

Universidad del País Vasco



Departamento de Neurociencias

# **Biomarcadores diagnósticos y de deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson**

TESIS DOCTORAL

Autor: **Manuel Delgado Alvarado**

Directora: **Dra. M<sup>a</sup> Cruz Rodríguez Oroz**

Memoria presentada para optar al título de Doctor en Neurociencias por la  
Universidad del País Vasco

San Sebastián, 2017

(c)2017 MANUEL DELGADO ALVARADO

Este trabajo se ha realizado en el Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia y el Hospital Universitario Donostia, bajo la dirección de la Dra. María Cruz Rodríguez Oroz y gracias a la ayuda del Programa Predoctoral de Formación de Personal Investigador No Doctor del Departamento de Educación, Política Lingüística y Cultura del Gobierno Vasco (PRE\_2014\_1\_358), de la Fundación Jesús de Gangoiti Barrera, del Centro de Investigación en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) y del Departamento de Salud del Gobierno Vasco (2011111074 y SAIOTEK 2012 S- PE12BN012).

*Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,  
y pensar lo que nadie más ha pensado*

*Albert Szent-Györgyi*

*A Leyre*

*A mi hermano*

*A mis padres*

# Agradecimientos

*Gracias a los pacientes. Su gran generosidad, e inmejorable predisposición, han hecho posible este trabajo de tesis. Ellos son el verdadero motor del avance en el conocimiento biomédico. Los momentos que he compartido con los pacientes y sus familias han sido tan enriquecedores, que me llevo una experiencia personal inolvidable.*

*A Mari Cruz, por darme la oportunidad de hacer esta tesis. Gracias por su dedicación y por acercarme un poco más a la comprensión de los trastornos del movimiento.*

*A Adolfo por su apoyo y consejos durante estos años.*

*Al Servicio de Neurología del Hospital Universitario Donostia y, en especial, al grupo de Trastornos del Movimiento. A José Félix, Alberto, Eli, Bixen, Patxi y, especialmente, a Javi Ruiz, por su ayuda constante. A las enfermeras de consulta por su ayuda. A Josefina, la secretaria que siempre encontraba solución a cualquier problema. Al personal del Hospital de Día Médico por su buena disposición, y en especial, a Begoña.*

*A la Fundación CITA Alzheimer, a Pablo Martínez Lage y a Andrea Izagirre por su colaboración y cesión de muestras.*

*A toda la gente del Instituto Biodonostia, porque ha sido un ambiente de trabajo y compañerismo inolvidable. A todos los “prins” permanentes y transitorios, por los innumerables buenos momentos compartidos, a Iván, Maitane, Leire (la navarrica), Neia, Alba Mateos, Paula, Estefanía, Erika, Alba Fernandez, Ane, Haizea, Idoia, y Oihane. A Ander y Garazi, por esos ratos por Trintxerpe.*

*Al “grupo de múltiple” (en la otra “pecera”), por esos “brain storming” que emanaban ciencia. A Haritz Irizar, gurú en materia de series. A Iñaki y a Matías, porque su buen humor era contagioso. A Maider, por resolver mis constantes dudas. Y a David, el jefe.*

*Y como no, gracias a mis compañeros del “grupo de Parkinson”. A Haritz Jiménez, ese bioquímico friki que resultaría ser un gran amigo, por esas charlas científico-filosóficas de las seis de la tarde. A Belén, que me enseñó a dar mis primeros pasos por el laboratorio, siempre dispuesta a ayudar. A Irene, compañera de trabajo inmejorable, por compartir los buenos y malos momentos. A Rosalía, por su ayuda con las evaluaciones neuropsicológicas. A Goros, por enseñarme los secretos de las ELISAs. A Lucía y Amaia, por su gran ayuda en el*

*laboratorio y los buenos momentos. A Tati, Leyre y Ana Quiroga, los últimos fichajes, no por ello menos importantes.*

*A Pili, Ana Aiastui y a Miren por sus consejos y todos los inolvidables ratos.*

*A las secres, Karmele, Irene y Leyre, por su ayuda logística y los momentos compartidos. A la “gente de abajo”, Puy, Maisabel, Amaia Pedruzo y Andrea por su apoyo con los temas administrativos. Y a José, siempre dispuesto a ayudar y a una buena charla.*

*A mis amigos de toda la vida, Andrés, Miguel, Maria, Jorge y Juan, por estar siempre ahí, por los buenos momentos.*

*A Alex, por ayudarme a recuperar el disco duro cuando lo formateé por accidente la semana antes de depositar la tesis.*

*A José Antonio y a Maite, por estar siempre dispuestos a ayudar. A Javi, por su apoyo constante y esas partidas que habrá que retomar.*

*A mis abuelos, por la ilusión que tienen por todo lo que hago.*

*A, Manolo, Ana, Manu y madrina, por sus buenos consejos y su apoyo.*

*A mi hermano y a Arantxa, con quienes compartí hogar durante el inicio de mi etapa en San Sebastián, por la ayuda y el apoyo que me dan. A Manex y a Telmo, por la alegría que me transmiten y las risas que me arrancan.*

*A mis padres, que me inculcaron siempre el interés y la curiosidad por las cosas que me rodean. Por su apoyo para que todos los proyectos en los que me embarco lleguen a buen puerto.*

*A Leyre, porque su apoyo, su paciencia y su amor han sido inmensurables y lo son todos los días de mi vida.*

## ABREVIATURAS

ABC	área bajo la curva
AMS	atrofia multisistema
BDNF	factor neurotrófico derivado de cerebro ( <i>brain derived neurotrophic factor</i> )
CL	cuerpos de Lewy
DCL-EP	deterioro cognitivo leve asociado a la EP
DCLw	demencia con cuerpos de Lewy
DEP	demencia asociada a la EP
EA	enfermedad de Alzheimer
EP	enfermedad de Parkinson
EPCN	EP cognitivamente normal
EPND	EP sin demencia
GWAS	estudio de asociación de genoma completo ( <i>genome-wide association study</i> )
H&Y	Escala de Hoehn y Yahr
HADS	Escala Hospitalaria de Ansiedad y Depresión
HVLT	<i>Hopkins Verbal Learning Test</i>
IDDD	<i>Interview for Deterioration of Daily Activities in Dementia</i>
IFN- $\gamma$	interferon ganma



IL	interleuquina
LCR	líquido cefalorraquídeo
MDS	<i>Movement Disorders Society</i>
MMSE	<i>Mini Mental State Examination</i>
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NL	neuritas de Lewy
NPS	<i>Neuropsychiatric Inventory</i>
PDQ-39	<i>Parkinson's disease Questionnaire</i>
PET	<i>positron emission tomography</i>
PSP	parálisis supranuclear progresiva
P-Tau	Tau fosforilada
RM	resonancia magnética
SN	sustancia negra
SNC	sistema nervioso central
SNP	polimorfismos de un sólo nucleótido ( <i>single nucleotide polymorphisms</i> )
SNpc	pars compacta de la SN
SPECT	<i>single photon emission computed tomography</i>
TCI	trastorno del control de impulsos
TCREM	trastorno de conducta de sueño REM

TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
T-Tau	Tau total
UPDRS	<i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale</i>

# Índice

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1. GENERALIDADES .....	3
2. EPIDEMIOLOGÍA .....	4
3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....	5
3.1. Manifestaciones motoras.....	5
3.2. Manifestaciones no motoras.....	6
4. ANATOMÍA PATOLÓGICA .....	8
5. ETIOLOGÍA.....	11
5.1. Factores ambientales.....	11
5.2. Factores de predisposición individual (no genéticos) .....	12
5.3. Factores de riesgo genético.....	12
5.3.1. <i>Formas autosómicas dominantes</i> .....	13
5.3.2. <i>Formas autosómicas recesivas</i> .....	14
5.3.3. <i>Variantes modificadoras del riesgo</i> .....	16
6. PATOGENIA .....	17
6.1. Estrés oxidativo.....	17
6.2. Disfunción mitocondrial.....	18
6.3. Degradación proteica.....	19
6.4. Inflamación .....	20
6.5. Hipótesis de la transmisión trans-sináptica de proteínas .....	21
7. DIAGNÓSTICO.....	24
8. TRATAMIENTO .....	25
9. DETERIORO COGNITIVO Y DEMENCIA EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	26
9.1. Demencia .....	27
9.1.1. <i>Epidemiología</i> .....	27
9.1.2. <i>Perfil neuropsicológico</i> .....	27
9.1.3. <i>Otras manifestaciones clínicas</i> .....	29
9.1.4. <i>Consecuencias</i> .....	31
9.2. Deterioro cognitivo leve en la enfermedad de Parkinson .....	32
9.2.1. <i>Definición y criterios diagnósticos</i> .....	32
9.2.2. <i>Epidemiología</i> .....	35

9.2.3. Subtipos de deterioro cognitivo leve.....	36
9.2.4. Evolución del deterioro cognitivo leve.....	37
9.3. Fisiopatología del deterioro cognitivo y la demencia .....	38
9.3.1. Déficit dopaminérgico .....	38
9.3.2. Déficit colinérgico .....	39
9.3.3. Déficit noradrenérgico.....	41
9.3.4. Déficit serotoninérgico.....	41
9.4. Anatomía patológica de la demencia y el deterioro cognitivo leve.....	42
10. BIOMARCADORES.....	44
10.1. Antecedentes y definición .....	44
10.2. Biomarcadores de enfermedad de Parkinson.....	45
10.2.1. Biomarcadores en líquido cefalorraquídeo .....	46
10.2.2. Biomarcadores en sangre.....	49
10.2.3. Neuroimagen.....	50
10.3. Biomarcadores de deterioro cognitivo leve y demencia.....	51
10.3.1. Biomarcadores en líquido cefalorraquídeo .....	52
10.3.2. Biomarcadores en sangre.....	54
10.3.3. Neuroimagen.....	55
<b>II. HIPÓTESIS.....</b>	<b>59</b>
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
<b>IV. MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
1. COHORTE I (HOSPITAL UNIVERSITARIO DONOSTIA).....	67
1.1. Pacientes .....	67
1.2. Controles .....	67
1.3. Evaluación clínica.....	68
1.4. Evaluación neuropsicológica.....	69
1.5. Extracción y procesamiento de plasma.....	70
1.6. Extracción y procesamiento de líquido cefalorraquídeo.....	71
1.7. Determinación de proteínas en líquido cefalorraquídeo .....	71
1.7.1. $\beta$ -amiloide.....	71
1.7.2. Tau total.....	72
1.7.3. Tau fosforilada .....	73

1.7.4. <i>α</i> -Sinucleína.....	73
1.7.5. Hemoglobina.....	74
1.8. Determinación de citoquinas en líquido cefalorraquídeo.....	74
1.9. Determinación de actividad de enzimas lisosomales en líquido cefalorraquídeo.....	75
1.10. Determinación de citoquinas en plasma.....	76
1.10.1. Interleuquina 6.....	76
1.10.2. Factor de necrosis tumoral $\alpha$ .....	77
2. COHORTE II (PARKINSON’S PROGRESSION MARKERS INITIATIVE).....	78
2.1. Pacientes.....	79
2.2. Controles.....	79
2.3. Evaluación clínica.....	79
2.4. Evaluación neuropsicológica.....	80
2.5. Obtención y manejo de los datos.....	80
2.5.1. Estudio de biomarcadores diagnósticos.....	80
2.5.2. Estudio de biomarcadores de deterioro cognitivo.....	81
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	82
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>87</b>
1. BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS DE ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	87
1.1. Cohorte I (Hospital Universitario Donostia).....	87
1.1.1. Líquido cefalorraquídeo.....	88
1.1.2. Plasma.....	93
1.2. Cohorte II (PPMI).....	95
2. BIOMARCADORES DE DETERIORO COGNITIVO Y DEMENCIA.....	96
2.1. Cohorte I (Hospital Universitario Donostia).....	96
2.1.1. Líquido cefalorraquídeo.....	98
2.1.2. Plasma.....	101
2.2. Cohorte II (PPMI).....	102
3. ENZIMAS LISOSOMALES.....	106
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>113</b>
BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	113
DETERIORO COGNITIVO LEVE Y DEMENCIA.....	119
ENZIMAS LISOSOMALES Y ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	125

CONSIDERACIONES FINALES .....	129
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	133
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	137
<b>ANEXO</b> .....	183
ARTÍCULO I .....	183
ARTÍCULO II .....	207
ARTÍCULO III .....	217
ARTÍCULO IV .....	245

# I. Introducción



## 1. Generalidades

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa cuyo sustrato patológico esencial, es la degeneración de neuronas dopaminérgicas de la pars compacta de la sustancia negra (SNpc). Consecuentemente se produce una pérdida de inervación dopaminérgica en el estriado que causa los signos cardinales de la enfermedad: temblor de reposo, rigidez y bradicinesia (Fahn *et al.*, 1971). El tratamiento con levodopa (Birkmayer and Hornykiewicz, 1961; Cotzias *et al.*, 1968; Hornykiewicz, 1974) o agonistas dopaminérgicos produce una mejoría de los signos motores clásicos, aunque su uso crónico se asocia con complicaciones como las discinesias, las fluctuaciones motoras y no motoras y el trastorno de control de impulsos (TCI). El avance de la enfermedad hace que los signos cardinales que, inicialmente suelen estar confinados a un hemicuerpo, se generalicen progresivamente y aparezcan los denominados signos axiales, como la inestabilidad postural o los bloqueos de la marcha.

Además de estas manifestaciones, la EP se caracteriza por otro grupo de signos y síntomas denominado “síntomas no motores”. Aunque pueden estar presentes desde el principio e incluso antes de que las manifestaciones motoras aparezcan, son más frecuentes en estadios tardíos (Rodríguez-Oroz *et al.*, 2009a). Entre ellos se incluyen, alteraciones del sistema nervioso autónomo (hipotensión ortostática, mal control de esfínteres, disfunción eréctil, alteraciones de la sudoración), alteraciones del sueño (insomnio, hipersomnias diurnas, trastorno de conducta del sueño REM [TCREM]), alteraciones psiquiátricas (ansiedad, depresión, apatía, alucinaciones, delirios), alteraciones del tracto gastrointestinal (disfagia, enlentecimiento del tránsito intestinal, estreñimiento) y deterioro cognitivo. Aunque inicialmente este grupo de manifestaciones estaba eclipsado, probablemente por la necesidad de la investigación médica de controlar las manifestaciones motoras de la enfermedad, en los últimos años han cobrado especial relevancia. Hoy en día está ampliamente aceptado que estas manifestaciones producen tanto o más deterioro en la calidad de vida que los aspectos motores (Simuni and Sethi, 2008) y, por tanto, la investigación en este campo ha sido sumamente prolífica en los últimos años. Especialmente relevante es el deterioro

cognitivo que, aunque inicialmente no suele interferir con la funcionalidad diaria, avanza a demencia en una proporción importante de pacientes.

## 2. Epidemiología

La incidencia de la EP varía según los diferentes estudios entre 1,5 y 22 casos por 100.000 habitantes y año (Wirdefeldt *et al.*, 2011). En una revisión sistemática que utilizó los datos de ocho estudios que cumplieron diversos criterios de calidad, se estimó una incidencia media en países desarrollados de 14 casos por 100.000 habitantes y año (Hirtz *et al.*, 2007). En estudios restringidos a poblaciones por encima de 55 o 65 años la incidencia varía entre 410 y 529 casos por 100.000 habitantes y año (Baldereschi *et al.*, 2000; Benito-Leon *et al.*, 2004; de Lau *et al.*, 2004). Cabe destacar que la incidencia es ligeramente superior en varones según se deriva de dos meta-análisis que arrojan una ratio varón:mujer de 1,49 y 1,46, respectivamente (Wooten *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2007).

La prevalencia de la EP también varía, dependiendo de la metodología utilizada, entre 31 y 5.703 casos/100.000 habitantes (Wirdefeldt *et al.*, 2011). En el artículo de revisión previamente mencionado se estimó una prevalencia por encima de los 65 años de 950 casos/100.000 habitantes utilizando los datos de 12 estudios de EEUU y Europa que cumplieron diversos criterios de calidad (Hirtz *et al.*, 2007). La prevalencia de la EP aumenta con la edad, que es el principal factor de riesgo para desarrollar la enfermedad, llegando a tener una prevalencia del 2,6 % en el subgrupo de 85-89 años (de Rijk *et al.*, 2000). El riesgo acumulado es de aproximadamente un 2 % a lo largo de la vida (Elbaz *et al.*, 2002). En el año 2007 se preveía un aumento al doble de su prevalencia en EEUU en los siguientes 25 años y de más del doble en países en vías de desarrollo de Asia y América del Sur (Dorsey *et al.*, 2007).

### 3. Manifestaciones clínicas

#### 3.1. Manifestaciones motoras

La *bradicinesia* es la manifestación más característica de la enfermedad. Bajo este término se suele englobar a la “acinesia”, la “bradicinesia” y la “hipocinesia”, que literalmente significan ausencia, lentitud y reducción de movimientos, respectivamente. Inicialmente se puede manifestar como una lentitud general en los movimientos o en las actividades diarias, reducción de los movimientos espontáneos, sobre todo los automáticos y tiempos de reacción largos (Jankovic *et al.*, 1999; Rodríguez-Oroz *et al.*, 2009a). Además de lentitud generalizada, los movimientos finos están muy alterados, lo que se puede poner de manifiesto en la exploración al realizar movimientos alternantes rápidos y movimientos secuenciales. Otras manifestaciones derivadas de la bradicinesia incluyen sialorrea (debida a disminución en la deglución), hipofonía, hipomimia, y reducción del braceo al andar.

El *temblor* es otra de las manifestaciones características de la EP. James Parkinson ya lo reflejó en el título de su trabajo en 1817 “*An Essay on the Shaking Palsy*”. Se trata de un temblor que aparece en reposo con una frecuencia de entre 4 y 6 Hz y, casi siempre, es más llamativo en la parte distal de una extremidad. En la región craneal, el temblor suele afectar a los labios, la barbilla y la mandíbula, pero raramente a la cabeza (Roze *et al.*, 2006). Curiosamente algunos pacientes se quejan de un “temblor interno”, que no es visible externamente. Muchos pacientes presentan de forma concomitante temblor postural, que puede ser incluso más incapacitante que el de reposo.

La *rigidez* se caracteriza por un aumento del tono muscular y se puede poner de manifiesto mediante maniobras de flexo-extensión y rotación articular pasivas en las que característicamente se evidencia una rigidez en “rueda dentada”. La rigidez puede aparecer o aumentar al realizar movimientos voluntarios concomitantes durante la exploración, en lo que se conoce como “maniobra de Froment” (Broussolle *et al.*, 2007). A veces puede llegar a producir dolor, de hecho, el hombro doloroso como consecuencia de la rigidez es una manifestación de inicio frecuente de la EP (Stamey *et al.*, 2008).

La *pérdida de reflejos posturales* es más frecuente en fases avanzadas de la enfermedad. Suele ir unida a la *imantación o bloqueos de la marcha*, lo que aumenta notablemente el riesgo de caídas. Estudios prospectivos muestran que después de 20 años, el 87% de los pacientes sufren caídas y el 81% imantación (Hely *et al.*, 2008). Los bloqueos de la marcha se definen como una ausencia o marcada reducción breve y transitoria de la progresión hacia delante de los pies a pesar de tener la intención de andar (Giladi and Nieuwboer, 2008). Los pacientes lo describen como si sus pies “se pegaran al suelo” y suele ocurrir al iniciar la marcha o en los giros. La pérdida de reflejos posturales y los bloqueos de la marcha se han asociado además de con el déficit dopaminérgico, con alteraciones del sistema colinérgico y noradrenérgico (Zarow *et al.*, 2003; Bohnen *et al.*, 2009). Es por ello, probablemente en parte, que estas alteraciones en general no responden o lo hacen en menor medida al tratamiento dopaminérgico.

### **3.2. Manifestaciones no motoras**

Clásicamente, la EP ha sido vista como una enfermedad primariamente motora. Sin embargo, ya a James Parkinson le llamaron la atención los problemas del sueño y gastrointestinales (Parkinson, 1817). Múltiples estudios en los últimos años han puesto de manifiesto la gran frecuencia y las graves consecuencias sobre la calidad de vida de las manifestaciones no motoras, en especial en estadios avanzados de la enfermedad (Lang and Obeso, 2004; Chaudhuri *et al.*, 2006).

La *disfunción autonómica*, que típicamente se asocia a la atrofia multisistema (AMS), puede ocurrir al inicio de la EP (Kaufmann *et al.*, 2004), si bien su frecuencia aumenta conforme avanza la enfermedad, y puede dar lugar a diversas manifestaciones. La hipotensión ortostática se da hasta en el 47% de pacientes, sin embargo, es raro que lleguen a presentar síncope. Las alteraciones de la sudoración, tanto hiperhidrosis como hipohidrosis, se han descrito en el 64 % de pacientes (Swinn *et al.*, 2003). Los síntomas urinarios son una queja muy frecuente. En un estudio se encontró que el 53% de pacientes tenía episodios de urgencia miccional mientras que el 27% presentaban incontinencia (Ransmayr *et al.*, 2008). Las alteraciones sexuales son también muy

frecuentes, tanto en forma de disfunción eréctil o eyaculación precoz en los hombres, como de dificultad para alcanzar el orgasmo o insatisfacción en las mujeres (Bronner *et al.*, 2004). Finalmente, las alteraciones gastrointestinales derivan del enlentecimiento del tránsito gastrointestinal lo que origina con mucha frecuencia estreñimiento y alteraciones en la absorción de la medicación, llegando en ocasiones a ser un problema grave. Se ha sugerido que el estreñimiento puede ser uno de los síntomas más precoces de la enfermedad, precediendo en años a la aparición de las manifestaciones motoras (Abbott *et al.*, 2007).

Las *alteraciones del sueño* también se han reconocido ampliamente como una manifestación de la EP, con mayor frecuencia en fases avanzadas. La más frecuente es el trastorno de conducta de sueño TCREM (Poryazova and Zachariev, 2005), pero también los somniloquios, los sueños vívidos, el insomnio y la hipersomnias diurna. El TCREM es un trastorno frecuente en la EP, con una prevalencia estimada de entre el 15% y el 47% de los pacientes. Se considera un factor de riesgo de EP pudiendo preceder en años su aparición (Comella *et al.*, 1998; Iranzo *et al.*, 2006). Además, con frecuencia se asocia con disfunción autonómica, y supone un factor de riesgo para el desarrollo de demencia (Postuma *et al.*, 2012). La hipersomnias diurna es más frecuente en fases avanzadas y, en su origen, se consideran múltiples factores tales como la medicación dopaminérgica, peor descanso nocturno por los trastornos motores y el avance de la propia enfermedad, que afecta a estructuras relacionadas con el mantenimiento del ciclo sueño/vigilia (Arnulf *et al.*, 2002; O'Suilleabhain and Dewey, 2002).

Las *alteraciones psiquiátricas* tienen un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes y sus familiares. La depresión es muy frecuente en la EP, con una prevalencia que varía del 2,7% al 90%. La estimación en un meta-análisis de la prevalencia de síntomas depresivos clínicamente significativos (independientemente de que se cumplieran criterios diagnósticos) es del 35% (Reijnders *et al.*, 2008). Aunque es frecuente en todos los estadios de la enfermedad, su prevalencia aumenta con la gravedad y con la presencia de demencia. El riesgo de suicidio global es del 4 % y se correlaciona con la gravedad de la depresión, el TCI y la psicosis (Nazem *et al.*, 2008).

Los síntomas depresivos suelen ir unidos a ansiedad. La prevalencia de ansiedad varía según estudios entre el 6% y el 55%, habiéndose estimado una prevalencia media de síntomas de ansiedad clínicamente significativos del 25,7% en un meta-análisis reciente (Broen *et al.*, 2016). La ansiedad se ha asociado con un empeoramiento subjetivo de los síntomas motores, más trastornos de la marcha, discinesias y disminución en la calidad de vida (Aarsland and Kramberger, 2015). El trastorno de ansiedad generalizada es la forma más frecuente, seguida de las fobias y los ataques de pánico (Broen *et al.*, 2016). La apatía se caracteriza por una disminución en el interés, falta de iniciativa para iniciar o completar actividades, falta de preocupación, indiferencia y aplanamiento afectivo (Dujardin *et al.*, 2007). Se ha descrito una prevalencia de entre el 16,5% y el 40% (den Brok *et al.*, 2015). Aunque la apatía suele ir asociada a síntomas depresivos, en un meta-análisis se determinó que la mitad de los pacientes con apatía no presentaban depresión concomitante, sugiriendo que la apatía es una entidad separada (den Brok *et al.*, 2015). De hecho, es llamativo cómo pacientes con falta total de iniciativa y abulia refieren “no estar tristes”.

El deterioro cognitivo, la demencia y la psicosis se tratarán en secciones posteriores.

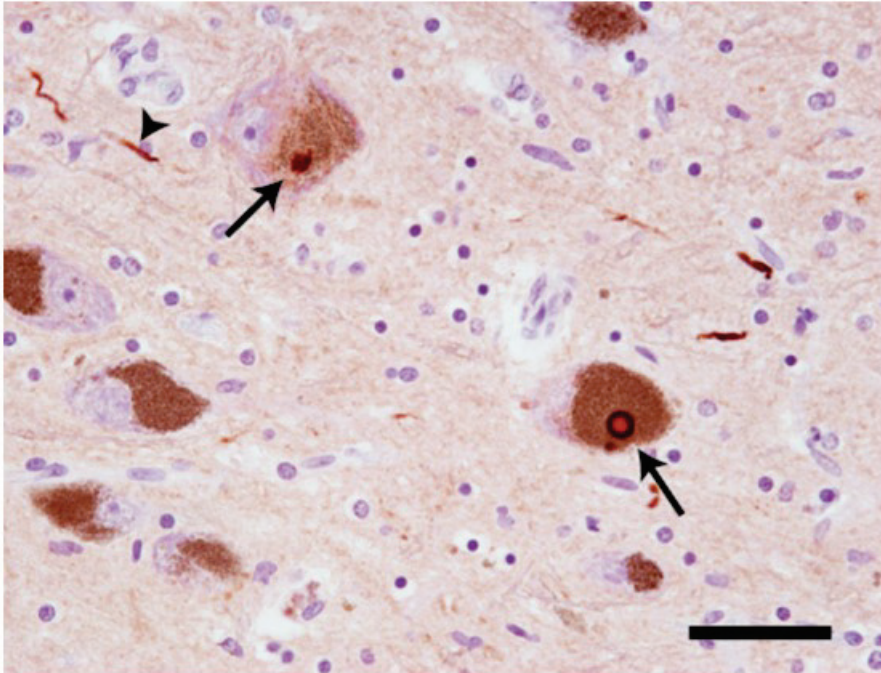
#### **4. Anatomía patológica**

Aunque con el paso del tiempo el conocimiento de los cambios neuropatológicos que tienen lugar en la EP se ha ido ampliando, los principales hallazgos histológicos siguen siendo 1) la despigmentación, pérdida de neuronas dopaminérgicas y gliosis en la SNpc y 2) la presencia de cuerpos de Lewy (CL) y neuritas de lewy (NL) en la SN (Figura 1) y otras regiones como el locus coeruleus y algunas áreas corticales (Lowe *et al.*, 1997). En 1919, Tretiakoff relacionó la pérdida de neuronas en la SN con la EP y describió la presencia de CL en las neuronas de esta estructura. Los CL son cuerpos de inclusión eosinofílicos intracitoplasmáticos, que habían sido previamente descritos por el neurólogo de origen alemán, Friedrich Heinrich Lewy, en la sustancia innominata y el núcleo dorsal del vago en pacientes con EP. Varios autores entre principios y mediados

del siglo XX confirmaron estos hallazgos y descubrieron afectación patológica a otros niveles, como el locus coeruleus y los núcleos del rafe (Goedert *et al.*, 2013). En 1997, Spillantini y colaboradores descubrieron que el principal componente de los CL es la  $\alpha$ -sinucleína (Spillantini *et al.*, 1997), que se deposita de forma anormal en estos agregados. A partir de entonces y con las nuevas técnicas de inmunohistoquímica, múltiples estudios han descrito la presencia de  $\alpha$ -sinucleína en el sistema nervioso periférico, autónomo y en otros órganos como las glándulas adrenales, la retina, el sistema genitourinario el corazón, la piel (Djaldetti *et al.*, 2009) y la glándula submaxilar (Adler *et al.*, 2016).

El diagnóstico histológico de la EP requiere dos hallazgos clave: pérdida de neuronas en la SNpc y presencia de CL (Daniel and Lees, 1993; Gelb *et al.*, 1999). Sin embargo, aunque la presencia de CL ayuda a confirmar el diagnóstico de EP, su ausencia no descarta la enfermedad y su presencia no es patognomónica de la misma. Aunque la gran mayoría de casos con EP presentan CL o NL, muchos casos de EP juvenil o los ligados a mutaciones de *parkina*, no tienen CL o NL (Pouloupoulos *et al.*, 2012). Por otro lado, se pueden encontrar en otras enfermedades como la neurodegeneración con acúmulo de hierro, la ataxia-telangiectasia, la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la degeneración corticobasal o la enfermedad de Alzheimer (EA) (Popescu *et al.*, 2004). Además, se ha observado que están presentes en un 7-10% de las autopsias de rutina (Gibb, 1986) y que aumentan con la edad (Fearnley and Lees, 1991), si bien, algunos autores consideran que estos hallazgos representarían formas presintomáticas de EP.

El envejecimiento fisiológico también se asocia a pérdida de neuronas dopaminérgicas, (preferentemente de la lámina dorsal de la SNpc) y pérdida de dopamina en el caudado (Fearnley and Lees, 1991). Sin embargo, la pérdida de neuronas en la EP afecta primero a la lámina ventrolateral de la SNpc, (Double *et al.*, 2010). Esto se corresponde con un patrón de pérdida de terminales dopaminérgicos que afecta primero al putamen dorsal y caudal y posteriormente al putamen ventral y al caudado (Kish *et al.*, 1988). La degeneración del sistema nigroestriatal produce una denervación del estriado con una pérdida de dopamina que varía entre el 44% y el 98% (Rajput *et al.*, 2008). La pérdida de dopamina en el estriado se correlaciona de forma significativa con la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Bernheimer *et al.*, 1973).



