



TESIS DOCTORAL

Estudio de la respuesta inmune periférica
en la enfermedad de Parkinson

Autora

Laura Muñoz Delgado

Director

Pablo Mir Rivera

Universidad de Sevilla, Facultad de Medicina, Departamento de Medicina

Marzo 2023

Tesis doctoral presentada 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 de la tesis doctoral titulada “Estudio de la respuesta inmune periférica en la enfermedad de Parkinson” elaborada por Laura Muñoz Delgado, graduada 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, a 8 de marzo de 2023.

Fdo: D. Pablo Mir Rivera

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis y mentor, Pablo Mir. Aún recuerdo su prudencia cuando aparecí de R1, ávida por sumergirme en los trastornos del movimiento y de la investigación... Y aquí estamos casi seis años después. Gracias por apoyarme y ayudarme a construir las alas para volar en el mundo de los trastornos del movimiento, y sobre todo gracias por enseñarme a disfrutar del vuelo.

Mis agradecimientos también se extienden a todo el laboratorio 104, me siento muy afortunada de estar rodeada de personas de tan alto valor tanto personal como profesional. Gracias a Piluca y a Tere por enseñarme con tanta paciencia los apasionantes entresijos de la genética. Gracias a Juanfran, Michel, Jesús y Miguel por sus sabios y valiosos consejos, y a que no solo importa el valor p. También a Ana María, Cris, Lorena, Marta, Loli y Rocío, gracias por vuestra alegría y calidez en el laboratorio. Gracias a todos los que formáis parte de la familia del IBiS, por hacer tan acogedor un instituto de investigación.

A mis compañeros y amigos los neurólogos, por hacer del hospital mi segunda (o primera) casa. Especial mención al equipo Trastornos: Fátima, Silvia, Astrid y Dani, gracias por acogerme y por transmitirme vuestra infinita sabiduría. Yo de mayor quiero ser como vosotros. Especial reconocimiento merece Raquel por haber sido mi arcoíris todos estos años, siempre miro mi codo izquierdo cuando necesito un empujoncito para seguir. A Pablito y a Blanca, los culpables de que estemos hoy aquí por no conseguir espantarme el día 0 en el que empezó esta tesis doctoral. A Leire y a Bea, mis mayores, mi ejemplo a seguir. Irene y Lucía, mis tutoras, que suerte haberos tenido de guías en el camino. Quisiera agradecer a todos y cada uno de los neurólogos que durante la residencia me han enseñado a ser la neuróloga que soy ahora.

Thanks to my Mediterranean team in the UCL, thanks to you the sun shines in London.

A mis eternas amigas y compañeras de viaje, no importa cuantos kilómetros nos separen, ellas siempre están a mi lado. A Silvia, mi gran pilar, le agradezco infinitamente soportarme desde los 3 años, que no es tarea fácil. Soy inmensamente afortunada por haber crecido juntas de la mano. A Carla y a Anna, gracias por estar, por ser una inspiración de que hay que mirar de cara a la vida, ponernos los tacones, y salir a bailar, siempre.

A Joaquín, gracias por tu amor y tu apoyo incondicional, por tu infinita paciencia, por saber sacarme siempre una sonrisa y por animarme siempre a seguir. Gracias de todo corazón por ser "coautor" de esta tesis doctoral, y, ojalá, del resto de mi vida.

Finalmente, mi mayor agradecimiento va destinado a mis padres y a mi enano. Gracias por estar presente no solo en esta etapa tan importante, sino en todo momento. Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, por siempre confiar y creer en mí, y a hacer todo lo posible porque mis sueños se hicieran realidad. Gracias a vosotros, cumplo esta gran meta.

Gracias a todos por acompañarme en esta tesis doctoral, y por disfrutarla conmigo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Epidemiología y perspectiva histórica	3
1.2. Clínica de la EP	4
1.3. Hallazgos anatomopatológicos en la EP	7
1.4. Patogenia de la EP	10
1.5. Etiología de la EP	11
1.5.1. Factores genéticos	11
1.5.1.1. EP familiar	12
1.5.1.2. Factores de riesgo genéticos en la EP	16
1.5.2. Factores medioambientales	18
1.6. Mecanismos fisiopatológicos	19
1.6.1. Agregación de α -sinucleína	20
1.6.2. Disfunción mitocondrial	20
1.6.3. Estrés oxidativo	21
1.6.4. Alteración de la autofagia y sistema lisosomal	21
1.6.5. Inflamación	22
2. HIPÓTESIS / HYPOTHESIS	29
3. OBJETIVOS / OBJECTIVES	33
4. METODOLOGÍA	37
4.1. Material y métodos comunes	37
4.2. Material y métodos específicos	39
4.2.1. Estudio 1. "Peripheral Immune Profile and Neutrophil-to-Lymphocyte ratio in Parkinson's disease"	39
4.2.2. Estudio 2. "Peripheral inflammatory immune response differs among sporadic and familial Parkinson's disease"	40
4.2.3. Estudio 3. "Peripheral inflammation is associated with dopaminergic degeneration in Parkinson's disease".	42

5. RESULTADOS	45
5.1. Resumen de resultados “Peripheral Immune Profile and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Parkinson’s disease”	45
5.2. Resumen de resultados “Peripheral inflammatory immune response differs among sporadic and familial Parkinson’s disease”	47
5.3. Resumen de resultados “Peripheral inflammation is associated with dopaminergic degeneration in Parkinson’s disease”	49
6. PUBLICACIONES	51
6.1. Publicación “Peripheral Immune Profile and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Parkinson’s disease”	53
6.2. Publicación “Peripheral inflammatory immune response differs among sporadic and familial Parkinson’s disease”	65
6.3. Publicación “Peripheral inflammation is associated with dopaminergic degeneration in Parkinson’s disease”	95
7. DISCUSIÓN	113
7.1. Perfil inmune periférico y la ratio neutrófilo-linfocito en la enfermedad de Parkinson	113
7.2. Relación de la respuesta inmune periférica con las características clínicas de la enfermedad de Parkinson	117
7.3. La respuesta inmune inflamatoria periférica difiere entre la enfermedad de Parkinson esporádica y familiar	118
7.4. La inflamación periférica se relaciona con la degeneración dopaminérgica en la enfermedad de Parkinson	122
7.5. Papel de la respuesta inmune inflamatoria periférica en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson	126
8. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	129
9. BIBLIOGRAFÍA	133

ABREVIATURAS

BDNF	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i> (Factor neurotrófico derivado del cerebro)
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CS	Controles sanos
DAT	Transportadores de dopamina
EG	Enfermedad de Gaucher
EP	Enfermedad de Parkinson
EP-GBA	Enfermedad de Parkinson asociada a mutaciones en el gen <i>GBA</i>
EP-LRRK2	Enfermedad de Parkinson asociada a mutaciones en el gen <i>LRRK2</i>
GBA	Glucocerebrosidasa (gen)
GCasa	β -Glucocerebrosidasa (enzima)
GWAS	<i>Genome Wide Association Study</i> (Estudio de asociación del genoma completo)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (antígeno leucocitario humano)
HY	Hoehn y Yahr
HUVR	Hospital Universitario Virgen del Rocío
IFN	Interferón
IL	Interleucina
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LEDD	Dosis equivalente diaria de levodopa
LRRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MAPT	<i>Microtubule Associated Protein Tau</i>
MOCA	Montreal Cognitive Assessment
MDS	Movement Disorder Society
MDS-UPDRS-III	MDS-Unified Parkinson's Disease Rating Scale parte III
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLR	<i>Neutrophil-to-lymphocyte ratio</i>
p	valor p de probabilidad
PCR	Proteína C reactiva

PD	Parkinson's disease
PET	<i>Positron Emission Tomography</i> (Tomografía por emisión de positrones)
PINK1	<i>PTEN Induced Kinase 1</i>
PPMI	<i>Parkinson's Progression Markers Initiative</i>
PRKN	<i>Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>
PRS	<i>Poligenic risk score</i> (Puntuación de riesgo poligénico)
r	Coeficiente de correlación parcial
REM	<i>Rapid Eye Movements</i>
RNL	Ratio neutrófilo-linfócito
NLR	Neutrophil-to-lymphocyte ratio
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (especies reactivas de oxígeno)
SNC	Sistema nervioso central
SNCA	α -sinucleína
SNpc	Sustancia negra pars compacta
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> (Tomografía computarizada por emisión de fotón único)
SUVR	<i>Standardized uptake value ratio</i> (Valor estandarizado de ratios de captación)
Th	<i>T helper</i> (T colaboradores)
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	T reguladores
UTM	Unidad de Trastornos del Movimiento

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología y perspectiva histórica

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente, después de la enfermedad de Alzheimer.

Según la Sociedad Española de Neurología, la prevalencia de la EP en España es aproximadamente un 0,3% en la población general, alcanza el 2% en mayores de 60 años y es superior al 4% en mayores de 80, con una incidencia de 8-18/100.000 personas/año. Según estos datos, se estima que en España hay aproximadamente 160.000 personas afectas por la enfermedad, aunque no existe un registro nacional de la misma. A nivel internacional, la Organización Mundial de la Salud publicó que en 2019 había aproximadamente 8,5 millones de personas afectas por la enfermedad. Por razones no del todo conocidas, la incidencia y prevalencia de la EP se han duplicado en los últimos 25 años y se cree que éstas puedan llegar a duplicarse de nuevo en las siguientes décadas (Dorsey et al., 2018; Bloem et al., 2021).

La EP es una enfermedad cuya incidencia y prevalencia aumentan con la edad, con una edad media de aparición en la sexta década de la vida. Sin embargo, no es una enfermedad exclusiva del envejecimiento. La edad de inicio es inferior a los 65 años en hasta un 25% de los pacientes e inferior a los 50 años en un 5-10%. Particularmente, si bien la enfermedad afecta a ambos sexos, la incidencia es mayor en varones que en mujeres (Jankovic et al., 2020; Bloem et al., 2021).

Por tanto, esta enfermedad neurodegenerativa causa un gran impacto en la calidad de vida del paciente y sus cuidadores, así como tiene un gran impacto socioeconómico a nivel mundial (GDB 2016 Neurology Collaborators, 2019).

La primera descripción clínica de la enfermedad fue realizada por James Parkinson en 1817 en su libro "An Essay on the Shaking Palsy", basándose en la observación clínica de pacientes con un síndrome de inicio insidioso y curso progresivo de temblor de reposo, postura en flexión y un trastorno de la marcha caracterizado por el arrastre de pies, pasos cortos y festinación (Parkinson, 2002). Desde inicios del siglo XX, se sabe que los

síntomas motores clásicos se deben a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del mesencéfalo y la subsecuente depleción de dopamina en los circuitos de los ganglios basales, como se explicará en detalle en el siguiente apartado. En 1967, llegó el gran avance terapéutico cuando George Cotzias introdujo la levodopa, precursor de la dopamina, como tratamiento de la enfermedad (Obeso et al., 2017). El objetivo de la levodopa es sustituir el déficit de dopamina intracerebral y con ello mejorar los síntomas y la calidad de vida de los pacientes. No obstante, a pesar de que la levodopa y otros avances terapéuticos posteriores han convertido a la EP en el primer ejemplo de enfermedad neurodegenerativa que puede tratarse y mejorar la calidad de vida de los pacientes hasta décadas después de su aparición; ninguno de estos tratamientos es curativo ni es capaz de detener la progresión de la neurodegeneración.

En conjunto, la prevalencia actual de la EP y el crecimiento estimado para las próximas décadas, así como el gran impacto personal y socioeconómico derivado, hace necesario perseverar en el estudio de su etiología y de los mecanismos fisiopatológicos implicados con el fin de identificar tratamientos modificadores de enfermedad y alcanzar una medicina personalizada.

1.2. CLÍNICA DE LA EP

Clínicamente, la EP se define por la presencia de parkinsonismo, que incluye los síntomas motores clásicos de la enfermedad: bradicinesia (lentitud y decremento del movimiento), acompañada de rigidez y/o temblor.

Los criterios diagnósticos actualmente aceptados son los publicados por la International Parkinson's and Movement Disorder Society (MDS) según los cuales el diagnóstico de la EP clínicamente establecida requiere la presencia de parkinsonismo y dos criterios de apoyo, así como la ausencia de criterios de exclusión sugerentes de otros parkinsonismos neurodegenerativos (Postuma et al., 2015). Más de 200 años después de la primera descripción por James Parkinson, el diagnóstico de la EP sigue siendo clínico. Hasta la fecha, no se disponen de biomarcadores diagnósticos definitivos y el diagnóstico definitivo de la EP solo puede confirmarse mediante una autopsia (Bloem et al., 2021).

La EP clínicamente manifiesta se precede de una larga fase prodrómica que puede iniciarse hasta en los 15-20 años previos a la aparición de los síntomas motores. En esta etapa no es posible el diagnóstico clínico basado en la presencia de parkinsonismo, pero sí que están presentes síntomas y/o signos indicativos de que la neurodegeneración ya ha comenzado. Estos síntomas son principalmente no motores, incluyendo la presencia de estreñimiento, hiposmia, trastorno de conducta del sueño REM (rapid-eye-movement, por sus siglas en inglés), o apatía, entre otros (Figura 1). En la actualidad, se han desarrollado unos criterios de investigación con tal de identificar a individuos en fases prodrómicas de la enfermedad (Berg et al., 2015; Heinzl et al., 2019). En estos criterios se define una probabilidad basal previa estimada según la edad (a más edad, más probabilidad; dado que ésta es el principal factor de riesgo para la EP). Posteriormente, la probabilidad de EP prodrómica se calcula mediante la combinación de ratios de probabilidad procedentes de biomarcadores de riesgo (factores de riesgo para la EP, como exposición a pesticidas o presencia de mutaciones en genes asociados a la EP) y de biomarcadores prodrómicos (síntomas y signos clínicos no-motores, motores y biomarcadores de neuroimagen que indican la existencia de neurodegeneración). En los últimos años, se está llevando a cabo mucha investigación para identificar otros biomarcadores bioquímicos, moleculares o de neuroimagen que permitan identificar a pacientes en fase prodrómica. La importancia de esto radica en que permitirá ahondar en la fisiopatología de la EP en sus fases iniciales y en que probablemente esta fase sea la adecuada para aplicar futuras terapias modificadoras del curso de la enfermedad, que podrían retrasar o incluso evitar la progresión a EP clínicamente establecida.

Tras el inicio de los síntomas motores cardinales de la EP, característicamente los pacientes presentan una fase llamada de luna de miel, en la cual los síntomas motores presentan buena respuesta al tratamiento. Sin embargo, a medida que progresa la enfermedad, el escenario clínico se vuelve más complejo (Figura 1). Con la evolución, los pacientes desarrollan complicaciones motoras relacionadas con la levodopa, así como surgen síntomas motores probablemente no relacionados con el déficit dopaminérgico (como problemas del habla, disfagia, congelamientos de la marcha o caídas). Paralelamente, la EP también se asocia con una variedad de síntomas no motores, como

alteraciones urinarias, depresión, hipotensión ortostática, alteraciones del sueño y/o deterioro cognitivo, entre otros, que repercuten de igual forma en la calidad de vida del paciente (Poewe et al., 2017; Tolosa et al., 2021; Bloem et al., 2021).

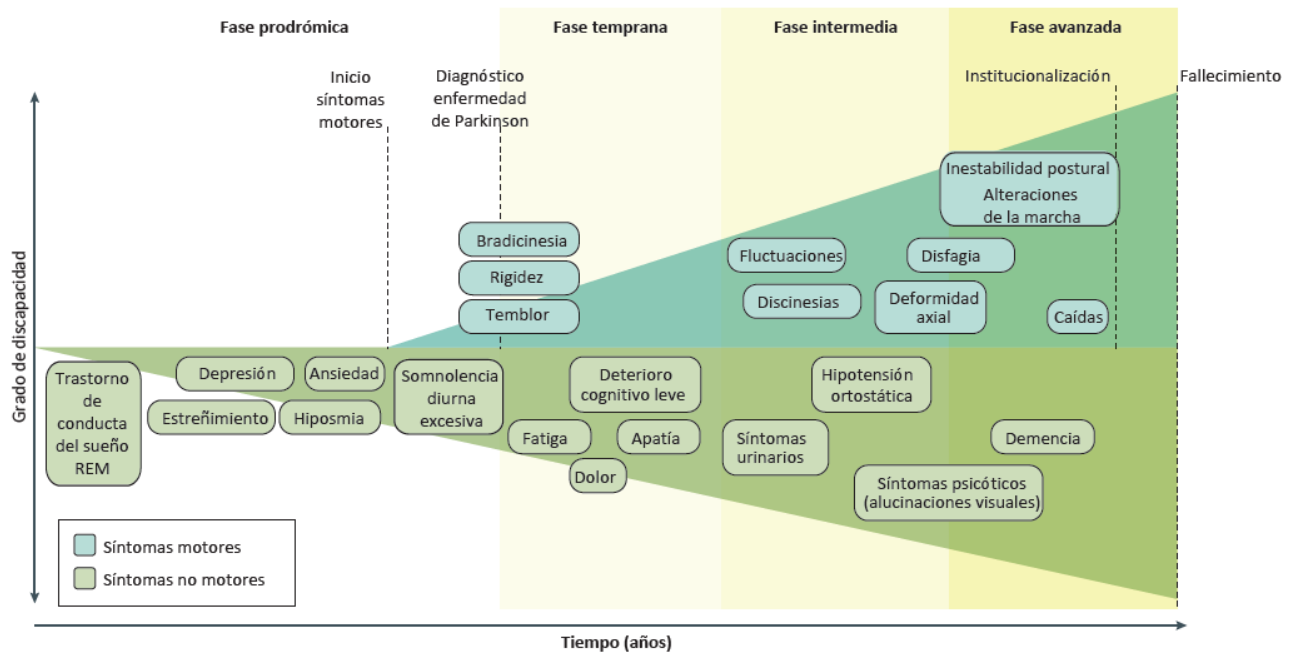


Figura 1. Síntomas y progresión clínica asociada a la EP (Adaptada de Poewe et al., 2017)

El espectro clínico y el curso de la enfermedad varían enormemente entre pacientes individuales. Algunos pacientes tienen una enfermedad de curso más benigno con una respuesta sostenida a la levodopa y escasos síntomas no-dopaminérgicos, mientras que otros pacientes muestran un curso más agresivo con un predominio temprano de síntomas no motores y desarrollo de deterioro cognitivo y demencia (Obeso et al., 2017).

Esta heterogeneidad clínica en la edad de inicio, la ratio de progresión y/o la presencia variable de síntomas motores y no motores sugiere la presencia de distintos subtipos biológicos y probablemente distintos mecanismos etiológicos y fisiopatológicos subyacentes implicados. Por ello, es de nuevo mandatorio la investigación en la etiopatogenia de la EP, y en biomarcadores para caracterizar o mejorar la subclasificación de los pacientes según mecanismos biológicos.

Un biomarcador es una característica definida y medible que actúa como indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas a intervenciones (Biomarkers Definitions Working Group 2001). Se pueden identificar distintos tipos de biomarcadores, por ejemplo, de riesgo de susceptibilidad (indica el potencial de desarrollar la enfermedad en un individuo sano), de diagnóstico (detecta o confirma enfermedad, o identifica individuos con un subtipo de enfermedad), o pronósticos (identifica la probabilidad de un evento en pacientes con una enfermedad), entre otros. La fuente de biomarcadores es amplia, incluyendo clínicos, imagen, bioquímicos, moleculares, y/o genéticos, entre ellos.

Con el fin de avanzar en la investigación y el conocimiento sobre la EP, han surgido distintas iniciativas y colaboraciones internacionales. Su objetivo es construir grandes biobancos a disposición de la comunidad investigadora para estudiar y caracterizar exhaustivamente a los pacientes y promover el descubrimiento y la validación de biomarcadores en la EP. Por ejemplo, entre ellas se encuentra la “Parkinson’s Progression Markers Initiative” (PPMI, por sus siglas en inglés), que es una cohorte internacional, multicéntrica, prospectiva y longitudinal que recoge biomarcadores clínicos, bioquímicos, genéticos y de neuroimagen.

A medida que se avance en el conocimiento de la etiopatogenia y en la identificación de biomarcadores, se espera tener una mejor comprensión de los motivos subyacentes en la heterogeneidad clínica de la enfermedad, y probablemente permitirá identificar estrategias modificadoras del curso de la enfermedad y aplicar la medicina personalizada.

1.3. Hallazgos anatomopatológicos en la EP

Como se introducía previamente, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNpc) en el mesencéfalo es el hallazgo anatomopatológico principal en todos los pacientes con EP (Obeso et al., 2017). La mayor parte de esta degeneración ocurriría de forma exponencial principalmente en estadios tempranos de la enfermedad y probablemente incluso en fases prodrómicas (Nandhagopal et al., 2009; Dijkstra et al., 2014). No es hasta que se han perdido al

menos un 30-50% de las neuronas dopaminérgicas y cerca del 80% de la dopamina a nivel del núcleo estriado, cuando aparecen los síntomas motores cardinales de la enfermedad (Obeso et al., 2017; Zaman et al., 2021).

Si bien la EP es una enfermedad neurodegenerativa compleja, los síntomas motores cardinales de la enfermedad son consecuencia de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la parte dorsolateral de la SNpc y el déficit de dopamina consecuente en la vía nigroestriatal. La vía nigroestriatal es la proyección de las neuronas dopaminérgicas al núcleo estriado (formado por el caudado y el putamen) el cual forma parte de los circuitos motores que involucran principalmente a las áreas motoras precentrales, entre otras vías (DeLong et al., 2007; Obeso et al., 2017).

La degeneración dopaminérgica puede ser evaluada in vivo utilizando la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) [¹²³I]FP-CIT, una técnica de medicina nuclear que permite medir la densidad de transportadores de dopamina (DAT, por sus siglas en inglés) (Obeso et al., 2017; Saeed et al., 2017). Los DAT están presentes en las terminales presinápticas de las neuronas dopaminérgicas en el estriado. Por tanto, la pérdida de las neuronas dopaminérgicas se traduce en menores niveles de DAT en el estriado y una menor captación en el SPECT [¹²³I]FP-CIT. En la EP, esta técnica muestra un patrón característico de hipocaptación con un gradiente rostro-caudal y una mayor afectación de la parte posterior del putamen. Además, los niveles de captación de DAT en el SPECT [¹²³I]FP-CIT pueden ser cuantificados usando métodos validados de neuroimagen automatizados o semiautomatizados (Tziortzi et al., 2011; Saeed et al., 2017; Labrador-Espinosa et al., 2021). En el diagnóstico de la EP clínicamente establecida, esta prueba de imagen no es imprescindible en el diagnóstico, pero su normalidad sí excluye el diagnóstico de EP (Postuma et al., 2015). Por otro lado, la degeneración dopaminérgica medida por SPECT [¹²³I]FP-CIT sí forma parte de los criterios diagnósticos de la EP en fase prodrómica siendo el segundo marcador prodrómico con mayor valor predictivo para la EP tras la presencia de trastorno de conducta del sueño REM (Heinzel et al., 2019).

Es importante mencionar que la patología en la EP no se limita a la degeneración de la SNpc y al déficit consecuente de dopamina; si no que también afecta a otras estructuras intracerebrales, y a otras vías y neurotransmisores. La implicación de vías serotoninérgicas, glutamatérgicas o noradrenérgicas, entre otras, se han asociado a gran parte de los síntomas no motores de la enfermedad, y requieren otras aproximaciones específicas (Jankovic et al., 2020).

En segundo lugar, el segundo marcador diagnóstico de la EP es la presencia de inclusiones proteicas llamadas cuerpos de Lewy presentes al menos en la SNpc, cuyo componente principal es la proteína α -sinucleína agregada. En 2003, Braak y colaboradores introdujeron la hipótesis de la progresión temporal y espacial de la agregación de la α -sinucleína en la EP (Braak et al., 2003). Según esta hipótesis, la patología de la EP empezaría en la periferia, en el sistema nervioso entérico, y luego seguiría una progresión caudo-rostral afectando primero a núcleos de nervios vago y glossofaríngeo localizados en la parte inferior del tronco del encéfalo y al bulbo olfatorio (estadios I y II de Braak), posteriormente a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc del mesencéfalo (estadios III y IV de Braak) y finalmente con la progresión de la enfermedad alcanzaría regiones cerebrales límbicas y neocorticales (estadios V y VI de Braak). Esta hipótesis se sustenta también en que síntomas como el estreñimiento o la alteración del olfato a menudo preceden la aparición de los síntomas motores de la EP incluso décadas antes. Profundizando en esta hipótesis, es de creciente interés el eje intestino-cerebro, el cual engloba la comunicación bidireccional entre el SNC y el sistema entérico, y la regulación de las respuestas inmunes entre intestino y cerebro (Houser et al., 2017). Se hipotetiza que en la EP pudiera haber un agente desencadenante inicial a nivel periférico que indujera un daño e inflamación en el intestino. Si esta respuesta inmune no es controlada, podría conllevar cambios en la permeabilidad intestinal, liberación de mediadores inflamatorios desde el intestino y un incremento de los niveles de α -sinucleína. La sobreexpresión de α -sinucleína a su vez promovería su agregación y el mantenimiento de las respuestas proinflamatorias a nivel sistémico, y podría alterar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica favoreciendo el flujo de α -sinucleína y moléculas inflamatorias al SNC (Houser et al., 2017). En línea con estas hipótesis, se han encontrado mayores niveles de marcadores inflamatorios en las heces de pacientes con

EP comparado con controles sanos (CS), y los niveles de algunas de estas moléculas se han asociado inversamente a la edad de inicio de los síntomas de la EP, sugiriendo que pudieran contribuir al desarrollo de la EP (Tansey et al., 2022).

Recientemente, un estudio realizado en monos demostró que al inyectar α -sinucleína procedente de pacientes con EP tanto en el estriado como a nivel entérico, ésta era capaz de inducir lesiones y degeneración tanto en el SNC como en el sistema nervioso entérico (Arotcarena et al., 2020). Este hallazgo sugirió que la progresión de patología α -sinucleína podría ser tanto caudo-rostral como rostro-caudal, variando entre pacientes y subtipos de enfermedad. Otra observación importante fue, que en contra de lo anteriormente observado por Braak, no se encontraron depósitos de α -sinucleína en el nervio vago, por lo que sugerían un posible mecanismo sistémico en el cual la circulación general actuaría como una ruta para la transmisión bidireccional a larga distancia de la α -sinucleína entre el sistema nervioso entérico y el SNC.

Si bien se desconocen gran parte de los complejos mecanismos implicados, la evidencia actual apunta a una clara interacción entre el sistema nervioso central y la periferia.

1.4. Patogenia de la EP

La etiología de la EP es probablemente multifactorial, siendo el resultado de una combinación variable de factores genéticos y medioambientales, junto con el envejecimiento como principal factor de riesgo para el desarrollo de EP.

Esta combinación de factores desencadena distintos procesos fisiopatológicos a nivel celular y molecular (agregación de α -sinucleína, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, inflamación...) que culminarían finalmente en la muerte neuronal (Figura 2) (Obeso et al., 2017; Jankovic et al., 2020; Bloem et al., 2021; Mamais et al., 2022).

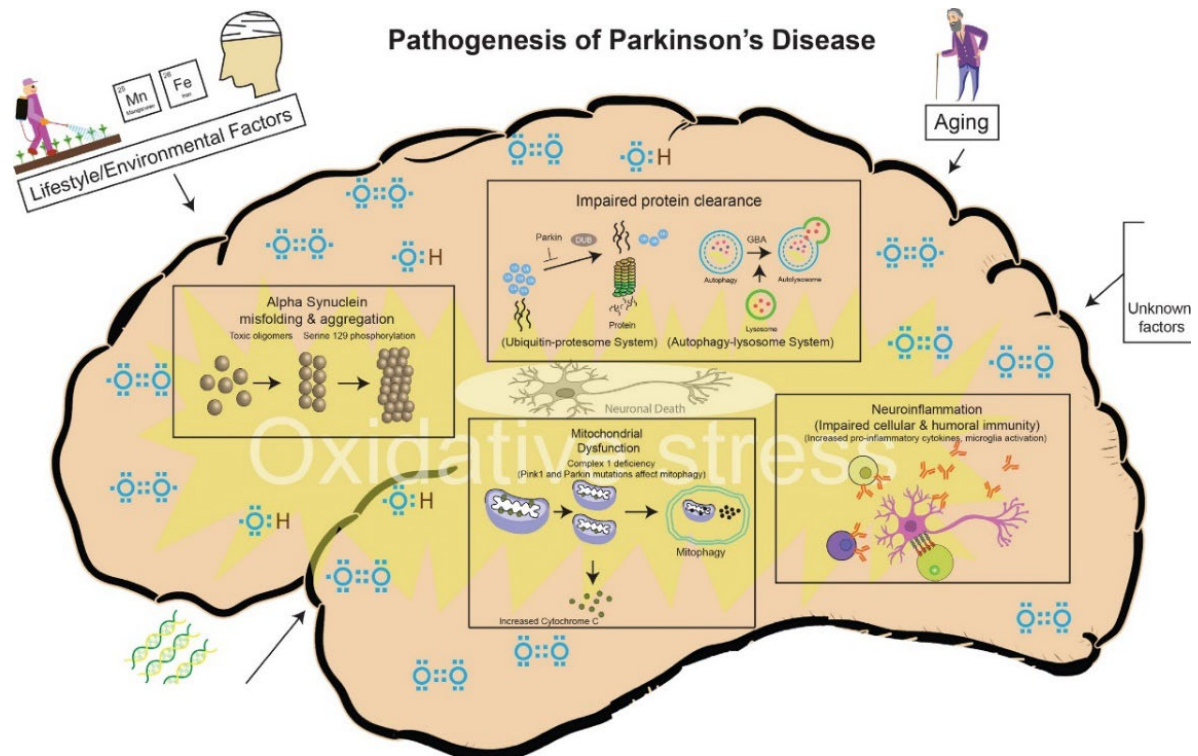


Figura 2. Patogenia de la EP. (Figura tomada de Jankovic et al., 2020).

A continuación, se describirán los distintos factores etiológicos y fisiopatológicos implicados en la EP.

1.5. Etiología de la EP

1.5.1. Factores genéticos

Tradicionalmente, la EP era considerada como una enfermedad idiopática en que la edad y los factores ambientales eran los principales factores de riesgo. Sin embargo, esta visión de la enfermedad ha ido cambiando desde la década de los noventa gracias al estudio de familias con varios miembros afectados de EP (Lunati et al., 2018, Bandres-Ciga et al., 2020; Mamais et al., 2022).

La evidencia actual indica que la EP es una enfermedad poligénica compleja. Si bien la mayoría de los pacientes presentan una EP esporádica donde los factores genéticos actúan de forma sinérgica con los factores medioambientales, aproximadamente un 15% de los pacientes presentan una historia familiar de EP, de los cuales el 5-10% siguen

una herencia mendeliana clásica (EP familiar o monogénica). En este sentido, las variantes en los genes asociados a la EP pueden clasificarse en dos tipos. Primero, variantes poco frecuentes en la población en genes responsables de la EP familiar con herencia mendeliana, donde la presencia de la variante es suficiente para causar la enfermedad. Segundo, variantes de riesgo comunes en la población que aumentan la susceptibilidad a la EP, pero con un tamaño de efecto de moderado a débil a nivel individual, que se identifican principalmente en la EP esporádica (Bandres-Ciga et al., 2020; Blauwendraat et al., 2020).

Para complicar esta diferenciación dicotómica simplificada, debe señalarse que las formas autosómicas dominantes de la EP familiar tienen penetrancia incompleta edad-dependiente, que a su misma vez puede depender de la interacción con variantes de riesgo (Jia et al., 2022).

1.5.1.1. EP familiar

Las formas familiares o monogénicas suponen una minoría dentro de la EP, pero son importantes por distintos motivos: 1) en casos seleccionados, pueden establecer un diagnóstico definitivo de un tipo particular de EP, 2) tienen implicación en el consejo genético a familiares, 3) brindan una oportunidad para mejorar nuestro conocimiento de la fisiopatología de la EP permitiendo identificar y estudiar en que vías celulares específicas están implicados estos genes, y 4) las formas monogénicas de la EP podrían ser subsidiarias a tratamientos específicos dirigidos a genes concretos, siendo un ejemplo de medicina personalizada (Bloem et al., 2021).

En la actualidad, se han descrito variantes patogénicas asociadas a la EP familiar en más de 20 genes, la mayoría de las cuales son altamente penetrantes (Blauwendraat et al., 2020). La implicación de algunos de estos genes en la EP es aún objeto de debate debido a que no se disponen de estudios de replicación y/o validación funcional hasta la fecha.

A continuación, se describirán las formas de EP familiar más frecuentes y estudiadas, los fenotipos clínicos asociados y los posibles mecanismos fisiopatológicos implicados.

a. EP familiar con herencia autosómica dominante:

- Gen *SNCA* (α -sinucleína)

El primer gen identificado responsable de la EP familiar fue el gen *SNCA* en 1997, que codifica la proteína α -sinucleína (Polymeropoulos et al., 1997). Actualmente, las mutaciones del gen *SNCA* son una causa rara de EP ya que son poco frecuentes.

En conjunto, los pacientes con mutaciones en el gen *SNCA* presentan una edad de inicio más temprana. Se han descrito mutaciones sin sentido o variaciones en el número de copias (duplicaciones y triplicaciones). Se ha demostrado que existe un efecto de dosis génica, de tal manera que los pacientes portadores de duplicaciones desarrollan la EP una década más tarde en comparación a los portadores de triplicaciones (Ibañez et al., 2009). Igualmente, las triplicaciones del gen *SNCA* se asocian a una mayor severidad motora y deterioro cognitivo (Jia et al., 2022).

La α -sinucleína es una proteína pequeña que parece estar implicada en el tráfico de vesículas, la fusión de vesículas-membranas, la liberación de neurotransmisores y el transporte axonal, pero su función en el cerebro normal no es del todo conocida (Jankovic et al., 2020). En la EP, la α -sinucleína agregada es el principal componente de los cuerpos de Lewy, hallazgo anatomopatológico característico de la enfermedad, y se ha demostrado que tiene un papel principal en la enfermedad, como se detallará posteriormente.

- Gen *LRRK2* (*Leucine-rich repeat kinase 2*)

Las mutaciones en el gen *LRRK2*, que codifica la proteína LRRK2 o dardarina, son la forma más frecuente de EP familiar con herencia autosómica dominante, responsable aproximadamente de entre 3-41% de los casos familiares.

El fenotipo clínico es casi indistinguible de la EP esporádica, aunque en conjunto tienen una edad de inicio ligeramente menor y un curso clínico más benigno. Asimismo, tienen una menor prevalencia de síntomas no motores como hiposmia, trastorno de conducta del sueño REM o deterioro cognitivo (Tönges et al., 2022).

Hasta la fecha, se han identificado más de 100 variantes sin sentido y con cambio de sentido, de las cuales 7 se han considerado causativas de EP familiar, siendo la p.Gly2019Ser la más prevalente. Esta mutación tiene un efecto fundador en la población

de judíos Askenazi y arábigos del Norte de África, y su frecuencia varía según las poblaciones estudiadas. La penetrancia es incompleta (del 3-42%), lo que significa que muchos portadores nunca desarrollarán la enfermedad, y está influida por la edad, el ambiente y otros factores genéticos. Además, también se han identificado variantes comunes en la población que incrementan el riesgo en la EP esporádica (Bloem et al., 2021; Jia et al., 2022).

La función de la proteína LRRK2 no se comprende del todo, ni las interacciones y los mecanismos fisiopatológicos por los que su alteración conduce a la EP. Fisiológicamente, se sabe que está implicada en el tráfico de vesículas, la autofagia, la síntesis proteica y la función del citoesqueleto (Jankovic et al., 2020). Además, LRRK2 forma parte de la familia de quinasas de interacción con receptor (RIP, por sus siglas en inglés) que es un grupo de proteínas que detectan y responden al estrés celular regulando la muerte celular y activando el sistema inmune (Tansey et al., 2022). Es en su dominio quinasa donde habitualmente se encuentran las mutaciones patogénicas, y se sugiere una ganancia de función como posible mecanismo subyacente. La hiperactivación de este dominio por mutaciones en *LRRK2* se ha asociado a degeneración de la vía nigroestriatal y a la agregación y propagación de la α -sinucleína (Tsika et al., 2015, O'Hara et al., 2020). Se han propuesto distintas vías metabólicas implicadas en la fisiopatología de la EP, como la alteración del metabolismo lipídico (Macías-García et al., 2022) o la regulación de las respuestas inmunes y la inflamación. En concreto, LRRK2 está altamente regulado y expresado en células del sistema inmune y una sobrerregulación de sus niveles se ha descrito en respuesta a estímulos proinflamatorios (Mamais et al., 2022; Tönges et al., 2022). Cook y colaboradores describieron que los niveles de LRRK2 están aumentados en células inmunes de pacientes con EP esporádica (Cook et al., 2017). Además, la toxicidad de LRRK2, tanto in vitro como in vivo, se atenúa tras la inhibición farmacológica de la quinasa de LRRK2.

Paralelamente, variantes en el gen *LRRK2* también se han asociado a un mayor riesgo de enfermedades inflamatorias intestinales como la enfermedad de Crohn o mayor susceptibilidad a infecciones, apoyando la asociación de este gen con el sistema inmune. Todo ello, en conjunto, sugiere una estrecha relación entre *LRRK2* y la inflamación y apoya un papel importante de ambos en la EP (Tansey et al., 2022).

b. EP familiar con herencia autosómica recesiva:

- Gen *PRKN*

Las mutaciones bialélicas en el gen *PRKN*, que codifica la proteína parkina, suponen hasta el 10-20% de la EP de inicio temprano y 77% de los casos de EP juvenil. Clínicamente, se caracteriza por presentar distonía en miembros inferiores como síntoma de presentación y un curso lentamente progresivo con buena respuesta al tratamiento dopaminérgico y de forma sostenida en el tiempo. En estos pacientes, las complicaciones motoras como fluctuaciones motoras y discinesias son frecuentes, pero es infrecuente el desarrollo de deterioro cognitivo (Bloem et al., 2021).

Hasta la fecha, se han descrito más de 130 variaciones en este gen que consisten en variantes del número de copias (deleciones o duplicaciones de exones), pequeñas deleciones o inserciones o cambios de un único nucleótido. El efecto patogénico de estas mutaciones supone una pérdida de función de la proteína. Parkina es una proteína implicada en la regulación de la mitofagia mediada por parkina/PINK1, que es la degradación selectiva de las mitocondrias dañadas y por tanto protege a la célula del estrés mitocondrial. En esta línea, distintos estudios muestran que en ausencia de parkina, el estrés mitocondrial activa la inmunidad innata y produce la liberación de mediadores inflamatorios (Sliter et al., 2018; Kline et al., 2020).

- Gen *PINK1*

Mutaciones en el gen *PINK1*, que codifica para la proteína quinasa PTEN1, representan la segunda causa de EP de herencia autosómica recesiva y se encuentran en aproximadamente un 9% de los pacientes con EP de inicio temprano. El fenotipo clínico es similar a los pacientes con EP y mutaciones en el gen *PRKN*, aunque presentan con más frecuencia síntomas neuropsiquiátricos (Tönges et al., 2022).

Se han identificado más de 60 mutaciones sin sentido o con cambio de sentido, que se han relacionado principalmente con disminución y pérdida de función de la proteína (Mamais et al., 2022). PINK1 también está implicada en la regulación de la mitofagia mediada por parkina/PINK1. Es una quinasa presente en la superficie de las mitocondrias dañadas donde fosforila tanto a parkina como a ubiquitina, promoviendo la mitofagia (Kline et al., 2020).

1.5.1.2. Factores de riesgo genéticos en la EP

Gracias a los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés), se han identificado variantes en genes que son comunes en la población y que confieren un riesgo incrementado de padecer EP. En 2009, se publicaron los primeros GWAS en los que se identificaron a los loci *SNCA* y *MAPT* (microtubule associated protein tau, por sus siglas en inglés) como los principales factores de riesgo de la EP (Satake et al., 2009; Simón-Sánchez et al., 2009). Desde entonces, se han realizado números estudios GWAS con un número creciente de individuos procedentes de distintas poblaciones, identificando múltiples variantes de riesgo en otros genes como el gen *LRRK2*. Recientemente, el mayor metaGWAS realizado en EP, que incluyó alrededor de 37.000 casos, 18.600 casos “proxy” (sujetos sanos sin enfermedad, pero con un familiar de primer grado con EP) y 1,4 millones de controles, logró identificar 90 variantes de riesgo independientes asociadas con la EP esporádica (Nalls et al., 2019). Los loci identificados mediante estudios GWAS confieren un riesgo relativamente pequeño para la EP, pero se ha evidenciado que su presencia puede, de forma aditiva, aumentar el riesgo de sufrir EP. Por ello, se ha propuesto el uso de una puntuación de riesgo poligénico (PRS, por sus siglas en inglés) que permite sumar el riesgo genético global para el individuo; dicho PRS se ha categorizado en tres niveles aportando, según el número de variantes que porta la persona, un riesgo diferente de padecer EP. Análisis posteriores estimaron que estas variantes de riesgo podrían explicar aproximadamente un 16-36% del riesgo genético en la EP, mostrando también que aún hay un considerable componente genético de la enfermedad sin identificar (Nalls et al., 2019).

El estudio de las vías celulares en las que se encuentran o actúan estos genes candidatos supone una oportunidad para avanzar en el conocimiento de la patogénia de la EP. Las vías biológicas identificadas que se encuentran principalmente implicadas incluyen la transmisión sináptica, el plegamiento de proteínas, la disfunción lisosomal, la homeostasis mitocondrial y la respuesta inmune (Bandres-Ciga et al., 2020). Asimismo, Witoelar y colaboradores encontraron que varias variantes genéticas de riesgo eran compartidas entre la EP y otras enfermedades autoinmunes e inflamatorias, exponiendo la influencia del sistema inmune en la patogénesis de la EP (Witoelar et al., 2017).

- Gen *GBA*

El gen *GBA1* o *GBA* codifica para la enzima glucocerebrosidasa (Gcasa), una enzima lisosomal implicada en el metabolismo de los glicolípidos.

Las mutaciones bialélicas en el gen *GBA* se asocian a la enfermedad de Gaucher (EG), mientras que las mutaciones en heterocigosis suponen el mayor factor de riesgo genético para la EP (multiplicando su riesgo por 5). La asociación entre este gen y la EP se describió gracias a la observación de una mayor incidencia de EP en los familiares con EG, así como a la presencia de síntomas parkinsonianos en los pacientes con EG (Neudorfer et al., 1996). La prevalencia de variantes en el gen *GBA* en pacientes con EP puede variar entre un 5-20% según la población estudiada (Parlar et al., 2023; Jia et al., 2022). Su penetrancia es variable y oscila entre el 10-30%. De forma muy interesante, el riesgo y el fenotipo clínico parece estar asociado con el tipo de variante en el gen *GBA*. Actualmente, la clasificación de las variantes en *GBA* en la EP se realiza según el tipo de EG que produce la variante en un estado de homocigosis. De tal manera que variantes causantes de EG tipo 1 (forma no neuropática) se clasifican como leves, variantes causantes de EG tipo 2 y 3 (formas neuropáticas) se clasifican en severas, y aquellas variantes que no causan EG, pero sí se asocian con un aumento de riesgo de EP se clasifican como factores de riesgo (Parlar et al., 2023). Los tipos de variantes en *GBA* también tienen diferentes efectos en la progresión clínica: los portadores de mutaciones severas presentan una mayor severidad motora, mayor deterioro cognitivo y más síntomas psiquiátricos en comparación a pacientes con EP portadores de variantes en *GBA* leves o EP esporádica sin variantes en *GBA* (Jesús et al., 2016; Thaler et al., 2018). El principal mecanismo fisiopatológico asociado a las mutaciones en el gen *GBA* es la pérdida o disminución de la actividad de la enzima lisosomal Gcasa, conllevando una disfunción lisosomal y de la autofagia, y por consiguiente la acumulación anormal de sus sustratos, entre los que se encontrarían lípidos y también la α -sinucleína patogénica (Alcalay et al., 2015). Al mismo tiempo, niveles elevados de α -sinucleína también pueden inhibir la actividad de la Gcasa, retroalimentándose entre ellas (Granek et al., 2023). La disfunción de la Gcasa y la acumulación de sus sustratos pueden inducir estrés oxidativo en la célula y causar daño mitocondrial, así como provocar la liberación de mediadores inflamatorios (Miliukhina et al., 2020; Jia et al., 2022; Mamais et al., 2022). Por ejemplo, se ha descrito que pacientes con EP y mutaciones en el gen *GBA* muestran niveles más

elevados de citoquinas proinflamatorias en comparación a pacientes sin mutaciones en *GBA* (Chahine et al., 2013). Pese a todo, hay mucha controversia de resultados entre estudios, probablemente debido a la heterogeneidad de las poblaciones o variantes de *GBA* incluidas en ellos, o a la contaminación de los datos con los provenientes de un pseudogen existente que presenta una altísima similitud con el gen.

