sólo se incluyeron sujetos que tuvieron accesible en su registro médico electrónico una prueba de neuroimagen que confirmara la presencia o ausencia de evento isquémico. Los análisis se realizaron usando el software estadístico SPSS (v. 26.0 para Windows; IBM, Armonk, NY, USA) y el software R studio package. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 4. RESUMEN DE RESULTADOS

En esta sección, los resultados obtenidos en los trabajos presentados en esta tesis se resumirán brevemente.

### Increased bilirubin levels in Parkinson's disease

En este trabajo se investigó las diferencias en los niveles de bilirrubina total sérica entre los pacientes con EP y controles sanos, así como la relación de estos niveles con las características clínicas de los pacientes EP. En este trabajo se evidenció que:

- Los niveles de bilirrubina total sérica diferían entre los pacientes con EP y controles sanos, siendo mayores en los primeros (EP:  $0,56 \pm 0,26$  mg/dl; controles sanos:  $0,45 \pm 0,22$  mg/dl;  $p < 0,001$ ) tras ajustar por sexo, edad, enzimas hepáticas y niveles de hemoglobina.
- En los pacientes EP con menor severidad clínica (estadios Hoehn & Yahr igual o inferior a 3) existían niveles más elevados de bilirrubina total sérica que en aquellos con un estadio de enfermedad más avanzado.
- En los pacientes con EP existía una correlación negativa débil entre los niveles de bilirrubina sérica y la duración de la enfermedad ( $p < 0,05$ ).
- No existía relación entre los niveles de bilirrubina sérica y el tipo de terapia dopaminérgica o la dosis equivalente de levodopa diaria que recibían los pacientes con EP.



## Serum lipid profile among sporadic and familial forms of Parkinson's disease

En este trabajo se investigó si el perfil lipídico sérico podía diferir entre las principales formas familiares de EP y las formas esporádicas de la enfermedad, quizás como consecuencia de las diferencias en la etiopatogenia de estas formas. En este trabajo se evidenció que:

- En el grupo total de pacientes con EP (formas esporádicas más familiares) se encontraron niveles inferiores de colesterol total y triglicéridos, comparado con controles sanos.
- Los pacientes con EP-*GBA* mostraban un perfil lipídico distinto del resto de grupos, mostrando unos niveles tanto de colesterol total como de lipoproteína de baja densidad significativamente inferiores a los encontrados en controles sanos y EP-*LRRK2*.
- Los pacientes con EP-*GBA* mostraban unos niveles de lipoproteína de baja densidad inferiores a pacientes con EP esporádica, siendo estas diferencias tendentes a la significación ( $p < 0,1$ ).
- Los pacientes con EP esporádica mostraban niveles de triglicéridos significativamente inferiores a controles sanos. Sin embargo, no existían diferencias ni en triglicéridos ni en otras lipoproteínas séricas entre formas esporádicas y familiares de EP.

## Increased stroke risk in Parkinson's disease patients with *LRRK2* mutations

En este artículo se analizó el riesgo vascular (presencia de evento clínico isquémico tanto cerebrovascular como cardiovascular) en pacientes con formas esporádicas de EP y las principales formas familiares de la EP. En este trabajo se evidenció que:

- La prevalencia de ictus isquémico era diferente entre los grupos, siendo los pacientes con EP-*LRRK2* aquellos con una prevalencia significativamente mayor al resto (13,8%) tras corregir por edad, sexo y factores de riesgo vascular.
- Los pacientes EP-*LRRK2* mostraban un incremento significativo del riesgo de ictus isquémico comparado con controles (OR 5,1; 95% IC 1,7-15,3;  $p = 0,004$ ), no evidenciándose otras diferencias significativas en el resto de grupos.
- En el subanálisis realizado con aquellos individuos que disponían de neuroimagen, se confirmó este incremento de riesgo para ictus isquémico en pacientes EP-*LRRK2* (OR 3,4; 95% IC 1,3-8,9;  $p = 0,02$ ), y también se encontró un incremento de riesgo en pacientes con EP esporádica (OR 1,8; 95% IC 0,99-3,2;  $p=0,05$ ) comparado con controles.
- El incremento de riesgo de ictus isquémico en los pacientes EP-*LRRK2* comparado con controles se asoció con una menor edad en el momento del evento cerebrovascular en los análisis de supervivencia mediante regresión de Cox ( $p= 0,004$ ).
- El tipo de ictus isquémico más frecuente en los pacientes con EP-*LRRK2* y EP esporádica fue de tipo lacunar, sin evidenciarse una mayor gravedad clínica en estos pacientes de manera estadísticamente significativa.
- No existían diferencias en factores de riesgo vascular o en la presencia de cardiopatía isquémica entre grupos, salvo por una menor tasa de hipertensión arterial en los pacientes con EP-*PRKN*.

## 5. PUBLICACIONES

## Increased bilirubin levels in Parkinson's disease

Publicado como:

**Macias-Garcia D**, Mendez-Del Barrio C, Jesús S, Labrador MA, Adarmes-Gómez A, Vargas-Gonzalez L, Carrillo F, Gómez-Garre P, Mir P. Increased bilirubin levels in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2019; 63: 213-6.  
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.01.012>



## Short communication

## Increased bilirubin levels in Parkinson's disease

Daniel Macías-García<sup>a</sup>, Carlota Méndez-Del Barrio<sup>a</sup>, Silvia Jesús<sup>a</sup>, Miguel Angel Labrador<sup>a</sup>, Astrid Adarmes-Gómez<sup>a</sup>, Laura Vargas-González<sup>a</sup>, Fátima Carrillo<sup>a</sup>, Pilar Gómez-Garre<sup>a,b</sup>, Pablo Mir<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Trastornos del Movimiento, Servicio de Neurología y Neurofisiología Clínica, Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Seville, Spain

<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Bilirubin  
Parkinson's disease  
Pathophysiology  
Heme oxygenase 1

## ABSTRACT

**Introduction:** Oxidative stress plays a key role in Parkinson's disease (PD) etiopathology. Heme oxygenase, an important enzyme which regulates oxidative balance, converts heme molecules into carbon monoxide, iron and biliverdin/bilirubin. The role of bilirubin has not been fully studied in PD, showing controversial results over the last few decades. Our aim was to investigate the relationship between bilirubin levels and PD. Secondly, we sought to evaluate the link between bilirubin concentration with PD progression, severity and dopaminergic treatment.

**Methods:** We included 420 PD patients (56% males, mean age:  $64 \pm 12$  years) and 435 healthy controls (47% males, mean age:  $58 \pm 17$  years). Bilirubin levels in both groups were compared using linear regression and multivariate analysis adjusted according to age and sex. Secondly, a case study with the PD cohort was carried out and bilirubin levels were correlated with current treatment, duration and severity of disease.

**Results:** Bilirubin levels were significantly higher in PD patients than in controls (PD:  $0.56 \pm 0.26$  mg/dl, controls:  $0.45 \pm 0.22$  mg/dl;  $p < 0.001$ ). In PD patients, we demonstrated a negative correlation between bilirubin levels and disease duration ( $p < 0.05$ ). Higher bilirubin concentrations were identified in PD patients with Hoehn & Yahr stage  $\leq 3$ . No relationship between bilirubin and treatment was found in PD patients.

**Conclusions:** Increased bilirubin levels are particularly related to the first years of PD. Overexpression of oxidative enzymes could play an important role in PD etiology, leading to higher bilirubin levels in the early stages of PD.

## 1. Introduction

Parkinson's Disease (PD) is one of the most common neurodegenerative disorders. Although its pathogenesis is widely studied, the role of many genetic and environmental factors remains unknown [1,2]. Oxidative stress is thought to play a key role in PD etiopathology and is commonly understood as an imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and the cellular antioxidant mechanisms [1]. Heme oxygenase (HO) is an important enzyme which regulates oxidative balance, with overexpression in dopaminergic cells exposed to oxidative stress [3]. HO converts heme molecules into carbon monoxide, iron and biliverdin/bilirubin. Bilirubin is considered to be a natural antioxidant and its serum concentration has been considered as a possible marker of HO isoform 1 (HO-1) activity [4,5]. Bilirubin plays a dual intracellular role with a concentration-dependent activity.

Bilirubin acts as a potent ROS scavenger in situations with lower intracellular levels. However, increased intracellular concentration may have a toxic effect. There is a dynamic equilibrium between plasmatic bilirubin levels and bilirubin concentration in extravascular tissues [6]. The role of bilirubin has not been fully studied in PD, and has shown controversial results over the last few decades [7–9]. Although it has been suggested that bilirubin plays a protective role in cardiovascular disease and other disorders [10], recent studies have found increased levels of bilirubin in newly-diagnosed PD patients [9].

From the point of view of pathogenic factors in PD, levels of bilirubin and HO-1 expression is a new pathway that should be studied. Our study aimed to investigate the relationship between serum bilirubin concentration and PD. Secondly, we sought to study the relationship between bilirubin levels and severity of disease and dopaminergic replacement therapy in PD.

\* Corresponding author. Unidad de Trastornos del Movimiento, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, Av. Manuel Siurot s/n, 41013, Seville, Spain.

E-mail address: [pmir@us.es](mailto:pmir@us.es) (P. Mir).

<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.01.012>

Received 15 May 2018; Received in revised form 21 December 2018; Accepted 12 January 2019

1353-8020/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 2. Methods

We included 420 PD patients (56% males, mean age:  $64 \pm 12$  years) and 435 healthy controls (47% males, mean age:  $58 \pm 17$  years). Patients were recruited from the Movement Disorder Clinic at Hospital Universitario Virgen del Rocío in Seville, Spain. Healthy controls were non-blood relatives of PD patients and volunteers from the primary care centers in the same geographical area as the PD patients. The diagnosis of PD patients was made using the United Kingdom Parkinson's Disease Society Brian Bank criteria. Exclusion criteria were any conditions that could affect serum bilirubin concentration. Firstly, we excluded subjects who had treatment with statins or chemotherapy, alcoholism, liver disease, biliary surgery or history of biliary colic, and recent hemolytic anemia. To avoid the influence of the well-known bilirubin-induced neurotoxicity, we excluded subjects with bilirubin levels high enough to produce it (serum bilirubin concentration  $> 2$  mg/dl). Additionally, in the healthy control group, we considered as exclusion criterion the presence of any relevant neurological disease. Demographic and clinical data as well as current treatment was recorded in both groups. To assess the severity of the disease, we used the modified Hoehn & Yahr scale (HY) and we gathered our PD population into three groups depending on HY stage (group 1 = HY 1–2; group 2 = HY 2.5–3; and group 3 = HY 4–5). In addition, data regarding dopaminergic replacement therapy was recorded. Serum total bilirubin concentration was determined in peripheral blood and analyzed in the laboratory of our Hospital.

Total bilirubin levels, hemoglobin concentration and tracers of liver function were compared in both groups by linear regression with multivariate analysis adjusted according to age and sex. Additionally, we compared bilirubin levels in both groups with multivariate analysis adjusted according to liver enzymes and hemoglobin in order to avoid confounding factors. To determine if the difference in bilirubin levels was linked to specific disease states, we compared bilirubin concentration in different HY groups to controls with multivariate analysis. However, correlation with motor stage of patients (Unified Parkinson's Disease Rating Scale – Part III) was not possible due to these data not being available for many patients. Demographic data was compared between PD and controls by Chi-square. We designed an age- and sex-matched control set in order to compare bilirubin levels between groups avoiding other possible confounding factors associated with sex or age (View Supplemental Material Methods).

In the PD group, we used bivariate linear regression to analyze the relationship between bilirubin levels and disease duration, treatment and demographics variables adjusted according to confounding variables. Results were considered statistically significant for  $p < 0.05$ .

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics software version 24.0. The study was approved by the local ethics committee, and written consent was obtained from all patients and healthy controls participating in the study.

## 3. Results

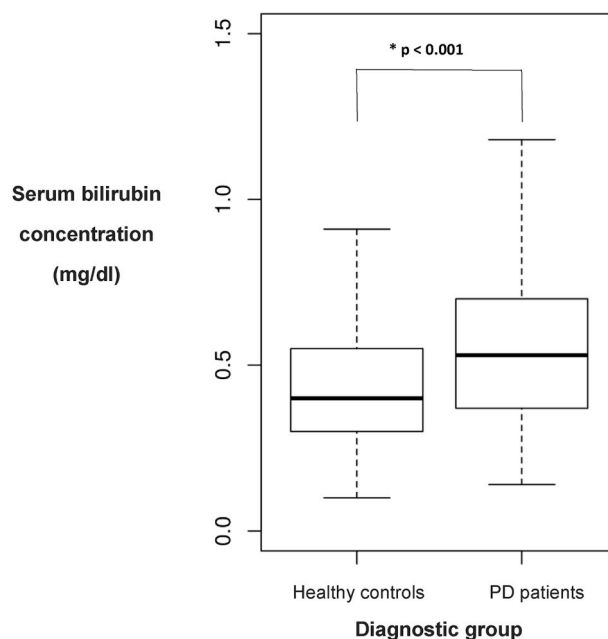
Demographic data and serum bilirubin levels are shown in Table 1. PD patients showed statistically significant higher serum bilirubin levels than healthy controls ( $0.56 \pm 0.26$  mg/dl vs  $0.45 \pm 0.22$  mg/dl;  $p < 0.001$ ). No difference in hemoglobin levels was found between groups; however, liver enzymes were slightly higher in controls than in PD patients (Table 1). The difference in bilirubin levels remained significant ( $p < 0.001$ ) after adjusting according to age, sex, liver enzymes and hemoglobin (Fig. 1). Furthermore, this difference amongst groups was observed after repeating the analysis in our age- and sex-matched control set (Supplemental material – Table S1). When we compared bilirubin levels among PD patients with a different HY group and controls, we found that those on mild and moderate stages ( $HY \leq 3$ ) had higher bilirubin levels than controls. These results remained statistically significant after adjusting according to age, sex,

**Table 1**

Demographic data, liver profile and serum bilirubin levels in controls and PD patients.

	Healthy Controls (N = 435)	PD patients (N = 420)	P value	Laboratory reference values
Age (years $\pm$ SD)	$58 \pm 17$	$64 \pm 12$	$< 0.001$	–
Sex (% ♂/% ♀)	47%/53%	56%/44%	0.005	–
Serum bilirubin Concentration (mg/dl)	$0.45 \pm 0.22$	$0.56 \pm 0.26$	$< 0.001^*$	0.2–1.2
GOT (IU/l)	23.3	17.7	0.07	10–40
GPT (IU/l)	20.6	14.4	$< 0.05$	10–40
GGT (IU/l)	26.2	22.7	$< 0.05$	10–50
Hemoglobin (g/l)	139,9	139,3	0.63	136–180

\* Adjusted according to sex, age, liver enzymes and hemoglobin.



**Fig. 1. Difference in bilirubin concentration between healthy controls and PD patients.** A boxplot diagram shows the difference in bilirubin concentration between healthy controls and PD determined by linear regression, \*adjusted according to age, sex, liver enzymes and hemoglobin.

liver enzymes and hemoglobin (Supplemental material - Table S2).

In the PD group, we did not find a significant association between bilirubin levels and age, type of dopaminergic treatment (levodopa treatment, dopamine agonist treatment) or levodopa equivalent daily dose (LEDD). However, we found a relationship between bilirubin levels and sex. Higher bilirubin levels were observed in males with PD (Supplemental material - Table S3). We also found a mild but significant negative correlation between bilirubin levels and years of disease duration after adjusting according to sex and LEDD ( $p = 0.049$ ) with a correlation coefficient value of  $-0.1$  (Supplemental Material - Figure S1).

Although we found differences in bilirubin levels between HY stages compared to healthy controls, within the PD cohort, we did not observe a direct correlation between bilirubin levels and HY stages.

## 4. Discussion

In this study, we compared serum bilirubin levels in PD patients and healthy controls, and higher bilirubin levels in PD patients were observed. This result remained statistically significant in our sex- and age-matched group, after adjusting according to possible confounding

factors. We also found that bilirubin levels were higher in the first years of the disease and decreased with disease progression, being independent of sex and dopaminergic therapy. To the best of our knowledge, this is the first reported association between bilirubin levels and disease progression. Although we did not observe a direct correlation between bilirubin levels and disease severity, we found that PD patients in early disease stages ( $HY \leq 3$ , functionally independent) have particularly higher bilirubin levels than controls.

These findings concur with previous studies [7,9]. Scigliano et al. found higher bilirubin levels in PD patients, interpreted as a possible effect of dopaminergic replacement therapy [7]. Additionally, Moccia et al. also showed higher bilirubin concentration in drug-naïve PD patients compared to controls [9]. Although they did not observe a relationship with the necessity of initiating dopaminergic treatment after a two-year follow-up, they reported a negative correlation between bilirubin levels and LEDD. In our work, bilirubin levels were not related to dopaminergic therapies or LEDD. Therefore, in our population dopamine replacement therapy does not seem to play a main role in the bilirubin levels of PD patients.

In contrast to our work, Qin et al. described in a Chinese population, lower levels of indirect bilirubin in PD patients compared to healthy subjects, with no difference in total bilirubin concentration [8]. This difference between our results and the previous study might be explained by some factors such as different exclusion criteria or HO polymorphisms, which could vary in different populations.

Even though other antioxidant molecules have been described as decreased in PD, the difference in bilirubin levels between PD and HC may correspond to enzymatic changes in CNS related to PD etiology. HO as well as other enzymatic pathways are suggested to play a key role in oxidative stress and mitochondrial dysfunction, both well-known mechanisms involved in PD etiology. HO-1 is inducible by ROS in CNS. An important role of HO-1 in the oxidative balance is demonstrated in brains with neurodegenerative disorders [3]. Considering these findings, increased levels of bilirubin in PD could be interpreted as a consequence of HO-1 overexpression in CNS during early disease stages. Moreover, it has been suggested that this overexpression could be an adaptive response to oxidative stress in *substantia nigra* of PD patients [3,9]. However, we hypothesize that in PD patients with a longer disease course, lower bilirubin levels might be related to either a failure in that antioxidant system or neurodegenerative changes favored by maintained overexpression of HO-1. The cause of ROS imbalance is still unknown, but an environmental and a genetic component are supposed in most PD forms [2]. The role in PD of genetic variations in the gene that codified HO-1 (*HMOX1*) has not been fully studied. Recently, two functional *HMOX1* variations have been described as potential genetic biomarkers of PD [11], although previously Funke et al. did not find an association between *HMOX1* polymorphisms and PD [12].

The strength of our conclusions is tempered by some limitations. Firstly, we did not have different types of bilirubin (direct and indirect) available in our study. They were not measured by our laboratory in the routine blood test unless a marked hyperbilirubinemia (total bilirubin  $> 1.5$  mg/dl) was detected. Most of the patients with hyperbilirubinemia were excluded from our cohort, as we mentioned above. Secondly, the overall hepatic profile was not completely homogenous in both groups. Higher liver enzymes levels (GGT and GPT) were found in controls. This fact does not justify the differences in bilirubin levels between groups since a hepatic dysfunction would have caused higher bilirubin levels in controls instead of PD. In addition, mean values of liver enzymes were in the normal range without detected hypertransaminasemia in either group. However, we adjusted our analysis of bilirubin between groups according to liver enzymes as previously mentioned. Even though selected exclusion criteria were applied, other possible factors interfering in bilirubin or liver enzymes concentration cannot be fully excluded. Due to the retrospective design of our study, we cannot achieve robust conclusions about a predictive value of serum bilirubin levels in PD progression. Finally, we compared groups (PD and

controls) which differ in dopaminergic treatment. This could explain the mild difference in liver enzymes between groups. However, as mentioned above, in our study bilirubin levels were not related to dopaminergic replacement therapy or LEDD so it is difficult to believe in a correlation between bilirubin and dopaminergic replacement therapy.

We conclude that total bilirubin concentrations are higher in PD patients. Our results describe for the first time that this increase in bilirubin levels is related to the initial years of PD. Overexpression of HO-1 could play an important role in PD etiology, leading to higher bilirubin levels in the early stages of PD. Regarding these findings, future genetic analysis of *HMOX1* expression in PD patients might be useful to better understand PD etiology.

### Contributorship statement

- Daniel Macías-García: conception and design of the study, analysis and interpretation of data; writing of the first draft and review and critique of the manuscript.

- Carlota Mendez-Del Barrio: acquisition of data; review and critique of the manuscript.

- Silvia Jesús: conception and design of the study; interpretation of data; review and critique of the manuscript.

- Miguel Angel Labrador: analysis and interpretation of data; review and critique of the manuscript.

- Astrid Adarmes-Gomez: acquisition of data; review and critique of the manuscript.

- Laura Vargas-González: acquisition of data; review and critique of the manuscript.

- Fátima Carrillo: acquisition of data; review and critique of the manuscript.

- Pilar Gómez-Garre: analysis and interpretation of data; review and critique of the manuscript.

- Pablo Mir: conception and design of the study; interpretation of data; review and critique of the manuscript.

All the listed authors gave their final approval of the final version of the manuscript.

### Conflicts of interest

The authors have nothing to disclose.

### Financial disclosure/conflict of interest concerning the research related to the manuscript

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (ISCIII-FEDER) [PI14/01823, PI16/01575], the Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía [CVI-02526, CTS-7685], the Consejería de Salud y Bienestar Social de la Junta de Andalucía [PI-0437-2012, PI-0471/2013], the Sociedad Andaluza de Neurología, the Fundación Alicia Koplowitz and the Fundación Mutua Madrileña. Pilar Gómez-Garre was supported by the "Miguel Servet" (from the ISCIII-FEDER) and "Nicolás Monardes" (from of Andalusian Ministry of Health) programmes. Silvia Jesús Maestre was supported by "Juan-Rodes" programme (from the ISCIII-FEDER). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Acknowledgments

We would like to thank the patients and healthy individuals who participated in this study. We also thank the *HUVR-IBiS Biobank (Andalusian Public Health System Biobank and ISCIII-Red de Biobancos PT13/0010/0056)* for the human specimens used in this study.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.01.012>.

## References

- [1] J.A. Obeso, M.C. Rodríguez-Oroz, C.G. Goetz, C. Marin, J.H. Kordower, M. Rodríguez, E.C. Hirsch, M. Farrer, A.H. Schapira, G. Halliday, Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle, *Nat. Med.* 16 (2010) 653–661.
- [2] A.B. Singleton, M.J. Farrer, V. Bonifati, The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications, *Mov. Disord.* 28 (2013) 14–23.
- [3] H. Schipper, W. Song, H. Zukor, J.R. Hascaloivici, D. Zeligman, Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement, *J. Neurochem.* 110 (2009) 469–485.
- [4] L. Ziberna, M. Martelanc, M. Franko, S. Passamonti, Bilirubin is an endogenous antioxidant in human vascular endothelial cells, *Sci. Rep.* 6 (2016) 29240, <https://doi.org/10.1038/srep29240>.
- [5] M.F. McCarty, Serum bilirubin may serve as a marker for increased heme oxygenase activity and inducibility in tissues – a rationale for the versatile health protection associated with elevated plasma bilirubin, *Med. Hypotheses* 81 (2013) 607–610.
- [6] J.F. Watchko, C. Tiribelli, Bilirubin-induced neurologic damage - mechanisms and management approaches, *N. Engl. J. Med.* 369 (2013) 2021–2030.
- [7] G. Scigliano, F. Girotti, P. Soliveri, M. Musicco, D. Radice, T. Caraceni, Increased plasma bilirubin in Parkinson patients on L-dopa: evidence against the free radical hypothesis? *Ital. J. Neurol. Sci.* 18 (1997) 69–72.
- [8] X.L. Qin, Q.S. Zhang, L. Sun, M.W. Hao, Z.T. Hu, Lower serum bilirubin and uric acid concentrations in patients with Parkinson's disease in China, *Cell Biochem. Biophys.* 72 (2014) 49–56.
- [9] M. Moccia, M. Picillo, R. Erro, K. Longo, M. Amboni, G. Santangelo, R. Allocca, O. Caporale, M. Triassi, M.T. Pellicchia, P. Barone, C. Vitale, Increased bilirubin levels in de novo Parkinson's disease, *Eur. J. Neurol.* 22 (2015) 954–959.
- [10] F. Peng, Y. Yang, J. Liu, Y. Jiang, C. Zhu, X. Deng, X. Hu, X. Chen, X. Zhong, Low antioxidant status of serum uric acid, bilirubin and albumin in patients with neuromyelitis optica, *Eur. J. Neurol.* 19 (2012) 277–283.
- [11] P. Ayuso, C. Martinez, P. Pastor, O. Lorenzo-Betancor, A. Luengo, F.J. Jimenez-Jimenez, H. Alonso-Navarro, J.A. Agúndez, E. García-Martín, An association study between Heme oxygenase-1 genetic variants and Parkinson's disease, *Front. Cell. Neurosci.* 8 (2014) 1–8.
- [12] C. Funke, J. Tomiuk, O. Riess, D. Berg, A.S. Soehn, Genetic analysis of heme oxygenase-1 (HO-1) in German Parkinson's disease patients, *J. Neural. Transm.* 116 (2009) 853–859.



## SUPPLEMENTAL MATERIAL

### Methods

#### Healthy control recruitment

Healthy controls were non-blood relatives of PD patients and volunteers from the primary care centers in the same geographical area as the PD patients. We interviewed them and asked them to participate in research in our Movement Disorder Unit with a routine blood test. During this small interview, we asked about treatments, family history of diseases or another important medical fact. Moreover, their clinical history and current treatment were personally revised by authors to ensure that controls did not have any neurological diseases.

#### Age/Sex-matched population

We designed an age- and sex-matched control set, excluding subjects at random from both original cohorts until the PD cohort was balanced by sex and age with the healthy controls. We used the R-software to randomize and exclude subjects. In this new model, 372 subjects were included in each cohort with the same male/female proportion and similar mean age.

We repeated the statistical analysis including multivariate analysis adjusted according to liver enzymes and hemoglobin.

**Table S1**  
**Demographic data, liver profile and serum bilirubin levels in age- and sex-matched model. Multivariate analysis between serum bilirubin levels in both cohorts, adjusted according to liver function enzymes and hemoglobin.**

	Healthy Controls (N=372)	PD patients (N=372)	P value	Laboratory reference values
Age (years $\pm$ SD)	61 $\pm$ 15	62 $\pm$ 12	0.56	-
Sex (% ♂ / % ♀)	55% / 45%	55% / 45%	0.5	-
Serum bilirubin Concentration (mg/dl)	0.47 $\pm$ 0.23	0.56 $\pm$ 0.25	<0.001*	0.2 - 1.2
GOT (IU/l)	20.7	17.65	0.07	10 - 40
GPT (IU/l)	21.2	14.4	<0.05	10 - 40
GGT (IU/l)	27.4	22.9	<0.05	10 - 50
Hemoglobin (g/l)	140,9	138,9	0.05	136 - 180

\* Adjusted according to sex, age, liver enzymes and hemoglobin

**Table S2**

**Multivariate analysis between serum bilirubin levels in PD patients with different disease severities and controls, adjusted according to age, sex, liver enzymes and hemoglobin.**

	<b>PD patients</b>	<b>Mean bilirubin concentration (mg/dl)</b>	<b>Standard Desviation</b>	<b>P value</b>
Group HY 1	220	0.59	0.27	<0.05
Group HY 2	164	0.54	0.23	<0.05
Group HY 3	36	0.5	0.3	>0.05

*Group HY 1: Hoehn & Yahr 1-2. Group HY 2: Hoehn & Yahr 2,5-3. Group HY 3: Hoehn & Yahr 4-5*

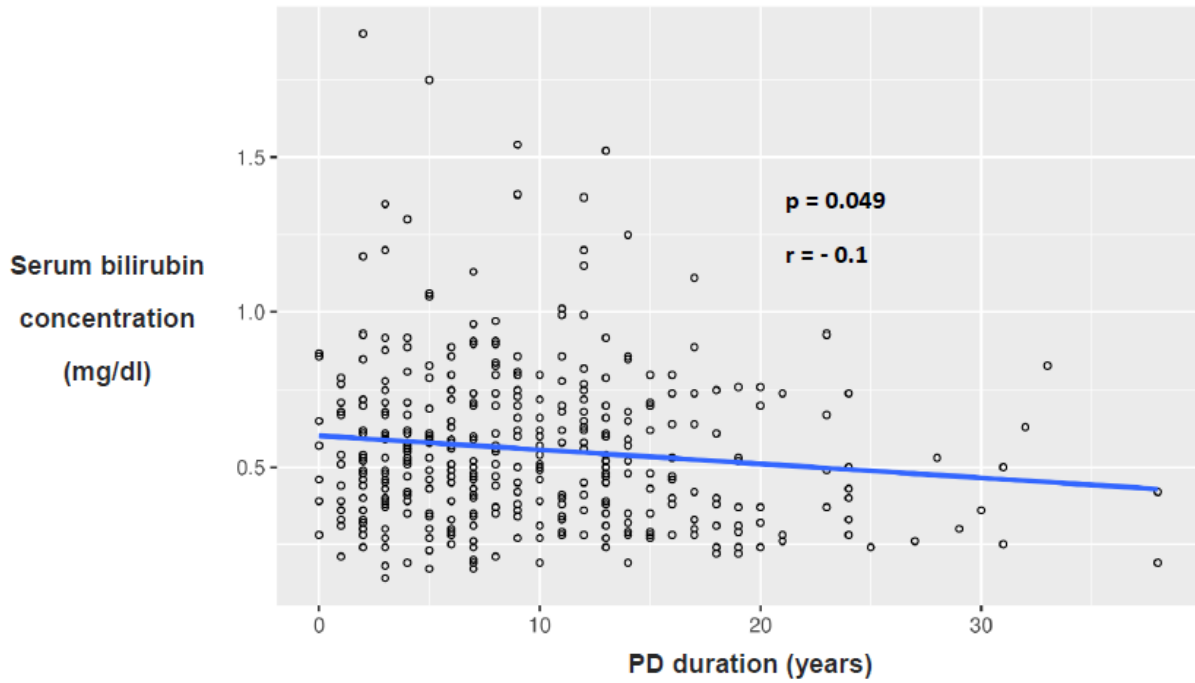
**Table S3**

**Bivariate linear regression analysis between bilirubin levels and demographic variables, treatment and disease duration in the PD group.**

	<b>Bilirubin levels (P value)</b>
Age ( <i>years</i> )	0.6
Sex ( <i>% males</i> )	< 0.001
Levodopa treatment	0.5
Dopamine agonist treatment	0.06
Levodopa equivalent daily dose	0.23
Disease duration ( <i>years</i> )	0.049*

*\*Adjusted according to sex and levodopa equivalent daily dose*

**Figure S1. Relationship between PD duration-bilirubin levels.** Dispersion diagram shows linear regression with the relationship between PD duration and bilirubin concentration, adjusted according to sex and levodopa equivalent daily dose.