**Figura 1.** Cuerpos de Lewy (flechas) y neuritas de Lewy (cabeza de flecha) en la sustancia negra de un paciente con EP, teñidos con un anticuerpo policlonal frente a  $\alpha$ -sinucleína (20x aumentos). Barra=50  $\mu$ m. Foto: Leire Almandoz Gil, Uppsala University (Ingelsson, 2016).

En el momento del diagnóstico la pérdida de dopamina en el estriado es mayor que la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN. El concepto clásico de que los síntomas motores aparecen cuando se ha perdido el 50% de neuronas dopaminérgicas (Bernheimer *et al.*, 1973) ha sido puesto en entredicho. Recientemente se ha sugerido que en el momento del diagnóstico, sólo el 30% de las neuronas dopaminérgicas se habrían perdido, mientras que entre el 50% y 60% de sus terminales axonales habrían desaparecido (Cheng *et al.*, 2010).

Aunque la afectación principal es la del sistema dopaminérgico, estructuras implicadas en otros sistemas de neurotransmisión se ven también afectadas en la EP. Así, la alteración del locus coeruleus produce déficit de las vías noradrenérgicas hacia el prosencéfalo. La degeneración de neuronas colinérgicas del núcleo pedúnculopontino y del núcleo basal de Meynert, produce déficit en la transmisión colinérgica. Y



finalmente, las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe también presentan degeneración, lo que produce un déficit serotoninérgico (Halliday *et al.*, 1990).

## 5. Etiología

Como en tantas otras enfermedades, la causa de la EP no se conoce con exactitud y, de modo simplista, se postula que puede ser el resultado de la interacción entre factores ambientales y factores de predisposición individual (no genéticos y genéticos).

### 5.1. Factores ambientales

Múltiples estudios epidemiológicos han revelado que diversos factores ambientales pueden aumentar o disminuir el riesgo de desarrollar EP. Se trata de exposiciones a diferentes sustancias o tóxicos ambientales que inhiben el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, induciendo estrés oxidativo. Desde la primera evidencia en 1985 de que la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) producía parkinsonismo (Ballard *et al.*, 1985), son múltiples los estudios que han encontrado asociaciones entre diferentes tóxicos y la EP. La rotenona, un pesticida de origen vegetal, puede también producir parkinsonismo experimental, y la exposición al mismo se ha asociado con EP (Frigerio *et al.*, 2006). Otros pesticidas que se han asociado con un riesgo aumentado de EP son el maneb y el paraquat, entre otros (Costello *et al.*, 2009).

Sin embargo, hay algunos factores ambientales que se han asociado muy consistentemente con un riesgo reducido de EP, en especial el consumo de tabaco y café. En un gran estudio de cohortes se correlacionó el menor riesgo de desarrollar EP con más años de consumo de tabaco, mayor número de cigarrillos al día, mayor edad al dejar de fumar y menos años desde que se había dejado de fumar (Thacker *et al.*, 2007). El consumo de café también se ha asociado con una pequeña disminución del riesgo de EP (Ross *et al.*, 2000; Ascherio *et al.*, 2001). En un meta-análisis en el que se

evaluaron 30 factores de riesgo, se hallaron 11 factores ambientales que modificaban el riesgo de EP (Noyce *et al.*, 2012). En orden decreciente de fuerza de asociación, los factores que aumentaban el riesgo fueron: exposición a pesticidas, traumatismo craneoencefálico previo, lugar de residencia rural, uso de  $\beta$ -bloqueantes, ocupación agrícola y consumo de agua de pozos. Los factores que se encontraron asociados con una disminución del riesgo fueron, en orden decreciente de fuerza de asociación: consumo de tabaco, consumo de café, uso de antiinflamatorios no esteroideos, uso de antagonistas del calcio y consumo de alcohol.

### **5.2. Factores de predisposición individual (no genéticos)**

Múltiples estudios epidemiológicos han revelado que diversos factores pueden aumentar o disminuir el riesgo de desarrollar EP. Como se ha descrito previamente, el sexo masculino confiere un riesgo ligeramente superior que el que tienen las mujeres, con una ratio varón:mujer de aproximadamente 1,5 (Wooten *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2007). La raza se ha propuesto también como factor de riesgo. Por ejemplo, en Estados Unidos la incidencia es mayor en la población de origen hispano, seguida por la de blancos no hispanos, asiáticos y afroamericanos (Van Den Eeden *et al.*, 2003). Sin embargo, la edad es el mayor factor de riesgo para padecer EP. De hecho, la prevalencia y la incidencia aumentan casi de forma exponencial con la edad (Driver *et al.*, 2009).

### **5.3. Factores de riesgo genético**

Aunque históricamente se consideraba que la EP era una enfermedad esporádica de causa desconocida, en las dos últimas décadas ha quedado claro que alrededor del 10% de casos están causados por mutaciones genéticas con forma de transmisión monogénica (Lesage and Brice, 2009). La heredabilidad de la EP se sugirió primeramente al encontrar que la incidencia de EP era superior en familiares de pacientes con EP y con temblor (Noyce *et al.*, 2012). Aunque inicialmente se describieron formas con un patrón de herencia mendeliana con mutaciones raras con

alta penetrancia, posteriormente se han descrito mutaciones relativamente frecuentes con penetrancia variable. Finalmente, se están describiendo multitud de variantes genéticas con una frecuencia alélica alta en la población, que producen una variación muy pequeña en el riesgo de EP y que posiblemente interaccionen con factores ambientales o epigenéticos.

### ***5.3.1. Formas autosómicas dominantes***

El primer gen que se encontró asociado a la EP fue el gen *SNCA*, que codifica la  $\alpha$ -sinucleína. Mutaciones sin sentido en este gen o multiplicaciones del locus que lo contiene producen EP con herencia autosómica dominante (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Kruger *et al.*, 1998). La EP asociada con mutaciones en éste gen suele tener una edad de inicio más temprana y una progresión más rápida, con deterioro cognitivo precoz. Las duplicaciones o triplicaciones del gen producen también EP de inicio temprano y progresión rápida, y se ha demostrado que existe un efecto de dosis genética. Los pacientes con duplicaciones desarrollan la enfermedad aproximadamente una década más tarde que los portadores de triplicaciones (Singleton *et al.*, 2003). Aunque es una causa rara de EP, gracias a este descubrimiento, se consiguió identificar la  $\alpha$ -sinucleína como el principal componente de los CL y las NL (Spillantini *et al.*, 1997). La  $\alpha$ -sinucleína se expresa fundamentalmente en tejido nervioso, tanto del sistema nervioso central (SNC) como del periférico a nivel presináptico, aunque también se encuentra en los hematíes. Aunque su función exacta no está del todo clara, múltiples evidencias sugieren que puede intervenir en la regulación de la transmisión sináptica, la regulación del calcio, la homeostasis mitocondrial, la expresión de genes y la fosforilación de proteínas (Stefanis, 2012).

El gen *LRRK2* codifica la proteína *leucine-rich repeat kinase 2*, una proteína grande y multidominio que está implicada en múltiples funciones celulares, como el crecimiento de neuritas y la morfogénesis sináptica, el tráfico transmembrana, la autofagia y la síntesis de proteínas (Roosen and Cookson, 2016). Sus dominios incluyen un dominio serina/treonina kinasa, un dominio ROC GTPasa y un dominio C-terminal COR

(Paisan-Ruiz *et al.*, 2004). Las mutaciones en *LRRK2* son la causa más frecuente de EP genética, encontrándose en aproximadamente el 4 % de casos familiares y en el 1% de casos esporádicos (Healy *et al.*, 2008). Se han identificado al menos 8 mutaciones patogénicas en este gen, siendo la más frecuente el cambio de glicina por serina en la posición 2019 (G2019S), que aumenta la actividad kinasa de la proteína. La EP causada por esta mutación es especialmente prevalente en algunas poblaciones, como en los Judíos Askenazis (28% de casos familiares y 10% de los esporádicos) y los Bereberes del norte de África (36% de casos familiares y 39% de casos esporádicos) (Healy *et al.*, 2008). Aunque el patrón de herencia es autosómico dominante, su penetrancia no es completa, y varía según los diferentes estudios entre el 30% (Ozelius *et al.*, 2006) y el 90% (Latourelle *et al.*, 2008). Uno de los estudios más grandes (1045 portadores) determinó que la edad se asociaba a la penetrancia, que fue del 28% a los 59 años, del 51 % a los 69 años y del 74% a los 70 años (Healy *et al.*, 2008). Sin embargo, en un estudio más reciente en 652 portadores, se encontró una penetrancia global del 24% a los 80 años (Marder *et al.*, 2015). La sustitución R1441G es también patogénica y, aunque es rara a nivel mundial, es muy frecuente en el País Vasco, donde está presente en el 16% de las formas familiares y el 4% de las esporádicas (Gorostidi *et al.*, 2009). Esta distribución geográfica se ha explicado por un efecto fundador (Simon-Sanchez *et al.*, 2006).

Mutaciones en el gen *VPS35* (*Vacuolar protein sorting 35*) también se asocian con EP de forma autosómica dominante. La proteína codificada por este gen interviene en el transporte retrógrado de proteínas a través de la red del trans Golgi. Es una causa muy rara de EP; el 1% de EP familiar y el 0,2% de EP esporádica se deben a mutaciones de este gen (Lesage *et al.*, 2012). Fenotípicamente es similar a la EP esporádica y presenta buena respuesta a levodopa (Kumar *et al.*, 2012).

### ***5.3.2. Formas autosómicas recesivas***

Los genes que se han asociado con formas autosómicas recesivas de EP son *parkina* (*RBR E3 ubiquitin protein ligase*), *PINK1* (*PTEN induced putative kinase 1*) y *DJ-1*

(*protein deglycase DJ-1*). Al contrario que las formas autosómicas dominantes, cuya edad de inicio es similar a la de la EP esporádica, las formas recesivas se asocian más frecuentemente con EP de inicio antes de los 40 años (Schrag and Schott, 2006). Las mutaciones en el gen *parkina* son la causa más frecuente de EP con herencia autosómica recesiva. En pacientes con edad de inicio antes de los 45 años, las mutaciones en este gen se encuentran hasta en el 50% de los casos familiares y en el 15 % de los esporádicos (Lucking *et al.*, 2000). El fenotipo de los pacientes con mutaciones en *parkina* es similar al de la EP esporádica, aunque es típico el inicio con distonía en una extremidad. Las mutaciones en *PINK1* y *DJ-1* son menos frecuentes (1-8% y 1-2% de casos de EP esporádica de inicio precoz, respectivamente) (Singleton *et al.*, 2013).

La EP autosómica recesiva puede ser el resultado de mutaciones monozigotas o heterozigotas compuestas de estos genes. Las proteínas codificadas por estos tres genes están implicadas en funciones mitocondriales, entre otras. Parkina, una ubiquitina ligasa E3 y PINK1, una serina treonina quinasa, funcionan en conjunto eliminando mitocondrias dañadas en lo que se conoce como mitofagia (McCoy and Cookson, 2012). La función de DJ-1 está menos establecida, aunque se sugiere que está implicada en la protección de neuronas frente al estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2005).

Mutaciones en el gen *DNAJC6* (*Encoding DNAJ heat shock protein family member C6*), que codifica la proteína auxilina, se han descrito recientemente como causa de EP autosómica recesiva. Las características de la enfermedad causada por este gen son atípicas, con una edad muy temprana de inicio, espasticidad, psicosis y deterioro cognitivo precoz (Edvardson *et al.*, 2012; Olgiati *et al.*, 2016). La proteína auxilina es una proteína asociada a clatrina y, predominantemente expresada en neuronas y en especial en terminales nerviosos, lo que sugiere que el transporte de vesículas es importante en la patogenia de la EP (Eisenberg and Greene, 2007).

Hay otros genes que también causan formas atípicas de EP, como *ATP13A2* (*ATPase 13A2*) (Ramirez *et al.*, 2006), *FBX07* (*F-box protein 7*) (Shojaee *et al.*, 2008), *PLA2G6* (*Phospholipase A2 group VI*) (Paisan-Ruiz *et al.*, 2009) y *SYNJ1* (*synaptojanin 1*) (Krebs *et al.*, 2013), entre otros.

### 5.3.3. Variantes modificadoras del riesgo

El escenario de la genética de la EP se ha ido completando en los últimos años con el descubrimiento de variantes genéticas. En general se trata de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs: *single nucleotide polymorphisms*) que también existen en la población general y que de forma individual sólo modifican muy sutilmente el riesgo de padecer la enfermedad. Las variantes de riesgo pueden ser “comunes” o “raras”, en función de su frecuencia en la población general, considerándose comunes cuando la frecuencia alélica es  $\geq 1\%$ . En general, las variantes comunes suelen presentar un efecto muy pequeño ( $OR < 1,5$ ), mientras que las variantes raras tienen efectos mayores.

En los últimos años, se han identificado numerosos genes y loci asociados al riesgo de EP. Aunque la aproximación más reciente implica estudios de asociación de genoma completo (GWAS: *genome-wide association study*), algunos resultados se obtuvieron estudiando directamente genes candidatos. Así, por ejemplo, se ha demostrado que el microsatélite *REPI* de la región promotora del *SNCA* se asocia con un riesgo 1,4 veces aumentado de EP (Maraganore *et al.*, 2006). Posteriormente, en estudios de GWAS se han identificado múltiples SNPs en este loci asociados al riesgo de EP. El descubrimiento de mutaciones en el gen *LRRK2* como causa de EP monogénica, también llevó a estudiar variantes comunes en este gen. Consecuentemente, se ha demostrado de forma consistente que algunas variantes como p.G2385R (Tan *et al.*, 2007; Zabetian *et al.*, 2009) y p.1628P (Ross *et al.*, 2008; Pulkes *et al.*, 2011) aumentaban el riesgo al doble. Aunque en estudios de GWAS el locus de *LRRK2* se identifica de forma consistente en población caucásica, las variantes exactas que causan el aumento del riesgo siguen siendo desconocidas, por lo que se requiere un análisis más profundo del locus (Hernandez *et al.*, 2016). Derivado también de observaciones clínicas, se identificó el haplotipo H1 del gen *MAPT* como un factor de riesgo de EP (Martin *et al.*, 2001). Finalmente, en un meta-análisis de estudios de GWAS reciente, se han identificado 28 SNPs en 24 loci que se asocian con la susceptibilidad de padecer EP (Nalls *et al.*, 2014).

Las mutaciones en el gen de la glucocerebrosidasa (*GBA*) son especialmente interesantes ya que su efecto se sitúa en un punto intermedio entre las formas autosómicas

dominantes y las variantes que aumentan el riesgo. La glucocerebrosidasa es un enzima lisosomal, y las mutaciones homocigotas de su gen producen la enfermedad de Gaucher. Los portadores de mutaciones en el gen *GBA* presentan un riesgo considerablemente aumentado de EP con una odds ratio de 5,43 (Sidransky *et al.*, 2009; Anheim *et al.*, 2012) y un riesgo acumulado del 30 % a los 80 años (McNeill *et al.*, 2012). Por tanto, se habla de un patrón de herencia “pseudo-autosómico dominante”. Sin embargo, al contrario que los genes que causan las formas monogénicas, las mutaciones en *GBA* son relativamente frecuentes, con una prevalencia en poblaciones no Askenazis de entre el 2,3% y el 9,4 % (Sidransky and Lopez, 2012).

## 6. Patogenia

Las manifestaciones motoras cardinales de la EP se deben al déficit dopaminérgico estriatal, siendo la rigidez y la bradicinesia las que mejor correlación muestran. Por ello, gran parte de la investigación sobre la patogenia de la enfermedad se ha centrado en los mecanismos que causan degeneración del sistema nigroestriatal. Sin embargo, otros sistemas monoaminérgicos, también degeneran en la EP, como el noradrenérgico y el serotoninérgico, aunque su conocimiento es menor. Hay numerosos procesos que se han puesto en relación con la pérdida de neuronas dopaminérgicas como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la excitotoxicidad, las alteraciones en la autofagia, la inflamación y la apoptosis.

### 6.1. Estrés oxidativo

En condiciones normales, los radicales libres o especies reactivas oxigenadas están en equilibrio con el sistema antioxidante para mantener la homeostasis. Cuando los radicales libres sobrepasan la actividad antioxidante de la célula, se produce el estrés oxidativo. El exceso de radicales libres produce daño a ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Está ampliamente demostrado que en la EP existe un exceso de radicales

libres que producen deterioro de estas macromoléculas (Sanders and Greenamyre, 2013). Son numerosos los estudios que han demostrado acúmulo de radicales libres, como el radical hidroxilo de productos oxidados en cerebros post mortem de pacientes con EP. También hay una disminución del glutatión reducido, uno de los principales antioxidantes intracelulares, en la SNpc (Perry *et al.*, 1982; Sian *et al.*, 1994), si bien no se conoce si esto es un defecto primario o una consecuencia del estrés oxidativo (Martin and Teismann, 2009).

La acumulación de hierro en su forma redox activa, también tiene un papel importante. Se ha demostrado que existe una acumulación de hierro en la SNpc de pacientes con EP, lo que sugiere que la peroxidación de lípidos inducida por hierro es también importante en la patogenia de la enfermedad (Friedlich and Beal, 2000). Por último, niveles plasmáticos o séricos elevados de ácido úrico, que tiene propiedades antioxidantes, se han asociado en varios estudios prospectivos con una reducción en el riesgo de desarrollar EP (Davis *et al.*, 1996; de Lau *et al.*, 2005a; Weisskopf *et al.*, 2007) y con una progresión más lenta de la enfermedad (Schwarzschild *et al.*, 2008).

### **6.2. Disfunción mitocondrial**

El papel de la disfunción mitocondrial en la patogenia de la EP está ampliamente demostrado. La primera evidencia vino dada por el hecho de que el MPTP, que bloquea la transferencia de electrones a través del complejo I, podía producir muerte de células dopaminérgicas y parkinsonismo prácticamente indistinguible de la EP (Ballard *et al.*, 1985). De hecho, el MPTP ha sido ampliamente usado para generar modelos animales de EP que permiten estudiar mecanismos y consecuencias de la pérdida de neuronas nigroestriatales *in vivo* (Smeyne and Jackson-Lewis, 2005). Posteriormente, se ha descubierto que otros agentes tóxicos como la rotenona, con un mecanismo semejante al MPTP, producen un efecto similar habiendo sido empleados también en modelos animales (Betarbet *et al.*, 2000). Por último, el estudio de las formas autosómicas recesivas de EP reveló que las formas mutadas de Parkina, DJ-1 y PINK



tienen efectos tóxicos en la mitocondria (Muftuoglu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Abramov *et al.*, 2011).

La vulnerabilidad de las neuronas a la disfunción mitocondrial se puede explicar por su alta actividad metabólica y su gran demanda energética, especialmente para mantener los gradientes iónicos transmembrana y la neurotransmisión (Nicholls and Budd, 2000). Las neuronas dopaminérgicas en concreto tienen una gran demanda energética, ya que tienen que mantener más de 400.000 sinapsis por cuerpo neuronal. Esto hace que sean especialmente vulnerables a cualquier proceso que comprometa la función mitocondrial (Bolam and Pissadaki, 2012). En cerebros post mortem de pacientes con EP se ha demostrado que existe una reducción del 30% al 40% de la actividad del complejo I mitocondrial en la SN (Schapira *et al.*, 1989). Además, PGC1 $\alpha$ , un factor de transcripción implicado en el recambio mitocondrial que se ha asociado con el riesgo de EP en un estudio de GWAS, tiene una expresión disminuida en cerebros de pacientes con EP (Zheng *et al.*, 2010). Por otro lado, mutaciones en el ADN mitocondrial podrían tener importancia. Aunque estas se producen con el envejecimiento fisiológico, en la SN hay una mayor proporción de mutaciones que en otras áreas cerebrales. Además, las mutaciones en el gen que codifica la  $\gamma$ -polimerasa mitocondrial (*POLG1*) pueden producir fenotipos con manifestaciones parkinsonianas (Delgado-Alvarado *et al.*, 2015).

### 6.3. Degradación proteica

Hay dos sistemas mediante los cuales las células eliminan proteínas solubles o insolubles: el sistema ubiquitin-proteasoma y el sistema de la autofagia. Tanto el mal funcionamiento de cualquiera de estos sistemas, como su saturación con cantidades anormales de  $\alpha$ -sinucleína oligomérica, puede dar lugar a la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína y por tanto a la formación de CL (Cuervo *et al.*, 2004). Se han encontrado alteraciones de ambos sistemas en la EP (Balch *et al.*, 2008). Con el envejecimiento fisiológico el sistema ubiquitin-proteasoma disminuye su actividad, por lo que la degradación proteica a través del sistema lisosomal de autofagia cobra más importancia

(Rubinsztein, 2006). Los lisosomas son orgánulos que contienen una variedad de enzimas para la degradación de proteínas, lípidos, azúcares y otras macromoléculas. Su fusión a endosomas que contienen estas macromoléculas (macroautofagia) es un paso clave en la autofagia. Se ha demostrado que el acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína produce una disminución de la degradación de proteínas por alteración del tráfico de enzimas a los lisosomas (Cooper *et al.*, 2006). Además, influye negativamente en el tráfico de proteínas a través de vesículas o endosomas al lisosoma para su degradación (Volpicelli-Daley *et al.*, 2014). La autofagia mediada por chaperonas se encarga de la degradación de proteínas citosólicas de forma selectiva en los lisosomas. La  $\alpha$ -sinucleína contiene un motivo de aminoácidos que hace que sea reconocida por chaperonas citosólicas y dirigida a los lisosomas. Tanto las formas mutadas de  $\alpha$ -sinucleína, como su sobreexpresión alteran su degradación por esta vía (Xilouri *et al.*, 2009).

Diversos estudios sugieren que LRRK2 tiene un papel regulador en la autofagia, tanto en la macroautofagia, como en la autofagia mediada por chaperonas. Por ejemplo, se ha demostrado que la mutación G2019S produce un aumento de las vacuolas autofágicas y una reducción de las neuritas, efecto que se facilita con rapamicina, un inductor de la autofagia (Winner *et al.*, 2011). Por otra parte, tanto la regulación positiva de LRRK2 nativa como de sus formas mutantes inhibe la actividad de la autofagia mediada por chaperonas (Yue and Yang, 2013). Resulta interesante el hecho de que mutaciones en el gen de la glucocerebrosidasa, un enzima lisosomal, es una causa relativamente frecuente de EP (3% de las formas esporádicas) (Winder-Rhodes *et al.*, 2013). Recientemente se ha demostrado, como cabía esperar, que la actividad de la glucocerebrosidasa está disminuida en la SN de pacientes con mutaciones heterocigotas en *GBA*. Curiosamente, también se ha encontrado disminuida en la SN de pacientes con EP esporádica (Gegg *et al.*, 2012).

### 6.4. Inflamación

Múltiples líneas de evidencia sugieren que la inflamación crónica puede contribuir a la degeneración de neuronas dopaminérgicas y a la progresión de la EP. En estudios

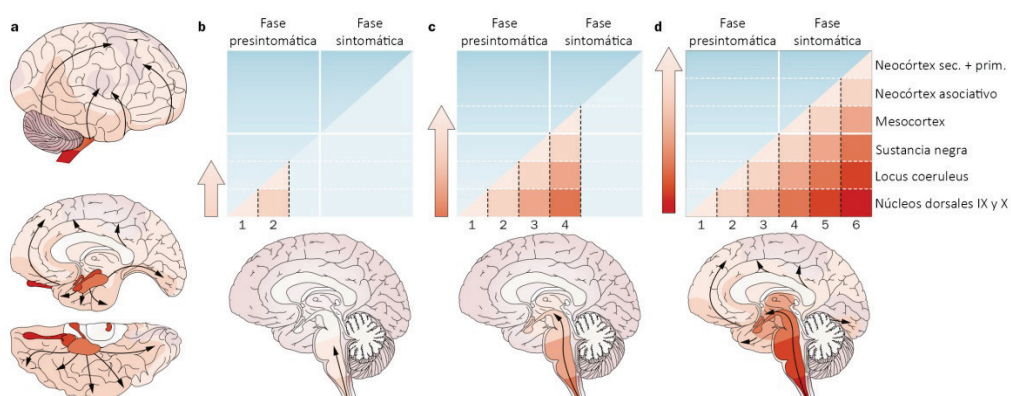
epidemiológicos se ha observado una menor prevalencia de EP en sujetos que han usado anti-inflamatorios no esteroideos (Gao *et al.*, 2011). Por otro lado, en estudios post mortem se ha demostrado la presencia de microglía activada en la SN y otras áreas cerebrales (Imamura *et al.*, 2003), lo que se ha corroborado *in vivo* mediante PET (*Positron emission tomography*) con PK11195 (Gerhard *et al.*, 2006). Además, variaciones en el locus del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, implicado en reconocimiento inmunológico y señalización entre células del sistema inmune (International Parkinson's Disease Genomics and Wellcome Trust Case Control, 2011) y en otros genes implicados en inflamación (Holmans *et al.*, 2013) se han encontrado asociadas a EP. Se ha sugerido que se podría establecer un bucle en el que la microglía aumenta la liberación de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleuquina 1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ) en respuesta al daño celular, lo que a su vez induciría un mayor daño neuronal (Collins *et al.*, 2012).

Por otro lado, algunos estudios han encontrado un aumento de factores proinflamatorios en plasma en pacientes con EP como son la interleuquina 6 (IL-6), el receptor soluble de interleuquina-2 (RSIL-2), y el TNF- $\alpha$  (Dobbs *et al.*, 1999; Scalzo *et al.*, 2010; Lindqvist *et al.*, 2012). En líquido cefalorraquídeo (LCR) también se han encontrado diferencias en los niveles de IL-6, IL-1  $\beta$  y TNF- $\alpha$  entre pacientes con EP y controles (Blum-Degen *et al.*, 1995; Mogi *et al.*, 1996).

### **6.5. Hipótesis de la transmisión trans-sináptica de proteínas**

El estudio de la extensión de la patología tipo Lewy por diversas estructuras del cerebro dio lugar al sistema de estadios de Braak y colaboradores (Figura 2). En su trabajo sugieren que la patología tipo Lewy comienza en el núcleo motor dorsal del vago y el núcleo olfatorio anterior y va afectando con la evolución de la enfermedad a otras áreas de tronco del encéfalo, como la SNpc, marcando el inicio de la fase sintomática de la enfermedad. Finalmente afectaría a diversas áreas corticales. Posteriormente se planteó si el proceso degenerativo podría comenzar fuera del sistema nervioso central (SNC), ya que encontraron inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína en ganglios simpáticos y parasimpáticos,

médula espinal, médula adrenal, tracto gastrointestinal, y piel de pacientes con EP (Hishikawa *et al.*, 2000; Braak *et al.*, 2006; Braak *et al.*, 2007; Fumimura *et al.*, 2007; Beach *et al.*, 2010) Estas observaciones han dado lugar la “*dual hit hypothesis*”, por la cual se especula que un patógeno desconocido entraría al sistema nervioso a través del bulbo olfatorio y del plexo entérico para ir afectando de manera progresiva a estructuras centrales.

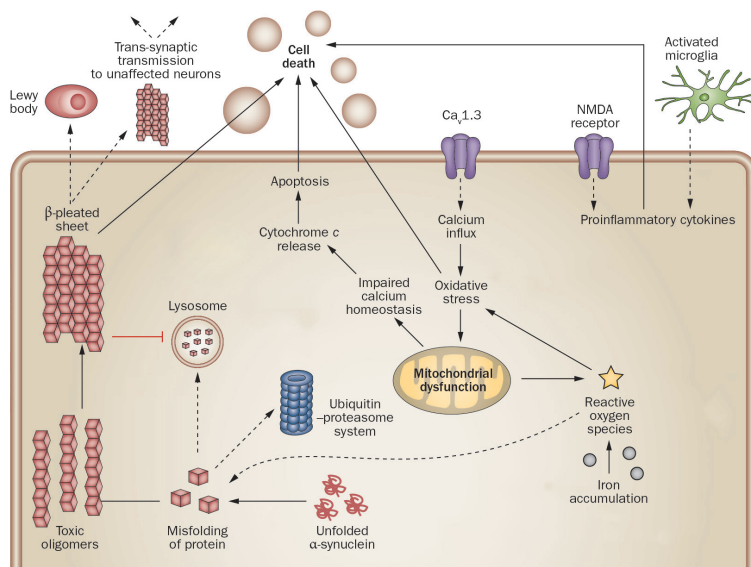


**Figura 2.** Seis estadios de la patología tipo Lewy según la hipótesis de Braak et al. Los casos con inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína caen en uno de los seis grupos de acuerdo con las regiones cerebrales afectas. La progresión entre grupos implica la adición de nuevas áreas y el empeoramiento de las previas (Goedert *et al.*, 2013).

Sobre esta línea de hipótesis, en los últimos años, se especula con la posibilidad de que la  $\alpha$ -sinucleína patológica pueda transmitirse entre células tanto del sistema nervioso periférico al central como dentro del SNC. Una de las primeras observaciones que apoyaba esta hipótesis fue la aparición en cerebros post mortem de inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína en células que habían sido trasplantadas a pacientes con EP (Li *et al.*, 2008). Más recientemente, se ha demostrado que fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína recombinante son capaces de entrar en neuronas en cultivo e inducir la formación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína y finalmente muerte neuronal (Volpicelli-Daley *et al.*, 2011). Además, la

inoculación intraestriatal de una forma sintetizada de  $\alpha$ -sinucleína en ratones *wild type* indujo la agregación de  $\alpha$ -sinucleína en otras regiones, como la SNpc (Luk *et al.*, 2012). Incluso se ha comprobado que inoculando extractos purificados de CL de pacientes con EP en la SN o el estriado de ratones y monos macacos *wild type* se inducía el acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína patológica y degeneración nigroestriatal (Recasens *et al.*, 2014). Estas evidencias hacen que se hipotetize sobre la posible transmisibilidad de la  $\alpha$ -sinucleína entre células y se hable de un comportamiento “similar a priones”.

Lejos de ser mecanismos individuales, cada vez parece más evidente que los diferentes mecanismos patogénicos tienen muchos puntos de confluencia y que pueden ser sinérgicos entre sí (Figura 3).