- Gen *HLA* (*human leukocyte antigen*)

La presentación de antígenos en el sistema inmune se produce gracias a las proteínas del sistema HLA (antígeno leucocitario humano), también llamado complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Las moléculas del CMH se dividen en dos tipos: tipo I presentes en la superficie de todas las células con núcleo, y tipo II (CMH-II) presente solo en las células presentadoras de antígenos y que a su vez se subdividen en los isotipos HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Los GWAS también han permitido identificar que polimorfismos de nucleótido único en los genes *HLA* modifican el riesgo de padecer enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas, incluyendo la EP. En la EP en concreto, se describen tanto variantes de riesgo como protectoras en los genes *HLA*, principalmente en aquellos que codifican para el CMH-II (Kline et al., 2020; Mamais et al., 2022). Adicionalmente, Kannarkat y colaboradores mostraron como la exposición a insecticidas en individuos portadores de una variante en un loci que codifica para el CMH-II aumentaba la capacidad de presentación del antígeno y la respuesta inmune y multiplicaba el riesgo de padecer la EP por 2,48; ejemplificando la compleja interacción gen-ambiente que tiene lugar en la etiopatogenia de la EP (Kannarkat et al., 2015).

1.5.2. Factores medioambientales

El papel de los factores medioambientales es probablemente crucial en las enfermedades neurodegenerativas, y en particular en la EP (Obeso et al., 2017). Se cree que la exposición de factores tóxico-metabólicos en individuos con una susceptibilidad genética determinada podría de forma sinérgica conllevar la alteración de distintos mecanismos celulares que concluyan en la neurodegeneración. Un hito fue el descubrimiento en 1983 de que el MPTP (1-metil-4-fenil, 6-tetrahidropiridina) era capaz

de causar un daño selectivo en las neuronas dopaminérgicas y una sintomatología similar a la EP. Desde entonces, se han descrito distintos factores de riesgo medioambientales que contribuyen a la etiología de la EP, entre los que se encuentran la exposición a pesticidas y disolventes, el traumatismo craneoencefálico, la vida rural, el consumo de agua de pozo y la ocupación agrícola (Goldman et al., 2013). Recientemente, se ha establecido también una asociación entre la diabetes tipo II y un mayor riesgo de EP y otras enfermedades neurodegenerativas (Cullinane et al., 2023). Por otro lado, factores ambientales relacionados con los hábitos de vida se han descrito como factores protectores asociados con un menor riesgo de EP. Entre ellos se encuentran el hábito tabáquico, el consumo de cafeína, la dieta mediterránea, el uso de antiinflamatorios, así como la actividad física (Jankovic et al., 2020; Bloem et al., 2021). Pese a que algunos de estos factores se apoyan por la plausibilidad biológica subyacente, algunas de estas observaciones no se han podido replicar de forma consistente.

1.6. Mecanismos fisiopatológicos

Gracias a estudios postmortem e in vivo de pacientes con EP, líneas celulares in vitro, y modelos animales, así como a la evidencia procedente de la identificación de genes asociados a la EP, se han identificado distintos mecanismos claves implicados en la fisiopatología de la EP. La evidencia apunta a que la compleja interacción entre la agregación aberrante de α -sinucleína, la disfunción mitocondrial, la alteración de las vías de autofagia-lisosoma, el estrés oxidativo, y la inflamación conllevarían conjuntamente a la muerte de las neuronas dopaminérgicas, entre otros circuitos también afectados (Bandres-Ciga et al., 2020; Jankovic et al., 2020; Bloem et al., 2021; Zaman et al., 2021). Cabe destacar que estas vías moleculares también se afectan de forma marcada por el envejecimiento, que es el principal factor de riesgo para la EP. Estos mecanismos fisiopatológicos implicados en el inicio y progresión de la neurodegeneración sugieren dianas para ser estudiadas como potenciales biomarcadores y dianas terapéuticas en la EP.

1.6.1. Agregación de α -sinucleína

La α -sinucleína es el componente principal de los cuerpos de Lewy, característicos de la EP. La α -sinucleína es una proteína codificada por el gen *SNCA* y ampliamente expresada en terminaciones presinápticas en el SNC, y también en otros tejidos como en los hematíes o el intestino. En condiciones fisiológicas se encuentra en forma de monómeros sin plegar o tetrámeros solubles. Sin embargo, en enfermedades neurodegenerativas como la EP, monómeros mal plegados son capaces de agregarse y formar oligómeros y fibrillas insolubles que acaban formando los cuerpos de Lewy. Se cree que estas formas de la α -sinucleína son tóxicas para las neuronas dopaminérgicas, desencadenando una serie de mecanismos celulares y moleculares que conllevarían la muerte neuronal (Yi et al., 2022; Deyel et al., 2023). Los oligómeros de α -sinucleína tienen propiedades proinflamatorias que conllevan la activación de la microglía en el SNC, que a su vez desencadena estrés oxidativo, liberación de más mediadores proinflamatorios y muerte neuronal (Zhang et al., 2005; Tansey et al., 2020; Jankovic y cols., 2020). Los desencadenantes de la acumulación y agregación de la α -sinucleína se desconocen, pero podrían estar implicadas tanto una sobreproducción de la proteína (evidencia apoyada por mutaciones en el gen *SNCA*), mutaciones que aumenten la probabilidad para un mal plegamiento u oligomerización, o bien alteraciones en las vías de degradación proteicas (Poewe et al., 2017).

1.6.2. Disfunción mitocondrial

Las mitocondrias tienen un papel fundamental en la función celular ya que son los principales orgánulos para la producción de energía, con lo que su disfunción puede comprometer la viabilidad celular. Además, juegan un papel en la muerte celular por apoptosis (Schapira et al., 2007). En pacientes con EP se ha constatado que existe una reducción de la actividad del complejo mitocondrial 1 asociada con disfunción mitocondrial (Zaman et al., 2021). En modelos animales de la EP, la inhibición de este complejo mediante rotenona produce daño mitocondrial y replica las características anatomopatológicas de la EP (Schapira et al., 2007; Jankovic et al., 2020). Asimismo, en ratones transgénicos con mutaciones patológicas en el gen *SNCA* se ha observado como

la sobreexpresión de α -sinucleína produce daño mitocondrial, principalmente debido a estrés oxidativo, y posteriormente conlleva a la muerte neuronal mediante apoptosis (Martin et al., 2006). La degradación de las mitocondrias dañadas (llamada mitofagia) también es esencial para el buen funcionamiento celular. Tal como se ha explicado previamente, el complejo Parkin/PINK1 tiene un papel imprescindible en este proceso y mutaciones deletéreas en los genes que codifican estas proteínas son causativas de la EP familiar (Bandres-Ciga et al., 2020). Por último, cabe mencionar que la disfunción mitocondrial inducida por las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y estrés oxidativo es uno de los principales factores asociados con el proceso de envejecimiento (Cui et al., 2012).

1.6.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre los niveles de ROS producidas por las células, y la capacidad de éstas para eliminar estos residuos tóxicos capaces de dañar su integridad. Diferentes vías generan ROS en el cerebro durante procesos celulares fisiológicos (por ejemplo, las propias mitocondrias); sin embargo, a veces la sobreproducción o un defecto en su aclaramiento conlleva la acumulación de ROS, que a su vez pueden conllevar a la muerte celular (Zaman et al., 2021). Asimismo, el propio metabolismo de la dopamina induce la producción de ROS, y se ha sugerido que estas especies también puedan incrementar la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas y la progresión de la neurodegeneración (Jenner et al., 2003). En línea con este hecho, estudios postmortem han evidenciado la presencia de estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Zaman et al., 2021). Pese a ello, se debate que el estrés oxidativo no tenga un rol causativo principal, sino que sea inducido por otras vías celulares (Jenner et al., 2003).

1.6.4. Alteración de la autofagia y el sistema lisosomal

La autofagia es un proceso celular que consiste en la degradación de elementos intracelulares, como por ejemplo proteínas y otros orgánulos dañados, y es esencial para mantener la homeostasis celular. Hay distintos tipos de autofagia en las que el material intracelular a través de distintas vías se entrega a los lisosomas para su degradación. Por

ello, la disfunción de la autofagia y el sistema lisosomal se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas como la EP (Zaman et al., 2021; Pradas et al., 2023). La implicación de la autofagia en la muerte de las neuronas dopaminérgicas se ha observado tanto en estudios postmortem de pacientes con EP como en estudios de modelos animales (Anglade et al., 1997, Lynch-Day et al., 2012). La alteración en estos sistemas de degradación puede contribuir a la acumulación de α -sinucleína (Poewe et al., 2017). Por ejemplo, en ratones transgénicos de α -sinucleína se ha observado la colocalización de α -sinucleína y marcadores de autofagia (Klucken et al., 2012), igual que en fibroblastos derivados de pacientes con EP se ha observado la acumulación de α -sinucleína en paralelo a la acumulación de lisosomas y a una disminución de su actividad proteolítica (Arotcarena et al., 2019). Los genes asociados a la EP también han aportado evidencia sobre la implicación del sistema lisosomal y a la autofagia. Tanto la mutación p.G2019S en el gen *LRRK2* como mutaciones en el gen *GBA* disminuyen las funciones lisosomales (Henry et al., 2015). Por último, la edad por sí misma también se encuentra asociada con una reducción de las funciones de la autofagia.

1.6.5. Inflamación

La implicación tanto de las respuestas inmunes centrales como periféricas en el inicio y progresión de la neurodegeneración en la EP está respaldada por múltiples líneas de evidencia (Tansey et al., 2022).

En el SNC, el principal componente residente del sistema inmune es la microglía. En condiciones fisiológicas, la microglía tiene una función de vigilancia del parénquima cerebral, proporciona apoyo trófico a las neuronas y contribuye a la sinaptogénesis y a la mielinización. En condiciones patológicas, como en respuesta a agentes tóxicos o estrés, la microglía se activa experimentando cambios morfológicos y funcionales que le permiten adquirir un fenotipo fagocítico (llamada microgliosis), así como ser una fuente de factores inflamatorios (Kaur et al., 2017; Lecours et al., 2018). Consecuentemente, expresan marcadores del CMH-II y actúan como células presentadoras de antígenos a células efectoras como los linfocitos T. La sobreactivación de la microglía puede ocasionar una producción continua y excesiva de mediadores inflamatorios, que son

neurotóxicos, y de ahí que dicha sobreactivación se haya relacionado con la neurodegeneración (Lecours et al., 2018; Deyer et al., 2023).

Una de las primeras piezas que implicó a la neuroinflamación en la patogénesis de la EP surgió en 1988, cuando McGeer y colaboradores describieron la presencia de una extensa activación microglial (o microgliosis) HLA-DR+ acompañando a la pérdida neuronal en la SNpc en estudios postmortem de pacientes con EP (McGeer et al., 1998). Distintas hipótesis se han formulado sobre los distintos roles de la microglía en la EP (Tansey et al., 2022). En primer lugar, en múltiples modelos animales de EP basados en neurotoxinas o en la sobreexpresión o administración de fibrillas de α -sinucleína, se ha demostrado que la microgliosis no es una simple consecuencia de la muerte neuronal y que la activación de la microglía aparece en respuesta a la toxicidad de α -sinucleína, sin o previa a la muerte neuronal (Fuzzati et al., 2019; Tansey et al., 2020; Hirsch et al., 2020). Por ejemplo, ratones transgénicos con mutaciones en el gen de α -sinucleína muestran una microgliosis precoz y un aumento de expresión de citoquinas proinflamatorias, previas a la muerte de neuronas dopaminérgicas (Su et al., 2008; Su et al., 2009). En segundo lugar, la microglía tiene funciones efectoras que pueden contribuir al aclaramiento de la α -sinucleína extracelular. Por ello, se postula también que la disfunción de su actividad fagocítica sería uno de los mecanismos que contribuyera a la degeneración y neuroinflamación. La identificación de marcadores CMH-II en la microglía que se encuentra en la vecindad de los depósitos de α -sinucleína sugiere que la microglía actuaría como células presentadoras de antígenos y apunta a la α -sinucleína como el potencial antígeno a ser presentado a los linfocitos T (Peralta-Ramos et al., 2019; Tansey et al., 2020; Deyer et al., 2023). En línea con esto, efectivamente la presencia de linfocitos T (CD4+ y CD8+) se ha descrito en la SNpc de pacientes con EP y en modelos animales (Brochard et al., 2009), hallazgo que se ha replicado en estudios posteriores y que parece contribuir a la degeneración neuronal (Tansey et al., 2020). De hecho, la inhibición de la expresión del CMH-II en modelos animales atenúa la activación microglial en presencia de la α -sinucleína, disminuye la presentación antigénica a los linfocitos T y disminuye la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Harms et al., 2013).

Por último, esta activación microglial también se ha estudiado in vivo mediante tomografía de emisión de positrones (PET) mostrando que está presente desde etapas tempranas de la enfermedad, y que ésta ocurre en múltiples áreas, como en el estriado y el córtex, y no solo en la SNpc (Iannaccone et al., 2013; Terada et al., 2016).

Por todo lo anteriormente expuesto, la evidencia apunta a una estrecha relación entre la α -sinucleína, la activación de la microglía y la respuesta inmunes, y la disfunción y muerte neuronal en la fisiopatología de la EP.

Al mismo tiempo, la existencia de una interacción cerebro-periferia en la EP, bien por la vía glio-linfática o por una alteración de la barrera hemato-encefálica, es ampliamente respaldada por la evidencia actual (Chen et al., 2018; Fuzzati et al., 2019; Hirsch et al., 2021). Especial referencia merecen diversos marcadores inflamatorios, como las citoquinas, que son moléculas claves de comunicación y modulación del sistema inmune y afectan tanto a los compartimentos central y periférico. La evidencia muestra que estos marcadores exhiben un perfil proinflamatorio tanto en el cerebro, en el líquido cefalorraquídeo (LCR) como en la sangre periférica en pacientes con EP en comparación a CS (Lindqvist et al., 2012; Qin et al., 2016; Kim et al., 2018; Fuzzati et al., 2019). La revisión sistemática y metaanálisis publicados recientemente por Qu y colaboradores demostró que los pacientes con EP tenían niveles significativamente elevados de los marcadores proinflamatorios interleucina (IL)-6, IL-1 β , factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) y proteína C reactiva (PCR) en sangre periférica y en LCR, así como niveles disminuidos del marcador antiinflamatorio IL-4 e interferón (INF)- γ en sangre periférica en comparación a CS, reforzando la hipótesis de la presencia de una respuesta proinflamatoria central y periférica en la EP (Qu et al., 2023). Estos resultados están en línea con los previos reportados en el metaanálisis de Qin y colaboradores, que además también mostraron niveles elevados de la citoquina proinflamatoria IL-2 y la IL-10 en sangre periférica, ambas con importantes funciones en la regulación de la respuesta inmune mediada por linfocitos (Qin et al., 2016). Las alteraciones en el perfil de citoquinas se han descrito desde estadios precoces de la enfermedad, así como se han asociado a la progresión de la enfermedad (perfiles más proinflamatorios se han asociado con peor progresión motora y cognitiva) (Chahine et al., 2013; Williams-Gray et al., 2016, Karpenko et al., 2018). Si bien es cierto que se han publicado resultados

controvertidos entre estudios, que podrían ser debidos a la heterogeneidad metodológica y diversidad de poblaciones incluidas.

Los leucocitos y sus subpoblaciones (neutrófilos, linfocitos, monocitos, basófilos y eosinófilos) también merecen especial atención en sangre periférica, ya que son los protagonistas de la inmunidad celular y secretan las citoquinas circulantes, a la vez que son reguladas por ellas. Además de la infiltración de algunas de estas subpoblaciones en el SNC de pacientes con EP, también se han descrito cambios cuantitativos y cualitativos en las distintas subpoblaciones leucocitarias en sangre periférica (Hirsch et al., 2020; Tansey et al., 2022).

En primer lugar, los linfocitos están principalmente implicados en la respuesta inmune adaptativa con la función de proteger al organismo tras la exposición a distintos antígenos, pero también pueden perpetuar reacciones inflamatorias contribuyendo a la patogenia de distintas enfermedades (Cohn et al., 2014). En concreto, los pacientes con EP muestran una alteración en la subpoblación de linfocitos T; particularmente una disminución en la subpoblación de linfocitos T CD4+ (también llamados T colaboradores o T helper (Th) en inglés), que además son los que reciben la información de las células presentadoras de antígenos que expresan las moléculas CMH-II (Tansey et al., 2020; Zaman et al., 2021). En este sentido, Sulzer y colaboradores observaron que los linfocitos T CD4+ reconocían ciertos péptidos de la α -sinucleína, apoyando su papel en la inmunidad adaptativa en la patogénesis de la EP (Sulzer et al., 2017). Asimismo, los linfocitos Th se diferencian en distintos subtipos en función del ambiente extracelular y las citoquinas presentes en él, y estos a su vez secretan distintas citoquinas jugando un papel clave en regular las respuestas inmunes. Entre los linfocitos Th se encuentran los linfocitos Th1 (considerados proinflamatorios y secretores de IL-2, IFN- γ o TNF entre otros), los Th17 (considerados proinflamatorios y secretores de IL-17 o IL-21) y los linfocitos Th2 (considerados antiinflamatorios y secretores de IL-4 o IL-5). A su vez, los linfocitos Th se encuentran modulados por los linfocitos T reguladores (Treg), que se encargan de suprimir las respuestas inflamatorias mediadas por linfocitos T y mantener la homeostasis. Por tanto, alteraciones en las respuestas mediadas por linfocitos T se relacionan con numerosas enfermedades inflamatorias y también neurodegenerativas (Wang et al., 2022). Concretamente en la EP, se ha observado que añadido a la reducción

en el recuento de linfocitos T CD4+, habría presente una desregulación de sus subpoblaciones mostrando una respuesta inmune inflamatoria potenciada por los linfocitos Th1 (Chen et al., 2015; Kustrimovic et al., 2018).

Los neutrófilos son la subpoblación leucocitaria más abundante en sangre periférica. Si bien tradicionalmente se consideraba que tenían un rol clave en los procesos inflamatorios agudos, actualmente también se conoce su relevancia en la inflamación crónica y en distintas enfermedades. Alteraciones en su función o una inadecuada supresión de su respuesta aguda puede conllevar a la perpetuación de los procesos inflamatorios y a la inflamación crónica (Kolaczowska et al., 2013). Curiosamente, el envejecimiento se ha relacionado con alteraciones en las funciones de los neutrófilos. Al mismo tiempo, la presencia de niveles elevados de marcadores proinflamatorios como la IL-1 β o TNF podrían retrasar la apoptosis de los neutrófilos y alargar su vida media. Además, los propios neutrófilos son una fuente importante de producción de ROS en sitios de inflamación, con lo que podría aumentar el estrés oxidativo, e incrementar los procesos inflamatorios (Soehnlein et al., 2017). No obstante, se desconoce el papel de los neutrófilos en la EP. Hasta la fecha, algunos estudios han descrito un aumento del recuento de esta población, mientras que otros no han encontrado diferencias en comparación con CS.

Por otro lado, la población de monocitos también se ha descrito anómala en la EP (Tansey et al., 2020). A nivel central, se ha observado la infiltración de monocitos en cerebros de modelos animales con sobreexpresión de α -sinucleína (Harms et al., 2018), así como los monocitos del LCR en pacientes con EP muestran una mayor expresión del CMH-II que los presentes en sangre periférica (Fiszer et al., 1994). Asimismo, se ha observado que los monocitos de pacientes con EP tienen alteraciones funcionales, incluyendo una alteración en su capacidad fagocitaria y una reducción en la capacidad de aclaramiento de la α -sinucleína (Gardai et al., 2013; Grozdanov et al., 2014).

Finalmente, a partir de estas poblaciones celulares, se derivan ciertas ratios que son ampliamente utilizadas como biomarcadores dado que son fácilmente medibles en sangre periférica y reflejan información de dos tipos celulares al mismo tiempo. En concreto, de creciente interés es la ratio neutrófilo-linfocito (RNL), obtenida mediante el cociente entre el recuento absoluto de neutrófilos y el recuento absoluto de linfocitos,

e integra la información de estas dos subpoblaciones leucocitarias y vías inmunes complementarias. Los neutrófilos se asocian con la inflamación crónica y los linfocitos representan la vía inmune reguladora. La RNL es un biomarcador bien establecido de inflamación periférica del organismo, de tal manera que una mayor RNL traduce la presencia de mayor inflamación sistémica. Su utilidad ha sido ampliamente demostrada y actualmente la RNL se utiliza con valor pronóstico en determinados cánceres, enfermedades infecciosas e inflamatorias y en el ictus isquémico, entre otros, así como ha mostrado ser biomarcador de deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer (Dong et al., 2019; Russell et al., 2019; Stefaniuk et al., 2020; Lin et al., 2022; Petrone et al., 2020). Distintos estudios han explorado la asociación entre la RNL y la EP como biomarcador de inflamación periférica (Akil et al., 2015; Ataç Uçar et al., 2017; Büyükkoyuncu et al., 2018; Solmaz et al., 2018; Umehara et al., 2020, entre otros). Sin embargo, los resultados entre estudios eran controvertidos hasta la fecha de esta tesis doctoral.

2. HIPÓTESIS / HYPOTHESIS

HIPÓTESIS

Los mecanismos fisiopatológicos implicados de la EP no se conocen por completo, pero la evidencia actual apoya la implicación de la respuesta inmune periférica y la inflamación en el inicio y la progresión de la EP. Desentrañar los mecanismos patogénicos subyacentes en la neurodegeneración tiene un potencial impacto en la búsqueda de nuevos biomarcadores y en el desarrollo de prometedoras dianas terapéuticas en la EP. La sangre periférica representa una forma fiable y no invasiva de estudiar in vivo la respuesta inmune periférica y los mecanismos subyacentes en los pacientes con EP. En ella, la ratio neutrófilo-linfocito (RNL) ha demostrado ser un biomarcador bien establecido de inflamación periférica del organismo. La NLR integra la información de estas dos subpoblaciones leucocitarias y vías inmunes complementarias: mientras que los neutrófilos se asocian con la inflamación crónica, los linfocitos representan la vía inmune reguladora. Por tanto, una mayor RNL traduce la presencia de mayor inflamación sistémica.

La hipótesis principal de esta tesis doctoral fue que en pacientes con EP existirían alteraciones en la respuesta inmune en sangre periférica medida por los leucocitos y sus subpoblaciones y que en concreto la RNL se encontraría elevada en comparación a CS, reflejando la presencia de inflamación. Asimismo, se plantearon las siguientes hipótesis específicas:

- La respuesta inmune periférica podría estar asociada con diferentes características clínicas de la enfermedad.
- La respuesta inmune periférica podría estar influenciada por la presencia de variantes en genes asociados a la EP.
- La respuesta inmune presente en la sangre periférica podría estar asociada con la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en el sistema nervioso central.

Para dar respuesta a las hipótesis planteadas y profundizar en la respuesta inmune periférica presente en la EP y su papel en la fisiopatología, se establecieron los siguientes objetivos.

HYPOTHESIS

The etiopathogenesis of Parkinson's disease (PD) is not entirely known, but there is robust evidence for the involvement of peripheral immune responses and inflammatory processes in the initiation and progression of PD. Disentangling the underlying pathogenic mechanisms on neurodegeneration may have potential impact on finding new biomarkers and potential therapeutic targets in Parkinson's disease. Peripheral blood represents a reliable and non-invasive way to study *in vivo* and monitor the underlying impairments in the peripheral immune response in patients with PD. Besides, the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) is a well-established indicator of the overall inflammatory status of the organism. The NLR integrates information from these two complementary leukocyte subpopulations and immune pathways: while neutrophils are associated with chronic inflammation, lymphocytes represent the regulatory immune pathway. Therefore, an increased NLR reflects the presence of more peripheral inflammation.

The main hypothesis was that an impairment in the peripheral immune response, based on the leukocytes and their subpopulations, would be present in patients with Parkinson's disease compared with healthy controls. In particular, the hypothesis was that patients with PD had a higher NLR compared to healthy controls, reflecting the presence of peripheral inflammation in Parkinson's disease.

In addition, the following specific hypotheses were made:

- The peripheral immune response could be associated with different clinical features of the disease.
- The peripheral immune response could be influenced by the genetic background of patients with PD, according to the presence of variants in well-defined Parkinson's disease associated genes.
- The immune response present in peripheral blood could be associated with the dopaminergic neurodegeneration in the brain.

To deepen on the peripheral immune response in Parkinson's disease and its role in its pathophysiology, the following objectives were established in this thesis.

3. OBJETIVOS / OBJECTIVES

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral fue ampliar el conocimiento existente de la respuesta inmune periférica en pacientes con EP y su rol en la fisiopatología de la enfermedad. Con ese fin, se planteó estudiar si existía una alteración de la respuesta inmune en sangre periférica medida por los leucocitos, sus subpoblaciones, y la RNL, así como si existía una asociación de ésta con las características clínicas y genéticas de los pacientes. De igual modo, se planteó estudiar si existía una relación entre la respuesta inmune a nivel periférico y la neurodegeneración a nivel central. Para alcanzar este objetivo, se empleó la cohorte local del Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR) en Sevilla, y posteriormente se empleó la cohorte internacional e independiente de PPMI con fines de validación.

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

1. Analizar si existen diferencias en el recuento absoluto de leucocitos, sus subpoblaciones y la RNL en pacientes con EP en comparación con CS mediante un estudio observacional analítico caso-control en la cohorte del HUVR.
2. Dilucidar el papel de la RNL en la EP comparando los resultados obtenidos en la cohorte del HUVR con los publicados en la literatura mediante una revisión sistemática y un metaanálisis.
3. Analizar la asociación de la respuesta inmune periférica con las características clínicas de los pacientes con EP, como la duración de la enfermedad y la severidad motora en las cohortes del HUVR y de PPMI.
4. Estudiar si la respuesta inmune periférica en pacientes con EP difiere según sus características genéticas (concretamente entre pacientes con EP esporádica y pacientes con variantes en los genes *GBA* y *LRRK2*), y en comparación con CS en la cohorte del HUVR, y posterior validación de resultados en la cohorte de PPMI.
5. Estudiar la relación entre la respuesta inmune periférica y la depleción dopaminérgica medida en el estriado mediante el SPECT [¹²³I]FP-CIT como biomarcador in vivo de neurodegeneración en la cohorte del HUVR, y posterior validación de resultados en la cohorte de PPMI.

OBJECTIVES

The overall aim of this thesis was to expand the understanding of the peripheral immune response in patients with PD and its role in the pathogenesis of PD. To this end, this thesis aimed to study whether there was an impaired immune response in peripheral blood based on the leukocytes, their subpopulations, and the NLR, and whether it was associated with the clinical and genetic features of patients with PD. Additionally, it aimed to investigate whether there was a relationship between the peripheral immune response and the neurodegeneration in the brain. To achieve these objectives, the local cohort of the Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR) in Seville was used, and the results were validated in the international and independent Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI) cohort.

To achieve the main objective, the following specific objectives were planned:

1. To study the differences between the peripheral immune response in patients with PD and healthy controls through a case-control study in the HUVR cohort.
2. To elucidate the role of the NLR in PD, as a biomarker of peripheral inflammation, by comparing the results obtained in the HUVR cohort with those published in the literature through a systematic review and a meta-analysis.
3. To examine whether the peripheral immune response in patients with PD was associated to certain clinical features of the disease, such as disease duration and motor severity, in both the HUVR and the PPMI cohorts.
4. To determine whether the peripheral immune response differed between patients with PD according to the genetic background (sporadic PD, *LRRK2*-associated PD, and *GBA*-associated PD) in both the HUVR and the PPMI cohorts.
5. To investigate the relationship between the peripheral immune response and the striatal dopaminergic depletion measured by [¹²³I]FP-CIT SPECT, as an *in vivo* biomarker of neurodegeneration, in both the HUVR and the PPMI cohorts.

4. METODOLOGÍA

A continuación, se realizará primero un resumen de la metodología común empleada en los distintos estudios y posteriormente se especificará la metodología específica de cada uno de los estudios individuales.

4.1. Material y métodos comunes:

Se incluyeron pacientes con EP procedentes de la Unidad de Trastornos del Movimiento (UTM) del HUVR, en Sevilla. Los pacientes con EP fueron diagnosticados en base a los criterios “Movement Disorder Society Clinical Diagnostic Criteria” (Postuma et al., 2015). Asimismo, se incluyeron CS, que eran individuos voluntarios de la misma área geográfica a la que pertenecían los pacientes con EP y sin parentesco con estos.

Como criterios de exclusión comunes en todos los sujetos incluidos en este estudio se consideraron aquellos factores que pudieran influir en el perfil inmune en el momento de la extracción sanguínea, incluyendo cáncer, enfermedades autoinmunes, inflamatorias o infecciosas, y/o tratamiento inmunosupresor o inmunomodulador. Además, como criterio de exclusión en los grupos de CS se consideraron también la presencia de enfermedades neurodegenerativas y/o historia familiar de EP.

Todos los individuos fueron evaluados en el HUVR y se recogieron sus datos demográficos y clínicos retrospectivamente. La severidad motora de la enfermedad se evaluó según la escala Hoehn y Yahr (HY). El tratamiento dopaminérgico fue recogido como dosis diaria equivalente de levodopa (LEDD). Todos los estudios fueron aprobados por el comité de ética del HUVR y todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito. Toda la información referente a la identidad de los pacientes ha sido considerada confidencial a todos los efectos y tratada conforme establece la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre (de “Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales”) y en el marco de la Ley 14/2007, de 7 de julio (“de Investigación Biomédica”).

En la figura 3 se ilustra la metodología empleada y los criterios de selección de cada una de las cohortes de los estudios individuales.

Búsqueda realizada en enero/2020:

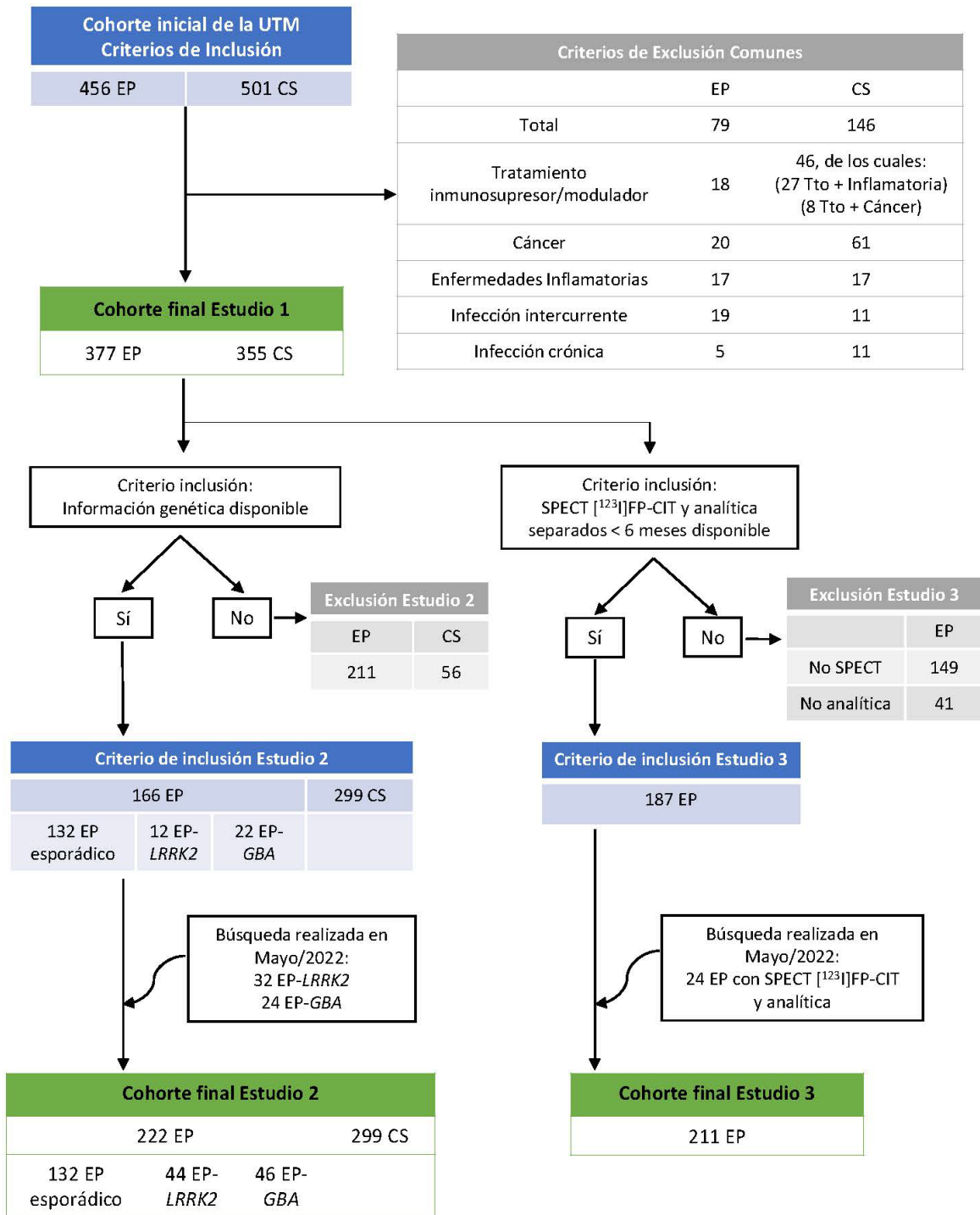


Figura 3. Diagrama de flujo de la cohorte inicial de la UTM del HUVR, los criterios de selección y las cohortes finales de cada uno de los estudios individuales.

La determinación del recuento total de leucocitos y sus subpoblaciones (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, y basófilos) fue realizada en sangre periférica y su análisis se llevó a cabo en el laboratorio de hematología del HUVR. Para su determinación se utilizaron los analizadores de hematimetría XN de la marca Sysmex que utilizan un canal de citometría de flujo fluorescente con determinación de forward-scatter, side-scatter y fluorescencia.

La RNL se calculó dividiendo el recuento absoluto de neutrófilos entre el recuento absoluto de linfocitos.

Los análisis estadísticos descritos a continuación fueron realizados usando el software R versión 3.5.1. y el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.). Se consideró un p valor (p) < 0,05 como estadísticamente significativo.

4.2. Material y métodos específicos de cada estudio individual.

4.2.1. Estudio 1. “Peripheral Immune Profile and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Parkinson’s disease”

Para la consecución del objetivo 1 y 3, se realizó un estudio de casos y controles incluyendo 377 pacientes con EP (con una edad media de $63,7 \pm 11,91$ años; 58,09% varones) y 355 CS (con una edad media de $59,23 \pm 15,06$ años; 47,89% varones).

Los recuentos de leucocitos y sus subpoblaciones, así como la RNL, se analizaron y se compararon entre grupos mediante modelos de regresión lineal multivariante, ajustados por sexo, edad y factores de riesgo cardiovascular. Se analizó la relación entre las poblaciones celulares y la RNL, y las características clínicas de la EP mediante modelos de regresión lineal ajustados por posibles variables confusoras. De forma específica, se realizaron análisis de potencia a priori (para evaluar el tamaño muestral necesario para alcanzar una potencia estadística de 0,80) y a posteriori (para evaluar la potencia del estudio realizado).

Para la consecución del objetivo 2, con el fin de clarificar el rol de la RNL en la EP, se realizó una revisión sistemática y un metaanálisis de acuerdo con los criterios PRISMA

(Urrútia et al., 2010). Para ello se realizó una búsqueda sistemática en las bases de datos científicas electrónicas en octubre de 2020. Se incluyeron aquellos estudios que cumplieran los siguientes criterios: 1) estudios caso-control describiendo la asociación entre EP y la RNL, 2) que dispusieran de un grupo control, y 3) que incluyeran tanto la media como las desviaciones estándar de la RNL. Tras una búsqueda inicial de 800 artículos y aplicar los criterios establecidos, 7 artículos fueron finalmente seleccionados para el metaanálisis. Dado que el artículo de Jiang y colaboradores (Jiang et al., 2019) presentaba dos cohortes claramente diferenciadas según la edad de inicio de la enfermedad, éste fue incluido como dos estudios. Finalmente, junto con nuestro estudio, se incluyeron 9 diferencias de medias de la RNL con un diseño de casos y controles, que incluían un total de 1219 pacientes con EP y 862 CS.

Los análisis estadísticos para el metaanálisis se realizaron mediante el “metaphor” package en el software R. Los tamaños de efecto se calcularon mediante las diferencias medias estandarizadas de la RNL entre los pacientes con EP y los CS usando el estadístico g de Hedges, que provee un tamaño de efecto no sesgado y ajustado al tamaño de la muestra. La heterogeneidad entre estudios se evaluó usando la prueba Q de Cochrane y el estadístico I^2 . El sesgo de publicación se evaluó mediante el gráfico de embudo y la prueba de Egger. Los análisis de sensibilidad se realizaron para evaluar la influencia de los estudios individuales en la estimación del efecto global. Los análisis de subgrupos y meta regresión (mediante modelos de efectos mixtos) se llevaron a cabo para detectar fuentes de heterogeneidad.

4.2.2 Estudio 2. “Peripheral inflammatory immune response differs among sporadic and familial Parkinson’s disease”.

Para la consecución del objetivo 4, con tal de evaluar si la respuesta periférica inmune inflamatoria difería según el estatus genético de los pacientes, se incluyeron dos cohortes, una cohorte primaria procedente del HUVR y una cohorte de replicación procedente de la cohorte de PPMI con fines de validación.

La cohorte primaria incluyó 222 pacientes con EP (con una edad media de $62,84 \pm 11,72$ años; 55,86% varones; edad media de inicio de síntomas motores $54,60 \pm 12,08$ años) y 299 CS (edad media de $59,94 \pm 15,31$ años; 51,17% varones) procedentes de la UTM del HUVR. Los pacientes con EP se clasificaron en tres grupos de acuerdo con su estatus genético: 132 pacientes con EP esporádica, 44 pacientes con variantes asociadas al gen *LRRK2* (EP-*LRRK2*) y 46 pacientes con variantes patogénicas en el gen *GBA* (EP-*GBA*). Como criterio de exclusión para pacientes con EP esporádica y CS fue la presencia de variantes patogénicas identificadas en los genes *LRRK2* y *GBA*. En ninguno de los pacientes incluidos se identificaron variantes simultáneamente en los genes *LRRK2* y *GBA*. En esta cohorte, la extracción de ADN se realizó a partir de muestras de sangre periférica 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 los 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 estudios de nuestro grupo (Jesus et al., 2016).

La cohorte de replicación de PPMI incluyó 401 pacientes con EP (edad media de $60,88 \pm 10,09$ años; 62,30% varones; edad media de inicio de síntomas motores $58,67 \pm 10,25$ años) y 173 CS (edad media de $59,8 \pm 12,24$ años; 64,37% varones). Los pacientes con EP se clasificaron en tres grupos de acuerdo con su estatus genético: 281 pacientes con EP esporádica, 66 pacientes con EP-*LRRK2* y 54 pacientes con EP-*GBA*. Se aplicaron los mismos criterios de inclusión y exclusión que para la cohorte primaria del HUVR. En esta cohorte, todos los estudios genéticos fueron realizados de forma centralizada. En todos los participantes, se realizó secuenciación del exoma o del genoma completo. Los procedimientos y detalles completos del estudio están disponibles en su página web (<http://www.ppmi-info.org>). Este estudio fue aprobado por el comité ético local de acuerdo con las guías de la declaración de Helsinki, y el consentimiento informado fue obtenido de todos los participantes del estudio.

Los análisis estadísticos específicos de este estudio se realizaron de igual forma en las dos cohortes. Los recuentos de células sanguíneas y la RNL se compararon entre los grupos de pacientes con EP y CS mediante modelos de regresión lineal multivariante,

ajustados por edad y sexo. Los análisis entre los diferentes grupos de pacientes con EP según su estado genético (EP esporádica, EP-*LRRK2*, EP-*GBA*) y CS se realizaron mediante modelos de regresión lineal multivariante con edad y sexo como covariables. Se realizaron análisis estratificados por sexo. La asociación entre los recuentos celulares y la RNL, y las características clínicas se realizó mediante la correlación de Spearman o Pearson, o modelos de regresión lineal multivariante, según fuese más apropiado.

4.2.3. Estudio 3. “Peripheral inflammation is associated with dopaminergic degeneration in Parkinson’s disease.”

Para la consecución del objetivo 5, con tal de estudiar la relación entre la inflamación periférica y la neurodegeneración, se incluyeron dos cohortes, una cohorte primaria procedente del HUVR y una cohorte de replicación procedente de la cohorte de PPMI.

La cohorte primaria incluyó 211 pacientes con EP ($56 \pm 9,51$ años, 63,55% varones) del HUVR, con una duración de la enfermedad de $6,41 \pm 6,51$ años y en tratamiento dopaminérgico (LEDD $666,67 \pm 679,69$ mg). Los criterios de inclusión específicos de este estudio fueron disponer de un SPECT [^{123}I]FP-CIT y una analítica de sangre con hemograma realizados con una diferencia de tiempo inferior a 6 meses.

En la cohorte de replicación de PPMI se incluyeron 344 pacientes con EP de novo (sin tratamiento dopaminérgico) ($61 \pm 9,69$ años, 65,41% varones), con una duración menor de la enfermedad ($2,04 \pm 2,02$ años) y sin tratamiento dopaminérgico. Se aplicaron los mismos criterios de inclusión y exclusión que en la cohorte primaria del HUVR. De forma adicional, en esta cohorte se evaluó la severidad motora mediante la parte III de la escala MDS-Unified Parkinson’s Disease Rating Scale (MDS-UPDRS-III) y el estado cognitivo mediante la escala Montreal Cognitive Assessment (MOCA).

En ambas cohortes, la adquisición de imágenes del SPECT [^{123}I]FP-CIT se realizó siguiendo los protocolos de imágenes estandarizados para la adquisición de datos y el posterior procesamiento de las imágenes se realizó mediante SPM12 (Wellcome Centre for Human Neuroimaging, Institute of Neurology, UCL, Londres, Reino Unido) con MATLAB 2018 (MathWorks, Natick, MA). Las imágenes fueron reorientadas primero y cada exploración se normalizó en el espacio estereotáctico estándar del MNI (Montreal

Neurological Institute) utilizando una plantilla del SPECT [¹²³I]FP-CIT desarrollada previamente por nuestro grupo (García-Gómez et al., 2013). Las imágenes resultantes se redistribuyeron en una matriz de 91x109x91 vóxeles con un tamaño de vóxel de 2x2x2 mm³. Por último, las imágenes se convirtieron a valores estandarizados de ratios de captación (SUVR, por sus siglas en inglés) normalizando cada vóxel cerebral a la captación de radioligando del lóbulo occipital (Tinaz et al., 2018). Los niveles de DAT se cuantificaron mediante las SUVR medias en diferentes subregiones del estriado anatómicamente definidas. Estructuralmente el cuerpo estriado se dividió en caudado y putamen, así como el putamen se dividió en subregiones anterior y posterior utilizando la comisura anterior como punto de referencia (según la metodología propuesta por Tziortzi et al., 2011).