# Serum lipid profile among sporadic and familial forms of Parkinson's disease

Publicado como:

**Macias-Garcia D**, Periñan MT, Muñoz-Delgado L, Jimenez-Jaraba MV, Labrador-Espinosa MA, Jesus S, Buiza-Rueda D, Mendez-Del Barrio C, Adarmes-Gomez A, Gómez-Garre P, Mir P. Serum lipid profile among sporadic and familial forms of Parkinson's disease. npj Parkinson's Disease (2021) 7:59 ; <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00206-6>

## ARTICLE OPEN



# Serum lipid profile among sporadic and familial forms of Parkinson's disease

Daniel Macías-García<sup>1,2</sup>, María Teresa Perrián<sup>1,2</sup>, Laura Muñoz-Delgado<sup>1,2</sup>, María Valle Jimenez-Jaraba<sup>1</sup>, Miguel Ángel Labrador-Espinosa<sup>1,2,3</sup>, Silvia Jesús<sup>1,2</sup>, Dolores Buiza-Rueda<sup>1,2</sup>, Carlota Méndez-Del Barrio<sup>1</sup>, Astrid Adarmes-Gómez<sup>1,2</sup>, Pilar Gómez-Garre<sup>1,2,3</sup> and Pablo Mir<sup>1,2,3</sup>

Brain cholesterol metabolism has been described as altered in Parkinson's disease (PD) patients. Serum lipid levels have been widely studied in PD with controversial results among different populations and age groups. The present study is aimed at determining if the serum lipid profile could be influenced by the genetic background of PD patients. We included 403 PD patients (342 sporadic PD patients, 30 *GBA*-associated PD patients, and 31 *LRRK2*-associated PD patients) and 654 healthy controls (HCs). Total cholesterol, HDL, LDL, and triglycerides were measured in peripheral blood. Analysis of covariance adjusting for sex and age (ANCOVA) and post hoc tests were applied to determine the differences within lipid profiles among the groups. Multivariate ANCOVA revealed significant differences among the groups within cholesterol and LDL levels. *GBA*-associated PD patients had significantly lower levels of total cholesterol and LDL compared to *LRRK2*-associated PD patients and HCs. The different serum cholesterol levels in *GBA*-associated PD might be related to diverse pathogenic mechanisms. Our results support the hypothesis of lipid metabolism disruption as one of the main PD pathogenic mechanisms in patients with *GBA*-associated PD. Further studies would be necessary to explore their clinical implications.

npj Parkinson's Disease (2021)7:59; <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00206-6>

## INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is the most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease<sup>1</sup>. The pathognomonic hallmark of PD is the degeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra and, consequently, the striatal dopamine depletion. Although it has been studied for years, PD etiology still remains uncertain. Several factors, environmental as well as genetic, have been elucidated as key factors in PD pathogenesis<sup>2</sup>. These factors lead to the degeneration of dopaminergic neurons through different metabolic pathways (oxidative stress, mitochondrial dysfunction, iron accumulation, endosomal-lysosomal functioning, among others).

Among environmental factors, lipids seem to play a role in the neurodegeneration of PD<sup>3-5</sup>. Brain cholesterol metabolism has been described as altered in PD patients and plasma 24-OH-cholesterol has been considered as a possible biomarker for PD<sup>6,7</sup>. In addition, studies with cultured neurons and animal models suggested that certain lipids and their metabolites promote an increase in oxidative stress and alpha-synuclein ( $\alpha$ -syn) aggregation in dopaminergic cells<sup>8,9</sup>.

Different studies have shown controversial results regarding serum lipid levels in PD<sup>10-15</sup>. A large prospective cohort study described an increased risk of PD with hypercholesterolemia among subjects aged under 55 years<sup>10</sup>. However, other studies showed lower levels of cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), apolipoprotein-B, and triglycerides in PD patients, suggesting a protective factor of lipids in the PD course<sup>11,13</sup>. Moreover, two prospective studies described a decrease in PD risk between subjects with hypercholesterolemia<sup>15,16</sup>. A possible influence on the disease course and the cognitive state in PD was proposed for serum cholesterol and LDL levels<sup>17,18</sup>. Recently, in a meta-analysis

of genome-wide association studies of PD, it was demonstrated that lipids and lipoproteins were involved in the pathogenic mechanisms of the disease, such as oxidative stress response or lysosomal functioning<sup>19</sup>. Interestingly, they found shared genetic etiology between lipid rafts total cholesterol and triglycerides and PD. These studies suggest a causal relationship between cholesterol metabolism and PD.

Several genes have been associated with the familial forms of PD. The identification of these genes and their mechanisms provides an insight into PD etiopathology<sup>20</sup>. Leucine-rich repeat kinase 2 gene (*LRRK2*) and glucocerebrosidase (*GBA*) gene are two of the most common causes of familial PD; however, mutations in those genes are found in different proportions among the PD population worldwide (from 0.4 to 20%)<sup>21,22</sup>.

The low penetrance of the most common *LRRK2* mutation (p. G2019S) suggested that there should be other factors that modulate the dopaminergic degeneration<sup>23</sup>. A higher peripheral inflammation and altered lipid storage capacity were suggested as underlying mechanisms in *LRRK2* pathogenesis<sup>24,25</sup>. Moreover, *LRRK2* knock-out animal models have shown changes in their serum cholesterol levels, whereas higher triglyceride levels have been described in *LRRK2* carriers<sup>26,27</sup>. On the other hand, heterozygous *GBA* mutations cause a loss of function of glucocerebrosidase (GCase) in PD patients, showing these patients with *GBA* variants a specific phenotype with higher cognitive decline and autonomic dysfunction than sporadic PD<sup>28</sup>. A link between the loss of function of GCase and lysosomal cholesterol accumulation was described in fibroblasts of PD patients with the *GBA* p.N370S mutation<sup>29</sup>. Moreover, patients with Gaucher type I disease, carriers of homozygous *GBA* mutations, showed reduced serum levels of cholesterol, LDL, and high-density lipoprotein

<sup>1</sup>Unidad de Trastornos del Movimiento Servicio de Neurología y Neurofisiología Clínica, Instituto de Biomedicina de Sevilla Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain. <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain. <sup>3</sup>Departamento de Medicina Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain. ✉email: [mgomez-ibis@us.es](mailto:mgomez-ibis@us.es); [pmir@us.es](mailto:pmir@us.es)

(HDL)<sup>30</sup>. Besides, studies in animal models suggested that a perturbation in glycosphingolipid levels might induce neuroinflammation and accelerate the PD pathogenesis in vulnerable dopaminergic neurons<sup>5,31</sup>.

Given the role of lipids in PD pathogenesis and the possible influence of *LRRK2* and *GBA* in that relationship, the present study is aimed at determining whether there are differences in the serum lipid profile between sporadic PD (sPD) and the main monogenic causes of familial PD (*GBA*-associated PD, *GBA*-PD and *LRRK2*-associated PD, *LRRK2*-PD). We hypothesized that levels of the serum lipids could be influenced by the genetic background of PD patients.

## RESULTS

### Case-control study

The demographic characteristics and the serum lipid profile of the whole PD cohort and healthy controls (HCs) are summarized in Table 1. PD patients were older than HCs (65.07 ± 11.83 vs 58.77 ± 16.01,  $p < 0.005$ ), with a slight predominance of males in both groups (52.14 and 58.31% of males, respectively). Regarding the serum lipid profile among both groups, serum levels of total cholesterol (TC), LDL, and triglycerides were lower in PD patients than HCs. Differences in TC and triglycerides levels between groups were statistically significant after adjusting for age and sex. There were no significant differences in HDL levels between PD patients and HCs.

### Parkinson's disease cohorts study

The demographic and clinical characteristics of the different PD cohorts (sPD, *GBA*-PD, and *LRRK2*-PD), as well as HCs are shown in Table 2. The familial PD groups (*GBA*-PD and *LRRK2*-PD) were younger than sPD and showed a lower age of PD onset. *GBA*-PD had a predominance of males (73.91%), whereas *LRRK2*-PD showed a higher proportion of females (62.98%). Although these PD groups had a longer disease duration than sPD, there were no differences between groups either in the severity of the disease or in the treatment. There were no significant differences in arterial hypertension, diabetes, or hyperlipidemia among the groups (Table 2).

When we compared the serum lipid profile among PD cohorts and HCs, we found statistically significant differences in TC levels [ $F(3,663) = 4.99, P < 0.005$ ] and LDL [ $F(3,502) = 3.85, P < 0.05$ ] after adjusting for age and sex (Table 3). *GBA*-PD showed the lowest levels of TC and LDL (178.22 ± 34.47 and 105.78 ± 29.85 mg/dl, respectively), while *LRRK2*-PD patients had the highest levels of both TC and LDL (213.73 ± 30.01 and 141.09 ± 30.48 mg/dl, respectively). TC and LDL levels of sPD were lower than HCs and *LRRK2*-PD but higher than the levels of *GBA*-PD patients. No differences were found between the groups in HDL levels. Regarding the triglycerides, HCs showed higher serum triglycerides levels than sPD, *GBA*-PD, and *LRRK2*-PD. However, these differences in triglycerides were not statistically significant after adjusting by sex and age [ $F(3,658) = 2.06, P = 0.10$ ].

### Multiple comparisons

We accomplished multiple comparisons to determine the differences in the lipid profile between groups (Figs. 1a–d). The

**Table 1.** Demographic characteristic and lipid profile of healthy controls and Parkinson's disease patients.

	Healthy controls ( $n = 420$ )	PD ( $n = 300$ )	$P$ value
Sex (% males)	52.14 %	58.31 %	0.09
Age (y), mean ± SD	58.77 ± 16.01	65.07 ± 11.83	<0.005
TC (mg/dl), mean ± SD	202.15 ± 38.11	194.84 ± 41.35	0.029*
HDL (mg/dl), mean ± SD	58.37 ± 17.25	58.96 ± 16.61	0.69
LDL (mg/dl), mean ± SD	127.49 ± 30.44	124.9 ± 38.73	0.49
TG (mg/dl), mean ± SD	115.59 ± 70.14	103.03 ± 57.68	0.006*

TC total cholesterol, HDL high-density lipoprotein, LDL low-density lipoprotein, TG triglycerides

PD Parkinson's disease patients, SD standard deviation.

\* $p < 0.05$  after adjusting by sex and age.

**Table 2.** Demographic and clinical data of healthy controls and Parkinson's disease cohorts.

	HCs ( $n = 420$ )	sPD ( $n = 250$ )	<i>GBA</i> -PD ( $n = 23$ )	<i>LRRK2</i> -PD ( $n = 27$ )	$P$ value
Sex (% males)	52.14%	58.40%	73.91%	37.02	0.03**
Age (y), Mean ± SD	58.77 ± 16.09	65.92 ± 11.77	58.83 ± 11.8	63.41 ± 11.79	<0.005**
Arterial hypertension, $n$ (%)	139 (33%)	104 (42%)	8 (35%)	8 (30%)	0.17
Diabetes, $n$ (%)	52 (12%)	45 (18%)	1 (4%)	2 (7%)	0.08
Hyperlipidemia, $n$ (%)	57 (14%)	47 (19%)	2 (9%)	6 (22%)	0.19
Age of onset (y), mean ± SD	–	56.60 ± 11.95	48.39 ± 8.87	51.65 ± 12.86	0.007*
Disease duration (y), mean ± SD	–	8.9 ± 6.23	10.67 ± 7.69	11.81 ± 7.06	<0.05*
Hoehn & Yahr, mean ± SD	–	2.26 ± 1.22	2.5 ± 0.96	1.9 ± 2.4	0.16
LEDD, mean ± SD	–	764.74 ± 470.14	694.25 ± 408.76	797.46 ± 579.46	0.86

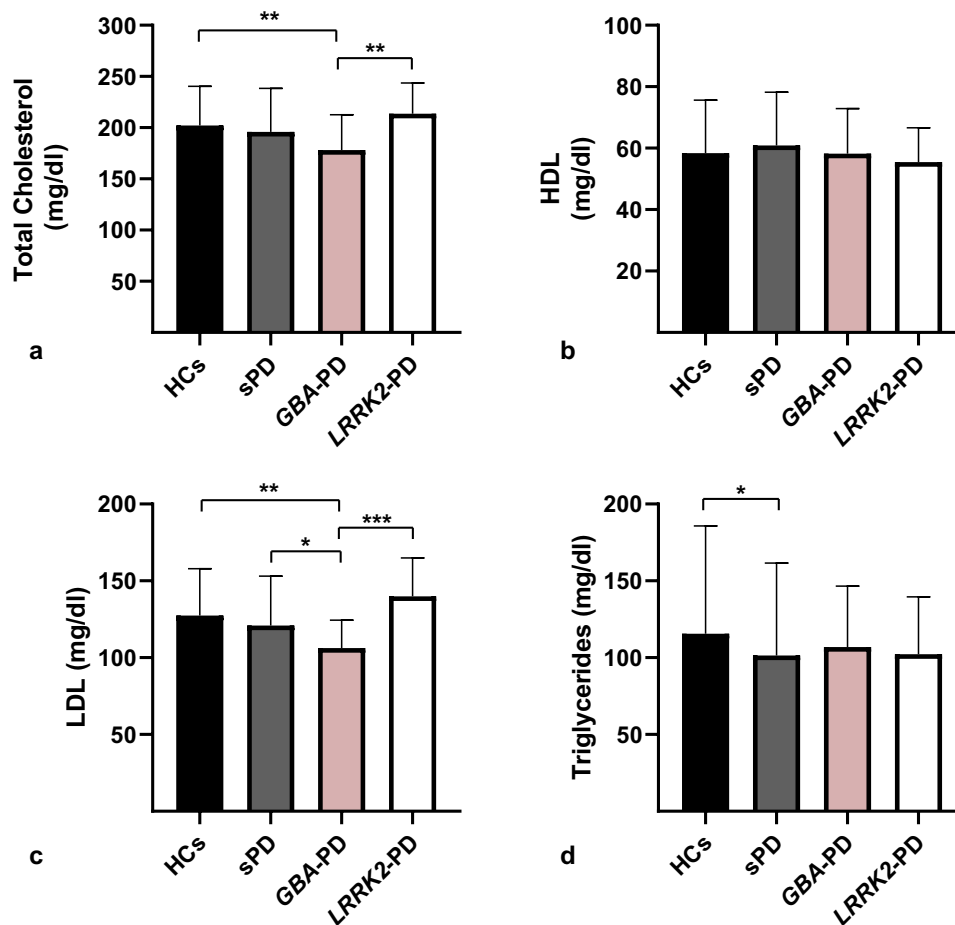
HCs healthy controls, LEDD levodopa equivalent daily dose, sPD sporadic Parkinson's disease patients, *GBA*-PD *GBA*-associated Parkinson's disease patients, *LRRK2*-PD *LRRK2*-associated Parkinson's disease patients, SD standard deviation.

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.005$ .

**Table 3.** Serum lipid profile in healthy controls and Parkinson's disease cohorts.

	HCs	sPD	GBA-PD	LRRK2-PD	F value	P value
TC (mg/dl), mean $\pm$ SD	202.15 $\pm$ 38.11	195.76 $\pm$ 42.68	178.22 $\pm$ 34.47	213.73 $\pm$ 30.01	4.99	0.002**
HDL (mg/dl), mean $\pm$ SD	58.37 $\pm$ 17.25	60.46 $\pm$ 17.77	56.11 $\pm$ 14.25	56.22 $\pm$ 12.32	1.03	0.38
LDL (mg/dl), mean $\pm$ SD	127.49 $\pm$ 30.44	125.75 $\pm$ 40.65	105.78 $\pm$ 29.85	141.09 $\pm$ 30.48	3.85	0.01*
TG (mg/dl), mean $\pm$ SD	115.59 $\pm$ 70.14	102.03 $\pm$ 59.63	105.39 $\pm$ 42.84	110.19 $\pm$ 63.46	2.06	0.10

TC total cholesterol, HDL high-density lipoprotein, LDL low-density lipoprotein, TG triglycerides, HCs healthy controls, sPD sporadic Parkinson's disease patients, GBA-PD GBA-associated Parkinson's disease patients, LRRK2-PD LRRK2-associated Parkinson's disease patients, SD standard deviation. Analysis of covariance (ANCOVA), adjusting by sex and age, was applied. \*\*\* $p < 0.005$  \*\* $p < 0.05$ .



**Fig. 1** Serum lipid profile among Parkinson's disease cohorts and healthy controls. Multiple comparisons of total cholesterol (a), HDL (b), LDL (c), and triglycerides (d) levels among healthy controls (HCs), sporadic Parkinson's disease patients (sPD), GBA-associated Parkinson's disease patients (GBA-PD), and LRRK2-associated Parkinson's disease patients (LRRK2-PD). Numbers shown as means  $\pm$  SD with one-way ANCOVA with post hoc testing for multiple comparisons as appropriate. \*\*\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.05$ , \* $p < 0.1$ .

complete results of Levene's test and post hoc tests are described in Supplementary Data 1 (Supplementary Tables 1–6). Post hoc analysis showed that TC and LDL levels were lower in GBA-PD compared with LRRK2-PD ( $p < 0.05$ ) (Figs. 1a, 1c). However, no differences were found in HDL or triglyceride levels.

When we compared the familial PD groups and sPD, we observed that LDL levels of GBA-PD were lower than in the sPD group. This difference remained marginally significant ( $p = 0.07$ ). GBA-PD TC levels were also lower than sPD; however, no statistically significant differences were found. Regarding the

LRRK2-PD group, we observed higher levels of both TC and LDL levels in LRRK2-PD patients compared to sPD. Nevertheless, these differences did not achieve statistical significance ( $p = 0.12$  and  $p = 0.16$ , respectively). No differences were found between the familial PD groups and sPD in HDL or triglycerides.

Finally, post hoc analysis showed statistically significant differences in TC and LDL levels between GBA-PD and HCs. Regarding triglycerides, sPD patients showed lower levels than HCs (Fig. 1d), although these differences remained marginally significant ( $p = 0.059$ ).

## DISCUSSION

The role of serum lipids in PD pathogenesis remains unclear with different results in several studies. This study specifically analyzed serum cholesterol profiles comparing familial and sporadic forms of PD. Our data indicate that *GBA*-PD patients had lower serum cholesterol and LDL levels than *LRRK2*-PD patients and HCs. Previous studies have shown that women had higher HDL and lower total cholesterol levels than men<sup>32,33</sup>. In this line, our findings are particularly noticeable ever since *GBA*-PD was the group with the highest male proportion and *LRRK2*-PD had a female predominance. Sex influence appears not to play the main role in the serum lipid levels of these patients, suggesting a possible link between specific PD pathogenesis and lipid metabolism. Moreover, a different serum lipid profile was observed in *GBA*-PD compared with sPD even though differences observed were marginally significant.

Our results in the case-control study showed lower levels of cholesterol and triglycerides in patients with PD compared to HCs, as previously described<sup>11–14</sup>. However, after PD subtyping, our largest PD group (sPD) showed lower triglycerides but no significant differences in cholesterol levels compared with HCs (Figs. 1a, 1d). Rozani et al. recently demonstrated a decrease in PD risk in middle-aged men and elderly women with hypercholesterolemia in the largest statin-free prospective study of serum lipids and PD<sup>15</sup>. Klemann et al. found a shared genetic risk between lipid/lipoprotein levels and PD<sup>19</sup>. In the same line, a Mendelian randomization study showed an association between higher levels of serum lipids (TC, LDL, and triglycerides) and a lower future risk of PD<sup>16</sup>. These studies suggest a causal relationship between lipid profile and PD. On the other hand, a large prospective cohort study showed an increased risk of PD with hypercholesterolemia among subjects aged under 55 years<sup>10</sup>. These controversial results could be explained by the heterogeneity within PD patients included in each study. Our results in the different PD cohorts showed that patients with *GBA*-PD have a different serum lipid profile, therefore supporting the idea that lipid metabolism could be influenced by PD pathogenesis. Our findings could explain the inconsistencies previously found within validation studies with larger PD populations, since lipid profiles could be influenced by the genetic background of PD patients. In this line, some authors proposed a different approach based on a better PD subtyping to achieve the identification of novel biomarkers and disease-modifying treatments in PD<sup>34,35</sup>.

Recently, the idea of PD as a protein-induced lipidopathy has been proposed, rather than as a proteinopathy<sup>36</sup>. This fresh approach to the Lewy pathology (LP) is based on new insights into  $\alpha$ -syn inclusions near the lipid rafts of cellular membranes<sup>37,38</sup>. Lipid rafts are cholesterol- and sphingolipids-enriched microdomains of cellular membranes that coordinate bioactivity of membrane constituents and protein-lipid interactions<sup>39</sup>. The altered composition of lipids rafts in frontal cortex neurons of PD patients has been described, compared with healthy controls<sup>40</sup>. Also, the main proteins involved in monogenic forms of PD, such as *LRRK2* or parkin, have been associated with lipid rafts and its dysfunction in PD pathology<sup>41,42</sup>. Nevertheless, our findings in *LRRK2*-PD patients do not allow us to draw conclusions about the role of lipid metabolism disruption in the specific pathophysiology of patients with *LRRK2* mutations.

Although a link between *GBA* variants and PD is well established in different populations, the relationship between GCase and  $\alpha$ -syn pathology remains uncertain<sup>43–47</sup>. A decreased GCase activity is supposed to promote LP and modulate neuronal susceptibility to  $\alpha$ -syn seeding by disruption in lysosomal maturation<sup>48–50</sup>. An in vitro study of PD patient fibroblasts with the *GBA* p.N370S mutation has evidenced a link between the loss of function in GCase and the lysosomal cholesterol accumulation with the appearance of multilamellar bodies (MLBs)<sup>29,51</sup>. It has been

proposed that the cholesterol needed for the formation of MLBs originates from two different routes: (1) endogenous cholesterol synthesis in the endoplasmic reticulum and (2) LDL-containing cholesterol that binds to the LDL-receptor on the cell membrane<sup>48</sup>. Interestingly, the *GBA* p.N370S mutation was the most prevalent of our pathogenic variants included in the *GBA*-PD group. This fact provides support to the idea of disrupted cholesterol metabolism in *GBA*-PD, which alters the autophagy-lysosome function and produces MLBs, being a possible explanation of the specific lipid profile observed in our patients<sup>50</sup>. Besides, some authors have stated the need of viewing PD as a systemic disorder where global cellular processes (pathogenic mechanisms) occur in a range of cellular subtypes, and not only in those cell types that display the characteristic neuropathology (i.e., dopaminergic neurons)<sup>52</sup>. To date, it remains unknown whether cholesterol accumulation is the first step in *GBA*-PD pathogenesis, or if it occurs secondarily to other lipids accumulations (i.e., glycosphingolipids)<sup>51</sup>. MLBs contain both primarily undegraded phospholipids and cholesterol. In this line, Guedes et al. reported decreased phospholipids levels (phosphatidic acid, phosphatidylethanolamine, among others) in the serum of *GBA* mutation carriers<sup>53</sup>. However, in the same study, increased levels of ceramides were reported in those patients. Finally, the lower TC and LDL levels in our *GBA*-PD patients are in line with the previous description of decreased cholesterol levels in Gaucher disease type I patients<sup>30</sup>. As we mentioned above, our work highlights the role of cholesterol metabolism and its link with *GBA*-PD pathology.

It is reasonable to consider whether lipid metabolism disruption (as a pathogenic mechanism of *GBA*-PD) could influence the specific phenotype of patients with *GBA*-PD<sup>28,43,44</sup>. However, answering this question is beyond the scope of this study and our study design does not allow us to evidence it. Longitudinal studies might be necessary to explore the influence of lipid profile in the *GBA*-PD course.

Regarding other aspects of the lipid profile in our study, neither HDL nor triglyceride levels differed between the familial PD groups and sPD. Differences in triglycerides were observed in our case-control analysis with decreased levels in the whole PD cohort compared to HCs. Nevertheless, when we classified in familial and sporadic PD groups, only sPD patients showed a decrease in triglyceride levels, which remained marginally significant compared with HCs. Our results might suggest that decreased triglyceride levels might be linked to sporadic forms of PD rather than genetic forms. These findings are contrary to those observed by Thaler et al.<sup>27</sup>. These authors accomplished an interesting study wherein they analyzed the possible influence of the metabolic syndrome in *GBA*- and *LRRK2*-associated PD patients compared with sPD. Although no relationship was observed between metabolic syndrome and disease course among PD groups, they described elevated triglyceride levels in *LRRK2* carriers. Interestingly, they also measured HDL levels as part of the metabolic syndrome, and no differences were found between familial and sporadic forms of PD. This former result is in line with our study, suggesting a lack of relationship between PD and HDL.

The strength of our conclusions is tempered by certain limitations. Firstly, our study is retrospective and we cannot elude that some other variables out of our control might influence the study, so our results require to be interpreted cautiously. Although most of the main factors that can directly influence the serum lipid levels were taken into account with selected inclusion/exclusion criteria (i.e., ethnic influence and lipid-modifying therapies), others, such as the body mass index or the type of diet of the study participants, were not considered. However, no relationship between dietary cholesterol intake and PD risk was previously found in a meta-analysis, either in prospective or case-control studies<sup>54</sup>. Second, we studied neither prodromal PD patients nor *GBA*/*LRRK2*-mutated asymptomatic carriers. Thus, we were not able to study the effect of these mutations in the lipid profile



before motor symptoms of PD manifest. Further studies with those prodromal patients might be required to confirm if the genetic background of PD patients influences their serum cholesterol levels. Finally, our familial PD cohorts have a relatively small sample size compared with sPD or HCs, limiting the statistical power for further analysis.

In conclusion, our results show that *GBA*-associated PD patients have different serum lipid profiles, and support the hypothesis of lipid metabolism disruption as one of the main pathogenic mechanisms in *GBA*-associated PD. However, further investigations would be necessary to confirm these findings and to study their possible clinical implications.

## METHODS

### Participants

We included 403 PD patients who were classified into three subgroups: 342 sporadic PD patients (sPD), 30 *GBA*-associated PD patients (*GBA*-PD), and 31 *LRRK2*-associated PD patients (*LRRK2*-PD). A control group with 654 HCs was also included. All subjects considered for the study were

Allele	cDNA	Protein	Exon	<i>n</i>
D409H	c.1342 G/C	p.Asp448His	10	2
L444P	c.1448 T/C	p.Leu483Pro	11	4
N370S	c.1223 A/G	p.Asn409Ser	10	12
S310G	c.928 A/G	p.Ser310Gly	8	3
L29fs	c.84dupG	p.Leu29Alafs*18	3	1
R535H	c.1604G > A	p.Arg535His	12	1
V457D	c.1487 T/A	p.Val496Asp	11	2
G195W	c.700 G > T	p.Gly234Trp	7	2
F213I	c.754 T > A	p.Phe252Ile	7	2
R262C	c.901 C > T	p.Arg301Cys	8	1

cDNA complementary DNA

Caucasian to avoid ethnic influences in the lipid profile. PD patients were recruited from the Movement Disorder Clinic at Hospital Universitario Virgen del Rocío in Seville, Spain. PD was diagnosed following the Movement Disorder Society Clinical Diagnostic Criteria<sup>55</sup>. HCs were recruited from the same geographical area and they were not considered for the study if they had any neurodegenerative disorder, a family history of PD, or a variant in *GBA* or *LRRK2* genes. sPD patients were not considered for the study if they had any variants in the PD-related genes. The *LRRK2*-PD group contained 28 *LRRK2* p.G2019S PD patients (90.3%) and 3 *LRRK2* p.R1441G PD patients (9.7%). The list of *GBA* pathogenic variants considered for the inclusion of patients in the *GBA*-PD group is shown in Table 4.

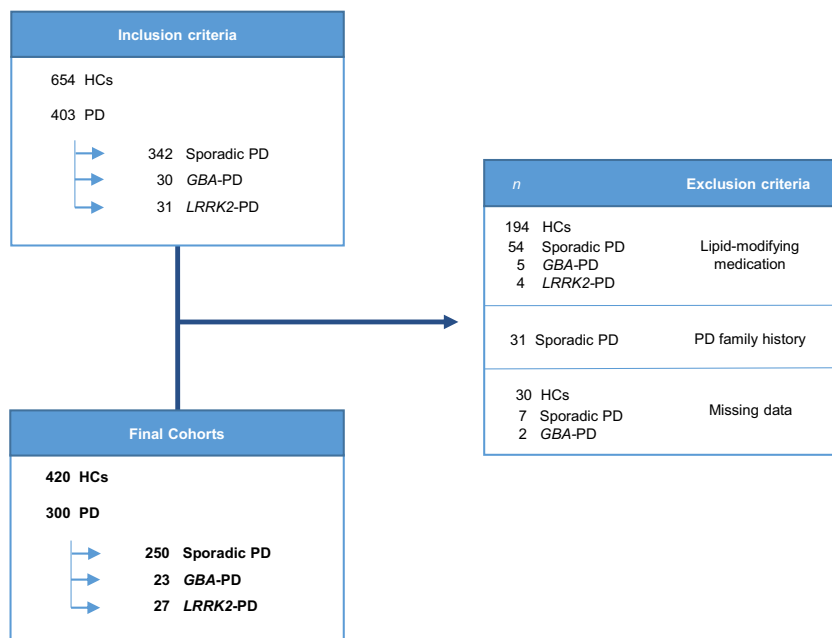
Exclusion criteria for all individuals included were receiving treatment with lipid-modifying therapy (i.e., statins, ezetimibe, antivirals, azathioprine), and having a first-degree PD family history exclusively for sPD patients. Figure 2 shows the study flowchart, exclusion criteria, and resultant cohorts.

We obtained consent from the local ethics committee of our hospital in accordance with the Declaration of Helsinki, and written informed consent from all the participants in the study. All subjects underwent a clinical assessment at our center and the demographical data were retrospectively obtained by consulting their previous medical records. Serum TC, HDL, LDL, and triglycerides were determined in peripheral blood and analyzed in the Central Laboratory of our center.

### Genetics

Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples by standard or automated methods (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche, Maxwell 16 System, Promega Corporation, Madison, WI, USA; MagNA Pure LC, Roche Diagnostics, Indianapolis) in compliance with established protocols. The mutational screening of *GBA* and *LRRK2* genes was previously done using a combination of high-resolution melting (HRM) and direct DNA resequencing as we describe below<sup>22,43</sup>.

Here we describe the procedure followed to do the *GBA* screening. Twenty-five nanograms of genomic DNA was used for each polymerase chain reaction (PCR). To prevent amplification of the neighboring pseudogene, *GBA* was first amplified in four large fragments that only and specifically amplified the functional gene but not the nearby pseudogene. PCR primer couples were designed based on the known genomic sequence (NG\_009783.1). The list with the primers used in our study for *GBA* screening is shown in Supplementary Data 2 (Supplementary Table 7). For the mutational screening, we studied isoform 1 of the *GBA* gene (NM\_001005741.2), which contains 12 exons, including a noncoding exon 1. The mutational screening of all exons and intron-exon boundaries



**Fig. 2** Study flowchart with selection criteria and final cohorts. HCs healthy controls, *GBA*-PD *GBA*-associated Parkinson's disease patients, *LRRK2*-PD *LRRK2*-associated Parkinson's disease patients, PD Parkinson's disease.

was then performed, using a combination of HRM analysis and direct DNA resequencing. HRM reactions were performed on a LightCycler480 (LC480) instrument, and HRM curve acquisition and analysis were performed using LC480 software version 1.3 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Samples showing abnormal melting profiles, including those with variants, were sequenced on both strands using the BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and resolved on an ABI3500 genetic analyzer (Applied Biosystems). We have adopted the conventional nomenclature, which refers to the processed protein and excludes the 39-residue signal peptide.

The *LRRK2* screening was done following the procedure described below. The mutational screening of all exons and intron–exon boundaries was performed using a HRM analysis and/or targeted resequencing. The gene regions which encode functional domains of *LRRK2* begin within exon 22 (amino acid 984), so, in this study, we used HRM analysis to screen for variations from that exon until exon 51. HRM reactions were performed on a LC480 instrument, and HRM curve acquisition and analysis were performed using LC480 software version 1.3 (Roche Applied Science). All samples showing abnormal melting profiles were sequenced by Sanger sequencing. The list with the primers used in our study for *LRRK2* screening by HRM is shown in Supplementary Data 2 (Supplementary Table 8). Targeted resequencing was performed using a customized Haloplex Target Enrichment Panel (including *LRRK2*), which was designed using Agilent's online Sure Design tool, following the manufacturer's protocol (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Samples were sequenced employing the Illumina NextSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Filtered variants predicted as pathogenic were validated by Sanger sequencing. To determine the origin of each patient with R1441G mutation, haplotype analysis was performed by testing microsatellite markers and single-nucleotide polymorphisms spanning the gene region.