**Figura 3.** Mecanismos patogénicos en la EP. Modificado de (Athauda and Foltynic, 2015).

### 7. Diagnóstico

El diagnóstico de la EP es eminentemente clínico. Los primeros criterios diagnósticos fueron propuestos por Hoehn y Yahr en 1967 (Hoehn and Yahr, 1967) y modificados por Marttila y Rinne en 1976 (Marttila and Rinne, 1976). Proponían el diagnóstico de EP idiopática en presencia de dos o más síntomas cardinales: temblor de reposo, rigidez, hipocinesia y alteración de reflejos posturales. Como requisito había que descartar el temblor esencial y los pacientes con historia previa de encefalitis, quienes se clasificaban como EP postencefalítica.

En 1985, Schoenberg y colaboradores (Schoenberg *et al.*, 1985) propusieron los términos EP probable y posible basándose en criterios de exclusión adicionales, como el parkinsonismo inducido por fármacos o debido a otras enfermedades. En 1992, Calne y colaboradores (Calne *et al.*, 1992) añaden la categoría diagnóstica parkinsonismo idiopático clínicamente definido que requería tres de los cuatro síntomas cardinales descritos originalmente o dos de ellos con al menos uno distribuido de forma asimétrica.

Los criterios más usados hasta la actualidad han sido los del Banco de Cerebros del Reino Unido, que requieren la presencia de bradicinesia, más al menos uno de los siguientes: rigidez, temblor de reposo o inestabilidad postural. Entre los criterios de exclusión destacan los ictus de repetición o disautonomía grave. Añadieron como criterios de apoyo al diagnóstico la respuesta a levodopa y el carácter progresivo de la enfermedad (Ward and Gibb, 1990). Gelb y colaboradores diseñaron unos criterios diagnósticos en 1999 basándose en una revisión de la literatura, similares a los propuestos por Calne y colaboradores, en los que establecieron tres niveles de certeza: EP posible, EP probable y EP definitiva. En estos criterios se dio importancia al inicio asimétrico y la respuesta a tratamiento con levodopa o agonistas dopaminérgicos, y no se consideró la alteración de reflejos posturales como síntoma cardinal (Gelb *et al.*, 1999).

Sin embargo, el avance en el conocimiento de la EP, en especial en lo que concierne a manifestaciones no motoras y genética ha hecho que la *Movement Disorders Society*

(MDS) haya redefinido recientemente, mediante un panel de expertos, los criterios diagnósticos de la EP (Postuma *et al.*, 2015). Se han establecido dos niveles de certeza:

- *EP clínicamente establecida*: Se prioriza la especificidad. Al menos el 90% tienen EP
- *EP clínicamente probable*: Hay un equilibrio entre sensibilidad y especificidad. Al menos el 80% de pacientes diagnosticados tienen EP. Se identifican el 80% de casos de EP.

La base de los criterios es la presencia de parkinsonismo definido como bradicinesia en combinación con al menos uno de los otros signos cardinales (temblor de reposo o rigidez). Se añaden unos criterios de apoyo, unos criterios de exclusión absolutos (que tienen que estar ausentes en ambos niveles) y unas “red flags”, cuya presencia no excluye en ninguno de los niveles, pero va en contra del diagnóstico de EP. Entre los criterios de apoyo se incluyen, entre otros, la presencia de discinesias inducidas por levodopa y la presencia de hiposmia o denervación simpática cardíaca demostrada mediante SPECT (*single photon emission computed tomography*) con [<sup>131</sup>I]-MIBG. Los criterios de exclusión absolutos son muy relevantes ya que se requiere su ausencia en las dos categorías diagnósticas. Entre ellos encontramos parálisis supranuclear de la infraversión de la mirada, normalidad en las pruebas de imagen del sistema dopaminérgico o falta de respuesta a la levodopa a altas dosis a pesar de presentar síntomas moderados. Las “red flags”, que no pueden estar presentes en la categoría de EP establecido incluyen, entre otras, disfunción bulbar temprana, disfunción autonómica grave dentro de los 5 primeros años o piramidalismo.

## 8. Tratamiento

Debido a que los principales problemas motores se deben al déficit dopaminérgico estriatal, el principal abordaje farmacológico es la administración de fármacos dopaminérgicos. Aun hoy, justo medio siglo después de la introducción de la levodopa

(Cotzias *et al.*, 1967), éste sigue siendo el tratamiento más efectivo para la EP (Olanow *et al.*, 2009). El uso de agonistas dopaminérgicos solos o en combinación con levodopa es una estrategia ampliamente usada. Aunque el uso de estos fármacos mejora considerablemente algunos síntomas, como la bradicinesia o la rigidez, no es efectivo para mejorar otras manifestaciones como los trastornos de la marcha, o el deterioro cognitivo. Además, con la evolución de la enfermedad su efectividad disminuye y aparecen las fluctuaciones motoras y discinesias, refractarias al tratamiento convencional. En ese momento existen tres opciones terapéuticas: bomba de infusión de apomorfina, infusión intrayunal de levodopa o estimulación cerebral profunda.

A pesar de que el tratamiento sintomático mejora la calidad de vida e incluso aumenta la esperanza de vida de los pacientes con EP, la búsqueda de un tratamiento capaz de frenar el proceso de neurodegeneración sigue siendo el objetivo de múltiples grupos de investigación. Son muchos los agentes que, aunque han demostrado ser efectivos en modelos animales, han fracasado al ser probados en ensayos clínicos y por el momento no existe ningún tratamiento capaz de frenar el proceso de neurodegeneración (Shults *et al.*, 2004).

## 9. Deterioro cognitivo y demencia en la enfermedad de Parkinson

Lejos de la observación inicial de James Parkinson en la que afirmaba que la función intelectual estaba preservada (“...*the senses and intellects being unjured...*”), hoy en día se reconoce que el deterioro cognitivo es una manifestación frecuente en la EP. Se incluye dentro de los síntomas no motores junto con las alteraciones psiquiátricas, las alteraciones del sistema nervioso autónomo, las alteraciones sensoriales, entre otros. De hecho, es uno de los síntomas no motores más frecuentes de la EP con escasa o nula respuesta al tratamiento dopaminérgico.



## 9.1. Demencia

### 9.1.1. Epidemiología

Ya en el momento del diagnóstico una proporción importante de pacientes (hasta un 36 %) presenta déficits cognitivos (Foltynie *et al.*, 2004), y la mayoría de ellos acaban progresando a demencia asociada a la EP (DEP) a largo plazo (Williams-Gray *et al.*, 2009). La prevalencia acumulada de DEP, según estudios longitudinales es del 78% a los 8 años (Aarsland *et al.*, 2003a) y del 83 % a los 20 años (Hely *et al.*, 2008) de evolución de la enfermedad. La prevalencia puntual de la DEP se ha estimado en una revisión sistemática de entre 24% y el 31 % (Aarsland *et al.*, 2005b). En la población general con 65 años o más, la prevalencia de la DEP es de 0,2% a 0,5 % y representa entre el 3% y el 4 % de todas las demencias (Aarsland *et al.*, 2005b). La incidencia de la DEP según estudios comunitarios varía entre 95,3 (Aarsland *et al.*, 2001a), 107,1 (Hobson and Meara, 2004) y 112,5 (Marder *et al.*, 1995) por cada 1.000 pacientes y año. Finalmente, el riesgo relativo de padecer demencia de un paciente con EP comparado con el de una persona sin EP varía según los estudios entre 1,7 (Marder *et al.*, 1995), 4,7 (de Lau *et al.*, 2005b), 5,1 (Hobson and Meara, 2004) y 5,9 (Aarsland *et al.*, 2001a).

### 9.1.2. Perfil neuropsicológico

En general, el inicio del deterioro cognitivo es insidioso y la progresión a demencia lenta. La caída anual del *Mini Mental State Examination* (MMSE) es de 1 punto en pacientes con EP sin demencia (EPND) y de 2.3 en pacientes con DEP, similar a los pacientes con EA (Aarsland *et al.*, 2004a). El perfil cognitivo de la DEP es predominantemente subcortical o disejecutivo, sin embargo, en fases avanzadas el fenotipo de la DEP va más allá, con alteraciones floridas en otros dominios. De hecho, en muchos estudios se ha comprobado que la diferenciación entre DEP y EA sólo mediante el uso de test neuropsicológicos es considerablemente difícil (Emre *et al.*, 2007).

Las alteraciones en la *atención* se presentan como una dificultad en la continuidad del pensamiento durante las frases haciendo que sea difícil seguir una conversación (Gratwicke *et al.*, 2015). Además, hacen que la vigilancia disminuya y el nivel de alerta fluctúe, lo que produce niveles de cognición fluctuante (Ballard *et al.*, 2002). Los déficits en atención se han descrito como el síntoma más incapacitante en la DEP, con una disminución importante en la calidad de vida (Bronnick *et al.*, 2006). Aunque existe controversia, en uno de los estudios más exhaustivos que utilizó la variabilidad en el tiempo de ejecución en una serie de tareas, se demostró que los pacientes con DEP y demencia con cuerpos de Lewy (DCLw) tenían una variabilidad mayor que los pacientes con EA (Ballard *et al.*, 2002).

Los problemas en la *memoria* son la queja inicial en el 67 % de los pacientes con DEP, mientras que lo es en el 94 % de los pacientes con DCLw y en el 100 % de aquellos con EA (Noe *et al.*, 2004). Se cree que la disfunción de la memoria en los pacientes con EP es un fallo de la evocación más que de la codificación o almacenamiento (Whittington *et al.*, 2000). Esta hipótesis proviene de estudios en pacientes con EPND en los que se demostró que el reconocimiento estaba intacto y el rendimiento aumentaba con pistas. Sin embargo, en los pacientes con DEP también existe alteración en la recuperación con pistas (Higginson *et al.*, 2005), así como déficits en el reconocimiento de material verbal y no verbal (Whittington *et al.*, 2000). Con todo, se cree que el déficit en memoria visual y verbal es menor en la DEP que la EA (Emre *et al.*, 2007).

La *función ejecutiva* suele estar alterada en la EP desde el momento del diagnóstico (Muslimovic *et al.*, 2005) y empeora con la evolución de la enfermedad (Christopher *et al.*, 2014). Se caracteriza por dificultades en la concentración, en el almacenamiento de la información, las habilidades de planificación y organización y en el cambio de tareas (“*set shifting*”), y ha sido objeto de estudio en multitud de trabajos. Medida con el test de fluencia verbal, en numerosos estudios presenta resultados controvertidos, con estudios que muestran mayor alteración en pacientes con DEP que en EA, mientras que en otros no encuentran diferencias significativas (Emre *et al.*, 2007). En fases avanzadas de la demencia parece que no existen diferencias entre DEP, DCLw y EA

(Pillon *et al.*, 1993). Sin embargo, teniendo en cuenta los estudios disponibles, parece que la función ejecutiva estaría más afectada en pacientes con DEP que en aquellos con EA (Emre *et al.*, 2007).

Los pacientes con EP tienen alteraciones sutiles en la *función visuoespacial* (percepción del espacio extra-personal) (Levin *et al.*, 1991) y en la función visuoperceptiva (dificultades al reconocer objetos por su forma) (Kida *et al.*, 2007) que van avanzando con la progresión de la enfermedad. De hecho, la función visuoespacial ha demostrado tener una alta sensibilidad para detectar la transición a DEP (Biundo *et al.*, 2014) y está muy alterada en los pacientes con DEP, similar a los pacientes con DCLw, pero más que en los pacientes con EA (Mosimann *et al.*, 2004).

En cuanto al *lenguaje*, es quizás el dominio que menor atención ha recibido en la EP, debido probablemente a que la presencia de afasia clínicamente evidente es rara. Parece que los pacientes con EA presentan más problemas en la denominación, tienen un discurso espontáneo más empobrecido, más anomia y más problemas al generar listas de palabras que los pacientes con DEP (Cummings *et al.*, 1988; Pillon *et al.*, 1993).

Las *praxias y la construcción* típicamente se estudian mediante la copia de diseños complejos o dibujando objetos comunes. El test del reloj está gravemente alterado en los pacientes con DEP (Emre *et al.*, 2004). Este test no sirvió para diferenciar pacientes con DEP, DCLw y EA, aunque se demostró que los dos primeros grupos tenían más errores de planificación. En otros estudios en los que se usaron test de copia no se encontraron diferencias (Aarsland *et al.*, 2003b; Noe *et al.*, 2004) entre pacientes con DEP y con EA, o se encontró mayor déficit en los primeros (Cormack *et al.*, 2004).

### ***9.1.3. Otras manifestaciones clínicas***

Más allá del perfil cognitivo, la DEP presenta algunas manifestaciones clínicas más frecuentemente que en otros tipos de demencia, como la psicosis (alucinaciones y delirios) o los trastornos afectivos.

Las *alucinaciones* son frecuentes en los pacientes con EP en general (25%-40%) (Aarsland *et al.*, 1999b; Fenelon *et al.*, 2000; Aarsland *et al.*, 2001d), pero son más frecuentes en los que presentan DEP (45%-65%) (Fenelon *et al.*, 2000; Aarsland *et al.*, 2001b; Aarsland *et al.*, 2001c; Aarsland *et al.*, 2007) y más aún en los pacientes con DCLw (60-80%) (Ballard *et al.*, 1999; Hirono *et al.*, 1999; Aarsland *et al.*, 2001b). Esto contrasta con la baja frecuencia de alucinaciones en la EA leve o moderada, que es del 4%-8% (Hirono *et al.*, 1999; Aarsland *et al.*, 2001c; Benoit *et al.*, 2005). En general, tanto en la DEP como en la DCLw, se trata de alucinaciones visuales (Fenelon *et al.*, 2000; Mosimann *et al.*, 2006), y su gravedad es variable, desde alucinaciones menores en que el paciente tiene crítica de las mismas hasta alucinaciones bien estructuradas con pérdida de realidad del paciente (Fenelon *et al.*, 2000; Llebaria *et al.*, 2010). Entre las menores, son muy frecuentes las alucinaciones de “pasaje” en las que el paciente tiene la sensación de estar acompañado por alguien, aunque realmente sabe que está sólo. Las alucinaciones pueden tener un gran impacto en la calidad de vida del paciente cuando están bien estructuradas (escenas complejas, etc) y se pierde la percepción de irrealidad del fenómeno. Las alucinaciones auditivas, cenestésicas (Ergun *et al.*, 2009) u olfatorias (Goetz *et al.*, 2011) aunque pueden ocurrir, son raras en la EP.

Los *delirios* son menos frecuentes que las alucinaciones, aunque también son relativamente frecuentes en la EP (17%) (Aarsland *et al.*, 1999b; Aarsland *et al.*, 2001d), en la DEP (25%-30%) (Aarsland *et al.*, 2001b; Aarsland *et al.*, 2001c; Aarsland *et al.*, 2007) y en la DCLw (57-78%) (Hirono *et al.*, 1999; Aarsland *et al.*, 2001b). En todo caso son más frecuentes que en la EA (Hirono *et al.*, 1999; Aarsland *et al.*, 2001c; Benoit *et al.*, 2005). Los tipos más frecuentes son los delirios paranoides (robo, celos, etc) y los de tipo “phantom boarder” que consisten en la sensación de presencia de personas en el domicilio (Aarsland *et al.*, 2001b).

Las *alteraciones afectivas* ocupan también un lugar importante entre las manifestaciones de la DEP. Tanto el estado de ánimo depresivo como el síndrome de depresión mayor son más frecuentes en los pacientes con DEP que en los afectos de EA (Starkstein *et al.*, 1996). Mientras que la prevalencia de depresión mayor es del 13 % (Aarsland *et al.*, 2001b), la de síntomas depresivos llega a ser del 40%-58 % (Aarsland *et al.*, 2001c). La

ansiedad, que se incluye en el mismo grupo de síntomas y suele acompañar a los síntomas depresivos, se da en el 30%-49 % (Menza *et al.*, 1993).

La *irritabilidad y la agresividad* no tienen un papel muy prominente en la DEP, mientras que su frecuencia es mayor en la DCLw y en la EA (Engelborghs *et al.*, 2005). La irritabilidad se da en menos del 10 % de pacientes con EPND y en el 14 % de los que presentan DEP (Aarsland *et al.*, 2001c). La *apatía*, más típica de la demencia frontotemporal (Hirono *et al.*, 1999) y de la PSP (Aarsland *et al.*, 2001d), se ha descrito en el 23%-54% (Aarsland *et al.*, 2001c; Aarsland *et al.*, 2007) de los pacientes con DEP, en comparación con el 17 % en los pacientes con EPND (Aarsland *et al.*, 2001d).

#### ***9.1.4. Consecuencias***

El impacto de la demencia en la EP es enorme y sus consecuencias sobre diferentes aspectos muy importantes. Resulta intuitivo pensar que el hecho de desarrollar demencia es catastrófico en una enfermedad que de base, ya puede afectar gravemente a las actividades diarias por la afectación motora. De hecho, en algunos estudios se ha asociado el desarrollo de demencia con un deterioro motor más agresivo (Elizan *et al.*, 1986; Graham and Sagar, 1999). En un estudio longitudinal, la caída en la puntuación de la *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS) III en un periodo de dos años fue mayor en los pacientes con DEP (9,7 puntos) que en los pacientes con EPND (5,1 puntos) (Burn *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha encontrado que la demencia es un factor de riesgo para presentar caídas (Wood *et al.*, 2002), complicación también temida en esta enfermedad. En un estudio transversal, los trastornos de la marcha y del equilibrio eran más frecuentes en los pacientes con DEP (93%) que en aquellos sin demencia (43%) (Allan *et al.*, 2005). Todo ello hace que la demencia esté claramente asociada con un empeoramiento en las funciones de la vida diaria (Rosenthal *et al.*, 2010).

El impacto socioeconómico de la DEP es también otra consecuencia de suma importancia. En un estudio retrospectivo se demostró que las estancias hospitalarias de los pacientes con DEP son el doble de largas que las de los pacientes con EPND (Fletcher *et al.*, 2011). Además, la demencia contribuye a que estos pacientes sean institucionalizados en residencias, siendo el mayor predictor de ingreso la presencia de alucinaciones (Aarsland *et al.*, 2000). De hecho, la prevalencia de DEP entre los pacientes ingresados en residencias llega a ser del 77% (Weerkamp *et al.*, 2013). Resulta interesante conocer los datos de un estudio prospectivo que valoró el impacto de la DEP sobre los costes médicos y no médicos derivados de la EP. En él se demostró que los costes de los pacientes con DEP (34.980 €/año) eran 3,3 veces mayores que los de los pacientes con EPND (10.626 €/año) (Vossius *et al.*, 2011).

No hay que olvidar tampoco el impacto que produce la EP sobre los cuidadores, que presentan más síntomas depresivos, cansancio y menos satisfacción con sus vidas. Los predictores más importantes que contribuyen a la carga del cuidador son el deterioro cognitivo, la agitación, los delirios y las conductas motoras inapropiadas (Aarsland *et al.*, 1999a). Finalmente, la DEP se asocia con una mayor mortalidad en los pacientes con EP. En un estudio prospectivo de 90 pacientes con EP y 11 años de seguimiento se demostró que la edad, la presencia de demencia y la depresión eran predictores independientes de mortalidad (Hughes *et al.*, 2004).

## 9.2. Deterioro cognitivo leve en la enfermedad de Parkinson

### 9.2.1. Definición y criterios diagnósticos

El término deterioro cognitivo leve (DCL) fue introducido por primera vez en 1988 por Reisberg y colaboradores (Reisberg *et al.*, 1988) para referirse al estadio 3 de la *Global Deterioration Scale*. Esta escala, que consta de siete estadios, ha sido y sigue siendo ampliamente usada para determinar la gravedad de las demencias degenerativas primarias. En 1999, Petersen y colaboradores redefinieron el concepto e introdujeron los primeros criterios diagnósticos para el DCL, que en esencia, identificaba a sujetos

con un deterioro de memoria mayor del esperado para la edad y el grado de educación, pero sin demencia (Petersen *et al.*, 1999). Este grupo de pacientes ha sido objeto de amplios estudios prospectivos en los que se ha tratado de diferenciar el envejecimiento fisiológico de las fases prodrómicas de la EA y se han evaluado posibles biomarcadores para su diagnóstico (Petersen *et al.*, 2009).

Posteriormente, el concepto de DCL se ha aplicado también a la EP (DCL-EP). Se ha definido este síndrome (análogo al DCL en la EA) para referirse a la fase prodrómica o inicial del proceso de deterioro cognitivo en la EP. Se define como un declive en las funciones cognitivas que no es normal para la edad pero con mantenimiento normal de las funciones de la vida diaria en pacientes con EP de más de un año de evolución de la enfermedad. Hasta hace poco no ha habido consenso en los criterios diagnósticos del DCL-EP, por lo que el uso de diferentes criterios diagnósticos ha tenido como consecuencia que los resultados de numerosos estudios sean difícilmente comparables. Como ejemplo, en una misma cohorte de pacientes con EP y usando dos tipos de criterios diferentes se clasificó como DCL-EP al 14 % o al 89 %, respectivamente (Dalrymple-Alford *et al.*, 2011).

En vista de la falta de homogeneidad y de la importancia de reconocer esta entidad, la MDS reunió en 2012 una *Task Force* para elaborar unos criterios diagnósticos formales para el DCL-EP (Litvan *et al.*, 2011) (Figura 4). La definición del DCL-EP, así establecida se basa en criterios clínicos, cognitivos y funcionales. Se establecieron dos niveles de diagnóstico en función de la exhaustividad de los test neuropsicológicos usados para evaluar la función cognitiva. El *nivel I* (evaluación abreviada) permite hacer el diagnóstico de DCL-EP posible y no aporta tanta certeza diagnóstica como el nivel II. Requiere “disfunción en una escala global de habilidades cognitivas validada para ser usada en EP o en una batería limitada de test neuropsicológicos”. El *nivel II* (evaluación exhaustiva) requiere la realización de una evaluación cognitiva que incluya al menos dos test neuropsicológicos por cada uno de los cinco dominios cognitivos (atención y memoria de trabajo, función ejecutiva, lenguaje, memoria y función visuoespacial). El diagnóstico de DCL-EP se hace cuando se encuentra “disfunción en al menos dos test neuropsicológicos que pueden corresponder a un mismo dominio

cognitivo o a diferentes dominios”. La disfunción se puede poner de manifiesto de tres maneras: a) rendimiento disminuido 1-2 desviaciones estándar por debajo de la norma; b) deterioro significativo demostrado en test seriados o c) deterioro significativo con respecto a niveles pre mórbidos estimados (Litvan *et al.*, 2012). Hay que considerar, que el rango de desviaciones estándar permitido en el nivel II para determinar que un test neuropsicológico este alterado, puede todavía introducir una considerable variación diagnóstica en la sensibilidad con que estos criterios son capaces de detectar el DCL-EP.

PD - MCI DIAGNOSTIC CRITERIA  
**TABLE 1.** Criteria for the Diagnosis of PD-MCI

**I. Inclusion criteria**

- Diagnosis of Parkinson's disease as based on the UK PD Brain Bank Criteria<sup>20</sup>
- Gradual decline, in the context of established PD, in cognitive ability reported by either the patient or informant, *or* observed by the clinician
- Cognitive deficits on either formal neuropsychological testing or a scale of global cognitive abilities (detailed in section III)
- Cognitive deficits are not sufficient to interfere significantly with functional independence, although subtle difficulties on complex functional tasks may be present

**II. Exclusion criteria**

- Diagnosis of PD dementia based on MDS Task Force proposed criteria<sup>18</sup>
- Other primary explanations for cognitive impairment (e.g., delirium, stroke, major depression, metabolic abnormalities, adverse effects of medication, or head trauma)
- Other PD-associated comorbid conditions (e.g., motor impairment or severe anxiety, depression, excessive daytime sleepiness, or psychosis) that, in the opinion of the clinician, significantly influence cognitive testing

**III. Specific guidelines for PD-MCI level I and level II categories**

A. Level I (abbreviated assessment)

- Impairment on a scale of global cognitive abilities validated for use in PD<sup>9</sup> *or*
- Impairment on at least two tests, when a limited battery of neuropsychological tests is performed (i.e., the battery includes less than two tests within each of the five cognitive domains, or less than five cognitive domains are assessed)

B. Level II (comprehensive assessment)

- Neuropsychological testing that includes two tests within each of the five cognitive domains (i.e., attention and working memory, executive, language, memory, and visuospatial)<sup>9</sup>
- Impairment on at least two neuropsychological tests, represented by either two impaired tests in one cognitive domain or one impaired test in two different cognitive domains
- Impairment on neuropsychological tests may be demonstrated by:
  - Performance approximately 1 to 2 SDs below appropriate norms *or*
  - Significant decline demonstrated on serial cognitive testing *or*
  - Significant decline from estimated premorbid levels

**IV. Subtype classification for PD-MCI (optional, requires two tests for each of the five cognitive domains assessed and is strongly suggested for research purposes)<sup>9</sup>**

- PD-MCI single-domain—abnormalities on two tests within a single cognitive domain (specify the domain), with other domains unimpaired *or*
- PD-MCI multiple-domain—abnormalities on at least one test in two or more cognitive domains (specify the domains)

**Figura 4.** Criterios diagnósticos de DCL-EP propuestos por la Movement Disorders Society Task Force (Litvan *et al.*, 2012).

Por ello, el *International Parkinson and Movement Disorders Society PD-MCI Validation Study Group*, ha realizado una validación del valor predictivo de los criterios diagnósticos de nivel II. Así, han demostrado que la disminución del rendimiento por



debajo de -1,5 desviaciones estándar representa un deterioro significativo en relación con el riesgo de desarrollar demencia. Sin embargo, aún se recomienda precaución ya que, como se ha visto previamente, además de la disminución en el rendimiento de los test, el deterioro se puede poner de manifiesto mediante declive en test seriados o respecto del nivel premórbido. Esta flexibilidad es una potencial limitación y se recomiendan más estudios para validar las diferentes formas de aplicar los criterios en diferentes poblaciones (Geurtsen *et al.*, 2014).

EL DCL-EP es un factor de riesgo de demencia, si bien es una entidad muy heterogénea, como se desarrollará posteriormente.

### ***9.2.2. Epidemiología***

La prevalencia del DCL-EP estimada en la revisión sistemática de la literatura que se realizó en la MDS *Task Force* es del 19-38% (media 27%). Hay que tener en cuenta que la variabilidad en la prevalencia puede reflejar, en parte, las diferentes definiciones y criterios diagnósticos que se han manejado de DCL-EP. En varios estudios de cohortes de pacientes con EP de reciente comienzo, previos a la introducción de los criterios de la MDS, la prevalencia de DCL-EP en el momento del diagnóstico era de 19-36% (Foltnie *et al.*, 2004; Muslimovic *et al.*, 2005; Elgh *et al.*, 2009). En un estudio multicéntrico en el que se evaluó una muestra de 1.341 pacientes con EP con una duración media de la enfermedad de 6,1 años se determinó una prevalencia de DCL-EP del 25,8% (I.C. 95%: 23,5% - 28,2%). En este estudio se definió DCL-EP en base a una disminución del rendimiento 1,5 desviaciones estándar por debajo de la media normativa en al menos uno de tres dominios (atención/función ejecutiva, memoria y función visuoespacial) (Aarsland *et al.*, 2010).

### ***9.2.3. Subtipos de deterioro cognitivo leve***

La función ejecutiva es el dominio cognitivo más prominentemente afectado en la EP, tanto en estadios iniciales como en fases avanzadas de la enfermedad (Foltnie *et al.*, 2004a; Goldman *et al.*, 2013; Muslimovic *et al.*, 2005). La función ejecutiva ha sido objeto de numerosos estudios en la EP, dado que esta función se afecta, en parte, por el déficit de modulación dopaminérgica del circuito asociativo de los ganglios basales que tienen los pacientes con EP. No obstante, el DCL-EP es heterogéneo desde el punto de vista neuropsicológico y puede haber afectación de todos los dominios.

Se puede hacer una subclasificación en función de los dominios cognitivos afectados. Anteriormente a los criterios de la MDS, esta subclasificación se hacía fundamentalmente atendiendo a la presencia o no de alteración en la memoria (siguiendo los criterios de Petersen) y se establecía un subtipo amnésico y otro no amnésico. En la actualidad, según los criterios de la MDS, se recomienda que la clasificación se haga atendiendo al número y al tipo de dominios afectados (dominio único o multidominio y qué dominios están alterados) (Litvan *et al.*, 2012). Los estudios en los que se han empleado los criterios de la MDS han demostrado que la mayoría de los pacientes con DCL-EP son del subtipo multidominio (más del 90% en cohortes prevalentes (Goldman *et al.*, 2013; Marras *et al.*, 2013) y 65% en una cohorte incidente (Broeders *et al.*, 2013a)). Sin embargo, en la mayoría de estudios previos sobre deterioro cognitivo en pacientes con EPND, el tipo más frecuente era el no amnésico de un único dominio (Aarsland *et al.*, 2009; Caviness *et al.*, 2007; Foltnie *et al.*, 2004a; Goldman *et al.*, 2012b; Litvan *et al.*, 2011), posiblemente debido al tipo de examen neuropsicológico realizado y los criterios usados. En un estudio reciente que ha evaluado a 219 pacientes con EP se ha encontrado que el dominio más frecuentemente afectado (1,5 desviaciones estándar por debajo de la norma) es la memoria (15,1%), seguido de función visuoespacial (13,2%), atención y memoria de trabajo (12,3%) y la función ejecutiva (11%). El lenguaje sólo se encontró afectado en el 5% de pacientes, incluso tomando como disfunción 1 desviación estándar por debajo de la norma (Yarnall *et al.*, 2014).

#### 9.2.4. Evolución del deterioro cognitivo leve

El DCL-EP se ha asociado con el desarrollo de DEP (Litvan *et al.*, 2011). En estudios longitudinales se ha identificado el DCL-EP como un factor de riesgo de desarrollo de demencia, con una tasa de conversión a DEP a los 4 años del 62% de los pacientes con DCL-EP en comparación con el 20 % de los cognitivamente normales en la EP avanzada (Janvin *et al.*, 2006). En otro estudio longitudinal en pacientes con EP avanzada el 42,3 % de los pacientes con DCL-EP desarrolló DEP a los 31 meses de seguimiento (Gasca-Salas *et al.*, 2014). En pacientes con EP de reciente diagnóstico se han descrito tasas de conversión de DCL-EP a DEP del 26 % a los 5 años (Broeders *et al.*, 2013b) o del 27 % a los 3 años (Pedersen *et al.*, 2013). Sin embargo, no se sabe si todos los subtipos de DCL-EP tienen la misma tasa de evolución a DEP o si los diferentes subtipos de DCL-EP tienen pronósticos diferentes.