Los análisis estadísticos específicos de este estudio se realizaron de igual forma en las dos cohortes. La asociación mediante los recuentos celulares (linfocitos, neutrófilos y la RNL) y los niveles de DAT en las subregiones del estriado se evaluaron mediante análisis de correlación de Spearman y posteriormente mediante análisis de regresión lineal multivariante (con la edad, sexo, duración de enfermedad y LEDD como covariables). Los resultados de los modelos de regresión co-variados se expresaron como correlación parcial (*r*) y el valor *p*. Se realizaron análisis de interacción para estudiar la influencia de la edad o el sexo en la asociación entre la respuesta inmune y los niveles de DAT. Posteriormente, se estudió la posible asociación entre los recuentos celulares, los niveles de DAT y las características clínicas mediante análisis de regresión lineal multivariante (con la edad, sexo y duración de enfermedad como covariables).

5. RESULTADOS

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

5.1. Resultados “Peripheral Immune Profile and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Parkinson’s disease”

En este estudio se evaluó si existían alteraciones en la respuesta inmune periférica (basada en los leucocitos, subpoblaciones y la RNL) en EP en comparación con CS, así como la relación de esta respuesta con las características clínicas de los pacientes con EP.

Los resultados del estudio de casos y controles en la cohorte del HUVR evidenciaron que:

- Los pacientes con EP mostraban una mayor RNL que los CS (EP: $2,47 \pm 1,1$; CS: $1,98 \pm 0,91$; $p < 0,001$), tras ajustar por edad, sexo y factores de riesgo cardiovascular.
- Los pacientes con EP mostraban un menor recuento absoluto de linfocitos que los CS (EP: $1,83 \pm 0,59 \times 10^3$ células/ μL ; CS: $2,14 \pm 0,66 \times 10^3$ células/ μL ; $p < 0,001$), tras ajustar por edad, sexo y factores de riesgo cardiovascular.
- Los pacientes con EP mostraban un mayor recuento absoluto de neutrófilos que los CS (EP: $4,13 \pm 1,32 \times 10^3$ células/ μL ; CS: $3,9 \pm 1,25 \times 10^3$ células/ μL ; $p = 0,11$), tras ajustar por edad, sexo y factores de riesgo cardiovascular.
- Los pacientes con EP mostraban un menor recuento absoluto de monocitos que los CS (EP: $0,45 \pm 0,15 \times 10^3$ células/ μL ; CS: $0,5 \pm 0,34 \times 10^3$ células/ μL ; $p < 0,05$), tras ajustar por edad, sexo y factores de riesgo cardiovascular.
- No se observaron diferencias en el recuento total del número de leucocitos entre pacientes con EP y CS.
- En los pacientes con EP no se encontró asociación entre la RNL ni la edad de inicio, la duración de la enfermedad, la severidad motora de la enfermedad (según HY) o la presencia de complicaciones motoras.
- Este estudio alcanzó una potencia estadística del 99%.

Los resultados del metaanálisis realizado mostraron:

- Se detectó una elevada heterogeneidad entre los estudios incluidos ($I^2=80\%$; $p=0,94$). Dada la presencia de heterogeneidad significativa ($I^2>50\%$), se empleó para el análisis el modelo de efectos aleatorios para evaluar el tamaño de efecto global.
- Los pacientes con EP mostraban una RNL mayor en comparación con CS (diferencia media estandarizada = 0,27; IC 95% - 0,05 a 0,60).
- No se detectó riesgo de sesgo de publicación.
- La fuente de heterogeneidad no fue detectada ni en los análisis de metaregresión (edad, sexo o año de publicación) ni en los análisis por subgrupos (según diseño del estudio).
- Los análisis de sensibilidad apoyaron la robustez de los resultados, dado que no se observaron cambios en el tamaño de efecto o la heterogeneidad al repetir los análisis extrayendo uno de los estudios cada vez.

5.2. Resultados “Peripheral inflammatory immune response differs among sporadic and familial Parkinson’s disease”.

En este estudio se evaluó si la respuesta inmune inflamatoria a nivel periférico difería entre pacientes con EP esporádica, EP-*LRRK2* y EP-*GBA* y en comparación con CS, en dos cohortes independientes (HUVR y PPMI). Se evidenció:

- El grupo total de pacientes con EP mostraban una mayor RNL, un menor recuento de linfocitos y monocitos, y un mayor recuento de neutrófilos, en comparación con los CS, en ambas cohortes y tras ajustar por sexo y edad.
- Sí se encontraron diferencias en la respuesta inmune periférica según el genotipo de los pacientes, en ambas cohortes. Los resultados se mantuvieron tras ajustar por sexo y edad, y tras realizar análisis estratificados por sexo.

Los pacientes con EP esporádica mostraron una mayor RNL ($p < 0,001$), un menor recuento de linfocitos y monocitos ($p = 0,001$ y $p = 0,05$) y un mayor recuento de neutrófilos ($p = 0,17$) en la cohorte del HUVR. Estos resultados fueron validados en la cohorte de replicación de PPMI.

Los pacientes con EP-*GBA* mostraron una mayor RNL ($p < 0,05$), un menor recuento de linfocitos ($p = 0,02$) y un mayor recuento de neutrófilos ($p = 0,14$), y no se encontraron diferencias en el recuento de monocitos, en la cohorte del HUVR. Estos resultados fueron validados en la cohorte de replicación de PPMI, excepto la disminución en el recuento de linfocitos ($p = 0,22$).

Los pacientes con EP-*LRRK2* no mostraron diferencias ni en la RNL, ni en el recuento de linfocitos, neutrófilos ni monocitos en comparación con CS en la cohorte primaria del HUVR. Los resultados fueron validados en la cohorte de replicación de PPMI.

Respecto a la asociación entre la respuesta inmune periférica y las características clínicas de la enfermedad:

- No se encontró asociación de la respuesta inmune con la duración o la severidad motora de la enfermedad (según el estadio HY) en ninguna de las dos cohortes.

- Sí se encontró asociación entre la RNL y la severidad motora basada en la escala MDS-UPDRS-III en la cohorte de replicación de PPMI. Esta asociación se encontró independientemente de las características genéticas de los pacientes con EP.
- No se encontró asociación entre la RNL y el deterioro cognitivo medido por la escala MOCA en la cohorte de replicación de PPMI.

5.3. Resultados “Peripheral inflammation is associated with dopaminergic degeneration in Parkinson’s disease”.

En este estudio se evaluó la relación entre la respuesta inmune inflamatoria a nivel periférico y la degeneración dopaminérgica midiendo los niveles de DAT en el estriado mediante el SPECT [¹²³I]FP-CIT, en dos cohortes independientes de pacientes con EP. En este estudio se evidenció que:

- Una mayor RNL en sangre periférica se asoció con menores niveles de DAT en el caudado y en el putamen ($r = -0,28$, $p < 0,001$ y $r = -0,25$, $p < 0,001$, respectivamente) en los pacientes con EP de la cohorte del HUVR.

Los resultados fueron validados en la cohorte de replicación de PPMI.

- Un menor recuento de linfocitos en sangre periférica se asoció con menores niveles de DAT en el caudado y en el putamen ($r = +0,16$, $p < 0,05$ y $r = +0,19$, $p = 0,005$, respectivamente) en los pacientes con EP de la cohorte del HUVR.

Los resultados fueron validados en la cohorte de replicación de PPMI.

- Un recuento mayor de neutrófilos en sangre periférica se asoció con menores niveles de DAT en el caudado ($r = -0,16$, $p = 0,02$) en los pacientes con EP de la cohorte del HUVR, pero esta asociación no alcanzó la significación estadística en el putamen ($r = -0,11$, $p = 0,08$).

No se encontró asociación entre el recuento de neutrófilos y los niveles de DAT en el estriado en la cohorte de replicación de PPMI.

- Las asociaciones encontradas entre la respuesta inmune periférica y los niveles de DAT en el estriado se hallaron de forma relativamente uniforme en las diferentes subregiones anatómicas en las dos cohortes.
- No se encontró una interacción del sexo de los pacientes en la asociación hallada entre los niveles de DAT en el estriado y la respuesta inmune periférica en ninguna de las dos cohortes. Sí se encontró una mínima interacción de la edad en la asociación con la RNL en la cohorte del HUVR, que no fue validada en la cohorte de replicación.
- No se encontró asociación entre la respuesta inmune periférica ni la duración de la enfermedad en ninguna de las dos cohortes.

- Respecto al tratamiento dopaminérgico, se observó una asociación débil entre las dosis equivalentes diarias de levodopa y el recuento de neutrófilos y la RNL.
- Se encontró una asociación negativa entre los niveles de DAT en todas las regiones del estriado y la severidad motora medida por HY, siendo esta asociación mayor en el putamen posterior, en las dos cohortes. Estos resultados fueron validados en la cohorte de replicación de PPMI, donde también se encontró la asociación con la severidad motora medida por la escala MDS-UPDRS-III.
- No se encontró asociación entre la respuesta inmune periférica y la severidad motora medida por el estadio HY en la cohorte del HUVR. Sí se encontró asociación entre la RNL (pero no entre linfocitos ni neutrófilos), y la severidad motora medida por el estadio HY y por la escala MDS-UPDRS-III en la cohorte de replicación de PPMI.
- No se encontró asociación entre el deterioro cognitivo evaluado por la escala MOCA ni la respuesta inmune periférica ni los niveles de DAT en el estriado en la cohorte de replicación de PPMI.

6. PUBLICACIONES

6.1. PERIPHERAL IMMUNE PROFILE AND NEUTROPHIL-TO-LYMPHOCYTE RATIO IN PARKINSON'S DISEASE

Publicado como:

Muñoz-Delgado L, Macías-García D, Jesús S, Martín-Rodríguez JF, Labrador-Espinosa MA, Jiménez-Jaraba MV, Adarmes-Gómez AD, Carrillo F, Mir P. **Peripheral Immune Profile and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Parkinson's Disease.** *Mov. Disorders* 2021; 36(10):2426-2430. DOI: [10.1002/mds.28685](https://doi.org/10.1002/mds.28685)

Peripheral Immune Profile and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Parkinson's Disease

Laura Muñoz-Delgado, MD,^{1,2} Daniel Macías-García, MD,^{1,2} Silvia Jesús, MD, PhD,^{1,2} Juan Francisco Martín-Rodríguez, PhD,^{1,2,3} Miguel Ángel Labrador-Espinosa, MSc,^{1,2,4} María Valle Jiménez-Jaraba, BSc,¹ Astrid Adarmes-Gómez, MD,^{1,2} Fátima Carrillo, MD, PhD,^{1,2} and Pablo Mir, MD, PhD^{1,2,4*} 

¹Unidad 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 ²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain ³Departamento de Psicología Experimental, Facultad de Psicología, Universidad de Sevilla, Seville, Spain ⁴Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

ABSTRACT: Background: The neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in peripheral blood is a well-established inflammatory marker, but its role in Parkinson's disease (PD) remains unclear.

Objectives: To determine whether a different peripheral immune profile and NLR were present in PD patients.

Methods: We conducted a case-control study that included 377 PD patients and 355 healthy controls

***Correspondence to:** Dr. Pablo Mir, Unidad de Trastornos del Movimiento, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013, Seville, Spain; E-mail: pmir@us.es

Relevant conflicts of interest/financial disclosures: No authors have actual or potential conflicts of interest.

Funding agencies: 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. 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 Hortega" program [CM18/00142] from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII-FEDER). Juan F. Martín-Rodríguez was supported by the VI-PPIT-US from the University of Seville [USE-18817-A]. Miguel Ángel Labrador-Espinosa was supported by the University of Seville [USE-19094-G].

Received: 29 January 2021; **Revised:** 6 May 2021; **Accepted:** 17 May 2021

Published online 8 June 2021 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/mds.28685

(HCs). Leukocytes, subpopulations, and the NLR were measured. Multivariate linear regression analyses were applied to determine the differences between groups and the association between NLR and clinical characteristics in PD. A meta-analysis was performed to clarify the association between NLR and PD.

Results: In our case-control study, the NLR was significantly higher in PD patients compared with HCs (2.47 ± 1.1 vs. 1.98 ± 0.91 , $P < 0.001$). No association between NLR and age at onset, disease severity, or disease duration was found. The meta-analysis showed that the NLR was likely to be higher in PD patients.

Conclusions: PD patients had an altered peripheral immune profile and a higher NLR compared with HCs. © 2021 International Parkinson and Movement Disorder Society

Key Words: Parkinson's disease; neutrophil-to-lymphocyte ratio; neuroinflammation; inflammatory markers; meta-analysis

El editor no permite publicar la versión completa del artículo en acceso abierto. La versión completa está disponible en: <https://doi.org/10.1002/mds.28685>.

SUPPORTING INFORMATION 1

Meta-analysis

a. Methods

- *Search strategy and eligibility criteria*

A comprehensive literature search was conducted in electronic scientific databases (PubMed, Scopus, Ovid, Medline, Embase, Web of Science, and Cochrane) in October 2020 to identify relevant case-control studies on the association between NLR and PD. We used the following search string: "Parkinson" OR "Parkinson's Disease" AND "neutrophil" AND "lymphocyte" OR "neutrophil lymphocyte ratio". Articles were included if the following inclusion criteria were met: (1) case-control studies describing the association between the NLR and PD; (2) studies had an HC group; and (3) studies had to include both means and standard deviations or sufficient statistical information (t , F , χ , Z -scores or p -values). No restrictions were applied regarding sample size, language, or time of publication. To assess additional studies not indexed in common databases, all retrieved references of the enrolled studies and recent published review articles were also checked.

- *Data extraction*

Two investigators (LMD and DMG) independently extracted the data. Discrepancies were resolved by a third investigator (SJM). We collected the following data: (1) general information: first author, publication year, country of the study participants, study design, and cohort selected; (2) individual characteristics: sample size, age, sex, medical diseases, and dopaminergic treatment, disease duration and severity in PD patients; (3) mean and standard deviation of the NLR; and (4) laboratory method. The corresponding author of the studies was contacted for further information when required.

- *Statistical analysis*

The "metaphor" package in R was used. Effect sizes were calculated as standardized mean differences of NLR between PD patients and HCs using the Hedges' g statistic, which provides an unbiased effect size adjusted for sample size. If the median and range were reported, the data were transformed into mean and standard deviation according to the methods described by McGrath et al.³⁸

Between-study heterogeneity was assessed using the Cochrane Q test and I^2 statistic. When heterogeneity was significant ($p < 0.05$ or $I^2 > 50\%$), we used the random effects

model to evaluate the overall effect size; otherwise, the fixed effects model was used. Publication bias was evaluated by a funnel plot and Egger's test. Sensitivity analyses were undertaken to assess the influence of individual studies on the overall effect estimate. Subgroup and meta-regression analyses using mixed-effects models were conducted to detect the sources of heterogeneity.

b. Results

Figure 1. PRISMA flowchart of the literature search and study selection process.

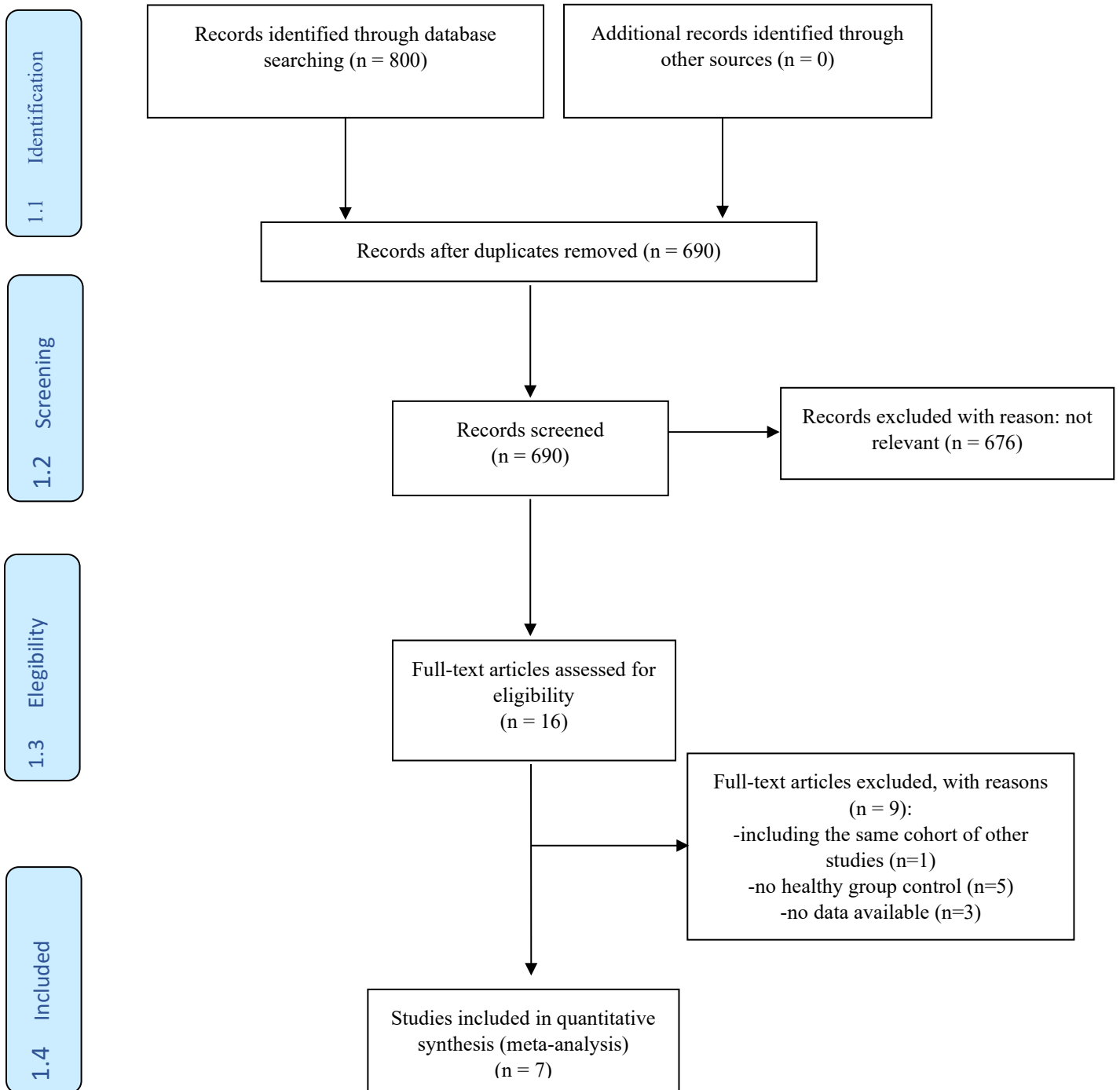


Table S1. Main descriptive data of individual case-control studies included in the meta-analysis.

Study name	Year	HC N	HC NLR mean \pm SD	HC Age (y) mean \pm SD	HC % men	PD n	PD NLR mean \pm SD	PD Age (y) mean \pm SD	PD % men	Disease duration (y) mean \pm SD
Akil et al ²¹	2015	50	2.1 \pm 0.32	65.9 \pm 10.1	52	51	3.1 \pm 1.3	69.5 \pm 9.3	56.86	6.1 \pm 5.2
Uçar et al ²²	2016	60	2.46 \pm 1.04	70.5 \pm 7.86	31.7	46	2.66 \pm 1.05	72.74 \pm 8.66	47.8	4.22 \pm 3.08
Büyükoyuncu Pekel et al ²³	2018	21	2.56 \pm 1.48	62.29 \pm 5.77	33.33	17	2.22 \pm 0.76	65.06 \pm 6.38	41.18	N/A
Sanjari et al ²⁴	2018	148	2.2 \pm 0.8	61.1 \pm 11.3	66.9	388	2.5 \pm 0.9	61.7 \pm 9.6	65.4	M 4 (IQR 0-36)
Jiang et al - EOPD ²⁵	2019	42	1.89 \pm 0.77	M 46.50 (IQR 5)	38.1	61	1.73 \pm 0.56	M 48 (IQR 7)	53.2	M 3 (IQR 3.5)
Jiang et al - LOPD ²⁵	2019	57	1.54 \pm 0.53	M 61 (IQR 9)	40.4	54	2.04 \pm 0.89	M 60 (IQR 6)	47.3	M 2 (IQR 3)
Inci et al ²⁹	2019	40	2.13 \pm 0.77	65.05 \pm 6.52	55	42	2.24 \pm 1.03	66.59 \pm 9.54	54.8	7.42 \pm 4.62
Jin et al ²⁶	2020	89	3 \pm 1.5	62.1 \pm 7.13	N/A	183	2.91 \pm 1.74	59.7 \pm 10.58	N/A	N/A
Muñoz- Delgado et al	2020	355	1.98 \pm 0.91	59.23 \pm 15.06	47.89	377	2.47 \pm 1.1	63.7 \pm 11.91	58.09	8.44 \pm 6.21

HC, healthy control; PD, Parkinson's disease; N, number of subjects; NLR, neutrophil to lymphocyte ratio; y, years; M, median; IQR: interquartile range; N/A, non-available.

Figure S2. Funnel plot. No evident asymmetry was observed, as demonstrated by the absence of asymmetries in the funnel plot and confirmed by Egger's test ($p=0.49$).

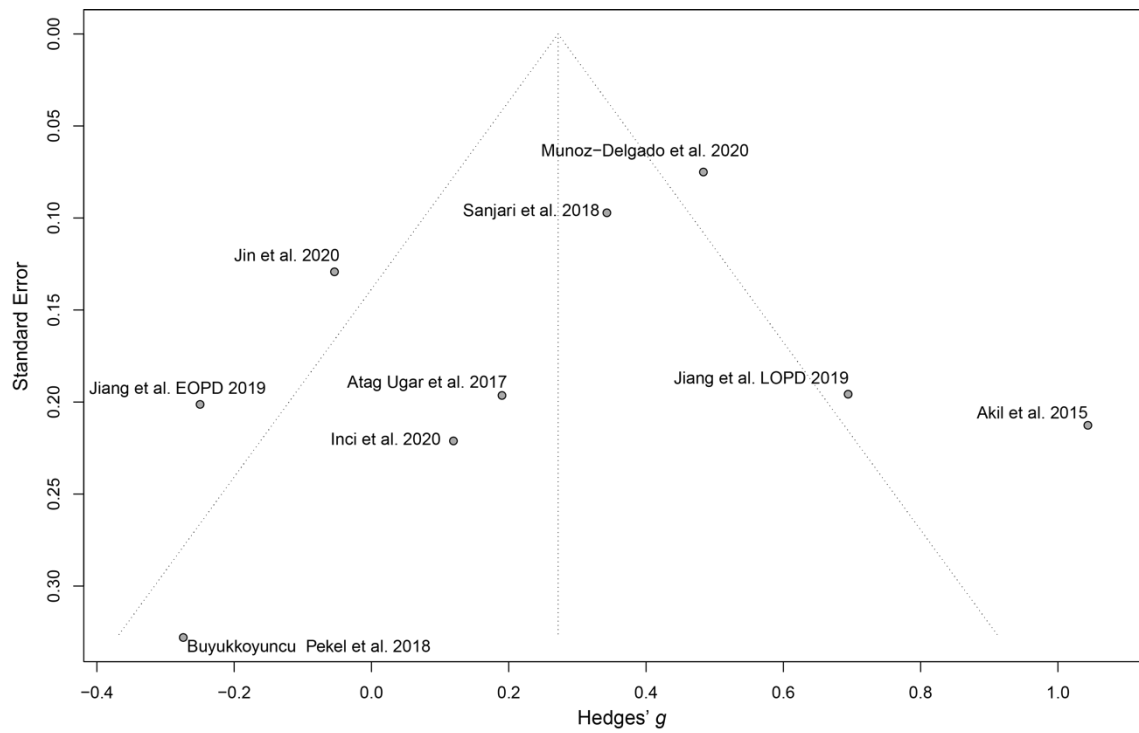


Figure S3. Baujat Plot graphic. The contribution of each study to the overall heterogeneity was reflected on the horizontal axis, and its influence on the pooled effect size on the vertical axis. The Baujat Plot showed that the Akil et al study had a major influence on the global heterogeneity with little impact on the global effect size, whereas our study was the most influential on the global effect size.

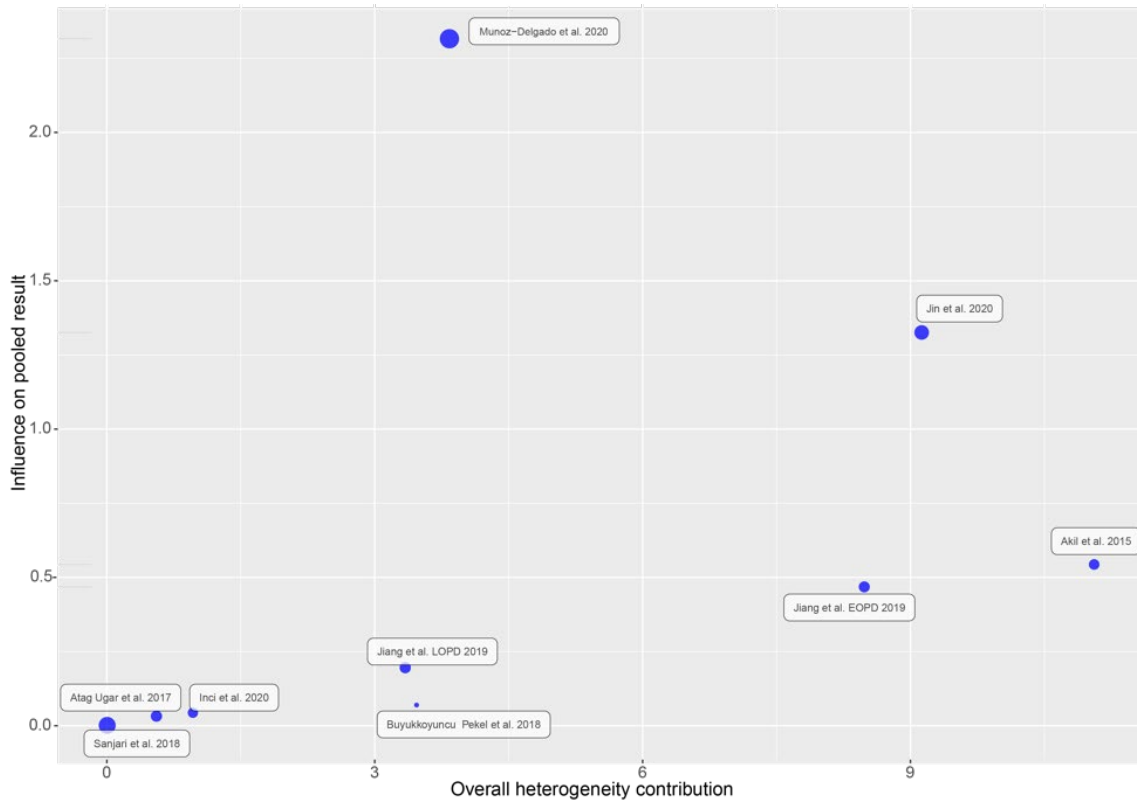


Figure S4. Forest plot excluding Akil et al study. When the meta-analysis was repeated excluding the Akil et al study, the overall effect size remained the same and the heterogeneity did not substantially decrease.

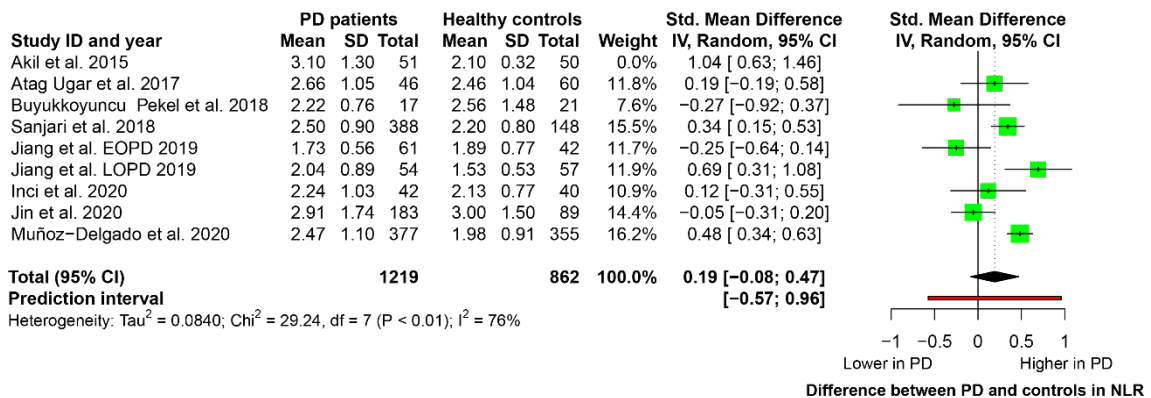


Table S2. Meta-regression analyses: no heterogeneity was identified among studies.

	R ²	P value
Year of publication	12.47%	0.1879
Age of PD patients	7.42%	0.2374
Sex of PD patients	0%	0.4292

PD, Parkinson's disease

SUPPORTING INFORMATION 2

Case-control study

a. Methods

Exclusion criteria of participants: participants with cancer, active or chronic autoimmune, inflammatory, or infectious diseases, and those receiving immunosuppressive therapy. Individuals with severe renal failure or severe hepatic disease and those whose CRP, neutrophil, and/or lymphocyte count were above the upper limit of the normal range (CRP >15 mg/dl, neutrophils >8000 cells/ μ L, lymphocytes >4000 cells/ μ L) were also excluded.

b. Results

Table S3. Association between neutrophil-to-lymphocyte ratio and characteristics of Parkinson's disease patients.

	Neutrophil-to-lymphocyte ratio
Levodopa equivalent daily dose	β weight = + 0.04; F (3,350) = 4.511, p<0.001 ^a
Disease duration	β weight = + 0.01; F (3,346) = 0.89, p=0.45 ^b
Hoehn & Yahr stage	β weight = - 0.07; F (4,314) = 0.92, p=0.45 ^c

^aMultivariate linear regression adjusting for age, sex and disease duration, and after performing a multicollinearity analysis. ^bMultivariate linear regression adjusting for age, sex and levodopa equivalent daily dose, and after performing a multicollinearity analysis. ^cMultivariate linear regression adjusting for age, sex and disease duration, and after performing a multicollinearity analysis.

Table S4. Clinical motor severity based on Hoehn & Yahr stage in Parkinson's disease group.

	HY 1-1.5 (n=54)	HY 2-2.5 (n=210)	HY 3 (n=50)	HY 4-5 (n=22)	p value
Age (y), mean \pm SD	60.82 \pm 10.9	62.16 \pm 11.87	66.42 \pm 11.22	75.02 \pm 8.04	<0.001 ^a
Sex (% males)	63	64.3	46	31.8	<0.05 ^a
Disease duration (y), mean \pm SD	5.14 \pm 4.07	8.64 \pm 6.38	12.03 \pm 7.62	12.54 \pm 6.24	<0.001 ^a
LEDD (mg), mean \pm SD	441.65 \pm 380.63	737.43 \pm 467.65	796.93 \pm 400.3	912.14 \pm 478.58	<0.001 ^a
NLR, mean \pm SD	2.25 \pm 0.83	2.51 \pm 1.19	2.45 \pm 1.1	2.39 \pm 0.91	0.36 ^b

HY, Hoehn & Yahr; N, number of subjects; y, years; SD, standard deviation; LEDD, levodopa equivalent daily dose; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio. ^aLinear regression. ^bAnalysis of variance, adjusting by sex, age, levodopa equivalent daily dose and disease duration; which was performed after a multivariate linear regression [F(7,307)=2.11, p value<0.05].

Table S5. Association between the neutrophil-to-lymphocyte ratio and dyskinesias in Parkinson's disease group.

	Dyskinesias (n=176)	No dyskinesias (n=201)	p value
Age (y), mean \pm SD	63.68 \pm 11.53	63.72 \pm 12.27	0.97 ^a
Sex (% males)	55.1	60.7	0.32 ^b
Disease duration (y), mean \pm SD	11.88 \pm 6.3	6.11 \pm 5.31	<0.001 ^a
LEDD, mean \pm SD	954.05 \pm 441.54	497.42 \pm 354.42	<0.001 ^a
NLR, mean \pm SD	2.58 \pm 1.17	2.37 \pm 1.04	0.98 ^c

N, number of subjects; y, years; SD, standard deviation; LEDD, levodopa equivalent daily dose; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio. ^aBased on Welch two-sample t-tests. ^bBased on Chi-squared test. ^cMultivariate linear regression adjusting for age, sex, disease duration and LEDD.

Table S6. Association between the neutrophil-to-lymphocyte ratio and motor fluctuations in Parkinson’s disease patients.

	Motor fluctuations (n=156)	No motor fluctuations (n=186)	p value
Age (y), mean ± SD	63.3 ± 11.38	63.32 ± 12.31	0.98 ^a
Sex (% males)	58.3	57.5	0.97 ^b
Disease duration (y), mean ± SD	12.55 ± 6.4	5.5 ± 4.6	<0.001 ^a
LEDD, mean ± SD	1008.44 ± 406.42	450.27 ± 329.2	<0.001 ^a
NLR, mean ± SD	2.58 ± 1.05	2.39 ± 1.11	0.67 ^c

N, number of subjects; y, years; SD, standard deviation; LEDD, levodopa equivalent daily dose; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio. ^aBased on Welch two-sample t-tests. ^bBased on Chi-squared test. ^cMultivariate linear regression adjusting for age, sex, disease duration and LEDD.

Table S7. Association between disease duration and neutrophil-to-lymphocyte ratio in Parkinson’s disease patients.

	Disease duration ≥ 5 years (n=246)	Disease duration < 5 years (n=126)	p value
Age (y), mean ± SD	65.24 ± 11.14	60.17 ± 12.48	< 0.001 ^a
Sex (% males)	56.5%	61.9%	0.32 ^b
LEDD, mean ± SD	898.41 ± 414.43	343.26 ± 258.34	< 0.001 ^a
NLR, mean ± SD	2.57 ± 1.09	2.25 ± 1.08	0.56 ^c

N, number of subjects; y, years; SD, standard deviation; LEDD, levodopa equivalent daily dose; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio. ^aBased on Welch two-sample t-tests. ^bBased on Chi-squared test. ^c Multivariate linear regression adjusting for age, sex and LEDD.

Table S8. Association between age at onset of Parkinson’s disease and neutrophil-to-lymphocyte ratio in Parkinson’s disease group.

	Age at onset ≤ 50 years (n=142)	Age at onset > 50 years (n=230)	p value
Age (y), mean ± SD	52.39 ± 8.2	70.4 ± 7.83	< 0.001 ^a
Sex (% males)	66.2	53.5	< 0.05 ^b
LEDD, mean ± SD	816.54 ± 494.6	652.21 ± 415.02	< 0.001 ^a
NLR, mean ± SD	2.48 ± 1.19	2.45 ± 1.03	0.56 ^c

N, number of subjects; y, years; SD, standard deviation; LEDD, levodopa equivalent daily dose; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio. ^aBased on Welch two-sample t-tests. ^bBased on Chi-squared test. ^c Multivariate linear regression adjusting for age, sex and LEDD.

6.2. PERIPHERAL INFLAMMATORY IMMUNE RESPONSE DIFFERS AMONG SPORADIC AND FAMILIAL PARKINSON'S DISEASE

Publicado como:

Muñoz-Delgado L, Macías-García D, Periñán MT, Jesús S, Adarmes-Gómez AD, Bonilla Toribio M, Buiza Rueda D, Jiménez-Jaraba MV, Benítez Zamora B, Díaz Belloso R, García-Díaz S, Martín-Bórnez M, Pineda Sánchez R, Carrillo F, Gómez-Garre P, Mir P. **Peripheral inflammatory immune response differs among sporadic and familial Parkinson's disease.** *NPJ Parkinson's disease* 2023 Jan; 9(1):12. DOI: [10.1038/s41531-023-00457-5](https://doi.org/10.1038/s41531-023-00457-5)

ARTICLE OPEN



Peripheral inflammatory immune response differs among sporadic and familial Parkinson's disease

Laura Muñoz-Delgado^{1,2}, Daniel Macías-García^{1,2}, María Teresa Periñán^{1,2}, Silvia Jesús^{1,2}, Astrid D. Adarmes-Gómez^{1,2}, Marta Bonilla Toribio^{1,2}, Dolores Buiza Rueda^{1,2}, María del Valle Jiménez-Jaraba¹, Belén Benítez Zamora¹, Rafael Díaz Belloso^{1,2}, Sergio García-Díaz^{1,2}, Miguel Martín-Bórnez¹, Rocío Pineda Sánchez^{1,2}, Fátima Carrillo^{1,2}, Pilar Gómez-Garre^{1,2} and Pablo Mir^{1,2,3}✉

Peripheral inflammatory immune responses are thought to play a major role in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD). The neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), a biomarker of systemic inflammation, has been reported to be higher in patients with PD than in healthy controls (HCs). The present study was aimed at determining if the peripheral inflammatory immune response could be influenced by the genetic background of patients with PD. We included a discovery cohort with 222 patients with PD (132 sporadic PD, 44 *LRRK2*-associated PD (with p.G2019S and p.R1441G variants), and 46 *GBA*-associated PD), as well as 299 HCs. Demographic and clinical data were recorded. Leukocytes and their subpopulations, and the NLR were measured in peripheral blood. Multivariate lineal regression and post-hoc tests were applied to determine the differences among the groups. Subsequently, a replication study using the Parkinson's Progression Markers Initiative cohort was performed which included 401 patients with PD (281 sPD patients, 66 *LRRK2*-PD patients, 54 *GBA*-PD patients) and a group of 174 HCs. Patients with sporadic PD and *GBA*-associated PD showed a significantly lower lymphocyte count, a non-significantly higher neutrophil count and a significantly higher NLR than HCs. The peripheral inflammatory immune response of patients with *LRRK2*-associated PD did not differ from HCs. Our study supports the involvement of a peripheral inflammatory immune response in the pathophysiology of sPD and *GBA*-associated PD. However, this inflammatory response was not found in *LRRK2*-associated PD, probably reflecting different pathogenic inflammatory mechanisms.

npj Parkinson's Disease (2023)9:12; <https://doi.org/10.1038/s41531-023-00457-5>

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease whose etiopathogenesis is still unknown. PD is considered to result from a complex interplay between aging, genetic susceptibility, and exposure to environmental factors¹. A wide variety of hypotheses have been put forward to explain the cause of neurodegeneration in PD, including inflammation. Both central and peripheral inflammatory immune responses have been documented in PD and they are thought to play a major role in the initiation and progression of neurodegeneration in PD^{2–8}. Ageing itself, the major risk factor for PD, is also associated with a low-grade inflammatory status of the immune system.

To begin with, studies have shown that neurodegeneration in PD is accompanied by microglial activation, but also the substantia nigra of patients with PD has been shown to be infiltrated by T lymphocytes^{2,3}. Moreover, a brain-periphery interaction is suggested to be present in PD. Cytokines, which communicate and modulate peripheral and central immune compartments, seem to be dysregulated in the blood, cerebrospinal fluid and brains of patients with PD compared to healthy controls (HCs)⁵. Concerning the peripheral immune activation, leukocytes (which are the immune cells in peripheral blood) and their subpopulations have been described to be quantitatively and qualitatively altered in patients with PD⁴. A decreased absolute lymphocyte count and particularly an impairment in CD4+ T cells subpopulation have been consistently reported in

the literature^{7,9}. It has been hypothesised that this dysregulation in lymphocytes population may diminish their protective immune function and promote a pro-inflammatory environment that could contribute to neurodegeneration⁷. In fact, it has recently been reported that a lower lymphocyte count might be causally related to the subsequent development of PD¹⁰. Even so, there are discrepancies between findings in T lymphocytes populations dysregulation, which may be explained by the heterogeneous cohorts evaluated in the studies. On the other hand, a higher neutrophil count in patients with PD has been also described in many cohorts⁹. However, few studies have specifically addressed the role of neutrophils in PD etiopathogenesis and whether the alterations in this population are cause or consequence remains to be further studied. More recently, our group has also studied the peripheral immune response in patients with PD compared to HCs through the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), a well-established non-invasive indicator of the overall inflammatory status of the organism^{11,12}. Our group reported that patients with PD had an altered peripheral immune response and a higher NLR compared with HCs, supporting the existence of an inflammatory systemic status in PD¹³.

Genetic factors should be also considered in the complex etiopathogenesis of PD. Several genes have been associated with the familial forms of PD, from variants in genes responsible for Mendelian forms of the disease (such as leucine-rich repeat kinase 2, *LRRK2*) to common risk *loci* that increase susceptibility for PD (such as heterozygous variants in glucocerebrosidase, *GBA*,

¹Unidad 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. ²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain. ³Departamento de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain. ✉email: mgomez-ibis@us.es; pmir@us.es

gene)^{1,14}. The identification of these genes have provided new insights into PD etiopathogenesis since they encode proteins involved in specific cellular pathways related to immunity and inflammation^{15,16}. Although LRRK2's function in cells is not completely understood, it is highly expressed in immune cells and regulates the immune responses^{4,17}. In patients with PD, it has been described an increased expression of LRRK2 protein levels in immune cells, such as monocytes or lymphocytes^{2,3,15}. Patients with LRRK2-associated PD (LRRK2-PD) may show a more pro-inflammatory cytokine profile compared to HCs, which has been also related to clinical severity¹⁸. Moreover, polymorphisms in the LRRK2 gene have been linked to inflammatory and infectious diseases¹⁴. On the other hand, several studies highlight a link between GBA gene and inflammation in PD¹⁹. Early studies identified increased plasma levels of inflammatory markers and cytokines in GBA-associated PD (GBA-PD) compared to sporadic PD (sPD) patients and HCs²⁰. Even so, there are controversial results between studies, probably due to differences between GBA variants or populations included.

It is worth mentioning that patients with mutations in these PD-associated genes have distinct clinical features and disease progression, which at the same time have been linked to different inflammatory profiles¹⁴. For example, patients with LRRK2-PD are usually considered to have a milder phenotype and to be less likely to develop cognitive impairment compared to sPD or GBA-PD¹⁴. At the same time, clinical features such as a more severe motor impairment or cognitive decline have been associated to a higher pro-inflammatory profile in patients with PD. Due to the complex

genotype, phenotype, and peripheral immune responses described in patients with PD, it could be hypothesized that the different genetic background in patients with PD might be associated with an involvement of different inflammatory pathways.

Altogether, the existing data highlights the importance of studying the peripheral inflammatory immune response in PD patients. We hypothesized that the peripheral inflammatory immune response could be influenced by the genetic background of patients with PD. Subsequently, studies in PD genetic cohorts are needed to better delineate the role of the immune responses on the pathogenesis of the disease. The present study is aimed at determining whether there are differences in the peripheral inflammatory immune response between sPD and the main causes of familial PD (LRRK2-PD and GBA-PD).

RESULTS

Characteristics of the whole case-control study

The demographic characteristics and the peripheral immune profile of the whole PD cohort and HCs from the discovery and the PPMI replication cohorts are summarized in Table 1.