### Statistical analysis

Group comparisons of categorical variables were performed using chi-square and Fisher's tests. Firstly, we compared the serum lipid profile (TC, LDL, HDL, and triglycerides) between the total PD group and HCs using multivariate linear regression adjusting for sex and age. The homogeneity of variance was studied with Levene's test. Second, we compared the serum lipids levels between the different PD cohorts (sPD, GBA-PD, and *LRRK2*-PD) and HCs using the analysis of covariance (ANCOVA), considering age and sex as covariates. Then, post hoc analysis for multiple comparisons between groups was applied. All statistical analyses were performed using IBM SPSS software (26 for Windows; IBM, Armonk, NY) and GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software, Inc.). A *p* value <0.05 was considered statistically significant.

### Reporting Summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

### DATA AVAILABILITY

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 26 January 2021; Accepted: 22 June 2021;

Published online: 16 July 2021

### REFERENCES

- Hirtz, D. et al. How common are the 'common' neurologic disorders? *Neurology* **68**, 326–337 (2007).
- Obeso, J. A. et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: a special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov. Disord.* **32**, 1264–1310 (2017).
- Jin, U., Park, S. J. & Park, S. M. Cholesterol metabolism in the brain and its association with Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **28**, 554–567 (2019).
- Xicoy, H., Wieringa, B. & Martens, G. J. M. The role of lipids in Parkinson's disease. *Cells* **8**, 27 (2019).
- Hallett, P. J., Engelder, S. & Isacson, O. Lipid and immune abnormalities causing age-dependent neurodegeneration and Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation* **16**, 153 (2019).
- Orth, M. & Bellosta, S. Cholesterol: its regulation and role in central nervous system disorders. *Cholesterol* **2012**, 1–19 (2012).
- Huang, X. et al. Brain cholesterol metabolism and Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **34**, 386–395 (2019).
- Paul, R., Choudhury, A. & Borah, A. Cholesterol – a putative endogenous contributor towards Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* **90**, 125–133 (2015).
- Halliday, G. M. et al. Synuclein redistributes to neuromelanin lipid in the substantia nigra early in Parkinson's disease. *Brain* **128**, 2654–2664 (2005).
- Hu, G., Antikainen, R., Jousilahti, P., Kivipelto, M. & Tuomilehto, J. Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology* **70**, 1972–1979 (2008).
- Guo, X. et al. The serum lipid profile of Parkinson's disease patients: a study from China. *Int. J. Neurosci.* **125**, 838–844 (2015).
- Wei, Q. et al. Reduced serum levels of triglyceride, very low density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in Parkinson's disease patients. *PLoS ONE* **8**, e75743 (2013).
- de Lau, L. M. L., Koudstaal, P. J., Hofman, A. & Breteler, M. M. B. Serum cholesterol levels and the risk of Parkinson's disease. *Am. J. Epidemiol.* **164**, 998–1002 (2006).
- Scigliano, G. et al. Reduced risk factors for vascular disorders in Parkinson disease patients: a case-control study. *Stroke* **37**, 1184–1188 (2006).
- Rozani, V. et al. Higher serum cholesterol and decreased Parkinson's disease risk: a statin-free cohort study. *Mov. Disord.* **33**, 1298–1305 (2018).
- Fang, F. et al. Lipids, apolipoproteins, and the risk of Parkinson disease. *Circ. Res.* **125**, 643–652 (2019).
- Huang, X. et al. Serum cholesterol and the progression of Parkinson's disease: results from DATATOP. *PLoS ONE* **6**, e22854 (2011).
- Sterling, N. W. et al. Higher plasma LDL-cholesterol is associated with preserved executive and fine motor functions in Parkinson's disease. *Aging Dis.* **7**, 237–245 (2016).
- Klemann, C. J. H. M. et al. Integrated molecular landscape of Parkinson's disease. *npj Park. Dis.* **3**, 14 (2017).
- Kim, C. & Alcalay, R. Genetic forms of Parkinson's disease. *Semin. Neurol.* **37**, 135–146 (2017).
- Trinh, J. et al. Genotype-phenotype relations for the Parkinson's disease genes SNCA, LRRK2, VPS35: MDSGene systematic review. *Mov. Disord.* **33**, 1857–1870 (2018).
- Gao, L. et al. Prevalence and clinical features of LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease in southern Spain. *Eur. J. Neurol.* **16**, 957–960 (2009).
- Lee, A. J. et al. Penetrance estimate of LRRK2 p.G2019S mutation in individuals of non-Ashkenazi Jewish ancestry. *Mov. Disord.* **32**, 1432–1438 (2017).
- Cabezudo, D., Baekelandt, V. & Lobbstaal, E. Multiple-hit hypothesis in Parkinson's disease: LRRK2 and inflammation. *Front. Neurosci.* **14**, 376 (2020).
- Yu, M. et al. LRRK2 mediated Rab8a phosphorylation promotes lipid storage. *Lipids Health Dis.* **17**, 1–8 (2018).
- Baptista, M. A. S. et al. Loss of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in rats leads to progressive abnormal phenotypes in peripheral organs. *PLoS ONE* **8**, 1–16 (2013).
- Thaler, A. et al. Metabolic syndrome does not influence the phenotype of LRRK2 and GBA related Parkinson's disease. *Sci. Rep.* **10**, 9329 (2020).
- Avenali, M. et al. Evolution of prodromal parkinsonian features in a cohort of GBA mutation-positive individuals: a 6-year longitudinal study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **90**, 1091–1097 (2019).
- García-Sanz, P. et al. N370S-GBA1 mutation causes lysosomal cholesterol accumulation in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **32**, 1409–1422 (2017).
- Ginsberg, H. et al. Reduced plasma concentrations of total, low density lipoprotein and high density lipoprotein cholesterol in patients with Gaucher type I disease. *Clin. Genet.* **26**, 109–116 (1984).
- Hallett, P. J. et al. Glycosphingolipid levels and glucocerebrosidase activity are altered in normal aging of the mouse brain. *Neurobiol. Aging* **67**, 189–200 (2018).
- Freedman, D. S. et al. Sex and age differences in lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy: the Framingham study. *Clin. Chem.* **50**, 1189–1200 (2004).
- Klingel, S. L. et al. Sex differences in blood HDL-c, the total cholesterol/HDL-c ratio, and palmitoleic acid are not associated with variants in common candidate genes. *Lipids* **52**, 969–980 (2017).
- Espay, A. J. & Lang, A. E. Parkinson diseases in the 2020s and beyond: replacing clinico-pathological convergence with systems biology divergence. *J. Park. Dis.* **8**, S59–S64 (2018).
- Lawton, M. et al. Developing and validating Parkinson's disease subtypes and their motor and cognitive progression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **89**, 1279–1287 (2018).
- Fanning, S., Selkoe, D. & Dettmer, U. Parkinson's disease: proteinopathy or lipodopathy? *npj Park. Dis.* **6**, 3 (2020).
- Shahmoradian, S. H. et al. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat. Neurosci.* **22**, 1099–1109 (2019).
- Sulzer, D. & Edwards, R. H. The physiological role of  $\alpha$ -synuclein and its relationship to Parkinson's Disease. *J. Neurochem.* **150**, 475–486 (2019).

39. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46–50 (2010).
40. Fabelo, N. et al. Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Mol. Med.* **17**, 1107–1118 (2011).
41. Hatano, T. et al. Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 678–690 (2007).
42. Cha, S.-H. et al. Loss of parkin promotes lipid rafts-dependent endocytosis through accumulating caveolin-1: implications for Parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.* **10**, 63 (2015).
43. Jesús, S. et al. GBA variants influence motor and non-motor features of Parkinson's disease. *PLoS ONE* **11**, 1–17 (2016).
44. Alcalay, R. N. et al. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain* **138**, 2648–2658 (2015).
45. De Melo Amaral, C. E. et al. GBA mutations p.n370s and p.L444p are associated with Parkinson's disease in patients from northern Brazil. *Arq. Neuropsiquiatr.* **77**, 73–79 (2019).
46. Nuytemans, K. et al. Novel variants in LRRK2 and GBA identified in latino Parkinson disease cohort enriched for Caribbean origin. *Front. Neurol.* **11**, 1–8 (2020).
47. Gegg, M. E. et al. No evidence for substrate accumulation in Parkinson brains with GBA mutations. *Mov. Disord.* **30**, 1085–1089 (2015).
48. García-Sanz, P., Aerts, M. F. G. J. & Moratalla, R. The role of cholesterol in  $\alpha$ -synuclein and Lewy body pathology in GBA1 Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **36**, 1–17 (2020).
49. Henderson, M. X. et al. Glucocerebrosidase activity modulates neuronal susceptibility to pathological  $\alpha$ -synuclein insult. *Neuron* **105**, 822–836 (2020). e7.
50. García-Sanz, P. & Moratalla, R. The importance of cholesterol in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **33**, 343–344 (2018).
51. García-Sanz, P., Orgaz, L., Fuentes, J. M., Vicario, C. & Moratalla, R. Cholesterol and multilamellar bodies: lysosomal dysfunction in GBA -Parkinson disease. *Autophagy* **14**, 717–718 (2018).
52. Reynolds, R. H. et al. Moving beyond neurons: the role of cell type-specific gene regulation in Parkinson's disease heritability. *npj Park. Dis.* **5**, 6 (2019).
53. Guedes, L. C. et al. Serum lipid alterations in GBA-associated Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.* **44**, 58–65 (2017).
54. Wang, A., Lin, Y., Wu, Y. & Zhang, D. Macronutrients intake and risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Geriatr. Gerontol. Int.* **15**, 606–616 (2015).
55. Postuma, R. B. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **30**, 1591–1601 (2015).

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the donors and the Hospital Universitario Virgen del Rocío-Instituto de Biomedicina de Sevilla Biobank (Andalusian Public Health System Biobank and ISCIII-Red de Biobancos PT17/0015/0041) for the human specimens used in this study. This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation [RTC2019-007150-1], the Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (ISCIII-FEDER) [PI14/01823, PI16/01575, PI18/01898, PI19/01576], the Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía [CVI-02526, CTS-7685], the Consejería de Salud y Bienestar Social de la Junta de Andalucía [PI-0471-2013, PE-0210-2018, PI-0459-2018, PE-0186-2019], and the

Fundación Alicia Koplowitz. Pilar Gómez-Garre was supported by the "Nicolás Monardes" program [C-0048-2017] (from Andalusian Regional Ministry of Health). Silvia Jesús was supported by the "Acción B Clínicos Investigadores" program from the Consejería de Salud y Familias de la Junta de Andalucía [B-0007-2019]. Daniel Macías-García was supported by the "Río Horteiga" program [CM18/00142] from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII-FEDER). María Teresa Perrián was supported by the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports [FPU16/05061]. Miguel Ángel Labrador-Espinosa is supported by University of Seville [USE-18817-A].

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

D.M.G. and P.M. conceived the project idea and designed the project. Acquisition, analysis or interpretation of results: all authors. D.M.G. and MV. J.J. contributed equally to the statistical analysis. D.M.G. drafted the first version of the manuscript. All authors reviewed and approved the final version of this article.

## COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00206-6>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to P.G.-G. or P.M.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

## SUPPLEMENTARY DATA

### Supplementary Data 1. Statistical Analysis Methods

We accomplished a Levene's test to study the homogeneity of variances of serum lipid variables (Total Cholesterol, HDL, LDL and triglycerides) in our population.

Depending on the results of the test, we chose the proper *post hoc* comparisons test and, if it was necessary, we added a Welch's test to the analysis of covariance (ANCOVA) already done. If there was homogeneity of variances (Levene's test  $p$  value  $> 0.05$ ), we applied Tukey test for multiple comparisons between groups. Instead, if homogeneity of variances should not be accepted (Levene's test  $p$  value  $< 0.05$ ), we applied Games-Howell test for multiple comparisons.

*Supplementary Table 1. Test for Equality of Variances (Levene's) in serum lipid variables*

	<b>F</b>	<b>df1</b>	<b>df2</b>	<b>p</b>
<i>Total cholesterol</i>	0.850	3	665	0.193
<i>HDL</i>	1.130	3	529	0.336
<i>LDL</i>	5.091	3	519	0.002*
<i>Triglycerides</i>	2.375	3	660	0.069

\*  $p < 0.05$

We applied Welch's test to compare mean levels of serum lipids variables between groups when homogeneity of variances was not accepted (LDL).

*Supplementary Table 2. Welch's Test applied to compare mean levels of serum lipids variables between groups*

	<b>F</b>	<b>df1</b>	<b>df2</b>	<b>p</b>
Total Cholesterol	5.902	3	63.039	0.001*
HDL	1.029	3	52.265	0.388
LDL	4.620	3	50.232	0.006*
Triglycerides	2.199	3	64.098	0.097

\*  $p < 0.05$

Supplementary Table 3. Post Hoc Comparisons - Total Cholesterol

		Mean Difference	95% CI for Mean Difference		SE	t	p <sub>tukey</sub>
			Lower	Upper			
HCs	sPD	6.397	-2.09	14.89	3.296	1.940	0.212
	GBA-PD	23.935	2.22	45.65	8.430	2.838	0.024**
	LRRK2-PD	-11.578	-32.07	8.91	7.957	-1.226	0.465
sPD	GBA-PD	17.538	-4.64	39.72	8.613	2.035	0.176
	LRRK2-PD	-17.975	-38.97	3.02	8.150	-1.993	0.123
GBA-PD	LRRK2-PD	-35.513	-64.50	-6.53	11.253	-3.004	0.009**

Note. P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). HCs: healthy controls. sPD: sporadic Parkinson's disease. GBA-PD: GBA-associated Parkinson's disease patients. LRRK2-PD: LRRK2-associated Parkinson's disease patients. \*\*\* p< 0.005 \*\* p< 0.05 \*p<0.1

Supplementary Table 4. Post Hoc Comparisons - HDL

		Mean Difference	95% CI for Mean Difference		SE	t	p <sub>tukey</sub>
			Lower	Upper			
HCs	sPD	-2.083	-6.36	2.20	1.661	-1.741	0.303
	GBA-PD	-2.261	-8.43	12.95	4.147	-0.175	0.948
	LRRK2-PD	2.155	-7.37	11.68	3.695	1.211	0.937
sPD	GBA-PD	4.344	-6.65	15.34	4.267	0.514	0.739
	LRRK2-PD	4.238	-5.63	14.11	3.829	1.932	0.686
GBA-PD	LRRK2-PD	-0.106	-14.01	13.80	5.395	0.962	1.000

Note. P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). HCs: healthy controls. sPD: sporadic Parkinson's disease. GBA-PD: GBA-associated Parkinson's disease patients. LRRK2-PD: LRRK2-associated Parkinson's disease patients. \*\*\* p< 0.005 \*\* p< 0.05 \*p<0.1

Supplementary Table 5. Games-Howell Post Hoc Comparisons - LDL

Comparison		Mean Difference	95% CI for Mean Difference		SE	t	p G-H
			Lower	Upper			
HCs	sPD	1.733	-7.98	11.45	3.754	0.462	0.967
	<i>GBA</i> -PD	21.708	1.35	42.06	7.241	2.998	0.034**
	<i>LRRK2</i> -PD	-13.601	-31.69	4.49	6.581	-1.62	0.191
sPD	<i>GBA</i> -PD	19.975	-1.43	41.40	7.790	2.564	0.074*
	<i>LRRK2</i> -PD	-15.334	-34.687	4.018	7.180	-1.73	0.162
<i>GBA</i> -PD	<i>LRRK2</i> -PD	-35.309	-60.812	-9.806	9.482	-3.39	0.003***

HCs: healthy controls. sPD: sporadic Parkinson's disease. *GBA*-PD: *GBA*-associated Parkinson's disease patients. *LRRK2*-PD: *LRRK2*-associated Parkinson's disease patients. \*\*\* p< 0.005 \*\* p< 0.05 \*p<0.1

Supplementary Table 6. Post Hoc Comparisons - Triglycerides

		95% CI for Mean Difference					
		Mean Difference	Lower	Upper	SE	t	p <sub>tukey</sub>
HCs	sPD	13.563	0.393	29.596	5.533	2.451	0.059*
	GBA-PD	10.199	-24.382	48.258	14.060	0.725	0.875
	LRRK2-PD	5.398	-29.152	39.418	13.311	0.407	0.980
sPD	GBA-PD	-3.364	-40.254	34.140	14.377	-0.234	0.995
	LRRK2-PD	-8.165	-44.989	25.267	13.607	-0.600	0.925
GBA-PD	LRRK2-PD	-4.801	-55.400	41.791	18.768	-0.256	0.994

Note. P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). HCs: healthy controls. sPD: sporadic Parkinson's disease. GBA-PD: GBA-associated Parkinson's disease patients. LRRK2-PD: LRRK2-associated Parkinson's disease patients.

\*\*\*p<0.005 \*\*p< 0.05 \*p<0.1

## Supplementary Data 2.

*Supplementary Table 7. Complete list of primers used in GBA screening*

<b>Primer</b>	<b>Sequences</b>
Exon 1A F	5'-GGAAGGTTAGGAATCCTCTGAGC
Exon 1A R	5'-GAAAAGCAGCCCTGGGGAGT
Exon 1B f	5'-GCCTCTGCATGAGTGACCGT
Exon 1B r	5'-TTAAGTGCGAACGCAGGGAG
Exon 2 F	5'-CCGGAATTACTTGCAGGGCT
Exon 2 R	5'-CCTGGATTCAAAGAGAGTCTGTCA
Exon 3 F2	5'-GTGGGCCTTGTCTAATGAA
Exon 3 R2	5'-ACCACCTGCTTACTGGAAGG
Exon 4 F	5'-GCAGATGTGTCCATTCTCCA
Exon 4 R	5'-CACTGACACCATTACCTCTAGGA
Exon 5 F	5'-TTCCCGCTGGGTACTGATAC
Exon 5 R	5'-CGAAAAGTTTCAATGGCTCT
Exon 6 F	5'-CAGGAGCCCAAGTTCCCTTT
Exon 6 R	5'-CTACAGTTTCTCAACCCCCAGA
Exon 7 F	5'-GTGGAGGCTAATGGCTGAAC
Exon 7 R3	5'-ACAGATCAGCATGGCTAAAT
Exon 8 F	5'-CACCCAGCTGGTCTGGTC
Exon 8 R	5'-GCTCTAAGTTTGGGAGCCAGT
Exon 9 F	5'-CTGTGTGCAAGGTCCAGGAT
Exon 9 R	5'-AGGTCTGAGGTCTGCTTTGC
Exon 10 F2	5'-CACAGCTGCCTCTCCACAT
Exon 10 R4	5'-GTCACCTCCTGCCTCCATG
Exon 11 F	5'-GTCCGTGGGTGGGTGACT
Exon 11 R	5'-ACGCTGTCTTCAGCCCACT
Exon 12 F2	5'-TGGCAGGATCACACTCAG
Exon 12 R2	5'-TGCTGTGCCCTCTTTAGTCA



*Supplementary Table 8. Complete list of primers used in LRRK2 screening*

<b>Primer</b>	<b>Sequences</b>
Exon 20 F2	AATTGTTGATTTCTAAGTTGCTGGT
Exon 20 R2	TGGGTCCTATTGTTCAATGTCAGT
Exon 21 F	GATTTTACAAAGGGAATGGACTGTG
Exon 21 R	GTCAGCAGCAAAACACAACATAATC
Exon 22 F	TGTCCTCTTCTCCAATAAATGACAG
Exon 22 R	TGGAGGAAATTCAACCAAACAC
Exon 23 F	GCTAGGAGGTGCTCACTAAACTTT
Exon 23R	AAGCTCTTCAAATGTCTTGAAAGTT
Exon 24 F	GCTAGACTTAAGTTCCTCAGATGG
Exon 24 R	TCAGCATATTTAGGCAACCC
Exon 25 F	AATGAGTCCTCTTTGATGCTGTTC
Exon 25 R	AAGGGTCCATATATGACTCATCTTG
Exon 26 F	CACTATTGGTAGCTGTTCTTATTTTTG
Exon 26R	AAGGTTCTGTTCCAGCTAATGTG
Exon 27 F	ACCCTGGGGAAAATTATTTGTG
Exon 27 R	GAAGCTTCTAGTTTCATGAAATTGG
Exon 28 F	CTTCCTCCCACCAACAGG
Exon 28 R	TGTCCATCAAAGTCACAGAGAG
Exon 29 F	CAAATACTAGGTTTCTTCAACAGCG
Exon 29 R	CATACAGTCTACCAGGTTTCTGGAT
Exon 30 F	GGATTCTTGCCTGTCGTTTG
Exon 30 R	CTCGGAAAGTTTCCCAATTCAA
Exon 31 F	AGCAGGCCCAGTTTGAAAG
Exon 31 R	GACATTTCTAGGCAGTTGAGAATC
Exon 32 F	TTAGCACTGAATTTGCCAACC
Exon 32 R	CCGTATGGATATTCTCTCAACTTTG
Exon 33 F	AAAGCCCCTTGATATTTGTTC
Exon 33 R	ATGCTTTGACCATAACCCCC
Exon 34 F	TCTTTCTGACTACTTTCCTGAGCA
Exon 34 R	TTCTTTACCTGCTTGGAACCAG
Exon 35 F	AGGTTGGGTGTTTTGTGAGG
Exon 35 R	ATGCCATCTCCCTAATTTCTC
Exon 36 F	GGAAGCAGTTAATAATTAATGGCTC
Exon 36 R	AAACATTCAAATTGTTTCCTTACC
Exon 37 F	CTTTGCGACAGTATGAGGTTTAGA
Exon 37 R	TGAAGGATCACTTAAAAGCATTGT
Exon 38 F	TTCACATCAAACCACAAATTTATG

Exon 38 R	GCAAAACAAATTCCAGATCTGTAAT
Exon 39 F	TCAATGAAACAAGTAGGTCAGGTTT
Exon 39 R	CATTATTTTGCATTTTCACAACGT
Exon 40 F	CCTGTTGATGCACTTTAAAGAAGG
Exon 40 R	TGACCTACTTACCTCAAACCATCAG
Exon 41 F	TTTTGATGCTTGACATAGTGGAC
Exon 41 R	CACATCTGAGGTCAGTGGTTATC
Exon 42 F	TATGAGCCCTGATGTTGGTC
Exon 42 R	CAATTAATAAAAAATGAAGCTGCTG
Exon 43 F	TTTTCTTTGCAATGTCTGGACC
Exon 43 R	GGTGAAAATTATAGGAGGTTTGCC
Exon 44 F	TTCAAGGGAAATGAGTTAACTCG
Exon 44 R	TGAAAGATTTAAAGAGCATTGGA
Exon 45 F	TTTTCTTTTCTTAACAGGAAGTTGC
Exon 45 R	TGCTGATGCAATAACAATTATGC
Exon 46 F	AAAGTGGAGGAGAACATTAAGGC
Exon 46 R	AATCCCATAAGAGGGGTGTG
Exon 47 F	TTTGAAAGCACAGATTTTATGGAG
Exon 47 R	AAGATCTTCCTTATGAATTATCAACAG
Exon 48 F	ATATTCAATTCAGAATGGTTAGGGA
Exon 48 R	CTGTGACACATGAAGTGCAAAGAT
Exon 49 F	CTTTATGGTTCTAGGGAGGTAATGG
Exon 49 R	GCACTGGAAAGTTCAGAGAAAATG
Exon 50 F	TTCAGTTCCAAGGTATTTGTGTC
Exon 50 R	TGTTACCATCATTACATCATTG
Exon 51 F	TAAAATACATGAGCCAAACTGAAA
Exon 51 R	TTCATACACACGAGCTATTTCAAAA

# Increased stroke risk in Parkinson's disease patients with *LRRK2* mutations

Publicado como:

**Macias-Garcia D**, Periñan MT, Muñoz-Delgado L, Jesús S, Jimenez-Jaraba MV, Buiza-Rueda D, Bonilla-Toribio M, Adarmes-Gomez A, Carrillo F, Gómez-Garre P, Mir P. Increased stroke risk in Parkinson's disease patients with *LRRK2* mutations. *Mov Disord.* 2021. Accepted / In press. DOI: 10.1002/mds.28863

## Increased stroke risk in Parkinson's disease patients with *LRRK2* mutations

Daniel Macías-García<sup>1,2</sup>, MD; María Teresa Periñán<sup>1,2</sup>, MsC; Laura Muñoz-Delgado<sup>1,2</sup>, MD; Silvia Jesús<sup>1,2</sup>, MD, PhD; María Valle Jimenez-Jaraba<sup>1</sup>, BSc; MsC; Dolores Buiza-Rueda<sup>1,2</sup>, MsC; Marta Bonilla-Toribio, MsC<sup>1,2</sup>; Astrid Adarmes-Gómez<sup>1,2</sup>, MD; Fátima Carrillo<sup>1,2</sup>, MD, PhD; Pilar Gómez-Garre<sup>1,2\*</sup>, PhD; Pablo Mir<sup>1,2,3\*</sup>, MD, PhD.

Authors' affiliations:

1. Unidad de Trastornos del Movimiento, Servicio de Neurología y Neurofisiología Clínica, Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Seville, Spain.

2. Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain.

3. Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

### \*Authors for correspondence:

Dr Pablo Mir and Dr Pilar Gómez-Garre

Unidad de Trastornos del Movimiento,

Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS),

Hospital Universitario Virgen del Rocío,

Avda. Manuel Siurot s/n, 41013, Seville, Spain.

Tel.: +34 955923039; Fax +34 955923101

Email: [pmir@us.es](mailto:pmir@us.es) and [mgomez-ibis@us.es](mailto:mgomez-ibis@us.es)

**Total word count of the manuscript:** 598

**Running title:** Stroke risk in sporadic and familial PD

1  
2  
3 **Keywords:** Parkinson's disease, sporadic Parkinson's disease, leucine-rich repeat  
4  
5 kinase 2, stroke, cerebrovascular disease.  
6  
7

8 **Disclosure statement:** No authors have actual or potential conflicts of interest.  
9

10  
11 **Funding sources:** This work was supported by the Spanish Ministry of Science and  
12  
13 Innovation [RTC2019-007150-1], the Carlos III Health Institute-The European  
14  
15 Regional Development Fund (ISCIII-FEDER) [PI14/01823, PI16/01575, PI18/01898,  
16  
17 PI19/01576], the Ministry of Economy, Innovation, Science and Employment of the  
18  
19 Government of Andalucía [CVI-02526, CTS-7685], the Ministry of Health and Social  
20  
21 Welfare of the Government of Andalucía [PI-0471-2013, PE-0210-2018, PI-0459-2018,  
22  
23 PE-0186-2019] and Fundación Alicia Koplowitz. Pilar Gómez-Garre was supported by  
24  
25 the "Nicolás Monardes" program [C-0048-2017] (from the Andalusian Regional  
26  
27 Ministry of Health). Silvia Jesús was supported by the "Acción B Clínicos  
28  
29 Investigadores" program from the Ministry of Health and Families of the Government  
30  
31 of Andalucía [B-0007-2019]. Daniel Macías-García was supported by the "Río  
32  
33 Horteiga" program [CM18/00142] from the Carlos III Health Institute (ISCIII-FEDER).  
34  
35 María Teresa Perriñán was supported by the Spanish Ministry of Education, Culture and  
36  
37 Sports [FPU16/05061].  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Parkinson's disease (PD) is associated with an increased stroke risk without relationship  
4 with coronary artery disease (CAD).<sup>1</sup> To date, little is known about the influence of PD-  
5 related genes in the vascular risk of these patients. This work aims to determine whether  
6 the vascular risk differs between sporadic/familial PD forms and controls.  
7  
8  
9

10  
11  
12 We recruited 355 patients with sporadic PD (sPD), 38 with *GBA*-associated PD (*GBA*-  
13 PD), 36 with *LRRK2*-associated PD (*LRRK2*-PD), 23 with *PRKN*-associated PD  
14 (*PRKN*-PD) and 620 controls. Demographic, clinical, and vascular risk factors data  
15 were collected. The presence of vascular events (ischemic stroke and CAD) were  
16 determined by clinical interview and consulting electronic medical records. We applied  
17 multivariate logistic regression and Cox regression analyses. In a confirmatory analysis,  
18 we repeated our multivariate analysis only with subjects who had a neuroimaging test  
19 (CT or MRI) available in their electronic records. The mutational screening of *PRKN*,  
20 *GBA*, and *LRRK2* genes was previously performed using a combination of high-  
21 resolution melting and direct DNA resequencing (Supplementary Material).<sup>2,3</sup>  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

36 sPD patients were significantly older than controls and *GBA*-PD. *PRKN*-PD had a lower  
37 rate of arterial hypertension. There were no other differences in vascular risk factors  
38 among groups (Table S1). *PRKN*-PD showed a significantly younger PD onset and  
39 longer disease duration than the other groups, and *GBA*-PD had a younger disease onset  
40 than sPD (Table S4-S6). However, there were no differences in other PD features.  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

48 The prevalence of ischemic stroke differed among groups, and this difference was  
49 statistically significant after controlling for sex, age, and vascular risk factors (Table S7-  
50 S8). However, no differences in CAD were found among groups. *LRRK2*-PD had the  
51 highest proportion of stroke (13.8%), followed by *PRKN*-PD and sPD (8.6% and 5.6%,  
52 respectively). *LRRK2*-PD showed a significantly increased risk of stroke compared with  
53 controls (OR 5.1; 95% CI 1.7-15.3; p=0.004), whereas there were no significant  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 differences in the other PD cohorts (Figure 1A). In our confirmatory analysis, we  
4 corroborated the previous finding. Interestingly, in that analysis sPD also showed a  
5 marginally significant increased risk of stroke compared with controls (OR 1.8; 95% CI  
6 0.99-3.2;  $p=0.05$ ) (Figure 1B). There was statistically significant difference in the  
7 survival distribution for ischemic stroke among groups (Figure 1C). The increased risk  
8 of stroke in *LRRK2*-PD was associated with a younger age at stroke compared with  
9 controls, a finding supported by our confirmatory analysis (Figure 1D).

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20 Our results are aligned with previous studies.<sup>4,5</sup> A meta-analysis concluded that the  
21 overall PD group had a 1.7-fold increase in the risk of stroke compared with controls,  
22 without differences in CAD.<sup>1</sup> In our study, sPD showed a similar increase in the stroke  
23 risk, although this association was marginally significant. *LRRK2*-PD showed a 5.1-fold  
24 increase in the risk of ischemic stroke after controlling for potential confounding  
25 factors. These results might be related to a different pathophysiology of stroke in certain  
26 PD subtypes compared with controls. A link between these brain disorders has been  
27 proposed, beyond the classical risk factors; considering the role of oxidative stress,  
28 neuroinflammation, altered lipid metabolism, among others.<sup>6</sup> Interestingly, it has been  
29 suggested that pathogenic variants of *LRRK2* might contribute to post-ischemic brain  
30 damage and neuroinflammation.<sup>7</sup>

31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46 In conclusion, *LRRK2*-PD patients may show an increased risk of ischemic stroke, with  
47 no differences in CAD. The sporadic forms of PD might have a higher cerebrovascular  
48 risk than controls. Conversely, *GBA*-PD and *PRKN*-PD patients showed a similar  
49 vascular risk to controls. Our results support the idea that mechanisms other than  
50 classical vascular risk factors might be involved in the cerebrovascular disease of those  
51 patients. Prospective studies are needed to confirm these findings.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Detailed introduction, methods, results, and discussion are included as Supplementary Material.



## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the donors and the Hospital Universitario Virgen del Rocío-Instituto Biomedicina de Sevilla Biobank (Andalusian Public Health System Biobank and ISCIII-Biobank Network PT17/0015/0041) for the human specimens used in this study.

## AUTHORS' ROLES

1. Research project: A. Conception, B. Organization, C. Execution;
2. Statistical Analysis: A. Design, B. Execution, C. Review and Critique;
3. Manuscript Preparation: A. Writing of the first draft, B. Review and Critique

Macías-García D: 1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A

Periñan MT: 1C, 2B, 2C, 3B

Muñoz-Delgado L: 1B, 1C, 3B

Jesús S: 1B, 1C, 3B

Jiménez-Jaraba MV: 2B, 2C, 3B

Buiza-Rueda D: 1B, 1C, 3B

Bonilla-Toribio M: 1B, 1C, 3B

Adarmes-Gómez AD: 1B, 1C, 3B

Carrillo F: 1B, 1C, 3B

Gómez-Garre P: 1B, 1C, 2C, 3B

1  
2  
3 Mir P: 1A, 1B, 1C, 2A, 2C, 3B  
4  
5  
6  
7

8  
9 **DATA AVAILABILITY STATEMENT**  
10

11 The data that support the findings of this study are available from the corresponding  
12 author upon reasonable request.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

20 **FINANCIAL DISCLOSURE**  
21

22 Macías-García D has received honoraria from Abbvie, Teva and Zambon.  
23  
24

25 Periñan MT: none  
26

27 Muñoz-Delgado L has received honoraria from Teva.  
28

29 Jesús S has received honoraria from Abbvie, Bial, Merz, UCB, Italfarmaco and  
30 Zambon.  
31  
32  
33

34 Jiménez-Jaraba MV: none  
35

36 Buiza-Rueda D: none  
37  
38

39 Bonilla-Toribio M: none  
40

41 Adarmes-Gómez AD has received honoraria from Abbvie, Italfarmaco, Zambon, Bial  
42 and Teva.  
43  
44

45 Carrillo F has received honoraria from Abbvie, Abbott, UCB and Zambon.  
46  
47

48 Gómez-Garré P: none  
49

50 Mir P has received honoraria from Abbott, Allergan, Abbvie, Bial, Britannia,  
51 Italfarmaco, Merz, UCB, Teva and Zambon  
52  
53  
54  
55

56 **CONFLICT OF INTERESTS:** none.  
57  
58  
59  
60

**REFERENCES**

1. Alves M, Caldeira D, Ferro JM, Ferreira JJ. Does Parkinson's disease increase the risk of cardiovascular events? A systematic review and meta-analysis. *Eur J Neurol.* 2020;27:288–96.
2. Jesús S, Huertas I, Bernal-Bernal I, et al. GBA variants influence motor and non-motor features of Parkinson's disease. *PLoS One.* 2016;11:1–17.
3. Macías-García D, Periñán MT, Muñoz-Delgado L, et al. Serum lipid profile among sporadic and familial forms of Parkinson's disease. *npj Park Dis.* 2021;7:59.
4. Becker C, Jick SS, Meier CR. Risk of stroke in patients with idiopathic Parkinson disease. *Park Relat Disord.* 2010;16:31–5.
5. Patel M, Coutinho C, Emsley HCA. Prevalence of radiological and clinical cerebrovascular disease in idiopathic Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg.* 2011;113:830–4.
6. Potashkin J, Huang X, Becker C, et al. Understanding the Links Between Cardiovascular Disease and Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2020;35:55–74.
7. Kim T, Vemuganti R. Mechanisms of Parkinson's disease-related proteins in mediating secondary brain damage after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37:1910–26.

**Figure legends**

Figure 1. Multivariate logistic regression and Cox regression model to determine the association between the occurrence of ischemic stroke and the study groups.

**(A)** Forest plot with adjusted odds ratio and confidence intervals of symptomatic ischemic stroke within the disease groups compared with controls. **(B)** Forest plot with adjusted odds ratio and confidence intervals of neuroimaging-confirmed ischemic stroke within the disease groups compared with controls. **(C)** Survival plots of symptomatic ischemic stroke in the Parkinson's disease groups and controls. Lines represent the cumulative event-free survival in years of age. **(D)** Survival plots of neuroimaging-confirmed ischemic stroke in the Parkinson's disease groups and controls. Lines represent the cumulative event-free survival in years of age. OR, odds ratio; CI, confidence interval; sPD, patients with sporadic Parkinson's disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson's disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson's disease; *PRKN*-PD, patients with *PRKN*-associated Parkinson's disease.

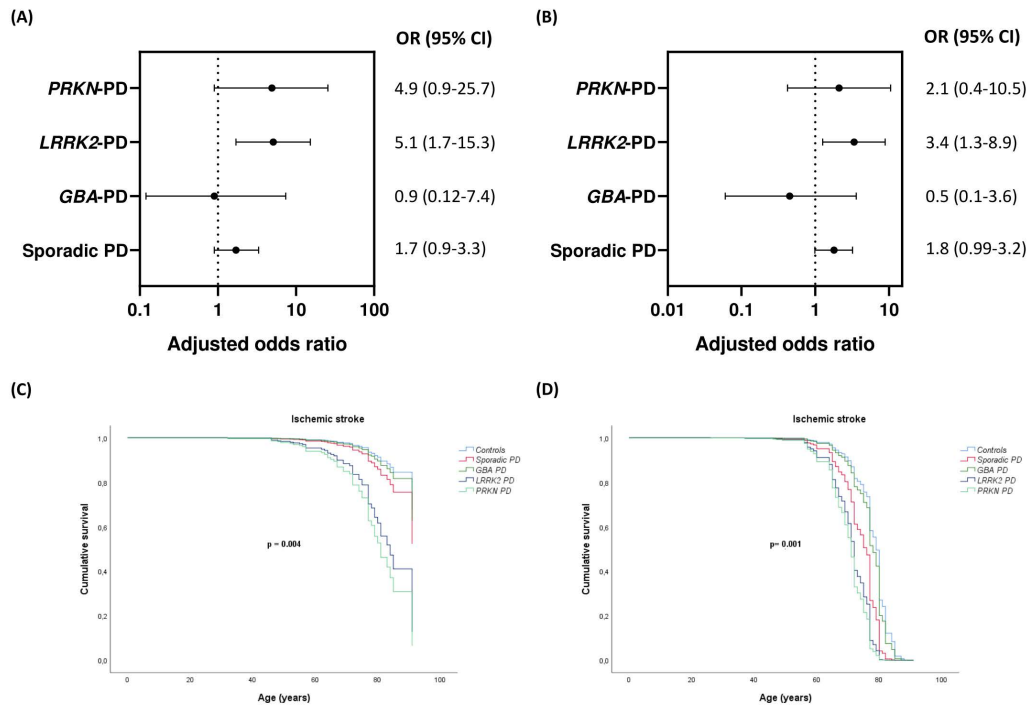


Figure 1. Multivariate logistic regression and Cox regression model to determine the association between the occurrence of ischemic stroke and the study groups. **(A)** Forest plot with adjusted odds ratio and confidence intervals of symptomatic ischemic stroke within the disease groups compared with controls. **(B)** Forest plot with adjusted odds ratio and confidence intervals of neuroimaging-confirmed ischemic stroke within the disease groups compared with controls. **(C)** Survival plots of symptomatic ischemic stroke in the Parkinson's disease groups and controls. Lines represent the cumulative event-free survival in years of age. **(D)** Survival plots of neuroimaging-confirmed ischemic stroke in the Parkinson's disease groups and controls. Lines represent the cumulative event-free survival in years of age. OR, odds ratio; CI, confidence interval; sPD, patients with sporadic Parkinson's disease; LRRK2-PD, patients with LRRK2-associated Parkinson's disease; GBA-PD, patients with GBA-associated Parkinson's disease; PRKN-PD, patients with PRKN-associated Parkinson's disease.

857x482mm (79 x 79 DPI)

## Supplementary Material

### Supplementary introduction

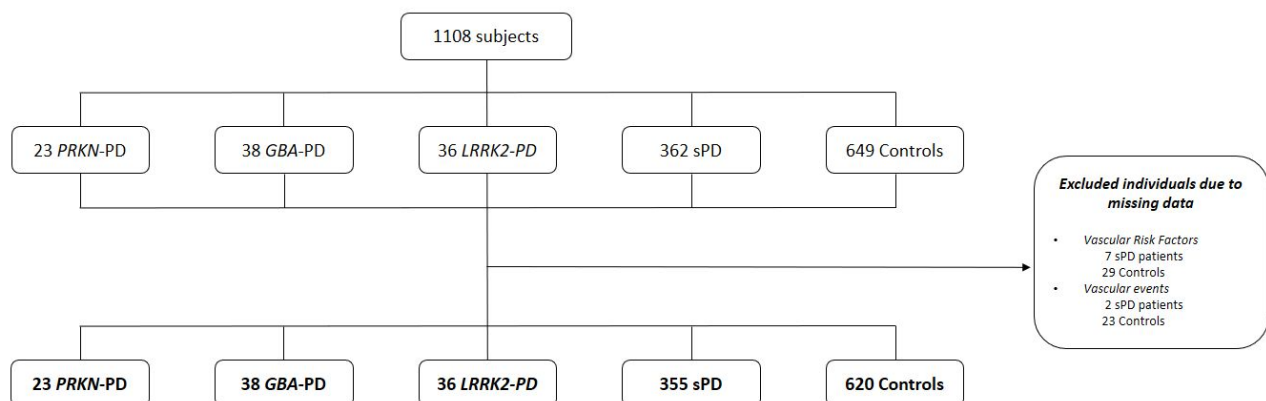
Parkinson's disease (PD) is the most prevalent neurodegenerative disorder, after Alzheimer's disease.<sup>1</sup> Although the pathological hallmarks of the disease (Lewy pathology,  $\alpha$ -synuclein accumulation, midbrain dopaminergic cell degeneration) are well-known, the etiopathogenesis of PD remains unclear.<sup>2-4</sup> A multifactorial model has been proposed in which genetic and environmental factors modulate the risk of developing PD.<sup>3</sup> Several authors have stated that a different approach is needed, considering that PD is not a single disease but various entities that converge in dopaminergic cell degeneration.<sup>4</sup> Numerous epidemiological and observational studies have linked vascular events with PD,<sup>5-13</sup> with a number of studies describing the influence of stroke and myocardial infarction on mortality among PD and other parkinsonian syndromes, sometimes with controversial results.<sup>5-7</sup> Other studies have attempted to clarify whether PD is a risk factor for developing a vascular event. Whereas a number of authors have found no differences between patients with PD and controls in terms of cumulative stroke incidence or have found a reduced risk of stroke among patients with PD,<sup>8,9</sup> other studies have reported an increased risk of stroke in PD.<sup>10-13</sup> Regarding coronary artery disease (CAD) in PD, studies with large cohorts have shown controversial results.<sup>10,13,14</sup> A prospective study in a Taiwanese population showed an increased risk of acute myocardial infarction in patients with PD, while a European epidemiological study reported no differences between PD and controls in the proportion of CAD.<sup>10,14</sup> A recent meta-analysis concluded that PD is associated with an increased risk of stroke.<sup>15</sup> Nevertheless, the authors found no relationship between PD diagnosis and CAD or cardiovascular mortality. Malek et al. reported an association between cerebrovascular disease and motor/cognitive features in patients with recently diagnosed PD.<sup>16</sup> It has been suggested that aspects other than the classical risk factors might influence the link between PD and vascular disease (e.g., altered glucose and lipid metabolism, oxidative stress, and neuroinflammation).<sup>17</sup> A number of studies have proposed a possible cardioprotective effect of various proteins related to PD etiology (such as Parkin, DJ-1, and PINK1), whereas other studies have suggested that the leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*) gene could contribute to post-ischemic neural damage and neuroinflammation.<sup>18-20</sup> Furthermore, a genome-wide association study showed that certain genes were shared between ischemic stroke and PD,<sup>21</sup> supporting the idea of common molecular pathways between the two diseases. Pathogenic variants in *LRRK2*, *Parkin* (*PRKN*) and glucocerebrosidase (*GBA*) genes are considered the main genetic factors that predispose individuals to the development of PD.<sup>3</sup> Various studies have described the specific clinical phenotypes of these patients.<sup>22,23</sup> Other specific clinical features have been shown in the familial forms of PD; for instance, an increase in certain types of cancer among patients with *LRRK2* mutations compared with idiopathic PD.<sup>24</sup> Surprisingly, survival studies among familial and sporadic forms of PD have shown controversial results, suggesting that other factors might play a role in their survival.<sup>25,26</sup> Finally, a specific serum lipid profile was described in a statin-free study in PD patients with *GBA* mutations compared with other forms of PD.<sup>27</sup> To date, little is known about the influence of PD-related genes in vascular disease. Given the reported

association between cerebrovascular events and PD, the present study is aimed at determining whether the vascular risk differs between sporadic and familial forms of PD.

## Supplementary Methods

### Participants

We conducted this study with patients with PD recruited from the Movement Disorder Clinic at Hospital Universitario Virgen del Rocío in Seville, Spain. PD was diagnosed following the Movement Disorder Society Clinical Diagnostic Criteria.<sup>28</sup> We recruited controls from the same geographical area and did not include those who had any neurodegenerative disorder, a family history of PD or a pathogenic variant in *PRKN*, *GBA* or *LRRK2*. Patients with PD with known mutations in PD-related genes other than *PRKN*, *GBA* or *LRRK2* were neither included in the study. We classified the patients with PD based on their genetic status: patients with *LRRK2*-associated PD (*LRRK2*-PD), patients with *GBA*-associated PD (*GBA*-PD), patients with *PRKN*-associated PD (*PRKN*-PD) and patients with sporadic PD (sPD). All genetic variants were classified in accordance with the American Society of Human Genetics guidelines. All the individuals considered for the study were Caucasian to avoid ethnic influences. We included a total of 1108 individuals and divided them into 5 groups: 362 sPD, 38 *GBA*-PD, 36 *LRRK2*-PD, 23 *PRKN*-PD and 649 controls (Figure S1).



**Figure S1.** Flowchart for the distribution of the study participants. Resulting groups are represented in bold. sPD, patients with sporadic Parkinson's disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson's disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson's disease; *PRKN*-PD, patients with *PRKN*-associated Parkinson's disease.

None of the individuals included in the study were blood relatives. All participants underwent a clinical assessment at our centre, and we retrospectively obtained their demographic data by reviewing their electronic medical records. Serum creatinine levels were determined in peripheral blood and analyzed in the central laboratory of our center. The presence of vascular risk factors (arterial hypertension, diabetes, hyperlipidemia, and smoking habit) and vascular events (ischemic stroke and CAD) were determined in our cohort during the clinical interview and by consulting electronic medical records. Regarding the diagnosis of symptomatic cerebrovascular events, patients should have been

1  
2  
3 diagnosed by a neurologist and events should have been confirmed by the presence of  
4 radiological findings (cerebral infarct) on brain imaging (computed tomography, CT, or  
5 magnetic resonance imaging, MRI). We classified the various types of ischemic strokes,  
6 following the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) classification, into 4  
7 separate categories: lacunar infarct, atherothrombotic, cardioembolic and cryptogenic.<sup>29</sup>  
8 We also added the category transient ischemic attack (TIA). All types of symptomatic  
9 CAD were considered, and patients should have been diagnosed by a cardiologist.  
10 We retrospectively reviewed all the neuroimaging tests (brain CT or MRI) available in the  
11 subjects' electronic records (PD patients and controls). For the neuroimaging-confirmed  
12 analyses, we considered as a positive finding both: a) symptomatic strokes confirmed by a  
13 neuroimaging test; and b) asymptomatic strokes diagnosed by a neuroimaging test  
14 conducted for other reasons. White matter hyperintensities were not considered for the  
15 analysis. In the confirmatory analysis, the resultant cohorts were: 267 controls, 257 sPD,  
16 33 *GBA*-PD, 34 *LRRK2*-PD and 21 *PRKN*-PD.  
17  
18  
19  
20  
21

22 The study was approved by the ethics committee of the University Hospital Virgen del  
23 Rocio, and we obtained written informed consent from all the participants in the study.  
24

### 25 **Genetics**

26 We isolated genomic DNA from peripheral blood samples by standard or automated  
27 methods (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche; MagNA Pure LC, Roche  
28 Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), in compliance with established protocols.  
29  
30

#### 31 *GBA* screening

32 Polymerase chain reaction (PCR) primer couples were designed on the basis of the known  
33 genomic sequence (NG\_009783.1). To prevent amplification of the neighbouring  
34 pseudogene, *GBA* was first amplified in 4 large fragments that only and specifically  
35 amplified the functional gene but not the nearby pseudogene. For the mutational screening,  
36 we studied isoform 1 of the *GBA* gene (NM\_001005741. 2), which contains 12 exons,  
37 including a noncoding exon 1. The mutational screening of all exons and intron-exon  
38 boundaries was then performed, using a combination of high-resolution melting (HRM)  
39 analysis and direct DNA resequencing. HRM reactions were performed on a  
40 LightCycler480 (LC480) instrument, and HRM curve acquisition and analysis were  
41 performed using LC480 software version 1.3 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN,  
42 USA). Samples showing abnormal melting profiles, including those with variants, were  
43 sequenced on both strands using the BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied  
44 Biosystems, Foster City, CA, USA) and resolved on an ABI3500 genetic analyzer  
45 (Applied Biosystems).  
46  
47  
48  
49  
50

51 We have adopted the conventional nomenclature, which refers to the processed protein and  
52 excludes the 39-residue signal peptide.  
53

#### 54 *LRRK2* screening

55 The mutational screening of all exons and intron-exon boundaries was performed using a  
56 HRM analysis and/or targeted resequencing. HRM reactions were performed on a  
57 LightCycler480 (LC480) instrument, and HRM curve acquisition and analysis were  
58  
59  
60



1 performed using LC480 software version 1.3 (Roche Applied Science). All samples  
2 showing abnormal melting profiles were sequenced by Sanger sequencing.  
3 Targeted resequencing was performed using a customized Haloplex Target Enrichment  
4 Panel (including *LRRK2*), which was designed using Agilent's online Sure Design tool,  
5 following the manufacturer's protocol (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA).  
6 Additionally, an extension of the first panel was designed using a customized KAPA target  
7 Enrichment Panel, which was designed using Roche's online HyperDesign tool, following  
8 the manufacturer's protocol (Roche Diagnostics). Samples were sequenced employing the  
9 Illumina NextSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Reads were mapped  
10 against the hg38 reference genome by using the Burrow-Wheeler Aligner (BWA). Variant  
11 calling was obtained using an in-house pipeline which takes advantage of the GATK Best  
12 Practices workflow. Produced VCFs were processed with eVAI software (enGenome;  
13 <https://evai.engenome.com/#login>) for annotation. Filtered variants predicted as pathogenic  
14 were validated by Sanger sequencing.  
15  
16  
17  
18  
19  
20

### 21 *PRKN* screening

22 Mutations in *PRKN* were screened in all subjects using HRM as well as targeted  
23 sequencing as described before. CNV was analysed using data from targeted sequencing as  
24 well as MLPA analysis.  
25  
26

### 27 **Statistical analysis**

28 We performed group comparisons of the categorical variables using the chi-squared test or  
29 Fisher's exact test, as appropriate. We employed an analysis of variance (ANOVA) for  
30 comparisons of means and applied post hoc tests when necessary. We applied logistic  
31 regression models to determine the association between ischemic stroke or CAD and the  
32 study groups, adjusting for potential confounding factors (sex, age, and vascular risk  
33 factors). If an association was found, we used odds ratios (OR) to examine the risk of a  
34 vascular event (ischemic stroke or CAD) among the various cohorts of PD compared with  
35 the controls. We employed Cox regression analysis to examine the association between the  
36 study groups and the occurrence of a vascular event (ischemic stroke or CAD) as a time-  
37 dependent outcome, censoring at age during the last follow-up or age at death. To avoid  
38 potential bias regarding stroke overdiagnosis in the PD population, we reviewed all  
39 neuroimaging studies (CT or MRI) available in the subjects' records conducted for any  
40 other reason. In a confirmatory analysis, we repeated our multivariate analysis (logistic  
41 multivariate regression and Cox regression) only with subjects who had a neuroimaging  
42 test. We performed all the statistical analyses with IBM SPSS software (26 for Windows;  
43 IBM, Armonk, NY, USA) and the R studio software package. A *p*-value < 0.05 was  
44 considered statistically significant.  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

### 52 **Supplementary results**

#### 53 **Participant clinical and demographic characteristics**

54 Figure 1 shows the final study groups. Table S1 lists the demographic and clinical  
55 characteristics of the study groups. The *LRRK2*-PD group consisted on 29 *LRRK2*  
56 p.G2019S PD patients (80.6 %) and 7 *LRRK2* p.R1441G PD patients (19.4%). The list of  
57  
58  
59  
60

*GBA* pathogenic variants considered for the inclusion of patients in the *GBA*-PD group is shown in Table S2, the most frequent variant being p.N370S (34% of *GBA*-PD). The *PRKN*-PD group contained 15 PD patients with homozygous mutations in *PRKN* (65.2%) and 8 PD patients with compound-heterozygous mutations in *PRKN* (34.8%). The most frequent pathogenic variant was the *PRKN* frameshift variant p.Asn52fs, c.155delA (43% of *PRKN*-PD). The list of *PRKN* pathogenic variants considered for the inclusion in the *PRKN*-PD group is shown in Table S3.

**Table S1. Demographic and clinical data of the controls and Parkinson's disease groups**

	<b>sPD</b> <b>(n= 355)</b>	<b>GBA-PD</b> <b>(n=38)</b>	<b>LRRK2-PD</b> <b>(n=36)</b>	<b>PRKN-PD</b> <b>(n=23)</b>	<b>Controls</b> <b>(n= 620)</b>	<b>p-value</b>
<i>Sex,</i> <i>n male (% male)</i>	218 (61%)	24 (63%)	14 (39%)	14 (61%)	334 (54%)	0.04 †
<i>Age, years ± SD</i>	65.76 ± 11.42	59.74 ± 10.89	63.53 ± 12.01	56.61 ± 15.59	59.35 ± 16.1	< 0.05 §
<i>Arterial hypertension, n(%)</i>	153 (43%)	19 (50%)	18 (50%)	3 (13%)	276 (45%)	0.04 †
<i>Diabetes, n (%)</i>	62 (18%)	5 (13%)	7 (19%)	2 (9%)	117 (19%)	0.66 †
<i>Hyperlipidemia, n (%)</i>	89 (25%)	9 (23%)	13 (36%)	6 (26%)	193 (31%)	0.24 †
<i>Smoking habit, n (%)</i>	108 (30%)	12 (32%)	13 (36%)	11 (48%)	219 (35%)	0.42 †
<i>Serum creatinine (mg/dl),</i> <i>mean ± SD</i>	0.88 ± 0.53	0.84 ± 0.14	0.80 ± 0.18	0.75 ± 0.18	0.95 ± 0.72	0.21 §
<i>Age at disease onset,</i> <i>years ± SD</i>	56.32 ± 11.84	49.18 ± 9.98	52.23 ± 12.61	33.09 ± 11.19	-	< 0.05 §
<i>Disease duration,</i> <i>years ± SD</i>	8.91 ± 6.13	10.72 ± 7.64	11.10 ± 6.73	22.83 ± 11.36	-	< 0.05 §
<i>Hoehn &amp; Yahr,</i> <i>mean ± SD</i>	2.22 ± 1.42	2.46 ± 0.91	2.01 ± 2.10	2.43 ± 0.88	-	0.54 §
<i>LEDD,</i> <i>mean ± SD</i>	745.18 ± 451.32	648.04 ± 407.86	887.63 ± 651.78	703.46 ± 471.34	-	0.20 §

LEDD, levodopa equivalent daily dose; sPD, sporadic Parkinson's Disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated PD; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated PD; *PRKN*-PD, patients with *PRKN*-associated PD. Data are presented as means ± standard deviation (SD) or number (n) with percentage (%). §, analysis of variance (ANOVA); †, chi-squared test.

**Table S2.** The list of *GBA* pathogenic variants considered for the inclusion of patients in *GBA*-PD group.

Allele	cDNA	Protein	Exon	n
D409H	c.1342G/C	p.Asp448His	10	2
L444P	c.1448T/C	p.Leu483Pro	11	4
N370S	c.1223A/G	p.Asn409Ser	10	13
S310G	c.928A/G	p.Ser310Gly	8	3
L29fs	c.84dupG	p.Leu29Alafs*18	3	1
R535H	c.1604G>A	p.Arg535His	12	1
V457D	c.1487T/A	p.Val496Asp	11	2
G195W	c.700G>T	p.Gly234Trp	7	1
F213I	c.754T>A	p.Phe252Ile	7	2
R262C	c.901C>T	p.Arg301Cys	8	1
E326K	c.1093G>A	p.Glu365Lys	9	8

**Table S3.** The list of *PRKN*-PD patient with the cigosity and mutation found in each patient

<i>PRKN</i> -PD patient	Cigosity	Mutation
1	Homozygous	p.Asn52fs; c.155delA
2	Homozygous	p.Gly430Ser; c.1288 G>A
3	Homozygous	p.Trp74fs; c.220_221dupTG
4	Homozygous	Complete deletion of exon 3 in heterozygosity and complete deletion of exon 4 in homozygosity
5	Homozygous	Complete deletion of exon 5 and 6
6	Homozygous	p.Trp74fs; c.220_221dupTG
7	Compound heterozygous	p.Asn52fs; c.155delA Complete deletion of exon 3 and 4
8	Homozygous	p.Asn52fs; c.155delA
9	Homozygous	p.Asn52fs; c.155delA
10	Compound heterozygous	p.Trp74fs; c.220_221dupTG Complete deletion in exon 8 and 9
11	Homozygous	p.Trp74fs; c.220_221dupTG
12	Homozygous	p.Asn52fs; c.155delA
13	Compound heterozygous	p.Arg275Trp, c.823C>T Complete deletion of exon 3 and 4
14	Homozygous	p.Thr415Asn; c.1244C>A
15	Compound heterozygous	p.Asn52fs; c.155delA c.1286-2A>T
16	Homozygous	p.Asn52fs; c.155delA
17	Compound heterozygous	p.Thr415Asn; c.1244C>A p.Asn52fs; c.155delA
18	Homozygous	p.Arg275Trp", "c.823C>T
19	Compound heterozygous	p.Asn52fs; c.155delA Complete deletion of exon 5 and 6
20	Compound heterozygous	p.Trp74fs, c.220_221dupTG c.1286-3C>G
21	Homozygous	p.Trp74fs, c.220_221dupTG
22	Compound heterozygous	Complete deletion in exon 8 and 9 Complete deletion in exon 3 and 4
23	Homozygous	p.Asn52fs; c.155delA

There were statistically significant differences among groups in terms of age. The post hoc test applied to study age among the groups showed that sPD patients were significantly older than controls and *GBA*-PD patients (Table S4). However, there were no statistical differences in age between either familial PD groups and controls or between the *LRRK2*-

PD group and the sPD. *LRRK2*-PD had a female predominance (61%), whereas the *GBA*-PD, sPD, *PRKN*-PD, and controls had a male predominance (63%, 61%, 61% and 54%, respectively). In comparison to other groups, *PRKN*-PD had a lower rate of arterial hypertension. However, there were no other differences in vascular risk factors or serum creatinine levels between the groups (Table S1). *PRKN*-PD patients showed a significantly younger onset of PD than the other PD groups, and *GBA*-PD had a younger onset of disease than sporadic PD. There were no differences between *LRRK2*-PD and either sporadic or *GBA*-PD (Table S5). There were statistically significant differences in disease duration between the *PRKN*-PD group and the other PD groups (Table S6). However, there were no differences in terms of dopaminergic treatment (levodopa equivalent daily dose) or disease severity (Hoehn & Yahr scale) among groups.

**Table S4.** Games-Howell post hoc comparisons for age among study groups

Comparison	Mean Difference	95% CI for Mean Difference		SE	t	Df	P value
		Lower	Upper				
Controls - sPD	-6.414	-8.838	-3.990	0.887	-7.233	929.803	< 0.01 **
Controls - <i>GBA</i>	-0.388	-5.723	4.947	1.882	-0.206	47.559	1.000
Controls - <i>LRRK2</i>	-4.179	-10.168	1.811	2.103	-1.987	42.691	0.290
Controls - <i>PRKN</i>	2.740	-7.037	12.518	3.317	0.826	23.778	0.920
sPD - <i>GBA</i>	6.027	0.724	11.329	1.868	3.226	46.146	0.019 *
sPD - <i>LRRK2</i>	2.236	-3.725	8.196	2.091	1.069	41.677	0.821
sPD - <i>PRKN</i>	9.155	-0.607	18.916	3.309	2.767	23.551	0.073
<i>GBA</i> - <i>LRRK2</i>	-3.791	-11.265	3.683	2.669	-1.420	70.382	0.617
<i>GBA</i> - <i>PRKN</i>	3.128	-7.513	13.769	3.702	0.845	35.083	0.915
<i>LRRK2</i> - <i>PRKN</i>	6.919	-4.010	17.848	3.819	1.812	38.350	0.382

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . sPD, sporadic Parkinson's disease; *GBA*, patients with *GBA*-associated PD; *LRRK2*, patients with *LRRK2*-associated PD; *PRKN*, patients with *PRKN*-associated PD.

**Table S5.** Tukey post hoc comparisons for age at disease onset among study groups

Comparison	Mean Difference	95% CI for Mean Difference		SE	t	P value
		Lower	Upper			
sPD - <i>GBA</i>	7.137	1.972	12.301	2.003	3.564	< 0.01**
sPD - <i>LRRK2</i>	4.092	-1.268	9.453	2.079	1.969	0.20
sPD - <i>PRKN</i>	23.234	16.725	29.743	2.524	9.205	< 0.01**
<i>GBA</i> - <i>LRRK2</i>	-3.044	-10.130	4.041	2.748	-1.108	0.69
<i>GBA</i> - <i>PRKN</i>	16.097	8.107	24.087	3.098	5.195	< 0.01**
<i>LRRK2</i> - <i>PRKN</i>	19.142	11.023	27.260	3.148	6.080	< 0.01**

\*\*  $p < 0.01$ . sPD, sporadic Parkinson's disease; *GBA*, patients with *GBA*-associated PD; *LRRK2*, patients with *LRRK2*-associated PD. *PRKN*, patients with *PRKN*-associated PD. P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 3 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method).

**Table S6.** Games-Howell post hoc comparisons for disease duration among PD groups

Comparison	Mean Difference	95% CI for Mean Difference		SE	t	Df	P value
		Lower	Upper				
sPD - <i>GBA</i>	-1.807	-5.394	1.780	1.337	-1.352	39.069	0.54
sPD - <i>LRRK2</i>	-2.260	-5.406	0.886	1.176	-1.921	41.951	0.24
sPD - <i>PRKN</i>	-13.919	-20.531	-7.307	2.389	-5.826	22.958	< 0.01**
<i>GBA</i> - <i>LRRK2</i>	-0.452	-4.961	4.056	1.711	-0.264	67.435	0.99
<i>GBA</i> - <i>PRKN</i>	-12.112	-19.375	-4.849	2.693	-4.497	35.062	< 0.01**
<i>LRRK2</i> - <i>PRKN</i>	-11.659	-18.750	-4.569	2.617	-4.455	32.038	< 0.01 **

\*\*  $p < 0.01$ . sPD, sporadic Parkinson's disease; *GBA*, patients with *GBA*-associated PD; *LRRK2*, patients with *LRRK2*-associated PD. *PRKN*, patients with *PRKN*-associated PD.