Aunque hasta hace poco la disfunción ejecutiva se ha descrito como predictor del desarrollo de demencia (Mahieux *et al.*, 1998; Levy *et al.*, 2002; Janvin *et al.*, 2005), hoy en día existen varias líneas de evidencia que apuntan en otra dirección. El estudio de la cohorte *CamPaIGN* con un amplio seguimiento, ha determinado que los predictores basales más importantes de desarrollo de demencia a los 10 años son el deterioro en la fluencia semántica y la copia de los pentágonos. Las tareas que reflejan función ejecutiva, como la fluencia fonémica u otras no se asociaron con conversión a demencia. De hecho, no se observó durante este periodo deterioro en la función ejecutiva (Williams-Gray *et al.*, 2007; Williams-Gray *et al.*, 2009; Williams-Gray *et al.*, 2013). En otro estudio que valoró la utilidad de la escala *Cognitive Rating Scale*, se pudo ver que la progresión de DCL-EP a DEP requería la adición de déficits en funciones corticales visuoespaciales al síndrome disejecutivo de base (Pagonabarraga *et al.*, 2008). En un meta-análisis que incluía 901 pacientes con EPND con un seguimiento medio de 29 meses, se describió durante este tiempo deterioro en la función cognitiva global, función visuoespacial y memoria, pero no en la función ejecutiva (Muslimovic *et al.*, 2007).

### 9.3. Fisiopatología del deterioro cognitivo y la demencia en la enfermedad de Parkinson

#### 9.3.1. Déficit dopaminérgico

Con la evolución de la enfermedad, hay una depleción dopaminérgica creciente hacia el putamen anterior y en el caudado (Hilker *et al.*, 2005a; Bohnen *et al.*, 2006a), que se ha relacionado con un mayor deterioro cognitivo en función ejecutiva (Nagano-Saito *et al.*, 2008). Además, algunas tareas asociadas a regiones frontales, tales como la fluencia verbal o la capacidad de atención, se han relacionado con el estado dopaminérgico (Kulisevsky *et al.*, 1996). En este sentido, varios estudios de PET con [<sup>18</sup>F]-dopa, que es un marcador de la funcionalidad de los terminales dopaminérgicos presinápticos del sistema nigroestriado, han encontrado asociación entre disfunción en las tareas ejecutivas y reducción de la captación de este radioligando en el caudado (Marie *et al.*, 1999; Bruck *et al.*, 2001). Además, muchos aspectos de la función ejecutiva mejoran con el tratamiento dopaminérgico (Cooper *et al.*, 1992; Lange *et al.*, 1992). Sin embargo, el tratamiento dopaminérgico puede producir un efecto negativo en otros aspectos, como el aprendizaje asociativo, probablemente por una “sobredosificación” en el estriado ventral, que se encontraría menos denervado, dando lugar a una disfunción en el subcircuito frontoestriatal (orbitofrontal, cíngulo anterior y circuito inferotemporal) (Kulisevsky, 2000). Además, en los pacientes con DEP existe una mayor denervación dopaminérgica en el caudado, estriado ventral y cíngulo anterior que en los pacientes con EP sin alteraciones cognitivas (Ito *et al.*, 2002; Bosboom *et al.*, 2004; Jokinen *et al.*, 2009) por lo que no sólo el sistema dopaminérgico nigroestriatal, sino también el mesolímbico y mesocortical parecen tener un papel en los déficits cognitivos de la DEP (Figura 5). Sin embargo, en relación al sistema dopaminérgico mesocortical, existen datos contradictorios, ya que mediante PET con [<sup>11</sup>C]-raclopride (antagonista de receptores dopaminérgicos D2 en el estriado) pacientes con EPND no mostraron alteraciones (Sawamoto *et al.*, 2008), mientras que en estudios con PET con [<sup>18</sup>F]-dopa mostraban reducción de la captación de este radiofármaco en dicho sistema (Scatton *et al.*, 1983; Nagano-Saito *et al.*, 2004). Más recientemente, con PET de [<sup>11</sup>C]-dihidrotetrabenazina y PET de [<sup>11</sup>C]-FLB 457, que evalúa los receptores D2

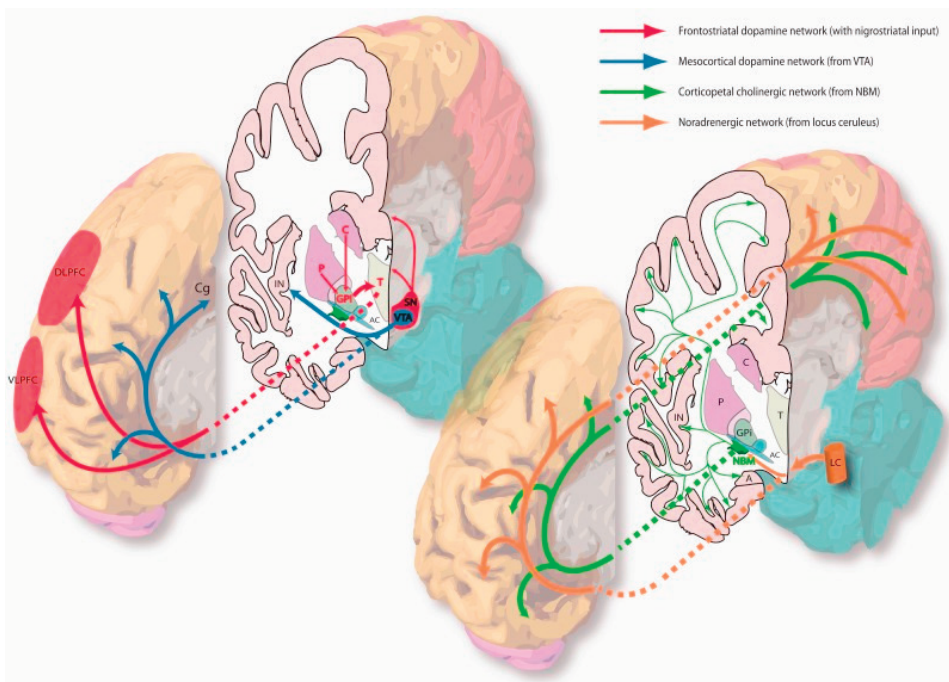
corticales (pero no estriatales) se encontró una severa depleción en el estriado ventral y en la ínsula en los pacientes con DCL-EP. Además, los pacientes con DCL-EP de tipo amnésico presentaban una mayor alteración del receptor D2 en corteza insular, cíngulo anterior y la circunvolución parahipocámpica derecha en comparación con los pacientes con DCL-EP no amnésico y los controles sanos (Christopher *et al.*, 2014).

Es probable que tanto la depleción dopaminérgica nigroestriatal como la mesocortical contribuyan a las alteraciones de la función ejecutiva en la EP, mientras que el déficit de memoria parece relacionarse con la disfunción dopaminérgica en corteza insular, cíngulo anterior y circunvolución parahipocámpica derecha.

### ***9.3.2. Déficit colinérgico***

Los pacientes con EP presentan alteraciones importantes en el sistema colinérgico (Bohnen *et al.*, 2011). De hecho, existe pérdida de neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert (Nakano and Hirano, 1984; Tagliavini *et al.*, 1984). Los estudios in vivo mediante PET de [<sup>11</sup>C]-metil-pirperidilpropionato de acetil colinesterasa han demostrado que los déficits colinérgicos aparecen precozmente en la EP (Shimada *et al.*, 2009), con una reducción más marcada en la demencia (Hilker *et al.*, 2005b), donde se encuentra un déficit mayor que en la EA (Bohnen *et al.*, 2003). Más recientemente, un estudio ha demostrado que la intensidad de la denervación colinérgica en la corteza es mayor cuanto mayor es el déficit cognitivo, sugiriendo un papel importante de este neurotransmisor en el desarrollo de la DEP (Bohnen *et al.*, 2015). La denervación colinérgica se ha relacionado también con las alucinaciones (Bosboom *et al.*, 2003) y con la depresión y la apatía (Bohnen *et al.*, 2007), sugiriendo que el deterioro cognitivo y estas manifestaciones pueden tener un solapamiento fisiopatológico. Además, el grado de hiposmia se ha correlacionado también con el déficit de acetilcolina en el hipocampo y neocórtex (Bohnen *et al.*, 2010). Además, se encontró que la hiposmia tenía una asociación selectiva con el déficit de memoria episódica. Por ello, se sugirió que una mayor alteración en la identificación de olores podría servir para diferenciar los pacientes con mayor riesgo de deterioro cognitivo

clínicamente significativo. Los fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa, que aumentan la transmisión colinérgica, han demostrado tener eficacia en algunos aspectos de la DEP (Aarsland *et al.*, 2004b; Poewe *et al.*, 2006; Emre, 2007), mejorando principalmente la atención y la función ejecutiva y también las alucinaciones (Figiel and Sadowsky, 2008). Además, en estudios con PET de [<sup>18</sup>F]-fluorodesoxiglucosa se ha demostrado que el tratamiento con estos fármacos aumenta el metabolismo cerebral en lóbulos frontales y cíngulo anterior bilateral (Ceravolo *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008).



**Figura 5.** Principales redes subcorticales afectadas en la DEP (de acuerdo con sus principales neurotransmisores). A = amígdala; AC = anterior commissure (lateral aspect); C = caudate; Cg = cingulate gyrus; DLPFC = dorsolateral prefrontal cortex; GPi = globo pallidus (internus); IN = insular cortex; LC = locus ceruleus; P = putamen; SN = substantia nigra; T = thalamus; VLPFC = ventrolateral prefrontal cortex; VTA = ventral tegmental area.(Gratwicke *et al.*, 2015).

### ***9.3.3. Déficit noradrenérgico***

En los cerebros de pacientes con DEP existe degeneración extensa de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus (Zweig *et al.*, 1993; Del Tredici and Braak, 2013), lo que disminuye las concentraciones de noradrenalina a nivel cortical (Fornai *et al.*, 2007). Aunque la implicación de este déficit en el deterioro cognitivo no está aclarada, la noradrenalina está implicada en los trastornos del ánimo y la conducta y en la atención (Benarroch, 2009). De hecho, el déficit de dopamina y noradrenalina en el estriado ventral, se ha asociado además de a depresión y apatía a alteraciones en la atención (Weintraub *et al.*, 2005; Rektorova *et al.*, 2008). Además, el tratamiento con un inhibidor de la recaptación de noradrenalina mejora la función ejecutiva en pacientes con EP (Marsh *et al.*, 2009).

### ***9.3.4. Déficit serotoninérgico***

El déficit serotoninérgico se produce como consecuencia de la pérdida neuronal en los núcleos del rafe. Este hecho se conoce ya desde los estudios anatomopatológicos clásicos (Bernheimer *et al.*, 1961; Fahn *et al.*, 1971). Más recientemente, estudios con radioligandos que se unen al transportador de serotonina han puesto de manifiesto un déficit serotoninérgico en globo pálido, estriado y corteza además de pérdida neuronal en los núcleos del rafe en pacientes con EP (Kerenyi *et al.*, 2003; Guttman *et al.*, 2007). Este déficit se ha relacionado con la depresión en la EP (Frisina *et al.*, 2008; Politis *et al.*, 2011), y algunos estudios sugieren que puede estar implicado en la presencia de alucinaciones visuales (Ballanger *et al.*, 2010; Huot *et al.*, 2011). No se ha estudiado si este déficit se asocia a deterioro cognitivo en la EP. Sin embargo, en tejido post mortem de pacientes con DEP existe un aumento en el recambio cortical de serotonina (Perry *et al.*, 1991) y en los receptores serotoninérgicos 2A (Cheng *et al.*, 1991), lo cual sugiere una reducción en la inervación serotoninérgica en estos pacientes.

### 9.4. Anatomía patológica de la demencia y el deterioro cognitivo leve en la enfermedad de Parkinson

La base neuropatológica de la DEP no está del todo clara y sigue siendo ampliamente discutida y revisada. Todo hace pensar que los cambios neuropatológicos que acontecen son de naturaleza heterogénea e incluyen CL corticales, patología tipo Alzheimer y patología cerebrovascular (Hurtig *et al.*, 2000; Jellinger, 2006; Sabbagh *et al.*, 2009; Adler *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2010; Irwin *et al.*, 2012). Según la evidencia disponible hasta el momento, los CL y NL corticales son el factor que presenta una correlación más fuerte con la DEP. La gravedad del deterioro cognitivo se ha correlacionado con la presencia de CL en el córtex (Hurtig *et al.*, 2000), especialmente a nivel frontal y del cíngulo (Mattila *et al.*, 2000; Apaydin *et al.*, 2002; Irwin *et al.*, 2012).

La coexistencia de patología tipo Alzheimer con la patología de tipo Lewy en pacientes con DEP es variable, con algunos estudios que encuentran una alta prevalencia (Hurtig *et al.*, 2000; Mattila *et al.*, 2000; Sabbagh *et al.*, 2009; Irwin *et al.*, 2012) y otros en los que es menor (Apaydin *et al.*, 2002; Hely *et al.*, 2008). Sin embargo, parece que puede tener un papel en la DEP ya que se ha encontrado correlación entre los ovillos neurofibrilares y la demencia en pacientes con EP (Hurtig *et al.*, 2000; Irwin *et al.*, 2012). Además, existe correlación entre la presencia de patología tipo Lewy neocortical y las placas amiloides y ovillos neurofibrilares (Apaydin *et al.*, 2002). A este respecto, un estudio que cuantificó ambas patologías a nivel cortical concluyó que es la combinación de ambas la que se correlaciona de forma más robusta con la DEP (Compta *et al.*, 2011b).

El papel de otros cambios patológicos en la DEP no está del todo claro. Hay que tener en cuenta que, en la mayoría de estudios patológicos, la edad de los sujetos estudiados muy frecuentemente es superior a los 75 años, por lo que la presencia de hallazgos casuales a nivel patológico es muy alta, y resulta complicado controlar estas variables. La *patología vascular*, en concreto la carga lesional en la sustancia blanca, se ha correlacionado con la DEP (Choi *et al.*, 2010). Sin embargo, en otros estudios se describe una prevalencia baja de patología vascular en los pacientes con DEP (Apaydin



*et al.*, 2002; Halliday *et al.*, 2008; Hely *et al.*, 2008; Rodriguez-Oroz *et al.*, 2009b; Gonzalez-Redondo *et al.*, 2012). La *angiopatía amiloide* cerebral también se asocia con la DEP (Irwin *et al.*, 2012) y se ha observado que se correlaciona positivamente con la patología tipo Lewy (Ghebremedhin *et al.*, 2010). En un estudio se ha encontrado que la angiopatía cerebral amiloide es más frecuente en pacientes con EP y patología tipo Alzheimer concurrente que en aquellos sin esta (Bertrand *et al.*, 2008). Por último, la *esclerosis del hipocampo* (pérdida de neuronas y gliosis en la región CA1 del hipocampo y en el subiculum) que se puede encontrar hasta en un 10 % de pacientes con EA (Beach *et al.*, 2012), se ha observado en 1 de 17 pacientes con DEP (Hely *et al.*, 2008) y en 7 de 131 (5.3 %) (Malek-Ahmadi *et al.*, 2013). En otro estudio no se observó correlación entre esclerosis del hipocampo y DEP (Irwin *et al.*, 2012).

Los estudios neuropatológicos de pacientes con DCL-EP son escasos, pero los datos disponibles apuntan a un sustrato patológico similar al de la DEP. En un estudio de 4 casos con EP con deterioro cognitivo pero sin demencia 3 mostraban CL neocorticales (Aarsland *et al.*, 2005a). En otro estudio en el que evaluaron 8 pacientes con DCL-EP mediante el sistema de estadiaje unificado de la patología por CL de Beach (Beach *et al.*, 2009), 3 tenían CL de predominio en el tronco del encéfalo (estadio 2a), 3 en el tronco del encéfalo-sistema límbico (estadio 3), y 2 en la corteza (estadio 4). La mitad de ellos tenían placas seniles en cantidad pequeña y 2 cumplían los criterios NIA-Reagan de EA (estos dos presentaban DCL amnésico) (Adler *et al.*, 2010). En otro estudio que usó este mismo sistema de estadiaje para evaluar 8 pacientes con DCL-EP, 2 tenían un estadio 2a, 5 tenían un estadio 3 y 1 tenía un estadio 4, mientras que la patología tipo Alzheimer fue muy heterogénea (Jellinger, 2010). En ambos estudios se encontraron cantidades variables de angiopatía cerebral amiloide (Adler *et al.*, 2010; Jellinger, 2010).

### 10. Biomarcadores

#### 10.1. Antecedentes y definición

El término biomarcador se refiere en última instancia a una subcategoría de signos médicos, es decir, indicadores objetivos del estado médico observados desde fuera del paciente que pueden ser medidos de forma precisa y reproducible. A lo largo de la historia de la Medicina, los médicos se han esforzado enormemente en encontrar parámetros cuantificables que fueran reflejo del estado de salud o enfermedad de sus pacientes. Por ejemplo, en el siglo XVII, era práctica habitual probar la orina de los pacientes para ver si era dulce y tratar de establecer así el diagnóstico de diabetes.

Biomarcador ha sido definido por el *National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group* como “una característica que es medida y evaluada de forma objetiva como un indicador de procesos biológicos normales o patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (Biomarkers Definitions Working, 2001). La *World Health Organization* por su parte lo ha definido como “cualquier sustancia, estructura o proceso que puede ser medido en el cuerpo o sus productos y que influye o predice la incidencia o el pronóstico de una enfermedad” (WHO International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in Risk assessment: Validity and Validation. 2001. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>).

Los biomarcadores pueden servir como herramienta diagnóstica, para monitorización de la gravedad de enfermedades, como indicadores del pronóstico o para predecir y monitorizar la respuesta a intervenciones. En general, los biomarcadores implican medidas en muestras biológicas (plasma, suero, orina, LCR, biopsias, etc.) o medidas en pruebas de imagen que, en el caso de las enfermedades neurológicas, son cerebrales (resonancia magnética, PET, SPECT entre otras).

La identificación de biomarcadores requiere determinar su relevancia y su validez. La relevancia se refiere a la capacidad de aportar información clínicamente relevante en el ámbito que se quieran usar. La validez se refiere a la necesidad de caracterizar la

efectividad del biomarcador o su utilidad como medida indirecta de un estado clínico. Existen varios niveles a la hora de evaluar la validez de un biomarcador:

- ¿Se puede medir de forma objetiva y reproducible en un caso y es capaz de medir una característica objetiva y cuantificable?
- Validez interna: Dentro de un mismo estudio, ¿existe una correlación robusta con la variable clínico a medir?
- Validez externa: ¿Tiene ese biomarcador un valor predictivo similar en otras poblaciones o estudios?

Un biomarcador ideal tiene que ser sensible, reproducible, barato, no invasivo y estar rigurosamente validado (Strimbu and Tavel, 2010).

## 10.2. Biomarcadores de enfermedad de Parkinson

El diagnóstico de la EP, como se ha visto, se basa en criterios clínicos. Debido a que algunas de las manifestaciones clínicas de la EP son similares a los de otras enfermedades, los diagnósticos erróneos son frecuentes. De hecho, la precisión diagnóstica es de alrededor del 75% para los neurólogos generales y algo mayor al 90% para los expertos en trastornos del movimiento (Hughes *et al.*, 2002). La precisión en el diagnóstico varía en función del tiempo de evolución de las manifestaciones, de la edad del paciente y de la experiencia del médico. Los errores en el diagnóstico se pueden deber a un fallo en el reconocimiento de otras patologías neurodegenerativas que cursan con parkinsonismo, principalmente PSP, AMS y degeneración corticobasal, o del parkinsonismo vascular. Por otro lado, otras entidades que cursan con temblor pueden etiquetarse erróneamente como EP, fundamentalmente el temblor esencial, el temblor distónico u otros tipos de temblor (Berg *et al.*, 2015). Las pruebas de imagen basadas en radioligandos, como el PET con [<sup>18</sup>F]-dopa o el SPECT con *N*-(3-fluoropropil)-2β-carbometoxi-3β-(4-iodofenil) (<sup>123</sup>I-FP-CIT), entre otras, son capaces de evaluar el estado de los terminales dopaminérgicos. La sensibilidad de estas pruebas para diferenciar la EP probable de sujetos normales o pacientes con temblor esencial ronda

el 90%. Por tanto, su positividad apoya el diagnóstico de EP cuando hay dudas. Sin embargo, está menos claro si su negatividad puede excluir el diagnóstico (Brooks, 2004). Por otra parte, estas pruebas no permiten distinguir la EP de los otros parkinsonismos neurodegenerativos. Por ello, la búsqueda de biomarcadores que asistan en el diagnóstico de la EP sigue siendo una necesidad crucial.

Por otro lado, en el momento del diagnóstico hay una reducción del 30 % de las neuronas de la SN y una reducción de entre el 50% y 60% de los terminales dopaminérgicos estriatales. (Cheng *et al.*, 2010). Por tanto, aunque en la actualidad no existe ningún tratamiento neuroprotector, sería crucial poder detectar la enfermedad en sus fases más iniciales por muchos motivos. Es intuitivo pensar que cuanto antes se inicie un potencial tratamiento neuroprotector, y antes se pare el proceso de neurodegeneración, más beneficio aportará. Por tanto, el desarrollo de terapias modificadoras del curso de la enfermedad ha de ser paralelo al descubrimiento de biomarcadores de diagnóstico temprano de la misma. Finalmente, si disponemos de biomarcadores de diagnóstico precoz, el seguimiento desde fases premotoras o incluso presintomáticas de los pacientes aportaría información muy valiosa en el conocimiento de la patogenia y de la evolución de la enfermedad en fases que hoy en día apenas se conocen.

La búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico cierto de EP se ha basado en diversas aproximaciones basadas en el estudio de muestras biológicas (plasma, orina, LCR), biopsias (piel, glándula salival) y pruebas de imagen (PET, SPECT, RM).

### ***10.2.1. Biomarcadores en líquido cefalorraquídeo***

El LCR es una fuente atractiva de posibles biomarcadores, dado que es el fluido biológico que tiene un mayor contacto con el SNC. Aunque se han estudiado múltiples moléculas, la aproximación más utilizada en EP ha sido la de determinar las proteínas que forman parte de los cambios patológicos de la EP. Como se ha visto, además de la patología tipo Lewy, en estudios post mortem, se observa que la patología tipo

Alzheimer es frecuente en la EP (32%-44%), especialmente en pacientes con demencia (Mattila *et al.*, 1998; Galvin *et al.*, 2006; Sabbagh *et al.*, 2009). La patología tipo Alzheimer consiste en el depósito extracelular de  $\beta$ - amiloide ( $\beta$ A) en placas amiloides y la acumulación intracelular de proteína tau en ovillos neurofibrilares. Por ello, además de la  $\alpha$ -sinucleína, se han estudiado el  $\beta$ A y las especies de tau en LCR. Los resultados respecto a  $\alpha$ -sinucleína son bastante contradictorios. Numerosos estudios no han encontrado diferencias entre pacientes y controles (Tokuda *et al.*, 2010; Foulds *et al.*, 2012; Herbert *et al.*, 2014; Nielsen *et al.*, 2014; Trupp *et al.*, 2014), mientras que en muchos otros se ha observado una disminución en los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en pacientes (Hall *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2013; Toledo *et al.*, 2013; Wennstrom *et al.*, 2013; Mondello *et al.*, 2014; Parnetti *et al.*, 2014b).

La medición de la forma oligomérica de  $\alpha$ -sinucleína ha cobrado especial interés y sus niveles se han encontrado aumentados en pacientes (Tokuda *et al.*, 2010). Pero lo más interesante es que calculando el índice  $\alpha$ -sinucleína oligomérica/ $\alpha$ -sinucleína total se diferenciaba a pacientes de controles con una sensibilidad del 89,3% y una especificidad del 90,6% con una área bajo la curva de 0,948 (Tokuda *et al.*, 2010). Tanto tau total (T-Tau) como tau fosforilada (P-Tau) muestran también resultados muy contradictorios, con estudios que han encontrado sus niveles elevados (Mollenhauer *et al.*, 2006; Compta *et al.*, 2009; Prikrylova Vranova *et al.*, 2010; Toledo *et al.*, 2013), disminuidos (Montine *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2013; Stav *et al.*, 2015) o sin diferencias (Jansen Steur *et al.*, 1998; Sjogren *et al.*, 2000; Parnetti *et al.*, 2008; Compta *et al.*, 2009; Sussmuth *et al.*, 2010; Wennstrom *et al.*, 2013; Vranova *et al.*, 2014). Quizás los resultados más consistentes son los relativos a la fracción 1-42 del  $\beta$ A, con un predominio de estudios que muestran una disminución de sus niveles (Mollenhauer *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2010; Montine *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2013; Toledo *et al.*, 2013), aunque también hay trabajos que no muestran diferencias (Kanemaru *et al.*, 2000; Sjogren *et al.*, 2000; Vranova *et al.*, 2014). Dos enzimas relacionadas con el aclaramiento de  $\alpha$ -sinucleína, la neurosina (Wennstrom *et al.*, 2013) y la ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa (Mondello *et al.*, 2014) se han encontrado disminuidas en pacientes comparados con controles. La transtiretina es una proteína transportadora de tiroxina y

retinol, y también está implicada en la eliminación de las especies tóxicas de  $\beta$ A (Fleming *et al.*, 2009). Curiosamente, sus niveles se han encontrado elevados en pacientes (Maarouf *et al.*, 2012a).

Las proteínas implicadas en supervivencia celular así como algunos factores de crecimiento también han sido objeto de estudio. La clusterina, una apolipoproteína que está implicada, entre otras funciones, en la supervivencia celular y en la protección frente al estrés del citosol, (Prikrylova Vranova *et al.*, 2010) se ha encontrado aumentada en pacientes con respecto a controles (Prikrylova Vranova *et al.*, 2010; Maarouf *et al.*, 2012b). ApoE, otra apolipoproteína, se ha encontrado aumentada (Maarouf *et al.*, 2012b), disminuida (Zhang *et al.*, 2008) o sin cambios (Alves *et al.*, 2010). El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF: *Brain derived neurotrophic factor*) tiene un papel importante en la plasticidad sináptica, y sus niveles se han encontrado aumentados en pacientes comparados con controles. Este factor neurotrófico, combinado con otros 8 biomarcadores (T-Tau, IL-8,  $\beta$ A1-42,  $\beta$ 2-microglobulina, proteína de unión a vitamina D, apoAII y apoE), clasificó bien al 95% de 38 pacientes con EP frente a controles (Zhang *et al.*, 2008).

Dada la implicación de la inflamación en la patogenia de la EP, se han estudiado diversas proteínas relacionadas con la misma. Así, se ha encontrado elevación en los niveles de IL-8 (Yu *et al.*, 2014), de IL-6 y de IL-1 $\beta$  (Blum-Degen *et al.*, 1995; Mogi *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1998; Dobbs *et al.*, 1999; Scalzo *et al.*, 2010) en pacientes. Los niveles de TNF- $\alpha$  se han encontrado elevados (Mogi *et al.*, 1994b) o sin cambios (Lindqvist *et al.*, 2013).

La implicación del estrés oxidativo en la EP también ha guiado algunos trabajos. La proteína DJ-1, cuyas mutaciones producen EP con herencia autosómica recesiva, regula factores de transcripción que ponen en marcha mecanismos de defensa antioxidantes (Saito, 2014). Los niveles de esta proteína se han encontrado disminuidos (Hong *et al.*, 2010) o aumentados (Waragai *et al.*, 2006; Herbert *et al.*, 2014). También se ha encontrado una reducción en los niveles de glutatión oxidado (Lewitt *et al.*, 2013) y un aumento de glutatión S-transferasa Pi (Maarouf *et al.*, 2012a). Los

niveles de 8-hidroxiguanosina, un marcador de daño oxidativo del RNA, se han encontrado elevados (Kikuchi *et al.*, 2002; Abe *et al.*, 2003).

Finalmente, guiados por las alteraciones en la autofagia encontradas en estudios post mortem e in vitro, algunos estudios han evaluado la actividad de diversos enzimas lisosomales en LCR de pacientes con EP. Así, se ha encontrado que la actividad de la catepsina E (van Dijk *et al.*, 2013), la  $\beta$ -galactosidasa (van Dijk *et al.*, 2013) y la  $\beta$ -hexosaminidasa (Parnetti *et al.*, 2014) estaban elevadas, mientras que la de la  $\alpha$ -fucosidasa (van Dijk *et al.*, 2013), la  $\alpha$ - y  $\beta$ -mannosidasa (Balducci *et al.*, 2007) y la glucocerebrosidasa (Balducci *et al.*, 2007; Parnetti *et al.*, 2014) estaban reducidas.

### ***10.2.2. Biomarcadores en sangre***

La sangre como fuente de biomarcadores es ideal en cuanto a su accesibilidad y coste. Sin embargo, presenta una serie de desventajas, como la falta de una conexión directa entre sangre y SNC o la heterogeneidad de su composición, en la que intervienen células, proteínas, lípidos y multitud de productos metabólicos.

Dada la importancia de la  $\alpha$ -sinucleína en la patogenia de la EP, ha habido estudios que han evaluado su presencia en plasma como biomarcador. Se ha conseguido detectar en sus diferentes formas: total, oligomérica y fosforilada. Sin embargo, los resultados son muy poco consistentes. Un estudio preliminar en el que se detectaron niveles elevados de  $\alpha$ -sinucleína oligomérica en pacientes con respecto a controles (El-Agnaf *et al.*, 2006) no pudo ser replicado por el mismo grupo (Foulds *et al.*, 2011). Otros estudios han encontrado niveles disminuidos de  $\alpha$ -sinucleína total (Li *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2013; Mollenhauer *et al.*, 2013), elevados (Lee *et al.*, 2006) o sin diferencias (Shi *et al.*, 2010). Varios aspectos metodológicos pueden influir estos resultados, entre ellos el alto contenido de  $\alpha$ -sinucleína en los glóbulos rojos.