In the discovery cohort, patients with PD were slightly older than HCs, without differences in sex ratio between groups. The mean age of onset was 54.60 ± 12.08 years, the mean disease duration of 8.25 ± 5.75 years and the mean Hoehn & Yahr (HY) stage in OFF state of 2.59 ± 0.94 . Patients with PD had lower lymphocyte and monocyte counts than HCs, but a higher neutrophil count. The NLR was significantly higher in patients

Table 1. Demographic and clinical features, as peripheral immune profile of healthy controls and patients with Parkinson's disease of the discovery cohort and the PPMI replication cohort.

	Discovery cohort			PPMI replication cohort		
	HCs (n = 299)	Patients with PD (n = 222)	P value	HCs (n = 173)	Patients with PD (n = 401)	P value
Age (y), mean \pm SD	59.94 \pm 15.31	62.84 \pm 11.72	< 0.05 ^a	59.8 \pm 12.24	60.88 \pm 10.09	0.27 ^a
Sex (% males)	51.17	55.86	0.29 ^b	64.37	62.30	0.64 ^b
Age of onset (y), mean \pm SD	–	54.60 \pm 12.08	–	–	58.67 \pm 10.25	–
Disease duration (y), mean \pm SD	–	8.25 \pm 5.75	–	–	2.57 \pm 3.55	–
HY in OFF state, mean \pm SD	–	2.59 \pm 0.94	–	–	1.63 \pm 0.53	–
UPDRS-III in OFF state, mean \pm SD	–	–	–	1.20 \pm 2.27	21.08 \pm 9.12	<0.001 ^a
MOCA, mean \pm SD	–	–	–	28.24 \pm 1.14	26.89 \pm 2.55	<0.001 ^a
LEDD, mean \pm SD	–	827.51 \pm 540.76	–	–	80.62 \pm 218.07	–
Leukocyte count (x10 ³ cells/ μ L), mean \pm SD	6.89 \pm 1.7	6.81 \pm 1.51	0.64 ^c	6.16 \pm 1.81	6.24 \pm 1.53	0.58 ^c
Lymphocytes (x10 ³ cells/ μ L), mean \pm SD	2.15 \pm 0.65	1.86 \pm 0.6	<0.001 ^c	1.85 \pm 0.91	1.69 \pm 0.52	<0.05 ^c
Neutrophils (x10 ³ cells/ μ L), mean \pm SD	3.92 \pm 1.25	4.24 \pm 1.27	<0.001 ^c	3.67 \pm 1.17	3.97 \pm 1.27	<0.05 ^c
Monocytes (x10 ³ cells/ μ L), mean \pm SD	0.52 \pm 0.36	0.46 \pm 0.15	<0.05 ^c	0.41 \pm 0.16	0.38 \pm 0.12	<0.05 ^c
Eosinophils (x10 ³ cells/ μ L), mean \pm SD	0.24 \pm 0.36	0.18 \pm 0.41	0.37 ^c	0.17 \pm 0.13	0.16 \pm 0.13	0.12 ^c
Basophils (x10 ³ cells/ μ L), mean \pm SD	0.08 \pm 0.54	0.03 \pm 0.03	0.27 ^c	0.05 \pm 0.03	0.05 \pm 0.03	0.49 ^c
NLR, mean \pm SD	1.98 \pm 0.89	2.51 \pm 1.13	<0.001 ^c	2.18 \pm 0.79	2.53 \pm 1.11	<0.001 ^c

HC healthy control, PD Parkinson's disease, n total number of subjects, y years, SD standard deviation, HY Hoehn & Yahr stage, UPDRS-III Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III, MOCA Montreal Cognitive Assessment, LEDD levodopa equivalent daily dose, NLR neutrophil-to-lymphocyte ratio.

^aBased on Welch two-sample t tests.

^bBased on χ^2 test.

^cBased on multivariate linear regression, adjusting for age and sex.

Table 2. Demographic and clinical data, and peripheral immune profile of healthy controls and Parkinson's disease genetic cohorts of the discovery cohort.

	HCs (<i>n</i> = 299)	sPD (<i>n</i> = 132)	LRRK2-PD (<i>n</i> = 44)	GBA-PD (<i>n</i> = 46)	<i>F</i> value	<i>P</i> value
Age (y), mean ± SD	59.94 ± 15.13	65.05 ± 11.72	62.48 ± 11.07	56.87 ± 10.35	6.28	<0.001 ^a
Sex (% males)	51.17	60.60	38.64	58.70	–	0.05 ^b
Age of onset (y), mean ± SD	NA	56.95 ± 12.09	53.41 ± 12.09	48.96 ± 10.09	9.01	<0.001 ^a
Disease duration (y), mean ± SD	NA	8.05 ± 5.54	9.11 ± 6.32	7.98 ± 5.80	0.62	0.54 ^a
HY in OFF state, mean ± SD	NA	2.03 ± 0.80	2.17 ± 0.73	2.07 ± 0.65	0.54	0.58 ^a
LEDD, mean ± SD	NA	756 ± 491.02	998.63 ± 554.05	867.51 ± 628.19	3.55	0.03 ^a
Leukocyte count (×10 ³ cells/μL), mean ± SD	6.89 ± 1.7	6.78 ± 1.51	6.81 ± 1.51	6.92 ± 1.52	1.61	0.16 ^c
Lymphocytes (×10 ³ cells/μL), mean ± SD	2.15 ± 0.65	1.79 ± 0.62	2.02 ± 0.51	1.9 ± 0.57	8.12	<0.001 ^c
Neutrophils (×10 ³ cells/μL), mean ± SD	3.92 ± 1.25	4.26 ± 1.27	4.06 ± 1.17	4.33 ± 1.38	4.05	<0.005 ^c
Monocytes (×10 ³ cells/μL), mean ± SD	0.52 ± 0.36	0.45 ± 0.13	0.49 ± 0.19	0.48 ± 0.14	2.26	<0.05 ^c
Eosinophils (×10 ³ cells/μL), mean ± SD	0.24 ± 0.36	0.2 ± 0.52	0.16 ± 0.11	0.15 ± 0.11	0.77	0.57 ^c
Basophils (×10 ³ cells/μL), mean ± SD	0.08 ± 0.54	0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.80	0.55 ^c
NLR, mean ± SD	1.98 ± 0.89	2.63 ± 1.13	2.11 ± 0.76	2.55 ± 1.33	12.06	<0.001 ^c

HC healthy control, PD Parkinson's disease, *n* total number of subjects, *y* years, *SD* standard deviation, *HY* Hoehn & Yahr stage, *LEDD* levodopa equivalent daily dose, *NLR* neutrophil-to-lymphocyte ratio.

^aBased on linear regression and analysis of covariance (ANCOVA).

^bBased on χ^2 test.

^cBased on multivariate linear regression, adjusting for age and sex.

with PD than in HCs. The differences remained statistically significant after adjusting for age and sex.

In the PPMI replication cohort, there were no differences in age and sex between the whole PD cohort and HCs. The mean age of onset was 58.67 ± 10.25, and they had a shorter disease duration (2.57 ± 3.55 years) and a minor motor disease severity (in OFF state, HY stage of 1.63 ± 0.53 and MDS Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III (MDS-UPDRS-III) scale of 21.08 ± 9.12 points) compared to the discovery cohort. Lower lymphocyte and monocyte count as well as a higher neutrophil count were also found among the whole PD group compared to HCs. Patients with PD had a significantly higher NLR than HCs. The differences remained statistically significant after adjusting for age and sex.

Parkinson's disease cohorts' study

Discovery cohort study. The demographic and clinical characteristics of the different PD cohorts (sPD, LRRK2-PD, and GBA-PD) and HCs from the discovery cohort are shown in Table 2. The sPD group was older than HCs. The GBA-PD group was younger and showed a lower age of PD onset than sPD and LRRK2-PD. sPD and GBA-PD had a predominance of males, whereas LRRK2-PD showed a higher proportion of females. There were no differences between groups either in the duration or severity of the disease according to HY stage. The levodopa equivalent daily dose (LEDD) was higher in the LRRK2-PD patients compared to sPD.

When we compared the leukocyte subpopulations among the different PD cohorts and HCs, we found statistically significant differences in lymphocytes [$F(5,515) = 8.12, p < 0.001$], neutrophils [$F(5,515) = 4.05, p < 0.005$], and monocytes [$F(5,515) = 2.26, p < 0.05$] counts and also in the NLR [$F(5,515) = 12.06, p < 0.001$], after adjusting for sex and age (Table 2).

We subsequently accomplished multiple comparisons to determine the differences in the peripheral immune response between groups (Fig. 1a–d). The complete results of post hoc tests in the discovery cohort are described in Supplementary Information 1, part A, supplementary Tables 1, 3, 5, and 7.

The lymphocyte count was significantly lower in sPD and GBA-PD groups than in HCs. The neutrophil count was higher in the sPD and GBA-PD groups than in HCs, although these differences did not achieve statistical significance ($p = 0.14$ and $p = 0.17$, respectively). Finally, sPD and GBA-PD also had a significantly higher NLR than HCs. On the other hand, the LRRK2-PD group did not show significant differences in either the lymphocyte or the neutrophil count or in the NLR when compared to HCs.

Regarding the monocyte count, there was a marginal difference in the monocyte count between sPD and HCs ($p = 0.05$), without statistically significant differences among other groups. No differences were found in the leukocyte count nor in the basophils and eosinophils count.

Finally, since there was a higher female predominance in LRRK2-PD group, we also studied the peripheral inflammatory immune response stratified per sex. These results are shown in Supplementary Information 1, Part B, Supplementary Tables 9–15.

In both males and females' cohorts, there were statistically significant differences in both lymphocyte counts and the NLR among PD groups and HCs. After multiple comparisons analyses, it was demonstrated that both lymphocyte counts and the NLR were higher in sPD in both males ($p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively) and females ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively) compared to HCs. Although a trend towards a lower lymphocyte count was observed in males in GBA-PD group compared to HCs, it was not statistically significant ($p = 0.06$). Concerning other

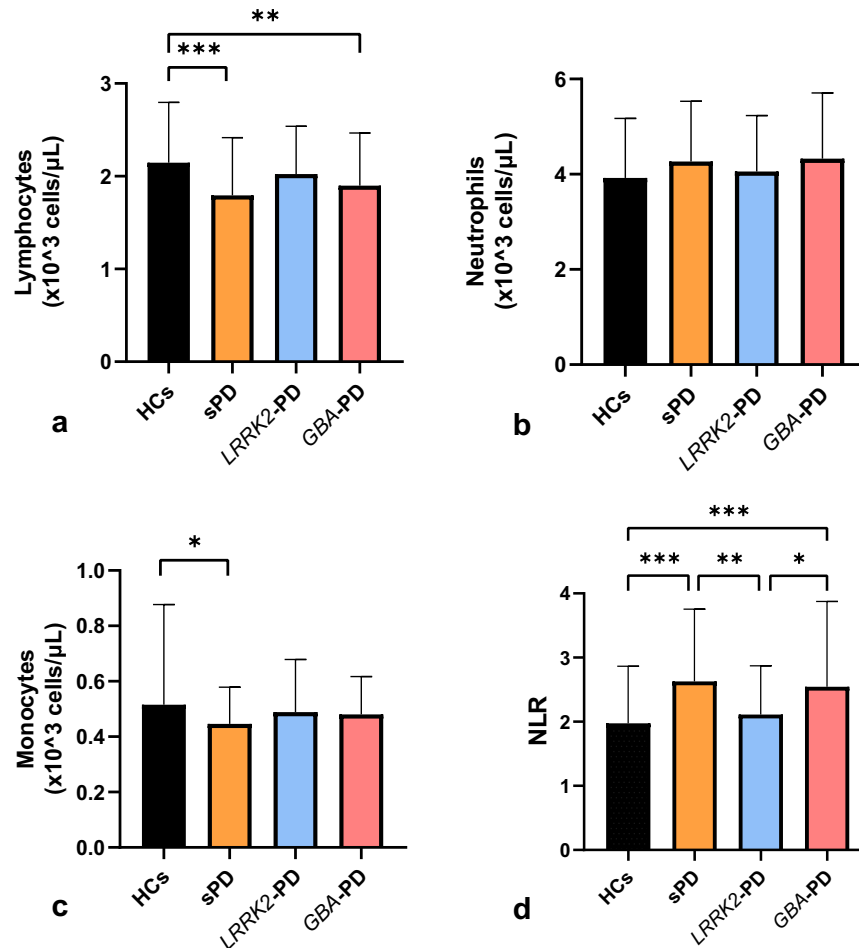


Fig. 1 Peripheral inflammatory immune profile among sporadic and familial forms of Parkinson's disease (PD) and healthy controls of the discovery cohort. *Multiple comparisons of lymphocytes (a), neutrophils (b), monocytes (c), and neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) (d) among healthy controls (HCs), sporadic PD patients (sPD), *GBA*-associated PD patients (*GBA*-PD, and *LRRK2*-associated PD patients (*LRRK2*-PD). Numbers shown as means \pm SD with multivariate lineal regression and post hoc testing for multiple comparisons as appropriate. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.05$, * $p \leq 0.1$.

blood cell counts, males showed a barely non-significant higher neutrophil count ($p = 0.1$) and a lower monocyte count ($p = 0.06$) in sPD compared to HCs, which were not observed in the female cohort. On the other hand, the *LRRK2*-PD group did not show significant differences in either the lymphocyte or the neutrophil count or in the NLR in sex-stratified PD groups when compared to HCs.

PPMI replication cohort study. Having found differences in the peripheral immune response among the different PD cohorts, we next tested our results for replication in an independent PPMI cohort. The detailed features of this cohort are shown in Table 3. No differences in age were found among groups. Whereas HCs, sPD, and *GBA*-PD had a male predominance, the *LRRK2*-PD showed a female predominance. Disease duration, motor, and cognitive impairment, as well as dopaminergic treatment were different among PD patients' cohorts. Patients with *LRRK2*-PD showed a longer disease duration and a higher LEDD compared to the other groups. These differences are due to the different eligibility criteria in PPMI study for sPD and genetic cohorts (see Methods section).

Statistically significant differences were also found in lymphocytes [$F(5568) = 3.02$, $p < 0.05$], neutrophils [$F(5568) = 3.31$, $p < 0.05$], and monocytes [$F(5576) = 8.81$, $p < 0.001$] counts and also in the NLR [$F(5564) = 7.55$, $p < 0.001$] among PD cohorts and HCs, after adjusting for sex and age.

Again, we subsequently accomplished multiple comparisons to determine the differences in the peripheral immune response between groups. The complete results of post-hoc tests in the PPMI replication cohort are shown in Supplementary Information 1, Part A, Supplementary Tables 2, 4, 6, and 8.

A lower lymphocyte count was found in sPD and *GBA*-PD than in HCs, but it was only statistically significant in the sPD group. Both sPD and *GBA*-PD had higher neutrophil count than HCs, but it was only significant in the *GBA*-PD group. Finally, the NLR was significantly higher in both sPD and *GBA*-PD groups compared to HCs. Again, no differences in either the lymphocyte, or neutrophil counts or the NLR were found between the *LRRK2*-PD group and the HCs.

The monocyte count showed differences between groups. However, after performing multiple comparisons test, only a marginally significant difference was found between sPD and HC ($p = 0.06$), without differences between other groups. No differences were found in leukocytes, basophils, nor eosinophils between groups.

Finally, since there was also a female predominance in *LRRK2*-PD group in PPMI replication cohort, we also tested our results for replication in sex-stratified analyses. Detailed results are shown in Supplementary Information 1, Part A, Supplementary Tables 16–21.

Females showed lower lymphocyte and monocyte counts in sPD group compared to HCs, which was not observed in males. On

Table 3. Demographic and clinical data, and peripheral immune response of healthy controls and Parkinson's disease genetic cohorts of the PPMI replication cohort.

	HCs (n = 174)	sPD (n = 281)	LRRK2-PD (n = 66)	GBA-PD (n = 54)	F value	P value
Age (y), mean ± SD	59.8 ± 12.24	60.99 ± 10.12	61.64 ± 10.18	59.37 ± 9.9	0.87	0.46 ^a
Sex (% males)	64.37	69.04	44.71	55.74	–	<0.001 ^b
Age of onset (y), mean ± SD	–	59.54 ± 10.41	56.92 ± 10.57	56.97 ± 10.41	2.81	0.06 ^a
Disease duration (y), mean ± SD	–	1.93 ± 1.84	4.63 ± 2.77	2.40 ± 2.15	45.64	<0.001 ^a
HY in OFF state, mean ± SD	–	1.57 ± 0.50	1.95 ± 0.62	1.63 ± 0.53	11.84	<0.001 ^a
MDS-UPDRS-III in OFF state, mean ± SD	–	21 ± 8.83	19.18 ± 8.23	23.57 ± 11.06	3.161	<0.05 ^a
MOCA, mean ± SD	28.24 ± 1.14	27.11 ± 2.30	25.75 ± 3.38	27.11 ± 2.25	22.54	<0.001 ^a
LEDD, mean ± SD	–	1.64 ± 20.25	428.45 ± 339.28	72.95 ± 187.97	204.13	<0.001 ^a
Leukocyte count (×10 ³ cells/μL), mean ± SD	6.16 ± 1.81	6.18 ± 1.49	6.32 ± 1.79	6.48 ± 1.45	1.34	0.25 ^c
Lymphocytes (×10 ³ cells/μL), mean ± SD	1.85 ± 0.91	1.66 ± 0.50	1.86 ± 0.61	1.66 ± 0.45	3.02	<0.05 ^c
Neutrophils (×10 ³ cells/μL), mean ± SD	3.67 ± 1.17	3.93 ± 1.24	3.94 ± 1.41	4.22 ± 1.25	3.31	<0.05 ^c
Monocytes (×10 ³ cells/μL), mean ± SD	0.41 ± 0.16	0.38 ± 0.13	0.37 ± 0.11	0.40 ± 0.12	8.81	<0.001 ^c
Eosinophils (×10 ³ cells/μL), mean ± SD	0.17 ± 0.13	0.16 ± 0.14	0.15 ± 0.09	0.14 ± 0.09	1.24	0.29 ^c
Basophils (×10 ³ cells/μL), mean ± SD	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.04	1.95	0.08 ^c
NLR, mean ± SD	2.18 ± 0.79	2.56 ± 1.16	2.28 ± 0.92	2.68 ± 0.99	7.55	<0.001 ^c

HC healthy control, PD Parkinson's disease, n total number of subjects, y years, SD standard deviation, HY Hoehn & Yahr stage, MDS-UPDRS-III MDS Unified Parkinson's disease rating part III scale, Montreal Cognitive Assessment, LEDD levodopa equivalent daily dose, NLR neutrophil-to-lymphocyte ratio.

^aBased on linear regression and analysis of covariance (ANCOVA).

^bBased on χ^2 test.

^cBased on multivariate linear regression, adjusting for age and sex.

the other hand, males showed a barely non-significant higher neutrophil count in sPD compared to HCs ($p = 0.1$), not observed in females. On top of that, in both male and female cohorts, there were statistically significant differences in the NLR among PD groups and HCs. After multiple comparisons analyses, the NLR was higher in sPD in males, and seemed to be higher in females compared to HCs, although the later did not reach an statistically significant level ($p = 0.18$). Again, the LRRK2-PD group did not show significant differences in either the lymphocyte or the neutrophil count or in the NLR in sex-stratified PD groups when compared to HCs.

Association of peripheral immune responses with PD clinical characteristics. Firstly, no correlation was found between disease duration and the peripheral inflammatory immune response studied in either the discovery cohort or the PPMI replication cohorts. Concerning motor impairment, no correlation was found between HY stage and the peripheral immune response in either the discovery or the PPMI replication cohort. Interestingly, a positive mild statistically significant correlation was found between the NLR, and the MDS-UPDRS-III scale in the whole PD cohort in the replication cohort. Moreover, this correlation seemed to be present regardless of the genetic status of patients with PD. Concerning cognitive impairment, no correlation was found between the MOCA score and the peripheral inflammatory immune response studied in the PPMI replication cohort. Detailed results are shown in the Supplementary Information 1, Part C.

DISCUSSION

This study specifically analysed if the peripheral inflammatory immune response could be different between sporadic and familial forms of PD. Our data indicated that sPD and GBA-PD had a significant lower lymphocyte count, a higher neutrophil count and a significantly higher NLR than HCs, supporting the presence of a peripheral inflammatory immune response. However, the LRRK2-PD group did not show differences in any leukocyte subpopulation nor in the NLR when compared to HCs. Remarkably, these results were replicated in the PPMI cohort.

Our results showed a higher NLR in the whole PD patients' cohort when compared to HCs, which is in line with previous reports¹³. This ratio has been extensively used as a biomarker of peripheral inflammation. The NLR integrates information from two leukocyte subpopulations: neutrophils are associated with chronic inflammation²¹, and lymphocytes might represent the regulatory pathway.

The decreased absolute lymphocyte count in patients with PD is also consistent with the data reported in the literature^{2,3,7,22}. There is growing evidence supporting the crucial involvement of T lymphocytes subpopulations in PD^{20,23–25}. A meta-analysis including 21 case-control studies and 943 patients with PD supported that the numbers of CD3+ and CD4+ T lymphocytes were significantly decreased in PD²⁶. In contrast with these results, other studies have found that patients with PD had an increase in the percentage of CD3+ and CD4+ T cells, whereas other groups did not find any significant differences compared to HCs²⁴. Based

on previous studies published, this decrease of CD4 + T cells could be due to an imbalance of specific subpopulations in peripheral blood responsible for different immune functions^{4,7,24}. It has been observed an increased proportion of Th1 and Th17 cells (which are pro-inflammatory) and a decreased number of Th2 cells (which have anti-inflammatory functions), that could lead to a functional pro-inflammatory Th1-biased immune response in PD^{27,28}. However, other groups have published an increase of Th17 and Th2 cells, without changes in Th1²². Diverse reports have been also reported on regulatory T cells, which are considered to have modulatory functions^{22,27–31}. As discussed in detail below, the differences found in the lymphocyte counts between the different studies might be in part due to the genetic background. According to our results, the peripheral inflammatory immune response seems to differ between sporadic and some genetic forms of the disease, particularly in *LRRK2*-PD. Altogether, these findings could suggest that most patients with PD may exhibit a deficient suppression of the proinflammatory response that could result in the loss of vulnerable dopaminergic neurons.

Mixed results have been published involving neutrophils and monocytes in PD. Regarding neutrophils, we reported higher levels in the whole PD cohort than in HCs. The increase in the neutrophil count was also present in the sPD and *GBA*-PD groups in our discovery cohort, but it was not replicated in the PPMI cohort. Whereas our findings are in line with other case-control studies^{32–34}, others have failed to find differences in the total neutrophil count in patients with PD³⁵. It has been also described that rather than quantitative changes, impairments in the neutrophil function could also be playing a role in PD³⁶. However, our study design does not allow us to evidence it.

In addition, monocytes may also contribute to PD pathogenesis. In our study, even though we found a decrease in the monocyte count in the whole PD group compared to HCs, only a marginal difference was identified in the sPD group compared to HCs. Recent studies have suggested a pro-inflammatory dysregulation in monocyte subpopulations as well as an impaired phagocytic function in peripheral monocytes in PD^{7,37–39}. Moreover, it has been reported that sex could influence the inflammatory activation of monocytes in patients with PD, being higher in females compared to males⁴⁰. In this regard, we found contradicting results in both cohorts. Hence, our results should be interpreted with caution as monocytes represent a marginal proportion of the total leukocyte blood count and more specific and functional studies may be necessary to explore the role of monocytes in PD.

Furthermore, we aimed to evaluate whether there was an association between the described peripheral inflammatory immune response and the clinical trajectories of patients with PD. In our study, no correlation was found between disease duration and lymphocyte, neutrophil or monocytes counts, nor with the NLR. Even so, there is some evidence coming mainly from blood cytokines studies that suggest that the inflammatory responses is higher and play a major role in early disease and decline with time^{4,7}. However, the cross-sectional design of our study does not permit us to obtain strong conclusions in this regard. Besides, a higher pro-inflammatory profile based mainly on blood cytokines and imaging features has been related to a more severe motor impairment and to the development of cognitive impairment^{41–43}. Although our results in the PPMI replication cohort suggested a relationship between a higher NLR with a more severe motor impairment based on MDS-UPDRS-III scale, we failed to find an association with MOCA scores. Further studies specifically designed to assess clinical disease progression according to the peripheral immune response are needed, and also taking into account the genetic background.

It is worth mentioning that the controversial described results involving the peripheral inflammatory immune responses in patients with PD could be in part explained by the heterogeneity

of populations included in the studies. To date, few studies have considered the genetic background of the individuals when studying the peripheral inflammatory immune response. The data obtained from our discovery PD cohorts' study showed that the impaired inflammatory response observed in sPD and *GBA*-PD groups was not found in patients with *LRRK2*-PD. Furthermore, these results were replicated in the PPMI cohort as well as in sex-stratified analyses in both cohorts.

Mutations in the *LRRK2* gene are the most frequent cause of autosomal dominant PD, with clinical and pathological phenotypes very similar to sPD^{44,45}. Even so, slight clinical differences have been reported between them. For example, the age at onset of *LRRK2*-PD is slightly lower than sPD and the typical male predominance seen in sPD is not seen in *LRRK2*-PD⁴⁵. In fact, the demographics characteristics of our cohorts coincide with the previous published reports. On top of that, our results support that they could also diverge in pathophysiological mechanisms. Other groups have also attempted to explore the differences in the peripheral immune profile between *LRRK2*-PD and sPD. For example, Brockmann and collaborators found that sPD but not *LRRK2*-PD had significantly higher levels of the pro-inflammatory marker interleukin (IL)-12-p40, the anti-inflammatory marker IL-10 and the brain-derived neurotrophic factor¹⁸. Intriguingly, pro-inflammatory IL-12 species enhance T cell proliferation and promote inflammation by facilitating either Th1 or Th17 differentiation. Moreover, IL-10 is thought to inhibit the expansion and activation of Th1 cells and Th17 cells, and it has been suggested to modulate higher levels of the pro-inflammatory cytokine IL-12 in patients with PD⁴⁶. In contrast, studies performed in the BEAT-PD study cohort did not find differences in the peripheral immune profile (no cellular or cytokines alterations) among patients with PD and mutations in *LRRK2* and *GBA* genes nor in non-manifesting carriers of these mutations^{47,48}.

On top of that, interesting reports have also emerged from animal models. A study performed with mice overexpressing human pathogenic *LRRK2* mutations found that there was not a *LRRK2* expression and/or activation in brain microglia neither a myeloid nor T cell infiltration. These findings suggested that the inflammation and neurodegeneration observed in the brain of the mutant mice could be mediated through circulating inflammatory mediators⁴⁴. More interestingly, they found that although there was an increase in the *LRRK2* expression in leukocytes, there was no difference in the expansion of the number of mononuclear cells between mutant and wild-type mice. At last, a leukocyte proteomic analysis revealed that the mutant *LRRK2* mice had an enrichment of proteins involved in immune pathways such as mitogen-activated protein kinases (MAPK) and nuclear factor κB (NF-κB) signalling. Overall, it may be hypothesised that whereas T lymphocytes could have a more prominent role in sPD etiopathogenesis, inflammation in *LRRK2*-PD could be mediated through circulating inflammatory mediators rather than through a T cell dysregulation.

Pathogenic *GBA* variants constitute the most common genetic risk factor for PD¹⁴. The *GBA* gene encodes the lysosomal enzyme β-glucocerebrosidase (GCase) which mediates the hydrolysis of glucocerebroside. The neurodegenerative manifestations of *GBA*-PD may arise from the loss-of-function of GCase, or from the toxic effects of accumulated lipids; however, it is becoming more apparent that inflammation plays a key role in the pathology of *GBA*-PD^{7,15,49}. In both cohorts of our study, the NLR was higher in *GBA*-PD than HCs and *LRRK2*-PD, supporting the presence of a peripheral inflammatory immune response. It could be hypothesised that mechanisms underlying *GBA*-associated PD could be at least partially shared with those in sporadic PD as *GBA* acts as a risk factor and not as a causative gene in PD. For that reason, in our results, we might observe a similar peripheral inflammatory immune response compared to sPD. Moreover, the decrease in the GCase activity caused by *GBA* pathogenic variants has been

shown to produce an accumulation of GCase substrates, which at the same time impairs lysosomal function and possibly leads to a decrease degradation of pathogenic synuclein, among other substrates. Some studies have suggested that when lysosome is overburdened, lysosomal vesicle contents may be released to extracellular space, activating antigen presentation, and exacerbating inflammatory immune responses through neutrophils and chronic inflammation^{19,50,51}. In addition, it has been reported that monocyte GCase activity is reduced in sPD⁵². It is worth saying that *GBA*-PD patients are clinically different from *LRRK2*-PD or sPD as they commonly have a more aggressive course in terms of dementia and motor progression^{12,53}. Interestingly, both dementia and severe motor impairment in PD have been related with higher levels of peripheral inflammation^{43,54}. In our study, we did not find a link between cognitive impairment and peripheral inflammatory immune response, probably due to the small prevalence of cognitive impairment in our sample. Although it was beyond the scope of this study, the relationship between the peripheral inflammatory status and the more aggressive course of *GBA*-PD deserves further research. Above all, these are preliminary hypothesis which should be taken with caution and further focused studies in *GBA*-PD should be driven to elucidate the link between *GBA* and peripheral inflammatory immune responses.

The strength of our conclusions is tempered by certain limitations. Firstly, the retrospective and cross-sectional design of this study cannot elude that some other variables out of our control might influence the results. However, we applied rigorous exclusion criteria (i.e., inflammatory diseases or cancer) to avoid confounding factors. Even though the LEDD was different among groups, previous studies that evaluated the NLR in drug-naïve PD patients suggested that this alteration was independent of LEDD^{34,55}. Also due to the cross-sectional design of our study, we could not properly study whether the peripheral inflammatory immune response differs across the disease course and clinical progression of PD patients with PD. Second, other inflammatory markers were not available to support systemic inflammation. Further studies with other inflammatory markers and/or lymphocyte subpopulations might be required to further characterize the peripheral inflammatory immune response, particularly in *LRRK2*-PD patients. Despite these limitations, our strength is that the replication study performed supported our significant findings.

In conclusion, our results support the involvement of a peripheral inflammatory immune response in sPD and *GBA*-PD patients. They showed a lower lymphocyte count, a likely a higher neutrophil count and a higher NLR than HCs. However, this peripheral inflammatory immune response was not found in *LRRK2*-PD patients. These findings suggest that pathogenic inflammatory mechanisms underlying *LRRK2*-PD may be different from those underlying sPD. Further prospective and longitudinal studies are required to confirm our results. A better understanding

of the different peripheral inflammatory immune response in sporadic and familial PD is likely to have clinical and therapeutic implications.

METHODS

Participants

We included a discovery cohort consisting of 222 patients with PD and 299 HCs recruited from our Movement Disorder Clinic of the Hospital Universitario Virgen del Rocío in Seville, Spain. Patients with PD were diagnosed following the Movement Disorder Society Clinical Diagnostic Criteria⁵⁶. Patients with PD were classified into three subgroups according to their genetic background: 132 sPD patients, 44 *LRRK2*-PD patients and 46 *GBA*-PD patients. sPD patients did not have any variants in the PD-associated genes. The *LRRK2*-PD group included 33 *LRRK2* p.G2019S PD patients and 11 *LRRK2* p.R1441G PD patients. The list of *GBA* pathogenic variants considered for the inclusion of patients in the *GBA*-PD group is shown in Table 4. HCs were volunteers 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 *LRRK2* or *GBA* genes. In addition, exclusion criteria for all study participants were factors that could influence the immune response at the time of the blood extraction. Therefore, participants with cancer, active or chronic autoimmune, inflammatory, or infectious diseases, and those receiving immunosuppressive therapy were not considered for the study. All subjects underwent a clinical assessment at our centre and the demographic and clinical data were retrospectively obtained by consulting their medical records.

Total leukocyte count and subpopulations (neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, and basophils) in peripheral blood were measured in the Central Laboratory of our center using Sysmex XN automated haematology analyser. It uses a fluorescence flow cytometry with forward-scattered, side-scattered, and side-fluorescence lights for cells determination. The NLR was calculated as absolute neutrophil count divided by absolute lymphocyte count.

For validating the peripheral immune profile in PD according to their genetic background, we used as replication cohort the Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI) cohort: an international, multisite, prospective, longitudinal cohort study. PPMI began initial recruitment in 2010 enrolling untreated patients in early stages. The study expanded and reinitiated recruitment in 2020, particularly aiming to recruit patients with pathogenic genetic variants, with some differences in the eligibility criteria between the two phases, such as disease duration and medication allowed. Details regarding the PPMI study have been published⁵⁷ and are available on the PPMI

Table 4. List of *GBA* pathogenic variants considered for the inclusion of patients in the *GBA*-associated Parkinson's disease group.

Allele	cDNA	Protein	Exon	Mutation severity	Discovery cohort (n)	PPMI replication cohort (n)
N370S	c.1223A/G	p.Asn409Ser	10	Mild	16	17
E326K	c.1093G > A	p.Gly365Lys	9	Mild	14	21
L444P	c.T1448C	p.Leu483Pro	11	Severe	7	3
R262C	c.901C > T	p.Arg301Cys	8	Risk	1	0
R535H	c.1604 G > A	p.Arg535His	12	Mild	5	0
F213I	c.754T > A	p.Phe252Ile	7	Severe	2	0
V457D	c.T1487A	p.Val496Asp	11	Risk	1	0
R463C	c.1504C > T	p.Arg502Cys	1	Severe	0	1
T369M	c.1223C > T	p.T369M	1	Mild	0	12

cDNA complementary DNA, n number of patients, PPMI Parkinson's Progression Markers Initiative.

website (<http://www.ppmi-info.org>). The PPMI data used in this study were downloaded on June 2, 2022. We applied the same criteria as for our discovery cohort. The replication study included 401 patients with PD [281 sPD patients, 66 *LRRK2*-PD patients (54 with p.G2019S and 12 with p.R1441G mutations), 54 *GBA*-PD patients] and a group of 174 HCs. The list of *GBA* pathogenic variants considered is shown in Table 4. *GBA* mutation severity has been determined according to the literature^{58–60}.

The study was approved by the local ethics committee according to the guidelines of the Helsinki declaration, and written informed consent was obtained from all study participants. The PPMI study was approved by the local institutional review boards of all participating sites.

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 detailed procedures followed for the *LRRK2* and *GBA* screening are described in Supplementary Information 2.

In the PPMI replication cohort, genetic testing was done by the centralised PPMI genetic testing core. All PPMI participants subsequently had whole exome or genome sequencing. Detailed methodology is available on the PPMI website (<http://www.ppmi-info.org>).

Statistical analysis

Group comparisons of categorical variables were performed using Fisher's or the chi-squared test. Firstly, we compared the differential blood cell counts and the NLR between the total PD group and HCs using multivariate linear regression adjusting for sex and age. Secondly, the comparison was made between the different PD cohorts (sPD, *LRRK2*-PD, and *GBA*-PD) and HCs using multivariate linear regression or analysis of covariance (ANCOVA), considering age and sex as covariates. Finally, post hoc analyses with Tukey test for multiple comparisons between groups were applied. Sex-stratified analyses were also performed in both cohorts. Correlations analyses between blood cells counts and clinical characteristics were performed using Spearman or Pearson analyses, as well as multivariate linear regression, as appropriate. Saphiro–Wilk's test was used to examine whether the different variables followed a normal distribution in the population. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using the R version 3.5.1., and GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software, Inc.).

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 does not present restrictions and are available upon a request that is reasonable made and that can be provided by the corresponding author [P.M. and P.G.-G.] due to participants privacy.

Received: 20 September 2022; Accepted: 13 January 2023;
Published online: 31 January 2023

REFERENCES

- 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).
- Tansey, M. G. & Romero-Ramos, M. Immune system responses in Parkinson's disease: early and dynamic. *Eur. J. Neurosci.* **49**, 364–383 (2019).
- Fuzzati-Armentero, M. T., Cerri, S. & Blandini, F. Peripheral-central neuroimmune crosstalk in Parkinson's disease: what do patients and animal models tell us? *Front Neurol.* **10**, 1–19 (2019).
- Hirsch, E. C. & Standaert, D. G. Ten unsolved questions about neuroinflammation in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **36**, 16–24 (2021).
- Su, X. & Federoff, H. J. Immune responses in Parkinson's disease: interplay between central and peripheral immune systems. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 275178 (2014).
- Tan, E. et al. Parkinson disease and the immune system — associations, mechanisms and therapeutics. *Nat. Rev. Neuro.* **16**, 303–318 (2020).
- Tansey, M. G. et al. Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 1–17 (2022).
- Williams, G. P. et al. Central and peripheral inflammation: connecting the immune responses of Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.* **6**, 1–8 (2022).
- Terkelsen, M. H. et al. Neuroinflammation and immune changes in prodromal Parkinson's disease and other synucleinopathies. *J. Parkinsons Dis.* **12**, S149–S163 (2022).
- Jensen, M. P. et al. Lower lymphocyte count is associated with increased risk of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **89**, 803–812 (2021).
- Russell, C. D. et al. The utility of peripheral blood leucocyte ratios as biomarkers in infectious diseases: a systematic review and metaanalysis. *J. Infect.* **78**, 339–348 (2019).
- Stefaniuk, P., Szymczyk, A. & Podhorecka, M. The neutrophil to lymphocyte and lymphocyte to monocyte ratios as new prognostic factors in hematological malignancies – a narrative review. *Cancer Manag. Res.* **12**, 2961–2977 (2020).
- Muñoz-Delgado, L. et al. Peripheral immune profile and neutrophil-to-lymphocyte ratio in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **36**, 2426–2430 (2021).
- Jia, F., Fellner, A. & Kumar, K. R. Monogenic Parkinson's disease: genotype, phenotype, pathophysiology, and genetic testing. *Genes* **13**, 471 (2022).
- Mamais, A., Kaganovich, A. & Harvey, K. Convergence of signalling pathways in innate immune responses and genetic forms of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **169**, e105721 (2022).
- Wallings, R. L. & Tansey, M. G. *LRRK2* regulation of immune-pathways and inflammatory disease. *Biochem. Soc. Trans.* **47**, 1581–1595 (2019).
- Blauwendraat, C., Nalls, M. A. & Singleton, A. B. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **19**, 170–178 (2020).
- Brockmann, K. et al. Inflammatory profile in *LRRK2*-associated prodromal and clinical PD. *J. Neuroinflammation* **13**, 122 (2016).
- Al-Azzawi, Z. A. M., Arfaie, S. & Gan-Or, Z. *GBA1* and the immune system: a potential role in Parkinson's disease? *J. Parkinsons Dis.* **12**, S53–S64 (2022).
- Chahine, L. M. et al. Clinical and biochemical differences in patients having Parkinson disease with vs without *GBA* mutations. *JAMA Neurol.* **70**, 852–858 (2013).
- Soehlein, O. et al. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 248–261 (2017).
- Yan, Z. et al. Dysregulation of the adaptive immune system in patients with early-stage Parkinson disease. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **8**, e1036 (2021).
- Kline, E. M. et al. Genetic and environmental factors in Parkinson's disease converge on immune function and inflammation. *Mov. Disord.* **36**, 25–36 (2021).
- Contaldi, E., Magistrelli, L. & Comi, C. T. Lymphocytes in Parkinson's Disease. *J. Parkinsons Dis.* **12**, S65–S74 (2022).
- Baird, J. K. et al. The key role of T cells in Parkinson's disease pathogenesis and therapy. *Parkinsonism Relat. Disord.* **60**, 25–31 (2019).
- Jiang, S. et al. The correlation of lymphocyte subsets, natural killer cell, and Parkinson's disease: a meta-analysis. *Neurol. Sci.* **38**, 1373–1380 (2017).
- Chen, Z., Chen, S. & Liu, J. The role of T cells in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **169**, 1–23 (2018).
- Kustrimovic, N. et al. Parkinson's disease patients have a complex phenotypic and functional Th1 bias: cross-sectional studies of CD4+ Th1/Th2/T17 and Treg in drug-naïve and drug-treated patients. *J. Neuroinflammation.* **15**, 205 (2018).
- Garfias, S. et al. Peripheral blood lymphocyte phenotypes in Alzheimer and Parkinson's diseases. *Neurologia* **19**, S0213–4853 (2019).
- Álvarez-Luquín, D. D. et al. Regulatory impairment in untreated Parkinson's disease is not restricted to Tregs: other regulatory populations are also involved. *J. Neuroinflammation.* **16**, 212 (2019).
- Karaaslan, Z. et al. Inflammation and regulatory T cell genes are differentially expressed in peripheral blood mononuclear cells of Parkinson's disease patients. *Sci. Rep.* **11**, 2316 (2021).
- Akil, E. et al. The increase of carcinoembryonic antigen (CEA), high-sensitivity C-reactive protein, and neutrophil/lymphocyte ratio in Parkinson's disease. *Neurol. Sci.* **36**, 423–428 (2015).
- Acar, T., Güzey Aras, Y. & Acar, B. A. Can the neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio be used in the differential diagnosis of Parkinson's disease and essential tremor? *Acta Med. Mediterr.* **35**, 929–933 (2019).

34. Solmaz, V. et al. Serum neutrophil-lymphocyte ratios, C-reactive protein and sedimentation levels in Parkinson's disease. *Cukurova Med. J.* **43**, 305–311 (2018).
35. Kara, S. P., Altunan, B. & Unal, A. Investigation of the peripheral inflammation (neutrophil-lymphocyte ratio) in two neurodegenerative diseases of the central nervous system. *Neurol. Sci.* **43**, 1799–1807 (2022).
36. Boyko, A. A. et al. Similarity and differences in inflammation-related characteristics of the peripheral immune system of patients with Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2633 (2017).
37. Grozdanov, V. et al. Inflammatory dysregulation of blood monocytes in Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol.* **128**, 651–663 (2014).
38. Gardai, S. J. et al. Elevated alpha-synuclein impairs innate immune cell function and provides a potential peripheral biomarker for Parkinson's disease. *PLoS ONE* **8**, e17634 (2013).
39. Tian, J. et al. Specific immune status in Parkinson's disease at different ages of onset. *NPJ Parkinsons Dis.* **8**, 5 (2022).
40. Carlisle, S. M. et al. Sex-based differences in the activation of peripheral blood monocytes in early Parkinson disease. *npj Parkinsons Dis.* **7**, 36 (2021).
41. Lawton, M. et al. Blood biomarkers with Parkinson's disease clusters and prognosis: the oxford discovery cohort. *Mov. Disord.* **35**, 279–287 (2020).
42. Tsukita, K., Sakamaki-Tsukita, H. & Takahashi, R. Lower circulating lymphocyte count predicts ApoE ε4-related cognitive decline in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **36**, 2969–2971 (2021).
43. Martin-Ruiz, C. et al. Senescence and inflammatory markers for predicting clinical progression in Parkinson's disease: The ICICLE-PD Study. *J. Parkinsons Dis.* **10**, 193–206 (2020).
44. Kozina, E. et al. Mutant LRRK2 mediates peripheral and central immune responses leading to neurodegeneration in vivo. *Brain* **141**, 1753–1769 (2018).
45. Tolosa, E., Vila, M., Klein, C. & Rascol, O. LRRK2 in Parkinson disease: challenges of clinical trials. *Nat. Rev. Neurol.* **16**, 97–107 (2020).
46. Rentzos, M. et al. Circulating interleukin-10 and interleukin-12 in Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* **119**, 332–337 (2009).
47. Thaler, A. et al. Biochemical markers for severity and risk in GBA and LRRK2 Parkinson's disease. *J. Neurol.* **268**, 1517–1525 (2021).
48. Thaler, A. et al. Mutations in GBA and LRRK2 are not associated with increased inflammatory markers. *J. Parkinsons Dis.* **11**, 1285–1296 (2021).
49. Miliukhina, I. V. et al. Plasma cytokines profile in patients with Parkinson's disease associated with mutations in GBA gene. *Bull. Exp. Biol. Med.* **168**, 423–426 (2020).
50. Lunghi, G. et al. β-Glucocerebrosidase deficiency activates an aberrant lysosome-plasma membrane axis responsible for the onset of neurodegeneration. *Cells* **11**, 2343 (2022).
51. Magnusen, A. F. et al. Genetic defects and pro-inflammatory cytokines in Parkinson's disease. *Front Neurol.* **12**, 636139 (2021).
52. Atashrazm, F. et al. Reduced glucocerebrosidase activity in monocytes from patients with Parkinson's disease. *Sci. Rep.* **8**, 15446 (2018).
53. Szewdo, A. A. et al. GBA and APOE impact cognitive decline in Parkinson's disease: a 10-year population-based study. *Mov. Disord.* **37**, 1016–1027 (2022).
54. Kouli, A. et al. Neuroinflammation and protein pathology in Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol. Commun.* **8**, 211 (2020).
55. Sanjari Moghaddam, H. et al. Association between peripheral inflammation and DATSCAN data of the striatal nuclei in different motor subtypes of Parkinson disease. *Front. Neurol.* **9**, 234 (2018).
56. Postuma, R. B. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **30**, 1591–1601 (2015).
57. Parkinson Progression Marker Initiative. The Parkinson Progression Marker Initiative (PPMI). *Prog. Neurobiol.* **95**, 629–635 (2011).
58. Smith, L. & Schapira, A. H. V. GBA variants and parkinson disease: mechanisms and treatments. *Cells* **11**, 1261 (2022).
59. Höglinger, G. et al. GBA-associated PD: chances and obstacles for targeted treatment strategies. *J. Neural Transm.* **129**, 1219–1233 (2022).
60. Krohn, L. et al. GBA variants in REM sleep behavior disorder: a multicenter study. *Neurology* **95**, e1008–e1016 (2020).