### Multivariate logistic regression models assessing the risk of stroke and CAD

The prevalence of ischemic stroke differed among the groups, and this difference was statistically significant after controlling for sex, age, and vascular risk factors (Table S6). Intergroup comparisons showed that the prevalence of ischemic stroke in the *LRRK2*-PD group was significantly higher after adjusting for potential confounders (Table S7). All the *LRRK2*-PD patients with stroke carried the p.G2019S mutation. Although the prevalence of CAD in the *PRKN*-PD group was slightly lower than in the others, this difference was not significant (Table S6).

**Table S7. Prevalence and characteristics of vascular events (ischemic stroke and coronary artery disease) in Parkinson's disease groups and controls**

	sPD (n= 355)	GBA-PD (n=38)	LRRK2-PD (n=36)	PRKN-PD (n=23)	Controls (n= 620)	p- value
<b>Ischaemic stroke, n (%)</b>	20 (5.6%)	1 (2.6%)	5 (13.8%)	2 (8.6%)	21 (3.4%)	0.02*
Age at stroke, years mean $\pm$ SD	66.1 $\pm$ 12.2	48	61.8 $\pm$ 15.2	73.0 $\pm$ 8.5	70.1 $\pm$ 12.3	0.47§
NIHSS, mean $\pm$ SD	9.7 $\pm$ 6.3	2	3.0 $\pm$ 2	4.0 $\pm$ 2.8	2.2 $\pm$ 1.6	0.39†
<i>Type of stroke, n</i>						
TIA	1	1	0	0	2	-
Lacunar	13	-	3	1	5	-
Atherothrombotic	1	-	0	0	5	-
Cardioembolic	4	-	0	0	5	-
Cryptogenic	1	-	2	1	4	-
<b>CAD, n (%)</b>	21 (5.9%)	2 (5.3%)	4 (10.8%)	1 (4.3%)	48 (7.8%)	0.83*
Age at CAD, years mean $\pm$ SD	67.7 $\pm$ 10.3	51.5 $\pm$ 4.9	62.3 $\pm$ 3.2	68	69.2 $\pm$ 10.5	0.08§

sPD, sporadic Parkinson's disease; GBA-PD, patients with GBA-associated PD; LRRK2-PD, patients with LRRK2-associated PD; PRKN-PD, patients with PRKN-associated PD; CAD, coronary artery disease; TIA, transient ischaemic attack; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale. \*Logistic regression model adjusted by sex, age and vascular risk factors. §, analysis of variance (ANOVA). †, Welch's test

**Table S8. Multivariate logistic regression model comparing ischemic stroke prevalence among the different Parkinson's disease groups and controls.**

Study group	B	Standard error	Wald	df	p-value	OR	95% CI	
							Lower	Upper
			10.33	4	0.02*	-	-	-
sPD	0.51	0.34	2.33	1	0.10	1.7	0.90	3.32
GBA-PD	-0.06	1.05	0.00	1	0.95	0.9	0.12	7.36
LRRK2-PD	1.57	0.56	7.96	1	0.004**	5.1	1.70	15.30
PRKN-PD	1.39	0.83	2.86	1	0.07	4.9	0.94	25.71

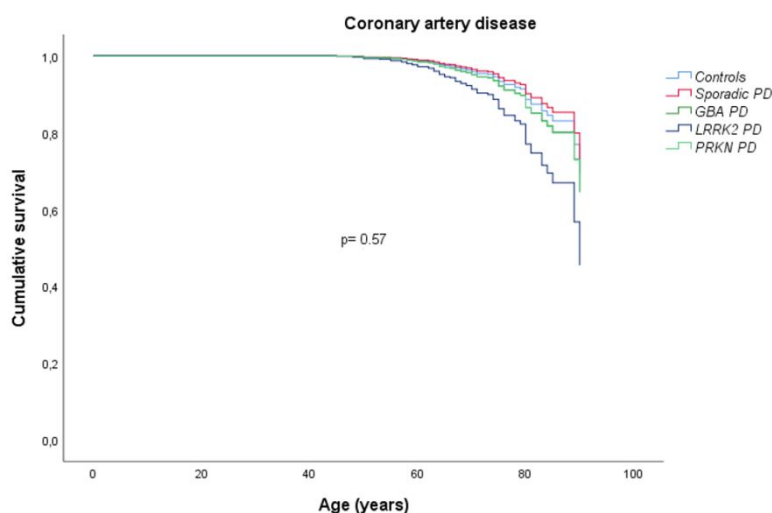
\* p < 0.05; \*\* p < 0.01. Logistic regression model adjusted for age, sex and vascular risk factors. CI, confidence interval; sPD, sporadic Parkinson's disease; GBA-PD, patients with GBA-associated PD; LRRK2-PD, patients with LRRK2-associated PD; PRKN-PD, patients with PRKN-associated PD.

No differences in terms of the age at stroke or the clinical severity of stroke were observed among the groups. When we classified the various types of ischemic stroke, we observed a predominance of lacunar infarction in the *LRRK2*-PD and sPD groups. Although no

differences in age at CAD were observed, the controls showed the highest age at the time of the cardiovascular event.

### Cox regression analyses

We plotted survival curves for age at diagnosis of ischemic stroke and CAD for each cohort. There was a statistically significant difference in the survival distribution for ischemic stroke among the groups (Wald test 13.0,  $p = 0.011$ ). Figure 1C shows that the increased risk for ischemic stroke in the patients with *LRRK2*-PD was associated with a younger age at stroke in that cohort. Patients with *PRKN*-PD also showed a different survival curve compared with controls. In our confirmatory analyses, the multivariate cox regression model confirmed the different survival curves for age at diagnosis of ischemic stroke of *LRRK2*-PD and *PRKN*-PD patients compared with controls (Figure 1D). Although PD patients showed lower age at CAD than controls, no significant differences were found in the survival distribution for CAD (Figure S2).



**Figure S2.** Survival plots of cardiovascular events in the Parkinson's disease groups and controls. Lines represent the cumulative event-free survival in years of age. sPD, patients with sporadic Parkinson's disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson's disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson's disease; *PRKN*-PD, patients with *PRKN*-associated Parkinson's disease.

### Intragroup comparisons of subjects with and without stroke

Finally, we compared the characteristics of subjects with and without stroke within each group (Table S8). Controls and *PRKN*-PD patients who had a stroke were significantly older. *LRRK2*-PD and sPD who had a stroke were older, though this difference was not statistically significant. sPD patients and controls with stroke showed a significantly higher proportion of arterial hypertension and hyperlipidemia than sPD and controls without a stroke. Regarding the PD characteristics, there were no differences in terms of PD severity or dopaminergic treatment among those who had a stroke and those who did not. *PRKN*-PD patients who had a stroke showed a significantly longer disease duration than those who did not. In the other groups, however, there were no differences in disease duration. The age at disease onset in *LRRK2*-PD patients who experienced a stroke was significantly higher than in those who did not. The Hoehn & Yahr stage was higher in *PRKN*-PD patients who had a stroke than in those without it, and this difference was marginally significant.

**Table S9.** Intragroup comparison of subjects with and without stroke

<i>Ischemic stroke</i>	Sporadic PD (n= 355)			GBA-PD (n=38)			LRRK2-PD (n=36)			PRKN-PD (n=23)			Controls (n= 620)		
	Yes	No	<i>p</i>	Yes	No	<i>p</i>	Yes	No	<i>p</i>	Yes	No	<i>p</i>	Yes	No	<i>p</i>
<i>Sex, n male (% male)</i>	12 (60%)	206 (62%)	0.89†	1 (100%)	23 (62%)	0.99‡	2 (40%)	13 (41%)	0.99‡	1 (50%)	13 (61%)	0.99‡	16 (71%)	319 (53%)	0.10†
<i>Age, years ± SD</i>	70.0 ± 10.3	65.5 ± 11.4	0.09§	51	59.97 ± 10.94	-	72.8 ± 10.9	62.9 ± 11.8	0.06§	76.0 ± 8.5	54.7 ± 14.66	<b>0.05§</b>	69.9 ± 12.6	59.0 ± 16.1	<b>&lt;0.01§</b>
<i>Arterial hypertension, n(%)</i>	17 (85%)	136 (41%)	<b>&lt;0.01†</b>	0 (0%)	19 (51%)	0.99‡	4 (80%)	14 (45%)	0.34‡	1 (50%)	2 (10%)	0.25‡	16 (76%)	260 (43,5%)	<b>&lt;0.01†</b>
<i>Diabetes, n (%)</i>	3 (15%)	59 (18%)	0.76†	0 (0%)	5 (13%)	0.99‡	1 (20%)	6 (19%)	0.99‡	1 (50%)	1 (5%)	0.17‡	6 (29%)	111 (19%)	0.248†
<i>Hyperlipidemia, n (%)</i>	9 (45%)	80 (24%)	<b>0.03†</b>	1 (100%)	8 (22%)	0.24‡	2 (40%)	11 (35%)	0.99‡	1 (50%)	5 (24%)	0.46‡	11 (52%)	182 (30%)	<b>0.03†</b>
<i>Smoking habit, n (%)</i>	7 (37%)	100 (30%)	0.55†	0 (0%)	12 (32%)	0.99‡	1 (20%)	12 (39%)	0.63‡	1 (50%)	10 (48%)	0.99‡	10 (48%)	209 (35%)	0.23†
<i>Serum creatinine</i>	0.96 ± 0.2	0.88 ± 0.5	0.56§	1.06	0.83 ± 0.14	-	0.76 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.71§	0.64 ± 0.18	0.76 ± 0.18	0.39§	1.14 ± 0.8	0.95 ± 0.7	0.41§
<i>Age at PD onset, years ± SD</i>	59.9 ± 12.4	56.1 ± 11.8	0.16§	46	49.3 ± 10.1	-	63.8 ± 10.9	50.3 ± 11.9	<b>0.02§</b>	33.0 ± 12.73	33.0 ± 10.8	0.99§			
<i>Disease duration, years ± SD</i>	9.2 ± 7.4	8.9 ± 6.1	0.85§	6	10.8 ± 7.7	-	8.2 ± 4.1	11.6 ± 7.0	0.30§	40.5 ± 21.9	21.1 ± 9.1	<b>0.02§</b>			
<i>Hoehn &amp; Yahr, mean ± SD</i>	2.3 ± 0.8	2.2 ± 1.4	0.83§	2	2.5 ± 0.9	-	2.6 ± 1.1	1.9 ± 2.3	0.26§	3.75 ± 1.8	2.3 ± 0.7	0.09§			
<i>LEDD, mean ± SD</i>	727.5 ± 265.7	746.2 ± 460.3	0.86§	775	659.6 ± 409.7	-	815.6 ± 539.5	899.6 ± 676.0	0.85§	576.5 ± 235.5	716.7 ± 489.7	0.96§			

LEDD, levodopa equivalent daily dose; PD, Parkinson’s disease; GBA-PD, patients with GBA-associated PD; LRRK2-PD, patients with LRRK2-associated PD; PRKN-PD, patients with PRKN-associated PD. Data are presented as means ± standard deviation (SD) or number (n) with percentage (%). §, analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis test as appropriate; †, chi-squared test; ‡, Fisher’s exact test. Bold values denote statistical significance at p<0.05

## Supplementary discussion

Our study specifically described the diverse cerebrovascular and cardiovascular risk among patients with PD according to their genetic background, thereby helping to understand the possible link between stroke and PD etiology. Our main finding was that patients with *LRRK2*-PD showed an increased risk of ischemic stroke. These cerebrovascular events tended to occur at a younger age than in controls. However, no differences in CAD were found between the familial and sporadic forms of PD as well as controls.

The results of our study are aligned with those of previous studies.<sup>10–12,15</sup> Interestingly, in our confirmatory analysis, the increased risk of ischemic stroke in the sPD group compared with controls was marginally significant (adjusted OR 1.8; 95% CI 0.99–3.2;  $p=0.05$ ). Although the *PRKN*-PD group also showed a non-significant increased risk of stroke, this finding was not confirmed in our confirmatory analysis. The *LRRK2*-PD group showed a 5.1-fold increase in the risk of ischemic stroke compared with controls. This increased risk seems to be particularly relevant in those *LRRK2*-PD patients who carried the p.G2019S mutation and with a late-onset disease. Although both sPD patients and controls who had a stroke showed higher rates of arterial hypertension and hyperlipidemia than those sPD patients and controls without stroke, there were no significant differences in vascular risk factors within the *LRRK2*-PD group (Table S9). These results might be related to a different pathophysiology of stroke in some PD patients compared with controls.<sup>19,20,30–32</sup> Considering the role of *LRRK2* in neuroinflammation, a plausible explanation for the increased risk of stroke in our patients with *LRRK2*-PD could be related to a pro-inflammatory state that might contribute to small-vessel infarction.

A recent study showed higher triglyceride levels in *LRRK2*-PD compared with sPD with no relationship between metabolic syndrome and PD features.<sup>33</sup> In contrast, our group previously reported lower levels of serum lipoproteins and cholesterol in *GBA*-PD patients compared with controls and other PD forms in a statin-free study. Interestingly, there were no differences between *LRRK2*-PD patients and sPD or controls.<sup>27</sup> In our cohort, the proportion of hyperlipidemia was slightly lower in the *GBA*-PD group than in the other PD groups; however, no statistically significant differences were found between the groups (Table S1). Our results after conducting a multivariate analysis support the idea that mechanisms other than classical vascular risk factors might influence the described increased risk of stroke in PD.<sup>15</sup>

Regarding the type of stroke, we found that patients with sPD and those with *LRRK2*-PD showed a predominance of symptomatic lacunar infarction. These results are in line with a previous study in which no differences were found between patients with PD and controls, either in carotid artery arteriosclerosis or in the intima-media thickness.<sup>34</sup> Our confirmatory analysis also showed an increased stroke risk in *LRRK2*-PD and sPD compared with controls when both symptomatic and asymptomatic events were considered. In line with our results, Patel et al. reported that patients with PD showed an increased number of cerebrovascular disease events (both clinically and radiologically diagnosed) but showed no differences in vascular risk factors compared with controls.<sup>11</sup> In this study, however, a higher frequency of radiological small-vessel infarcts was reported in the controls compared with PD patients, as opposed to our findings. In contrast, a recent South Korean



nationwide study showed an increased risk of atrial fibrillation in PD, especially in those with an early age at disease onset.<sup>35</sup> Furthermore, *LRRK2* has been proposed as a possible gene related to atrial fibrillation maintenance.<sup>36</sup> Our main results do not support a possible link between cardioembolic stroke and PD, either in patients with sporadic or familial forms of PD.

No significant differences were found in CAD among the groups. As we mentioned above, these results are in line with previous studies, including a recent meta-analysis.<sup>10,15</sup> However, other studies with large cohorts have reported an increased risk of CAD in patients with PD.<sup>13,14</sup> These conflicting results could be explained by ethnic differences between the populations or different diagnostic criteria for the participants included in those studies.

Our study has limitations. First, the retrospective nature of our study requires our results to be interpreted cautiously, understanding their preliminary nature. Although we confirmed ischemic stroke with radiological findings, and vascular risk factors were included in our logistic model, certain factors out of our control (such as diet or statin doses) might have influenced our findings. Second, given that we did not consider asymptomatic *PRKN*, *GBA* or *LRRK2* carriers for the study, it was not possible to determine the risk of vascular events in these individuals. Further prospective studies within those populations would be necessary to determine the role of these genes in their vascular disease risk, regardless of PD neurodegeneration. Finally, our study was not designed to reach conclusions regarding cardiac abnormalities other than symptomatic myocardial infarction.

### Supplementary references

1. Kalia L V., Lang AE. Evolving basic, pathological and clinical concepts in PD. *Nat Rev Neurol*. 2016;12:65–6.
2. Fanning S, Selkoe D, Dettmer U. Parkinson's disease: proteinopathy or lipidopathy? *npj Park Dis*. 2020;6:3.
3. Jankovic J, Tan EK. Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020;91:795–808.
4. Espay AJ, Lang AE. Parkinson Diseases in the 2020s and Beyond: Replacing Clinico-Pathologic Convergence With Systems Biology Divergence. Brundin P, Langston JW, Bloem BR, editors. *J Parkinsons Dis*. 2018;8:S59–64.
5. Ben-Shlomo Y, Marmot MG. Survival and cause of death in a cohort of patients with parkinsonism: Possible clues to aetiology? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995;58:293–9.
6. Pennington S, Snell K, Lee M, Walker R. The cause of death in idiopathic Parkinson's disease. *Park Relat Disord*. 2010;16:434–7.
7. Driver JA, Kurth T, Buring JE, Gaziano JM, Logroscino G. Parkinson disease and risk of mortality: A prospective comorbidity-matched cohort study. *Neurology*. 2008;70:1423–30.
8. Levine RL, Jones JC, Bee N. Stroke and Parkinson's disease. *Stroke*. 1992;23:839–42.
9. Nataraj A, Rajput AH. Parkinson's disease, stroke, and related epidemiology. *Mov Disord*. 2005;20:1476–80.
10. Becker C, Jick SS, Meier CR. Risk of stroke in patients with idiopathic Parkinson disease. *Park Relat Disord*. 2010;16:31–5.
11. Patel M, Coutinho C, Emsley HCA. Prevalence of radiological and clinical cerebrovascular disease in idiopathic Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg*. 2011;113:830–4.
12. Huang Y-P, Chen L-S, Yen M-F, et al. Parkinson's Disease Is Related to an Increased Risk of Ischemic Stroke—A Population-Based Propensity Score-Matched Follow-Up Study. *PLoS One*. 2013;8:e68314.
13. Li Q, Wang C, Tang H, Chen S, Ma J. Stroke and Coronary Artery Disease Are Associated with Parkinson's Disease. *Can J Neurol Sci*. 2018;45:559–65.

14. Liang H-W, Huang Y-P, Pan S-L. Parkinson disease and risk of acute myocardial infarction: A population-based, propensity score-matched, longitudinal follow-up study. *Am Heart J*. 2015;169:508–14.
15. Alves M, Caldeira D, Ferro JM, Ferreira JJ. Does Parkinson's disease increase the risk of cardiovascular events? A systematic review and meta-analysis. *Eur J Neurol*. 2020;27:288–96.
16. Malek N, Lawton MA, Swallow DMA, et al. Vascular disease and vascular risk factors in relation to motor features and cognition in early Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2016;31:1518–26.
17. Potashkin J, Huang X, Becker C, et al. Understanding the Links Between Cardiovascular Disease and Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 2020;35:55–74.
18. Mukherjee UA, Ong S-B, Ong S-G, Hausenloy DJ. Parkinson's disease proteins: Novel mitochondrial targets for cardioprotection. *Pharmacol Ther*. 2015;156:34–43.
19. Kim T, Vemuganti R. Mechanisms of Parkinson's disease-related proteins in mediating secondary brain damage after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37:1910–26.
20. Kim C, Beilina A, Smith N, et al. LRRK2 mediates microglial neurotoxicity via NFATc2 in rodent models of synucleinopathies. *Sci Transl Med*. 2020;12:eaay0399.
21. Lang W, Wang J, Ma X, et al. Identification of Shared Genes Between Ischemic Stroke and Parkinson's Disease Using Genome-Wide Association Studies. *Hum Mol Genet*. 2019;21:1–8.
22. Jesús S, Huertas I, Bernal-Bernal I, et al. GBA variants influence motor and non-motor features of Parkinson's disease. *PLoS One*. 2016;11:1–17.
23. Trinh J, Zeldenrust FMJ, Huang J, et al. Genotype-phenotype relations for the Parkinson's disease genes SNCA, LRRK2, VPS35: MDSGene systematic review. *Mov Disord*. 2018;33:1857–70.
24. Ruiz-Martínez J, de la Riva P, Rodríguez-Oroz MC, et al. Prevalence of cancer in Parkinson's disease related to R1441G and G2019S mutations in LRRK2. *Mov Disord*. 2014;29:750–5.
25. Thaler A, Kozlovski T, Gurevich T, et al. Survival rates among Parkinson's disease patients who carry mutations in the LRRK2 and GBA genes. *Mov Disord*. 2018;33:1656–60.
26. Cilia R, Tunesi S, Marotta G, et al. Survival and dementia in GBA -associated Parkinson's disease: The mutation matters. *Ann Neurol*. 2016;80:662–73.
27. Macías-García D, Periñán MT, Muñoz-Delgado L, et al. Serum lipid profile among sporadic and familial forms of Parkinson's disease. *npj Park Dis*. 2021;7:59.
28. Postuma RB, Berg D, Stern M, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015;30:1591–601.
29. Love BB, Bendixen BH. Classification of subtype of acute ischemic stroke definitions for use in a multicenter clinical trial. *Stroke*. 1993;24:35–41.
30. Cabezudo D, Baekelandt V, Lobbstaël E. Multiple-Hit Hypothesis in Parkinson's Disease: LRRK2 and Inflammation. *Front Neurosci*. 2020;14.
31. Cao J, Zhuang Y, Zhang J, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 aggravates secondary brain injury induced by intracerebral hemorrhage in rats by regulating the P38 MAPK/Drosha pathway. *Neurobiol Dis*. 2018;119:53–64.
32. Berwick DC, Heaton GR, Azeggagh S, Harvey K. LRRK2 Biology from structure to dysfunction: research progresses, but the themes remain the same. *Mol Neurodegener*. 2019;14:49.
33. Thaler A, Shenhar-Tsarfaty S, Shaked Y, et al. Metabolic syndrome does not influence the phenotype of LRRK2 and GBA related Parkinson's disease. *Sci Rep*. 2020;10:9329.
34. Yan L-Y, He Q-F, Lu M-Y, et al. Association between carotid plaque and Parkinson's disease. *Ann Transl Med*. 2019;7:94–94.
35. Han S, Moon I, Choi E, et al. Increased atrial fibrillation risk in Parkinson's disease: A nationwide population-based study. *Ann Clin Transl Neurol*. 2021;8:238–46.
36. Zou R, Zhang D, Lv L, et al. Bioinformatic gene analysis for potential biomarkers and therapeutic targets of atrial fibrillation-related stroke. *J Transl Med*. 2019;17:45.

## 6. DISCUSIÓN

En este apartado se procederá a realizar una discusión general de los resultados obtenidos en los trabajos que conforman esta tesis.

A pesar de un amplio conocimiento de los fenotipos clínicos y de los hallazgos neuropatológicos, aún se desconocen muchos aspectos de la etiopatogenia de la EP. Diversos mecanismos fisiopatológicos se creen implicados en esta y se propone que deben ser estos las dianas terapéuticas de futuras terapias modificadoras de la progresión en la EP. Mientras algunos mecanismos se han evidenciado alterados en algunas formas concretas, el estrés oxidativo es considerado uno de los implicados de manera generalizada en la neurodegeneración de las diversas formas de EP. A pesar de existir resultados previos contradictorios en la relación de la bilirrubina sérica y la EP, en nuestra población los niveles de bilirrubina total sérica (molécula considerada un antioxidante endógeno) se encuentran aumentados en pacientes con EP. Los niveles aumentados de bilirrubina se encuentran inversamente relacionados con los años de evolución de enfermedad, siendo mayores los niveles en pacientes en estadio leve a moderado de la enfermedad. Sin embargo, no parece existir relación entre los niveles séricos de bilirrubina y el tratamiento dopaminérgico. Estos hallazgos pueden reflejar el papel que juega el estrés oxidativo en las fases iniciales de la enfermedad. En esta línea, se ha propuesto que los niveles de bilirrubina sérica pueden servir de marcadores de la expresión de la HO-1, isoforma inducible de esta enzima oxidativa cuya sobreexpresión se ha demostrado en células gliales y neuronas de la SNpc de pacientes con EP. Debido a la relación planteada entre la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer y la expresión de HO-1 en la neuroglia de estos pacientes (Si y cols, 2020), nuestros resultados plantean como futura línea de investigación la necesidad de explorar la posible relación entre el deterioro cognitivo en la EP y la expresión de *HMOX1*, los niveles de HO-1 y los niveles plasmáticos de bilirrubina.

Por otro lado, la alteración del metabolismo lipídico y su estrecha relación con los sistemas lisosomal y de autofagia ha generado la hipótesis de que al menos determinadas formas de la EP puedan corresponder a una lipidopatía inducida por una disfunción proteica y no a una simple proteinopatía. En este sentido, nuestros hallazgos en pacientes con EP-*GBA* apoyan la hipótesis de una alteración del metabolismo lipídico como mecanismo fisiopatológico concreto en esta forma de EP. A pesar de existir en nuestra población general de pacientes con EP unos niveles disminuidos de colesterol total y lipoproteínas de baja densidad; cuando estratificamos nuestra cohorte en función de su etiología genética encontramos que estos niveles bajos se evidenciaban específicamente en los pacientes con EP-*GBA*; existiendo esta tendencia en formas esporádicas, aunque sin ser significativa. Ello apoya la necesidad de una clasificación de los pacientes con EP en función de su fisiopatología subyacente a la hora de buscar una terapia modificadora del curso de la enfermedad, pudiendo ser los biomarcadores de

esta fisiopatología una herramienta útil en la estratificación, selección o seguimiento en la respuesta de futuras terapias. Nuestros resultados han generado futuras líneas de investigación donde se estudiarán la relación del perfil lipídico sérico ampliado y las características clínicas de los pacientes con EP-*GBA*; así como con la relación de la actividad GCasa en medios celulares de estos pacientes obtenidos mediante cultivo de fibroblastos.

Finalmente, en nuestra cohorte hemos confirmado la existencia de un mayor riesgo de evento cerebrovascular (ictus isquémico) en pacientes EP comparados con controles, sin existir mayor riesgo cardiovascular. Los pacientes con EP-*LRRK2* (mayoritariamente portadores de la mutación G2019S) han mostrado un aumento de riesgo significativo para ictus isquémico comparado con controles sanos de la misma área geográfica, sin evidenciar un incremento en el riesgo de cardiopatía isquémica. Este incremento del riesgo cerebrovascular comparado con sujetos sin enfermedad neurodegenerativa, se observa de manera no significativa en pacientes con EP esporádica; sin embargo, no se evidencia en pacientes con EP-*GBA* o EP-*PRKN*. Nuestros resultados sugieren que las formas familiares de EP pueden presentar un riesgo cerebrovascular diferente a las formas esporádicas de la enfermedad y a la población general; sin que exista una diferencia significativa en los factores de riesgo vascular clásicos. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que otros mecanismos fisiopatológicos pueden explicar la relación entre las formas esporádicas y familiares de la EP y el riesgo cerebrovascular específico de estas. Futuros trabajos que analicen la enfermedad cerebrovascular en resonancia magnética cerebral de portadores asintomáticos de mutaciones en *LRRK2* permitirán conocer el riesgo vascular en estos pacientes independientemente de la neurodegeneración propia de la EP. Adicionalmente, otra futura investigación planteada a raíz de nuestros hallazgos es la estimación ultrasonográfica del grosor íntima-media de la arteria carótida interna en pacientes con EP esporádica y familiar, permitiendo determinar si las diferencias genéticas de los pacientes con EP influyen no solamente en su perfil lipídico sérico sino en manifestaciones vasculares sistémicas que puedan jugar un papel en el diverso riesgo vascular descrito.

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

### Estudio del papel de la bilirrubina sérica en la enfermedad de Parkinson

Para atender a los tres primeros objetivos específicos planteados en esta tesis, se compararon los niveles séricos de bilirrubina total entre pacientes con EP y controles sanos, evidenciándose unos niveles elevados de bilirrubina en sujetos afectados por EP. Este resultado se mantuvo estadísticamente significativo en un modelo creado pareado por sexo y edad, tras corregir por posibles factores de confusión. Identificamos también que los niveles de bilirrubina eran mayores en los primeros años de la enfermedad y que

disminuían con la progresión de la misma, siendo este hallazgo independiente del sexo y del tratamiento dopaminérgico. Esta es la primera asociación demostrada entre niveles séricos de bilirrubina y progresión de la EP. A pesar de no observar una correlación directa entre los niveles del biomarcador sérico y la severidad de la enfermedad (objetivada mediante la escala de HY), encontramos que los pacientes con EP en estadios iniciales ( $HY \leq 3$ , funcionalmente independientes) presentaban niveles significativamente mayores que los controles. Este resultado se encuentra en línea con el estudio de Lee y cols, donde se evidenciaron que los niveles elevados de bilirrubina en pacientes EP de inicio se correlacionaban de manera moderada con la severidad de degeneración nigroestriatal en el putamen posterior mediante análisis cuantitativo en SPECT [ $I^{123}$ ]FP-CIT (Lee y cols, 2019)

Estos hallazgos coinciden con estudios previos (Scigliano y cols, 1997; Moccia y cols, 2015). Scigliano y cols, encontraron niveles aumentados de bilirrubina sérica en pacientes EP, interpretando estos resultados como un posible efecto de la terapia dopaminérgica a la que estaban sometidos los mismos. Posteriormente, Moccia y cols, demostraron igualmente niveles aumentados de bilirrubina total en una cohorte de pacientes con EP de menor tamaño, pero sin tratamiento dopaminérgico (Moccia y cols, 2015). Aunque no observaron una relación con la necesidad de iniciar tratamiento dopaminérgico en un período de seguimiento de dos años, encontraron una correlación negativa entre los niveles de bilirrubina y la dosis equivalente de levodopa diaria (DELD). En nuestro trabajo, los niveles de bilirrubina no se relacionaron ni con los distintos tipos de tratamientos dopaminérgicos ni con la DELD. Por ello, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la terapia dopaminérgica no juega un papel fundamental en la relación de la bilirrubina sérica y la EP.

Por el contrario, otros autores describieron en un estudio en población de origen chino, niveles disminuidos de bilirrubina indirecta en pacientes EP comparado con controles sanos. Sin embargo, no evidenciaron diferencias en la concentración de bilirrubina total sérica entre grupos (Qin y cols, 2015). Estas diferencias entre nuestros resultados y el estudio previo pueden explicarse por varios motivos como los diversos criterios de exclusión aplicados en cada estudio o las variantes genéticas en los genes que codifican enzimas oxidativas como la HO-1 (*HMOX1*) que pueden variar entre diversas poblaciones. Finalmente, un meta-análisis que analizaba el papel de la bilirrubina sérica en la EP encontró niveles superiores de bilirrubina total en pacientes EP frente a sujetos sanos (Jin y cols, 2020). Los autores llevaron a cabo el meta-análisis incluyendo 8 estudios (incluido este trabajo), evidenciando que esta relación era significativa en poblaciones de descendencia caucásica.