DJ-1 también se ha sugerido como posible biomarcador. Pero al igual que ocurre con la  $\alpha$ -sinucleína, sus niveles en sangre pueden estar influenciados por otras variables. Shi y colaboradores demostraron que la hemólisis, la contaminación con plaquetas y la edad

inflúan los niveles plasmáticos de DJ-1. De hecho, más del 95% de los niveles de DJ-1 y  $\alpha$ -sinucleína provenían de los glóbulos rojos. Controlando por esas variables no se encontraron diferencias entre pacientes y controles (Shi *et al.*, 2010). Posteriormente se evaluaron los niveles totales de DJ-1 y de diversas isoformas utilizando electroforesis en gel de dos dimensiones, *immunoblotting* y espectroscopía de masas. Con esta técnica tampoco se encontraron niveles diferentes de DJ-1, pero se encontró que fracciones específicas de una isoforma eran diferentes en pacientes que en controles (Lin *et al.*, 2012).

En relación a la inflamación varias citoquinas como IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  o interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Dobbs *et al.*, 1999; Brodacki *et al.*, 2008; Scalzo *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2014) se han encontrado elevadas en plasma de pacientes, si bien la IL-6 también se ha encontrado disminuida (Dursun *et al.*, 2015).

Mediante aproximaciones sin candidatos elegidos de antemano se han encontrado otras proteínas con potencial como biomarcador. En un estudio que evaluó 96 proteínas plasmáticas mediante multiplex, ApoA1 se asoció de forma inversa con el riesgo de EP en dos cohortes independientes, y además se asoció con la gravedad de la enfermedad (Qiang *et al.*, 2013). De acuerdo con esto, se ha demostrado que los niveles plasmáticos de APOA1 presentan una correlación negativa con el déficit dopaminérgico. Y esto tiene implicaciones terapéuticas inmediatas, ya que los niveles de APOA1 son modificables. De hecho, dos estudios de cohortes han demostrado que el uso de estatinas que elevan los niveles de APOA1, disminuyen el riesgo de EP (Gao *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013).

### ***10.2.3. Neuroimagen***

De las diferentes técnicas de imagen disponibles, son las pruebas de imagen funcional con radiotrazadores (PET o SPECT) las que han mostrado un mayor rendimiento en el diagnóstico de la EP. Como se ha expuesto, las pruebas de imagen funcional con



radioligandos que evalúan el estado del sistema dopaminérgico tienen utilidad en el diagnóstico diferencial de la EP (Brooks, 2004).

Por otro lado, la evidencia relativa a la resonancia magnética (RM), sugiere que no es un método útil para el diagnóstico precoz de la EP. La evaluación estructural de la sustancia gris cortical o de estructuras subcorticales (mediante secuencias T1) (Feldmann *et al.*, 2008; Biundo *et al.*, 2011; Cerasa *et al.*, 2011; Jubault *et al.*, 2011; Tinaz *et al.*, 2011; Tessitore *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2015) así como la volumetría (Hutchinson *et al.*, 2003; Minati *et al.*, 2007; Menke *et al.*, 2009; Peran *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2011; Kwon *et al.*, 2012) u otras técnicas (relaxometría, secuencias ponderadas en susceptibilidad, tensor de difusión) (Baudrexel *et al.*, 2010; Peran *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2011; Lotfipour *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Zhan *et al.*, 2012) para detectar cambios en la SN presentan resultados muy variables y son en general técnicas muy poco sensibles y específicas para el diagnóstico de la EP. La RM funcional, aunque ha mostrado resultados prometedores al detectar cambios precoces en la conectividad funcional entre diversas áreas (Long *et al.*, 2012; Skidmore *et al.*, 2013) tampoco tiene utilidad en el diagnóstico de la EP.

### **10.3. Biomarcadores de deterioro cognitivo leve y demencia**

En los últimos años, los trabajos dedicados al estudio de biomarcadores de deterioro cognitivo o demencia en la EP han crecido considerablemente. Pero, ¿tiene sentido disponer de un biomarcador de deterioro cognitivo en la EP? Como se ha expuesto anteriormente, el DCL-EP se ha establecido sin lugar a dudas como un factor de riesgo del desarrollo de demencia, sin embargo no se conoce qué pacientes con DCL-EP tienen más riesgo de desarrollar DEP. Una consecuencia práctica inicial de poder identificar a los sujetos en riesgo de presentar DCL-EP y DEP sería la capacidad del médico para evaluar de forma individualizada el pronóstico de cada paciente y poder hacer un manejo terapéutico optimizado (Weintraub *et al.*, 2004).

Por otro lado, con el objetivo de instaurar potenciales terapias neuroprotectoras o tratamientos preventivos, tendría sentido aplicárselas sólo a aquellos pacientes que estén en riesgo de desarrollar deterioro cognitivo en las fases más precoces del mismo, antes de que el proceso adquiriera un carácter irreversible. La identificación de sujetos con DCL-EP se hace hasta ahora mediante criterios diagnósticos, que están basados en datos clínicos, con las limitaciones que ya se han puesto de manifiesto. El contar con una herramienta diagnóstica de apoyo facilitaría enormemente la inclusión de estos pacientes en ensayos clínicos o estudios prospectivos. Por último, el estudio de marcadores moleculares o de imagen podría contribuir a entender la fisiopatología del proceso de deterioro cognitivo (Shi *et al.*, 2010).

Los tipos de abordaje que se han usado en la búsqueda de biomarcadores de DEP o DCL-EP son superponibles a los que se han visto para el diagnóstico de la EP. Aunque se proporciona a continuación un breve resumen de los hallazgos principales, en el **Artículo I** (Anexo) se realiza una revisión detallada.

### ***10.3.1. Biomarcadores en líquido cefalorraquídeo***

Como se ha visto, el DCL-EP y la DEP se asocian con la presencia de patología tipo Lewy y tipo Alzheimer en diferentes áreas, principalmente corticales (Hurtig *et al.*, 2000; Mattila *et al.*, 2000; Apaydin *et al.*, 2002; Jellinger, 2006; Sabbagh *et al.*, 2009; Adler *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2010; Irwin *et al.*, 2012). Por ello, muchos de los estudios que han tratado de evaluar biomarcadores de DCL-EP o DEP han estudiado las proteínas implicadas en los agregados patológicos:  $\beta$ A, T-Tau, P-Tau y  $\alpha$ -sinucleína.

En la mayoría de estudios, el  $\beta$ A se encuentra disminuido en pacientes con DEP comparados con controles (Mollenhauer *et al.*, 2006; Maetzler *et al.*, 2009; Montine *et al.*, 2010; Compta *et al.*, 2011a; Compta *et al.*, 2015) o con pacientes con EPND (Mollenhauer *et al.*, 2006; Compta *et al.*, 2011a; Compta *et al.*, 2015). Además, niveles bajos de  $\beta$ A se han asociado con conversión a demencia en pacientes con EPND (Siderowf *et al.*, 2010; Compta *et al.*, 2013). Sin embargo, los resultados con T-Tau o

P-Tau han mostrado resultados menos consistentes, ya que sus niveles se han encontrado elevados (Mollenhauer *et al.*, 2006; Compta *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2012; Compta *et al.*, 2015) o sin cambios (Jansen Steur *et al.*, 1998; Parnetti *et al.*, 2008; Montine *et al.*, 2010; Maetzler *et al.*, 2012; Vranova *et al.*, 2014) en pacientes con DEP. Los resultados en pacientes con DCL-EP son más variables, habiéndose encontrado niveles reducidos (Montine *et al.*, 2010) o sin cambios de  $\beta$ A (Beyer *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014), niveles aumentados (Yu *et al.*, 2014) o sin cambios (Montine *et al.*, 2010; Beyer *et al.*, 2013) a de T-Tau y niveles comparables de P-Tau (Montine *et al.*, 2010; Beyer *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014).

Resulta interesante el hecho de que en pacientes con EPND, niveles disminuidos de  $\beta$ A se asocian con peor rendimiento cognitivo en diferentes dominios o test como en fluencia fonémica (Compta *et al.*, 2009; Compta *et al.*, 2013), en memoria (Alves *et al.*, 2010; Siderowf *et al.*, 2010; Stav *et al.*, 2015), función ejecutiva (Siderowf *et al.*, 2010) o atención y memoria de trabajo (Leverenz *et al.*, 2011). Asimismo, niveles disminuidos de  $\beta$ A se han asociado con una mayor progresión del deterioro cognitivo (Siderowf *et al.*, 2010; Compta *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015).

Los niveles de  $\alpha$ -sinucleína se han encontrado elevados (Hansson *et al.*, 2014; Compta *et al.*, 2015) o sin cambios (Hall *et al.*, 2012; Wennstrom *et al.*, 2013) en pacientes con DEP comparados con aquellos con EPND y controles. Aunque su concentración se ha asociado con un deterioro cognitivo más rápido en pacientes con EP *de novo* (Stewart *et al.*, 2014), la mayoría de estudios no han encontrado asociación entre los niveles de  $\alpha$ -sinucleína y el rendimiento cognitivo en pacientes con EPND (Parnetti *et al.*, 2014b; Buddhala *et al.*, 2015; Stav *et al.*, 2015).

Se han valorado proteínas implicadas en otros procesos metabólicos, como la inflamación. La proteína C reactiva se ha encontrado elevada en pacientes con DEP respecto de pacientes con EPND y controles (Lindqvist *et al.*, 2013). En pacientes con DCL-EP la IL-6 e IL-1 $\beta$  se han encontrado elevadas, mientras que el IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  estaban disminuidas al compararlos con controles (Yu *et al.*, 2014). Además se han demostrado algunas asociaciones interesantes como una correlación negativa entre los niveles de IL-6 y la puntuación del *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA) en pacientes

con DCL-EP (Yu *et al.*, 2014) o la puntuación del MMSE en pacientes con DEP (Lindqvist *et al.*, 2013).

Aunque la actividad de los enzimas lisosomales se ha evaluado, como se ha visto, en relación a la presencia de EP, no existe ningún estudio que lo haya hecho en relación al deterioro cognitivo o la demencia en la EP.

Como se puede observar, a la luz de los estudios existentes, la reducción en los niveles de  $\beta$ A en pacientes con DEP es el hallazgo más consistente. Sin embargo, en pacientes con DCL-EP existe bastante heterogeneidad en las concentraciones de  $\beta$ A (Montine *et al.*, 2010; Beyers *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014), probablemente en relación con la heterogeneidad cognitiva del DCL-EP. Esto, junto con la presencia de correlaciones entre los niveles de  $\beta$ A y déficit en diferentes dominios, sugiere que el  $\beta$ A podría servir como biomarcador de subtipos específicos de DCL-EP con un mayor riesgo de desarrollar DEP.

### ***10.3.2. Biomarcadores en sangre***

La sangre como fuente de biomarcadores de DCL-EP o DEP es igualmente atractiva, pero presenta las limitaciones mencionadas. La homocisteína, que se asocia con demencia y con deterioro cognitivo en la población general y en la EA, está elevada en pacientes con EP en tratamiento con levodopa (Ansari *et al.*, 2014). Sin embargo, su asociación con deterioro cognitivo en la EP es controvertido. Mientras algunos estudios han encontrado que niveles elevados se asocian con demencia o peor rendimiento cognitivo (O'Suilleabhain *et al.*, 2004; Bialecka *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013a), otros no han encontrado ninguna relación con el DCL-EP, la DEP o el rendimiento neuropsicológico (Hassin-Baer *et al.*, 2006; Camicioli *et al.*, 2009; Rodriguez-Oroz *et al.*, 2009b).

Las proteínas implicadas en la inflamación, también se han evaluado en relación al deterioro cognitivo o la demencia en la EP, aunque los estudios son más escasos. Mientras que no se han encontrado diferencias entre pacientes con DEP y controles en

los niveles de proteína C reactiva ultrasensible (Song *et al.*, 2013b), niveles elevados de IL-6 (Menza *et al.*, 2010; Scalzo *et al.*, 2010), TNF- $\alpha$  (Menza *et al.*, 2010), y la proteína 10 inducida por interferón  $\gamma$  (Rocha *et al.*, 2014) se han asociado con peor cognición global en pacientes con EPND.

Algunos resultados interesantes se han encontrado en relación a factores de crecimiento. Niveles reducidos de factor de crecimiento epidérmico han demostrado tener cierto valor predictivo para el desarrollo de DEP y deterioro cognitivo (Chen-Plotkin *et al.*, 2011; Pellecchia *et al.*, 2013). Asimismo se ha visto que el factor de crecimiento similar a insulina correlaciona de forma positiva con la cognición global (Ma *et al.*, 2015) a y la función ejecutiva (Pellecchia *et al.*, 2014).

Hasta la fecha no se ha validado ningún biomarcador de DCL-EP o DEP en plasma.

### ***10.3.3. Neuroimagen***

Aunque el arsenal de radioligandos disponibles para estudiar diferentes aspectos de la fisiología del cerebro es amplio (sistemas de neurotransmisión [dopaminérgico, colinérgico], metabolismo de la glucosa, depósito de  $\beta$ A, flujo sanguíneo, etc.), no se puede considerar ninguno de ellos como biomarcador de deterioro cognitivo o demencia en la EP (Bohnen *et al.*, 2003; Colloby *et al.*, 2005; Hilker *et al.*, 2005b; Mito *et al.*, 2005; Bohnen *et al.*, 2006b; Edison *et al.*, 2008; Garcia-Garcia *et al.*, 2012; Petrou *et al.*, 2012; Shimada *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013c; Gonzalez-Redondo *et al.*, 2014).

Diferentes técnicas de RM han sido usadas para explorar diferencias entre pacientes con DCL-EP o DEP y pacientes con EPCN o controles. En los últimos años la cantidad de estudios disponibles ha crecido de forma considerable y además las técnicas de análisis de RM están en constante evolución, por lo que la complejidad a la hora de interpretar los resultados puede ser una limitación. Sin embargo, aunque se han encontrado diferencias en los estudios estructurales de sustancia gris (Nagano-Saito *et al.*, 2005; Summerfield *et al.*, 2005; Pagonabarraga *et al.*, 2013; Mak *et al.*, 2014), en los estudios

con tensor de difusión (Kamagata *et al.*, 2012; Agosta *et al.*, 2013; Melzer *et al.*, 2013), o en los estudios de RM funcional (Ekman *et al.*, 2012; Rektorova *et al.*, 2012; Seibert *et al.*, 2012; Baggio *et al.*, 2014; Nagano-Saito *et al.*, 2014), ninguna de estas técnicas permite hasta este momento mejorar el rendimiento diagnóstico de los criterios clínicos.

## II. Hipótesis

El proceso neurodegenerativo en la EP comienza años antes de que seamos capaces de diagnosticarla. Por otro lado, los criterios diagnósticos, basados en las manifestaciones clínicas motoras, aunque tienen una alta sensibilidad y especificidad, necesitan ser mejorados con biomarcadores objetivos. Dada la importancia de realizar un diagnóstico preciso y de estar en condiciones de detectar la enfermedad lo más pronto posible, el estudio de biomarcadores diagnósticos de EP sigue siendo crucial.

Por otra parte, el deterioro cognitivo leve en la EP es un factor de riesgo del desarrollo posterior de demencia asociada a la EP. Sin embargo, es una entidad muy heterogénea desde el punto de vista neuropsicológico y probablemente, neuropatológico. Esto se ve reflejado en que no todos los pacientes con DCL-EP acaban desarrollando demencia y que la latencia a la misma también varía en quienes la desarrollan. Una considerable corriente de evidencia sugiere que, aunque la función ejecutiva es un dominio alterado desde fases tempranas de la enfermedad en una proporción importante de pacientes, es la adición de alteraciones en los dominios “alojados en regiones posteriores” (lenguaje y función visuoespacial) lo que se asocia con la progresión a demencia. Sin embargo, esta hipótesis no está suficientemente contrastada y son necesarios biomarcadores fiables.

En la patogenia de la EP y del deterioro cognitivo asociado a la EP intervienen diferentes mecanismos que interaccionan entre sí. Las proteínas patológicas ( $\alpha$ -sinucleína,  $\beta$ -amiloide, tau total y tau fosforilada) en LCR pueden ser el reflejo de diferentes mecanismos neuropatológicos sinérgicos. Por todo ello, nuestra hipótesis es que la combinación en forma de índices o ratios de  $\alpha$ -sinucleína y marcadores de patología tipo Alzheimer ( $\beta$ -amiloide, tau total y tau fosforilada) junto a marcadores de inflamación en LCR tendrían una mayor utilidad como biomarcadores diagnósticos de EP y de DEP que de forma individual. Además, diferentes índices entre estas proteínas podrían asociarse con subtipos de deterioro cognitivo.

Por otra parte, dada la implicación de las alteraciones de la autofagia en el depósito de estas proteínas de forma patológica, hipotetizamos que pueden existir cambios en la actividad de enzimas lisosomales en LCR de pacientes con EP y que estos cambios pueden servir para diferenciar pacientes con DCL-EP.



## III. Objetivos

El propósito principal de esta tesis es buscar biomarcadores para ayudar al diagnóstico de la EP y del deterioro cognitivo leve y demencia asociados a la misma.

I. En relación al diagnóstico de EP se establecen los siguientes objetivos:

1. Estudiar en una muestra de pacientes y controles las proteínas neuropatológicas  $\beta$ -amiloide, tau total y tau fosforilada en LCR y un panel de citoquinas proinflamatorias en LCR y en sangre para conocer su valor diagnóstico.
2. Determinar si la combinación de proteínas neuropatológicas entre sí o con citoquinas proinflamatorias aumenta el rendimiento diagnóstico de las proteínas individuales.
3. Establecer correlaciones entre estas proteínas y sus índices con variables clínicas de gravedad de la enfermedad.
4. Validar los resultados en una cohorte más amplia multicéntrica e internacional.
5. Estudiar en una muestra de pacientes y controles la actividad de diversos enzimas lisosomales para conocer su valor diagnóstico.

II. En relación al deterioro cognitivo leve y la demencia se establecen los siguientes objetivos:

1. Estudiar en una muestra de pacientes con DCL-EP y cognitivamente normales las proteínas neuropatológicas  $\beta$ -amiloide, tau total y tau fosforilada en LCR y un panel de citoquinas proinflamatorias en LCR y en sangre para conocer su valor en el diagnóstico del DCL-EP.
2. Determinar el valor diagnóstico de la combinación de diferentes proteínas neuropatológicas entre sí en el DCL-EP.
3. Establecer correlaciones entre diferentes combinaciones de proteínas y subtipos de DCL-EP según afectación de los distintos dominios cognitivos.
4. Validar los resultados en una cohorte más amplia, multicéntrica e internacional, con seguimiento prospectivo, para establecer su valor pronóstico en el desarrollo de demencia y en el deterioro cognitivo.

5. Estudiar las diferencias en la actividad de enzimas lisosomales entre pacientes con DCL-EP y aquellos cognitivamente normales.

## IV. Métodos

## 1. Cohorte I (Hospital Universitario Donostia)

### 1.1. Pacientes

Se reclutaron pacientes con EP en la Unidad de Trastornos del Movimiento del Hospital Universitario Donostia desde Enero de 2012 hasta Enero de 2016. El diagnóstico de EP se realizó por un experto en trastornos del movimiento de acuerdo con los criterios del Banco de Cerebros de Londres (Hughes *et al.*, 1992). Se les informó del objetivo del estudio y de las pruebas a realizarse y firmaron el Consentimiento Informado, aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Donostia. Los criterios de exclusión fueron:

1. Demencia o psicosis.
2. Pacientes en estadios graves de la enfermedad (Hoehn y Yahr > 4).
3. Estimulación cerebral profunda.
4. Depresión clínicamente relevante.
5. Comorbilidad importante que a juicio de los investigadores pudiera influir negativamente en el rendimiento cognitivo.
6. Contraindicación para realización de punción lumbar, tales como tratamiento con anticoagulantes.

### 1.2. Controles

Los controles se buscaron entre los cónyuges o acompañantes de los pacientes y otros voluntarios sanos. Se les informó también de la naturaleza del estudio y de las pruebas que se les iba a realizar previo a la firma del Consentimiento informado. Los criterios de exclusión fueron:

1. Cualquier enfermedad neurológica o sistémica con afectación del SNC.
2. Deterioro cognitivo leve o demencia.
3. Antecedentes familiares de EP o EA.

4. Alcoholismo, tabaquismo importante, presencia de factores de riesgo cardiovascular que a juicio del evaluador podían tener repercusiones a nivel del SNC.
5. Presencia de lesiones cerebrales en RM craneal.
6. Uso de medicamentos psicotrópicos.

Los controles así reclutados se utilizaron como muestra para determinar los valores normativos en los test neuropsicológicos (como se explicará a continuación) así como para realizar las determinaciones en plasma. Sin embargo, no se obtuvo LCR de esta cohorte, por lo que para disponer de LCR de controles se contactó con el Centro de Investigación y Terapias Avanzadas CITA-Alzheimer en San Sebastián, donde realizan seguimiento de una cohorte de sujetos sanos sin patología en RM y con MMSE>28.

### 1.3. Evaluación clínica

Tanto en pacientes como en controles se recogieron los datos demográficos básicos: edad, sexo, años de escolarización. Además, a ambos grupos se les aplicaron las siguientes escalas de morbilidad psiquiátrica:

- Escala Hospitalaria de Ansiedad y Depresión (HADS).
- *Neuropsychiatric Inventory* (NPS).

A los pacientes, además, se les evaluaron diferentes aspectos motores y no motores de la enfermedad mediante escalas específicas. Esta evaluación se realizó bajo los efectos de su medicación dopaminérgica habitual. Las escalas utilizadas fueron:

- Escala de Hoehn y Yahr (H&Y).
- *Unified Parkinson's disease Rating Scale* (UPDRS) partes I, II III y IV.
- *Interview for Deterioration of Daily Activities in Dementia* (IDDD).
- *Parkinson's disease Questionnaire* (PDQ-39).

#### 1.4. Evaluación neuropsicológica

Tanto al grupo de pacientes como de controles se les realizó una evaluación neuropsicológica exhaustiva. A los pacientes se les realizó bajo los efectos de su medicación dopaminérgica habitual. Se utilizaron dos test por cada uno de los cinco dominios cognitivos, de acuerdo con las recomendaciones de la MDS *Task Force* para el diagnóstico de DCL-EP:

- Atención y Memoria de trabajo: Dígitos Inversos (WAISS III) (Wechsler 1997), *Symbol Digit Modality Test* (Wechsler, 1997).
- Función Ejecutiva: *Trail Making Test B* (Reitan, 1955), Fluencia verbal “p”.
- Memoria: Recuerdo diferido del Rey Auditory Verbal Learning Test (Rey, 1964), recuerdo inmediato de la Figura compleja de Rey (Osterrieth, 1944).
- Lenguaje: Denominación de Boston (Kaplan *et al.*, 1938), Fluencia Verbal Semántica (animales).
- Función Visuoespacial: Decisión de Objeto y localización de número (VOSP) (Warrington *et al.*, 1991).
- Además como test de función cognitiva global se usaron el MMSE (Folstein *et al.*, 1975) y el MoCA (Nasreddine *et al.*, 2005).
- La copia de los pentágonos del MMSE se utilizó de forma específica, dado su valor predictor en la progresión a demencia (Williams-Gray *et al.*, 2013; Gasca-Salas *et al.*, 2014). Se puntuó utilizando una escala de 0 a 2, en la que 2 puntos indican que los 10 ángulos están presentes y existe intersección, 1 punto indica que las dos figuras existen y una de ellas tiene 5 ángulos y 0 peor que eso (Ala *et al.*, 2001).

En cada paciente se calculó una puntuación  $z$  para cada test de acuerdo con la fórmula:

$$z = \frac{\text{Puntuación del test} - \text{Media de ese test en controles}}{\text{Desviación estándar de ese test en controles}}$$

El diagnóstico de DCL-EP se realizó de acuerdo con el nivel II de los criterios de la MDS *Task Force* (2012) (Litvan *et al.*, 2012). Así, se estableció diagnóstico de DCL-EP cuando se cumplían los dos siguientes criterios:

1. Deterioro cognitivo referido por el paciente, el acompañante u observado por el neurólogo, que no interfería de forma significativa con la independencia funcional, si bien podía haber dificultades sutiles en tareas complejas.
2. Puntuación menor de 1,5 desviaciones estándar por debajo de la media de los controles en al menos dos test neuropsicológicos de la batería administrada, bien dentro de un mismo dominio o en diferentes dominios.

Se calculó también una puntuación  $z$  para cada dominio obteniendo la media de las puntuaciones  $z$  de los test que componen cada dominio, de acuerdo con lo anteriormente establecido.

### 1.5. Extracción y procesamiento de plasma

Se realizó extracción de sangre por venopunción tras permanecer en ayunas desde las 0 h del mismo día. Se recogió en tubos tratados con EDTA y se centrifugó dentro de los primeros 20 minutos tras la extracción a 2000g durante 15 minutos a 4 °C. Se recogió el plasma que se distribuyó en alícuotas en tubos de polipropileno que se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.



## 1.6. Extracción y procesamiento de líquido cefalorraquídeo

Se extrajo LCR mediante punción lumbar en el espacio L4-L5 o L3-L4 usando una aguja de 22G. Se llevó a cabo entre las 9 h y las 10 h, tras ayunas desde las 0 h del mismo día. Antes de la punción se anestesió la zona con mepivacaína al 1%. Los primeros 2mL de LCR se utilizaron para descartar anomalías en los estudios de rutina (células, glucosa y proteínas) y los siguientes 10 mL se recogieron en tubos de polipropileno. La muestra obtenida se centrifugó inmediatamente durante 10 minutos a 4000g y 4 °C y posteriormente se almacenó a -80 °C en alícuotas de polipropileno de 400µl hasta su análisis final.

## 1.7. Determinación de proteínas en líquido cefalorraquídeo

Se determinaron las concentraciones en LCR de  $\beta$ -amiloide, tau, tau fosforilada en el residuo treonina 18 (p-tau) y  $\alpha$ -sinucleína total mediante kits comerciales de ELISA. Todas las curvas se ajustaron mediante regresión logística de cuatro parámetros. Los duplicados con un coeficiente de variación superior al 20 % fueron excluidos.

Debido a que los hematíes tienen un alto contenido de  $\alpha$ -sinucleína, la presencia de hematíes en el LCR puede ser un factor de confusión de los niveles totales de  $\alpha$ -sinucleína en el LCR. Por ello, se determinó la concentración de hemoglobina en el LCR y se descartaron (para los análisis en los que intervenía la  $\alpha$ -sinucleína) las muestras con una concentración de hemoglobina  $\geq 200$  ng/mL.

### 1.7.1. $\beta$ -amiloide

Se determinó la fracción  $\beta$ -amiloide 1-42 mediante el kit comercial de ELISA Innotech®  $\beta$ -Amyloid (1-42) de Fujirebio, (Gante, Bélgica). Se siguieron las instrucciones del fabricante que, a modo de resumen, fueron las siguientes. Tras descongelar las muestras de forma progresiva en hielo y atemperar los reactivos a temperatura

ambiente, se procedió del siguiente modo. Primeramente se prepararon los estándares para realizar la curva patrón, partiendo de una concentración de 2000 pg/mL, que se diluyó progresivamente hasta conseguir el estándar menor que tiene un valor de 125 pg/mL. A continuación, se preparó una placa de polipropileno de predispensación con las soluciones estándar, las muestras de LCR y diluyente de muestra como blanco. Ya que todas las muestras y estándares se analizaron por duplicado, se cuidó de poner exceso suficiente en la placa de predispensación para dos muestras finales de 25 µL. Seguidamente se añadieron 75 µL de la solución con el anticuerpo biotinilado (IgG murina anti-β-amiloide(1-42) marcada con biotina). Después se añadieron 25 µL de las muestras estándar, las muestras de LCR y el diluyente como blanco, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se eliminó el contenido de los pocillos mediante inversión. Tras lavar 5 veces de forma manual con la solución de lavado administrada en el kit, se añadieron 100 µL de la solución con la estreptavidina unida a peroxidasa y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el contenido y, tras lavar 5 veces la placa, se añadieron 100 µL de solución sustrato (bencidina de tetrametilo) y se incubó durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Tras ello, se paró la reacción añadiendo la solución de parada (ácido sulfúrico 0,9 N). Se cuidó de seguir el mismo orden para parar la reacción que se había seguido para añadir las muestras. Finalmente se procedió a la lectura de la absorbancia a 450 nm de longitud de onda en un aparato Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation).

### *1.7.2. Tau total*

Se determinó la proteína tau total en LCR mediante el kit comercial de ELISA Innostest® hTAU Ag de Fujirebio, (Gante, Bélgica). Se procedió de la misma forma que con el kit anterior, sólo que en este kit, las muestras estándar vienen ya preparadas (“calibradores”) con un rango de 50-2000 pg/mL. Las muestras analizadas fueron de 25 µL. La incubación con los anticuerpos biotinilados fue de 18 h a 25 °C. El resto del procedimiento fue superponible al previo.

### *1.7.3. Tau fosforilada*

Se determinó la proteína tau fosforilada en prolina 181 en LCR mediante el kit comercial de ELISA Innostest® Phospho-Tau(181P) de Fujirebio, (Gante, Bélgica). Se procedió de la misma forma que con los kits anteriores. La curva patrón se preparó, partiendo de una concentración de 500 pg/mL que se diluyó progresivamente hasta conseguir un estándar de 15,6 pg/mL. El volumen de las muestras analizadas fue de 75 µL. La incubación con el anticuerpo anti tau fosforilada fue a 4 °C durante 18 h. La incubación con la solución de estreptavidina unida a peroxidasa fue de 1 h en lugar de 30 minutos. El resto del procedimiento fue superponible a los previos.