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, PI21/01875, and PI22/01704], 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], the Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades de la

Junta de Andalucía [PY20_00896], and the Fundación Alicia Koplowitz. Several authors of this publication are members of the European Reference Network for Rare Neurological Diseases – Project ID No 739510. Pilar Gómez-Garre was supported by the “Nicolás Monardes” program (C-0048-2017; from the Andalusian Regional Ministry of Health). Silvia Jesús was supported by the “Acción B Clínicos Investigadores” program from the Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía (B-0007-2019). Daniel Macías-García was supported by the “Juan Rodés” program (JR22/00073) from the Instituto de Salud Carlos III. Laura Muñoz-Delgado was supported by the “Río Hortega” program (CM21/00051) from the Instituto de Salud Carlos III. Rafael Díaz Belloso was supported by pre-doctoral contract for training in health research (PFIS) from Instituto de Salud Carlos III. Sergio García Díaz was supported by an University Teacher Training Programme (FPU) from the Spanish Ministry of Education. Data biospecimens used in the analyses presented in this article were obtained from the Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI) (www.ppmi-info.org/access-data-specimens/download-data). As such, the investigators within PPMI contributed to the design and implementation of PPMI and/or provided data and collected biospecimens but did not participate in the analysis or writing of this report. For up-to-date information on the study, visit www.ppmi-info.org. PPMI – a public-private partnership – is funded by The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research and funding partners, including Abbvie Inc., AcureX Therapeutics, Allergan, Amathus Therapeutics, Aligning Science Across Parkinson's, Avid Radiopharmaceuticals, Bial Biotech, Biogen, BioLegend, Bristol-Myers Squibb, Calico Life Sciences LLC, Celgene Corporation, Coave, DeCapo Brainscience, Denali Therapeutics, The Edmond J. Safra Foundation, 4D Pharma, GE Healthcare, Genentech, GlaxoSmithKline, Golub Capital, Handl Therapeutics, Insitro, Janssen Pharmaceuticals, Lilly, Lundbeck, Merck&Co, Meso Scale Discovery, Neurocrine Biosciences, Pfizer Inc, Piramal Imaging, Preval Therapeutics, F. Hoffmann-La Roche Ltd and its affiliated company Genentech Inc., Sanofi Genzyme, Servier, Takeda Pharmaceutical Company, Teva Neuroscience Inc., UCB, Vanqua Bio, Verily Life Sciences, Voyager Therapeutics Inc, and Yumanity Therapeutics.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.M.D., P.G.G., and P.M. conceived the project idea and designed the research project. Acquisition, analysis, or interpretation of results: all authors. L.M.D, M.V.J.J., and B.B.Z. contributed equally to the statistical analysis. L.M.D. drafted the first version of the manuscript. Both co-corresponding authors, P.G.G. and P.M. have jointly supervised the work. 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/s41531-023-00457-5>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Pilar Gómez-Garre or Pablo Mir.

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) 2023

Supplementary Information 1. Results

Part A. Post Hoc Comparisons to determine the differences in the peripheral immune response between groups.

Supplementary Table 1. Discovery cohort. Post Hoc Comparisons – Lymphocyte count

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
HCs	<i>GBA</i> -PD	0.273	0.019	0.526	0.098	2.771	0.029*
	sPD	0.327	0.158	0.497	0.066	4.972	< 0.001*
	<i>LRRK2</i> -PD	0.099	-0.159	0.358	0.100	0.990	0.755
<i>GBA</i> -PD	sPD	0.054	-0.223	0.331	0.107	0.506	0.958
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.173	-0.513	0.166	0.132	-1.317	0.553
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	-0.228	-0.508	0.052	0.109	-2.096	0.156

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). * A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson's disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson's disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson's disease.

Supplementary Table 2. PPMI replication cohort. Post Hoc Comparisons – Lymphocyte count

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
<i>GBA</i> -PD	HCs	-0.195	-0.460	0.069	0.103	-1.901	0.229
	sPD	-0.012	-0.265	0.241	0.098	-0.120	0.999
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.204	-0.516	0.108	0.121	-1.682	0.334
HCs	sPD	0.184	0.019	0.348	0.064	2.880	0.021*
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.008	-0.255	0.239	0.096	-0.086	1.000
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	-0.192	-0.426	0.043	0.091	-2.108	0.152

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). * A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson's disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson's disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson's disease.

Supplementary Table 3. Discovery cohort. Post Hoc Comparisons – Neutrophil count

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
HCS	<i>GBA</i> -PD	-0.410	-0.924	0.103	0.199	-2.059	0.168
	sPD	-0.287	-0.630	0.056	0.133	-2.155	0.137
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.141	-0.665	0.383	0.203	-0.694	0.899
<i>GBA</i> -PD	sPD	0.123	-0.437	0.684	0.217	0.567	0.942
	<i>LRRK2</i> -PD	0.269	-0.417	0.956	0.266	1.010	0.744
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	0.146	-0.421	0.713	0.220	0.663	0.911

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCS, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson's disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson's disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson's disease.

Supplementary Table 4. PPMI replication cohort. Post Hoc Comparisons – Neutrophil count

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
<i>GBA</i> -PD	HCS	0.573	0.077	1.069	0.193	2.976	0.016*
	sPD	0.332	-0.142	0.806	0.184	1.803	0.273
	<i>LRRK2</i> -PD	0.265	-0.320	0.849	0.227	1.167	0.648
HCS	sPD	-0.241	-0.549	0.067	0.119	-2.018	0.182
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.308	-0.772	0.155	0.180	-1.714	0.317
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	-0.067	-0.507	0.372	0.171	-0.394	0.979

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCS, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson's disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson's disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson's disease.

Supplementary Table 5. Discovery cohort. Post Hoc Comparisons – Monocyte count

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
HCs	<i>GBA</i> -PD	0.037	-0.081	0.156	0.046	0.814	0.848
	sPD	0.079	-5.309e-5	0.158	0.031	2.576	0.050
	<i>LRRK2</i> -PD	0.021	-0.100	0.142	0.047	0.445	0.971
<i>GBA</i> -PD	sPD	0.042	-0.088	0.171	0.050	0.832	0.839
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.017	-0.175	0.142	0.061	-0.270	0.993
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	-0.058	-0.189	0.073	0.051	-1.149	0.659

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson’s disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson’s disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson’s disease.

Supplementary Table 6. PPMI replication cohort. Post Hoc Comparisons – Monocyte count

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
<i>GBA</i> -PD	HCs	-0.002	-0.055	0.051	0.021	-0.076	1.000
	sPD	0.030	-0.020	0.081	0.020	1.542	0.413
	<i>LRRK2</i> -PD	0.032	-0.030	0.094	0.024	1.319	0.551
HCs	sPD	0.032	-0.001	0.065	0.013	2.498	0.061
	<i>LRRK2</i> -PD	0.034	-0.016	0.083	0.019	1.746	0.301
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	0.002	-0.045	0.049	0.018	0.091	1.000

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson’s disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson’s disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson’s disease.

Supplementary Table 7. Discovery cohort. Post Hoc Comparisons – Neutrophil-to-lymphocyte ratio

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
HCs	<i>GBA</i> -PD	-0.599	-1.000	-0.197	0.156	-3.840	< .001*
	sPD	-0.590	-0.859	-0.322	0.104	-5.664	< .001*
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.120	-0.530	0.290	0.159	-0.753	0.875
<i>GBA</i> -PD	sPD	0.008	-0.430	0.447	0.170	0.050	1.000
	<i>LRRK2</i> -PD	0.479	-0.059	1.016	0.208	2.297	0.100
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	0.470	0.027	0.914	0.172	2.733	0.033*

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson’s disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson’s disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson’s disease.

Supplementary Table 8. PPMI replication cohort. Post Hoc Comparisons – Neutrophil-to-lymphocyte ratio

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
<i>GBA</i> -PD	HCs	0.532	0.128	0.935	0.156	3.397	0.004*
	sPD	0.177	-0.209	0.563	0.150	1.181	0.639
	<i>LRRK2</i> -PD	0.411	-0.064	0.886	0.184	2.228	0.117
HCs	sPD	-0.355	-0.605	-0.104	0.097	-3.643	0.002*
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.121	-0.497	0.256	0.146	-0.826	0.842
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	0.234	-0.124	0.592	0.139	1.685	0.332

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson’s disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson’s disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson’s disease.

Part B. Sex-stratified analyses to determine the differences in the peripheral immune response between groups.

Supplementary Table 9. Demographic and clinical data, and peripheral immune profile of healthy controls and Parkinson’s disease genetic cohorts of the discovery cohort, sex-stratified

	Sex	HCs	sPD	<i>LRRK2</i> -PD	<i>GBA</i> -PD	<i>F</i> value	<i>P</i> value
N	M	153	80	17	27		
	F	146	52	27	19		
Age (y), mean ± SD	M	60.09 ± 15.74	63.95 ± 11.95	64.35 ± 11.35	53.63 ± 9.96	4.20	< 0.05 ¹
	F	59.80 ± 14.51	66.81 ± 11.31	61.56 ± 11.25	60.90 ± 8.46	3.64	0.01 ¹
Age of onset (y), mean ± SD	M	-	56.25 ± 12.67	55.24 ± 13.71	46.82 ± 10.19	6.01	< 0.05 ¹
	F		58.21 ± 11.25	52.44 ± 11.22	51.26 ± 8.47	4.18	0.02 ¹
Disease duration (y), mean ± SD	M		7.70 ± 5.84	9.12 ± 7.05	6.82 ± 6.10	0.75	0.47 ¹
	F		8.60 ± 5.06	9.11 ± 5.96	9.63 ± 5.05	0.28	0.75 ¹
HY in OFF state, mean ± SD	M		2.42 ± 0.87	2.56 ± 0.63	2.26 ± 0.86	0.70	0.50 ¹
	F		2.78 ± 1.11	2.82 ± 0.92	3 ± 0.91	0.31	0.73 ¹
LEDD, mean ± SD	M		740.51 ± 471.61	1085.53 ± 593.88	810.64 ± 714.70	2.77	0.07 ¹
	F		780.30 ± 523.89	943.92 ± 531.60	948.32 ± 486.84	1.23	0.30 ¹
Leukocyte count, mean ± SD	M	7 ± 1.58	7.02 ± 1.35	7.24 ± 1.50	6.93 ± 1.63	1.56	0.18 ²
	F	6.77 ± 1.82	6.39 ± 1.67	6.54 ± 1.48	6.91 ± 1.41	0.70	0.59 ²
Lymphocyte count, mean ± SD	M	2.17 ± 0.64	1.84 ± 0.63	2.11 ± 0.66	1.87 ± 0.58	4.06	0.003 ²
	F	2.13 ± 0.66	1.72 ± 0.61	1.97 ± 0.40	1.95 ± 0.57	5.69	< 0.001 ²
Neutrophil count, mean ± SD	M	3.99 ± 1.16	4.41 ± 1.16	4.29 ± 1.03	4.35 ± 1.42	3.97	0.004 ²
	F	3.86 ± 1.33	4.04 ± 1.40	3.91 ± 1.25	4.29 ± 1.36	0.54	0.71 ²
Monocyte count, mean ± SD	M	0.53 ± 0.17	0.48 ± 0.13	0.58 ± 0.21	0.51 ± 0.14	3.31	0.011 ²
	F	0.50 ± 0.49	0.39 ± 0.11	0.43 ± 0.15	0.43 ± 0.13	0.92	0.46 ²
Eosinophil count, mean ± SD	M	0.25 ± 0.39	0.18 ± 0.13	0.20 ± 0.14	0.15 ± 0.12	1.69	0.15 ²
	F	0.23 ± 0.34	0.23 ± 0.82	0.14 ± 0.08	0.16 ± 0.11	0.18	0.86 ²
Basophil count, mean ± SD	M	0.12 ± 0.76	0.02 ± 0.03	0.04 ± 0.04	0.03 ± 0.02	0.47	0.76 ²
	F	0.03 ± 0.03	0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.03	1.68	0.16 ²
NLR, mean ± SD	M	2.01 ± 0.94	2.66 ± 1.10	2.21 ± 0.79	2.58 ± 1.33	6.77	< 0.001 ²
	F	1.94 ± 0.83	2.58 ± 1.18	2.05 ± 0.75	2.50 ± 1.36	5.60	< 0.001 ²

Abbreviations: HC, healthy control; sPD, sporadic Parkinson’s disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson’s disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson’s disease; N, total number of individuals; M, male; F, female; y, years; SD, standard deviation; HY, Hoehn & Yahr stage; LEDD, levodopa equivalent daily dose; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio. Note: All blood cell counts are expressed as x10³ cells/μL.

¹Based on linear regression and analysis of covariance (ANCOVA); ²Based on multivariate linear regression, adjusting for age. *A p value < 0.05 was considered statistically significant and bolded.

Supplementary Table 10. Discovery cohort - Males. Post Hoc Comparisons – Lymphocyte count

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
HCs	<i>GBA</i> -PD	0.333	-0.011	0.676	0.133	2.502	0.062
	sPD	0.307	0.081	0.534	0.088	3.502	0.003*
	<i>LRRK2</i> -PD	0.037	-0.381	0.456	0.162	0.230	0.996
<i>GBA</i> -PD	sPD	-0.025	-0.396	0.345	0.143	-0.177	0.998
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.295	-0.806	0.216	0.198	-1.495	0.442
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	-0.270	-0.706	0.166	0.169	-1.602	0.379

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson's disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson's disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson's disease.

Supplementary Table 11. Discovery cohort - Females. Post Hoc Comparisons – Lymphocyte count

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
HCs	<i>GBA</i> -PD	0.171	-0.213	0.555	0.148	1.153	0.657
	sPD	0.349	0.089	0.609	0.100	3.473	0.003*
	<i>LRRK2</i> -PD	0.141	-0.189	0.471	0.128	1.102	0.689
<i>GBA</i> -PD	sPD	0.178	-0.247	0.602	0.164	1.084	0.700
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.031	-0.502	0.441	0.182	-0.168	0.998
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	-0.208	-0.584	0.167	0.145	1.435	0.479

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson's disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson's disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson's disease.

Supplementary Table 12. Discovery cohort - Males. Post Hoc Comparisons – Neutrophil count

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
HCs	<i>GBA</i> -PD	-0.438	-1.076	0.200	0.247	-1.776	0.287
	sPD	-0.383	-0.804	0.038	0.163	-2.354	0.089
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.255	-1.032	0.521	0.300	-0.850	0.831
<i>GBA</i> -PD	sPD	0.055	-0.633	0.743	0.266	0.206	0.997
	<i>LRRK2</i> -PD	0.183	-0.765	1.131	0.367	0.499	0.959
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	0.128	-0.681	0.937	0.313	0.410	0.977

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson’s disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson’s disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson’s disease.

Supplementary Table 13. Discovery cohort - Males. Post Hoc Comparisons – Monocyte count

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
HCs	<i>GBA</i> -PD	0.010	-0.076	0.097	0.034	0.307	0.997
	sPD	0.051	-0.006	0.108	0.022	2.321	0.063
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.046	-0.151	0.059	0.041	-1.128	0.673
<i>GBA</i> -PD	sPD	0.041	-0.052	0.134	0.036	1.137	0.530
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.056	-0.185	0.072	0.050	-1.130	0.714
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	-0.097	-0.207	0.013	0.042	-2.290	0.085

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson’s disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson’s disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson’s disease.

Supplementary Table 14. Discovery cohort – Males. Post Hoc Comparisons – Neutrophil-to-lymphocyte ratio

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
HCs	<i>GBA</i> -PD	-0.650	-1.202	-0.098	0.214	-3.042	0.014
	sPD	-0.612	-0.976	-0.247	0.141	-4.338	<.001
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.154	-0.827	0.518	0.260	-0.594	0.934
<i>GBA</i> -PD	sPD	0.038	-0.557	0.634	0.230	0.166	0.998
	<i>LRRK2</i> -PD	0.496	-0.326	1.317	0.318	1.560	0.403
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	0.457	-0.243	1.158	0.271	1.688	0.332

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson's disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson's disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson's disease.

Supplementary Table 15. Discovery cohort - Females. Post Hoc Comparisons – Neutrophil-to-lymphocyte ratio

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
HCs	<i>GBA</i> -PD	-0.541	-1.140	0.058	0.232	-2.335	0.093
	sPD	-0.565	-0.971	-0.160	0.157	-3.605	0.002
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.091	-0.606	0.424	0.199	-0.459	0.968
<i>GBA</i> -PD	sPD	-0.024	-0.687	0.638	0.256	-0.095	1.000
	<i>LRRK2</i> -PD	0.450	-0.286	1.185	0.284	1.581	0.392
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	0.474	-0.112	1.060	0.227	2.092	0.159

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson's disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson's disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson's disease.

Supplementary Table 16. Demographic and clinical data, and peripheral immune profile of healthy controls and Parkinson's disease genetic cohorts of the PPMI cohort, sex-stratified

	Sex	HCs	sPD	LRRK2-PD	GBA-PD	F value	P value
N	M	111	194	31	30		
	F	62	87	35	24		
Age (y), mean ± SD	M	61.38 ± 11.34	61.89 ± 9.72	60.52 ± 10.12	59.9 ± 8.51	0.44	0.73 ¹
	F	56.98 ± 13.34	60.53 ± 9.17	62.89 ± 10.29	58.71 ± 11.57	2.46	0.06 ¹
Age of onset (y), mean ± SD	M	-	59.96 ± 10	55.76 ± 10.77	57.61 ± 9.19	2.77	0.06 ¹
	F	-	58.59 ± 9.37	57.98 ± 10.44	56.17 ± 11.93	0.54	0.58 ¹
Disease duration (y), mean ± SD	M	-	1.92 ± 2.03	4.75 ± 3.13	2.3 ± 2.08	22.18	< 0.001¹
	F	-	1.94 ± 1.33	4.53 ± 2.43	2.54 ± 2.27	25.07	< 0.001¹
HY in OFF state, mean ± SD	M	-	1.58 ± 0.50	1.89 ± 0.64	1.64 ± 0.49	4.28	< 0.05¹
	F	-	1.55 ± 0.50	2 ± 0.61	1.61 ± 0.58	7.46	< 0.001¹
MDS-UPDRS-III in OFF state, mean ± SD	M	-	21.14 ± 8.85	20.54 ± 8.91	25.18 ± 12.21	2.50	0.08 ¹
	F	-	20.69 ± 8.84	17.82 ± 7.39	21.61 ± 9.37	1.50	0.23 ¹
LEDD, mean ± SD	M	-	2.37 ± 24.36	411.41 ± 362.43	62.98 ± 168.01	115.07	< 0.001¹
	F	-	0	443.05 ± 322.75	85.42 ± 213.40	76.87	< 0.001¹
Leukocyte count, mean ± SD	M	6.17 ± 1.88	6.34 ± 1.52	6.50 ± 2.19	6.55 ± 1.38	0.59	0.62 ²
	F	6.14 ± 1.68	5.82 ± 1.37	6.14 ± 1.30	6.39 ± 1.57	1.29	0.28 ²
Lymphocyte count, mean ± SD	M	1.80 ± 1.03	1.67 ± 0.53	1.78 ± 0.63	1.59 ± 0.46	1.15	0.33 ²
	F	1.93 ± 0.65	1.63 ± 0.45	1.93 ± 0.59	1.74 ± 0.44	4.83	0.0009²
Neutrophil count, mean ± SD	M	3.70 ± 1.14	4.05 ± 1.26	4.20 ± 1.72	4.30 ± 1.20	2.19	0.07 ²
	F	3.62 ± 1.25	3.67 ± 1.15	3.71 ± 1.03	4.12 ± 1.32	1.09	0.34 ²
Monocyte count, mean ± SD	M	0.43 ± 0.17	0.41 ± 0.12	0.39 ± 0.13	0.44 ± 0.13	1.26	0.29 ²
	F	0.37 ± 0.12	0.33 ± 0.12	0.35 ± 0.10	0.36 ± 0.09	2.21	0.07 ²
Eosinophil count, mean ± SD	M	0.18 ± 0.13	0.17 ± 0.12	0.15 ± 0.12	0.16 ± 0.10	0.62	0.60 ²
	F	0.16 ± 0.12	0.15 ± 0.18	0.16 ± 0.09	0.13 ± 0.07	0.54	0.80 ²
Basophil count, mean ± SD	M	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.05 ± 0.04	0.62	0.60 ²
	F	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.34	0.80 ²
NLR, mean ± SD	M	2.27 ± 0.79	2.62 ± 1.06	2.58 ± 1.13	2.88 ± 1.1	3.87	0.004²
	F	2.02 ± 0.76	2.44 ± 1.39	2.01 ± 0.60	2.44 ± 0.81	4.15	0.003²

Abbreviations: HC, healthy control; PD, Parkinson's disease; N, total number of individuals; M, male; F, female; y, years; SD, standard deviation; HY, Hoehn & Yahr stage; MDS-UPDRS-III, MDS Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III scale; LEDD, levodopa equivalent daily dose; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio. Note: All blood cell counts were expressed as $\times 10^3$ cells/ μL . ¹Based on linear regression and analysis of covariance (ANCOVA); ²Based on multivariate linear regression, adjusting for age. *A p value < 0.05 was considered statistically significant and bolded.

Supplementary Table 17. PPMI replication cohort - Females. Post Hoc Comparisons – Lymphocyte count

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
<i>GBA</i> -PD	HCs	-0.179	-0.512	0.154	0.129	-1.390	0.507
	sPD	0.095	-0.224	0.415	0.123	0.774	0.866
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.220	-0.589	0.148	0.142	-1.548	0.411
HCs	sPD	0.274	0.042	0.506	0.090	3.059	0.013
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.042	-0.339	0.256	0.115	-0.362	0.984
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	-0.316	-0.594	-0.038	0.107	-2.944	0.019

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson’s disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson’s disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson’s disease.

Supplementary Table 18. PPMI replication cohort - Males. Post Hoc Comparisons – Neutrophil count

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
<i>GBA</i> -PD	HCs	0.596	-0.076	1.269	0.261	2.290	0.102
	sPD	0.249	-0.392	0.891	0.249	1.003	0.748
	<i>LRRK2</i> -PD	0.105	-0.732	0.941	0.324	0.323	0.988
HCs	sPD	-0.347	-0.736	0.041	0.151	-2.306	0.098
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.492	-1.155	0.172	0.257	-1.913	0.224
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	-0.144	-0.776	0.488	0.245	-0.590	0.935

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson’s disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson’s disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson’s disease.

Supplementary Table 19. PPMI replication cohort - Females. Post Hoc Comparisons – Monocyte count

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
<i>GBA</i> -PD	HCs	-0.015	-0.086	0.056	0.027	-0.545	0.948
	sPD	0.034	-0.034	0.102	0.026	1.295	0.567
	<i>LRRK2</i> -PD	0.019	-0.060	0.097	0.030	0.626	0.924
HCs	sPD	0.049	-0.005	0.098	0.019	2.564	0.054
	<i>LRRK2</i> -PD	0.034	-0.029	0.097	0.024	1.387	0.509
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	-0.015	-0.074	0.044	0.023	-0.659	0.912

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson’s disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson’s disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson’s disease.

Supplementary Table 20. PPMI replication cohort - Males. Post Hoc Comparisons – Neutrophil-to-lymphocyte ratio

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
<i>GBA</i> -PD	HCs	0.627	0.102	1.151	0.203	3.085	0.012
	sPD	0.281	-0.219	0.781	0.194	1.451	0.469
	<i>LRRK2</i> -PD	0.305	-0.347	0.957	0.253	1.206	0.624
HCs	sPD	-0.346	-0.649	-0.042	0.117	-2.943	0.018*
	<i>LRRK2</i> -PD	-0.322	-0.839	0.195	0.200	-1.607	0.376
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	0.024	-0.469	0.516	0.191	0.123	0.999

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson’s disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson’s disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson’s disease.

Supplementary Table 21. PPMI replication cohort - Females. Post Hoc Comparisons – Neutrophil-to-lymphocyte ratio

Group A	Group B	Mean difference (Group A-B)	95% CI for Mean Difference		SE	t	p tukey
			Lower	Upper			
<i>GBA</i> -PD	HCs	0.394	-0.255	1.042	0.250	1.573	0.396
	sPD	0.040	-0.582	0.662	0.240	0.167	0.998
	<i>LRRK2</i> -PD	0.503	-0.214	1.221	0.277	1.817	0.268
HCs	sPD	-0.353	-0.805	0.098	0.174	-2.027	0.181
	<i>LRRK2</i> -PD	0.110	-0.469	0.688	0.223	0.491	0.961
sPD	<i>LRRK2</i> -PD	0.463	-0.078	1.004	0.209	2.219	0.122

Note: P-value and confidence intervals adjusted for comparing a family of 4 estimates (confidence intervals corrected using the tukey method). *A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Abbreviations: SE, standard error; HCs, healthy controls; sPD, sporadic Parkinson’s disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson’s disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson’s disease.

Part C. Peripheral inflammatory immune response according to clinical characteristics of patients with PD.

a. Disease duration

To evaluate whether there was a correlation between the peripheral inflammatory immune response and the disease duration, we performed Spearman's correlation analyses in both cohorts and in the different genetic subgroups. Detailed results can be found in Supplementary table 22. When Spearman's correlations were statistically significant (p value < 0.05), we further performed a multivariate linear regression analysis adjusting for age, gender, and LEDD to control for possible confounding factors.

Firstly, in our discovery cohort, we found a statistically significant correlation between the disease duration and lymphocytes and the NLR in the whole PD cohort. However, these results were not replicated in the PPMI cohort. Moreover, these correlations were not found in the multivariate linear analyses adjusting for age, sex and LEDD. Multivariate linear regression analysis [$F(4,216) = 22.07$, $p < 0.001$] showed that the lymphocyte count was not statistically significant ($p = 0.80$), whereas age was a clear confounding factor ($p < 0.05$). Likewise, multivariate linear regression analysis [$F(4,216) = 22.05$, $p < 0.001$] showed that the NLR was not statistically significant ($p = 0.80$), whereas age was a clear confounding factor ($p < 0.05$).

When evaluating Parkinson's disease genetic subgroups, a correlation between disease duration and the NLR could be observed in the *LRRK2*-PD subgroup in the Spearman's correlation. However, this correlation was not statistically significant after performing a multivariate linear regression analysis in both cohorts [$F(4,39) = 1.83$, $p = 0.14$ in the discovery cohort, and $F(4,63) = 2.21$, $p = 0.07$ in the PPMI cohort].

In conclusion, no correlation was found between disease duration and the peripheral immune response studied in either the discovery cohort or the PPMI replication cohort.

Supplementary Table 22. The correlation (Spearman) between disease duration and the different blood cells counts as well as the NLR in patients with Parkinson’s disease from the discovery and the PPMI replication cohorts

	Disease duration (y)							
	Whole PD cohort		sPD		LRRK2-PD		GBA-PD	
	Discovery (n=222)	PPMI (n=401)	Discovery (n=132)	PPMI (n=281)	Discovery (n=44)	PPMI (n=66)	Discovery (n=46)	PPMI (n=54)
Lymphocytes (x10 ³ cells/μL)	- 0.134 (0.05)	+ 0.03 (0.54)	- 0.13 (0.14)	- 0.02 (0.70)	- 0.21 (0.17)	+ 0.07 (0.58)	- 0.08 (0.60)	-0.11 (0.42)
Neutrophils (x10 ³ cells/μL)	+ 0.06 (0.40)	+ 0.03 (0.57)	+ 0.08 (0.38)	- 0.04 (0.55)	+ 0.17 (0.27)	+ 0.34 (0.006)*	- 0.08 (0.62)	+0.11 (0.42)
Monocytes (x10 ³ cells/μL)	+ 0.05 (0.51)	- 0.07 (0.19)	+ 0.03 (0.74)	- 0.10 (0.09)	+ 0.03 (0.83)	+ 0.04 (0.73)	+ 0.05 (0.77)	+0.17 (0.23)
NLR	+ 0.14 (0.04)*	+ 0.01 (0.80)	+ 0.15 (0.09)	- 0.01 (0.82)	+ 0.33 (0.03)*	+ 0.28 (0.02)*	- 0.03 (0.82)	+0.21 (0.14)

Note: values expressed as: rho correlation coefficient (p value). *A p value < 0.05 was considered statistically significant. Abbreviations: y, years; sPD, sporadic Parkinson’s disease; GBA-PD, patients with GBA-associated Parkinson’s disease; LRRK2-PD, patients with LRRK2-associated Parkinson’s disease; n, number of subjects; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio.

b. Motor impairment

Motor impairment in patients with PD was assessed based on HY stage and MDS-UPDRS-III scale, both in OFF state. Data concerning Hoehn & Yahr stage was available in both cohorts. Unfortunately, UPDRS part III scale was not available in the discovery cohort as data was obtained retrospectively and UPDRS scale was not previously recorded in the clinics.

Concerning HY stage, data are shown in Supplementary Table 23 below. Remarkably, a positive correlation was observed between the NLR and the HY stage in OFF in the sPD cohort in both cohorts. For that reason, we further performed multivariate linear regression analyses to assess whether there were other variables confounding our results. After adjusting for age, sex, disease duration and LEDD, the correlation between the NLR and the HY stage did not remain statistically significant. In the HUVR cohort, the analysis showed that the NLR was not statistically significant (p=0.16), whereas age was a clear confounding factor (p<0.05) [F(5,119)=17.06, p<0.001]. Likewise, in the PPMI cohort, the analysis showed that the NLR was not statistically significant (p=0.50), whereas age was a clear confounding factor (p<0.05) [F(5,275)=3.62, p<0.001]. To conclude, no correlation was found the peripheral immune response evaluated in our study and motor impairment based on HY stage in patients with PD.

Supplementary Table 23. The correlation (Spearman) between motor impairment assessed by Hoehn & Yahr stage and the different blood cells counts as well as the NLR in patients with Parkinson's disease from the discovery and the PPMI replication cohorts

Hoehn y Yahr scale in OFF state								
	Whole PD cohort		sPD		LRRK2-PD		GBA-PD	
	Discovery (n=222)	PPMI (n=401)	Discovery (n=132)	PPMI (n=281)	Discovery (n=44)	PPMI (n=66)	Discovery (n=46)	PPMI (n=54)
Lymphocytes (x10 ³ cells/ μ L)	- 0.07 (0.30)	- 0.11 (0.04)*	- 0.11 (0.23)	-0.13 (0.03)*	- 0.02 (0.91)	- 0.02 (0.89)	- 0.08 (0.62)	- 0.19 (0.18)
Neutrophils (x10 ³ cells/ μ L)	+ 0.09 (0.20)	+ 0.06 (0.22)	+ 0.16 (0.08)	+ 0.06 (0.29)	+ 0.05 (0.76)	- 0.04 (0.77)	- 0.07 (0.67)	+ 0.24 (0.09)
Monocytes (x10 ³ cells/ μ L)	+ 0.05 (0.50)	+ 0.05 (0.35)	- 0.04 (0.67)	+ 0.06 (0.29)	+ 0.07 (0.66)	- 0.15 (0.29)	+ 0.17 (0.27)	+ 0.21 (0.13)
NLR	+ 0.11 (0.13)	+ 0.14 (0.006)*	+ 0.20 (0.03)*	+ 0.17 (0.006)*	+ 0.06 (0.71)	- 0.02 (0.88)	- 0.05 (0.75)	+ 0.30 (0.03)*

Note: values are expressed as rho correlation coefficient (p value). *A p value < 0.05 was considered statistically significant. Abbreviations: sPD, sporadic Parkinson's disease; GBA-PD, patients with GBA-associated Parkinson's disease; LRRK2-PD, patients with LRRK2-associated Parkinson's disease; n, number of subjects; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio.

Eventually, we evaluated whether there was an association between the peripheral immune response and motor impairment based on MDS-UPDRS-III scale, which is a much more precise motor scale compared to HY stage. Data are shown in supplementary Table 24 below. In the Spearman's correlation analyses, the MDS-UPDRS-III score showed to be associated with the NLR in the whole cohort ($p < 0.001$), and in the different PD cohorts. For that reason, further multivariate regression analyses were performed. The MDS-UPDRS-III remained positive correlated with the NLR ($p < 0.05$), after adjusting per age, gender, disease duration and LEDD [F(5,381)=6.22, $p < 0.001$]. Moreover, multivariate linear regression analyses also showed the MDS-UPDRS-III was positively correlated with PD subgroups, regardless of their genetic background. Although it was only statistically significant in LRRK2-PD group ($p = 0.04$), there was a trend to significance in sPD ($p = 0.19$) and GBA-PD ($p = 0.09$).

Supplementary Table 24. The correlation (Spearman) between motor impairment based on MDS-UPDRS-III scale and the different blood cells counts as well as the NLR in patients with Parkinson’s disease from the PPMI replication cohort

	MDS-UPDRS-III scale in OFF state			
	Whole PD cohort (n=388)	sPD (n=281)	<i>LRRK2</i> -PD (n=56)	<i>GBA</i> -PD (n=51)
Lymphocytes (x10³ cells/μL)	- 0.10 (0.06)	- 0.08 (0.21)	- 0.10 (0.45)	- 0.10 (0.49)
Neutrophils (x10³ cells/μL)	+ 0.13 (0.01)*	+ 0.08 (0.20)	+ 0.26 (0.06)	+ 0.26 (0.07)
Monocytes (x10³ cells/μL)	+ 0.09 (0.09)	+ 0.05 (0.41)	+ 0.19 (0.16)	0.15 (0.31)
NLR	+ 0.18 (<0.001)*	+ 0.12 (0.05)*	+ 0.32 (0.02)*	0.21 (0.13)

Note: values are expressed as rho correlation coefficient (p value). *A p value < 0.05 was considered statistically significant. Abbreviations: MDS-UPDRS-III, MDS Unified Parkinson’s disease rating part III scale; n, number of subjects; sPD, sporadic Parkinson’s disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson’s disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson’s disease; NLR: neutrophil-to-lymphocyte ratio.

c. Cognitive impairment.

Finally, Spearman’s correlation analyses were performed to determine whether any of the blood cells counts or the NLR correlated to cognitive impairment assessed by the MOCA scale. Our discovery cohort was assessed retrospectively so MOCA scale was not available for all participants. These analyses could only be performed in the PPMI cohort. No correlation was found between MOCA score and either the different blood cells counts or the NLR in PPMI cohort.

Supplementary Table 25. The correlation (Spearman) between cognitive impairment based MOCA score and the different blood cells counts as well as the NLR in patients with Parkinson’s disease from the PPMI replication cohort.

	MOCA score			
	Whole PD cohort (n=400)	sPD (n=281)	<i>LRRK2</i> -PD (n=65)	<i>GBA</i> -PD (n=54)
Lymphocytes (x10 ³ cells/ μ L)	- 0.02 (0.56)	+ 0.03 (0.66)	- 0.12 (0.32)	+ 0.04 (0.75)
Neutrophil (x10 ³ cells/ μ L)	+ 0.03 (0.54)	+ 0.07 (0.27)	+ 0.06 (0.62)	- 0.22 (0.12)
Monocytes (x10 ³ cells/ μ L)	+ 0.01 (0.90)	+ 0.04 (0.46)	- 0.05 (0.70)	- 0.22 (0.10)
NLR	+ 0.03 (0.56)	+ 0.04 (0.51)	+ 0.11 (0.37)	- 0.22 (0.12)

Note: values are expressed as rho correlation coefficient (p value). *A p value < 0.05 was considered statistically significant. Abbreviations: MOCA, Montreal Cognitive Assessment; PD, Parkinson’s disease; sPD, sporadic Parkinson’s disease; *GBA*-PD, patients with *GBA*-associated Parkinson’s disease; *LRRK2*-PD, patients with *LRRK2*-associated Parkinson’s disease; n, number of subjects; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio.

Supplementary Information 2. Methods

The mutational screening of all *LRRK2* exons and intron–exon boundaries was performed using a High Resolution Melting (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 LightCycler-480 (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 below in Supplementary Table 26. 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.

The procedure followed to do the *GBA* screening is outlined below. Twenty-five nanograms of genomic DNA was used for each polymerase chain reaction (PCR). To prevent amplification of the neighbouring 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 below in Supplementary Table 27. 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 was then performed using a combination of HRM analysis and direct DNA resequencing. 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, 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.

Supplementary Table 26. Complete list of primers used in *LRRK2* screening

Primer	Sequences
Exon 20 F2	AATTGTTGATTTCTAAGTTGCTGGT
Exon 20 R2	TGGGTCCTATTGTTCAATGTCAGT
Exon 21 F	GATTTTACAAAGGGAATGGACTGTG
Exon 21 R	GTCAGCAGCAAACACAACATAATC
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	AATGAGTCCTCTTTGATGCTGTTT
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	GGATTCTTGCTGTCGTTTG
Exon 30 R	CTCGGAAAGTTTCCCAATTCAA
Exon 31 F	AGCAGGCCAGTTTGAAAG
Exon 31 R	GACATTTCTAGGCAGTTGAGAATC
Exon 32 F	TTAGCACTGAATTTGCCAACC
Exon 32 R	CCGATGGATATTCTCTCAACTTTG
Exon 33 F	AAAGCCCCTTGATATTTGTTT
Exon 33 R	ATGCTTTGACCATAACCCCT
Exon 34 F	TCTTTCTGACTACTTTCACTGAGCA
Exon 34 R	TTCTTTACCTGCTTGAACCCAG
Exon 35 F	AGGTTGGGTGTTTTGTGAGG
Exon 35 R	ATGCCATCTCCCTAATTTCTC
Exon 36 F	GGAAGCAGTTAATAATTAATGGCTC
Exon 36 R	AAACATTCAAATTGTTTCTTACC
Exon 37 F	CTTTGCGACAGTATGAGGTTTAGA
Exon 37 R	TGAAGGATCACTTAAAAGCATTTGT
Exon 38 F	TTCACATCAAACCAACAAATTTATG

Supplementary Table 27. Complete list of primers used in *GBA* screening

Primer	Sequences
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'-CAGGAGCCCAAGTTCCTTT
Exon 6 R	5'-CTACAGTTTCTCAACCCCAAGA
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'-TGCTGTGCCCTCTTAGTCA

6.3. PERIPHERAL INFLAMMATION IS ASSOCIATED WITH DOPAMINERGIC DEGENERATION IN PARKINSON'S DISEASE

Publicado como:

Muñoz-Delgado L, Labrador-Espinosa MA, Macías-García D, Jesús S, Benítez-Zamora B, Fernández-Rodríguez P, Adarmes-Gómez AD, Reina Castillo MI, Labrador S, Silva-Rodríguez J, Carrillo F, García Solis D, Grothe MJ, Mir P. **Peripheral inflammation is associated with dopaminergic degeneration in Parkinson's disease.** *Mov. Disorders* 2023. doi: 10.1002/mds.29369

Peripheral Inflammation Is Associated with Dopaminergic Degeneration in Parkinson's Disease

Laura Muñoz-Delgado, MD,^{1,2} Miguel Ángel Labrador-Espinosa, MSc,^{1,2,3} Daniel Macías-García, MD, PhD,^{1,2} Silvia Jesús, MD, PhD,^{1,2} Belén Benítez Zamora, BsC,¹ Paula Fernández-Rodríguez, MD,^{1,4} Astrid D. Adarnes-Gómez, MD,^{1,2} María Isabel Reina Castillo, MSc,¹ Sandra Castro-Labrador, MSc,¹ Jesús Silva-Rodríguez, PhD,¹ Fátima Carrillo, MD, PhD,^{1,2} David García Solís, MD,⁴ Michel J. Grothe, PhD,^{1,2*} and Pablo Mir, MD, PhD^{1,2,3*}

¹Unidad 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

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

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

⁴Servicio de Medicina Nuclear, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain

ABSTRACT: Background: Peripheral inflammatory immune responses are suggested to play a major role in dopaminergic degeneration in Parkinson's disease (PD). The neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) is a well-established biomarker of systemic inflammation in PD. Degeneration of the nigrostriatal dopaminergic system can be assessed in vivo using [¹²³I]FP-CIT single photon emission computed tomography imaging of striatal dopamine transporter (DAT) density.

Objectives: To assess the relationship between the peripheral immune profile (NLR, lymphocytes, and neutrophils) and striatal DAT density in patients with PD.

Methods: We assessed clinical features, the peripheral immune profile, and striatal [¹²³I]FP-CIT DAT binding levels of 211 patients with PD (primary-cohort). Covariate-controlled associations between the immune response and striatal DAT levels were assessed using

linear regression analyses. For replication purposes, we also studied a separate cohort of 344 de novo patients with PD enrolled in the Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI-cohort).

Results: A higher NLR was significantly associated with lower DAT levels in the caudate (primary-cohort: $\beta = -0.01$, $p < 0.001$; PPMI-cohort: $\beta = -0.05$, $p = 0.05$) and the putamen (primary-cohort: $\beta = -0.05$, $p = 0.02$; PPMI-cohort: $\beta = -0.06$, $p = 0.02$). Intriguingly, a lower lymphocyte count was significantly associated with lower DAT levels in both the caudate (primary-cohort: $\beta = +0.09$, $p < 0.05$; PPMI-cohort: $\beta = +0.11$, $p = 0.02$) and the putamen (primary-cohort: $\beta = +0.09$, $p < 0.05$, PPMI-cohort: $\beta = +0.14$, $p = 0.01$), but an association with the neutrophil count was not consistently observed (caudate; primary-cohort: $\beta = -0.05$, $p = 0.02$; PPMI-cohort: $\beta = 0$, $p = 0.94$;

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](#) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

***Correspondence to:** Pablo Mir, Unidad de Trastornos del Movimiento, Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013, Seville, Spain. E-mail: pmir@us.es.