Aunque se han descrito niveles disminuidos de otras moléculas antioxidantes en la EP, la diferencia en los niveles de bilirrubina sérica entre pacientes con EP y controles sanos podrían corresponder a cambios enzimáticos en el SNC relacionados con la etiopatogenia de la EP. La enzima HO, así como otras enzimas oxidativas, juegan un papel fundamental en el incremento del estrés oxidativo y en la disfunción mitocondrial asociada a la etiología de la EP (Schipper y cols, 2019). La isoforma HO-1 es inducible por

las ROS en el SNC, y degrada el grupo Heme en hierro, monóxido de carbono y biliverdina/bilirrubina. Se ha demostrado que HO-1 desempeña una función importante en la alteración del equilibrio redox en cerebros con enfermedades neurodegenerativas (Schipper y cols, 2009). Además, se han descrito niveles plasmáticos elevados de HO-1 en pacientes EP comparados frente a pacientes con enfermedad de Alzheimer y sujetos sanos (Mateo y cols, 2010). Recientemente, este hallazgo se ha reproducido en pacientes EP en estadios iniciales de la enfermedad (Sun y cols, 2021). Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, los niveles aumentados de bilirrubina en los pacientes EP de nuestra población pueden ser interpretados como una consecuencia de la sobreexpresión de HO-1 en el SNC durante las etapas iniciales de la enfermedad. Se ha sugerido que esta sobreexpresión enzimática podría ser una respuesta adaptativa en respuesta al incremento de estrés oxidativo en la SNpc de pacientes con EP (Schipper y cols, 2019). Las causas de este incremento del estrés oxidativo son desconocidas, pero se supone que tanto factores genéticos como ambientales influye en la mayoría de pacientes con EP (Singleton y cols, 2013). Por el contrario, consideramos que en pacientes EP con una enfermedad de larga evolución, los niveles disminuidos de bilirrubina podrían estar relacionados con fallos en los sistemas de mantenimiento de equilibrio redox o por la propia neurodegeneración inducida por la sobreexpresión de HO-1. Sin embargo, otros factores externos como las alteraciones nutricionales en estadios avanzados de la EP no pueden ser descartadas.

El papel en la EP de las variantes genéticas en el gen *HMOX1* no se conoce en profundidad. Mientras dos variantes han sido descritas como asociadas a la EP en una cohorte española (Ayuso y cols, 2014); Funke y cols, no encontraron asociación entre diversos polimorfismos de *HMOX1* y el riesgo a desarrollar EP en la población alemana (Funke y cols, 2009). De manera interesante, Infante y cols, describieron un marcado incremento de riesgo para desarrollo de EP (OR: 5,45 con un IC al 95%: 1,18 – 25,1) entre polimorfismos de *HMOX1* (rs2071746 genotipo TT) junto a exposición a pesticidas, no existiendo riesgo significativo de ambos factores (genético y ambiental) por separado (Infante y cols 2011). Ello apoya la influencia conjunta de ambos tipos de factores en el incremento de estrés oxidativo en la EP.

Nuestro trabajo tiene ciertas limitaciones. Primero, nosotros no dispusimos en nuestro estudio de los niveles de los distintos tipos de bilirrubina (directa e indirecta). Estas formas no son analizadas en nuestro laboratorio en sujetos que no presentan hiperbilirrubinemia (criterio de exclusión de nuestro estudio para evitar el efecto de la neurotoxicidad inducida por esta). Segundo, el perfil hepático no fue homogéneo entre los pacientes EP y controles. Niveles mayores de las enzimas hepáticas (Gamma-glutamyl transferasa o GGT; y Glutámico pirúvico transaminasa o GPT) se evidenciaron en controles. Este hecho no justificaría las diferencias en los niveles de bilirrubina entre grupos ya que una disfunción hepática en controles sanos conllevaría un incremento de la bilirrubina total sérica en controles y no en pacientes con EP. Además, los niveles medios de las enzimas hepáticas se encontraron en el rango de la normalidad sin evidenciarse disfunción hepática en ningún grupo. A pesar de todo ello, incluimos los niveles de enzimas hepáticas en nuestro modelo multivariante al comparar los niveles

de bilirrubina entre grupos. Aunque aplicamos estrictos criterios de exclusión, no podemos excluir con total seguridad que otras variables pudieran influir en los niveles de bilirrubina. Debido al carácter retrospectivo de nuestro estudio, no podemos obtener conclusiones definitivas sobre el valor predictivo de los niveles de bilirrubina en la progresión de la EP. Sin embargo, el incremento de las concentraciones plasmáticas de HO-1 en pacientes con EP en estadio temprano apoyan el papel de la bilirrubina como marcador de un incremento oxidativo en fases iniciales de la EP. Finalmente, en nuestro estudio hemos comparado grupos (pacientes EP y controles sanos) que diferían en la presencia de tratamiento dopaminérgico. Sin embargo, en nuestro estudio los niveles de bilirrubina total sérica no se relacionaron ni con los diferentes tratamientos dopaminérgicos ni con la DELD. Ello y los resultados de niveles elevados de bilirrubina en una reducida cohorte de pacientes EP sin tratamiento (Moccia y cols, 2015), hace difícil considerar la existencia de una correlación entre los niveles de bilirrubina sérica y la terapia dopaminérgica.

Nuestros resultados mostraron que las concentraciones de bilirrubina total sérica eran mayores en pacientes con EP, describiéndose por primera vez que este incremento estaba relacionado con los años iniciales de la enfermedad. La sobre-expresión de la enzima HO-1 podría jugar un importante papel en la etiopatogenia de la EP, conduciendo a niveles elevados de bilirrubina sérica en estadios iniciales de la enfermedad. Estudios de la expresión de *HMOX1* en pacientes EP podrían ser de gran utilidad para comprender la etiopatogenia de la enfermedad.

#### Estudio del perfil lipídico sérico en formas esporádicas y familiares de la enfermedad de Parkinson

El papel de los lípidos séricos en la etiopatogenia de la EP no es completamente entendido debido a diferentes resultados de diversos estudios. Con el objetivo de responder a los objetivos específicos cuarto y quinto planteados en esta tesis doctoral, se analizó específicamente los niveles de colesterol, lipoproteínas y triglicéridos séricos comparando las principales formas familiares y esporádicas de la EP. Nuestros resultados indican que los pacientes con EP-*GBA* tienen menores niveles de colesterol sérico y de LDL que pacientes con EP-*LRRK2* y que controles sanos. Con respecto a la influencia del sexo en el perfil lipídico sérico, estudios previos han demostrado que las mujeres presentan niveles superiores de HDL e inferiores de colesterol total sérico que los hombres (Freedman y cols, 2004; Klingel y cols, 2017). En este sentido, nuestros resultados son particularmente reseñables ya que el grupo de pacientes con EP-*GBA* fue el grupo con una mayor proporción masculina mientras que el grupo de EP- *LRRK2* tuvo un predominio femenino. La influencia del sexo no parece tener un papel predominante en el perfil lipídico sérico de estos pacientes, sugiriendo que otros mecanismos, como los implicados en la etiopatogenia de cada forma de EP, pueden explicar estas diferencias en el metabolismo lipídico. Además, se evidenció un perfil lipídico sérico diferente en el grupo EP-*GBA* comparado con los pacientes con EP esporádica. Aunque

estas diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas, presentaban una tendencia a la significación.

Nuestros resultados en el primer análisis de casos-contróles mostraron menores niveles de colesterol y triglicéridos en pacientes EP comparado con controles sanos, como había sido previamente descrito (Guo y cols, 2015; Wei y cols, 2013; de Lau y cols, 2006; Scigliano y cols, 2006; Rozani y cols, 2018). Sin embargo, tras subtipificar a los pacientes EP (EP-*LRRK2*, EP-*GBA* y EP esporádica), el grupo resultante de mayor tamaño muestral (EP esporádica) mostraba menores niveles de triglicéridos y colesterol que controles, aunque esta última diferencia no era estadísticamente significativa. Rozani y cols, demostraron recientemente una disminución en el riesgo de desarrollar EP en hombres de mediana edad y mujeres ancianas con hipercolesterolemia en el mayor estudio prospectivo de sujetos sin toma de estatinas que ha estudiado la relación de los lípidos séricos y la EP (Rozani y cols, 2018). Klemann y cols, evidenciaron un riesgo genético compartido entre niveles de lípidos y lipoproteínas séricas y la EP (Klemann y cols, 2017). En la misma línea, un estudio de randomización mendeliana mostró una asociación entre niveles mayores de lípidos séricos (colesterol total, LDL y triglicéridos) y un menor riesgo futuro de EP (Fang y cols, 2019). Estos estudios sugieren una relación causal entre el perfil lipídico sérico y la EP.

Por otro lado, un estudio de cohortes prospectivo y de gran tamaño muestral demostró un aumento de riesgo de EP en sujetos menores de 55 años con hipercolesterolemia (Hu y cols, 2008). Estos resultados controvertidos podrían explicarse debido a la heterogeneidad de los pacientes con EP incluidos en cada uno de los estudios. Nuestros resultados en las diferentes cohortes de EP mostraron que los pacientes con EP-*GBA* mostraron un perfil lipídico sérico diferente, apoyando por tanto la idea de que el metabolismo lipídico puede verse influenciado por la etiopatogenia de la EP. Estos hallazgos podrían explicar las inconsistencias previamente encontradas en estudios de validación con grandes cohortes de EP, ya que el perfil lipídico podría verse influenciado por las características genéticas de los pacientes con EP. En esta línea, algunos autores han propuesto una aproximación diferente basada en una mejor subtipificación de los pacientes con EP para conseguir identificar nuevos biomarcadores específicos y nuevas terapias modificadoras de la enfermedad (Espay y Lang, 2018; Lawton y cols, 2018).

De manera reciente, se ha propuesto una nueva hipótesis etiológica de la EP en la cual está es concebida como una lipidopatía inducida por proteínas en vez de una proteinopatía (Fanning y cols, 2020). Esta nueva aproximación a la patología tipo Lewy (CL y NL) está basada en nuevos hallazgos que demuestran la existencia de inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína cerca de los microdominios denominados *lipid rafts* en las membranas celulares (Shahmoradian y cols, 2019; Sulzer y cols, 2019). Los dominios *lipid rafts* son microdominios de las membranas celulares ricos en colesterol y esfingolípidos que coordinan la bioactividad de los constituyentes de la membrana y las interacciones proteína-lípido (Lingwood y Simons, 2010). Se ha descrito una composición alterada de los *lipid rafts* en las neuronas de la corteza frontal de pacientes con EP comparados con sujetos sanos (Fabelo y cols, 2011). A su vez, algunas de las proteínas codificadas por los



genes que condicionan las principales formas familiares de EP (como *LRRK2*, parkina o *GCasa*) se han asociado con estos microdominios de membrana y su disfunción en la EP (Hatano y cols, 2007; Cha y cols, 2015; García-Sanz y cols, 2018). Sin embargo, nuestros resultados en pacientes EP-*LRRK2* no nos permiten obtener conclusiones acerca del papel de la alteración del metabolismo lipídico en la etiopatogenia específica de pacientes con mutaciones en *LRRK2*.

Aunque la relación entre las variantes patogénicas en *GBA* y la EP está bien establecida y descrita en diversas poblaciones, la relación entre la actividad *GCasa* y la PL no es comprendida en su totalidad (Jesús y cols, 2016; Alcalay y cols, 2015; De Melo Amaral y cols, 2019; Nuytemans y cols, 2020; Gegg y cols, 2015). Una actividad disminuida de la actividad enzimática *GCasa* se cree que promueve la PL y modula la susceptibilidad neuronal al acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína, al alterarse la maduración y funcionamiento del sistema lisosomal (García-Sanz y cols, 2018; Henderson y cols, 2020; García-Sanz y cols, 2020). Estudios in vitro con fibroblastos de pacientes EP con mutaciones N370S en *GBA* han mostrado una conexión entre la pérdida de función de *GCasa* y el acúmulo lisosomal de colesterol, con la aparición de cuerpos multilaminares (García-Sanz y cols, 2017). El colesterol necesario para la formación de estos cuerpos multilaminares proviene de dos fuentes diferentes: (1) síntesis endógena de colesterol en el RE; y (2) colesterol almacenado en las lipoproteínas LDL que se unen a los receptores de LDL en la membrana celular (García-Sanz y cols, 2020). Es interesante reseñar, que la mutación N370S de *GBA* fue la más prevalente de las variantes patogénicas incluidas en nuestra cohorte de pacientes con EP-*GBA*. Este hecho apoya la idea de una disrupción del metabolismo del colesterol en esta forma familiar de EP, alterando el funcionamiento del sistema lisosoma-autofagia y pudiendo conducir a la formación de los cuerpos multilaminares. Ello puede ser una posible explicación para el perfil lipídico específico observado en estos pacientes en nuestro estudio. Además, se ha propuesto una visión de la EP como un trastorno sistémico donde los procesos celulares (mecanismos patogénicos) ocurren en diversos subtipos de células y no solo en aquellas que manifiestan las características neuropatológicas (como, por ejemplo, neuronas dopaminérgicas de la SNpc) (Reynolds y cols, 2019). Hasta la fecha, se desconoce si el acúmulo de colesterol puede ser el primer paso en la etiopatogénesis de la EP-*GBA* o si este ocurre de manera secundaria al acúmulo de otros lípidos como los glucoesfingolípidos (García-Sanz y cols, 2018). Los cuerpos multilaminares contienen fundamentalmente fosfolípidos y colesterol. En esta línea, Guedes y cols, mostraron un descenso en los niveles séricos de fosfolípidos (ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, entre otros) en portadores de mutaciones en *GBA*. Sin embargo, en este mismo estudio, encontraron un incremento de ceramidas en suero de pacientes con EP-*GBA* (Guedes y cols, 2017). Finalmente, los niveles disminuidos de colesterol total y de LDL en nuestros pacientes con EP-*GBA* se encuentran en línea con lo reportado previamente por Ginsberg y cols; quienes evidenciaron niveles disminuidos de colesterol sérico en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo I (Ginsberg y cols, 1984). Como mencionamos anteriormente, nuestro trabajo pone de manifiesto el papel del metabolismo del colesterol y su relación con la patología de la EP-*GBA*.

Razonablemente, podemos plantearnos si la alteración del metabolismo lipídico (como un posible mecanismo patogénico de formas EP-*GBA*) puede tener relación con el fenotipo específico de estos pacientes con mayor riesgo de síntomas motores y no motores que las formas esporádicas (Jesús y cols, 2016; Alcalay y cols, 2015; Avenali y cols, 2019). Sin embargo, responder a esta pregunta se encuentra fuera del alcance de este estudio, ya que nuestro diseño no nos permitiría demostrarlo y obtener conclusiones robustas sobre ello. Estudios longitudinales serían necesarios para explorar la influencia del perfil lipídico en el curso de la enfermedad de estos pacientes.

Con respecto a otros aspectos del perfil lipídico en nuestro estudio, ni la lipoproteína HDL ni los niveles de triglicéridos mostraron diferencias entre formas familiares y esporádicas de la EP. En el estudio de casos-contróles inicial, se evidenciaron diferencias en los niveles de triglicéridos entre la cohorte completa de pacientes EP comparado con controles. Sin embargo, cuando realizamos el análisis clasificando los pacientes en EP esporádica y familiar, sólo los pacientes con EP esporádica mostraron un descenso en los niveles de triglicéridos comparado con controles, presentando esta diferencia una tendencia a la significación estadística ( $p=0,059$ ). Nuestros resultados pueden sugerir que los niveles disminuidos de triglicéridos pueden encontrarse en relación con las formas esporádicas de EP en vez de con las monogénicas. Estos hallazgos son contrarios a los observados por Thaler y cols, Estos autores llevaron a cabo un interesante estudio donde analizaron la influencia del síndrome metabólico en pacientes con EP-*GBA* y EP-*LRRK2* comparado con pacientes con EP esporádica. Aunque no encontraron una relación entre el síndrome metabólico y el curso de la enfermedad en los diversos grupos, describieron niveles aumentados de triglicéridos en individuos portadores de mutaciones *LRRK2* (Thaler y cols, 2020). Curiosamente, estos autores también analizaron los niveles de HDL como parte del síndrome metabólico, sin encontrar diferencias entre las formas de EP familiares estudiadas y la EP esporádica. Estos últimos resultados se encuentran en línea con los mostrados en nuestro estudio, sugiriendo una falta de relación entre la EP y las lipoproteínas de alta densidad.

Nuestro trabajo presenta algunas limitaciones. La primera de ellas es su carácter retrospectivo. Debido a este, no podemos excluir que otras variables fuera de nuestro control pudieran influenciar nuestro estudio. Por ello, nuestros resultados deben ser interpretados con cautela. Aunque la mayoría de los factores que podían influenciar directamente los niveles séricos de los lípidos/lipoproteínas estudiados fueron tenidos en cuenta con estrictos criterios de inclusión/exclusión (influencias étnicas o terapias modificadoras de lípidos séricos); otros, como el índice de masa corporal o el tipo de dieta de nuestros participantes no fueron considerados. Sin embargo, no se ha encontrado relación entre la toma de colesterol en la dieta y el riesgo de EP, en un meta-análisis que incluye tanto estudios prospectivos como casos-control (Wang y cols, 2015). Segundo, no estudiamos pacientes con EP prodrómica ni portadores asintomáticos de mutaciones en *LRRK2* o *GBA*. Por lo tanto, no fuimos capaces de estudiar el efecto de estas mutaciones en el perfil lipídico antes del inicio de las manifestaciones motoras de la EP. Futuros estudios con sujetos en fase prodrómica de la enfermedad serían necesarios para confirmar si las características genéticas influyen en los niveles de

colesterol sérico de estos pacientes. Finalmente, nuestras cohortes de pacientes con EP familiar tenían un tamaño muestral relativamente pequeño comparado con las cohortes de pacientes EP esporádica y controles sanos, limitando la potencia estadística para análisis estadísticos.

Nuestros resultados mostraron que los pacientes con EP-*GBA* presentaban un perfil lipídico diferente, y ello apoya la hipótesis de la alteración del metabolismo lipídico como uno de los principales mecanismos patogénicos en estas formas de EP. Sin embargo, son necesarios estudios con cohortes mayores para corroborar estos hallazgos y su implicación clínica.

### Estudio del papel de las características genéticas de los pacientes con enfermedad de Parkinson en su riesgo vascular

Para atender a los objetivos específicos sexto y séptimo planteados en este trabajo de tesis doctoral, se describió específicamente el riesgo cerebro y cardiovascular en pacientes con EP teniendo en cuenta sus características genéticas, y pudiendo ayudar a entender posibles relaciones entre la fisiopatología del ictus isquémico y de la EP. Para ello, comparamos el riesgo vascular entre subgrupos de EP (formas esporádicas, formas asociadas al principal factor de riesgo genético y formas autosómicas dominante y recesiva más frecuentes a nivel mundial) y controles sin enfermedad neurodegenerativa. Nuestro principal hallazgo fue la presencia significativa de una mayor proporción de ictus isquémicos en aquellos pacientes con EP-*LRRK2*. Estos eventos cerebrovasculares tendían a ocurrir a edad más temprana que en los controles. Sin embargo, no se evidenciaron diferencias en el riesgo cardiovascular entre las formas familiares y esporádicas de la EP con respecto a controles.

Los resultados de nuestro estudio se encuentran en línea con los previamente mostrados en otros estudios (Becker y cols, 2010; Patel y cols, 2011; Huang y cols, 2013; Alves y cols, 2020). Un meta-análisis llevado a cabo por Alves y cols, estudió el riesgo de ictus isquémico en el global de la población con EP, incluyendo 11 estudios y realizando una revisión sistemática de la literatura (Alves y cols, 2020). Los autores concluyeron que el conjunto de los pacientes con EP presentaba un incremento de riesgo de ictus isquémico de hasta 1,7 veces comparado con controles, sin encontrar diferencias en los eventos cardiovasculares o la mortalidad asociada a estos. En nuestro estudio, los pacientes con EP esporádica mostraron un incremento similar de riesgo de ictus isquémico comparado con controles sanos, aunque esta asociación no alcanzó significación estadística. En nuestro análisis de confirmación realizado con aquellos que tenían prueba de neuroimagen disponible, identificamos un riesgo de ictus isquémico en el grupo de EP esporádica similar con tendencia a la significación (OR ajustada 1,8; IC al 95% 0,99-3,2;  $p = 0,05$ ). Aunque inicialmente el grupo de pacientes con EP-*PRKN* mostró un incremento de riesgo de ictus isquémico sin alcanzar la significación estadística, este hallazgo no fue validado en el análisis posterior de confirmación. En el grupo de pacientes EP-*LRRK2* se evidenció el mayor incremento significativo de riesgo

de ictus isquémico comparado con los controles, tras ajustar por sexo, edad y factores de riesgo vascular. Adicionalmente, este incremento de riesgo parece ser particularmente relevante en aquellos pacientes EP-*LRRK2* que portan la mutación p.G2019S y que presentan una edad de inicio de enfermedad similar a las formas esporádicas. Aunque tanto los pacientes con EP esporádica como controles que tuvieron un ictus mostraron mayor presencia de hipertensión arterial y dislipemia que aquellos que no tuvieron evento cerebrovascular, no se evidenció diferencias significativas en factores de riesgo vascular entre los pacientes EP-*LRRK2* con y sin ictus isquémico. Estos hallazgos podrían estar en relación con la diferente fisiopatología de los ictus isquémicos en algunos de los pacientes EP comparado con controles. Se ha propuesto la existencia de una relación entre ambas patologías, más allá de los factores de riesgo vasculares clásicos, considerándose el potencial papel que jugarían mecanismos fisiopatológicos como el estrés oxidativo, la neuroinflamación o la alteración del metabolismo lipídico, entre otros (Potashkin y cols, 2020). Estudios en modelos animales han mostrado que las variantes patogénicas en *LRRK2* podrían contribuir al daño cerebral post-isquémico y promover la neuroinflamación (Kim y cols, 2020, Kim y cols, 2017; Cabezudo y cols, 2020; Cao y cols, 2018; Berwick y cols, 2019). Teniendo en cuenta la relación de *LRRK2* y la neuroinflamación, una posible explicación del incremento de riesgo de ictus isquémico observado en los pacientes EP-*LRRK2* podría estar en relación con un aumento del estado pro-inflamatorio en estos pacientes que contribuyera al desarrollo de ictus isquémicos de pequeño vaso.

En un estudio reciente, Thaler y cols, describieron mayores niveles de triglicéridos en los pacientes EP-*LRRK2* comparados con pacientes con EP esporádica, sin evidenciar una relación entre la existencia de síndrome metabólico y la EP o sus características clínicas (Thaler y cols, 2020). Por el contrario, en nuestro trabajo anterior demostramos en una cohorte sin consumo de estatinas niveles séricos disminuidos de lipoproteínas y colesterol sérico en pacientes EP-*GBA* comparado con otras formas de EP y controles. Sin embargo, los pacientes con EP-*LRRK2* no mostraron diferencias significativas en su perfil lipídico comparado con controles sanos o EP esporádica. En nuestro tercer estudio, la proporción de hiperlipidemia fue ligeramente inferior en el grupo EP-*GBA*; sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos. Todo ello, junto con los resultados de nuestro tercer trabajo tras realizar un análisis multivariante que incluye los factores de riesgo vascular clásicos, apoya la idea de que otros mecanismos distintos a estos factores podrían jugar un papel en el riesgo cerebrovascular de nuestros pacientes EP-*LRRK2*.

Curiosamente, se ha descrito que genes de riesgo comunes para EP y patología cerebrovascular están relacionados con la ruta molecular de señalización Wnt /  $\beta$ -catenina (Lang y cols, 2019). Siendo además *LRRK2* uno de los principales reguladores propuestos en la supresión de esta vía Wnt/  $\beta$ -catenina, relacionada con el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Berwick y cols, 2012; Berwick y cols, 2019).

Si atendemos al tipo de ictus isquémico de cada cohorte, encontramos que los pacientes con EP esporádica y con EP-*LRRK2* mostraron un predominio de infartos lacunares sintomáticos. Estos resultados apoyan un estudio previo donde no se observaron diferencias entre pacientes con EP y controles sanos, ni en la ateromatosis de la arteria carótida ni en el grosor íntima-media de los sujetos (Yan y cols, 2019). Nuestro análisis de confirmación también demostró un incremento de ictus isquémicos en EP-*LRRK2* y EP esporádica frente a controles cuando tanto eventos sintomáticos como asintomáticos fueron considerados. Patel y cols, encontraron que los pacientes con EP presentaban un mayor número de ictus (ambos diagnosticados tanto clínica como radiológicamente) pero sin diferir en los factores de riesgo vascular al compararlos con controles sanos (Patel y cols, 2011). Estos resultados se encuentran en línea con nuestro trabajo, donde encontramos un mayor riesgo de ictus isquémico en sujetos con EP esporádica y asociada a *LRRK2* sin encontrar diferencias significativas en los factores de riesgo vasculares. Sin embargo, en el trabajo previo se encontró una mayor frecuencia de infartos de pequeño vaso (diagnosticados radiológicamente) en controles comparado con pacientes EP, en contraposición con nuestros resultados. Un estudio poblacional reciente desarrollado en Corea del Sur mostró un incremento del riesgo de fibrilación auricular en pacientes con EP, especialmente en aquellos con una edad de inicio temprana o menor a 50 años (Han y cols, 2021). Además, *LRRK2* se ha propuesto como un gen que podría estar relacionado con la persistencia de fibrilación auricular (Zou y cols, 2019). Nuestros principales hallazgos no apoyan una conexión entre los ictus de tipo cardioembólico y la EP, ya sea en pacientes con EP esporádica o asociada a *LRRK2*.

Otros estudios han mostrado una afectación más severa de la marcha, inestabilidad postural y menor supervivencia en pacientes con EP que presentan un ictus (Patel y cols, 2011; Chen y cols, 2020; Perdomo-Lampignano y cols, 2020). Sin embargo, nuestro trabajo no demostró diferencias significativas en la severidad de enfermedad entre subtipos de EP con o sin ictus isquémico. Es posible que la ausencia de disponibilidad de escalas de evaluación motora de la EP nos haya limitado la posibilidad de encontrar diferencias en este apartado de nuestro trabajo. Uno de estos estudios describió una mayor tasa de inestabilidad postural entre pacientes con EP e ictus evidenciados radiológicamente (Patel y cols, 2011). Sin embargo, este análisis no fue realizado considerando posibles variables de confusión (como el sexo y la edad) en un modelo de análisis multivariante, y los pacientes con EP e ictus eran significativamente mayores que aquellos sin evento isquémico. En otro estudio, los autores describieron una correlación leve entre infartos lacunares, hiperintensidades de sustancia blanca en ganglios de la base e inestabilidad postural y de la marcha (Chen y cols, 2020). Estos resultados no se encuentran en línea con la mayor proporción de ictus isquémico evidenciada en nuestros pacientes EP-*LRRK2* sin una aparente repercusión en la severidad de la enfermedad. Sin embargo, en nuestro análisis de confirmación, únicamente con sujetos con pruebas de neuroimagen, no se analizó el grado de patología vascular de sustancia blanca (hipertensidades de sustancia blanca) sino únicamente la presencia de lesiones isquémicas focales sintomáticas o asintomáticas en

localizaciones típicas de isquemia cerebral. Ello podría explicar la diferencia con los estudios anteriormente descritos. Estudios longitudinales empleando estudios de neuroimagen protocolizados serían necesarios para investigar la influencia de la patología cerebrovascular tanto sintomática como asintomática en el curso de la enfermedad de pacientes con EP esporádica y familiar.

No encontramos diferencias significativas en términos de cardiopatía isquémica entre los distintos grupos. Como mencionamos con anterioridad, estos resultados se encuentran en línea con estudios previos, incluido un meta-análisis reciente (Becker y cols, 2010; Alves y cols, 2020). Sin embargo, otros estudios de cohortes han descrito un incremento de riesgo de cardiopatía isquémica en pacientes con EP (Li y cols, 2018; Liang y cols, 2015). Estas diferencias entre estudios, podrían estar explicadas por las diferencias étnicas entre las poblaciones incluidas en los estudios, así como por los distintos criterios diagnósticos de los participantes incluidos.

Nuestro trabajo muestra limitaciones a tener en cuenta. Primero, la naturaleza retrospectiva de nuestro estudio y el limitado tamaño de las cohortes de EP familiar, nos debe hacer interpretar nuestros resultados con cautela, entendiendo el carácter preliminar de estos. Aunque confirmamos la presencia de cada ictus isquémico mediante la existencia de hallazgos radiológicos, incluimos los factores de riesgo vascular en nuestro modelo estadístico ajustado y llevamos a cabo un análisis de confirmación; otros factores fuera de nuestro control (como la dieta o el peso) podrían haber influenciado nuestros resultados. Segundo, dado que no incluimos en nuestro estudio portadores asintomáticos de mutaciones en *GBA* o *LRRK2*, no podemos extrapolar nuestros resultados a estos sujetos ni determinar su riesgo vascular. Estudios prospectivos con estas poblaciones serían necesarios para determinar el rol de estos genes en su riesgo vascular, independientemente de la neurodegeneración acaecida por la EP. Finalmente, dado que exclusivamente se recogieron datos de cardiopatía isquémica sintomática, no podemos obtener conclusiones sobre otras anomalías cardíacas como los trastornos del ritmo en la EP. Es conocido que la variabilidad de la frecuencia cardíaca en pacientes con EP-*LRRK2* difiere de pacientes con EP esporádica (Visanji y cols, 2017). Por todo ello, no podemos excluir alguna posible relación entre mutaciones en *PRKN*, *LRRK2* o *GBA* y otras funciones cardíacas en pacientes con EP.

Nuestros resultados en este trabajo sugieren que los pacientes con EP-*LRRK2* pueden mostrar un mayor riesgo de ictus isquémico, sin diferencias en el riesgo cardiovascular. Adicionalmente, las formas esporádicas de la EP podrían presentar un mayor riesgo cerebrovascular que los controles. En estos pacientes, otros mecanismos distintos a los factores de riesgo vascular clásicos podrían estar implicados en el mayor riesgo de ictus isquémico. Por el contrario, los pacientes con EP-*GBA* y EP-*PRKN* muestran un riesgo vascular similar a los sujetos control. Son necesarios estudios prospectivos y con cohortes mayores para confirmar estos hallazgos e incorporarlos a nuestra práctica clínica diaria.

## 7. CONCLUSIONES

1. Los niveles séricos de bilirrubina total están aumentados en pacientes con EP frente a controles sanos, encontrándose particularmente elevados en los primeros años y estadios clínicos de la enfermedad.
2. Los mayores niveles de bilirrubina sérica en la EP parecen no relacionarse con la terapia dopaminérgica.
3. Los niveles séricos elevados de bilirrubina podrían estar en relación con la etiopatogenia de la EP, siendo un posible biomarcador sérico del incremento de estrés oxidativo.
4. Nuestros resultados muestran que los pacientes con EP-*GBA* tienen un perfil lipídico diferente a otras formas de EP y a individuos sanos no portadores de variantes en *GBA*.
5. La existencia de un perfil lipídico sérico específico en pacientes con EP-*GBA* apoya la hipótesis de la alteración del metabolismo lipídico como un mecanismo fisiopatológico en pacientes con esta forma de enfermedad.
6. Los pacientes con EP-*LRRK2* podrían presentar un mayor riesgo de ictus isquémico que la población general, sin asociar un mayor riesgo cardiovascular.
7. Las formas esporádicas de EP podrían tener un mayor riesgo de evento cerebrovascular que sujetos controles sin enfermedad neurodegenerativa. Sin embargo, los pacientes con EP-*GBA* y EP-*PRKN* muestran un riesgo cerebrovascular similar a controles.
8. No existen diferencias en el riesgo cardiovascular de las formas esporádicas y las principales formas familiares de EP con respecto a la población general.
9. Otros mecanismos fisiopatológicos, distintos a los factores de riesgo vascular clásicos, podrían estar implicados en el riesgo cerebrovascular de determinados pacientes con EP.
10. Son necesarios estudios prospectivos que confirmen estos hallazgos en el perfil lipídico y en el riesgo vascular en las formas familiares de EP, antes de incorporarlos a la práctica clínica habitual.