### *1.7.4. $\alpha$ -Sinucleína*

La  $\alpha$ -sinucleína se determinó mediante el kit comercial de ELISA Alpha-Synuclein ELISA, de Covance (Dedham, MA, USA). La descongelación y procesamiento de las muestras fue igual que con los otros kits. La curva patrón constó de una concentración máxima de 1500 pg/mL y una mínima de 6,1 pg/mL. Las muestras se diluyeron 1:10, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras finales tuvieron un volumen de 200µL. Se realizó una primera incubación con las muestras y los estándares toda la noche a 4 °C con agitación. Al día siguiente se tiró el contenido de la placa y se lavó 4 veces de forma manual. Después se retiró el contenido y se incubó 2 h a temperatura ambiente con 50 µL de la solución que contenía el anticuerpo primario biotinilado. Posteriormente se añadieron 200 µL de la solución con estreptavidina y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras tirar el contenido se añadieron 100 µL de sustrato quimioluminiscente. Seguidamente se realizó la lectura de la luminancia en un Appliskan (Thermo Scientific).

### ***1.7.5. Hemoglobina***

La concentración de hemoglobina en LCR se determinó mediante el kit comercial de ELISA Human hemoglobin ELISA quantitation kit, de Bethyl Lab Inc (Montgomery, TX, USA). La descongelación y procesamiento de las muestras fue igual que con los otros kits. La curva patrón constó de una concentración máxima de 1500 ng/mL y la mínima 6,25 ng/mL. Las muestras se diluyeron 1:10, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para un volumen final de muestra de 100 $\mu$ L. Primeramente se incubó la placa con 100  $\mu$ L de anticuerpo de recubrimiento durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras eliminar el contenido, se añadieron 200  $\mu$ L de solución de parada que se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se eliminó y se añadieron 100  $\mu$ L de las muestras estándar, las muestras de LCR y el diluyente como blanco y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminó el contenido y se añadieron 100  $\mu$ L de la solución con el anticuerpo frente a la hemoglobina. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó el contenido y se añadieron 100  $\mu$ L de la solución con el sustrato y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Tras ello, se paró la reacción añadiendo la solución de parada. Finalmente se procedió a la lectura de la absorbancia a 450 nm de longitud de onda en un aparato Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation).

### **1.8. Determinación de citoquinas en líquido cefalorraquídeo**

Los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN y TNF- $\alpha$  en LCR se midieron mediante un ensayo multiplex basado en microesferas recubiertas de anticuerpo, que permite la medición simultánea de múltiples proteínas. Se utilizó un kit comercial, el “Milliplex<sup>®</sup> MAP Human High Sensitivity T cell Magnetic Bead Panel”, de Millipore (Billerica, MA, USA). Se siguieron las instrucciones del fabricante, que a modo de resumen fueron las siguientes. Tras descongelar las muestras de forma progresiva en hielo y atemperar los reactivos a temperatura ambiente se procedió del siguiente modo. Se preparó la mezcla de microesferas a partir de viales individuales con microesferas específicas para cada citoquina. Para ello se sonicaron durante 30 segundos y se

agitaron con un vórtex durante 1 minuto antes de añadir 70  $\mu\text{L}$  de cada vial al recipiente de mezcla, que se completó con diluyente hasta un volumen final de 3,5 mL. A continuación, se prepararon las muestras estándar. Para ello se reconstituyó el estándar administrado (conteniendo todas las citoquinas simultáneamente) con 250  $\mu\text{L}$  de la solución diluyente administrada (MXHSM-7). A partir de 50  $\mu\text{L}$  de la solución estándar así obtenida se fueron haciendo diluciones seriadas hasta obtener 7 estándares. A continuación, se abrió la placa del ensayo y se lavó con 200  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado que se mantuvo durante 10 minutos en el agitador. Tras retirar el buffer de lavado, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de la solución estándar en los pocillos correspondientes y 25  $\mu\text{L}$  de las muestras más 25  $\mu\text{L}$  de buffer de ensayo en el resto de pocillos. Como blanco se usó "Serum Matrix". Se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de la solución con las microesferas, que se fue agitando con frecuencia para evitar que las microesferas se decantasen. La placa se selló y envolvió en papel de aluminio y se incubó durante 18 horas a 4 °C. Al día siguiente se retiró el contenido de la placa y se lavó de forma manual 3 veces. Para ello, la placa se colocó en un plato de lavado magnético al menos 60 segundos antes de eliminar el contenido, para permitir que las microesferas se decantaran y no se eliminaran con el lavado. Después se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de la solución con los anticuerpos de detección. Se selló la placa y se envolvió en papel de aluminio y se incubó en un agitador durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras ello, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de la solución con estreptavidina-ficoeritrina y se incubó de la misma manera durante 30 minutos. Posteriormente se eliminó el contenido de los pocillos y se lavó 3 veces como se ha descrito. Se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de "Drive Fluid" y se resuspendieron las microesferas mediante agitación durante 5 minutos. Se procedió a la lectura de la placa en un equipo Luminex 200™. Los datos se analizaron con el software Milliplex®Analyst 5.1.

### **1.9. Determinación de actividad de enzimas lisosomales en líquido cefalorraquídeo**

La actividad de los enzimas lisosomales  $\beta$ -glucocerebrosidasa,  $\beta$ -hexosaminidasa,  $\alpha$ -fucosidasa,  $\beta$ -galactosidasa, and catepsina D se determinaron utilizando substratos fluorógenos, de acuerdo con procedimientos previamente descritos (Persichetti *et al.*,

2014). Para la  $\beta$ -hexosaminidasa y la  $\alpha$ -fucosidasa, 10  $\mu$ L de LCR se incubaron con 40  $\mu$ L de la solución de sustrato durante 10 minutos a 37 °C. La actividad de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa y la  $\beta$ -galactosidasa se midió incubando 20  $\mu$ L de LCR con 40  $\mu$ L de la solución con el sustrato durante 3 h. Se añadió ácido taurodesoxicólico al 0,2% al mix de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa. Todas las reacciones se pararon añadiendo buffer glicina/NaOH 0,2 M frío a pH 10,4 hasta un volumen final de 0,3 mL. La fluorescencia del fluoróforo liberado (4-methylumbelliferone) se midió en un fluorómetro BMG LabtechFLUOstar OPTIMA (longitud de onda de excitación = 360 nm; longitud de onda de emisión = 446 nm). La actividad de la catepsina D se determinó usando el sustrato Mca-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-NH<sub>2</sub>. Se incubaron 30  $\mu$ L de LCR con el sustrato durante 90 minutos a 40 °C. Las reacciones se pararon añadiendo ácido tricloroacético al 5% (w/v) hasta un volumen final de 0,3  $\mu$ L. La fluorescencia se midió con una longitud de onda de excitación de 328 nm y una longitud de onda de emisión de 393 nm. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Todas las medidas se realizaron por triplicado. El coeficiente de variación aceptado se fijó en menos de 10%.

### **1.10. Determinación de citoquinas en plasma**

Sólo las citoquinas detectadas en LCR fueron estudiadas en plasma.

#### ***1.10.1. Interleuquina 6***

La IL-6 en plasma se midió con el kit comercial Quantikine® ELISA Human IL-6 Immunoassay de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Se siguieron las instrucciones del fabricante). La descongelación y procesamiento de las muestras fue igual que con los otros kits. La curva patrón constó de una concentración máxima de 100 pg/mL y la mínima 3,13 pg/mL El volumen de muestra fue de 100  $\mu$ L. Se realizó una primera incubación de las muestras y los estándares a temperatura ambiente

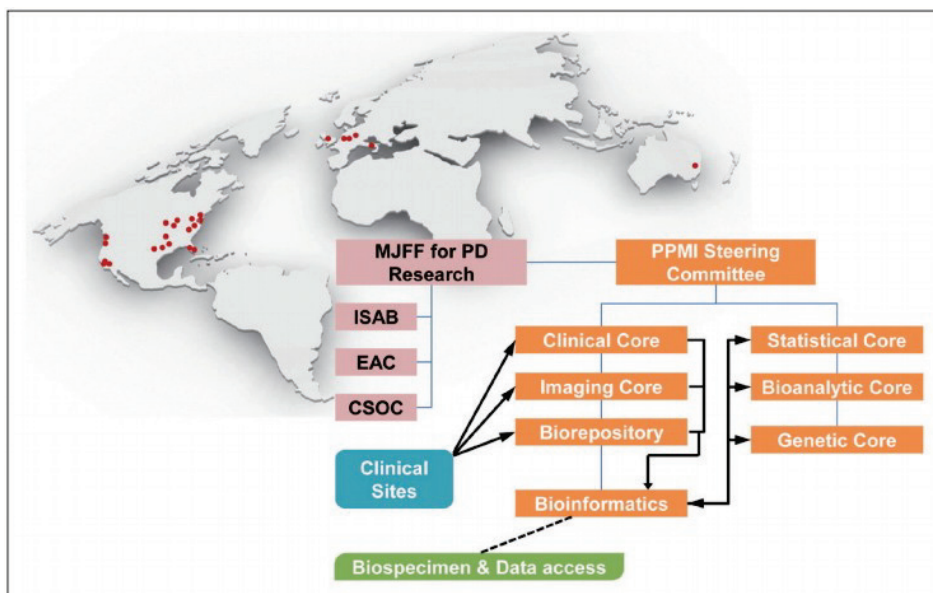
durante 2 horas. Después se eliminó el contenido y añadieron 200  $\mu\text{L}$  de la solución con el anticuerpo anti IL-6 conjugado y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Se eliminó el contenido y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de solución substrato y se incubó durante 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Tras ello, se paró la reacción añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de solución de parada. Se cuidó de seguir el mismo orden para parar la reacción que se había seguido para añadir las muestras. Finalmente se procedió a la lectura de la absorbancia a 450 nm de longitud de onda en un aparato Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation).

### ***1.10.2. Factor de necrosis tumoral $\alpha$***

El TNF- $\alpha$  en plasma se midió con el kit comercial Quantikine® ELISA Human TNF- $\alpha$  Immunoassay de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Se siguieron las instrucciones del fabricante. La descongelación y procesamiento de las muestras fue igual que con los otros kits. La concentración mayor en la curva patrón fue de 1000 pg/mL que se diluyó progresivamente hasta conseguir el estándar menor, de 15,6 pg/mL. El volumen final de las muestras fue de 200  $\mu\text{L}$ . Inicialmente se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 2 horas. Después se incubó con 200  $\mu\text{L}$  de la solución con el anticuerpo anti TNF- $\alpha$  conjugado durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de solución substrato y se incubó durante 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Tras ello, se paró la reacción añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de solución de parada. Finalmente se procedió a la lectura de la absorbancia a 450 nm de longitud de onda en un aparato Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation).

## 2. Cohorte II (Parkinson's Progression Markers Initiative)

Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI) es un estudio internacional (10 países) y multicéntrico (33 centros), prospectivo, longitudinal y observacional diseñado para el descubrimiento y validación de biomarcadores de progresión de EP (Figura 6).



**Figura 6.** Estructura organizativa del PPMI y distribución de los diferentes centros en EEUU, Europa y Australia (Kang, 2016).

Una parte muy importante de esta iniciativa es el depósito de muestras y datos en un repositorio que está disponible para toda la comunidad científica (Parkinson Progression Marker, 2011). De esta forma cualquier investigador con una propuesta de estudio puede obtener permiso para acceder a datos clínicos, genéticos, analíticos, de RM, de SPECT o de LCR. La metodología detallada de todo el estudio está disponible en <http://www.ppmi-info.org/study-design/research-documents-and-sops/>.



### 2.1. Pacientes

Los pacientes incluidos en el PPMI son pacientes con EP con un máximo de dos años de evolución, con un estadio de H&Y menor o igual a 2, y con una edad igual o superior a 30 años. Se requiere confirmación de déficit dopamnergico con DaT SCAN o el PET de VMAT-2. Como principales criterios de exclusión se incluyen los parkinsonismos atípicos o debidos a fármacos, la presencia de demencia (Emre *et al.*, 2007) y que hayan iniciado tratamiento para la EP (los criterios de inclusión y exclusión completos se pueden descargar en: <http://www.ppmi-info.org/wp-content/uploads/2017/02/PPMI-Am11-Protocol.pdf>).

### 2.2. Controles

El grupo de controles incluyó hombres o mujeres de 30 años o más, sin enfermedades neurológicas presentes o activas clínicamente significativas, con una puntuación del MoCA  $\leq 26$  (los criterios de inclusión y exclusión completos están disponibles en: <http://www.ppmi-info.org/wp-content/uploads/2017/02/PPMI-Am11-Protocol.pdf>).

### 2.3. Evaluación clínica

Como se ha expuesto, el estudio PPMI es prospectivo y longitudinal, y consta de 16 visitas a lo largo de 96 meses de seguimiento y diferentes evaluaciones en cada visita. Además de los datos demográficos básicos y otros aspectos clínicos, en la primera visita se recogen:

- UPDRS I, II, III y IV.
- Escala de H&Y.
- Escala modificada de Schwab y England de actividades de la vida diaria.

- Escala de sueño de Epworth.
- *REM Sleep Behavior Disorder Questionnaire*.
- *Geriatric Depression Scale*.
- Test de identificación de olores (UPSIT).

### 2.4. Evaluación neuropsicológica

La evaluación neuropsicológica del PPMI se realiza en la visita basal y a los 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 meses. La batería utilizada está formada por:

- MoCA.
- *Hopkins Verbal Learning Test* (HVLT)
- *Symbol Digit Modalities test*.
- *Letter and number sequencing*.
- Fluencia semántica.
- Orientación de las líneas de Benton.

### 2.5. Obtención y manejo de los datos

La descarga de datos se realizó con fecha 4 de Julio de 2016 de la base de datos del PPMI ([www.ppmi-info.org/data](http://www.ppmi-info.org/data)), obteniéndose información de 423 pacientes y 240 controles.

#### 2.5.1. Estudio de biomarcadores diagnósticos

Se utilizaron los datos de los valores de  $\beta$ A1-42, T-Tau, P-Tau and  $\alpha$ -sinucleína de la visita basal. De acuerdo con la metodología aplicada en nuestra cohorte, se excluyeron las muestras con niveles de hemoglobina  $\geq 200$  ng/mL (106 pacientes y 46 controles). La n final con la que se trabajó fue de 314 pacientes y 111 controles.

De las variables clínicas recogidas en el PPMI utilizamos: edad, sexo, años de evolución de la enfermedad, UPDRS I-IV y escala de H&Y.

### ***2.5.2. Estudio de biomarcadores de deterioro cognitivo***

Para esta parte específica se utilizaron los datos de pacientes que tuvieran LCR en la primera visita y que tuvieran datos de exploración cognitiva tanto en la primera visita como en la visita de seguimiento a los 3 años. Igualmente se excluyeron aquellos pacientes que tuvieran niveles de hemoglobina  $\geq 200$  ng/mL. La n final con la que se trabajó fue de 281 pacientes.

Se clasificó a los pacientes de acuerdo con la presencia de DEP a los 3 años cuando la puntuación del MoCa fue  $< 21$  (Dalrymple-Alford *et al.*, 2010).

Para determinar el declive cognitivo se calculó la diferencia entre la visita basal y a los tres años de las puntuaciones obtenidas en cada visita. En los casos en los que se disponía de más de un test por dominio para poder calcular una puntuación z compuesta se usó este valor a partir de los valores z de los test:

- Memoria: Recuerdo inmediato del HVLT, recuerdo diferido del HVLT y reconocimiento diferido del HVLT.
- Atención y memoria de trabajo: *Letter and Number Sequencing* y *Symbol Digit Modality Test*.

Para el resto de test se utilizó la resta de sus puntuaciones brutas:

- Orientación de las líneas de Benton (función visuoespacial).
- Fluencia semántica (lenguaje).

El cálculo de las puntuaciones z de los test se realizó de acuerdo con la fórmula descrita previamente, utilizando los datos de los controles del PPMI en la visita basal.

También se calculó la diferencia de la puntuación de MoCA, como media de deterioro cognitivo global.

### 3. Análisis estadístico

La comparación de las variables cuantitativas entre tres grupos se realizó mediante ANOVA y corrección de Bonferroni. Para variables que no seguían una distribución normal se utilizó el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Mann-Whitney o T de Student (penalizando x3) para comparaciones post hoc. La comparación de variables cuantitativas entre dos grupos se realizó mediante la T de Student o U de Mann Whitney, de acuerdo con la distribución normal o no de las muestras. La comparación de variables cualitativas se realizó mediante el test de Chi<sup>2</sup>. Las correlaciones bivariadas se realizaron con el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman, según la distribución de las variables a correlacionar. Para ajustar las comparaciones y las correlaciones por edad, se introdujo esta variable como variable independiente en un modelo de regresión lineal. Cuando la variable dependiente no seguía una distribución normal se realizó transformación logarítmica.

Para estudiar el rendimiento diagnóstico de las diferentes proteínas o ratios se trazaron sus curvas ROC (receiver operating characteristic). Cuando se quiso incluir más de una variable en una curva ROC, se introdujeron los valores predictivos obtenidos en un análisis de regresión logística que incluía como variables independientes las variables de interés.

Para confirmar la asociación entre determinadas ratios y el declive cognitivo en la cohorte del PPMI, se realizaron modelos de regresión lineal introduciendo como variable dependiente la diferencia en las puntuaciones z compuestas de los dominios o en las puntuaciones de los test entre la visita de seguimiento a los 3 años y la visita basal. Como variables predictoras se introdujeron las ratios de interés. La edad y/o la puntuación basal del MoCA se introdujeron como factores de confusión en el análisis multivariante cuando en el univariante habían presentado una asociación significativa

con la variable dependiente. Además para calcular el riesgo relativo de desarrollar demencia se realizaron modelos de regresión logística con las ratios de interés que se dividieron en cuartiles y se categorizaron obteniendo dos grupos: uno que englobaba a los cuartiles 1º, 2º y 3º y otro que englobaba el 4º cuartil. Así se introdujeron como variable independiente. Mediante la ecuación propuesta por Zhang *et al.* (Zhang and Yu, 1998) se calculó el riesgo relativo de desarrollar demencia del cuartil 4º, respecto de los demás cuartiles.

El análisis se realizó usando el soporte informático SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, Ill, EEUU).

## V. Resultados

## 1. Biomarcadores diagnósticos de enfermedad de Parkinson

Los resultados de este apartado han dado lugar al **Artículo II** (Anexo I).

### 1.1. Cohorte I (Hospital Universitario Donostia)

A partir de una cohorte de 70 pacientes (edad media  $71 \pm 6$  años, 43 varones [61,4%] y  $8 \pm 4$  años de evolución de la enfermedad) se obtuvo LCR de 45 pacientes, que fueron los que accedieron a realizarse una punción lumbar. De esas muestras, por razones, técnicas se trabajó con 40 muestras para las mediciones en LCR (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características demográficas y clínicas de los pacientes y controles para el estudio de LCR.

	EP (n=40)	Controles (n=40)	p
Edad	71,0 $\pm$ 6,2	68,2 $\pm$ 5,0	0,028
Sexo (nº hombres/%)	28 (70%)	21 (53,8%)	0,168
Educación (años)	10,4	13,7	0,002
Duración de la EP (años)	7,9 $\pm$ 4,1	-	
Hoehn y Yahr	2,3 $\pm$ 0,5	-	
UPDRS I	13,2 $\pm$ 5,9	-	
UPDRS II	16,7 $\pm$ 7,2	-	
UPDRS III	22,2 $\pm$ 7,9	-	
UPDRS IV	2,6 $\pm$ 3,7	-	
Dosis diaria equivalente de levodopa (mg)*	1065,9 $\pm$ 502	-	
IDDD	37,7 $\pm$ 8,6	-	
MMSE	27,7 $\pm$ 2,2	28,5 $\pm$ 1	0,160
MoCA	21,8 $\pm$ 4,8	-	

\*La dosis total equivalente de levodopa = levodopa x 1 + levodopa de liberación prolongada x 1 + levodopa con entacapona x 0,33 + levodopa con tolcapona x 0,5 + pramipexol x 100 x 1,42 + ropinirol x 20 + rotigotina x 30 + selegilina x10 + rasagilina x 100 + amantadina x 1

### *1.1.1. Líquido cefalorraquídeo*

Los resultados se muestran en la Tabla 2. Los pacientes eran mayores que los controles ( $p=0,028$ ). Ajustando por la edad, los niveles de  $\alpha$ -sinucleína ( $p=0,007$ ) y de  $\beta A1-42$  ( $p=0,048$ ) fueron menores en pacientes que en controles. Los niveles de T-Tau ( $p=0,656$ ) y P-Tau ( $p=0,865$ ), así como los índices T-Tau/ $\beta A1-42$  ( $p=0,513$ ) y P-Tau/ $\beta A1-42$  ( $p=0,600$ ) no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, todas las ratios en las que intervenía la  $\alpha$ -sinucleína, fueron mayores en pacientes que en controles: T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína ( $p<0,001$ ), P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína ( $p<0,001$ ), T-Tau/ $\beta A1-42+\alpha$ -sinucleína ( $p=0,005$ ) y P-Tau/ $\beta A1-42+\alpha$ -sinucleína ( $p=0,001$ ) (Tabla 2).

Los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IFN $\gamma$  en LCR estaban por debajo del umbral de detección, explicado en métodos, para cada uno. La IL-6 alcanzó niveles detectables en la mayoría de pacientes (39) y de controles (38), y sus niveles medios no mostraron diferencias entre ambos grupos ( $p=0,346$ ). Los niveles de TNF- $\alpha$  estaban por debajo del umbral de detección en 8 pacientes y 13 controles. En el resto, la concentración media, ajustada por edad, resultó ser mayor en pacientes que en controles ( $p=0,021$ ). Para saber si la presencia de niveles detectables de TNF- $\alpha$  se debía a algún factor de confusión comparamos las principales variables demográficas y clínicas en cada grupo entre los sujetos con y sin niveles detectables de esta citoquina. No se encontraron diferencias en los controles en edad ( $p=0,811$ ) o sexo ( $p=0,427$ ), ni en los pacientes en edad ( $p=0,791$ ), sexo ( $p=0,649$ ), duración de la enfermedad ( $p=0,839$ ) o UPDRS III ( $p=0,619$ ).



**Tabla 2.** Características bioquímicas en LCR de los pacientes con EP y los controles.

	EP (n=40)	Controles (n=40)	p
$\beta$ A1-42 (pg/mL)	736,8 $\pm$ 239,1	877,6 $\pm$ 289,5	0,048*
T-Tau (pg/mL)	231,2 $\pm$ 113,7	210,7 $\pm$ 115,9	0,656
P-Tau (pg/mL)	46,6 $\pm$ 17,8	46,2 $\pm$ 16,5	0,865
T-Tau/ $\beta$ A	0,330 $\pm$ 0,193	0,279 $\pm$ 0,245	0,513
P-Tau/ $\beta$ A	0,0662 $\pm$ 0,0279	0,0593 $\pm$ 0,0368	0,600
$\alpha$ -sinucleína (pg/mL) <sup>a</sup>	1048,9 $\pm$ 492,0	1170,3 $\pm$ 392,3	0,007*
T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína <sup>a</sup>	0,2379 $\pm$ 0,007	0,1654 $\pm$ 0,06	<0,001*
P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína <sup>a</sup>	0,0490 $\pm$ 0,008	0,0385 $\pm$ 0,007	<0,001*
T-Tau/ $\beta$ A+ $\alpha$ -sinucleína <sup>a</sup>	0,1359 $\pm$ 0,051	0,0951 $\pm$ 0,045	0,005*
P-Tau/ $\beta$ A+ $\alpha$ -sinucleína <sup>a</sup>	0,0276 $\pm$ 0,006	0,0215 $\pm$ 0,005	0,001*
IL-6 (pg/mL) <sup>b</sup>	0,617 $\pm$ 0,30	0,531 $\pm$ 0,22	0,346
TNF- $\alpha$ (pg/mL) <sup>c</sup>	0,401 $\pm$ 0,158	0,307 $\pm$ 0,124	0,021*
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	Indetectable	Indetectable	
IL-2 (pg/mL)	Indetectable	Indetectable	
IFN $\gamma$ (pg/mL)	Indetectable	Indetectable	

\* p ajustada por edad. Sólo las comparaciones que fueron significativas en el análisis univariante se corrigieron por la edad.

Dado que se excluyeron muestras en el análisis de  $\alpha$ -sinucleína y no todos los sujetos presentaron niveles detectables de citoquinas, la cifra de pacientes y controles en diferentes variables difiere:

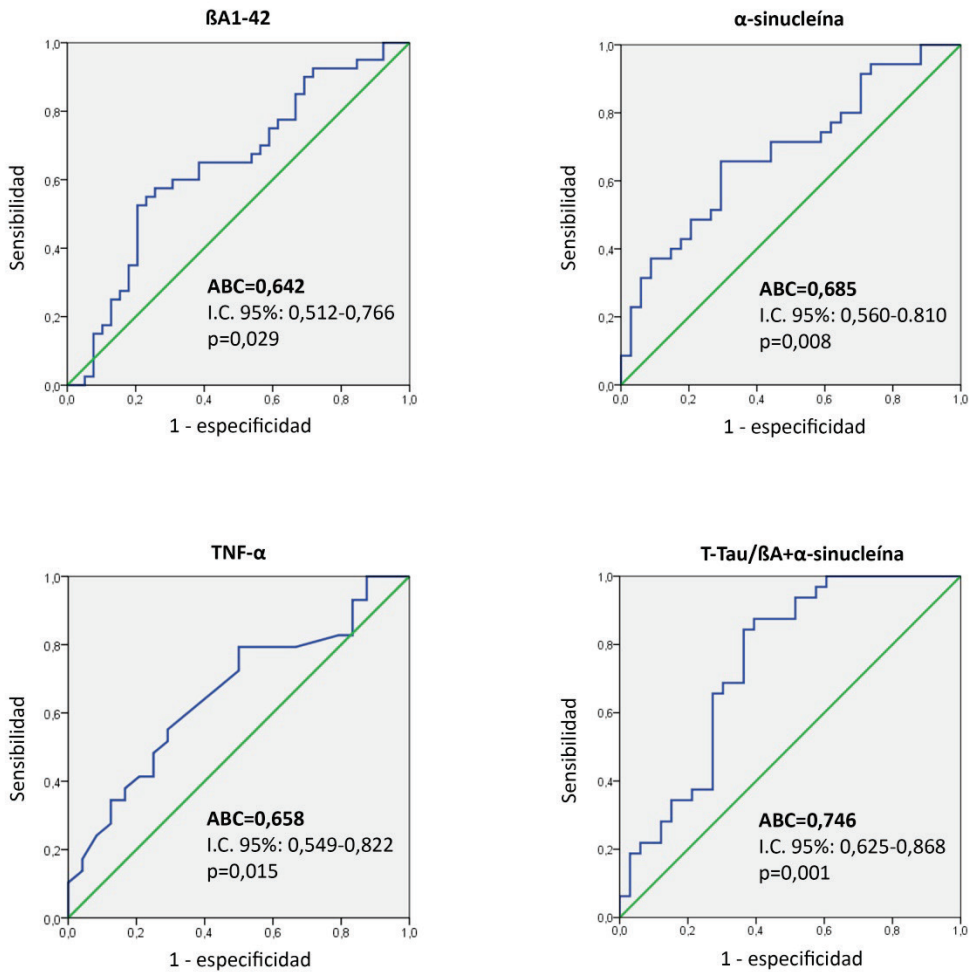
<sup>a</sup> Pacientes con EP (n= 35; hombres 25; edad 71,4  $\pm$  6,4 años), controles (n= 34; hombres=18; edad 68,1  $\pm$  5): p para la edad=0,021 y para el género p=0,140.

<sup>b</sup> Pacientes con EP (n= 39; hombres 28; edad 71,2  $\pm$  6,2 años), controles (n= 38; hombres=20; edad 68,1  $\pm$  4,8): p para la edad=0,016 y para el género p=0,083.

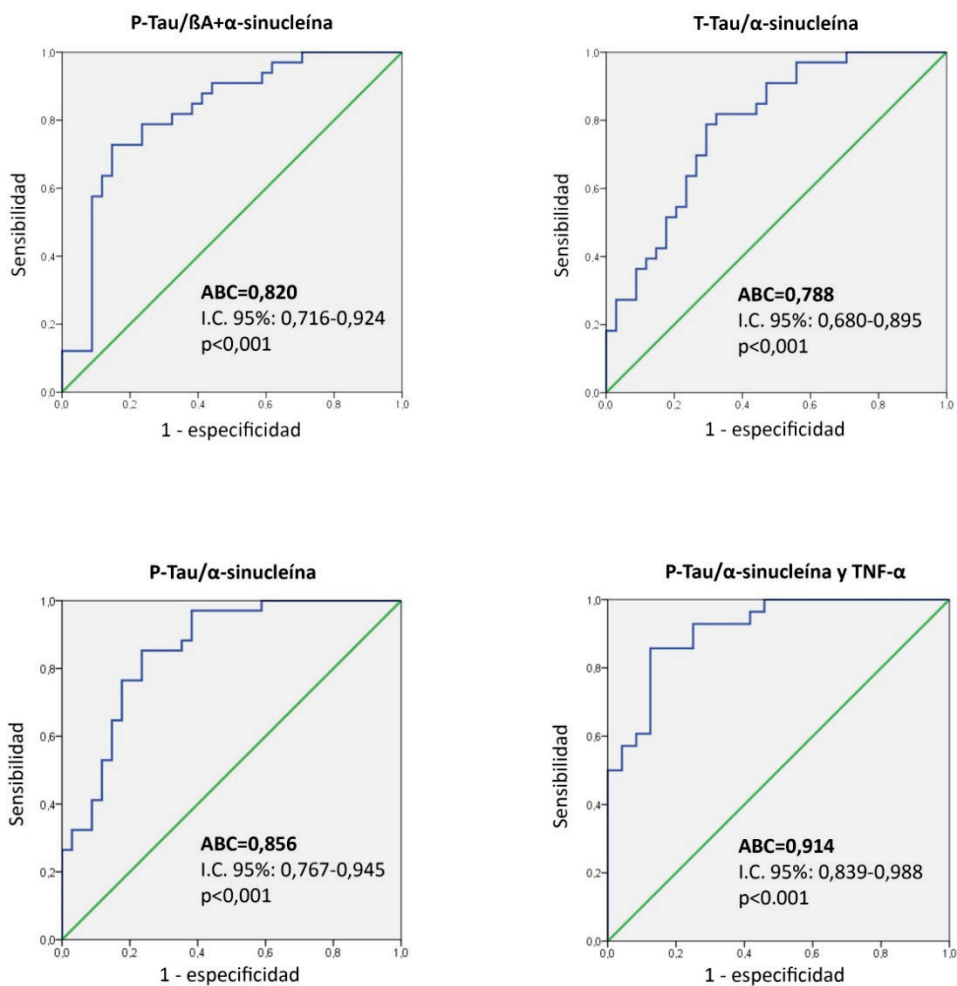
<sup>c</sup> Pacientes con EP (n= 32; hombres 22; edad 71,1  $\pm$  6,6 años), controles (n= 27; hombres=13; edad 68,2  $\pm$  4,2): p para la edad=0,049 y para el género p=0,109.