Michel J. Grothe, Unidad de Trastornos del Movimiento, Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013, Seville, Spain. E-mail: mgrothe@us.es

Relevant conflicts of interest/financial disclosures: The authors declare no actual or potential conflicts of interest. 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) (PI16/01575, PI18/01898, PI19/01576, PI20/00613, PI21/01875, PI22/01704), 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), the Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades de la Junta de Andalucía (PY20_00896), and the Fundación Alicia Koplowitz. Several authors of this publication are members of the European Reference Network for Rare Neurological Diseases (project ID 739510). L.M.D. and P.M.R. are members of the COST Action IMMUPARKNET (CA21117). L.M.D. was supported by the "Río Hortega" program (CM21/00051) from the Instituto de Salud Carlos III. M.A.L.E. was supported by a PhD scholarship (PIF/VI-PPIT-US). D.M.G. was supported by the "Juan Rodés" program (JR22/00073) from the Instituto de Salud Carlos III. S.J. was supported by the "Acción B Clínicos Investigadores" program from the Consejería de Salud y Familias de la Junta de Andalucía (B-0007-2019). M.I.R.C. was supported by a PFIS fellowship (FI21/00160), J.S.R. was supported by the "Sara Borrell" program (CD21/00067), M.J.G. was supported by the "Miguel Servet" program (CP19/00031), all from the Instituto de Salud Carlos III.

Received: 23 December 2022; **Revised:** 27 January 2023; **Accepted:** 10 February 2023

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/mds.29369

putamen; primary-cohort: $\beta = -0.04$, $p = 0.08$; PPMI-cohort: $\beta = -0.01$, $p = 0.73$).

Conclusions: Our findings across two independent cohorts suggest a relationship between systemic inflammation and dopaminergic degeneration in patients with PD. This relationship was mainly driven by the lymphocyte count. © 2023 The Authors. *Movement Disorders*

published by Wiley Periodicals LLC on behalf of International Parkinson and Movement Disorder Society.

Key Words: [123 I]FP-CIT SPECT; inflammation; neurodegeneration; neutrophil-to-lymphocyte ratio; Parkinson's disease

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder primarily characterized by the presence of well-known classical motor symptoms (bradykinesia, and rigidity or rest tremor) as well as some additional supporting and exclusionary criteria.¹ The neuropathologic features are the progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and the aggregation of misfolded α -synuclein protein in Lewy bodies in at least the brain stem, among other structures affected.² Following the neurodegeneration of the SNpc, a depletion of dopamine is observed through the nigrostriatal pathways, which is mainly responsible for the cardinal motor symptoms of PD.^{2,3}

The dopaminergic neurodegeneration associated with PD can be assessed in vivo by using [123 I]FP-CIT single photon emission computed tomography (SPECT), a molecular imaging technique that allows to measure dopamine transporter (DAT) density.^{2,4} DAT binding levels from [123 I]FP-CIT can be accurately quantified using validated automated or semi-automated neuroimaging methods.⁴⁻⁶ To this end, the striatum is usually divided using anatomical regions of interest (caudate, putamen, and its subregions).⁵

Regarding the pathophysiology of PD, recent evidence supports that both central and peripheral inflammation, among other pathological processes, are implicated in the initiation and progression of PD.^{2,7-11} In this regard, both post-mortem and in vivo (imaging) studies have demonstrated that SNpc neurodegeneration is accompanied by microglial activation and T-lymphocyte infiltration.^{7,9,11} Furthermore, a growing body of evidence supports the involvement of peripheral inflammatory conditions in the pathophysiology of PD, not only involving cytokines, but also peripheral immune cells.⁷⁻¹¹ In a previous case-control study,¹² we observed that the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), a well-established non-invasive indicator of the overall inflammatory status, is altered in PD, suggesting the presence of a peripheral inflammatory immune response. Using a meta-analysis across all previous case-control studies, we could further corroborate an increased inflammatory systemic status in PD.¹² A singular characteristic of the NLR is that it integrates information from two leukocyte

subpopulations and complementary immune pathways: the neutrophils, representing chronic inflammation, and the lymphocytes, which might represent the regulatory processes.

Investigating the interplay between peripheral inflammatory immune responses and nigrostriatal degeneration in PD could elucidate important insights into the etiopathogenesis of PD. One previous study has suggested an association between the NLR and DAT levels in anatomical striatal subregions in patients with PD,¹³ but more studies are needed to investigate further this interesting finding.

Based on the exposed evidence, we hypothesized that a higher peripheral inflammatory immune response could be associated with increased neurodegeneration across the nigrostriatal pathways. Therefore, our primary aim was to study the relationship between the NLR and regional striatal DAT levels across anatomically defined striatal subregions in a large cohort of patients with PD recruited at our local Movement Disorders Unit. Second, we aimed to explore the differential roles of lymphocytes and neutrophils in dopaminergic degeneration. Finally, we also assessed associations of the peripheral inflammatory response and dopaminergic degeneration with the cardinal motor symptoms of patients with PD.

Methods

Participants

Our principal cohort included 211 patients with PD recruited through the Movement Disorder Clinic at the Hospital Universitario Virgen del Rocío in Seville, Spain. From those, 187 (88.6%) of these patients were also included in our previous work.¹² PD diagnosis was performed following the Movement Disorder Society Clinical Diagnostic Criteria¹ and patients potentially subjected to factors (other than PD) that could influence immune response at the time of the blood extraction (including cancer, active or chronic autoimmune, inflammatory, or infectious disease, and immunosuppressive therapy) were excluded. Because of immune factors, ~14% of the initial cohort of patients considered in our previous work¹² were excluded. Patients were included in the present study if they had a [123 I]

FP-CIT SPECT scan and a blood test available within less than 6 months between both measurements. Following this inclusion criteria, 149 patients from our previous study were excluded as they did not have an [¹²³I]FP-CIT SPECT available, and another 41 patients were excluded for not having a blood test as indicated. All patients underwent these examinations before March 2020. All recruited subjects underwent clinical assessment at our center, and demographic and additional clinical data were retrospectively obtained by consulting their medical records. Disease severity was evaluated by the Hoehn and Yahr (HY) stage, because the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) was not uniformly applied to all participants. Dopaminergic treatment was recorded as the levodopa equivalent daily dose (LEDD).

For validation purposes, we also included 344 de novo patients with PD enrolled in the Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI), an international, multisite, prospective, longitudinal cohort study. Details regarding the PPMI study have been published¹⁴ and are available on the PPMI website (<http://www.ppmi-info.org>). The PPMI data used in this study were downloaded in June 2022. Inclusion and exclusion criteria equivalent to those used for our principal cohort were applied. In addition to the aforementioned variables, the Movement Disorder Society-Sponsored Revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III (MDS-UPDRS-III) scale and the Montreal Cognitive Assessment (MOCA) were recorded for the PPMI cohort.

The study was approved by the local ethics committee according to the guidelines of the Helsinki declaration, and written informed consent was obtained from all study participants. The PPMI study was approved by the local institutional review boards of all participating sites.

Peripheral Immune Cell Measurements

Total leukocyte count and subpopulations (neutrophils and lymphocytes) in peripheral blood were measured in the Central Laboratory at our center using Sysmex XN automated hematology analyser (Sysmex Europe SE, Germany). It uses a fluorescence flow cytometry with forward-scattered, side-scattered, and side-fluorescence lights for cells determination. The NLR was calculated as the ratio between the absolute neutrophil and the absolute lymphocyte counts.

Neuroimaging Acquisition

Imaging acquisition in both cohorts was performed following similar, standardized imaging protocols for the acquisition of [¹²³I]FP-CIT SPECT data. See Supporting Data.

Neuroimaging Preprocessing

[¹²³I]FP-CIT SPECT images from both cohorts were processed using SPM12 (Wellcome Centre for Human Neuroimaging, Institute of Neurology, UCL, London, United Kingdom) running under MATLAB 2018a (The MathWorks, Natick, MA). Images were first reoriented and each scan was then spatially normalized into the standard stereotactic Montreal Neurological Institute (MNI) space using a [¹²³I]FP-CIT template developed by our group.¹⁵ The resulting images were resliced to a matrix of $91 \times 109 \times 91$ voxels with a voxel size of $2 \times 2 \times 2$ mm³. Finally, images were converted to standardized uptake value ratio (SUVR) units by normalizing each brain voxel to the radioligand uptake of the occipital lobe.¹⁶

DAT Quantification

DAT levels were quantified by the mean SUVR in different anatomically defined subregions of the striatum. Structurally, the striatum was divided into caudate and putamen. Using the methodology proposed by Tziortzi et al,⁵ we divided the putamen into anterior and posterior subregions using the anterior commissure as the reference point.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using the R version 3.5.1 and GraphPad Prism 8 (GraphPad Software.) Associations between blood cell counts (lymphocytes, neutrophils, and the NLR) and DAT levels in anatomically defined striatal subregions were assessed by correlation analyses using Spearman's correlation (following a positive Kolmogorov–Smirnov's test for non-normal data distribution). Significant associations were further assessed using multivariate linear regression analyses controlled for age, sex, disease duration, and LEDD. Results from covariate-controlled regression models were expressed as partial correlation (r), β coefficient (β), t value (t), and p value (p). Interaction analyses were performed to assess whether age or sex influenced the association between DAT levels and the peripheral immune profile in both cohorts. Multicollinearity was also assessed according to tolerance and variance inflation factor (VIF) values. Second, association analyses between blood cells counts, striatal DAT levels, and clinical characteristics were also performed using multivariate linear regression analyses, controlling for age, sex, and disease duration. The same analyses were performed in both cohorts. A p value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Clinical and Demographic Characteristics

Clinical and demographic characteristics of patients with PD from the primary and the PPMI replication

TABLE 1 Clinical and demographic characteristics, peripheral immune profile, and mean striatal DAT levels of patients with PD from the primary cohort and the PPMI replication cohort

Characteristics	Primary cohort (n = 211)	PPMI replication cohort (n = 344)
Age (y), mean ± SD	56 ± 9.51	61 ± 9.69
Sex (% males)	63.55	65.41
Age of onset (y), mean ± SD	49.63 ± 11.07	58.99 ± 9.94
Disease duration (y), mean ± SD	6.41 ± 6.51	2.04 ± 2.02
LEDD, mean ± SD	666.67 ± 679.69	0
HY in OFF state, mean ± SD	2.30 ± 1.14	1.57 ± 0.50
MDS-UPDRS-III score, mean ± SD	–	21.18 ± 9.07
MOCA score, mean ± SD	–	27.11 ± 2.31
Lymphocytes (×10 ³ cells/μL), mean ± SD	1.93 ± 0.61	1.67 ± 0.52
Neutrophils (×10 ³ cells/μL), mean ± SD	4.12 ± 1.21	3.93 ± 1.21
NLR, mean ± SD	2.34 ± 1.02	2.53 ± 1.01
SUVR score in caudate, mean ± SD	2.24 ± 0.47	2.43 ± 0.46
SUVR score in putamen, mean ± SD	2.36 ± 0.58	2.64 ± 0.49
SUVR score in anterior putamen, mean ± SD	2.65 ± 0.70	2.98 ± 0.61
SUVR score in posterior putamen, mean ± SD	2.10 ± 0.47	2.33 ± 0.40

Abbreviations: HY, Hoehn and Yahr stage; LEDD, levodopa equivalent daily dose; MDS-UPDRS-III, Movement Disorders Society Unified Parkinson’s Disease Rating Scale part III; MOCA, Montreal Cognitive Assessment Scale; n, total number of subjects; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; PPMI, Parkinson’s Progression Markers Initiative; SD, standard deviation; SUVR, standardized uptake value ratio; y, years.

cohorts were summarized in Table 1. The main differences between both cohorts were that patients with PD from the PPMI replication cohort had a shorter disease duration (2.04 ± 2.02 years) and were not on dopaminergic treatment.

Correlations Between the Peripheral Immune Response and Anatomically Defined Striatal Subregions

In our primary cohort, DAT levels in the caudate, putamen, and putamen subregions showed a significant negative

Spearman correlation with the NLR, as well as a positive correlation with the lymphocyte count and a negative correlation with the neutrophil count. The correlation was similar among both putamen subregions. Results are represented in Figure 1 and detailed in Supplementary Table S1.

These associations were also supported in covariate-controlled regression models. Lower DAT levels in the caudate and the putamen were associated with a higher NLR ($r = -0.28, p < 0.001$ and $r = -0.25, p < 0.001$, respectively) and a lower lymphocyte count ($r = +0.16, p < 0.05$ and $r = +0.19, p = 0.005$, respectively). Lower DAT levels in the caudate were associated with a higher neutrophil count ($r = -0.16, p = 0.02$), but the association between lower DAT levels in the putamen and the neutrophil count only reached trend-level statistical significance ($r = -0.11, p = 0.08$). When assessing putamen subregions, lower DAT levels in both the anterior and the posterior putamen were also significantly associated with a higher NLR and a lower lymphocyte count. However, although the anterior putamen was associated with a higher neutrophil count ($r = -0.14, p = 0.04$), this association was not found with the posterior putamen ($r = -0.07, p = 0.25$). Detailed results are shown in Supplementary Table S2.

In the PPMI replication cohort, DAT levels in the caudate and putamen, as well as in the putamen subregions, showed a negative Spearman correlation with the NLR ($r = -0.11, p = 0.05$ and $r = -0.08, p = 0.13$, respectively) and a significant positive correlation with the lymphocyte count. No correlation was found between striatal DAT levels and the neutrophil count results are represented in Figure 2 and in Supplementary Table S3.

In covariate-controlled regression models, we also found that lower DAT levels in the caudate and in the putamen were associated with a higher NLR ($r = -0.09, p = 0.05$ and $r = -0.11, p = 0.02$, respectively) and a lower lymphocyte count ($r = +0.13, p = 0.02$ and $r = +0.14, p = 0.01$, respectively). Again, no association was found between the caudate and putamen DAT levels and the neutrophil count ($r = +0.02, p = 0.94$ and $r = 0, p = 0.73$, respectively). Regarding anatomically defined putamen subregions, lower DAT levels in both the anterior and the posterior putamen were also associated with a significant higher NLR and a lower lymphocyte count. However, no association was found with the neutrophil count. Detailed results are shown in Supplementary Table S4.

Association between the Peripheral Immune Response, Striatal DAT Levels, and Demographic and Clinical Features of Patients with PD

First, our results showed that sex was not contributing in a meaningful way to the association found between DAT levels and the peripheral immune

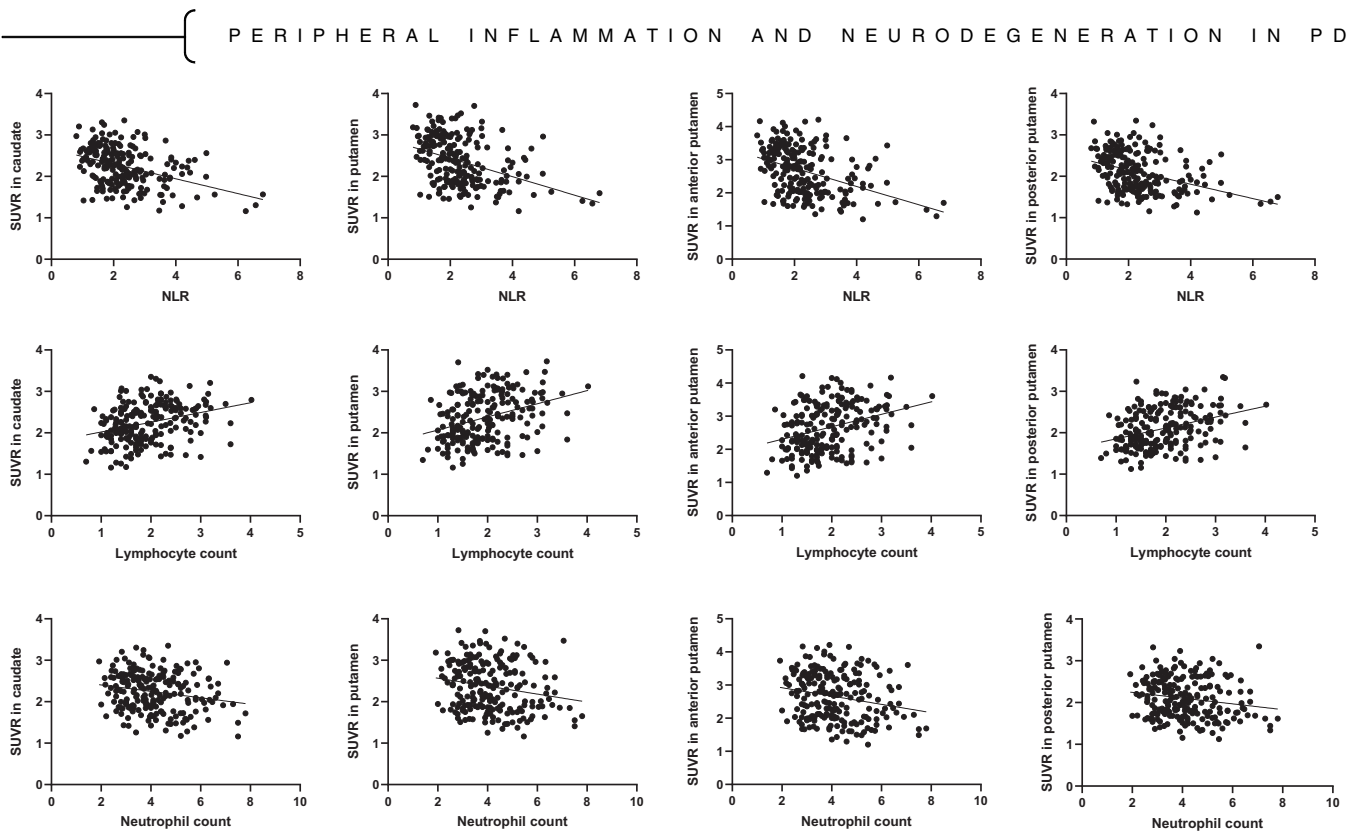


FIG. 1. Spearman's correlations between striatal dopamine transporter binding and the peripheral immune response in the primary cohort.

response as none of the interaction terms were statistically significant in either the primary or the PPMI replication cohorts (Supplementary Table S5). Secondly, interaction analyses showed a statistically significant but minimal interaction of age on the association between SUVR in all striatal subregions, and NLR as well as neutrophils in the primary cohort, which were not further replicated in the PPMI replication cohort (Supplementary Table S6).

In both cohorts, neither the NLR, nor the lymphocyte or neutrophil counts, showed a significant association with disease duration, after controlling for age and sex (Supplementary Table S7).

Concerning dopaminergic treatment, a weak but statistically significant positive association was found between dopaminergic treatment and neutrophils in patients with PD from our primary cohort. The association between dopaminergic treatment and lymphocyte count did not reach statistical significance. See Supplementary Table S8.

Concerning HY stage, it showed a significant negative association with DAT levels in all structural striatal subregions in both cohorts, after adjusting for age, sex, disease duration, and LEDD (Supplementary Table S10). Particularly, the strongest association was found with the posterior putamen in the primary cohort ($r = -0.18$, $p = 0.04$) and in the PPMI replication cohort ($r = -0.17$, $p = 0.002$). Moreover, the HY stage

showed a trend to a positive association with NLR and a negative association with the lymphocyte count. Although the association with the NLR only reached trend-level statistical significance in the primary cohort ($r = +0.12$, $p = 0.11$), it was statically significant in the PPMI replication cohort ($r = +0.12$, $p = 0.03$). On the contrary, whereas the association with the lymphocyte count was statistically significant in the primary cohort ($r = -0.13$, $p = 0.04$), it did not reach the statistical significance in the PPMI replication cohort ($r = -0.08$, $p = 0.14$). No association was found between HY stage and the neutrophil count. See Supplementary Table S7 for detailed results.

Similar to HY stage, MDS-UPDRS-III scores (only available in the PPMI cohort) showed significant associations with striatal DAT levels in all structural subregions (see Supplementary Table 11). Interestingly, the strongest association was found with the posterior putamen ($r = -0.15$, $p = 0.006$). Moreover, MDS-UPDRS-III score showed a positive association with the NLR ($r = +0.14$, $\beta = +1.25$, $p = 0.02$). This association was not found with lymphocytes or neutrophils. See Supplementary Table S12.

In the PPMI replication cohort, cognitive impairment based on the MOCA scale did not show a significant association with any of the peripheral inflammatory markers or regional striatal DAT levels. See Supplementary Tables S13 and S14.

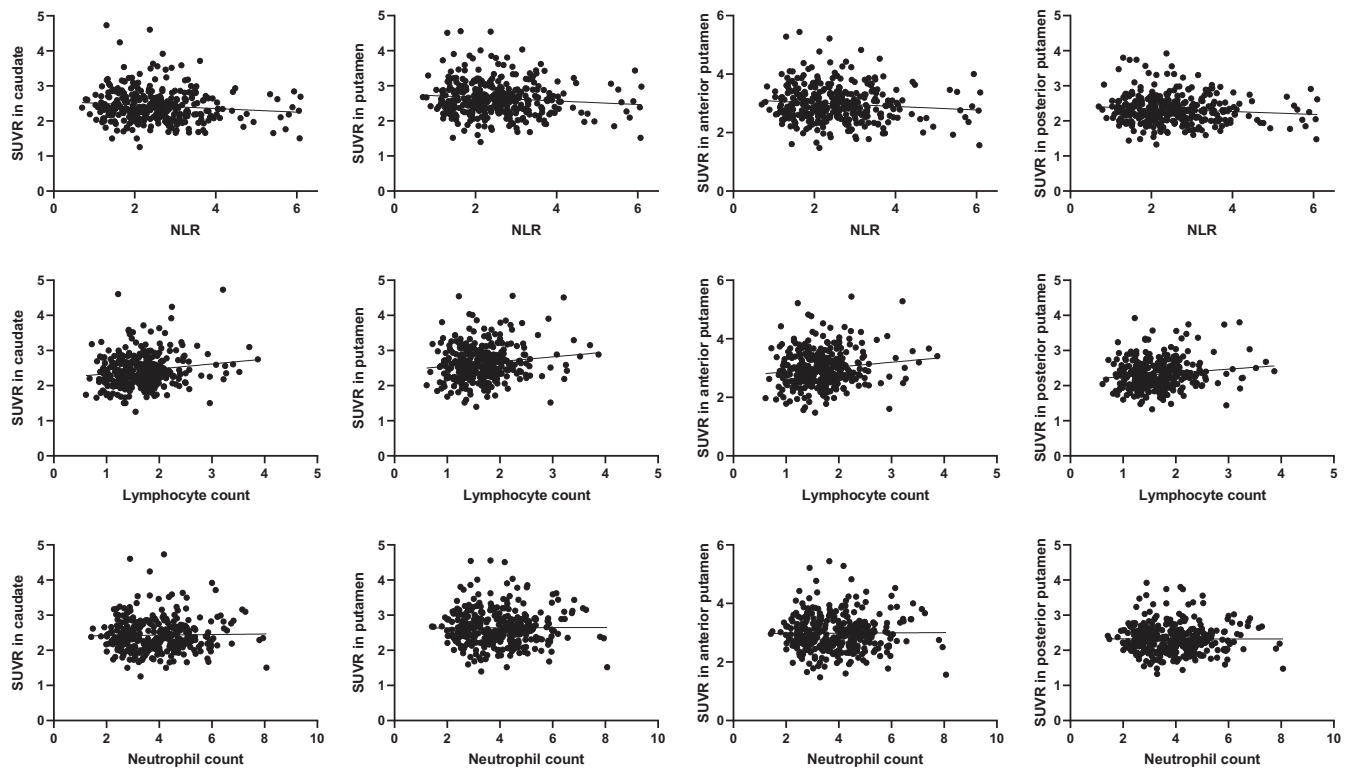


FIG. 2. Spearman's correlations between striatal DAT binding and the peripheral immune response in the PPMI replication cohort. Abbreviations: DAT, dopamine transporter; PPMI, Parkinson's Progression Markers Initiative.

Discussion

Following on the results from previous studies, we evaluated whether the peripheral inflammatory immune response in PD could be associated to dopaminergic degeneration. Our results revealed that both a higher NLR and a lower lymphocyte count in peripheral blood were associated with lower mean striatal DAT levels, relatively uniformly across different anatomical striatal subregions. Remarkably, these results were replicated in a complementary cohort of de novo PD patients, which suggests that this link is present since early stages of the disease.

Previous studies have linked neurodegeneration to inflammation.¹⁷⁻¹⁹ One of the first evidence linking neuroinflammation to the pathogenesis of PD came in 1988, when McGeer et al showed activated microglia in postmortem brains from patients with PD.²⁰ Later on, it was observed that CD4+ and CD8+ T lymphocytes were present in SNpc of patients with PD at greater levels than in healthy controls.⁸ Moreover, in vivo evaluation of microglial activity using positron emission tomography ligands has reported the presence of neuroinflammation in brains of patients with PD.^{21,22} Concerning peripheral inflammatory markers, cytokines, which communicate and modulate peripheral and central immune compartments, seem to be

dysregulated in the blood, cerebrospinal fluid, and brains of patients with PD,^{7,11,23} as well as leukocytes and their subpopulations have been described to be quantitatively and qualitatively altered in peripheral blood.^{10,12,24} However, very few studies specifically assessed the relationship between inflammatory peripheral markers and in vivo neurodegeneration. In a previous study,¹³ the authors found a negative correlation between the NLR and striatal DAT levels in a large sample of drug-naïve early patients with PD. Specifically, this correlation was found between the NLR and specific binding ratio in the contralateral putamen as well as ipsilateral putamen and caudate with respect to motor dominance of the patients. However, associations were only found to be significant in a tremor-dominant subgroup of patients and not in the other motor phenotypes. Hence, in this study, we aimed to reassess associations between NLR and striatal DAT levels in large and heterogeneous samples of PD patients from two different cohorts and further explore the differential roles of lymphocytes and neutrophils in this association. Finally, we assessed the relationships of peripheral inflammatory markers and regional DAT levels with motor and cognitive features of patients with PD.

To the best of our knowledge, this was the first study to analyze separately the contributions of lymphocyte

and neutrophil counts in peripheral blood to striatal DAT levels. Our results revealed that this association is mainly driven by lymphocytes. This finding is consistent with previous knowledge about the role of lymphocytes in PD. Not only a decreased absolute lymphocyte count has been constantly reported in the literature,^{7,8,24-26} but growing evidence also supports the crucial involvement of T lymphocyte subpopulations in PD.²⁴⁻²⁷ In patients with PD, it has been observed an increased proportion of Th1 and Th17 cells, which are pro-inflammatory, and a decreased number of Th2 cells, which have anti-inflammatory functions, could lead to a functional pro-inflammatory Th1-biased immune response.^{27,28} However, other groups have published an increase of Th17 and Th2 cells in PD, without changes in Th1.²⁹ Diverse reports have been also reported on regulatory T cells, which are considered to have modulatory functions.^{26,28,29} Altogether, it is suggested that this imbalance of specific T lymphocytes subpopulations could lead to a deficient suppression of the proinflammatory response that could result in the loss of vulnerable dopaminergic neurons.^{8,9,27,30} Interestingly, it has been recently reported that a lower lymphocyte count is associated with an increased risk of subsequent PD, suggesting that this might be a causal relationship.³¹ In this regard, data from the PPMI replication cohort in our study showed that a lower lymphocyte count was also associated with lower DAT levels in de novo PD patients, reinforcing that this link is present since the very early stages of the disease. To elucidate further this possible causal role of lymphocytes in neurodegeneration, studies on the link between lymphocytes, particularly their subpopulations, and dopaminergic degeneration in the prodromal phase of PD could be of high value.

In contrast to lymphocyte count, we were not able to find a consistent association between the neutrophil count and striatal DAT levels in our study. Although we observed a weak negative association in the primary cohort, which might certainly strengthen the correlation with the NLR, no association was found in the PPMI replication cohort. Although a higher neutrophil count has been reported in patients with PD,¹² few studies have specifically addressed the role of neutrophils in PD etiopathogenesis.⁹ It should be noted that the main differences between both cohorts were that patients from the PPMI replication cohort were in early stages of the disease and were not under dopaminergic treatment; hence, two hypotheses could be made. Because neutrophils have dopamine receptors,³² dopaminergic treatment in patients from the primary cohort could have modulated neutrophils' function. Moreover, our results might suggest that neutrophil alterations might not be primary related to neurodegeneration, but they might play a secondary role and contribute to sustain chronic inflammation. Further longitudinal and specific studies are needed to assess the role of neutrophils in PD.

Finally, although PD is a complex neurodegenerative disorder, the cardinal motor features of PD result mainly from dopamine deficiency within the motor loop that involves principally the precentral motor fields and their projection through the basal ganglia, mainly with the posterior putamen.^{2,33} We aimed to evaluate associations between inflammation, neurodegeneration, and motor symptoms in PD. Our results showed that both HY stage (in both cohorts) and MDS-UPDRS-III (only in the PPMI replication cohort) were negatively correlated with lower striatal DAT levels, which is in line with previous reports.^{2,34,35} Our particular finding was that the highest association was observed for the posterior putamen, which is not surprising as this subregion has functional connections with the frontal eye field, pre-supplementary motor area, and precentral gyrus.^{5,33} Additionally, although the HY stage only showed a trend to a positive association with the NLR, we found that a higher MDS-UPDRS-III score was significantly associated with a higher NLR. Compared to the HY stage, the MDS-UPDRS-III score comprehensively assesses the major motor symptoms of PD. Despite the link between inflammation and a more severe motor status has been reported in other studies based on proinflammatory profiles of serum cytokines,³⁶⁻³⁸ our study only partially confirmed these hypotheses. By contrast, increased microglial activation in brains of patients with PD has not been reported to correlate with clinical severity.^{21,22} Altogether, our results suggest an intricate relationship between peripheral inflammation (higher NLR), dopaminergic neurodegeneration (lower striatal DAT levels), and worse motor impairment, even in early stages of PD. These results should be considered exploratory and require further investigation. Finally, we assessed whether there was an association between cognition, the peripheral immune response, and striatal DAT levels in our study. Despite that we failed to find an association, no detailed cognitive assessments were available for our primary cohort, and it is an interesting venue for further research.

The strength of our conclusions is tempered by certain limitations. First, the retrospective and cross-sectional design of this study cannot elude that some covariates might influence the results. To minimize this risk, we applied rigorous exclusion criteria (ie, inflammatory diseases or cancer) to avoid confounding factors, and we included secondary analyses controlling for the identified confounding covariates. Second, the inclusion of additional inflammatory markers and/or lymphocyte subpopulations would be of great value for characterizing the systemic inflammatory response in more detail, but unfortunately, these data were not available for our present study. Finally, quantification of specific DAT binding reductions in small, spatially detailed striatal subregions may benefit from partial

volume correction of [¹²³I]FP-CIT SPECT signal using anatomic information from high-resolution structural magnetic resonance imaging,³⁹ but this data was not available for our retrospective cohort. Despite these limitations, a distinct strength of our study is the replication of the principal findings in an independent cohort of PD patients at an early disease stage.

Taken together, our findings across two independent cohorts suggest a relationship between a peripheral inflammatory immune response and dopaminergic degeneration in patients with PD. A lower lymphocyte count and possibly a consequently higher NLR are associated with lower striatal DAT levels in patients with PD. By contrast, our results do not suggest a primary role of neutrophils in neurodegeneration in PD. Further studies are required to confirm our results and to elucidate the cause-and-effect relationship. Our preliminary data could suggest a new strategy for studying and monitoring the relationship between peripheral inflammation and neurodegeneration in living patients with PD. A better understanding of the role of the peripheral inflammatory immune responses in the complex pathophysiologic mechanisms in PD is also likely to have therapeutic implications in the future. ■

Acknowledgments: 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. Data biospecimens used in the analyses presented in this article were obtained from the PPMI (<https://www.ppmi-info.org/access-data-specimens/download-data>). As such, the investigators within PPMI contributed to the design and implementation of PPMI and/or provided data and collected biospecimens, but did not participate in the analysis or writing of this report. For up-to-date information on the study, visit <https://www.ppmi-info.org>. PPMI, a public-private partnership, is funded by The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research and funding partners, including AbbVie, AcureX Therapeutics, Allergan, Amathus Therapeutics, Aligning Science Across Parkinson's, Avid Radiopharmaceuticals, Bial Biotech, Biogen, BioLegend, Bristol-Myers Squibb, Calico Life Sciences, Celgene Corporation, Coave, DeCapo BrainScience, Denali Therapeutics, The Edmond J. Safra Foundation, 4D Pharma, GE Healthcare, Genentech, GlaxoSmithKline, Golub Capital, Handl Therapeutics, Insitro, Janssen Pharmaceuticals, Lilly, Lundbeck, Merck&Co, Meso Scale Discovery, Neurocrine Biosciences, Pfizer, Piramal Imaging, Prevail Therapeutics, F. Hoffmann-La Roche and its affiliated company Genentech, Sanofi Genzyme, Servier, Takeda Pharmaceutical Company, Teva Neuroscience, UCB, Vanqua Bio, Verily Life Sciences, Voyager Therapeutics, and Yumanity Therapeutics.

Data Availability Statement

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

REFERENCES

1. Postuma RB, Berg D, Stern M, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2015;30(12):1591–1601.
2. Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: a special essay on the 200th anniversary of the shaking palsy. *Mov Disord* 2017 Sep;32(9):1264–1310.
3. Bloem BR, Okun MS, Klein C. Parkinson's disease. *Lancet* 2021; 397(10291):2284–2303.

4. Saeed U, Compagnone J, Aviv RI, et al. Imaging biomarkers in Parkinson's disease and parkinsonian syndromes: current and emerging concepts. *Transl Neurodegener* 2017;6:8.
5. Tziortzi AC, Searle GE, Tzimopoulou S, et al. Imaging dopamine receptors in humans with [¹¹C]-(+)-PHNO: dissection of D3 signal and anatomy. *Neuroimage* 2011;54:264–277.
6. Labrador-Espinosa MA, Grothe MJ, Macías-García D, et al. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease specifically associates with dopaminergic depletion in sensorimotor-related functional subregions of the striatum. *Clin Nucl Med* 2021;46(6):e296–e306.
7. Tansey MG, Romero-Ramos M. Immune system responses in Parkinson's disease: early and dynamic. *Eur J Neurosci* 2019;49(3): 364–383.
8. Tansey MG, Wallings RL, Houser MC, Herrick MK, Keating CE, Joers V. Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Immunol* 2022;22:657–673.
9. Hirsch EC, Standaert DG. Ten unsolved questions about neuroinflammation in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2021;36(1): 16–24.
10. Williams GP, Schonhoff AM, Sette A, Lindestam Arlehamn CS. Central and peripheral inflammation: connecting the immune responses of Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2022;6:1–8.
11. Tan E, Chao YX, West A, Chan LL, Poewe W, Jankovic J. Parkinson disease and the immune system — associations, mechanisms and therapeutics. *Nat Rev Neurol* 2020;16(6):303–318.
12. Muñoz-Delgado L, Macías-García D, Jesús S, et al. Peripheral immune profile and neutrophil-to-lymphocyte ratio in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2021;36(10):2426–2430.
13. Sanjari Moghaddam H, Ghazi Sherbaf F, Mojtahed Zadeh M, Ashraf-Ganjouei A, Aarabi MH. Association between peripheral inflammation and DATSCAN data of the striatal nuclei in different motor subtypes of Parkinson disease. *Front Neurol* 2018;9:234.
14. Parkinson Progression Marker Initiative. The Parkinson progression marker Initiative (PPMI). *Prog Neurobiol* 2011;95(4):629–635.
15. García-Gómez FJ, García-Solís D, Luis-Simón FJ, et al. Elaboration of the SPM template for the standardization of SPECT images with ¹²³I-Ioflupane. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol* 2013;32:350–356.
16. Tinaz S, Chow C, Kuo PH, Krupinski EA, et al. Semiquantitative analysis of dopamine transporter scans in patients with Parkinson disease. *Clin Nucl Med* 2018;43(1):e1–e7.
17. Gelders G, Baekelandt V, Van der Perren A. Linking neuroinflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *J Immunol Res* 2018;16:4784268.
18. Machado A, Herrera AJ, Venero JL, et al. Peripheral inflammation increases the damage in animal models of nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration: possible implication in Parkinson's disease incidence. *Parkinsons Dis* 2011;2011:393769.
19. La Virola P, Balducci C, Baroni M, et al. Peripheral inflammation exacerbates α-synuclein toxicity and neuropathology in Parkinson's models. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2021 Feb;47(1):43–60.
20. 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(8):1285–1291.
21. 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;21:404–412.
22. Bartels AL, Willemsen ATM, Doorduyn J, de Vries EFJ, Dierckx RA, Leenders KL. [¹¹C]-PK11195 PET: quantification of neuroinflammation and a monitor of anti-inflammatory treatment in Parkinson's disease? *Parkinsonism Relat Disord* 2010;16:57–59.
23. Qin XY, Zhang SP, Cao C, Loh YP, Cheng Y. Aberrations in peripheral inflammatory cytokine levels in Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Neurol* 2016;73(11):1316–1324.
24. Contaldi E, Magistrelli L, Comi C. T lymphocytes in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2022;12(s1):S65–S74.
25. Fuzzati-Armentero MT, Cerri S, Blandini F. Peripheral-central neuroimmune crosstalk in Parkinson's disease: what do patients and animal models tell us? *Front Neurol* 2019;10:1–19.

26. Yan Z, Yang W, Wei H, et al. Dysregulation of the adaptive immune system in patients with early-stage Parkinson disease. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2021;8(5):e1036.
27. Kustrimovic N, Comi C, Magistrelli L, et al. Parkinson's disease patients have a complex phenotypic and functional Th1 bias: cross-sectional studies of CD4⁺ Th1/Th2/T17 and Treg in drug-naïve and drug-treated patients. *J Neuroinflammation* 2018;15(1):205.
28. Chen Z, Chen S, Liu J. The role of T cells in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2018;169:1–23.
29. Jiang S, Gao H, Luo Q, Wang P, Yang X. The correlation of lymphocyte subsets, natural killer cell, and Parkinson's disease: a meta-analysis. *Neurol Sci* 2018;38:1373–1380.
30. Álvarez-Luquín DD, Arce-Sillas A, Leyva-Hernández J, et al. Regulatory impairment in untreated Parkinson's disease is not restricted to Tregs: other regulatory populations are also involved. *J Neuroinflammation* 2019;16(1):212.
31. Jensen MP, Jacobs BM, Dobson R, et al. Lower lymphocyte count is associated with increased risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2021;89(4):803–812.
32. Sarkar C, Basu B, Chakroborty D. The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain Behav Immun* 2010;24(4):525–528.
33. DeLong MR, Wichmann T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 2007;64:20–24.
34. Furukawa K, Shima A, Kambe D, et al. Motor progression and nigrostriatal neurodegeneration in Parkinson disease. *Ann Neurol* 2022;92(1):110–121.
35. Terashi H, Taguchi T, Ueta Y, Mitoma H, Aizawa H. Relationship between ¹²³I-FP-CIT-SPECT and motor severity in drug-naïve patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2021;15:117476.
36. Lawton M, Baig F, Toulson G, et al. Blood biomarkers with Parkinson's disease clusters and prognosis: the oxford discovery cohort. *Mov Disord* 2020;35(2):279–287.
37. Tsukita K, Sakamaki-Tsukita H, Takahashi R. Lower circulating lymphocyte count predicts ApoE ε4-related cognitive decline in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2021;36(12):2969–2971.
38. Martin-Ruiz C, Williams-Gray CH, Yarnall AJ, et al. Senescence and inflammatory markers for predicting clinical progression in Parkinson's disease: the ICICLE-PD study. *J Parkinsons Dis* 2020;10(1):193–206.
39. Trnka J, Dusek P, Samal M, et al. MRI-guided voxel-based automatic semi-quantification of dopamine transporter imaging. *Phys Med* 2020;75:1–10.

Supporting Data

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

SGML and CITI Use Only DO NOT PRINT

Author 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.

L.M.D.: 1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B.

M.A.L.E.: 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3B.

D.M.G.: 1B, 1C, 2C, 3B.

S.J.: 1B, 1C, 2C, 3B.

B.B.Z.: 2B, 2C, 3B.

P.F.R.: 1B, 1C, 3B.

A.D.A.G.: 1B, 1C, 3B.

M.I.R.C.: 1B, 1C, 3B.

S.C.L.: 1B, 1C, 3B.

J.S.R.: 1B, 1C, 3B.

F.C.: 1B, 1C, 3B.

D.G.S.: 1B, 1C, 3B.

M.J.G.: 1A, 1B, 1C, 2A, 2C, 3B.

P.M.: 1A, 1B, 1C, 2A, 2C, 3B.

Financial Disclosures

L.M.D. has received support for attending meetings and/or travel or honorarium for lecturing from AbbVie, Zambon, Merz, and Italfarmaco. M.A.L.E. has none to declare. D.M.G. has received support for attending meetings and/or travel or honorarium for lecturing from Palex, AbbVie, and Italfarmaco. S.J. has received support for attending meetings and/or travel or honorarium for lecturing from Abbott, AbbVie, Bial, Italfarmaco, Merz, and Zambon. B.B.Z. has none to declare. P.F.R. has none to declare. A.D.A.G. has received support for attending meetings and/or travel or honorarium for lecturing from AbbVie, Bial, Italfarmaco, Merz, UCB, and Zambon. M.I.R.C. has none to declare. S.C.L. has none to declare. J.S.R. is a founder and advisor at Qubiotech Health Intelligence S.L. F.C. has none to declare. D.G.S. has none to declare. M.J.G. has none to declare. P.M. has received support for attending meetings and/or travel or honorarium for lecturing from Abbott, Allergan, AbbVie, Bial, Britannia, Italfarmaco, Merz, UCB, Teva, and Zambon.

Supplementary Information

Methods

Neuroimaging acquisition:

At our centre, data were acquired on a Siemens Symbia T6 scanner with a dual-head rotating gamma camera and fan-beam collimator. Image acquisition was started between 3 and 4 h after injection of 185 MBq of [¹²³I]FP-CIT. A total of 120 projections of 30s each over a 360° circular orbit was acquired on a 128×128 matrix (zoom 1.23) to build the 3D images. Reconstruction was performed with the Siemens e.soft software (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) by applying a filtered back-projection (FBP) reconstruction algorithm using a Butterworth filter.

For the PPMI cohort, data acquisition was performed across multiple centers following a standardized protocol. Images were acquired 4 ± 0.5 hours after the injection of 111 to 185 MBq of [¹²³I]FP-CIT. A total of 120 projections of 30s each over a 360° circular orbit was acquired on a 128×128 matrix. 3D image reconstruction was then carried out using the PMOD software (PMOD Technologies, Zurich, Switzerland). In order to improve image homogeneity across the multicentric image acquisitions, the Imaging Core Lab of the Institute for Neurodegenerative Disorders (Yale University, New Haven, Connecticut) applies standardized pre-processing steps to all [¹²³I]FP-CIT acquisitions in PPMI¹⁵. The complete standardized protocol is available at the PPMI website: [PPMI2.0 SPECT TOM Final v5.0 20211207 PE.pdf \(ppmi-info.org\)](https://ppmi-info.org/PPMI2.0_SPECT_TOM_Final_v5.0_20211207_PE.pdf)

Results

Table 1. Spearman’s rank order analyses between SUVR in striatal regions-of-interest, and the NLR, lymphocytes and neutrophils in patients with PD from the primary cohort.

	NLR	Lymphocyte count	Neutrophil count
SUVR in caudate	-0.39 (<0.001)	+0.33 (<0.001)	-0.18 (0.008)
SUVR in putamen	-0.40 (<0.001)	+0.34 (<0.001)	-0.20 (0.004)
SUVR in anterior putamen	-0.41 (<0.001)	+0.33 (<0.001)	-0.20 (0.003)
SUVR in posterior putamen	-0.39 (<0.001)	+0.34 (<0.001)	-0.17 (0.01)

Abbreviations: NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; SUVR, standardized uptake value ratio. Notes: values are express as rho (*p value*).

Table 2. Covariate-controlled regression analyses between SUVR in putamen subregions and the NLR, lymphocytes and neutrophils in patients with PD from our primary cohort.