## 8. CONCLUSIONS

1. Serum bilirubin levels are increased in PD patients compared to healthy subjects, particularly in early stages.
2. Higher bilirubin levels in PD are not likely to be related to dopaminergic replacement therapy.
3. Increased bilirubin levels might be related to PD etiopathology as a possible serum biomarker of oxidative stress dysregulation.
4. Our results show that *GBA*-associated PD patients have different serum lipid profiles compared with other forms of PD and healthy controls.
5. The specific serum lipid profile in *GBA*-associated PD patients supports the hypothesis of lipid metabolism disruption as one of the main pathogenic mechanisms in *GBA*-associated PD.
6. Our results suggest that patients with *LRRK2*-associated PD may show an increased risk of ischemic stroke compared with controls, with no differences in cardiovascular events.
7. The sporadic forms of PD might have a higher cerebrovascular risk than the controls. Conversely, patients with *GBA*-associated PD and *PRKN*-associated PD may show a similar vascular risk to controls.
8. No differences in terms of cardiovascular events and risk were observed among familial and sporadic forms of PD and controls without a neurodegenerative disorder.
9. Mechanisms other than classical vascular risk factors might be involved in the cerebrovascular disease of those PD patients.
10. Further investigations would be necessary to confirm these findings in the lipid profile and cerebrovascular risk in familial forms of PD, and to study their relationship with disease progression and their possible clinical implications.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Phillipson OT. Management of the aging risk factor for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2014; 35 (4): 847-57. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.073.
- Jankovic J, Tan EK. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020; 91(8): 795-808. doi: 10.1136/jnnp-2019-322338.
- Benito-León J, Bermejo-Pareja F, Morales-Gonzalez JM, Porta-Etessam J, Trincado R, Vega S, et al. Incidence of Parkinson's disease and parkinsonism in three elderly populations of central Spain. *Neurology*. 2004; 62 (5): 734-41
- Espay AJ, Lang AE. Parkinson Diseases in the 2020s and Beyond: Replacing Clinico-Pathologic Convergence With Systems Biology Divergence. *J Parkinsons Dis*. 2018;8:S59–64.
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinic-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992; 55:181-4
- Postuma RB, Berg D, Stern M, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015;30(12):1591-1601.
- Lees AJ, Selikhova M, Andrade LA, Duyckaerts C. The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. *Mov Disord*. 2008; 23 (6): 777-83. doi: 10.1002/mds.21855.
- Fahn S. The 200-year journey of Parkinson disease: reflecting on the past and looking towards the future. *Parkinsonism Relat Disord*. 2018; 46: S1-S5. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.07.020.
- Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov. Disord.*. 2017. 32, 1264–310.
- Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*. 1991; 114(5): 2283-301. doi: 10.1093/brain/114.5.2283.
- Fearnley JM, Lees AJ. Striatonigral degeneration. A clinicopathological study. *Brain*. 1990; 113(6): 1823-42. doi: 10.1093/brain/113.6.1823.
- Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics and pathophysiology. *Clin Geriatr Med*. 2020; 36(1): 1–12. doi:10.1016/j.cger.2019.08.002

- Espay AJ, Vizcarra JA, Marsili L, Lang AE, Simon DK, Merola A, et al. Revisiting protein aggregation as pathogenic in sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *Neurology*. 2019; 92(7): 329-37. doi: 10.1212/WNL.0000000000006926.
- Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3:17013. doi: 10.1038/nrdp.2017.13.
- Chaudhuri KR, Poewe W, Brooks D. Motor and nonmotor complications of levodopa: phenomenology, risk factors and imaging features. *Mov Disord*. 2018; 33(6):909-919. doi: 10.1002/mds.27386.
- Baig F, Lawton M, Rolinski M, Ruffmann C, Nithi K, Evetts SG et al. Delineating non motor symptoms in early Parkinson's Disease and first-degree relatives. *Mov Disord*. 2015; 30(13): 1759-66.
- Forno LS (1969) Concentric hyalin intraneuronal inclusions of Lewy type in the brains of elderly persons (50 incidental cases): relationship to parkinsonism. *Journal of the American Geriatrics Society*, 17, 557-575.
- Hansen L, Salmon D, Galasko D, Masuah E, Katzman R, De Teresa R, et al. The Lewy body variant of Alzheimer's disease: a clinical and pathological entity. *Neurology*. 1990; 40: 1-8.
- Klos KJ, Ahlskog JE, Josephs KA, Apaydin H, Parisi JE, Boeve BF, et al. Alpha-synuclein pathology in the spinal cords of neurologically asymptomatic aged individuals. *Neurology*. 2006;66(7):1100-2. doi: 10.1212/01.wnl.0000204179.88955.fa.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003; 24(2): 197-211. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00065-9.
- Braak H, Bohl JR, Müller CM, Rüb U, , Del Tredici K. Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord*. 2006; 21: 2042-51.
- McCann H, Cartwright H, Halliday GM. Neuropathology of  $\alpha$ -synuclein propagation and braak hypothesis. *Mov Disord*. 2016. 31(2):152-60. doi: 10.1002/mds.26421.
- Surmeier DJ, Obeso JA, Halliday GM. Parkinson's disease is not simply a prion disorder. *The Journal of Neuroscience*. 2017; 37(41): 9799-9807.
- Schapira, A.H.; Cooper, J.M.; Dexter, D.; Clark, J.B.; Jenner, P.; Marsden, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in parkinson's disease. *J. Neurochem*. 1990, 54, 823–827.

Zhu J, Chu CT. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010; 20(Suppl 2):S325–S334.

Parker WD, Parks JK, Swerdlow RH. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Res.* 2008; 16:215–218.

Jenner P, Olanow W. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurol.* 2006; 66:S24– S36.

Beal MF. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol.* 2005; 58:495–505.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet Lond Engl.* 1989;1(8649):1269.

Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences: Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *EMBO J.* 2012;31(14):3038–62.

Malpartida AB, Williamson M, Narendra DP, Wade-Martins R, Ryan BJ. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's disease: from mechanism to therapy. *Trends in Biochemical Sciences.* 2021; 46(4): 329-43. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.11.007>

Carling PJ, Mortiboys H, Green C, Mihaylov S, Sandor C, et al. Deep phenotyping of peripheral tissue facilitates mechanistic disease stratification in sporadic Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.*2020; 187, 101772

Smith, A.M. et al. Mitochondrial dysfunction and increased glycolysis in prodromal and early Parkinson's blood cells. *Mov. Disord.* 2018; 33, 1580–1590

Li W, Fu Y, Halliday GM, Sue CM. PARK genes link mitochondrial dysfunction and alpha-synuclein pathology in sporadic Parkinson's disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021; 9:612476. doi:10.3389/fcell.2021.612476

Billingsley KJ, Barbosa IA, Bandrés-Ciga S, Quinn JP, Bubb VJ, Deshpande C, et al. Mitochondria function associated genes contribute to Parkinson's disease risk and later age at onset. *NPJ Parkinson disease.* 2019; 5:8. Doi: 10.1038/s41531-019-0080-x

Guerra F, Girolimetti G, Beli R, Mitruccio M, Pacelli C, Ferretta A, et al. Synergistic effect of mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Cells.* 2019; 8, 452; doi:10.3390/cells8050452

- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*. 1994; 74(1): 139-55
- Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 2013;3(4):461-91. doi: 10.3233/JPD-130230.
- Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell*. 2019; 18(6):e13031. doi: 10.1111/accel.13031.
- Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*. 2014; 24(10): 453-62. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mieyal JJ. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients*. 2012; 4:1399–1440.
- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol*. 1994. 36(3): 348-55. doi: 10.1002/ana.410360305.
- Gu M, Owen AD, Toffa SE, Cooper JM, Dexter DT, Jenner P, Marsden CD, Schapira AH. Mitochondria function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases. *J Neurol Sci*. 1998 Jun 11;158(1):24-9. doi: 10.1016/s0022-510x(98)00095-1.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39:44–84.
- Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, Montine TJ. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol*. 1999 May;154(5):1423-9. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65396-5.
- Montine KS, Quinn JF, Zhang J, Fessel JP, Roberts LJ 2nd, Morrow JD, Montine TJ. Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids*. 2004; 128:117–124
- Nicholls DG. Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002 Nov;34(11):1372-81. doi: 10.1016/s1357-2725(02)00077-8.

Dryanovski DI, Guzman JN, Xie Z, Galteri DJ, Volpicelli-Daley LA, Lee VM, Miller RJ, Schumacker PT, Surmeier DJ. Calcium entry and alpha-synuclein inclusions elevate dendritic mitochondrial oxidant stress in dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 2013; 33:10154–10164.

Mosharov EV, Larsen KE, Kanter E, Phillips KA, Wilson K, Schmitz Y, Krantz DE, Kobayashi K, Edwards RH, Sulzer D. Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron*. 2009;62(2):218-29. doi: 10.1016/j.neuron.2009.01.033.

Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Schumacker PT. The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2011; 198:221-31. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.08.045.

Branch SY, Sharma R, Beckstead MJ. Aging decreases L-type calcium channel currents and pacemaker firing fidelity in substantia nigra dopamine neurons. *J Neurosci*. 2014;34(28):9310-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4228-13.2014.

Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C, Marek K; Parkinson Study Group. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2004 Dec 9;351(24):2498-508. doi: 10.1056/NEJMoa033447.

Hattori N, Mizuno Y. Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease. *Lancet*. 2004; 364: 722-24.

Ambani LM, Van Woert MH, Murphy S. Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Arch Neurol*. 1975; 32: 114-18.

Kish SJ, Morito C, Hornykiewicz O. Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neurosci Lett*. 1985; 58: 343-46.

Marttila RJ, Lorentz H, Rinne UK. Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. Increase of superoxide dismutase-like activity in the substantia nigra and basal nucleus. *J Neurol Sci*. 1988; 86: 321-31.

Schipper H, Song W, Zukor H, Hascalovici JR, Zeligman D. Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. *J Neurochem*. 2009; 110: 469-85.

Schipper HM, Song W, Tavitian A, Cressatti M. The sinister face of heme oxygenase-1 in brain aging and disease. *Prog Neurobiol*. 2019;172:40-70. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.06.008.

Schipper H, Liberman A, Stopa EG. Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 1998; 150: 60-8.

Schipper H, Song W. A Heme Oxygenase-1 transducer Model of Degeneration and developmental brain disorders. *Int J Mol Sci*. 2015; 16: 5400-19.

Schipper H. Heme oxigenase expression in human central nervous system disorders. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37: 1995-2011.

Hirsch EC, Standaert DG. Ten unsolver questions about neuroinflammation in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2021; 36(1):16-24. doi: 10.1002/mds.28075.

McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*. 1988; 38:1285–91.

McGeer PL, Schwab C, Parent A, Doudet D. Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Ann Neurol*. 2003; 54:599–604

Langston JW, et al. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol*. 1999; 46:598– 605.

Kannarkat GT, et al.- The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 2013 ; 3(4): 493–514. doi:10.3233/JPD-130250.

Halliday GM, Stevens CH. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011;26:6-17.

Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2002;68:325-340.

Holmans P, Moskvina V, Jones L, et al. A pathway-based analysis provides additional support for an immune-related genetic susceptibility to Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2013;22:1039-1049.

Dzamko N, Geczy CL, Halliday GM. Inflammation is genetically implicated in Parkinson's disease. *Neuroscience* 2015;302:89-102.

Hamza TH, Zabetian CP, Tenesa A, et al. Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. *Nat Genet* 2010;42:781-785.

International Parkinson Disease Genomics Consortium; Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, et al. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a metaanalysis of genome-wide association studies. *Lancet* 2011; 377:641-9.

Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet* 2014;46:989-993.

Zhang M, Mu H, Shang Z, et al. Genome-wide pathway-based association analysis identifies risk pathways associated with Parkinson's disease. *Neuroscience* 2017;340:398-410.

Chen H, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2005; 58:963-7.

San Luciano M, Tanner CM, Meng C, Marras C, Goldman SM, Lang AE, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory use and LRRK2 Parkinson's disease penetrance. *Mov Disord*. 2020; 35(10): 1755-64

Brochard V, Combadière B, Prigent A, et al. Brain infiltration of CD4 lymphocytes contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease model. *J Clin Invest* 2008; 119: 182-92.

Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Trans* 2000;(60): 277-290.

Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, et al. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005;57(2):168-175.

Gerhard A, Pavese N, Hotton G, et al. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2006;21(2):404-412.

Terada T, Yokokura M, Yoshikawa E, et al. Extrastriatal spreading of microglial activation in Parkinson's disease: a positron emission tomography study. *Ann Nucl Med* 2016;30(8):579-87.

Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(3):460-73

Malik K, Maddison DC, Smith GA, Peters OM. Autophagic and endo-lysosomal dysfunction in neurodegenerative disease. *Molecular brain*. 2019; 12:100.  
<https://doi.org/10.1186/s13041-019-0504-x>

- Sharma M, Burré J, Bronk P, Zhang Y, Xu W, Südhof TC. CSP $\alpha$  knockout causes neurodegeneration by impairing SNAP-25 function. *EMBO J.* 2012; 31(4):829–41.
- Arias E and Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr Opin Cell Biol* 23: 184–189, 2011
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* 2006;441(7095):885–9.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* 2006;441(7095):880–4.
- Roscic A, Baldo B, Crochemore C, Marcellin D, Paganetti P. Induction of autophagy with catalytic mTOR inhibitors reduces huntingtin aggregates in a neuronal cell model. *J Neurochem.* 2011;119(2):398–407.
- Lee JH, Tecedor L, Chen YH, Monteys AM, Sowada MJ, Thompson LM, et al. Reinstating aberrant mTORC1 activity in Huntington’s disease mice improves disease phenotypes. *Neuron.* 2015;85(2):303–15.
- Dice JF. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci.* 1990;15(8):305–9.
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science.* 2004;305(5688):1292–5.
- Martinez-Vicente M, Tallozy Z, Kaushik S, Massey AC, Mazzulli J, Mosharov EV, et al. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest.* 2008;118(2):777–88.
- Orenstein SJ, Kuo S-H, Tasset I, Arias E, Koga H, Fernandez-Carasa I, et al. Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat Neurosci.* 2013;16(4):394–406.
- Wang B, Cai Z, Tao K, Zeng W, Lu F, Yang R, et al. Essential control of mitochondrial morphology and function by chaperone-mediated autophagy through degradation of PARK7. *Autophagy.* 2016;12(8):1215–28.
- Yang Q, She H, Gearing M, Colla E, Lee M, Shacka JJ, et al. Regulation of neuronal survival factor MEF2D by chaperone-mediated autophagy. *Science.* 2009; 323(5910):124–7.



- Pitcairn C, Wani WY, Mazzulli JR. Dysregulation of the autophagic-lysosomal pathway in Gaucher and Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2019;122: 72-82.
- Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, et al. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature.* 2006;441(7097):1157–61.
- Ron I, Horowitz M. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Human Molecular Genetics.* 2005;14 (16): 2387–98
- Alcalay RN, Levy OA, Waters CC, Fahn S, Ford B, Kuo SH, Mazzoni P, Pauciulo MW, Nichols WC, Gan-Or Z, et al. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain.* 2015; 138:2648–2658.
- Gegg ME, Burke D, Heales SJR, Cooper JM, Hardy J, Wood NW, Schapira AHV. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Annals of Neurology.* 2012; 72:455–463.
- Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Tayebi N, Kim WS, Sidransky E, Cooper A, Garner B, Halliday GM. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased  $\alpha$ -synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Brain.*2014; 137:834–848.
- Murphy KE, Halliday GM. Glucocerebrosidase deficits in sporadic Parkinson disease. *Autophagy.* 2014; 10:1350–1351.
- Fernandes HJ, Hartfield EM, Christian HC, Emmanouilidou E, Zheng Y, Booth H, Bogetofte H, Lang C, Ryan BJ, Sardi SP, et al. ER Stress and Autophagic Perturbations Lead to Elevated Extracellular alpha-Synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-Derived Dopamine Neurons. *Stem Cell Reports.* 2016; 6:342–356. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.01.013.
- Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, Sidransky E, Grabowski GA, Krainc D. Gaucher Disease Glucocerebrosidase and  $\alpha$ -Synuclein Form a Bidirectional Pathogenic Loop in Synucleinopathies. *Cell.*2011; 146:37–52.
- Steger M, Diez D, Dhekne HS, Lis P, Nirujogi RS, Karayel O, et al. Systematic proteomic analysis of LRRK2-mediated Rab GTPase phosphorylation establishes a connection to ciliogenesis. *Elife.* 2017; 10;6:e31012. doi: 10.7554/eLife.31012.
- Sanchez-Danes A, Richaud-Patin Y, Carballo-Carbajal I, Jimenez-Delgado S, Caig C, Mora S, Di Guglielmo C, Ezquerra M, Patel B, Giralt A, et al. 2012; Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol Med.* 4:380–395.

Yu M, Arshad M, Wang W, Zhao D, Xu L, Zhou L. LRRK2 mediated Tab8a phosphorylation promotes lipid storage. *Lipids in Health and Disease*. 2018; 17:34 <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0684-x>

Chung SY, Kishinevsky S, Mazzulli JR, Graziotto J, Mrejeru A, Mosharov EV, et al. Parkin and PINK1 Patient iPSC-Derived Midbrain Dopamine Neurons Exhibit Mitochondrial Dysfunction and  $\alpha$ -Synuclein Accumulation. *Stem Cell Rep*. 2016;7(4):664–77.

Fiesel FC, Ando M, Hudec R, Hill AR, Castanedes-Casey M, Caulfield TR, et al. (Patho-)physiological relevance of PINK1-dependent ubiquitin phosphorylation. *EMBO Rep*. 2015;16(9):1114–30.

Hou X, Fiesel FC, Truban D, Castanedes Casey M, Lin W, Soto AI, et al. Age and disease-dependent increase of the mitophagy marker phosphoubiquitin in normal aging and Lewy body disease. *Autophagy*. 2018;14(8): 1404–18.

Bonello F, Hassoun SM, Mouton-Liger F, Shin YS, Muscat A, Tesson C, et al. LRRK2 impairs PINK1/Parkin-dependent mitophagy via its kinase activity: pathologic insights into Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2019; 28:1645–60

Bae EJ, Yang NY, Song M, Lee CS, Lee JS, Jung BC, Lee HJ, Kim S, Masliah E, Sardi SP, et al. Glucocerebrosidase depletion enhances cell-to-cell transmission of alpha-synuclein. *Nat Commun*. 2014; 5:4755. [PubMed: 25156829]

Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, Schapira AHV. 2010; Chaperone-Mediated Autophagy Markers in Parkinson Disease Brains. *Archives of Neurology*. 67:16–25.

Holthuis, J.C.M.; Menon, A.K. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* 2014, 510, 48–57.

Xicoy, H., Wieringa, B. & Martens, G. J. M. The Role of Lipids in Parkinson's Disease. *Cells* 8, 27 (2019).

Orth, M. & Bellosta, S. Cholesterol: Its Regulation and Role in Central Nervous System Disorders. *Cholesterol* 2012, 1–19 (2012).

Paul, R., Choudhury, A. & Borah, A. Cholesterol – A putative endogenous contributor towards Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* 90, 125–133 (2015).

Halliday, G. M. et al.  $\alpha$ -Synuclein redistributes to neuromelanin lipid in the substantia nigra early in Parkinson's disease. *Brain* 128, 2654–2664 (2005).

Kamel, F.; Goldman, S.M.; Umbach, D.M.; Chen, H.; Richardson, G.; Barber, M.R.;

Meng, C.; Marras, C.; Koerll, M.; Kasten, M.; et al. Dietary fat intake, pesticide use, and Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.* 2014, 20, 82–87.

Moloney EB, Moskites A, Ferrari EJ, Isacson O, Hallett PJ. The glycoprotein GPNMB is selectively elevated in the substantia nigra of Parkinson's disease patients and increases lysosomal stress. *Neurobiol Dis.* 2018; 120: 1–11.  
doi:10.1016/j.nbd.2018.08.013.

Guerreiro, P.S.; Coelho, J.E.; Sousa-Lima, I.; Macedo, P.; Lopes, L.V.; Outeiro, T.F.; Pais, T.F. Mutant A53T  $\alpha$ -Synuclein Improves Rotarod Performance Before Motor Deficits and Affects Metabolic Pathways. *Neuromol. Med.* 2017, 19, 113–121.

He, Q.; Wang, M.; Petucci, C.; Gardell, S.J.; Han, X. Rotenone induces reductive stress and triacylglycerol deposition in C2C12 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013, 45, 2749–2755. [CrossRef]

Sere, Y.Y.; Regnacq, M.; Colas, J.; Berges, T. A *Saccharomyces cerevisiae* strain unable to store neutral lipids is tolerant to oxidative stress induced by  $\alpha$ -synuclein. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, 49, 1755–1764.

Cole, N.B.; Murphy, D.D.; Grider, T.; Rueter, S.; Brasaemle, D.; Nussbaum, R.L. Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 6344–6352.

Sánchez Campos, S.; Alza, N.P.; Salvador, G.A. Lipid metabolism alterations in the neuronal response to A53T  $\alpha$ -synuclein and Fe-induced injury. *Arch. Biochem. Biophys.* 2018, 655, 43–54.

Jin, U., Park, S. J. & Park, S. M. Cholesterol metabolism in the brain and its association with Parkinson's disease. *Exp. Neurobiol.* 28, 554–567 (2019).

Hallett, P. J., Engelender, S. & Isacson, O. Lipid and immune abnormalities causing age-dependent neurodegeneration and Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation* 16, 153 (2019).

Hu, G., Antikainen, R., Jousilahti, P., Kivipelto, M. & Tuomilehto, J. Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 70, 1972–1979 (2008).

Guo, X. et al. The serum lipid profile of Parkinson's disease patients: A study from China. *Int. J. Neurosci.* 125, 838–844 (2015).

Weij, Q. et al. Reduced Serum Levels of Triglyceride, Very Low Density Lipoprotein Cholesterol and Apolipoprotein B in Parkinson's Disease Patients. *PLoS One* 8, e75743 (2013).

de Lau, L. M. L., Koudstaal, P. J., Hofman, A. & Breteler, M. M. B. Serum Cholesterol Levels and the Risk of Parkinson's Disease. *Am. J. Epidemiol.* 164, 998–1002 (2006).

Scigliano, G. et al. Reduced risk factors for vascular disorders in Parkinson disease patients: A case-control study. *Stroke* 37, 1184–1188 (2006).

Rozani, V. et al. Higher serum cholesterol and decreased Parkinson's disease risk: A statin-free cohort study. *Mov. Disord.* 33, 1298–1305 (2018).

Fang, F. et al. Lipids, Apolipoproteins, and the Risk of Parkinson Disease. *Circ. Res.* 125, 643–652 (2019).

Huang, X. et al. Serum Cholesterol and the Progression of Parkinson's Disease: Results from DATATOP. *PLoS One* 6, e22854 (2011).

Thaler A, Shenhar-Tsarfaty S, Shaked Y, et al. Metabolic syndrome does not influence the phenotype of LRRK2 and GBA related Parkinson's disease. *Sci Rep.* 2020;10:9329.

Sterling, N. W. et al. Higher plasma LDL-cholesterol is associated with preserved executive and fine motor functions in Parkinson's disease. *Aging Dis.* 7, 237–245 (2016).

Klemann, C. J. H. M. et al. Integrated molecular landscape of Parkinson's disease. *npj Park. Dis.* 3, 14 (2017).

Huang, X. et al. Brain cholesterol metabolism and Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 34, 386–395 (2019).

Lingwood, D. & Simons, K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science* (80-. ). 327, 46–50 (2010).

Fabelo, N. et al. Severe Alterations in Lipid Composition of Frontal Cortex Lipid Rafts from Parkinson's Disease and Incidental Parkinson's Disease. *Mol. Med.* 17, 1107–1118 (2011).

Hatano, T. et al. Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts. *Hum. Mol. Genet.* 16, 678–690 (2007).

Cha, S.-H. et al. Loss of parkin promotes lipid rafts-dependent endocytosis through accumulating caveolin-1: implications for Parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.* 10, 63 (2015).

Shahmoradian, S. H. et al. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat. Neurosci.* 22, 1099–1109 (2019).

- García-Sanz, P. et al. N370S-GBA1 mutation causes lysosomal cholesterol accumulation in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 32, 1409–1422 (2017).
- Garcia-Sanz P, Orgaz L, Fuentes JM, Vicario C, Moratalla R. Cholesterol and multilamellar bodies: Lysosomal dysfunction in GBA-Parkinson's disease. *Autophagy.* 2018; 14(4): 717-8.  
doi:<https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1427396>
- Fanning, S., Selkoe, D. & Dettmer, U. Parkinson's disease: proteinopathy or lipidopathy? *npj Park. Dis.* 6, 3 (2020).
- Ginsberg, H. et al. Reduced plasma concentrations of total, low density lipoprotein and high density lipoprotein cholesterol in patients with Gaucher type I disease. *Clin. Genet.* 26, 109–116 (1984).
- Hallett, P. J. et al. Glycosphingolipid levels and glucocerebrosidase activity are altered in normal aging of the mouse brain. *Neurobiol. Aging* 67, 189–200 (2018).
- Freedman, D. S. et al. Sex and Age Differences in Lipoprotein Subclasses Measured by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: The Framingham Study. *Clin. Chem.* 50, 1189–1200 (2004).
- McNaught KS, Olanow CW. Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2006; 25: 530-45.
- Berg D, Hochstrasser H. Iron metabolism in Parkinsonian syndromes. *Mov. Disord.* 2006; 21: 1299-1310.
- Cohen G. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 738: 8-14.
- Kristal BS, Conway AD, Brown AM, Jian JC, Ulluci PA, Li SW et al. Selective dopaminergic vulnerability: 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde targets mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30; 924-31.
- Lamensdorf I, Eisenhofer G, Harvey-White J, Nechustan A, Kirk K, Kopin I.J. 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde potentiates the toxic effects of metabolic stress in PC12 cells. *Brain Res.* 2000; 868: 191-201.
- Palacios N, Gao X, McCullough ML, Jacobs EJ, Patel AV, Mayo T, et al. Obesity, diabetes, and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2011; 26: 2253-9.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000; 3: 1301-06.

Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, O'Reilly E, McCullough ML, Calle EE et al. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2006; 60: 197-203.

Jesús S, Pérez I, Cáceres-Redondo MT, Carrillo F, Carballo M, Gómez-Garre P, et al. Low serum uric acid concentration in Parkinson's disease in southern Spain. *Eur J Neurol*. 2013; 20: 208-10.

Gaenslen A, Gasser T, Berg D. Nutrition and the risk for Parkinson's disease: review of the literature. *J Neural Transm*. 2008; 115: 703-13.

Etminan M, Gill SS, Samii A. Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2005; 4: 362-65.

Zhang SM, Hernan MA, Chen H, Spiegelman D, Willett WC, Ascherio A. Intakes of vitamins E and C, carotenoids, vitamin supplements, and PD risk. *Neurology*. 2002; 59: 1161-9.

Miyake Y, Fukushima W, Tanaka K, Sasaki S, Kiyohara C, Tsuboi Y, et al. Dietary intake of antioxidant vitamins and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *Eur J Neurol*. 2011; 8: 106-13.

Alcalay RN, Gu Y, Mejia-Santana H, Cote L, Marder KS, Scarmeas N. The association between Mediterranean diet adherence and Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012; 27: 771-4.

Okubo H, Miyake Y, Sasaki S, Murakami K. Dietary patterns and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *Eur J Neurol*. 2012;19; 681-8.

Parkinson Study Group STEADY-PD III Investigators. Isradipine Versus Placebo in Early Parkinson Disease: A Randomized Trial. *Ann Intern Med*. 2020; 172(9): 591-8. doi:10.7326/M19-2534.

Elkouzi A, Vedam-Mai V, Eisinger RS, Okun MS. Emerging therapies in Parkinson disease - repurposed drugs and new approaches. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(4):204-223. doi: 10.1038/s41582-019-0155-7.

Schwarzschild MA, Macklin EA, Bakshi R, Battacharyya S, Logan R, Espay AJ, et al. Sex differences by design and outcome in the Safety of Urate Elevation in PD (SURE-PD) trial. *Neurology*. 2019;93(14):e1328-e1338. doi: 10.1212/WNL.0000000000008194.

Negida A, Menshawy A, El Ashal G, Elfouly Y, Hani Y, Hegazy Y, El Ghonimy S, Fouda S, Rashad Y. Coenzyme Q10 for Patients with Parkinson's Disease: A Systematic

Review and Meta-Analysis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2016;15(1):45-53. doi: 10.2174/1871527314666150821103306.

Martin-Bastida A, Ward RJ, Newbould R, Piccini P, Sharp D, Kabba C, et al. Brain iron chelation by deferiprone in a phase 2 randomised double-blinded placebo controlled clinical trial in Parkinson's disease. *Sci Report*. 2017; 7: 1398. DOI:10.1038/s41598-017-01402-2

Wang, A., Lin, Y., Wu, Y. & Zhang, D. Macronutrients intake and risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Geriatr Gerontol Int*. 2015; 15, 606-16

Schipper H, Song W, Zukor H, Hascalovici JR, Zeligman D. Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. *J Neurochem*. 2009; 110: 469-85.

Schipper H, Song W. A Heme Oxygenase-1 transducer Model of Degeneration and developmental brain disorders. *Int J Mol Sci*. 2015; 16: 5400-19.

Schipper H. Heme oxygenase expression in human central nervous system disorders. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37: 1995-2011.

Hirose W, Ikematsu K, Tsuda R. Age-associated increases in heme oxygenase-1 and ferritin immunoreactivity in the autopsied brain. *Legal Medicine*. 2003; 5: 360-6.

McNaught KS, Olanow CW. Proteasome inhibitor-induced model of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2006; 60(2): 243-7.

Yamamoto N, Izumi Y, Matsuo T, Wakita S, Kume T, Takada-Takatori Y et al. Elevation of heme oxygenase-1 by proteasome inhibition affords dopaminergic neuroprotection. *J Neurosci Res*. 2010; 88: 1934-42.

Youn J, Kim DW, Kim ST, Park SY, Yeo EJ, Choi YJ et al. PEP-1-HO-1 prevents MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in a PD mouse model. *BMB Rep*. 2014; 47(10): 569-74.

Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*. 2006; 443: 780-6.

Scotter EL, Vance C, Nishimura AL, Lee YB, Chen HJ, Urwin H et al. Differential roles of the ubiquitin proteasome system and autophagy in the clearance of soluble and aggregated TDP-43 species. *J Cell Sci*. 2014; 127: 1263-78.

Stahnke T, Stadelmann C, Netzler A, Bruck W et Richter-Landsberg C. Differential upregulation of heme oxygenase-1 (HSP32) in glial cells after oxidative stress and in demyelinating disorders. *J Mol Neurosci*. 2007;32: 25-37.