Para evaluar el rendimiento diagnóstico en la diferenciación de pacientes y controles de las proteínas y ratios que habían resultado diferentes entre ambos grupos, se realizó un análisis de curvas ROC (Figura 7) Las mayores áreas bajo la curva (ABC) fueron las de la ratio P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína y las de esta ratio en combinación con los niveles de TNF- $\alpha$ . El ABC del índice P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína combinado con los niveles de TNF- $\alpha$  fue de 0,914 (I.C. al 95% 0,839-0,988;  $p < 0,001$ ) con una sensibilidad del 92,9% y una especificidad del 75% para el punto de corte  $\leq 0,710$ . La ratio P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína sola mostró un ABC de 0,856 (I.C. al 95% 0,767-0,945;  $p < 0,001$ ) con una sensibilidad del 97,1% y una especificidad del 61,8% para el punto de corte  $\leq 0,392$ .

En un análisis de correlación se observó que ninguna de las proteínas de forma individual, ni de los ratios o la combinación de la ratio P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína con TNF- $\alpha$  mostró correlación con ninguna de las escalas UPDRS.



**Figura 7.** Curvas ROC de las diferentes proteínas y ratios en LCR en la diferenciación de pacientes y controles.



**Figura 7** (continuación). Curvas ROC de las diferentes proteínas y ratios en LCR en la diferenciación de pacientes y controles.

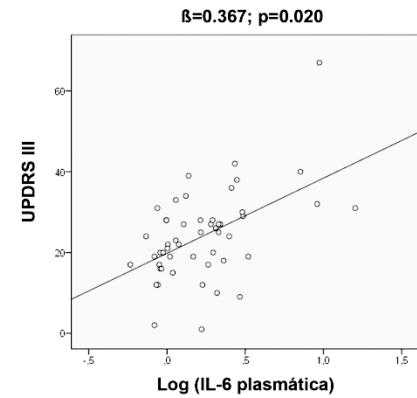
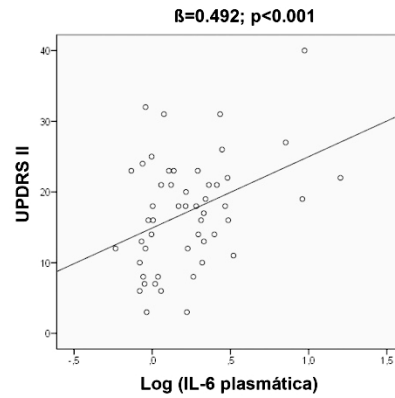
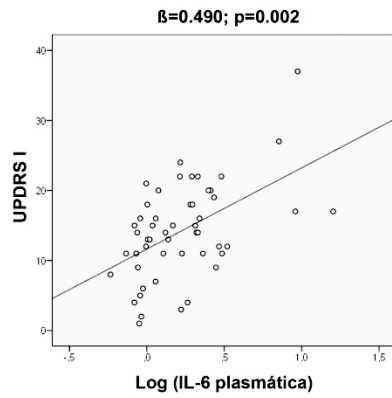
**1.1.2. Plasma**

Sólo se evaluaron en plasma las citoquinas cuyos niveles habían sido detectables en LCR, es decir IL-6 y TNF- $\alpha$ . Los niveles de TNF- $\alpha$  estaban por debajo del umbral de detección para la técnica en todos los pacientes y controles. Los niveles de IL-6 estaban por encima del umbral de detección, pero no hubo diferencias en su media entre ambos grupos ( $p=0,742$ ) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Citoquinas plasmáticas en pacientes y controles.

	<b>EP (n=51)</b>	<b>Controles (n=24)</b>	<b>p</b>
<b>Edad (años)</b>	71,0 $\pm$ 6,3	68,2 $\pm$ 5,5	0,070
<b>Sexo (nº hombres/%)</b>	34 (66,6%)	12 (50%)	0,167
<b>IL-6 (pg/mL)</b>	2,29 $\pm$ 2,66	1,91 $\pm$ 1,27	0,742
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	Indetectable	Indetectable	

Sin embargo, en un análisis de regresión lineal se observó que, ajustados por edad y años de evolución, los niveles plasmáticos de IL-6 se correlacionaban positivamente con la UPDRS I ( $\beta=0,490$ ;  $p=0,002$ ), UPDRS II ( $\beta=0,492$ ;  $p<0,001$ ) y UPDRS III ( $\beta=0,367$ ;  $p=0,020$ ) (Figura 8).



**Figura 8.** Correlaciones entre IL-6 en plasma y UPDRS I, II y III.

## 1.2. Cohorte II (PPMI)

Las características demográficas, clínicas y de los parámetros de LCR se recogen en la Tabla 4. Los pacientes eran ligeramente mayores que los controles teniendo esta diferencia una tendencia hacia la significación estadística ( $p=0,051$ ). Tras ajustar por edad, ninguno de los niveles de proteínas fue diferente entre pacientes y controles. Sólo las diferencias en los niveles de  $\alpha$ -sinucleína mostraron una tendencia hacia la significación estadística con una media menor en los pacientes ( $p=0,061$ ). La ratio P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína ( $p=0,030$ ) y la ratio P-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína ( $p=0,034$ ) estaban elevadas en pacientes comparados con controles. Sin embargo, al realizar un análisis de curvas ROC, sus ABC no mostraron valores aceptables para considerarlos biomarcadores diagnósticos de EP: P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína 0,551 ( $p=0,113$ ) y P-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína 0,553 ( $p=0,098$ ).

**Tabla 4.** Cohorte del PPMI: Características demográficas, clínicas y de LCR de los pacientes con EP y los controles.

	EP (n=314)	Controles (n=111)	p	p ajustada
Edad (años)	61,3 $\pm$ 9,7	59,1 $\pm$ 11,5	0,051	
Sexo (nº hombres/%)	203 (64,4%)	68 (61,3%)	0,523	
Duración de la enfermedad (meses)	6,9 $\pm$ 6,7	-		
Educación (años)	15,6 $\pm$ 2,9	16 $\pm$ 3,1	0,238	
Hoehn y Yahr	1,5 $\pm$ 0,5	-		
UPDRS III	20,6 $\pm$ 8,6	-		
MoCA	27,1 $\pm$ 2,2	28,2 $\pm$ 1	<0,001	
$\beta$ A (pg/mL)	374,0 $\pm$ 102,4	385,3 $\pm$ 75,1	0,054	0,120
T-Tau (pg/mL)	44,6 $\pm$ 18,0	43,8 $\pm$ 15,1	0,993	0,617

Tabla 4 (continuación)

	EP (n=314)	Controles (n=111)	p	p ajustada
P-Tau (pg/mL)	15,9 ± 10,3	14,2 ± 6,5	0,329	0,446
T-Tau/βA1-42	0,1259 ± 0,06	0,1131 ± 0,02	0,126	0,490
P-Tau/βA1-42	0,0443 ± 0,036	0,0371 ± 0,014	0,030	0,088
α-sinucleína (pg/mL)	1836,9 ± 734,4	1978,1 ± 796,5	0,109	0,066
T-Tau/α-sinucleína	0,0256 ± 0,008	0,0234 ± 0,005	0,017	0,061
P-Tau/α-sinucleína	0,00964 ± 0,008	0,00785 ± 0,0035	0,035	<b>0,030</b>
T-Tau/βA+α-sinucleína	0,0207 ± 0,006	0,0191 ± 0,003	0,017	0,082
P-Tau/βA+α-sinucleína	0,00768 ± 0,006	0,00640 ± 0,0027	0,020	<b>0,034</b>

## 2. Biomarcadores de deterioro cognitivo y demencia

Los resultados de esta parte han dado lugar al **Artículo III** (Anexo).

### 2.1. Cohorte I (Hospital Universitario Donostia)

Tras aplicar los criterios diagnósticos de DCL-EP de la MDS *Task Force* (nivel II), de los 40 pacientes de los que se había realizado el análisis de proteínas y citoquinas en LCR, 25 tenían DCL-EP y 15 eran cognitivamente normales. Los pacientes con DCL-EP presentaban un rendimiento menor que los pacientes con EPCN en diversos test neuropsicológicos y dominios cognitivos (Tabla 5).



**Tabla 5.** Características demográficas, clínicas y cognitivas de los pacientes con DCL-EP y con EPCN.

	EPCN (n=15)	DCL-EP (n=25)	p
Edad	66,6 ± 6,3	73,7 ± 4,5	<0,001
Sexo (nº hombres/%)	12 (80%)	16 (64 %)	0,285
Educación (años)	14 ± 5	8 ± 4	<0,001
Duración de la enfermedad (años)	6 ± 2	8 ± 4	0,108
Hoehn y Yahr	2,1 ± 0,5	2,4 ± 0,4	0,185
UPDRS I	10,6 ± 6,7	14,8 ± 4,8	0,028
UPDRS II	14,2 ± 8,0	18,2 ± 6,3	0,090
UPDRS III	18,2 ± 7,1	24,6 ± 7,4	0,011
UPDRS IV	2,0 ± 4,0	3,0 ± 3,5	0,151
Dosis diaria equivalente de levodopa (mg)	1041,2 ± 545,9	1080,8 ± 484,9	0,813
IDDD	34,47 ± 10,6	39,9 ± 6,7	0,031
MMSE	28,4 ± 2,6	27,2 ± 1,8	0,010
MoCA	24,47 ± 5,43	20,32 ± 3,77	0,005
Z atención y memoria de trabajo	-0,37 ± 0,41	-1,52 ± 0,36	<0,001
*SDMT	32,1 ± 6,8	12,6 ± 6,7	<0,001
*Dígitos inversos	4,0 ± 1,0	3,3 ± 0,8	<0,001
Z función ejecutiva	-0,35 ± 0,87	-2,79 ± 1,40	<0,001
*TMTB	119,3 ± 59,0	304,6 ± 118,8	<0,001
*Fluencia fonémica	14,6 ± 7,0	10,0 ± 4,0	0,013
Z memoria	-0,58 ± 0,67	-1,25 ± 0,76	0,011
*RAVLT diferido	5,2 ± 2,6	4,6 ± 2,7	0,565
*FCR recuerdo inmediato	15,2 ± 4,3	8,8 ± 5,8	0,001
Z lenguaje	0,18 ± 0,82	-1,30 ± 1,09	<0,001
*Fluencia semántica	19,4 ± 6,2	14,8 ± 4,9	0,013

**Tabla 5** (continuación)

	EPCN (n=15)	DCL-EP (n=25)	p
<b>* Denominación de Boston</b>	52,7 ± 5,7	45,0 ± 8,7	0,004
<b>Z visuoespacial</b>	-0,54 ± 1,21	-1,83 ± 1,69	0,011
<b>*Decisión de objeto (VOSP)</b>	15,9 ± 2,2	13,6 ± 2,7	0,011
<b>*Localización de número (VOSP)</b>	8,5 ± 1,7	7,3 ± 2,0	0,047
<b>Copia pentágonos</b>	0: 1 (6,7%)	0: 3 (12%)	0,084
	1: 0	1: 6 (24%)	
	2: 14 (93,3%)	2: 16 (64%)	

\*Test usados para el diagnóstico de DCL-EP de acuerdo con los criterios de la MDS *Task Force* (nivel II).

### ***2.1.1 Líquido cefalorraquídeo***

No hubo diferencias en ninguna de las proteínas, sus ratios o las citoquinas estudiadas en LCR entre los dos grupos (Tabla 6).

Tabla 6. Características de LCR de pacientes con DCL-EP y controles.

	EPCN (n=15)	DCL-EP (n=25)	p	P ajustada
$\beta$ A1-42 (pg/mL)	703,5 $\pm$ 235,9	756,7 $\pm$ 243,6	0,503	0,968
T-Tau (pg/mL)	206,1 $\pm$ 99,6	246,9 $\pm$ 121	0,248	0,678
P-Tau (pg/mL)	41,9 $\pm$ 13,2	49,2 $\pm$ 19,6	0,335	0,926
T-Tau/ $\beta$ A1-42	0,3208 $\pm$ 0,224	0,3375 $\pm$ 0,1754	0,317	0,710
P-Tau/ $\beta$ A1-42	0,0647 $\pm$ 0,0279	0,0670 $\pm$ 0,0284	0,621	0,984
$\alpha$ -sinucleína (pg/mL) <sup>a</sup>	903,8 $\pm$ 252,5	947,8 $\pm$ 393,6	0,714	0,879
T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína <sup>a</sup>	0,2394 $\pm$ 0,09	0,2467 $\pm$ 0,05	0,178	0,289
P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína <sup>a</sup>	0,0499 $\pm$ 0,009	0,0506 $\pm$ 0,009	0,929	0,789
T-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína <sup>a</sup>	0,1362 $\pm$ 0,06	0,1351 $\pm$ 0,03	0,447	0,321
P-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína <sup>a</sup>	0,0280 $\pm$ 0,007	0,0274 $\pm$ 0,005	0,776	0,549
IL-6 (pg/mL) <sup>b</sup>	0,555 $\pm$ 0,24	0,625 $\pm$ 0,33	0,650	0,709
TNF- $\alpha$ (pg/mL) <sup>c</sup>	0,448 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	0,373 $\pm$ 0,15	0,199	0,372
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	Indetectable	Indetectable		
IL-2 (pg/mL)	Indetectable	Indetectable		
IFN $\gamma$ (pg/mL)	Indetectable	Indetectable		

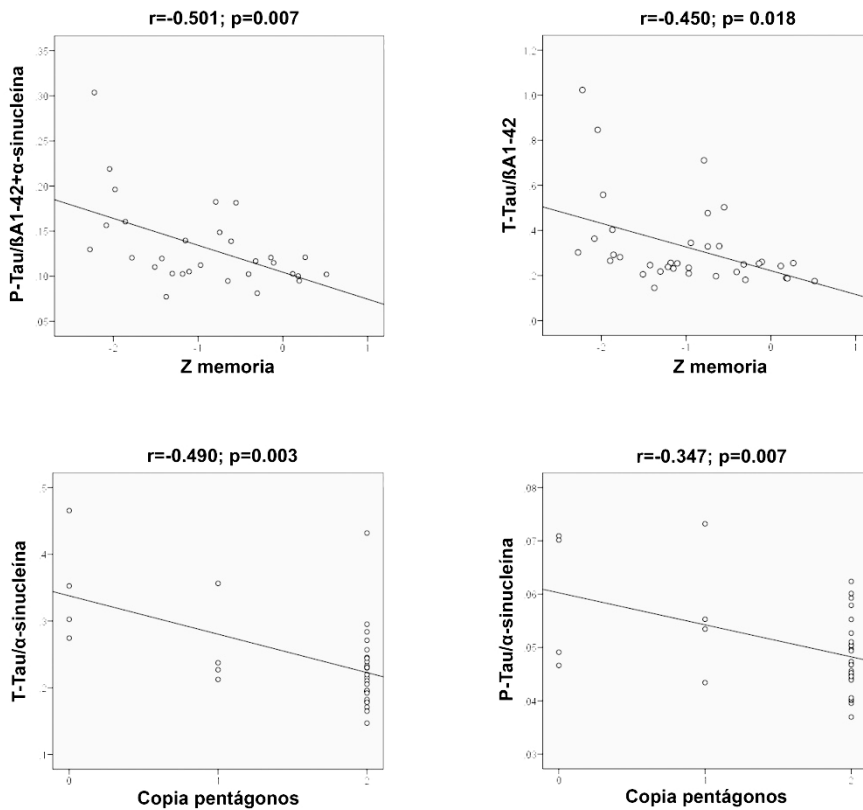
Dado que se excluyeron muestras en el análisis de  $\alpha$ -sinucleína y no todos los sujetos presentaron niveles detectables de citoquinas, la cifra de pacientes con DCL-EP y EPCN en diferentes variables difiere:

<sup>a</sup>EPCN (n=14; hombres 12; edad 66,8  $\pm$  6,5), DCL-EP (n=21; hombres 16; edad 74,4  $\pm$  4,3): p=0,001 para la edad y p=0,445 para el sexo.

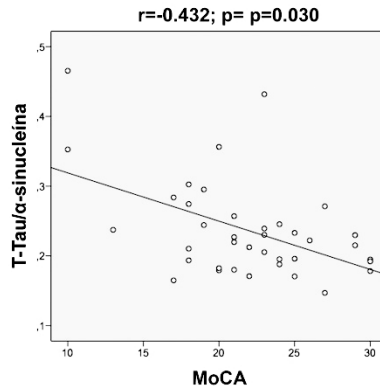
<sup>b</sup>EPCN (n=14; hombres 12; edad 66,9  $\pm$  6,5), DCL-EP (n=25; hombres 16; edad 73,7  $\pm$  4,5): p=0,001 para la edad y p=0,148 para el sexo.

<sup>c</sup>EPCN (n=12; hombres 10; edad 67,3  $\pm$  6,3), DCL-EP (n=20; hombres 12; edad 74,1  $\pm$  4,5): p=0,001 para la edad y p=0,168 para el sexo.

Al realizar el análisis de correlación entre los niveles de proteínas en LCR o sus ratios y las puntuaciones z de los dominios cognitivos, la puntuación del MoCa y la puntuación de la copia de los pentágonos se observaron diferentes correlaciones, que se mantenían tras introducir la edad como covariable. Los índices T-Tau/ $\beta$ A1-42 ( $r=-0,450$ ;  $p=0,018$ ) y T-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína ( $r=-0,501$ ;  $p=0,007$ ) presentaban una correlación negativa con la puntuación z en memoria. La ratio T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína ( $r=-0,490$ ;  $p=0,003$ ) y la ratio P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína ( $r=-0,347$ ;  $p=0,007$ ) tenían una correlación negativa con la puntuación de la copia de los pentágonos y la primera, además correlacionaba negativamente con la puntuación del MoCA ( $r=-0,432$ ;  $p=0,012$ ) (Figura 9).



**Figura 9.** Correlaciones entre diferentes ratios de proteínas en LCR y diferentes medidas cognitivas.



**Figura 9** (continuación)

### 2.1.2. Plasma

Como se ha mencionado, sólo se evaluaron en plasma las citoquinas que habían sido detectables en LCR: IL-6 y TNF- $\alpha$ . El TNF- $\alpha$  estaba por debajo del umbral de detección en todos los sujetos y los niveles de IL-6, que eran detectables, no fueron diferentes entre ambos grupos (Tabla 7). Sin embargo, al realizar un estudio de correlación entre los niveles de IL-6 y los dominios cognitivos y la puntuación del MMSE y del MoCA, se observó que los niveles plasmáticos de IL-6, ajustados por la edad, correlacionaron negativamente con la puntuación del MoCA ( $r = -0,429$ ;  $p = 0,024$ ) y con la puntuación z de lenguaje ( $r = -0,553$ ;  $p = 0,002$ ) (Figura 10).

**Tabla 7.** Citoquinas plasmáticas en pacientes con DCL-EP y cognitivamente normales.

	EPCN (n=21)	DCL-EP (n=29)	p	p ajustada
Edad (años)	67,3 $\pm$ 6,3	74,0 $\pm$ 4,4	<0,001	
Sexo (n° hombres/%)	15 (71,4%)	18 (62%)	0,490	
IL-6 (pg/mL)	1,70 $\pm$ 1,4	2,24 $\pm$ 2	0,040	0,707
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	Indetectable	Indetectable		

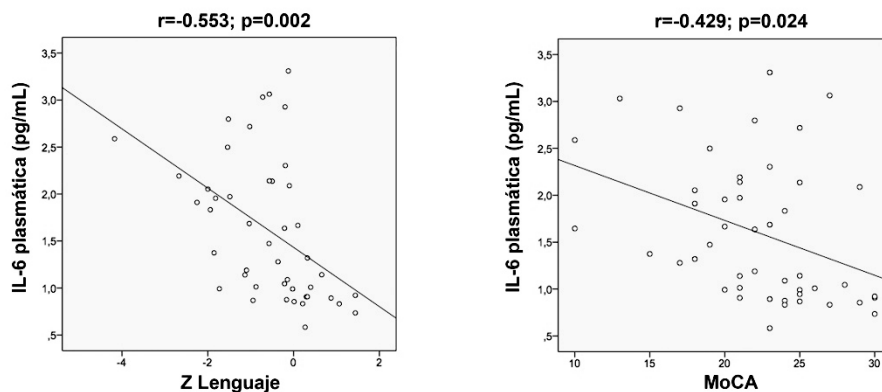


Figura 10. Correlaciones entre IL-6 plasmática y medidas cognitivas.

## 2.2. Cohorte II (PPMI)

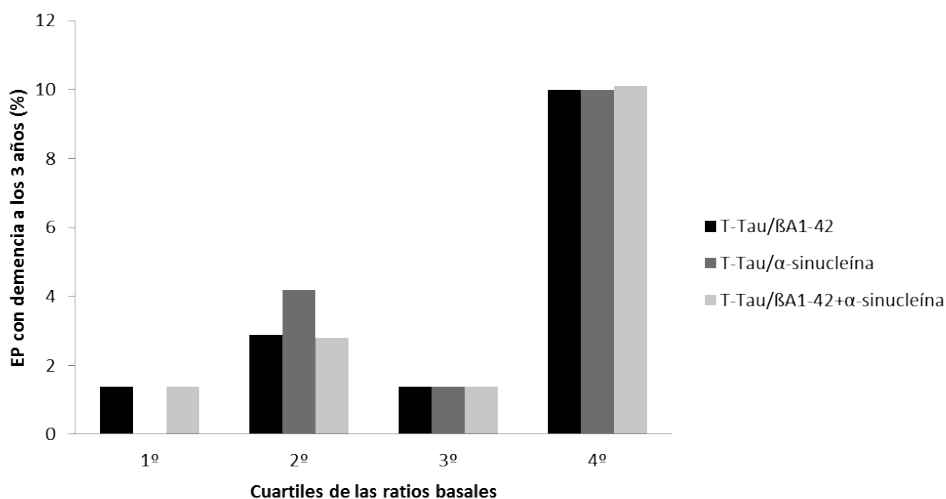
Tras observar que algunas ratios presentaban correlaciones negativas con algunas variables cognitivas, quisimos determinar si alguna de esas ratios era útil para predecir el deterioro en determinadas funciones cognitivas o el desarrollo de demencia en esta cohorte longitudinal. Tras 3 años de seguimiento (media  $36 \pm 1$  meses), 11 pacientes cumplían criterios de DEP (MoCA < 21). En la visita basal esos pacientes eran mayores y tenían una puntuación menor en el MoCA que los que permanecieron sin demencia a los 3 años. Las ratios T-Tau/ $\beta$ A1-42 ( $p=0,001$ ), T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína ( $p=0,004$ ) y T-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína ( $p<0,001$ ) eran mayores en los pacientes que desarrollaron demencia a los 3 años, incluso corrigiendo por la edad y la puntuación basal del MoCA (Tabla 8).

**Tabla 8.** Características basales de los pacientes del PPMI clasificados de acuerdo con su estado cognitivo a los 3 años de evolución.

	EPND (n=270)	DEP (n=11)	p
Edad (años)	60,9 ± 9,9	67,2 ± 4	<0,001
Sexo (nº hombres/%)	173 (64,1%)	6 (54,5%)	0,519
Educación (años)	15,7 ± 2,9	14,5 ± 2,5	0,187
Hoehn y Yahr	1,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5	0,977
UPDRS III	20,2 ± 8,6	19,0 ± 5,9	0,752
MoCA	27,2 ± 2,1	25,5 ± 2,8	0,027
<b>LCR</b>			
βA1-42 (pg/mL)	374,2 ± 98,2	326,7 ± 114,0	0,342
T-Tau (pg/mL)	43,8 ± 16,8	60,2 ± 29,3	0,072
P-Tau (pg/mL)	15,8 ± 10,5	16,2 ± 7,6	0,509
T-Tau/βA1-42	0,122 ± 0,06	0,207 ± 0,12	0,010
P-Tau/βA1-42	0,044 ± 0,03	0,056 ± 0,03	0,151
α-sinucleína (pg/mL)	1833,4 ± 722,1	1638,5 ± 455,2	0,609
T-Tau/α-sinucleína	0,0253 ± 0,007	0,0367 ± 0,013	0,004
P-Tau/α-sinucleína	0,0096 ± 0,008	0,0098 ± 0,003	0,125
T-Tau/Aβ1-42+α-sinucleína	0,0204 ± 0,005	0,0305 ± 0,01	0,003
P-Tau/Aβ1-42+α-sinucleína	0,0077 ± 0,006	0,0082 ± 0,002	>0,999

En los modelos de regresión lineal (Tabla 9) se observó que las ratios T-Tau/βA1-42, T-Tau/α-sinucleína y T-Tau/βA1-42+α-sinucleína eran predictores independientes de caída en la puntuación del MoCA ( $\beta=0,236$   $p<0,001$ ;  $\beta=0,231$   $p<0,001$ ;  $\beta=0,274$   $p<0,001$ ; respectivamente) y en la fluencia semántica ( $\beta=0,176$   $p=0,005$ ;  $\beta=0,126$   $p=0,038$ ;  $\beta=0,147$   $p=0,017$ ; respectivamente). Sólo el índice T-Tau/βA1-42 fue predictor independiente del deterioro en el dominio de memoria ( $\beta=0,141$ ;  $p=0,026$ ). Los modelos de regresión logística demostraron que los pacientes del 4º cuartil de esas

3 ratios (valores de T-Tau/ $\beta$ A1-42  $\geq$  0,137; T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína  $\geq$  0,029; y T-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína  $\geq$  0,023) tenían un riesgo relativo de desarrollar demencia a los 3 años de 5,26 (I.C. al 95% 1,61-14,77; p=0,007), 5,26 (I.C. al 95% 1,61-14,77; p=0,007) y 5,36 (I.C. al 95% 1,64-14,99; p=0,006), respectivamente, al compararlos con los pacientes con valores en el resto de cuartiles (Figura 11).



Ratio	4º cuartil	RR	I.C. 95%	p
T-Tau/A $\beta$ 1-42	0,137	5,26	1,61 - 14,77	0,007
T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína	0,029	5,26	1,61 - 14,77	0,007
T-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína	0,023	5,36	1,64 - 14,99	0,006

**Figura 11.** Pacientes con DEP en el PPMI a los tres años en función del cuartil de las ratios de proteínas (gráfico). Riesgo relativo de tener DEP a los 3 años en los pacientes con valores de las ratios por encima del 4º cuartil (tabla).



**Tabla 9.** Regresión lineal de las principales ratios como predictores de deterioro en cognición global, memoria, atención y memoria de trabajo, fluencia semántica y test de orientación de las líneas de Benton a los 3 años de evolución

	UNIVARIABLE		MULTIVARIABLE	
	Coefficiente	p	Coefficiente	p
<b>MoCA</b>				
Edad	0.229	<0.001		
MoCA basal	0.309	<0.001		
T-Tau/A $\beta$ 1-42	0.295	<0.001	0.236	<0.001
T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína	0.237	<0.001	0.231	<0.001
T-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína	0.297	<0.001	0.274	<0.001
<b>MEMORIA</b>				
Edad	0.133	0.028		
MoCA basal	-0.102	0.094		
T-Tau/A $\beta$ 1-42	0.169	0.005	0.141	0.026
T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína	0.056	0.357		
T-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína	0.097	0.113		
<b>ATENCIÓN Y MEMORIA DE TRABAJO</b>				
Edad	0.005	0.195		
MoCA basal	0.089	0.159		
T-Tau/A $\beta$ 1-42	0.012	0.855		
T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína	-0.088	0.163		
T-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína	-0.058	0.357		

Tabla 9 (continuación)

	UNIVARIABLE		MULTIVARIABLE	
	Coefficiente	p	Coefficiente	p
<b>FLUENCIA SEMÁNTICA</b>				
Edad	0.125	0.038		
MoCA basal	0.012	0.837		
T-Tau/A $\beta$ 1-42	0.198	0.001	0.176	0.005
T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína	0.141	0.020	0.126	0.038
T-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína	0.166	0.006	0.147	0.017
<b>ORIENTACIÓN DE LÍNEAS DE BENTON</b>				
Edad	0.093	0.124		
MoCA basal	-0.077	0.203		
T-Tau/A $\beta$ 1-42	-0.021	0.723		
T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína	-0.064	0.292		
T-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína	-0.051	0.401		

### 3. Enzimas lisosomales

Los resultados de esta parte han dado lugar al **Artículo IV** (Anexo).

Se estudiaron 41 pacientes y 41 controles. Ninguna de las actividades de los enzimas lisosomales medida tenía correlación con la concentración total de proteínas en LCR, por lo que las actividades no se normalizaron.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles en ninguno de los enzimas estudiados, aunque había una tendencia para la  $\beta$ -galactosidasa ( $p=0.06$ ) (Tabla 10).

**Tabla 10.** Características demográficas y clínicas y actividad de enzimas lisosomales de pacientes y controles.

	EP (n=41)	Controles (n=41)	p
Edad (años)	70,9 ± 5,7	69,1 ± 4,2	0,110
Sexo (nº hombres/%)	27 (65,9%)	27 (65,9%)	>0,999
Duración de la enfermedad (años)	7,8 ± 3,9	-	-
Hoehn y Yahr	2,2 ± 0,5	-	-
UPDRS III	22,3 ± 7,6	-	-
β-hexosaminidasa (pmol/min/ml)	2444,7 ± 558,2	2482,9 ± 390,4	0,721
α-fucosidasa (pmol/min/ml)	433,7 ± 148,1	443,4 ± 1014,3	0,731
Catepsina D (pmol/min/ml)	61,9 ± 16,3	64,7 ± 14,3	0,386
β-glucocerebrosidasa (pmol/min/ml)	6,1 ± 1,6	6,5 ± 1,4	0,308
β-galactosidasa (pmol/min/ml)	6,1 ± 2,4	7,1 ± 2,4	0,062

De la muestra de pacientes 24 tenían DCL-EP y 17 eran cognitivamente normales. Los pacientes con DCL-EP eran mayores y tenían menos años de escolarización que los pacientes con EPCN. Ajustando por la edad, la actividad de la catepsina D era menor en los pacientes con EPCN que en los pacientes con DCL-EP ( $p=0.018$ ) y la de β-glucocerebrosidasa presentaba tendencia con  $p=0.58$  (Tabla 11).