	NLR	Lymphocyte count	Neutrophil count
SUVR in caudate	$r = -0.28$, $\beta = -0.09$, $t = -4.22$, $p < 0.001$	$r = +0.16$, $\beta = +0.09$, $t = +2.34$, $p = 0.02$	$r = -0.16$, $\beta = -0.04$, $t = -2.32$, $p = 0.02$
SUVR in putamen	$r = -0.25$, $\beta = -0.10$, $t = -3.78$, $p < 0.001$	$r = +0.19$, $\beta = +0.12$, $t = +2.86$, $p = 0.005$	$r = -0.11$, $\beta = -0.04$, $t = -1.70$, $p = 0.08$
SUVR in anterior putamen	$r = -0.27$, $\beta = -0.13$, $t = -3.99$, $p < 0.001$	$r = +0.18$, $\beta = +0.14$, $t = +2.62$, $p = 0.01$	$r = -0.14$, $\beta = -0.06$, $t = -2.06$, $p = 0.001$
SUVR in posterior putamen	$r = -0.22$, $\beta = -0.08$, $t = -3.32$, $p = 0.001$	$r = +0.20$, $\beta = +0.11$, $t = +3.02$, $p = 0.003$	$r = -0.07$, $\beta = -0.02$, $t = -1.16$, $p = 0.25$

Abbreviations: SUVR, standardized uptake value ratio; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio. Notes: data are shown as as partial correlation (*r*), beta coefficient (β), t value (*t*), and p value (*p*) obtained by multivariate linear regression analyses with SUVR as the dependent variable, and adjusted for age, sex, disease duration and levodopa equivalent daily dose.

Table 3. Spearman’s rank order analyses between SUVR in striatal regions-of-interest, and the NLR, lymphocytes and neutrophils in patients with PD from the PPMI replication cohort.

	NLR	Lymphocyte count	Neutrophil count
SUVR in caudate	-0.11 (0.05)	+0.12 (0.02)	0 (0.99)
SUVR in putamen	-0.08 (0.13)	+0.11 (0.04)	0 (0.89)
SUVR in anterior putamen	-0.08 (0.12)	+0.10 (0.05)	0.01 (0.89)
SUVR in posterior putamen	-0.08 (0.15)	+0.11 (0.04)	0 (0.95)

Table 4. Covariate-controlled regression analyses between SUVR in putamen subregions and the NLR, lymphocytes and neutrophils in patients with PD from the PPMI replication cohort.

	NLR	Lymphocyte count	Neutrophil count
SUVR in caudate	$r = -0.09, \beta = -0.05,$ $t = -1.90, p = 0.05$	$r = +0.13, \beta = +0.11,$ $t = +2.41, p = 0.02$	$r = +0.02, \beta = 0.001,$ $t = 0.06, p = 0.94$
SUVR in putamen	$r = -0.11, \beta = -0.06,$ $t = -2.32, p = 0.02$	$r = +0.14, \beta = +0.14,$ $t = +2.62, p = 0.01$	$r = +0, \beta = -0.01,$ $t = -0.34, p = 0.73$
SUVR in anterior putamen	$r = -0.10, \beta = -0.07,$ $t = -2.18, p = 0.03$	$r = +0.13, \beta = +0.16,$ $t = +2.47, p = 0.01$	$r = +0.01, \beta = -0.01,$ $t = -0.25, p = 0.80$
SUVR in posterior putamen	$r = -0.11, \beta = -0.05,$ $t = -2.44, p = 0.02$	$r = +0.15, \beta = +0.12,$ $t = +2.73, p = 0.01$	$r = +0.01, \beta = -0.01,$ $t = -0.46, p = 0.65$

Abbreviations: SUVR, standardized uptake value ratio; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio. Notes: data are shown as as partial correlation (r), beta coefficient (β), t value (t), and p value (p) obtained by multivariate linear regression analyses with SUVR as the dependent variable, and adjusted for age, sex, and disease duration.

Table 5. Interaction analyses assessing the effect of sex on the association between DAT levels and the peripheral immune response in the primary cohort and in the PPMI replication cohort.

		NLR	Lymphocytes	Neutrophils
SUVR in caudate	Primary cohort	$\beta = -0.06, t = -0.97,$ $p = 0.33$	$\beta = -0.05, t = 0.49,$ $p = 0.63$	$\beta = -0.02, t = 0.30,$ $p = 0.77$
	PPMI cohort	$\beta = -0.04, t = -0.74,$ $p = 0.46$	$\beta = +0.07, t = +0.69,$ $p = 0.49$	$\beta = -0.02, t = -0.52,$ $p = 0.60$
SUVR in putamen	Primary cohort	$\beta = +0.11, t = -1.48,$ $p = 0.14$	$\beta = -0.13, t = -1.02,$ $p = 0.31$	$\beta = -0.02, t = -0.24,$ $p = 0.81$
	PPMI cohort	$\beta = -0.04, t = -0.67,$ $p = 0.51$	$\beta = +0.02, t = +0.21,$ $p = 0.84$	$\beta = -0.03, t = -0.57,$ $p = 0.57$
SUVR in anterior putamen	Primary cohort	$\beta = +0.14, t = +1.57,$ $p = 0.12$	$\beta = -0.14, t = -0.91,$ $p = 0.36$	$\beta = +0.002, t = +0.02,$ $p = 0.98$
	PPMI cohort	$\beta = -0.04, t = -0.58,$ $p = 0.56$	$\beta = +0.05, t = +0.36,$ $p = 0.72$	$\beta = -0.02, t = -0.37,$ $p = 0.71$
SUVR in posterior putamen	Primary cohort	$\beta = +0.07, t = +1.31,$ $p = 0.19$	$\beta = -0.12, t = -1.15,$ $p = 0.25$	$\beta = -0.03, t = -0.59,$ $p = 0.56$
	PPMI cohort	$\beta = -0.04, t = -0.77,$ $p = 0.44$	$\beta = -0.001, t = -0.01,$ $p = 0.99$	$\beta = -0.03, t = -0.83,$ $p = 0.41$

Abbreviations: NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; SUVR, standardized uptake value ratio. Data are shown as beta coefficient (β), t value (t), and p value (p), obtained by multiple linear regression analyses with SUVR in striatal subregions as the dependent variable, and NLR, lymphocytes and neutrophils as independent variable, and sex as the interaction term.

Table 6. Interaction analyses assessing the effect of age on the association between DAT levels and the peripheral immune response in the primary cohort and in the PPMI replication cohort.

		NLR	Lymphocytes	Neutrophils
SUVR in caudate	Primary cohort	$\beta = +0.008, t = +2.76, p = 0.01^*$	$\beta = -0.007, t = -1.43, p = 0.15$	$\beta = +0.006, t = +2.28, p = 0.02^*$
	PPMI cohort	$\beta = -0.003, t = +1.31, p = 0.19$	$\beta = -0.008, t = -1.74, p = 0.08$	$\beta = -0.0009, t = -0.39, p = 0.70$
SUVR in putamen	Primary cohort	$\beta = +0.01, t = +2.46, p = 0.01^*$	$\beta = -0.008, t = -1.34, p = 0.18$	$\beta = +0.007, t = 2.04, p = 0.04^*$
	PPMI cohort	$\beta = +0.004, t = +1.45, p = 0.15$	$\beta = -0.007, t = -1.32, p = 0.19$	$\beta = +0.0002, t = 0.11, p = 0.91$
SUVR in anterior putamen	Primary cohort	$\beta = +0.012, t = +2.57, p = 0.01^*$	$\beta = -0.011, t = -1.63, p = 0.11$	$\beta = 0.008, t = +1.86, p = 0.06^*$
	PPMI cohort	$\beta = +0.005, t = +1.55, p = 0.12$	$\beta = -0.01, t = -1.59, p = 0.11$	$\beta = +0.0001, t = +0.05, p = 0.96$
SUVR in posterior putamen	Primary cohort	$\beta = +0.087, t = +1.50, p = 0.13$	$\beta = -0.005, t = -0.92, p = 0.36$	$\beta = +0.006, t = +2.23, p = 0.03^*$
	PPMI cohort	$\beta = +0.003, t = +1.25, p = 0.21$	$\beta = -0.004, t = -0.90, p = 0.37$	$\beta = +0.0004, t = +0.20, p = 0.84$

Abbreviations: NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; SUVR, standardized uptake value ratio. Data are shown as beta coefficient (β), t value (t), and p value (p), obtained by multiple linear regression analyses with SUVR in striatal subregions as the dependent variable, and NLR, lymphocytes and neutrophils as independent variable, and age as the interaction term. *p values < 0.05 were considered statistically significant.

Table 7. Covariate-controlled regression analyses of disease duration, with the NLR, lymphocytes, and neutrophils in patients with PD from both the primary and the PPMI replication cohorts.

	Disease duration – Primary cohort	Disease duration – PPMI replication cohort
NLR	$r = +0.06, \beta = +0.29, t = +0.91, p = 0.36$	$r = 0, \beta = 0, t = -0.03, p = 0.99$
Lymphocyte count	$r = -0.09, \beta = -0.68, t = -1.31, p = 0.19$	$r = +0.04, \beta = +0.16, t = +0.74, p = 0.46$
Neutrophil count	$r = 0, \beta = 0, t = 0, p = 0.99$	$r = +0.04, \beta = +0.06, t = +0.63, p = 0.53$

Abbreviations: NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio. Data are shown as partial correlation (r), beta coefficient (β), t value (t), and p value (p), obtained by multivariate linear regression analyses with HY stage as the dependent variable, and adjusted for age, sex, and levodopa equivalent daily dose (the later only in the primary cohort).

Table 8. Covariate-controlled regression analyses of levodopa equivalent daily dose with the NLR, lymphocytes, and neutrophils in patients with PD from the primary cohort.

	NLR	Lymphocytes	Neutrophils
LEDD	$r= +0.18, \beta= 3.91 \cdot 10^{-4},$ $t=2.67, p= 0.008$	$r= -0.13, \beta= 1.62 \cdot 10^{-4},$ $t= -1.82, p=0.07$	$r= +0.15, \beta= 3.63 \cdot 10^{-4},$ $t= 2.03, p=0.04$

Abbreviations: NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; LEDD, levodopa equivalent daily dose. Data are shown as partial correlation (r), beta coefficient (β), t value (t), and p value (p), obtained by multivariate linear regression analyses with cell counts as the dependent variable, and adjusted for age, sex, and disease duration.

Table 9. Covariate-controlled regression analyses between Hoehn & Yahr stage and striatal DAT levels in patients with PD from both the primary and the PPMI replication cohort.

	HY - Primary cohort	HY - PPMI replication cohort
SUVR in caudate	$r= -0.16, \beta= -0.30,$ $t= -2.07, p= 0.04$	$r= -0.16, \beta= -0.18,$ $t= -2.88, p= 0.004$
SUVR in putamen	$r= -0.17, \beta= -0.26,$ $t= -2.10, p= 0.04$	$r= -0.16, \beta= -0.17,$ $t= -2.93, p= 0.004$
SUVR in anterior putamen	$r= -0.16, \beta= -0.20,$ $t= -1.99, p= 0.05$	$r= -0.15, \beta= -0.13,$ $t= -2.70, p= 0.007$
SUVR in posterior putamen	$r= -0.18, \beta= -0.31,$ $t= -2.12, p= 0.04$	$r= -0.17, \beta= -0.22,$ $t= -3.16, p= 0.002$

Abbreviations: HY, Hoehn & Yahr stage. SUVR, standardized uptake value ratio. Data are shown as partial correlation (r), beta coefficient (β), t value (t), and p value (p), obtained by multivariate linear regression analyses with HY stage as the dependent variable, and adjusted for age, sex, disease duration and levodopa equivalent daily dose (the later only in the primary cohort).

Table 10. Covariate-controlled regression analyses between Hoehn & Yahr stage in OFF state, and the NLR, lymphocytes, and neutrophils in patients with PD from both the primary and the PPMI replication cohorts.

	HY - Primary cohort	HY - PPMI replication cohort
NLR	$r= +0.12, \beta= +0.08,$ $t= +1.63, p= 0.11$	$r= +0.12, \beta= +0.06,$ $t= +2.13, p= 0.03$
Lymphocyte count	$r= -0.13, \beta= -0.16,$ $t= -2.05, p= 0.04$	$r= -0.08, \beta= -0.08,$ $t= -1.48, p= 0.14$
Neutrophil count	$r= 0, \beta= 0,$ $t= 0.16, p= 0.88$	$r= +0.08, \beta= +0.03,$ $t= +1.39, p= 0.17$

Abbreviations: HY, Hoehn & Yahr stage, NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio. Data are shown as partial correlation (r), beta coefficient (β), t value (t), and p value (p), obtained by multivariate linear regression analyses with HY stage as the dependent variable, and adjusted for age, sex, disease duration and levodopa equivalent daily dose (the later only in the primary cohort).

Table 11. Covariate-controlled regression analyses between MDS-UPDRS-III score and striatal DAT levels in patients with PD from the PPMI replication cohort.

	MDS-UPDRS-III
SUVR in caudate	$r = -0.11, \beta = -2.42, t = -2.08, p = 0.04$
SUVR in putamen	$r = -0.13, \beta = -2.63, t = -2.49, p = 0.01$
SUVR in anterior putamen	$r = -0.12, \beta = -1.92, t = -2.24, p = 0.03$
SUVR in posterior putamen	$r = -0.15, \beta = -3.60, t = -2.76, p = 0.006$

Abbreviations: MDS-UPDRS-III, MDS-Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III; SUVR, standardized uptake value ratio. Data are shown as partial correlation (r), beta coefficient (β), t value (t), and p value (p), obtained by multivariate linear regression analyses with MDS-UPDRS part III score as the dependent variable, and adjusted for age, sex, and disease duration.

Table 12. Covariate-controlled regression analyses between MDS-UPDRS-III score and peripheral immune response in patients with PD from the PPMI replication cohort.

	MDS-UPDRS-III
NLR	$r = +0.14, \beta = +1.25, t = +2.41, p = 0.02$
Lymphocyte count	$r = -0.08, \beta = -1.40, t = -1.38, p = 0.17$
Neutrophil count	$r = +0.11, \beta = +0.76, t = +1.80, p = 0.07$

Abbreviations: MDS-UPDRS-III, MDS-Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio. Data are shown as partial correlation (r), beta coefficient (β), t value (t), and p value (p), obtained by multivariate linear regression analyses with MDS-UPDRS part III score as the dependent variable, and adjusted for age, sex, and disease duration.

Table 13. Covariate-controlled regression analyses between MOCA score and striatal DAT levels in patients with PD from the PPMI replication cohort.

	MOCA
SUVR in caudate	$r = 0, \beta = +0.12, t = +0.39, p = 0.69$
SUVR in putamen	$r = -0.04, \beta = -0.01, t = -0.05, p = 0.96$
SUVR in anterior putamen	$r = -0.03, \beta = -0.01, t = -0.02, p = 0.98$
SUVR in posterior putamen	$r = -0.04, \beta = -0.03, t = -0.09, p = 0.93$

Abbreviations: MOCA, Montreal Cognitive Assessment; SUVR, standardized uptake value ratio. Data are shown as partial correlation (r), beta coefficient (β), t value (t), and p value (p), obtained by multivariate linear regression analyses with MOCA score as the dependent variable, and adjusted for age, sex, and disease duration.

Table 14. Covariate-controlled regression analyses between MOCA score and peripheral immune response in patients with PD from the PPMI replication cohort.

	MOCA
NLR	$r = +0.04, \beta = +0.14, t = +1.09, p = 0.27$
Lymphocyte count	$r = +0.02, \beta = +0.13, t = +0.50, p = 0.62$
Neutrophil count	$r = +0.07, \beta = +0.18, t = +1.73, p = 0.09$

Abbreviations: MOCA, Montreal Cognitive Assessment; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio. Data are shown as partial correlation (r), beta coefficient (β), t value (t), and p value (p), obtained by multivariate linear regression analyses with MOCA score as the dependent variable, and adjusted for age, sex, and disease duration.

7. DISCUSIÓN

En este apartado se procede a realizar una discusión de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral. La etiopatogenia de la EP es compleja y en gran parte desconocida. Diversos mecanismos fisiopatológicos se creen implicados en ésta y su progresiva comprensión promete el desarrollo de dianas terapéuticas de futuras terapias modificadoras de enfermedad. La evidencia actual apoya que las respuestas inmunes y la inflamación probablemente jueguen un papel principal en el inicio y la progresión de la enfermedad. La hipótesis principal de este estudio fue que en los pacientes con EP existirían alteraciones en la respuesta inmune periférica medida por los leucocitos, sus subpoblaciones y la RNL y en concreto que los pacientes con EP tendrían una mayor RNL reflejando la presencia de inflamación. Por ello, el principal objetivo de esta tesis doctoral fue estudiar la respuesta inmune periférica presente en los pacientes con EP de la cohorte local del HUVR en Sevilla. Posteriormente, se evaluó si la respuesta inmune periférica estaría relacionada con las características clínicas y genéticas de los pacientes. Finalmente, se estudió si la respuesta inmune a nivel periférico estaba relacionada con la degeneración neuronal en el SNC.

7.1. Perfil inmune periférico y la ratio neutrófilo-linfocito en la EP.

Con el fin de dar respuesta a los dos primeros objetivos propuestos, se compararon los leucocitos, sus subpoblaciones y la RNL entre los pacientes con EP y CS.

En esta tesis doctoral se evidenció que los pacientes con EP tenían un menor recuento de linfocitos y monocitos, así como una tendencia a un mayor recuento de neutrófilos en comparación con CS. De forma más relevante, en esta tesis doctoral se demostró que los pacientes con EP tenían una mayor RNL en sangre periférica en comparación con los CS. Posteriormente, el metaanálisis realizado confirmó la presencia de una mayor RNL en los pacientes con EP, apoyando la presencia de una mayor inflamación periférica, en comparación con CS.

El menor recuento de linfocitos en sangre periférica en los pacientes con EP hallado en esta tesis doctoral fue consistente con lo publicado en la literatura (Chen et al., 2018; Fuzzati-Armentero y cols, 2019; Baird et al., 2019; Contaldi et al., 2022). Un metaanálisis

que incluía 21 estudios caso-control con un total de 943 pacientes con EP respaldó una disminución en el recuento de los linfocitos T CD3+ y CD4+ en sangre periférica en la EP (Jiang et al., 2017). Esta disminución en el recuento de linfocitos T CD4+ podría deberse a un desequilibrio de subpoblaciones linfocitarias específicas responsables de diferentes funciones inmunitarias. Kustrimovic y colaboradores describieron una disminución de las subpoblaciones Th2 y Th17 y una respuesta inmune potenciada por un aumento en los linfocitos Th1 (proinflamatorios) con un incremento en la producción de IFN- γ y TNF (Kustrimovic et al., 2018), igual que otros estudios (Chen et al., 2015). Acorde con esto, se ha descrito que los linfocitos T de los pacientes con EP muestran más receptores TNF- α en comparación con CS, lo que apoya la presencia de un proceso inflamatorio (Bongioanni et al., 1997). No obstante, otros grupos han descrito una disminución del recuento total de linfocitos T CD4+ pero con aumento de linfocitos Th17 y Th2, sin cambios en la subpoblación Th1 (Yan et al., 2021). En cuanto a los linfocitos T reguladores, responsables de modular e inhibir las respuestas inflamatorias, se han publicado resultados controvertidos. Mientras que algunos estudios observan una disminución del recuento de linfocitos Tregs (Chen et al., 2015; Kustrimovic et al., 2018; Alvarez-Luquin et al., 2019; Contaldi et al., 2022) o alteraciones en su disfuncionalidad (Chen et al., 2018), otros investigadores refieren un aumento en esta subpoblación (Jiang et al., 2017) o no observan cambios (Yan et al., 2021). Es posible que la divergencia en los resultados entre estudios sea debida al tamaño muestral, la heterogeneidad de los pacientes incluidos o la diferente metodología empleada en ellos. Paralelamente, los linfocitos T CD4+ en la EP parecen sufrir cambios en su funcionalidad, como alteraciones en la función mitocondrial y en la migración, y probablemente ello también comprometa su inmunocompetencia (Mamula et al., 2022). En conjunto, estos hallazgos podrían indicar la existencia de una respuesta inmune proinflamatoria excesiva acompañada de una supresión deficiente por parte de los mecanismos antiinflamatorios que podrían resultar en la pérdida de neuronas dopaminérgicas vulnerables en la EP.

Por otro lado, los neutrófilos son los protagonistas en la inflamación crónica. En esta tesis doctoral, se observó un aumento en el recuento de neutrófilos en los pacientes con EP en comparación con CS. Mientras que esta observación iría en línea con los estudios publicados por Akil et al., 2015 y Solmaz et al., 2018; otros estudios no encuentran

diferencias significativas en el recuento absoluto de neutrófilos en los pacientes con EP (Ataç et al., 2017; Contaldi et al., 2022; Stanca et al., 2022). Hasta la fecha, pocos estudios se han dirigido específicamente a analizar el papel de los neutrófilos en la EP. De forma añadida a la incertidumbre sobre las alteraciones cuantitativas en los neutrófilos en la EP, se ha sugerido que también podrían padecer alteraciones funcionales (Boyko et al., 2017). Por ejemplo, se ha descrito un aumento del estrés oxidativo en los neutrófilos circulantes de pacientes con EP en comparación con CS (Vitte et al., 2004) y una disminución en la fagocitosis de los neutrófilos, sugiriendo que esto supondría una pérdida de su función protectora a favor de una perpetuación de la inflamación (Salman et al., 1999). Futuros estudios dirigidos específicamente a los neutrófilos son necesarios para elucidar su rol en la EP. Por último, los monocitos también podrían estar contribuyendo a la patogenia de la EP. En este estudio se encontró un menor recuento de monocitos en pacientes con EP en comparación con CS. Estudios recientes han descrito alteraciones funcionales con una desregulación en sus subpoblaciones a favor de un perfil proinflamatorio, así como alteraciones en su capacidad fagocítica (Gardai et al., 2013; Grozdanov et al., 2014). Cabe mencionar que el sexo también podría estar influyendo de forma diferencial en la activación de los monocitos en la EP, siendo la inflamación mayor en mujeres que en hombres (Carlisle et al., 2021). Los resultados concernientes a los monocitos obtenidos en esta tesis doctoral deberían interpretarse con cautela, dado que la evidencia apunta a alteraciones en la función de monocitos, más que a alteraciones cuantitativas. Por ello, estudios funcionales más específicos probablemente serían necesarios para explorar el papel de los monocitos en la EP.

De forma relevante en esta tesis doctoral, la RNL fue significativamente mayor en los pacientes con EP en comparación a los CS en la cohorte del HUVR, lo cual apoyó la hipótesis de la presencia de una mayor respuesta inmune inflamatoria periférica en la EP. Pese a la divergencia de resultados previos en cuanto a la relación entre la RNL y la EP, el metaanálisis realizado también confirmó la existencia de una mayor RNL en la EP. El estudio caso-control de este estudio incluyó el mayor tamaño muestral descrito hasta la fecha (732 individuos), tras el de Moghaddam y colaboradores (536 individuos), y ambos estudios mostraron que la RNL fue significativamente mayor en pacientes con EP

en comparación con CS. Probablemente el reducido tamaño muestral de la mayoría de los estudios realizados previamente (< 120 individuos) pudo haber limitado la potencia estadística para alcanzar diferencias significativas en ellos, infraestimando el tamaño de efecto global. La robustez del metaanálisis llevado a cabo en esta tesis fue apoyada por el análisis de sensibilidad realizado. No obstante, se detectó una elevada heterogeneidad entre los estudios incluidos que no fue posible clarificar. En primer lugar, debe tenerse en cuenta el tratamiento dopaminérgico dado que las células inmunes expresan receptores dopaminérgicos, y su diferenciación y función podría verse influida por la levodopa administrada (Sarkar et al., 2010; Baird et al., 2019). En este estudio, se observó una leve asociación entre la LEDD y los linfocitos y la RNL. Dado que la mayor parte de los pacientes incluidos estaban en tratamiento dopaminérgico, no se puede descartar que éste haya influido en los valores de la RNL. Sin embargo, estudios realizados en pacientes de EP de novo sin tratamiento dopaminérgico también han descrito una mayor RNL en EP en comparación con CS, sugiriendo que esta alteración no está influenciada por el tratamiento con levodopa (Sanjari et al., 2018; Umehara et al., 2020).

Por tanto, esta tesis doctoral demostró la presencia de una mayor RNL en los pacientes con EP en comparación con CS, reflejando la presencia de una mayor inflamación periférica. No obstante, debe tenerse en cuenta que la RNL probablemente no sea lo suficientemente sensible para desentrañar los complejos mecanismos inmunológicos subyacentes y posiblemente sean necesarios más estudios para clarificar si esta alteración tiene un papel causal en la compleja fisiopatología de la EP. Al mismo tiempo, es posible que el abordaje de la EP como una sola entidad diagnóstica suponga una limitación de cara a esclarecer su fisiopatología y desarrollar terapias modificadoras. La heterogeneidad clínica de la EP probablemente también sea indicativa de distintos mecanismos fisiopatológicos subyacentes y por ello estudios en subgrupos específicos de pacientes podrían facilitar la comprensión de la fisiopatología subyacente.

Con esta hipótesis, se procedió a desarrollar los siguientes objetivos de esta tesis doctoral y estudiar la asociación entre la respuesta inmune periférica y las características clínicas y genéticas de la EP.

7.2. Relación de la respuesta inmune periférica con las características clínicas de la EP.

Para dar respuesta al tercer objetivo de esta tesis doctoral se analizó si la RNL y la respuesta inmune periférica estaba asociada con las características clínicas de los pacientes con EP en los tres estudios realizados.

En primer lugar, no se encontró asociación entre la RNL y la duración de la enfermedad, en línea con otros estudios (Ataç et al., 2017; Büyükkoyuncu et al., 2018), lo cual apoyaría la presencia de una mayor inflamación a lo largo de todo el curso de la enfermedad. Tampoco se encontró asociación entre la RNL y la edad de inicio de la enfermedad, hallazgo que contradice lo publicado previamente por Jiang y colaboradores en 2019 y Jin y colaboradores en 2020.

La asociación entre la respuesta inmune periférica y la severidad motora de la enfermedad se evaluó mediante la escala HY en los tres estudios realizados en la cohorte del HUVR. No se encontró una asociación significativa con la RNL en ninguno de ellos. Estudios previamente publicados analizando la asociación entre la severidad motora de la enfermedad y la inflamación periférica han mostrado estudios controvertidos. Mientras que algunos trabajos relacionan un perfil proinflamatorio de citoquinas con una mayor severidad motora (Williams-Gray et al., 2016; Karpenko et al., 2018), otros no encuentran relación entre el fenotipo clínico y la RNL o el perfil de citoquinas (Ataç et al., 2017; Sanjari et al., 2018; Yilmaz et al., 2018). Distintas hipótesis podrían formularse para explicar esta divergencia de resultados. Por un lado, podría deberse a la heterogeneidad de pacientes incluidos entre estudios. Por otro lado, el estadio HY es una escala globalmente aceptada para medir la severidad de la EP, pero posiblemente sea poco sensible en discriminar de forma precisa los distintos síntomas motores de la enfermedad en comparación con otras escalas como la MDS-UPDRS-III (la cual desafortunadamente no estaba disponible en la cohorte del HUVR, pero sí en la cohorte de PPMI). Por ese motivo, se procedió a analizar la asociación entre la inflamación y la severidad motora medida según la escala MDS-UPDRS-III en las dos cohortes de PPMI incluidas en el segundo y tercer estudio. En ambos, sí que se observó que una mayor RNL se asociaba significativamente con una mayor severidad motora basada en la escala

MDS-UPDRS-III. En comparación con el estadio HY, la escala MDS-UPDRS-III evalúa de forma más exhaustiva y precisa la sintomatología motora de la EP. Esta asociación va en línea con estudios previamente publicados basados en perfiles proinflamatorios de citoquinas séricas (Lawton et al., 2020; Martín-Ruiz et al., 2020; Tsukita et al., 2021). De forma muy interesante, Williams-Gray observaron que mientras un perfil de citoquinas más proinflamatorio (basado en IFN- γ , TNF- α , IL-2, y IL-16) se asociaba a una peor progresión motora a los 36 meses, un perfil más antiinflamatorio (basado en IL-4, IL-13 y IL-12p70) se asociaba a una función motora estable en el tiempo (Williams-Gray et al., 2016). A diferencia de esta asociación entre una mayor severidad motora y una mayor inflamación periférica, no se ha descrito que la severidad motora se correlacione con el aumento de la activación microglial en cerebros de pacientes con EP (Gerhard et al., 2006; Bartels et al., 2010). Estos resultados deberían considerarse exploratorios y requieren futuros proyectos prospectivos, dado que no pudieron validarse en otra cohorte independiente.

Por último, se evaluó si existía una asociación entre la cognición evaluada mediante la escala MOCA y la respuesta inmune periférica en las cohortes de PPMI incluidas en el segundo y tercer estudio. En ninguno de ellos se halló una asociación significativa. Previamente, sí que se ha descrito la relación de un mayor perfil proinflamatorio con el desarrollo de deterioro cognitivo y demencia, basada en estudios de citoquinas y neuroimagen (Martín-Ruiz et al., 2020; Lawton et al., 2021; Tsukita et al., 2021). Una limitación para tener en cuenta es la ausencia de evaluaciones cognitivas detalladas disponibles en la cohorte del HUVR, e indica un campo interesante para futuras investigaciones.

7.3. La respuesta inmune inflamatoria periférica difiere entre la EP esporádica y familiar.

La identificación de genes altamente implicados en la etiología de la EP supone una excelente oportunidad para estudiar y entender los diversos mecanismos implicados en la fisiopatología de la EP y probablemente también su heterogeneidad clínica.

Con el objetivo de dar respuesta al cuarto objetivo de esta tesis doctoral, se analizó específicamente si la respuesta inmune periférica podía diferir según las características

genéticas de los pacientes. Para ello se analizaron las diferencias entre pacientes con EP esporádica y pacientes con variantes patogénicas en los genes *LRRK2* y *GBA*, y en comparación con CS, en dos cohortes independientes.

En primer lugar, este estudio apoyó los hallazgos del primer estudio realizado, es decir, la existencia de una mayor respuesta inmune inflamatoria periférica en el conjunto de los pacientes con EP en comparación con CS, tanto en la cohorte primaria del HUVR como en la cohorte de replicación de PPMI.

Posteriormente, se encontraron diferencias en la respuesta inflamatoria según las características genéticas de los pacientes. Los pacientes con EP esporádica y con EP-*GBA* mostraron una mayor respuesta inflamatoria periférica reflejada por una mayor RNL, un menor recuento de linfocitos y un mayor recuento de neutrófilos, en comparación con CS. No obstante, este estudio reveló que los pacientes con EP-*LRRK2* no presentaban diferencias ni en la RNL ni en ninguna subpoblación leucocitaria en comparación con los CS, indicando que los mecanismos patogénicos en los pacientes con mutaciones patogénicas en el gen *LRRK2* podrían ser diferentes a los que subyacen a la EP esporádica. Además, estos resultados se validaron en la cohorte de replicación de la cohorte PPMI, así como en análisis estratificados por sexo en ambas cohortes.

Hasta la fecha, pocos estudios habían considerado las características genéticas de los pacientes al estudiar la respuesta inmune inflamatoria periférica. Las observaciones descritas en esta tesis doctoral podrían apuntar a la heterogeneidad genética de los pacientes con EP como uno de los posibles motivos de la controversia en los resultados entre los estudios publicados sobre la respuesta inmune inflamatoria periférica en los pacientes con EP.

Las mutaciones en el gen *LRRK2* son la causa más frecuente de EP familiar con herencia autosómica dominante, con fenotipos clínicos y patológicos muy similares a la EP esporádica. Aun así, se han descrito ligeras diferencias clínicas entre ellas. Por ejemplo, la edad de inicio de la EP-*LRRK2* es ligeramente inferior a la de la EP esporádica y el típico predominio masculino observado en la EP esporádica no se observa en la EP-*LRRK2* (Kozina et al., 2018, Tolosa et al., 2020). De hecho, las características demográficas de

las cohortes de este estudio coincidieron con la bibliografía, así como los resultados sugirieron que también podrían divergir en los mecanismos fisiopatológicos.

Estudios previos también han explorado las posibles diferencias en la respuesta inmune periférica entre los pacientes con EP esporádica y EP-*LRRK2*. Por ejemplo, Brockmann y colaboradores describieron que la EP esporádica, pero no la EP-*LRRK2*, presentaba niveles significativamente superiores de la IL-12-p40 (proinflamatoria), la IL-10 (antiinflamatoria) y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Estos hallazgos son interesantes dado que la IL-12 potencia la proliferación de los linfocitos T y su diferenciación a Th1 y Th17, promoviendo la inflamación. Además, se cree que la IL-10 inhibe la expansión y activación de los linfocitos Th1 y Th17, y se ha sugerido que promueve niveles más altos de la citocina proinflamatoria IL-12 en pacientes con EP (Rentzos et al., 2009). Por el contrario, otros estudios realizados en la cohorte del estudio BEAT-PD no encontraron diferencias en la respuesta inmune periférica (ni alteraciones celulares ni en citocinas) entre pacientes con EP y mutaciones en los genes *LRRK2* y *GBA* ni en portadores asintomáticos de estas mutaciones (Thaler et al., 2021; Thaler et al., 2021).

Paralelamente, hallazgos interesantes han surgido de modelos animales de *LRRK2*. En concreto, un estudio realizado en ratones que sobreexpresaban mutaciones patogénicas en el gen *LRRK2* descubrió que no había un aumento de expresión ni activación de *LRRK2* en la microglía cerebral ni infiltración de células mieloides o linfocitos T (Kozina et al., 2018). Estos hallazgos sugirieron a los investigadores que la inflamación y la neurodegeneración observadas en el cerebro de los ratones mutantes podrían estar mediadas por mediadores inflamatorios circulantes. Más interesante aún, descubrieron que, aunque había un aumento de la expresión de *LRRK2* en los leucocitos periféricos, no había diferencias en el recuento de células mononucleares entre los ratones mutantes y no mutantes. Por último, un análisis proteómico de los leucocitos reveló que los ratones mutantes *LRRK2* presentaban un enriquecimiento de proteínas implicadas en vías inmunes como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés) y la señalización del factor nuclear kB (NF-kB). En base a la evidencia expuesta, se plantea la hipótesis que mientras los linfocitos T podrían tener un papel más destacado en la etiopatogenia de la EP esporádica, la inflamación en la EP-

LRRK2 podría estar mediada por mediadores inflamatorios circulantes en lugar de por una desregulación de los linfocitos T.

En ambas cohortes de este estudio, la RNL fue mayor en los pacientes con EP-*GBA* en comparación con CS y pacientes con EP-*LRRK2*, lo que apoyó la presencia de una mayor respuesta inmune inflamatoria periférica en estos pacientes. Las variantes patogénicas en el gen *GBA* constituyen el mayor factor de riesgo genético en la EP esporádica. Las manifestaciones neurodegenerativas en los pacientes con EP-*GBA* pueden deberse a la pérdida de función de la GCasa o a los efectos tóxicos de los lípidos acumulados. Cabe destacar que se ha descrito que la actividad GCasa también se encuentra disminuida en los monocitos de los pacientes con EP esporádica, aún sin variantes patogénicas en el gen *GBA* (Atashrazm et al., 2018). La evidencia reciente apunta a que la inflamación también desempeña un papel clave en la patología de la EP-*GBA* (Jia et al., 2022; Mamais et al., 2022; Miliukhina y cols, 2020). Se ha sugerido que cuando el lisosoma está sobrecargado, el contenido de las vesículas lisosomales podría liberarse al espacio extracelular, activando la presentación de antígenos y exacerbando las respuestas inmunes inflamatorias a través de los neutrófilos y la inflamación crónica (Magnusen et al., 2021; Al-Azzawi et al., 2022, Lunghi et al., 2022). Se podría hipotetizar que los mecanismos subyacentes en la EP-*GBA* podrían ser compartidos, al menos parcialmente, con los de la EP esporádica, ya que el gen *GBA* actúa como un factor de riesgo y no como un gen causativo en la EP. Por ello, la mayor respuesta inmune inflamatoria periférica observada en este estudio en los pacientes con EP-*GBA* sería similar en comparación a los pacientes con EP esporádica.

Cabe destacar que los pacientes con EP-*GBA* son clínicamente diferentes de la EP-*LRRK2* o la EP esporádica, ya que especialmente los portadores de variantes severas suelen tener un curso más agresivo en términos de demencia y peor progresión motora (Szwedo et al., 2022). Curiosamente, tanto una mayor severidad motora como el desarrollo de demencia en la EP se han relacionado con niveles más altos de inflamación periférica (Martin-Ruiz et al., 2020; Kouli et al., 2020). En este estudio, y en línea con el estudio anterior, no se encontró una correlación entre el deterioro cognitivo y la respuesta inmune inflamatoria periférica, probablemente debido a la pequeña prevalencia de deterioro cognitivo en la cohorte de PPMI. Debe tenerse en cuenta que

el pequeño tamaño muestral de los subgrupos de pacientes con EP-GBA en función de la severidad de la variante también limitó la obtención de conclusiones fiables. Pese a que éste no fue un objetivo primario de este estudio, futuras investigaciones podrían llevarse a cabo para estudiar específicamente la relación entre la inflamación periférica y el curso más agresivo de los pacientes con EP-GBA teniendo en cuenta los efectos de los diferentes tipos de variantes.

Todo lo anteriormente expuesto sugiere que existen distintos subtipos biológicos entre los pacientes con EP implicando distintos mecanismos fisiopatológicos inflamatorios subyacentes. En esta línea, se plantea la necesidad de estratificar los pacientes según sus características genéticas para proseguir los estudios de investigación e identificar posibles dianas terapéuticas con el fin de desarrollar una medicina personalizada.

7.4. La inflamación periférica se relaciona con la degeneración dopaminérgica en la EP.

Para atender al quinto objetivo planteado en esta tesis doctoral, se estudió si la respuesta inmune inflamatoria periférica podría estar relacionada con la degeneración dopaminérgica en la SNpc. Para ello, se estudió la asociación entre la RNL, los linfocitos y los neutrófilos en sangre periférica y los niveles de DAT en el estriado cuantificados por el SPECT [¹²³I]FP-CIT, en dos cohortes independientes.

Esta tesis doctoral demostró que el incremento de la respuesta inmune inflamatoria a nivel periférico se encontraba relacionada con la degeneración dopaminérgica en el SNC. Una mayor NLR y un menor recuento de linfocitos en sangre periférica se asociaron con menores niveles de DAT en el estriado, y de forma relativamente uniforme en todas sus subregiones anatómicas. Notablemente, estos resultados fueron replicados en una cohorte independiente de pacientes con EP de novo, lo que sugirió que esta asociación estaría presente desde etapas tempranas de la enfermedad.

La asociación entre la inflamación a nivel central y la neurodegeneración se ha descrito ampliamente en estudios previos. En 1988, McGeer y colaboradores describieron por primera vez la activación de la microglía junto a la muerte de las neuronas

dopaminérgicas en la SNpc de pacientes con EP (McGeer et al., 1988). Posteriormente, la presencia de neuroinflamación se ha demostrado repetidamente en modelos animales y en estudios postmortem de pacientes con EP (Su et al., 2008; Fuzzati et al., 2019; Tansey et al., 2020), así como también se ha visualizado in vivo mediante estudios de neuroimagen con PET (Iannaccone et al., 2013; Terada et al., 2016).

Por el contrario, pocos estudios habían estudiado específicamente la relación entre la inflamación periférica y la neurodegeneración in vivo. El SPECT [¹²³I]FP-CIT supone una excelente oportunidad para cuantificar in vivo la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. En un estudio previo, los autores encontraron una correlación negativa entre la RNL y los niveles de DAT en el estriado en una cohorte de 388 pacientes con EP en estadios tempranos sin tratamiento farmacológico (Sanjari et al., 2018). Concretamente, la correlación fue encontrada entre la RNL y el putamen contralateral, así como en el caudado y putamen ipsilaterales, respecto al hemisferio más afecto a nivel motor. Estas correlaciones solo resultaron significativas en el subgrupo de pacientes con fenotipo tremórico, y no en el resto de los fenotipos motores.

Por tanto, en esta tesis doctoral se propuso reevaluar la relación entre la RNL y los niveles de DAT en el estriado en dos grandes cohortes de pacientes con EP, así como también estudiar por primera vez el papel diferencial de los linfocitos y los neutrófilos en esta relación.

Este estudio reveló que la inflamación periférica medida por la RNL estaba asociada con la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, y que esta asociación estaba impulsada principalmente por los linfocitos. Este hallazgo fue consistente con el conocimiento previo sobre el papel de los linfocitos en la EP. Tal como se ha descrito en los apartados anteriores, no solo una disminución del recuento absoluto de linfocitos ha sido frecuentemente descrita en la literatura, sino que también la creciente evidencia apoya una participación crucial de las subpoblaciones de linfocitos T en la EP (Tansey et al., 2022). En conjunto, se postula que un desequilibrio en las subpoblaciones de linfocitos T podría conllevar a una supresión defectuosa de la respuesta proinflamatoria que resultaría en la pérdida de las neuronas dopaminérgicas vulnerables (Kustrimovic et al., 2018; Fuzzati-Armentero et al., 2019; Contaldi et al., 2022). Curiosamente, a favor de esta hipótesis, un estudio ha expuesto recientemente que un menor recuento de

linfocitos se asocia con un mayor riesgo de padecer EP, sugiriendo una relación causal (Jensen et al., 2021). En este sentido, los datos de la cohorte de replicación de PPMI, que incluye pacientes con EP en estadios tempranos, también mostraron que un recuento menor de linfocitos se asociaba con menores niveles de DAT en el estriado, reforzando que este vínculo estaría presente desde etapas muy tempranas de la enfermedad. Con la finalidad de elucidar en más profundidad el posible papel causal de los linfocitos en la neurodegeneración, estudios dirigidos al estudio de las subpoblaciones linfocitarias, y/o en pacientes con EP en fase prodrómica podrían ser de gran valor en un futuro.

Por otro lado, en este estudio no se encontró una asociación sólida entre el recuento de neutrófilos y los niveles de DAT en el estriado. Aunque se observó una débil asociación negativa en la cohorte primaria, no se encontró asociación en la cohorte de replicación de PPMI. Si bien distintos estudios han observado un mayor recuento de neutrófilos en los pacientes con EP en comparación a CS, pocos estudios han abordado específicamente su papel en la etiopatogenia de la EP (Hirsch et al., 2021). Cabe señalar que las principales diferencias entre ambas cohortes fueron que los pacientes de la cohorte de replicación de PPMI se encontraban en etapas tempranas de la enfermedad y sin tratamiento dopaminérgico, por lo que se podrían plantear dos hipótesis. Dado que los neutrófilos tienen receptores de dopamina (Sarkar et al., 2010), el tratamiento dopaminérgico en los pacientes de la cohorte del HUVR podría haber modulado la función de los neutrófilos e influido en los resultados. Por otro lado, se podría sugerir que las alteraciones observadas en los neutrófilos podrían no estar relacionadas de forma primaria con la neurodegeneración, sino que los neutrófilos podrían desempeñar un papel secundario y contribuir a la inflamación crónica. Estudios longitudinales y específicos sean probablemente necesarios para evaluar el papel de los neutrófilos en la EP.

Finalmente, se evaluaron las posibles asociaciones entre la respuesta inflamatoria periférica y los niveles de DAT en el estriado con las características clínicas motoras y cognitivas de los pacientes con EP.