- Schipper H, Liberman A, Stopa EG. Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 1998; 150: 60-8.
- Schipper H, Vininsky R, Brull R, Small L et Brawer JR. Astrocyte mitochondria: a substrate for iron deposition in the aging rat substantia nigra. *Exp Neurol*. 1998; 152: 188-96.
- Schipper H, Bernier L, Mehindate K, Frankel D. Mitochondrial iron sequestration in dopamine-challenged astroglia: role of heme oxygenase-1 and the permeability transition pore. *J Neurochem*. 1999; 72: 1802-11.
- Schipper H. Brain iron deposition and the free radical mitochondrial theory of ageing. *Ageing Res*. 2004; 3: 265-301.
- Zukor H, Song W, Liberman A, Mui J, Vali H, Fillebeen C, et al. HO-1-mediated macroautophagy: a mechanism for unregulated iron deposition in aging and degenerating neural tissues. *J Neurochem*. 2009; 109: 776-91.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987; 235: 1043-46.
- Stocker R, Glazer AN Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84: 5918-22.
- Llesuy SF, Tomaro ML. Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage. *Biochim Biophys Acta* 1994;1223:9-14.
- Yao HM, Shen DL, Zhao XY, Wang XF, Sun TW, Zhang JY et al. Prognostic value of total bilirubin in patients with angina pectoris undergoing percutaneous coronary intervention. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(9): 15930-9.
- McCarty MF. Serum bilirubin may serve as a marker for increased heme oxygenase activity and inducibility in tissues - a Rationale for the versatile health protection associated with elevated plasma bilirubin. *Med Hypotheses*. 2013; 81: 607-10.
- Scigliano G, Girotti F, Soliveri P, Musicco M, Radice D, et Caraceni T. Increased plasma bilirubin in Parkinson patients on L-dopa: evidence against the free radical hypothesis?. *Ital J Neurol Sci*. 1997; 18:69-72.
- Moccia M, Picillo M, Erro R, Longo K, Amboni M, Santangelo G et al. Increased bilirubin levels in de novo Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2015; 22: 954-9.



- Hatano T, Saiki S, Okuzumi A, Mohny R et Hattori N. Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomic technologies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015; 0: 1-7.
- Ayuso P, Martinez C, Pastor P, Lorenzo-Betancor O, Luengo A, Jimenez-Jimenez FJ, et al. An association study between Heme oxygenase-1 genetic variants and Parkinson's Disease. *Front Cell Neurosci*. 2014; 8(298): 1-8.
- Song W, Kotheri V, Velly AM, Cressatti M, Liberman A, Gornitsky M, et al. Evaluation of salivary heme oxygenase-1 as a potential biomarker of early Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2018; 33(4): 583-91
- Ziberna L, Martelanc M, Franko M, Passamonti S. Bilirubin is an endogenous antioxidant in human vascular endothelial cells. *Sci. Rep.* 6 (2016) 29240. doi:10.1038/srep29240
- Ostrow, L. Pascolo, D. Brites, C. Tiribelli. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity. *Trends Mol Med*. 10 (2004) 65-70.
- Gazzin S, Strazielle N, Tiribelli C, Ghersi-Egea JF. Transport and metabolism at blood-brain interfaces and in neural cells: relevance to bilirubin-induced encephalopathy. *Front Pharmacol*. 89 (2012) 1-13.
- Watchko JF, Tiribelli C. Bilirubin-Induced Neurologic Damage - Mechanisms and Management Approaches. *N Engl J Med*. 369 (2013) 2021-2030.
- Qin XL, Zhang QS, Sun L, Hao MW, Hu ZT. Lower serum bilirubin and uric acid concentrations in patients with Parkinson's disease in China. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 72 (2014) 49-56.
- Stojanov M, Stefanovic A, Dzingalasevic G, Ivanisevic J, Miljkovic M, Mandic-Radic S, Prostan M. Total bilirubin in young men and women: association with risk markers for cardiovascular diseases. *Clinical biochemistry*. 46 (2013) 1516-1519.
- J. Zelenka, A. Dvorak, L. Alán, M. Zadinová, M. Haluzik, L. Vitek. Hyperbilirubinemia protects against aging-associated inflammation and metabolic deterioration. *Oxid Med Cell Longev*. (2016) 6190609. doi: 10.1155/2016/6190609
- F. Peng, Y. Yang, J. Liu, Y. Jiang, C. Zhu, X. Deng, X. Hu, X. Chen, X. Zhong. Low antioxidant status of serum uric acid, bilirubin and albumin in patients with neuromyelitis optica. *Eur J Neurol*. 19 (2012) 277-283.

M. Moccia, M. Picillo, R. Erro, K. Longo, M. Amboni, G. Santangelo, R. Allocca, O. Caporale, M. Triassi, M.T. Pellecchia, P. Barone, C. Vitale. Increased bilirubin levels in de novo Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 22 (2015) 954–959.

M. Moccia, M.T. Pellecchia, E. Spina, P. Barone, C. Vitale. Bilirubin and Uric Acid: Two Different Anti-oxidants in Parkinson's Disease. *Cell Biochem Biophys.* 74 (2016) 91-92.

Kim CY, Alcalay RN. Genetic forms of Parkinson's disease. *Semin Neurol.* 2017; 37:135–146.

Blauwendraat C, Nalls M, Singleton AB. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2020; 19(2): 170-8. DOI:[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30287-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30287-X)

Nalls MA, Blauwendraat C, Vallerga CL, Heilbron K, Bandres-Ciga S, Chang D, et al. Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol.* 2019; 18(12): 1091-1102. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30320-5.

Singleton AB, Farrer MJ, Bonifati V. The genetics of PD: progress and therapeutic implications. *Mov Disord.* 2013 January; 28(1): 14-23.

Marras C, Lang A, Van de Arrenburg B, Sue CM, Tabrizi SJ, Bertram L, et al. Nomenclature of Genetic Movement Disorders: Recommendation of the International Parkinson and Movement Disorders Society Task Force. *Mov Disord.* 2016; 31 (4): 436-57

Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 1996; 274(5290):1197–1199

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276(5321):2045–2047

Chan P, Tanner CM, Jiang X, Langston JW. Failure to find the alpha-synuclein gene missense mutation (G209A) in 100 patients with younger onset Parkinson's disease. *Neurology.* 1998;50(2):513–514

Scott WK, Yamaoka LH, Stajich JM, et al. The alpha-synuclein gene is not a major risk factor in familial Parkinson disease. *Neurogenetics* 1999;2(3):191–192

Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004;55(2):164–173

Krüger R, Kuhn W, Müller T, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998;18(2):106–108

Proukakis C, Dudzik CG, Brier T, et al. A novel  $\alpha$ -synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology* 2013; 80(11):1062–1064

Lesage S, Anheim M, Letournel F, et al; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. G51D  $\alpha$ -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann Neurol* 2013;73(4):459–471

Papadimitriou D, Antonelou R, Miligkos M, et al. Motor and nonmotor features of carriers of the p.A53T alpha-synuclein mutation: a longitudinal study. *Mov Disord*. 2016;31(8): 1226-1230

Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004;364(9440):1167–1169

Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003;302(5646): 841

Ahn TB, Kim SY, Kim JY, Park SS, Lee DS, Min HJ, et al. alpha-Synuclein gene duplication is present in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2008;70(1): 43-9. doi: 10.1212/01.wnl.0000271080.53272.c7.

Ibáñez P, Bonnet AM, Débarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, et al. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004;364(9440):1169-71. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17104-3.

Kasten M, Klein C. The many faces of alpha-synuclein mutations. *Mov Disord*. 2013;28(6):697–701.

Zimprich A, Biskup S, Leitner P, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 2004;44(4):601–607

Paisán-Ruiz C, Jain S, Evans EW, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*. 2004;44(4):595–600

Gao L, Gómez-Garre P, Díaz-Corrales FJ, et al. Prevalence and clinical features of LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease in southern Spain. *Eur J Neurol*. 2009;16(8):957-960.

Lee AJ, et al. Penetrance estimate of LRRK2 p.G2019S mutation in individuals of non-Ashkenazi Jewish ancestry. *Mov. Disord*. 32, 1432–1438 (2017).

Lüth T, Köing IR, Grünewald A, Kasten M, Klein C, Hentati F, Farrer M, Trinh J. Age at onset of LRRK2 p.Gly2019Ser is related to environmental and lifestyle factors. *Mov Disord.* 2020; 35 (10): 1854-8.

Cabezudo D, Baekelandt V, Lobbestael E. Multiple-Hit Hypothesis in Parkinson's Disease: LRRK2 and Inflammation. *Front Neurosci.* 2020;14(April).

Berwick DC, Heaton GR, Azeggagh S, Harvey K. LRRK2 Biology from structure to dysfunction: research progresses, but the themes remain the same. *Mol Neurodegener.* 2019;14(1):49.

Berwick DC, Harvey K. LRRK2 functions as a Wnt signaling scaffold, bridging cytosolic proteins and membrane-localized LRP6. *Hum Mol Genet.* 2012;21(22):4966-4979.

Delcambre S, Ghelfi J, Ourzen N, Grandmougin L, Dellbrouck C, Seibler P, et al. Mitochondrial mechanisms of LRRK2 G2019S penetrance. *Front. Neurol.* 11:881. doi: 10.3389/fneur.2020.00881

Yu M. et al. LRRK2 mediated Rab8a phosphorylation promotes lipid storage. *Lipids Health Dis.* 17, 1–8 (2018).

Baptista M, et al. Loss of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in rats leads to progressive abnormal phenotypes in peripheral organs. *PLoS One* 8, 1–16 (2013).

Thaler, A. et al. Metabolic syndrome does not influence the phenotype of LRRK2 and GBA related Parkinson's disease. *Sci. Rep.* 10, 1–8 (2020).

Trinh J, Zeldenrust FMJ, Huang J, et al. Genotype-phenotype relations for the Parkinson's disease genes SNCA, LRRK2, VPS35: MDSGene systematic review. *Mov Disord.* 2018;33(12):1857-1870.

Dzamko, N, Rowe DB, Halliday GM. Increased peripheral inflammation in asymptomatic leucine-rich repeat kinase 2 mutation carriers. *Mov. Disord.* 2016; 31:889-97.

Hatano, T. et al. Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16, 678-90.

Ferrazza, R. et al. LRRK2 deficiency impacts ceramide metabolism in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016; 478: 1141-6.

Ysselstein, D. et al. LRRK2 kinase activity regulates lysosomal glucocerebrosidase in neurons derived from Parkinson's disease patients. *Nat. Commun.* 2019; 10, 1-9.

Baptista, M. A. S. et al. LRRK2 inhibitors induce reversible changes in nonhuman primate lungs without measurable pulmonary deficits. *Sci. Transl. Med.* 12, (2020).

Rocha, E. M. et al. LRRK2 inhibition prevents endolysosomal deficits seen in human Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 134, 104626 (2020)

Cutillo G, Simon DK, Eleuteri S. VPS35 and the mitochondria: Connecting the dots in Parkinson's disease pathophysiology. *Neurobiology of Disease.* 2020; 145: 105056. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105056>

Rahman AA, Morrison BE. Contributions of VPS35 mutations to Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2019; 401: 1-10. doi:10.1016/j.neuroscience.2019.01.006.

Song S, Huang H, Guan X, Fiesler V, Bhuiyan MIH, Liu R, Jalali S, Hasan MN, Tai AK, Chattopadhyay A, Chaparala S, Sun M, Stolz DB, He P, Agalliu D, Sun D, Begum G. Activation of endothelial Wnt/beta-catenin signaling by protective astrocytes repairs BBB damage in ischemic stroke. *Prog Neurobiol.* 2021;199:101963. doi: 10.1016/j.pneurobio.2020.101963.

Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013;19(2):179-92. doi: 10.1038/nm.3074.

Jesús S, Huertas I, Bernal-Bernal I, et al. GBA variants influence motor and non-motor features of Parkinson's disease. *PLoS One.* 2016;11:1–17.

Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, et al. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *QJM* 1996;89(9): 691–694

Aharon-Peretz J, Badarny S, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson disease: phenotype-genotype correlation. *Neurology* 2005;65(9):1460–1461

Beavan MS, Schapira AH. Glucocerebrosidase mutations and the pathogenesis of Parkinson disease. *Ann Med* 2013;45(8): 511–521

Alcalay RN, Levy OA, Waters CC, et al. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain* 2015;138(Pt 9):2648–2658

Huang CL, Wu-Chou YH, Lai SC, et al. Contribution of glucocerebrosidase mutation in a large cohort of sporadic Parkinson's disease in Taiwan. *Eur J Neurol* 2011;18(10):1227–1232

Wu YR, Chen CM, Chao CY, et al. Glucocerebrosidase gene mutation is a risk factor for early onset of Parkinson disease among Taiwanese. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78(9): 977–979

Lesage S, Anheim M, Condroyer C, et al; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2011;20(1): 202–210

Neumann J, Bras J, Deas E, et al. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain* 2009;132(Pt 7):1783–1794

Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2004;351(19):1972–1977

Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2009;361(17):1651–1661

Gan-Or Z, Giladi N, Rozovski U, et al. Genotype-phenotype correlations between GBA mutations and Parkinson disease risk and onset. *Neurology* 2008;70(24):2277–2283

Anheim M, Elbaz A, Lesage S, et al; French Parkinson Disease Genetic Group. Penetrance of Parkinson disease in glucocerebrosidase gene mutation carriers. *Neurology* 2012;78(6): 417–420

Alcalay RN, Dinur T, Quinn T, et al. Comparison of Parkinson risk in Ashkenazi Jewish patients with Gaucher disease and GBA heterozygotes. *JAMA Neurol* 2014;71(6):752–757

Gan-Or Z, Amshalom I, Kilarski LL, et al. Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease. *Neurology*. 2015;84(9):880–887

Brockmann K, Srulijes K, Pfloderer S, et al. GBA-associated Parkinson's disease: reduced survival and more rapid progression in a prospective longitudinal study. *Mov Disord* 2015;30(3): 407–411

Schierding W, Farrow S, Fadason T, Graham OEE, Pitcher TL, Qubisi S, Davidson AJ, Perry JK, Anderson TJ, Kennedy MA, Cooper A, O'Sullivan JM. Common Variants Coregulate Expression of GBA and Modifier Genes to Delay Parkinson's Disease Onset. *Mov Disord*. 2020 Aug;35(8):1346-1356. doi: 10.1002/mds.28144.

Thaler A, Kozlovski T, Gurevich T, Bar-Shira A, Gana-Weisz M, Orr-Urtreger A, et al. Survival rates among Parkinson's disease patients who carry mutations in the LRRK2 and GBA genes. *Mov Disord*. 2018; 33(10): 1656-60.

- Oeda T, Umemura A, Mori Y, et al. Impact of glucocerebrosidase mutations on motor and nonmotor complications in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2015;36(12):3306–3313
- Alcalay RN, Caccappolo E, Mejia-Santana H, et al. Cognitive performance of GBA mutation carriers with early-onset PD: the CORE-PD study. *Neurology* 2012;78(18):1434–1440
- Brockmann K, Srulijes K, Hauser AK, et al. GBA-associated PD presents with nonmotor characteristics. *Neurology* 2011;77(3): 276–280
- Gan-Or Z, Mirelman A, Postuma RB, et al. GBA mutations are associated with rapid eye movement sleep behavior disorder. *Ann Clin Transl Neurol* 2015;2(9):941–945
- Cilia R, Tunesi S, Marotta G, et al. Survival and dementia in GBA-associated Parkinson's disease: the mutation matters. *Ann Neurol* 2016;80(5):662–673
- Thaler A, Gurevich T, Bar Shira A, et al. A “dose” effect of mutations in the GBA gene on Parkinson's disease phenotype. *Parkinsonism Relat Disord.* 2016:S1353-8020(16)30495-3
- Clark LN, Kartsaklis LA, Wolf Gilbert R, et al. Association of glucocerebrosidase mutations with dementia with Lewy bodies. *Arch Neurol* 2009;66(5):578–583
- Parkkinen L, Neumann J, O'Sullivan SS, et al. Glucocerebrosidase mutations do not cause increased Lewy body pathology in Parkinson's disease. *Mol Genet Metab* 2011;103(4):410–412
- Goker-Alpan O, Stubblefield BK, Giasson BI, Sidransky E. Glucocerebrosidase is present in  $\alpha$ -synuclein inclusions in Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 2010;120(5):641–649
- Gegg ME, Sweet L, Wang BH, Shihabuddin LS, Sardi SP, Schapira AHV. No evidence for substrate accumulation in Parkinson brains with GBA mutations. *Mov Disord.* 2015; 30(8): 1085-9.
- García-Sanz, P., Aerts, J. & Moratalla, R. The Role of Cholesterol in  $\alpha$ -Synuclein and Lewy Body Pathology in GBA1 Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* mds.28396 (2020) doi:10.1002/mds.28396.
- Tejera-Parrado C, Mir P, Periñán MT, Vela-Desojo L, Abreu-Rodríguez I, Alonso-Cánovas A, et al. A genetic analysis of a Spanish population with early onset Parkinson's disease. *PLoS One.* 2020 Sep 1;15(9):e0238098. doi: 10.1371/journal.pone.0238098.

Ishikawa A, Tsuji S. Clinical analysis of 17 patients in 12 Japanese families with autosomal-recessive type juvenile parkinsonism. *Neurology* 1996;47(1):160–166

Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, et al. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet* 1997;60(3):588–596

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392(6676):605–608

Hattori N, Kitada T, Matsumine H, et al. Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals. *Ann Neurol* 1998;44(6):935-941

Jeon BS, Kim JM, Lee DS, Hattori N, Mizuno Y. An apparently sporadic case with parkin gene mutation in a Korean woman. *Arch Neurol* 2001;58(6):988–989

Lücking CB, Abbas N, Dürr A, et al; The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease and the French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Lancet* 1998; 352(9137):1355–1356

Hedrich K, Marder K, Harris J, et al. Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for Parkin mutations. *Neurology* 2002;58(8):1239–1246

Marder KS, Tang MX, Mejia-Santana H, et al. Predictors of parkin mutations in early-onset Parkinson disease: the consortium on risk for early-onset Parkinson disease study. *Arch Neurol* 2010; 67(6):731–738

Dawson TM, Dawson VL. The role of Parkin in Familial and sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2010; 25:S32-S39. doi:10.1002/mds.22798.

Yao Z, Wood NW. Cell death pathways in Parkinson's disease: role of mitochondria. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(9):2135-49.

Pramstaller PP, Schlossmacher MG, Jacques TS, et al. Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Ann Neurol* 2005;58(3):411–422

Doherty KM, Silveira-Moriyama L, Parkkinen L, et al. Parkin disease: a clinicopathologic entity? *JAMA Neurol.* 2013;70(5): 571-79



- Ahlskog JE. Parkin and PINK1 parkinsonism may represent nigral mitochondrial cytopathies distinct from Lewy body Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009; 15(10):721-27.
- Rub C, Wilkening A, Voos W. Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system. *Cell Tissue Res* 2017;367(1):111–123
- Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, et al. Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet* 2001;68(4):895–900
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, et al. Hereditary earlyonset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* 2004;304(5674):1158–1160
- Valente EM, Salvi S, Ialongo T, et al. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol.*2004;56(3):336–341
- Bonifati V, Rohé CF, Breedveld GJ, et al; Italian Parkinson Genetics Network. Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology* 2005; 65(1):87–95
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science.* 2003; 299: 256-69.
- Dolgacheva L, Berezhnov A, Fedotova E, Zinchenko V, Abramov A. Role fo DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 2019; 51:175–188. <https://doi.org/10.1007/s10863-019-09798-4>
- Ariga H, Takahashi-Niki K, Kato I, Maita H, Niki T, Iguchi-Ariga SM. Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease. *Oxidative Med Cell Longev.* 2013:683920. <https://doi.org/10.1155/2013/683920>
- Biosa A, Sandrelli F, Beltramini M, Greggio E, Bubacco L, Bisaglia M. Recent findings on the physiological function of DJ-1: Beyond Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2017; 108: 65-72. doi: 10.1016/j.nbd.2017.08.005
- Guzman JN, Sánchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker P, Surmeier DJ. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature.* 2010; 468, 696–700. doi:10.1038/nature09536

Kilarski LL, Pearson JP, Newsway V, et al. Systematic review and UK-based study of PARK2 (parkin), PINK1, PARK7 (DJ-1) and LRRK2 in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27(12):1522–1529.

Gómez-Garre P, Jesús S, Carrillo F, Cáceres-Redondo MT, Huertas-Fernández I, Bernal-Bernal I, Bonilla-Toribio M, Vargas-González L, Carballo M, Mir P. Systematic mutational analysis of FBXO7 in a Parkinson's disease population from southern Spain. *Neurobiol Aging*. 2014;35(3):727.e5-7. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.011.

Park JS, Blair NF, Sue CM. The role of ATP13A2 in Parkinson's disease: clinical phenotypes and molecular mechanisms. *Mov Disord*. 2015; 30(6): 770-9. doi: 10.1002/mds.26243.

Tang C, Han H, Yan M, Zhu S, Liu J, Liu Z, et al. PINK1-PRKN/PARK2 pathway of mitophagy is activated to protect against renal ischemia-reperfusion injury. *Autophagy*. 2018; 14(5): 880-97.

He L, Zhou Q, Huang Z, Xu J, Zhou H, Lv D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy promotes apelin-13-induced vascular smooth muscle cell proliferation by AMPK $\alpha$  and exacerbates atherosclerotic lesions. *J Cell Physiol*. 2018;1–15.

Livingston M, Wang J, Zhou J, Wu G, Ganley IG, Hill JA, et al. Clearance of damaged mitochondria via mitophagy is important to the protective effect of ischemic preconditioning in kidneys. *Autophagy*. 2019; 15 (12): 2142-62.

Wen Y, Gu Y, Tang X, Hu Z. PINK1 overexpression protects against cerebral ischemia through Parkin regulation. *Environ Toxicol*. 2020; 35 (2): 188-93.

Ben-Shlomo Y, Marmot MG. Survival and cause of death in a cohort of patients with parkinsonism: Possible clues to aetiology? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995;58(3):293-299.

Pennington S, Snell K, Lee M, Walker R. The cause of death in idiopathic Parkinson's disease. *Park Relat Disord*. 2010;16(7):434-437.

Driver JA, Kurth T, Buring JE, Gaziano JM, Logroscino G. Parkinson disease and risk of mortality: A prospective comorbidity-matched cohort study. *Neurology*. 2008;70(Issue 16, Part 2):1423-1430.

Levine RL, Jones JC, Bee N. Stroke and Parkinson's disease. *Stroke*. 1992;23(6):839-842.

Nataraj A, Rajput AH. Parkinson's disease, stroke, and related epidemiology. *Mov Disord*. 2005;20(11):1476-1480.

Becker C, Jick SS, Meier CR. Risk of stroke in patients with idiopathic Parkinson disease. *Park Relat Disord*. 2010;16(1):31-35.

Patel M, Coutinho C, Emsley HCA. Prevalence of radiological and clinical cerebrovascular disease in idiopathic Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg*. 2011;113(10):830-834.

Huang Y-P, Chen L-S, Yen M-F, et al. Parkinson's Disease Is Related to an Increased Risk of Ischemic Stroke—A Population-Based Propensity Score-Matched Follow-Up Study. *PLoS One*. 2013;8(9):e68314.

Li Q, Wang C, Tang H, Chen S, Ma J. Stroke and Coronary Artery Disease Are Associated with Parkinson's Disease. *Can J Neurol Sci*. 2018;45(5):559-565.

Liang H-W, Huang Y-P, Pan S-L. Parkinson disease and risk of acute myocardial infarction: A population-based, propensity score-matched, longitudinal follow-up study. *Am Heart J*. 2015;169(4):508-514.

Alves M, Caldeira D, Ferro JM, Ferreira JJ. Does Parkinson's disease increase the risk of cardiovascular events? A systematic review and meta-analysis. *Eur J Neurol*. 2020;27(2):288-296.

Potashkin J, Huang X, Becker C, Chen H, Foltynie T, Marras C. Understanding the Links Between Cardiovascular Disease and Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 2020;35(1):55-74.

Thaler, A. et al. Metabolic syndrome does not influence the phenotype of LRRK2 and GBA related Parkinson's disease. *Sci. Rep.* 10, 9329 (2020).

Mukherjee UA, Ong S-B, Ong S-G, Hausenloy DJ. Parkinson's disease proteins: Novel mitochondrial targets for cardioprotection. *Pharmacol Ther*. 2015;156:34-43.

Kim T, Vemuganti R. Mechanisms of Parkinson's disease-related proteins in mediating secondary brain damage after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(6):1910-1926.

Kim C, Beilina A, Smith N, et al. LRRK2 mediates microglial neurotoxicity via NFATc2 in rodent models of synucleinopathies. *Sci Transl Med*. 2020;12(565): eaay0399

Lang W, Wang J, Ma X, et al. Identification of Shared Genes Between Ischemic Stroke and Parkinson's Disease Using Genome-Wide Association Studies. *Hum Mol Genet*. 2019;21: 1-8

- Yue X, Li H, Yan H, Zhang P, Chang L, Li T. Risk of Parkinson disease in diabetes mellitus: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. *Medicine (Baltimore)* 2016;95: e3549.
- Lu L, Fu DL, Li HQ, Liu AJ, Li JH, Zheng GQ. Diabetes and risk of Parkinson's disease: an updated meta-analysis of case-control studies. *PLoS ONE* 2014;9:e85781.
- Cereda E, Barichella M, Pedrolli C, et al. Diabetes and risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2011;34:2614-2623.
- Driver JA, Smith A, Buring JE, Gaziano JM, Kurth T, Logroscino G. Prospective cohort study of type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. *Diabetes Care* 2008;31:2003-2005.
- De Pablo-Fernandez E, Goldacre R, Pakpoor J, Noyce AJ, Warner TT. Association between diabetes and subsequent Parkinson disease: a record-linkage cohort study. *Neurology* 2018; 91:e139-e142.
- Xu Q, Park Y, Huang X, et al. Diabetes and risk of Parkinson's disease. *Diabetes Care* 2011;34:910-915.
- Grandinetti A, Morens DM, Reed D, MacEachern D. Prospective study of cigarette smoking and the risk of developing idiopathic Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 1994;139:1129-1138.
- Simon KC, Chen H, Schwarzschild M, Ascherio A. Hypertension, hypercholesterolemia, diabetes, and risk of Parkinson disease. *Neurology*. 2007;69:1688-1695.
- Qiu C, Hu G, Kivipelto M, et al. Association of blood pressure and hypertension with the risk of Parkinson disease: the National FINRISK Study. *Hypertension* 2011;57:1094-1100.
- Vikdahl M, Backman L, Johansson I, Forsgren L, Haglin L. Cardiovascular risk factors and the risk of Parkinson's disease. *Eur J Clin Nutr* 2015;69:729-733.
- Savica R, Grossardt BR, Ahlskog JE, Rocca WA. Metabolic markers or conditions preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Mov Disord* 2012;27:974-979.
- Miyake Y, Tanaka K, Fukushima W, et al. Case-control study of risk of Parkinson's disease in relation to hypertension, hypercholesterolemia, and diabetes in Japan. *J Neurol Sci*. 2010; 293: 82-6.
- Becker C, Jick SS, Meier CR. Use of antihypertensives and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 2008; 70: 1438-44.

- Powers KM, Smith-Weller T, Franklin GM, Longstreth WT Jr, Swanson PD, Checkoway H. Diabetes, smoking, and other medical conditions in relation to Parkinson's disease risk. *Parkinsonism Relat Disord* 2006;12:185-189.
- Scigliano G, Musicco M, Soliveri P, Piccolo I, Ronchetti G, Girotti F. Reduced risk factors for vascular disorders in Parkinson disease patients: a case-control study. *Stroke* 2006;37: 1184-8.
- Paganini-Hill A. Risk factors for Parkinson's disease: the leisure world cohort study. *Neuroepidemiology*. 2001;20(2): 118-24. doi: 10.1159/000054770.
- McCann SJ, LeCouteur DG, Green AC, Brayne C, Johnson AG, Chan D, McManus ME, Pond SM. The epidemiology of Parkinson's disease in an Australian population. *Neuroepidemiology*. 1998;17(6):310-7. doi: 10.1159/000026185.
- Lin KD, Yang CY, Lee MY, Ho SC, Liu CK, Shin SJ. Statin therapy prevents the onset of Parkinson disease in patients with diabetes. *Ann Neurol*. 2016;80(4):532-40. doi: 10.1002/ana.24751.
- Wahner AD, Bronstein JM, Bordelon YM, Ritz B. Statin use and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 2008; 70(16 Pt 2): 1418–1422
- Lee YC, Lin CH, Wu RM, et al. Discontinuation of statin therapy associates with Parkinson disease: a population-based study. *Neurology* 2013; 81(5): 410–416. 26.
- Becker C, Jick SS, Meier CR. Use of statins and the risk of Parkinson's disease: a retrospective case-control study in the UK. *Drug Saf* 2008; 31(5): 399–407.
- Ritz B, Manthripragada AD, Qian L, et al. Statin use and Parkinson's disease in Denmark. *Mov Disord* 2010; 25(9): 1210–1216.
- Samii A, Carleton BC, Etminan M. Statin use and the risk of Parkinson disease: a nested case control study. *J Clin Neurosci* 2008; 15(11): 1272–1273. 29.
- Gao X, Simon KC, Schwarzschild MA, Ascherio A. Prospective study of statin use and risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 2012; 69(3): 380–384.
- Ng YF, Ng E, Lim EW, Prakash KM, Tan LCS, Tan EK. Case-control study of hypertension and Parkinson's disease. *npj Parkinson's Disease*.2021;7:63. <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00202-w>
- Williams D, Bandres-Ciga S, Heilbron K, Hinds D, Noyce AJ, et al. Evaluation lipid-lowering drug targets for Parkinson's disease prevention with mendelian randomization. *Ann Neurol*. 2020; 88: 1043-7

Liu G, Shi M, Mosley JD, Weng C, Zhang Y, Lee M, et al. A mendelian randomization approach using 3-HMG-Coenzyme-A reductase gene variation to evaluate the association of statin-induced low-density lipoprotein cholesterol lowering with noncardiovascular disease phenotypes. *JAMA Network Open*. 2021;4(6):e2112820. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.12820

Sheng Z, Jia X, Kang M. Statin use and risk of Parkinson's disease: A meta-analysis. *Behav Brain Res*. 2016;309:29-34. doi: 10.1016/j.bbr.2016.04.046.

Bai S, Song Y, Huang X, Peng L, Jia J, Liu Y, Lu H. Statin Use and the Risk of Parkinson's Disease: An Updated Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(3):e0152564. doi: 10.1371/journal.pone.0152564.

Liu G, Sterling NW, Kong L, Lewis MM, Mailman RB, Chen H, Leslie D, Huang X. Statins may facilitate Parkinson's disease: Insight gained from a large, national claims database. *Mov Disord*. 2017 Jun;32(6):913-917. doi: 10.1002/mds.27006.

Huang X, Alonso A, Guo X, Umbach DM, Lichtenstein ML, Ballantyne CM, Mailman RB, Mosley TH, Chen H. Statins, plasma cholesterol, and risk of Parkinson's disease: a prospective study. *Mov Disord*. 2015 Apr;30(4):552-9. doi: 10.1002/mds.26152

Jeong SM, Jang W, Shin DW. Association of statin use with Parkinson's disease: Dose-response relationship. *Mov Disord*. 2019 Jul;34(7):1014-21. doi: 10.1002/mds.27681.

Bykov K, Yoshida K, Weisskopf MG, Gagne JJ. Confounding of the association between statins and Parkinson disease: systematic review and meta-analysis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2017;26(3):294-300. doi: 10.1002/pds.4079.

Lee DY, Oh M, Kim SJ, Oh JS, Chung SJ, Kim JS. Bilirubin-Related Differential Striatal [18F]FP-CIT Uptake in Parkinson Disease. *Clin Nucl Med*. 2019;44(11):855-859. doi: 10.1097/RLU.0000000000002749.

Jin JN, Liu X, Li MJ, Bai XL, Xie AM. Association between serum bilirubin concentration and Parkinson's disease: a meta-analysis. *Chin Med J (Engl)*. 2020; 134(6):655-61. doi: 10.1097/CM9.0000000000001300.

Si Z, Wang X. The neuroprotective and neurodegeneration effects of heme oxygenase-1 in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2020;78(4):1259-72. doi: 10.3233/JAD-200720.