La severidad motora medida por la escala HY (en ambas cohortes) y por la escala MDS-UPDRS-III (solo en la cohorte de replicación de PPMI) estaba negativamente

correlacionada con niveles más bajos de DAT en el estriado, en línea con otros estudios previamente publicados (Terashi et al., 2021; Furukawa et al., 2022). Particularmente en este estudio se observó que la asociación más alta se encontraba con el putamen posterior. Estos resultados eran esperables dado que los síntomas motores de la EP son consecuencia del déficit de dopamina dentro de los ganglios basales y en concreto el putamen posterior es la región del estriado con conexiones funcionales con el campo ocular frontal, el área motora suplementaria y el giro precentral (DeLong et al., 2007; Tziortzi et al., 2011). Cabe recordar también la asociación encontrada entre una mayor RNL y la severidad motora según la escala MDS-UPDRS-III. Todo ello en conjunto sugiere una interesante relación entre la inflamación periférica (mayor RNL), la neurodegeneración dopaminérgica (niveles más bajos de DAT en el estriado), y una mayor severidad motora, que estaría presente incluso en etapas tempranas de la enfermedad de EP.

Por el contrario, no se encontró asociación entre el deterioro cognitivo según la escala MOCA y la depleción dopaminérgica en el estriado y sus subregiones. Esta ausencia de correlación no fue sorprendente, ya que el MOCA es una prueba de cribaje del estado cognitivo que evalúa de forma global muchos dominios corticales y que no son dependientes del cuerpo estriado. Además, otras regiones cerebrales y neurotransmisores son bien conocidos por estar involucrados en el deterioro cognitivo en la EP (Obeso et al, 2017), pero estos no han sido evaluados en el estudio actual.

Una limitación de este estudio fue que la cuantificación de la reducción específica de la unión de los DAT en subregiones pequeñas y espacialmente detalladas del estriado por SPECT [¹²³I]FP-CIT pudiera beneficiarse de la corrección parcial del volumen de la señal utilizando la información anatómica de la RM estructural de alta resolución (Trnka et al., 2020), pero estos datos no estaban disponibles para esta cohorte retrospectiva. A pesar de estas limitaciones, una fortaleza de este estudio fue la replicación de los hallazgos principales en una cohorte independiente de pacientes con EP en una etapa temprana de la enfermedad.

7.5. Papel de la respuesta inmune inflamatoria periférica en la fisiopatología de la EP.

En esta tesis doctoral se ha demostrado que los pacientes con EP muestran una mayor RNL en sangre periférica en comparación con los CS, reflejando la presencia de una mayor inflamación periférica, y apoya la utilidad de la RNL como biomarcador no-invasivo de inflamación sistémica en la EP. Asimismo, los pacientes con EP muestran un menor recuento de linfocitos en sangre periférica, en línea con la literatura que postula que podría ser debido a una desregulación de sus subpoblaciones a favor de una respuesta proinflamatoria y una pérdida de la función protectora. Además, los pacientes con EP muestran una tendencia a un mayor recuento de neutrófilos, los cuales están implicados en la inflamación crónica, si bien futuros estudios son necesarios para clarificar si estos tienen un rol primario o secundario en la neurodegeneración.

La heterogeneidad clínica de la EP sugiere la implicación de distintos mecanismos fisiopatológicos subyacentes y por ello estudios en subgrupos específicos de pacientes podrían facilitar la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad. En esta tesis doctoral, se ha mostrado que esta mayor respuesta inmune inflamatoria periférica en la EP está presente independientemente de la edad, el sexo y la duración de la enfermedad. Por el contrario, una mayor inflamación periférica sí podría estar asociada con una mayor severidad de los síntomas motores de la enfermedad, si bien estos resultados fueron preliminares y pendientes de validación. Paralelamente, la identificación de genes altamente implicados en la etiología de la EP supone una excelente oportunidad para estudiar y entender los diversos mecanismos implicados en la fisiopatología de la EP y probablemente también su heterogeneidad clínica. En esta tesis doctoral, se ha descrito que la respuesta inmune periférica difiere según el genotipo de los pacientes. Los pacientes con EP esporádica muestran una mayor RNL y un menor recuento de linfocitos en sangre periférica, en comparación con CS, apoyando la presencia de una mayor inflamación periférica. Por el contrario, la respuesta periférica basada en la RNL, linfocitos y neutrófilos no fue diferente entre los pacientes con EP-*LRRK2* y CS, indicando que los mecanismos patogénicos en los pacientes con EP-*LRRK2* podrían ser diferentes a los que subyacen a la EP esporádica. Estos resultados apoyan la

necesidad de estratificar a los pacientes en estudios de investigación y podrían tener potenciales implicaciones en el desarrollo de futuras dianas terapéuticas.

Finalmente, en esta tesis doctoral se demostró que la mayor inflamación periférica presente en los pacientes con EP está asociada con la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc. Una mayor RNL y un menor recuento de linfocitos en sangre periférica están asociados con menores niveles de DAT en el estriado medidos por el SPECT [¹²³I]FP-CIT. Por el contrario, no se apoya un rol primario de los neutrófilos en la neurodegeneración en la EP. Además, esta tesis doctoral sugiere al SPECT [¹²³I]FP-CIT como biomarcador in vivo de utilidad para profundizar en el estudio entre la inflamación y la neurodegeneración.

Los estudios presentados en esta tesis doctoral presentaron limitaciones que deben tenerse en cuenta. En primer lugar, el diseño retrospectivo y transversal de estos estudios no pudo eludir que algunas covariables pudieran influir en los resultados. Por ello, se aplicaron análisis multivariantes y estratificados, así como criterios de exclusión rigurosos (con relación a factores relacionados con el sistema inmune) para evitar y minimizar factores de confusión en los resultados. En segundo lugar, la inclusión de marcadores inflamatorios adicionales como citoquinas y/o subpoblaciones linfocitarias hubiera sido de gran valor para caracterizar la respuesta inflamatoria sistémica en profundidad, y particularmente en subgrupos de pacientes según su genotipo. Desafortunadamente estos biomarcadores no estuvieron disponibles en estos estudios por su diseño retrospectivo, aunque plantean la realización de futuros estudios prospectivos. Pese a lo anterior, las fortalezas de los estudios realizados en esta tesis doctoral son su tamaño muestral y el subsecuente metaanálisis realizado, así como la validación de los resultados en dos cohortes independientes.

En conjunto, esta tesis doctoral demuestra la existencia y el papel de la inflamación crónica y la desregulación inmune en la patogenia de la EP. Esta respuesta inflamatoria periférica difiere según el genotipo y posiblemente también según las características clínicas de los pacientes. Además, demuestra que el incremento de la inflamación periférica está asociado con la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la

enfermedad. Esta tesis doctoral ofrece futuras líneas de investigación sobre los mecanismos subyacentes en la respuesta inmune inflamatoria periférica en la EP. Una mejor comprensión del papel de la respuesta inmune inflamatoria periférica en los complejos mecanismos fisiopatológicos de la EP podría tener potenciales implicaciones terapéuticas en el futuro.

8. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

1. Existe una mayor respuesta inmune inflamatoria periférica en la enfermedad de Parkinson en comparación con controles sanos.
2. Los pacientes con enfermedad de Parkinson muestran una disminución del recuento de linfocitos y un aumento del recuento de neutrófilos en sangre periférica, en comparación con controles sanos.
3. Los pacientes con enfermedad de Parkinson tienen una mayor ratio neutrófilo-linfocito en comparación con controles sanos, apoyando la presencia de una mayor inflamación periférica y la utilidad de la ratio neutrófilo-linfocito como biomarcador no-invasivo de la inflamación sistémica presente en la enfermedad de Parkinson.
4. La mayor inflamación periférica no estaría asociada con la duración de la enfermedad, pero una mayor ratio neutrófilo-linfocito sí podría estar asociada con una mayor severidad motora en la enfermedad de Parkinson.
5. La respuesta inmune periférica difiere en la enfermedad de Parkinson según las características genéticas de los pacientes.
6. Los pacientes con enfermedad de Parkinson esporádica, así como los pacientes con enfermedad de Parkinson con variantes patogénicas en el gen *GBA* muestran una mayor respuesta inmune inflamatoria periférica reflejada por una mayor ratio neutrófilo-linfocito, un menor recuento de linfocitos y un mayor recuento de neutrófilos, en comparación con controles sanos.
7. Por el contrario, los pacientes con enfermedad de Parkinson con variantes patogénicas en el gen *LRRK2* no presentan alteraciones en la respuesta inmune periférica estudiada en comparación con controles sanos, indicando que los mecanismos fisiopatológicos inflamatorios subyacentes podrían ser diferentes a la enfermedad de Parkinson esporádica.
8. El incremento de la inflamación periférica en la enfermedad de Parkinson está asociado con la degeneración de las neuronas dopaminérgicas.

CONCLUSIONS

1. Patients with Parkinson's disease have a higher peripheral inflammatory immune response compared to healthy controls.
2. Patients with Parkinson's disease have a lower lymphocyte count and a higher neutrophil count in peripheral blood compared to healthy controls.
3. Patients with Parkinson's disease have a higher neutrophil-to-lymphocyte ratio compared to healthy controls, supporting the presence of a higher peripheral inflammation, and demonstrating that the neutrophil-to-lymphocyte ratio is a useful non-invasive biomarker of systemic inflammation in Parkinson's disease.
4. The higher peripheral inflammatory immune response is not related to the disease duration; but a higher neutrophil-to-lymphocyte ratio could be associated with a worse motor severity in Parkinson's disease.
5. The peripheral immune response differs between patients according to the genetic background.
6. Patients with sporadic Parkinson's disease and *GBA*-associated Parkinson's disease show a higher peripheral inflammatory immune response reflected by a higher neutrophil-to-lymphocyte ratio, a lower lymphocyte count and a higher neutrophil count, compared to healthy controls.
7. In contrast, patients with *LRRK2*-associated Parkinson's disease do not show an impairment in the peripheral immune response compared to healthy controls, indicating that the underlying inflammatory pathophysiological mechanisms may be different from those in sporadic Parkinson's disease.
8. The higher peripheral inflammation in Parkinson's disease is associated with dopaminergic neurodegeneration.

9. BIBLIOGRAFÍA

Akil E, Bulut A, Kaplan İ, Özdemir HH, Arslan D, Aluçlu MU. The increase of carcinoembryonic antigen (CEA), high-sensitivity C-reactive protein, and neutrophil/lymphocyte ratio in Parkinson's disease. *Neurol Sci.* 2015; 36(3):423-8. doi: 10.1007/s10072-014-1976-1.

Al-Azzawi ZAM, Arfaie S, Gan-Or Z. GBA1 and The Immune System: A Potential Role in Parkinson's Disease? *J Parkinsons Dis.* 2022; 12(s1):S53-S64. doi: 10.3233/JPD-223423.

Alcalay RN, Levy OA, Waters CC, Fahn S, Ford B, Kuo SH, Mazzone P, Pauciulo MW, Nichols WC, Gan-Or Z, Rouleau GA, Chung WK, Wolf P, Oliva P, Keutzer J, Marder K, Zhang X. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain.* 2015; 138(9):2648-58. doi: 10.1093/brain/awv179.

Álvarez-Luquín DD, Arce-Sillas A, Leyva-Hernández J, Sevilla-Reyes E, Boll MC, Montes-Moratilla E, et al. Regulatory impairment in untreated Parkinson's disease is not restricted to Tregs: other regulatory populations are also involved. *J Neuroinflammation.* 2019; 16(1):212. doi: 10.1186/s12974-019-1606-1.

Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, et al. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol.* 1997 Jan; 12(1):25-31. PMID: 9046040.

Arotcarena ML, Teil M, Dehay B. Autophagy in Synucleinopathy: The Overwhelmed and Defective Machinery. *Cells.* 2019; 8(6):565. doi: 10.3390/cells8060565.

Arotcarena ML, Dovero S, Prigent A, Bourdenx M, Camus S, Porras G, et al. Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates. *Brain.* 2020;143(5):1462-1475. doi: 10.1093/brain/awaa096.

Ataç Uçar C, Gökçe Çokal B, Ünal Artık HA, İnan LE, Yoldaş TK. Comparison of neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) in Parkinson's disease subtypes. *Neurol Sci.* 2017; 38(2):287-293. doi: 10.1007/s10072-016-2758-8.

Atashrazm F, Hammond D, Perera G, Dobson-Stone C, Mueller N, Pickford. et al. Reduced glucocerebrosidase activity in monocytes from patients with Parkinson's disease. *Scientific reports* 2018; 8(1):15446. doi:10.1038/s41598-018-33921-x

Baird JK, Bourdette D, Meshul CK, Quinn JF. The key role of T cells in Parkinson's disease pathogenesis and therapy. *Parkinsonism Relat Disord.* 2019; 60:25-31. doi: 10.1016/j.parkreldis.2018.10.029.

Bandres-Ciga S, Diez-Fairen M, Kim JJ, Singleton AB. Genetics of Parkinson's disease: An introspection of its journey towards precision medicine. *Neurobiol Dis.* 2020; 137:104782. doi: 10.1016/j.nbd.2020.104782.

Bandres-Ciga S, Saez-Atienzar S, Kim JJ, Makarious MB, Faghri F, Diez-Fairen M, et al. Large-scale pathway specific polygenic risk and transcriptomic community network analysis identifies novel functional pathways in Parkinson disease. *Acta Neuropathol.* 2020;140(3):341-358. doi: 10.1007/s00401-020-02181-3.

Bartels AL, Willemsen AT, Doorduyn J, de Vries EF, Dierckx RA, Leenders KL. [11C]-PK11195 PET: quantification of neuroinflammation and a monitor of anti-inflammatory treatment in Parkinson's disease? *Parkinsonism Relat Disord.* 2010; 16(1):57-9. doi: 10.1016/j.parkreldis.2009.05.005.

Berg D, Postuma RB, Adler CH, Bloem BR, Chan P, Dubois B, et al. MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2015; 30(12):1600-11. doi: 10.1002/mds.26431. PMID: 26474317.

Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology* 2001; 69:89-95.

Blauwendraat C, Nalls MA, Singleton AB. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2020; 19(2):170-178. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30287-X.

Bloem BR, Okun MS, Klein C. Parkinson's disease. *Lancet.* 2021; 397(10291):2284-2303. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00218-X.

Bongioanni P, Castagna M, Maltinti S, Boccardi B, Dadone F. T-lymphocyte tumor necrosis factor-alpha receptor binding in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 1997; 149(1):41-5. doi: 10.1016/s0022-510x(97)05382-3.

Boyko AA, Troyanova NI, Kovalenko EI, Sapozhnikov AM. Similarity and Differences in Inflammation-Related Characteristics of the Peripheral Immune System of Patients with Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(12):2633. doi: 10.3390/ijms18122633.

Braak, Heiko et al. "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease." *Neurobiology of aging* 2003; 24(2):197-211. doi:10.1016/s0197-4580(02)00065-9

Brochard V, Combadière B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthet V, et al. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest.* 2009; 119(1):182-92. doi: 10.1172/JCI36470.

Brockmann K, Apel A, Schulte C, Schneiderhan-Marra N, Pont-Sunyer C, Vilas D, et al. Inflammatory profile in LRRK2-associated prodromal and clinical PD. *J Neuroinflammation.* 2016; 13(1):122. doi: 10.1186/s12974-016-0588-5.

Büyükkoyuncu-Pekel N, Yildiz D, Sigirli D, Yabaci A, Seferoglu M, Günes A. Parkinson's disease: is it actually an inflammatory disorder? *Turkish Journal of Geriatrics* 2018; 21(4):483–489.

Carlisle SM, Qin H, Hendrickson RC, Muwanguzi JE, Lefkowitz EJ, Kennedy RE, et al. Sex-based differences in the activation of peripheral blood monocytes in early Parkinson disease. *NPJ Parkinsons Dis.* 2021; 7(1):36. doi: 10.1038/s41531-021-00180-z.

Chahine LM, Qiang J, Ashbridge E, Minger J, Yearout D, Horn S, et al. Clinical and biochemical differences in patients having Parkinson disease with vs without GBA mutations. *JAMA Neurol.* 2013; 70(7):852-8. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.1274.

Chen Y, Qi B, Xu W, Ma B, Li L, Chen Q, et al. "Clinical correlation of peripheral CD4⁺-cell sub-sets, their imbalance and Parkinson's disease." *Molecular medicine reports* 2015; 12(4):6105-11. doi:10.3892/mmr.2015.4136

Chen Z, Chen S, Liu J. The role of T cells in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2018; 169:1-23. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.08.002.

Cohn L, Hawrylowicz C, Ray A. Biology of Lymphocytes. *Middleton's Allergy* 2014 (1): 203-214. ISBN 9780323085939. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08593-9.00013-9>.

Contaldi E, Magistrelli L, Comi C. T Lymphocytes in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2022; 12(s1):S65-S74. doi: 10.3233/JPD-223152.

Contaldi E, Magistrelli L, Cosentino M, Marino F, Comi C. Lymphocyte Count and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Are Associated with Mild Cognitive Impairment in Parkinson's Disease: A Single-Center Longitudinal Study. *J Clin Med.* 2022; 11(19):5543. doi: 10.3390/jcm11195543.

Cook DA, Kannarkat GT, Cintron AF, Butkovich LM, Fraser KB, Chang J, et al. LRRK2 levels in immune cells are increased in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis.* 2017; 3:11. doi: 10.1038/s41531-017-0010-8.

Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct.* 2012; 646354. doi: 10.1155/2012/646354.

Cullinane PW, de Pablo Fernandez E, König A, Outeiro TF, Jaunmuktane Z, Warner TT. Type 2 Diabetes and Parkinson's Disease: A Focused Review of Current Concepts. *Mov Disord.* 2023; 38(2):162-177. doi: 10.1002/mds.29298.

DeLong MR, Wichmann T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 2007; 64:20-24

Deyell JS, Sriparna M, Ying M, Mao X. The Interplay between α -Synuclein and Microglia in α -Synucleinopathies. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(3):2477. doi: 10.3390/ijms24032477.

Dijkstra AA, Voorn P, Berendse HW, Groenewegen HJ; Netherlands Brain Bank; Rozemuller AJ, et al. Stage-dependent nigral neuronal loss in incidental Lewy body and Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2014; 29(10):1244-51. doi: 10.1002/mds.25952.

Dong X, Nao J, Shi J, Zheng D. Predictive Value of Routine Peripheral Blood Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2019; 11:332. doi: 10.3389/fnagi.2019.00332

Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, Bloem BR. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *J Parkinsons Dis.* 2018; 8(s1):S3-S8. doi: 10.3233/JPD-181474

Fiszer U, Mix E, Fredrikson S, Kostulas V, Link H. Parkinson's disease and immunological abnormalities: increase of HLA-DR expression on monocytes in cerebrospinal fluid and of CD45RO+ T cells in peripheral blood. *Acta Neurol Scand.* 1994; 90(3):160-6. doi: 10.1111/j.1600-0404.1994.tb02699.x.

Furukawa K, Shima A, Kambe D, Nishida A, Wada I, Sakamaki H, et al. Motor Progression and Nigrostriatal Neurodegeneration in Parkinson Disease. *Ann Neurol.* 2022; 92(1):110-121. doi: 10.1002/ana.26373.

Fuzzati-Armentero MT, Cerri S, Blandini F. Peripheral-Central Neuroimmune Crosstalk in Parkinson's Disease: What Do Patients and Animal Models Tell Us? *Front Neurol.* 2019; 10:232. doi: 10.3389/fneur.2019.00232.

García-Gómez FJ, García-Solís D, Luis-Simón FJ, Marín-Oyaga VA, Carrillo F, Mir P, et al. Elaboración de una plantilla de SPM para la normalización de imágenes de SPECT con 123I-loflupano [Elaboration of the SPM template for the standardization of SPECT images with 123I-loflupane]. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol.* 2013; 32(6):350-6. doi: 10.1016/j.remnm.2013.02.009.

Gardai SJ, Mao W, Schüle B, Babcock M, Schoebel S, Lorenzana C, et al. Elevated alpha-synuclein impairs innate immune cell function and provides a potential peripheral biomarker for Parkinson's disease. *PLoS One.* 2013; 8(8):e71634. doi: 10.1371/journal.pone.0071634.

GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019; 18(5):459-480. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30499-X.

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

Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, et al. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2006; 21(2):404-12. doi: 10.1016/j.nbd.2005.08.002.

Goldman SM. Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014;54:141-64. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011613-135937.

Granek Z, Barczuk J, Siwecka N, Rozpędek-Kamińska W, Kucharska E, Majsterek I. GBA1 Gene Mutations in α -Synucleinopathies-Molecular Mechanisms Underlying

Pathology and Their Clinical Significance. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):2044. doi: 10.3390/ijms24032044.

Grozdanov V, Bliederaeuser C, Ruf WP, Roth V, Fundel-Clemens K, Zondler L, Brenner D, Martin-Villalba A, Hengerer B, Kassubek J, Ludolph AC, Weishaupt JH, Danzer KM. Inflammatory dysregulation of blood monocytes in Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol.* 2014; 128(5):651-63. doi: 10.1007/s00401-014-1345-4.

Harms AS, Cao S, Rowse AL, Thome AD, Li X, Mangieri LR, et al. MHCII is required for α -synuclein-induced activation of microglia, CD4 T cell proliferation, and dopaminergic neurodegeneration. *J Neurosci.* 2013; 33(23):9592-600. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5610-12.2013.

Harms AS, Thome AD, Yan Z, Schonhoff AM, Williams GP, Li X, et al. Peripheral monocyte entry is required for alpha-Synuclein induced inflammation and Neurodegeneration in a model of Parkinson disease. *Exp Neurol.* 2018; 300:179-187. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.11.010.

Heinzel S, Berg D, Gasser T, Chen H, Yao C, Postuma RB; MDS Task Force on the Definition of Parkinson's Disease. Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2019; 34(10):1464-1470. doi: 10.1002/mds.27802.

Henry AG, Aghamohammadzadeh S, Samaroo H, Chen Y, Mou K, Needle E, et al. Pathogenic LRRK2 mutations, through increased kinase activity, produce enlarged lysosomes with reduced degradative capacity and increase ATP13A2 expression. *Hum Mol Genet.* 2015; 24(21):6013-28. doi: 10.1093/hmg/ddv314.

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

Houser MC, Tansey MG. The gut-brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson's disease pathogenesis? *NPJ Parkinsons Dis.* 2017; 3:3. doi: 10.1038/s41531-016-0002-0.

Iannaccone S, Cerami C, Alessio M, Garibotto V, Panzacchi A, Olivieri S, et al. In vivo microglia activation in very early dementia with Lewy bodies, comparison with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord* 2013; 19: 47–52. doi: 10.1016/j.parkreldis.2012.07.002.

Ibáñez P, Lesage S, Janin S, Lohmann E, Durif F, Destée A, et al. Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms. *Arch Neurol.* 2009; 66(1):102-8. doi: 10.1001/archneurol.2008.555.

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.

Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003; 53(3):S26-36.doi: 10.1002/ana.10483. PMID: 12666096.

Jensen MP, Jacobs BM, Dobson R, Bandres-Ciga S, Blauwendraat C, Schrag A, et al. Lower Lymphocyte Count is Associated With Increased Risk of Parkinson's Disease. *Ann Neurol.* 2021; 89(4):803-812. doi: 10.1002/ana.26034.

Jesús S, Huertas I, Bernal-Bernal I, Bonilla-Toribio M, Cáceres-Redondo MT, Vargas-González L, et al. GBA Variants Influence Motor and Non-Motor Features of Parkinson's Disease. *PLoS One.* 2016; 11(12):e0167749. doi: 10.1371/journal.pone.0167749.

Jia F, Fellner A, Kumar KR. Monogenic Parkinson's Disease: Genotype, Phenotype, Pathophysiology, and Genetic Testing. *Genes (Basel).* 2022; 13(3):471. doi: 10.3390/genes13030471.

Jiang S, Gao H, Luo Q, Wang P, Yang X. The correlation of lymphocyte subsets, natural killer cell, and Parkinson's disease: a meta-analysis. *Neurological sciences: official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 2017; 38(8):1373-1380. doi:10.1007/s10072-017-2988-4

Jiang S, Wang Y, Gao H, Luo Q, Wang D, Li Y, et al. Cell Ratio Differences in Peripheral Blood between Early- and Late-Onset Parkinson's Disease: A Case-Control Study. *Biomed Res Int.* 2019; 2072635. doi: 10.1155/2019/2072635.

Jin H, Gu HY, Mao CJ, Chen J, Liu CF. Association of inflammatory factors and aging in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2020; 736:135259. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135259.

Kannarkat GT, Cook DA, Lee JK, Chang J, Chung J, Sandy E, et al. Common Genetic Variant Association with Altered HLA Expression, Synergy with Pyrethroid Exposure, and Risk for Parkinson's Disease: An Observational and Case-Control Study. *NPJ Parkinsons Dis.* 2015;1:15002. doi: 10.1038/npjparkd.2015.2.

Karpenko MN, Vasilishina AA, Gromova EA, Muruzheva ZM, Bernadotte A. Interleukin-1 β interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-6, interleukin-10, and tumor necrosis factor- α levels in CSF and serum in relation to the clinical diversity of Parkinson's disease. *Cell Immunol.* 2018; 327:77–82.

Kaur K, Gill JS, Bansal PK, Deshmukh R. Neuroinflammation - A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2017; 381:308–14. doi: 10.1016/j.jns.2017.08.3251

Kim R, Kim HJ, Kim A, Jang M, Kim A, Kim Y, et al. Peripheral blood inflammatory markers in early Parkinson's disease. *J Clin Neurosci.* 2018; 58:30–3. doi: 10.1016/j.jocn.2018.10.079

Kline EM, Houser MC, Herrick MK, Seibler P, Klein C, West A, Tansey MG. Genetic and Environmental Factors in Parkinson's Disease Converge on Immune Function and Inflammation. *Mov Disord.* 2021; 36(1):25-36. doi: 10.1002/mds.28411.

Klucken J, Poehler AM, Ebrahimi-Fakhari D, Schneider J, Nuber S, Rockenstein E, et al. Alpha-synuclein aggregation involves a bafilomycin A 1-sensitive autophagy pathway. *Autophagy.* 2012; 8(5):754-66. doi: 10.4161/auto.19371.

Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(3):159-75. doi: 10.1038/nri3399.

Kouli A, Camacho M, Allinson K, Williams-Gray CH. Neuroinflammation and protein pathology in Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol Commun.* 2020; 8(1):211. doi: 10.1186/s40478-020-01083-5.

Kozina E, Sadasivan S, Jiao Y, Dou Y, Ma Z, Tan H, et al. Mutant LRRK2 mediates peripheral and central immune responses leading to neurodegeneration in vivo. *Brain.* 2018; 141(6):1753-1769. doi: 10.1093/brain/awy077.

Kustrimovic N, Comi C, Magistrelli L, Rasini E, Legnaro M, Bombelli R, et al. Parkinson's disease patients have a complex phenotypic and functional Th1 bias: cross-sectional studies of CD4+ Th1/Th2/T17 and Treg in drug-naïve and drug-treated patients. *J Neuroinflammation.* 2018; 15(1):205. doi: 10.1186/s12974-018-1248-8.

Labrador-Espinosa MA, Grothe MJ, Macías-García D, Jesús S, Adarmes-Gómez A, Muñoz-Delgado L, et al. Dyskinesia in Parkinson Disease Specifically Associates With Dopaminergic Depletion in Sensorimotor-Related Functional Subregions of the Striatum. *Clin Nucl Med.* 2021;46(6):e296-e306. doi: 10.1097/RLU.0000000000003609.

Lawton M, Baig F, Toulson G, Morovat A, Evetts SG, Ben-Shlomo Y, Hu MT. Blood biomarkers with Parkinson's disease clusters and prognosis: The oxford discovery cohort. *Mov Disord.* 2020; 35(2):279-287. doi: 10.1002/mds.27888.

Lecours C, Bordeleau M, Cantin L, Parent M, di Paolo T, Tremblay MÈ. Microglial implication in Parkinson's disease: Loss of beneficial physiological roles or gain of inflammatory functions? *Front Cell Neurosci.* 2018;12(8):1–8. doi: 10.3389/fncel.2018.00282

Lin N, Li J, Yao X, Zhang X, Liu G, Zhang Z, et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer liver metastasis: A meta-analysis of results from multivariate analysis. *Int J Surg.* 2022; 107:106959. doi: 10.1016/j.ijso.2022.106959.

Lindqvist D, Kaufman E, Brundin L, Hall S, Surova Y, Hansson O. Non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease - correlations with inflammatory cytokines in serum. *PLoS One.* 2012; 7(10):e47387. doi: 10.1371/journal.pone.0047387.

Lunghi G, Carsana EV, Loberto N, Cioccarelli L, Prioni S, Mauri L, et al. β -Glucocerebrosidase Deficiency Activates an Aberrant Lysosome-Plasma Membrane Axis

Responsible for the Onset of Neurodegeneration. *Cells* 2022; 11(15):2343. doi: 10.3390/cells11152343

Lynch-Day MA, Mao K, Wang K, Zhao M, Klionsky DJ. The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(4):a009357. doi: 10.1101/cshperspect.a009357.

Macías-García D, Periñán MT, Muñoz-Delgado L, Jesús S, Jimenez-Jaraba MV, Buiza-Rueda D, Bonilla-Toribio M, Adarmes-Gómez A, Carrillo F, Gómez-Garre P, Mir P. Increased Stroke Risk in Patients with Parkinson's Disease with LRRK2 Mutations. *Mov Disord*. 2022;37(1):225-227. doi: 10.1002/mds.28863.

Magnusen AF, Hatton SL, Rani R, Pandey MK. Genetic Defects and Pro-inflammatory Cytokines in Parkinson's Disease. *Front Neurol*. 2021; 12:636139. doi: 10.3389/fneur.2021.636139.

Mamais A, Kaganovich A, Harvey K. Convergence of signalling pathways in innate immune responses and genetic forms of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2022; 169:105721. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105721.

Mamula D, Khosousi S, He Y, Lazarevic V, Svenningsson P. Impaired migratory phenotype of CD4⁺ T cells in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis*. 2022; 8(1):171. doi: 10.1038/s41531-022-00438-0.

Martin-Ruiz C, Williams-Gray CH, Yarnall AJ, Boucher JJ, Lawson RA, Wijeyekoon RS, et al. Senescence and Inflammatory Markers for Predicting Clinical Progression in Parkinson's Disease: The ICICLE-PD Study. *J Parkinsons Dis*. 2020;10(1):193-206. doi: 10.3233/JPD-191724.

Martin L, Pan Y, Price AC, Sterling W, Copeland NG, Jenkins NA et al. Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 2006; 26(1):41-50. doi:10.1523/jneurosci.4308-05.2006

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(8):1285-91. doi: 10.1212/wnl.38.8.1285.

Miliukhina IV, Usenko TS, Senkevich KA, Nikolaev MA, Timofeeva AA, Agapova EA, et al. Plasma Cytokines Profile in Patients with Parkinson's Disease Associated with Mutations in GBA Gene. *Bull Exp Biol Med*. 2020; 168(4):423-426. doi: 10.1007/s10517-020-04723-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.

Nandhagopal R, Kuramoto L, Schulzer M, Mak E, Cragg J, Lee CS, et al. Longitudinal progression of sporadic Parkinson's disease: a multi-tracer positron emission tomography study. *Brain*. 2009; 132(11):2970-9. doi: 10.1093/brain/awp209.

Neudorfer, O., Giladi, N., Elstein, D., Abrahamov, A., Turezkite, T., Aghai, E., et al. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. 1996; 89:691–694. doi: 10.1093/qjmed/89.9.691

O'Hara DM, Pawar G, Kalia SK, Kalia LV. LRRK2 and α -Synuclein: Distinct or Synergistic Players in Parkinson's Disease? *Front Neurosci*. 2020; 14:577. doi: 10.3389/fnins.2020.00577.

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(9):1264–1310. doi: 10.1002/mds.27115.

Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2002 Spring;14(2):223-36. doi: 10.1176/jnp.14.2.223.

Parlar SC, Grenn FP, Kim JJ, Baluwendraat C, Gan-Or Z. Classification of GBA1 Variants in Parkinson's Disease: The GBA1-PD Browser. *Mov Disord*. 2023. doi: 10.1002/mds.29314.

Peralta Ramos JM, Iribarren P, Bousset L, Melki R, Baekelandt V, Van der Perren A. Peripheral Inflammation Regulates CNS Immune Surveillance Through the Recruitment of Inflammatory Monocytes Upon Systemic α -Synuclein Administration. *Front Immunol*. 2019; 10:80. doi: 10.3389/fimmu.2019.00080.

Petrone AB, Eisenman RD, Steele KN, Mosmiller LT, Urhie O, Zdilla MJ. Temporal dynamics of peripheral neutrophil and lymphocytes following acute ischemic stroke. *Neurol Sci*. 2019;40(9):1877–85.

Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, Schrag AE, Lang AE. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3:17013. doi: 10.1038/nrdp.2017.13.

Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276:2045–2047. doi: 10.1126/science.276.5321.2045

Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015; 30(12):1591-601. doi: 10.1002/mds.26424.

Pradas E, Martínez-Vicente M. The Consequences of GBA Deficiency in the Autophagy-Lysosome System in Parkinson's Disease Associated with GBA. *Cells* 2023; 12(1):191. doi:10.3390/cells12010191

Qin XY, Zhang SP, Cao C, Loh YP, Cheng Y. Aberrations in Peripheral Inflammatory Cytokine Levels in Parkinson Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 2016; 73(11):1316-1324. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.2742.

Qu Y, Li J, Qin Q, Wang D, Zhao J, An K, et al. A systematic review and meta-analysis of inflammatory biomarkers in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis.* 2023;9(1):18. doi: 10.1038/s41531-023-00449-5.

Rentzos M, Nikolaou C, Andreadou E, Paraskevas GP, Rombos A, Zoga M, et al. Circulating interleukin-10 and interleukin-12 in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 2009; 119(5):332-7. doi: 10.1111/j.1600-0404.2008.01103.x.

Russell CD, Parajuli A, Gale HJ, Bulteel NS, Schuetz P, Jager CPC De, et al. The utility of peripheral blood leucocyte ratios as biomarkers in infectious diseases: A systematic review and meta-analysis. *J Infect J.* 2019; 78:339–48.

Saeed U, Compagnone J, Aviv RI, Strafella AP, Black SE, Lang AE, Masellis M. Imaging biomarkers in Parkinson's disease and Parkinsonian syndromes: current and emerging concepts. *Transl Neurodegener.* 2017; 6:8. doi: 10.1186/s40035-017-0076-6.

Salman H, Bergman M, Djaldetti R, Bessler H, Djaldetti M. Decreased phagocytic function in patients with Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother.* 1999; 53(3):146-8. doi: 10.1016/S0753-3322(99)80080-8.

Sanjari MH, Ghazi Sherbaf F, Mojtahed Zadeh M, Ashraf-Ganjouei A, Aarabi MH. Association Between Peripheral Inflammation and DATSCAN Data of the Striatal Nuclei in Different Motor Subtypes of Parkinson Disease. *Front Neurol.* 2018; 9:234. doi: 10.3389/fneur.2018.00234.

Sarkar C, Basu B, Chakroborty D. The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain Behav Immun* 2010; 24(4): 525-528.

Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2009;41(12):1303-7. doi: 10.1038/ng.485.

Schapira, A H V. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell death and differentiation* 2007; 14(7):1261-6. doi:10.1038/sj.cdd.4402160

Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2009; 41(12):1308-12. doi: 10.1038/ng.487.

Sliter DA, Martinez J, Hao L, Chen X, Sun N, Fischer TD, et al. Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature.* 2018; 561(7722):258-262. doi: 10.1038/s41586-018-0448-9.

Soehnlein O, Steffens S, Hidalgo A, Weber C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2017; 17(4):248-261. doi: 10.1038/nri.2017.10.

Solmaz V, Pekdas E, Aksoy D, Çevik B, Gülsüm S, Benli I. Serum neutrophil-lymphocyte ratios, C-reactive protein and sedimentation levels in Parkinson's disease. *Cukurova Medical Journal* 2018; 43(2): 305-311. doi: 10.17826/cumj.341649

Stanca ID, Criciotoiu O, Neamtu SD, Vasile RC, Berceanu-Bora NM, Minca TN, Pirici I, Rosu GC, Bondari S. The Analysis of Blood Inflammation Markers as Prognostic Factors in Parkinson's Disease. *Healthcare (Basel)*. 2022; 10(12):2578. doi: 10.3390/healthcare10122578

Stefaniuk P, Szymczyk A, Podhorecka M. The neutrophil to lymphocyte and lymphocyte to monocyte ratios as new prognostic factors in hematological malignancies – a narrative review. *Cancer Manag Res*. 2020; 12:2961–77.

Su X, Maguire-zeiss KA, Giuliano R, Prifti L, Venkatesh K, Federoff HJ. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's Disease. *Neurobiol Aging*. 2008;29(11):1690–701.

Su X, Federoff HJ, Maguire-Zeiss KA. Mutant alpha-synuclein overexpression mediates early proinflammatory activity. *Neurotox Res*. 2009; 16(3):238-54. doi: 10.1007/s12640-009-9053-x.

Sulzer D, Alcalay RN, Garretti F, Cote L, Kanter E, Agin-Lieb J, et al. T cells from patients with Parkinson's disease recognize α -synuclein peptides. *Nature*. 2017; 546(7660):656-661. doi: 10.1038/nature22815.

Szwedo AA, Dalen I, Pedersen KF, Camacho M, Bäckström D, Forsgren L, et al. GBA and APOE Impact Cognitive Decline in Parkinson's Disease: A 10-Year Population-Based Study. *Mov Disord*. 2022; 37(5):1016-1027. doi: 10.1002/mds.28932.

Tansey MG, Romero-Ramos M. Immune system responses in Parkinson's disease: Early and dynamic. *Eur J Neurosci* 2019;49(3):364–383.doi:10.1111/ejn.14290

Tansey MG, Wallings RL, Houser MC, Herrick MK, Keating CE, Joers V. Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(11):657-673. doi: 10.1038/s41577-022-00684-6.

Terada T, Yokokura M, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Kono S, Konishi T et al. Extrastriatal spreading of microglial activation in Parkinson's disease: a positron emission tomography study. *Ann Nucl Med*. 2016; 30(8):579-87. doi: 10.1007/s12149-016-1099-2.

Terashi H, Taguchi T, Ueta Y, Mitoma H, Aizawa H. Relationship between ¹²³I-FP-CIT-SPECT and motor severity in drug-naive patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2021;426:117476. doi: 10.1016/j.jns.2021.117476.

Thaler A, Omer N, Giladi N, Gurevich T, Bar-Shira A, Gana-Weisz M, et al. Biochemical markers for severity and risk in GBA and LRRK2 Parkinson's disease. *J Neurol*. 2021; 268(4):1517-1525. doi: 10.1007/s00415-020-10325-4.

Thaler A, Omer N, Giladi N, Gurevich T, Bar-Shira A, Gana-Weisz M, et al. Mutations in GBA and LRRK2 Are Not Associated with Increased Inflammatory Markers. *J Parkinsons Dis*. 2021;11(3):1285-1296. doi: 10.3233/JPD-212624.

Tinaz S, Chow C, Kuo PH, Krupinski EA, Blumenfeld H, Louis ED, et al. Semiquantitative Analysis of Dopamine Transporter Scans in Patients With Parkinson Disease. *Clin Nucl Med*. 2018;43(1):e1-e7. doi: 10.1097/RLU.0000000000001885.

Tolosa E, Vila M, Klein C, Rascol O. LRRK2 in Parkinson disease: challenges of clinical trials. *Nat Rev Neurol*. 2020; 16:97-107 (2020).

Tolosa E, Garrido A, Scholz SW, Poewe W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2021; 20(5):385-397. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00030-2.

Tönges L, Buhmann C, Klebe S, Klucken J, Kwon EH, Müller T, et al. Blood-based biomarker in Parkinson's disease: potential for future applications in clinical research and practice. *J Neural Transm (Vienna)*. 2022;129(9):1201-1217. doi: 10.1007/s00702-022-02498-1.

Trnka J, Dusek P, Samal M, Kupka K, Sonka K, Ruzicka E. MRI-guided voxel-based automatic semi-quantification of dopamine transporter imaging. *Phys Med*. 2020; 75:1-10. doi: 10.1016/j.ejmp.2020.05.010.

Tsika E, Nguyen AP, Dusonchet J, Colin P, Schneider BL, Moore DJ. Adenoviral-mediated expression of G2019S LRRK2 induces striatal pathology in a kinase-dependent manner in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2015; 77:49-61. doi: 10.1016/j.nbd.2015.02.019

Tsukita K, Sakamaki-Tsukita H, Takahashi R. Lower Circulating Lymphocyte Count Predicts ApoE ϵ 4-Related Cognitive Decline in Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 2021;36(12):2969-2971.

Tziortzi AC, Searle GE, Tzimopoulou S, Salinas C, Beaver JD, Jenkinson M, et al. Imaging dopamine receptors in humans with [11C]-(+)-PHNO: dissection of D3 signal and anatomy. *Neuroimage*. 2011; 54(1):264-77. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.06.044.

Umehara T, Oka H, Nakahara A, Matsuno H, Murakami H. Differential leukocyte count is associated with clinical phenotype in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2020 Feb 15;409:116638. doi: 10.1016/j.jns.2019.116638. Epub 2019 Dec 16. PMID: 31865186.

Urrútia G, Bonfill X. Declaración PRISMA: una propuesta para mejorar la publicación de revisiones sistemáticas y metaanálisis" [PRISMA declaration: a proposal to improve the publication of systematic reviews and meta-analyses]. *Medicina clinica* 2010; 135(11):507-11. doi:10.1016/j.medcli.2010.01.015

Vitte J, Michel BF, Bongrand P, Gastaut JL. Oxidative stress level in circulating neutrophils is linked to neurodegenerative diseases. *J Clin Immunol*. 2004;24(6):683-92. doi: 10.1007/s10875-004-6243-4.

Wang J, Nan Y, Liu M, Hu K. The Role of CD4⁺ T Cells in the Immunotherapy of Brain Disease by Secreting Different Cytokines. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2022;17(3-4):409-422. doi: 10.1007/s11481-022-10056-5.

Williams-Gray CH, Wijeyekoon R, Yarnall AJ, Lawson RA, Breen DP, et al. Serum immune markers and disease progression in an incident Parkinson's disease cohort (ICICLE-PD). *Mov Disord*. 2016;31(7):995-1003. doi: 10.1002/mds.26563.

Witoelar A, Jansen IE, Wang Y, Desikan RS, Gibbs JR, Blauwendraat C, et al. Genome-wide Pleiotropy Between Parkinson Disease and Autoimmune Diseases. *JAMA Neurol*. 2017;74(7):780-792. doi: 10.1001/jamaneurol.2017.0469.

Yan Z, Yang W, Wei H, Dean M, Standaert D, Cutter G et al. Dysregulation of the Adaptive Immune System in Patients With Early-Stage Parkinson Disease. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021;8(5):e1036.

Yi S, Wang L, Wang H, Ho MS, Zhang S. Pathogenesis of α -Synuclein in Parkinson's Disease: From a Neuron-Glia Crosstalk Perspective. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23):14753. doi: 10.3390/ijms232314753.

Yilmaz R, Strafella AP, Bernard A, Schulte C, van den Heuvel L, Schneiderhan-Marra N, et al. Serum Inflammatory Profile for the Discrimination of Clinical Subtypes in Parkinson's Disease. *Front Neurol*. 2018; 9:1123. doi: 10.3389/fneur.2018.01123.

Zaman V, Shields DC, Shams R, Drasites KP, Matzelle D, Haque A, Banik NL. Cellular and molecular pathophysiology in the progression of Parkinson's disease. *Metab Brain Dis*. 2021;36(5):815-827. doi: 10.1007/s11011-021-00689-5.

Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, et al. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J*. 2005;19(6):533-42. doi: 10.1096/fj.04-2751com.