## RESULTADOS

**Tabla 11.** Características demográficas y clínicas y actividad de enzimas lisosomales de pacientes con EPCN y DCL-EP

	EPCN (n=17)	DCL-EP (n=24)	p
Edad (años)	67,1 ± 5,9	73,6 ± 3,8	0,001
Sexo (n° hombres/%)	13 (76,5%)	14 (58,3%)	0,228
Duración de la enfermedad (años)	6,9 ± 3,0	8,5 ± 4,5	0,285
Escolarización (años)	13 ± 5	8 ± 4	0,001
H&Y	2 ± 0,4	2,4 ± 0,5	0,062
UPDRS III	19,6 ± 7,9	24,2 ± 7	0,058
MMSE	28,2 ± 2,4	27,2 ± 1,9	0,028
MoCA	25,0 ± 5,0	20,0 ± 3,6	0,001
β-hexosaminidasa (pmol/min/ml)	2362,1 ± 533,6	2503,2 ± 579,0	0,432
α-fucosidasa (pmol/min/ml)	421,4 ± 93,5	442,4 ± 178,5	0,627
Catepsina D (pmol/min/ml)	55,2 ± 12,0	66,6 ± 17,5	0,018*
β-glucoocerebrosidasa (pmol/min/ml)	5,5 ± 1,2	6,5 ± 1,7	0,058
β-galactosidasa (pmol/min/ml)	5,8 ± 1,6	6,3 ± 2,8	0,460

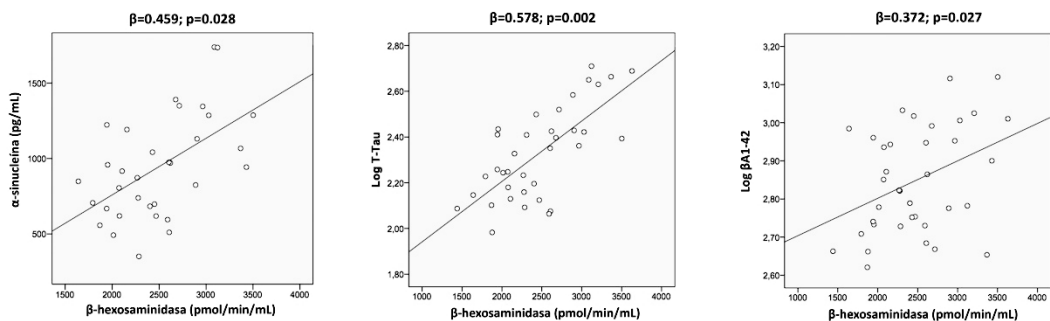
\*Ajustado por edad

En un análisis de correlación se observó que controlando por la edad, la actividad de la catepsina D tenía una correlación positiva con la UPDRS I ( $r=0,331$ ;  $p=0,024$ ), UPDRS IV ( $r=0,351$ ;  $p=0,022$ ), HADS ( $r=0,378$ ;  $p=0,019$ ), and PDQ-39 ( $r=0,330$ ;  $p=0,044$ ). Por otro lado, la α-fucosidasa presentaba una correlación negativa con la escala de H&Y ( $-0,335$ ;  $p=0,021$ ) y la PDQ-39 ( $r=-0,462$ ;  $p=0,002$ ).

En un análisis de correlación entre las actividades de enzimas lisosomales y las puntuaciones z de los dominios cognitivos, la puntuación del MoCA y del MMSE no se observó ninguna correlación.

Un subgrupo de 37 de los 41 pacientes con análisis de enzimas lisosomales disponía también de determinación de βA1-42, T-Tau, P-Tau; y en 34 pacientes se disponía

también de  $\alpha$ -sinucleína. Con estos pacientes se realizó un análisis de correlación para determinar si existía relación entre los niveles de proteínas patológicas y la actividad de alguno de los enzimas estudiados. Así se observó que la actividad de la  $\beta$ -hexosaminidasa tenía una correlación positiva con los niveles de  $\beta$ A1-42 ( $r=0,382$ ;  $p=0,020$ ) y que tanto la actividad de la  $\beta$ -hexosaminidasa como la  $\alpha$ -fucosidasa correlacionaron de forma positiva con los niveles de T-Tau ( $r=0,649$   $p<0,001$  y  $r=0,435$   $p=0,008$ , respectivamente), P-Tau ( $r=0,619$   $p<0,001$  y  $r=0,452$   $p=0,005$ , respectivamente) y  $\alpha$ -sinucleína ( $r=0,541$   $p=0,001$  y  $r=0,387$   $p=0,026$ ). Como la actividad de estas dos últimas enzimas correlacionaba de forma positiva ( $r=0,606$ ;  $p<0,001$ ), se introdujeron como variables independientes junto con la edad en un modelo de regresión lineal para cada una de las proteínas como variables dependientes. De esta forma, sólo la actividad de la  $\beta$ -hexosaminidasa permaneció asociada de forma independiente con los niveles de  $\alpha$ -sinucleína ( $\beta=0,459$ ;  $p=0,028$ ). La correlación de la  $\beta$ -hexosaminidasa con los niveles de  $\beta$ A1-42 se ajustó únicamente por la edad, permaneciendo también significativa ( $\beta=0,372$ ;  $p=0,027$ ) (Figura 12).



**Figura 12.** Correlación entre la actividad de la  $\beta$ -hexosaminidasa y los niveles en LCR de  $\alpha$ -sinucleína y  $\beta$ A1-42.

## VI. Discusión

La presente tesis se ha centrado en el estudio de biomarcadores en LCR y plasma, no sólo para ayudar al diagnóstico de la EP, sino también para monitorizar o predecir una de sus complicaciones más relevantes, el deterioro cognitivo y la progresión a demencia. La aproximación seguida en múltiples estudios de evaluar en LCR las proteínas implicadas en los agregados patológicos presentes en la EP, se ha completado con el cálculo de las ratios entre ellas, el estudio de citoquinas proinflamatorias en LCR y plasma, y la actividad de enzimas lisosomales en LCR. Además, para validar nuestros resultados en lo que respecta al estudio de las proteínas patológicas y sus ratios se ha utilizado la base de datos de la cohorte del PPMI, que contiene datos longitudinales de más de 400 pacientes con EP.

### **Biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson**

El hallazgo principal del Artículo II es que el índice P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína, sólo o en combinación con los valores de TNF- $\alpha$  en LCR, presenta una precisión para diferenciar pacientes con EP de controles mayor que cualquiera de las proteínas estudiadas por separado. Al igual que en trabajos previos (Mollenhauer *et al.*, 2006; Parnetti *et al.*, 2008; Compta *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2010; Montine *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2013; Toledo *et al.*, 2013; Wennstrom *et al.*, 2013), hemos encontrado que los niveles de  $\beta$ A1-42 y de  $\alpha$ -sinucleína en LCR son menores en pacientes que en controles. Sin embargo, el rendimiento diagnóstico de estas dos proteínas para diferenciar pacientes de controles fue muy bajo, de acuerdo con las áreas bajo la curva de sus curvas ROC, que fue de 0,642 para el  $\beta$ A1-42 (I.C. al 95% 0,512-0,766;  $p=0.029$ ) y de 0,685 para la  $\alpha$ -sinucleína (I.C. al 95% 0,560-0,810;  $p=0,008$ ). En la mayoría de estudios previos no se dan resultados de curvas ROC de los niveles de estas proteínas, probablemente debido a que no presentaron valor diagnóstico o fue muy bajo. Sin embargo, en un estudio previo que sí los describió, el área bajo la curva del  $\beta$ A1-42 fue de 0,62 y el de la  $\alpha$ -sinucleína 0,71 (Shi *et al.*, 2011), muy similares a los vistos en nuestro trabajo. Esto probablemente se debe a que los niveles de estas

proteínas tienen una gran dispersión y un alto grado de solapamiento de sus valores entre pacientes y controles.

Los resultados para T-tau y P-Tau de nuestro trabajo concuerdan con los de otros estudios que no han encontrado diferencias en los niveles de estas proteínas entre pacientes y controles (Molina *et al.*, 1997; Jansen Steur *et al.*, 1998; Sjogren *et al.*, 2000; Parnetti *et al.*, 2008; Compta *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2010; Parnetti *et al.*, 2014b; Vranova *et al.*, 2014). No obstante, existe una gran heterogeneidad de resultados con numerosos estudios que han encontrado aumento (Mollenhauer *et al.*, 2006; Compta *et al.*, 2009; Prikrylova Vranova *et al.*, 2010; Toledo *et al.*, 2013) o disminución (Montine *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2013; Stav *et al.*, 2015) de las especies de tau.

Tanto el índice T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína como el índice P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína, o este índice en combinación con los niveles de TNF- $\alpha$  mostraron unas ABC buenas para el diagnóstico de la EP. Parnetti y colaboradores evaluaron los índices T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína, P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína y  $\beta$ A1-42/ $\alpha$ -sinucleína en la diferenciación de pacientes con EP de controles y otras enfermedades como DCLw, EA y demencia frontotemporal. En su estudio encontraron que el mejor rendimiento para la diferenciación de pacientes frente a controles fue el de la ratio T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína, con un área bajo la curva de 0,765, una sensibilidad del 89% y una especificidad del 61% (Parnetti *et al.*, 2011). Los valores de la curva ROC de la ratio P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína no se dan en este artículo, aunque se dice que son “algo menores”. De cualquier manera, el área bajo la curva de la ratio P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína en nuestro trabajo puede ser superior: 0,856 (IC al 95% 0,767-0,945;  $p = 0,001$ ) con una sensibilidad del 92.9% y una especificidad del 75% para un punto de corte de la ratio  $\leq 0,710$ .

Además de estos dos índices, evaluamos otros: T-Tau/ $\beta$ A1-42, P-Tau/ $\beta$ A1-42, T-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína y P-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sinucleína ya que en la EP, especialmente en estadios avanzados, hay una alta prevalencia de patología tipo Alzheimer (Hurtig *et al.*, 2000; Mattila *et al.*, 2000; Sabbagh *et al.*, 2009; Irwin *et al.*, 2012). Algunos estudios han evaluado las ratios formadas por T-Tau o P-Tau y  $\beta$ A1-42 con resultados heterogéneos. Prikrylova y colaboradores no encontraron diferencias en



la ratio T-Tau/ $\beta$ A1-42 (duración media de la enfermedad de  $4,4 \pm 3,6$  años), pero hay que tener en cuenta que el tamaño muestral era relativamente pequeño (32 pacientes y 30 controles) (Prikrylova Vranova *et al.*, 2010). Por otro lado, en un estudio preliminar de la base del PPMI se encontró que este índice estaba disminuido en pacientes con EP *de novo* (duración media 0.4 años) respecto de controles, pero hay que tener en cuenta que la magnitud del cambio no era grande (0,240 frente a 0,215) y que el nivel de significación fue de 0,45 (Kang *et al.*, 2013).

En nuestra cohorte, tanto la ratio P-Tau/ $\beta$ A1-42 como la T-Tau/ $\beta$ A1-42 están elevadas en pacientes respecto de controles, pero sus áreas bajo la curva no son buenas como para que puedan ser consideradas biomarcadores diagnósticos de EP. Tomando como ejemplo estas ratios, diseñamos las ratios compuestas por  $\beta$ A1-42 +  $\alpha$ -sinucleína en el denominador. Dado que la mayoría de estudios sugieren que el  $\beta$ A1-42 y la  $\alpha$ -sinucleína están disminuidos en el LCR de pacientes, se incluyó la  $\alpha$ -sinucleína en el denominador, ya que el sentido de su variación sería el mismo que el del  $\beta$ A1-42. Sin embargo, aunque estas ratios se encontraron elevadas en pacientes, sus áreas bajo la curva no fueron mayores que las de sus homólogas formadas únicamente por T-Tau o P-Tau y  $\alpha$ -sinucleína. Esto podría deberse a que los depósitos de  $\alpha$ -sinucleína son más relevantes en el desarrollo de la EP que los de  $\beta$ A1-42. Sin embargo, como se discutirá más adelante, los depósitos de  $\beta$ A, y por tanto los índices formados por  $\beta$ A1-42, podrían tener más relación con el desarrollo de determinadas manifestaciones de la enfermedad, como el deterioro cognitivo.

Los resultados encontrados en la cohorte del PPMI refuerzan los resultados de nuestra cohorte. Al comparar los niveles de  $\beta$ A1-42, T-Tau, P-Tau y  $\alpha$ -sinucleína en LCR de forma individual, ninguna de estas proteínas difirió entre los pacientes y los controles del PPMI. Sin embargo, cuando comparamos los índices que habíamos usado en nuestra cohorte, dos de ellos, se encontraron significativamente elevados en pacientes: el índice P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína y el índice P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína+ $\beta$ A1-42. Esto resulta especialmente interesante, ya que estos dos índices son los que mayor área bajo la curva mostraron en nuestra cohorte. Sin embargo, al realizar el análisis de curvas ROC de estos índices en la cohorte del PPMI, sus áreas bajo la curva no alcanzaron valores

estadísticamente significativos (P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína 0.551 [p=0.113] y P-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -sinucleína 0.553 [p=0.098]). Esto y el hecho de que en el PPMI no se hayan encontrado diferencias en otros índices que sí fueron diferentes en nuestra cohorte podría deberse a que los pacientes incluidos en la cohorte del PPMI son de reciente diagnóstico, con una evolución media de la enfermedad de 6 meses, a diferencia de los pacientes de nuestra cohorte, que tenían una duración media de 8 años. Por otro lado, hay que tener en cuenta que al ser una cohorte de pacientes *de novo*, no se puede descartar la presencia de parkinsonismos atípicos, que sólo se pueden identificar tras años de evolución. Además, no se puede descartar que no existan diferencias en los métodos analíticos utilizados. Por tanto, podría hipotetizarse que, dado que el índice P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína es el que mejor área bajo la curva mostró en nuestra cohorte y es uno de los dos índices que muestran diferencias en la corte del PPMI, podría ser el índice que antes se altera con la EP y ser un buen candidato como biomarcador de enfermedad.

De las dos citoquinas que alcanzaron niveles detectables en LCR, el TNF- $\alpha$  estaba aumentado en el LCR de pacientes al compararlos con controles, en línea con un estudio previo (Mogi *et al.*, 1994b) y en contraposición a otro en el que no se encontraron diferencias (Lindqvist *et al.*, 2013). Resulta de especial interés el hecho de que al combinar los niveles de TNF- $\alpha$  con la ratio P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína en nuestra cohorte se obtuvo una curva ROC con unos parámetros muy buenos. Un trabajo previo utilizó una aproximación similar utilizando índices formado por complemento 3/ $\beta$ A1-42 y factor H/  $\beta$ A1-42. Aunque estas ratios fueron mayores en pacientes que en controles, su valor diagnóstico no mejoraba el de ambas proteínas inflamatorias por separado. Nosotros, por primera vez, hemos demostrado que la combinación de un marcador de inflamación con proteínas de agregación patológica resulta en unos parámetros de curva ROC discretamente superiores.

Los niveles de IL-6 en LCR no fueron diferentes entre los pacientes y los controles, a diferencia de los pocos estudios que han evaluado esta citoquina en LCR, que han encontrado niveles aumentados en pacientes en comparación con controles (Blum-Degen *et al.*, 1995; Mogi *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1998). Esta discrepancia podría

deberse importantes diferencias metodológicas, ya que esos estudios utilizaron ELISA como método de detección mientras que en nuestro estudio utilizamos un ensayo multiplex. Además, en uno de ellos el LCR se obtuvo de los ventrículos (Mogi *et al.*, 1996). Por otro lado, tampoco en nuestra cohorte se encontraron diferencias en la IL-6 plasmática, lo que también está en desacuerdo con estudios previos en los que se encontró elevada (Dobbs *et al.*, 1999; Brodacki *et al.*, 2008; Scalzo *et al.*, 2010; Lindqvist *et al.*, 2012) o disminuida (Dursun *et al.*, 2015). En este caso, las discrepancias entre nuestro estudio y los previos puede deberse, entre otros, a la diferencia en los kits de ELISA utilizados.

Sin embargo existía una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de IL-6 y las UPDRS I, II y III, lo cual indicaría que niveles crecientes de IL-6 se asocian con una mayor gravedad de la enfermedad tanto a nivel motor, como no motor. Un estudio previo ha encontrado que niveles elevados de IL-6 plasmática se asocian con alteraciones en diversos aspectos motores como la velocidad de deambulación o velocidad de transferencia de sentado a levantado, entre otros (Scalzo *et al.*, 2010).

Aunque el papel de la inflamación en la EP aún no se comprende del todo, la evidencia disponible en los últimos años sugiere que la inflamación derivada del estrés oxidativo y la toxicidad producida por citoquinas pueden contribuir a la degeneración nigroestriatal y a acelerar la progresión de la EP (Tansey and Goldberg, 2010; Edison *et al.*, 2013). En estudios post-mortem se ha demostrado que existe un aumento de microglía activada y de los niveles de diversas citoquinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 e IL-6 en la SN de pacientes con EP (Mogi *et al.*, 1994a; Mogi *et al.*, 1996; Hunot *et al.*, 1999; Imamura *et al.*, 2003). En estudios in vivo, mediante PET con [<sup>11</sup>C](R)PK11195 (1-(2-clorofenil)-N-metil-N-(1-metilpropil)-3-isoquinolina carboxamida) se ha verificado una hiperactivación de la microglía en diversas áreas corticales, mayor cuanto más avanza la enfermedad (Edison *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2015). Curiosamente, en un estudio con microarrays de expresión, se observó que la región lateral de la SN, la que antes degenera en la EP, presentaba un patrón de expresión con un incremento de genes que codifican para citoquinas proinflamatorias (Duke *et al.*, 2007). Además, la mayoría de estos genes se expresan en

altos niveles en las células de la glía (Chung *et al.*, 2005). A diferencia de las neuronas del hipocampo o la corteza, las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas son exquisitamente sensibles a las propiedades deletéreas de las citoquinas, como el TNF- $\alpha$  (Block *et al.*, 2007). Y además, la región mesencefálica donde se encuentran las neuronas dopaminérgicas es la que presenta una mayor densidad de microglía (Lawson *et al.*, 1990). Todo esto sugiere que la microglía puede estar activada desde etapas tempranas en el desarrollo de la enfermedad, produciendo una respuesta aberrante o exagerada ante diversos estímulos.

La microglía es una población de células del sistema fagocítico mononuclear establecidas en el SNC que, en condiciones normales, se encarga de la eliminación de células que entran en apoptosis como parte de procesos fisiológicos (Hickey and Kimura, 1988). La microglía libera TNF- $\alpha$  en respuesta al daño celular, como parte de la respuesta inmune innata. En modelos *in vitro* de células dopaminérgicas se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  reduce la degradación de  $\alpha$ -sinucleína a través de la alteración de la acidificación de los lisosomas (Wang *et al.*, 2015). Además, el TNF- $\alpha$  estimula a las  $\gamma$ - y  $\beta$ -secretasas, enzimas implicadas en la proteólisis de la proteína precursora de amiloide y por tanto aumenta la producción de  $\beta$ A1-42. En consonancia con estos datos, fármacos con efecto inhibitor sobre el TNF- $\alpha$ , como la pentoxifilina o el XPro<sup>®</sup>1595 han demostrado efectos neuroprotectores en el modelo de rata con 6-OHDA (Barnum *et al.*, 2014; Neves *et al.*, 2015). De esta forma, puede que se establezca un bucle, en el que la inflamación perpetúa e incrementa la neurodegeneración, que a su vez produce una retroalimentación positiva de la inflamación.

La IL-6 es una interleuquina importante en la respuesta inmune innata. Se sabe que las formas mutadas de  $\alpha$ -sinucleína asociadas con la EP autosómica dominante inducen la expresión de IL-6 en astrocitos (Klegeris *et al.*, 2006). Sin embargo, el papel de la IL-6 en la neuroinflamación y en la EP es complejo. Aunque inicialmente se pensaba que era un citoquina puramente proinflamatoria, posteriores estudios han demostrado que también posee propiedades antiinflamatorias, como por ejemplo, antagonizar las acciones de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , entre otras. La IL-6 es capaz de inducir la agregación

de ubiquitina,  $\alpha$ -sinucleína y tau en cultivos de células gliales (Bick *et al.*, 2008). Sin embargo, por otro lado, se ha demostrado que la IL-6 es capaz de rescatar la muerte de neuronas dopaminérgicas inducida por 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP+) (Akaneya *et al.*, 1995) y que en ratones knock out para IL-6 la vulnerabilidad al MPTP era mayor (Bolin *et al.*, 2002).

## Deterioro cognitivo leve y demencia

En el Artículo III se han evaluado las proteínas de agregación “clásicas” y sus índices en LCR así como citoquinas en LCR y plasma como candidatos a biomarcadores de DCL-EP o progresión a demencia. Los principales resultados de este trabajo son que en nuestra cohorte los índices T-Tau/ $\beta$ A1-42 y T-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -sinucleína T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína y P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína presentan correlaciones con diversas medidas cognitivas. De esas ratios, tres de ellas (T-Tau/A $\beta$ 1-42, T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína y T-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -sinucleína) demostraron ser predictores independientes de progresión a demencia o empeoramiento en memoria en la cohorte del PPMI.

No hubo diferencias en ninguna de las proteínas ni en sus índices entre pacientes con DCL-EP y pacientes con EPCN. Sin embargo, se encontraron algunas correlaciones interesantes. Controlando por la edad, se encontró que las ratios T-Tau/ $\beta$ A1-42 y T-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -sinucleína presentaban una correlación negativa con la puntuación z del dominio memoria. Por otro lado, se observó que las ratios T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína y P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína tenían una correlación negativa con la puntuación de la intersección de los pentágonos. Finalmente, la ratio T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína también correlacionaba negativamente con la puntuación del MoCA.

Resulta muy interesante el hecho de que al explorar estas mismas ratios en la cohorte del PPMI, tres de ellas, T-Tau/ $\beta$ A1-42, T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína y T-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -sinucleína, se encontraron elevadas en los pacientes que a los tres años desarrollaron DEP. Por ello, se exploró si estas ratios predecían el deterioro cognitivo global o en dominios específicos. Para ello, se crearon modelos de regresión lineal que tenían como

variable dependiente la caída en diferentes dominios o test neuropsicológicos. Como en la base del PPMI no había test suficientes para obtener puntuaciones  $z$  de todos los dominios, se utilizaron las puntuaciones brutas de algunos test de forma individual como reflejo del estado de algunos dominios. Así se obtuvieron modelos para el declive en MoCA,  $z$  de memoria,  $z$  de atención y memoria de trabajo, fluencia semántica y el test de la Orientación de las líneas de Benton. Para cada dominio o test se hicieron modelos con cada ratio, introduciendo la edad y/o la puntuación del MoCA basal como covariables, cuando fue apropiado. De esta forma se comprobó que estas tres ratios eran predictores de forma independiente de la caída en la puntuación del MoCA y en la fluencia semántica. Únicamente la ratio T-Tau/A $\beta$ 1-42 fue predictor del declive en memoria. La predicción del declive en fluencia semántica y memoria es especialmente relevante, ya que el deterioro de estas funciones se ha asociado con la progresión a demencia (Muslimovic *et al.*, 2007; Broeders *et al.*, 2013a) y aquí por primera vez se proponen biomarcadores para la predicción de su empeoramiento.

En un último paso se quiso cuantificar, de alguna manera, la influencia de estas ratios sobre el riesgo de desarrollar DEP. Para ello, se realizaron 3 modelos de regresión logística en los que la variable dependiente fue la presencia o no de DEP a los tres años. Como variable independiente en cada modelo se introdujeron las ratios categorizadas en cuartiles. Así se encontró que los pacientes con valores de las tres ratios por encima del 4º cuartil presentaron un riesgo unas 5 veces superior que el de los pacientes del resto de cuartiles de desarrollar DEP a los 3 años de evolución.

**Tabla 12.** Características en LCR de las proteínas de agregación y sus ratios, correlación con diferentes medidas cognitivas y capacidad diagnóstica o predictiva.

	$\beta$ A	T-Tau	P-Tau	$\alpha$ -sin	T-Tau/ $\beta$ A1-42	P-Tau/ $\beta$ A1-42	T-Tau/ $\alpha$ -sin	P-Tau/ $\alpha$ -sin	T-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sin	P-Tau/ $\beta$ A1-42+ $\alpha$ -sin
EP <sup>1</sup>	↓	=	=	↓	=	=	↑	↑, D	↑	↑
DCL-EP <sup>2</sup>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
DEP	-	-	-	-	P	-	P	-	P	-
Cognición global	-	-	-	-	P	-	P, C	-	P	-
Memoria	-	-	-	-	P, C	-	-	-	C	-
Pentágonos	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-
F. semántica	-	-	-	-	P	-	P		P	-

<sup>1</sup>comparados con controles.

<sup>2</sup>comparados con pacientes con EPCN.

Abreviaturas: D, diagnóstico; P, predictor; C, correlación

Tanto en nuestra cohorte como en la del PPMI, las proteínas de forma individual no han mostrado ninguna utilidad como biomarcadores de deterioro cognitivo o demencia. Sin embargo, los diferentes índices se han asociado con la capacidad cognitiva en diferentes dominios o test en nuestra cohorte y con la progresión del deterioro cognitivo en la cohorte del PPMI. Este hecho es de gran relevancia y puede traducir la naturaleza heterogénea de la patología del deterioro cognitivo y la demencia en la EP, como se ha demostrado en estudios neuropatológicos (Hurtig *et al.*, 2000; Jellinger, 2006; Sabbagh *et al.*, 2009; Adler *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2010; Irwin *et al.*, 2012). De hecho, se ha comprobado que existe correlación entre la patología tipo Lewy y tipo Alzheimer (Apaydin *et al.*, 2002) y que la combinación de ambas correlaciona de forma muy robusta con la DEP (Compta *et al.*, 2011b). Esto concuerda con múltiples estudios *in vitro* e *in vivo* que muestran múltiples interacciones entre las proteínas que se agregan en la DEP. Así mientras que el  $\beta$ A induce la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína (Masliah *et al.*, 2001), la  $\alpha$ -sinucleína a su vez es capaz de inducir la agregación del  $\beta$ A1-42 (Clinton *et al.*, 2010). Además, la  $\alpha$ -sinucleína promueve la hiperfosforilación de tau (Frasier *et al.*, 2005), así como las inclusiones de tau en neuronas (Guo *et al.*, 2013).

Esta heterogeneidad y complejidad patológica y bioquímica, puede estar en relación con la gran heterogeneidad clínica observada en el deterioro cognitivo de la EP. En efecto, aunque el constructo DCL-EP delimita un subgrupo de pacientes con EP, la heterogeneidad clínica de este subgrupo es muy grande. La cantidad y tipo de dominios cognitivos afectados entre sujetos es muy variable y lo que es más importante, aunque el DCL-EP es un factor de riesgo de progresión a demencia, no todos los pacientes con DCL-EP acaban desarrollándola. Y este es quizás uno de los puntos clave en el estudio de biomarcadores de deterioro cognitivo, diferenciar a los pacientes con DCL-EP que tienen más riesgo de evolucionar a demencia.

El hecho de que en nuestra cohorte las ratios T-tau/A $\beta$ 1-42 correlacionaran con la ejecución en el dominio de memoria y de que en la cohorte del PPMI se asociara con el declive en este mismo dominio podría ser relevante. Estos índices, formados por las proteínas implicadas en la patología tipo Alzheimer podrían constituir un biomarcador



útil en la identificación de un tipo específico de DCL-EP. Es más, dado que en el PPMI su elevación en pacientes con EP *de novo* predice el desarrollo de demencia, sugiere que estos índices podrían servir como biomarcadores desde fases tempranas de la enfermedad, incluso antes de que aparezca DCL-EP. En concreto, podría servir para identificar a aquellos pacientes con mayores cambios patológicos tipo Alzheimer y con mayor declive en memoria, en consonancia con estudios previos en los que el deterioro en memoria marcaba la progresión a demencia (Muslimovic *et al.*, 2007; Williams-Gray *et al.*, 2009).

Por otro lado, la ratio T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína presentó una correlación negativa con la puntuación de la copia de los pentágonos en nuestra cohorte. Estudios previos han encontrado que rendimientos bajos en esta prueba se asocian con conversión a DEP (Williams-Gray *et al.*, 2013; Gasca-Salas *et al.*, 2014). El hecho de que no hayamos encontrado correlación con el dominio de función visuoespacial en nuestra cohorte ni capacidad de predicción sobre el test de orientación de las líneas de Benton en el PPMI, podría ser un aspecto relevante. En este sentido el test de la copia de los pentágonos, podría ser una prueba más específica para detectar el deterioro de la función visuoespacial en la EP en relación a una mayor carga de patología tipo Lewy en regiones posteriores (Schneider *et al.*, 2012).

Así pues, vemos que diferentes índices se asocian con deterioro en diferentes dominios que pueden estar señalando a subgrupos de pacientes con más riesgo de deteriorarse desde el punto de vista cognitivo. Estos resultados podrían ser objeto de futuros estudios para corroborarlos y delimitar subgrupos de DCL-EP con diferentes riesgos de progresión a demencia.

Por otro lado, ninguna de las ratios se asoció con peor ejecución en los dominios de función ejecutiva o atención y memoria de trabajo en nuestra cohorte o con un mayor declive en estas funciones en la cohorte del PPMI. Este hecho resulta interesante ya que va en consonancia con las diferentes líneas de evidencia que sugieren que aunque las funciones dependientes de los circuitos prefrontales están alteradas en la EP y empeoran conforme avanza la enfermedad, su fisiopatología se relaciona

fundamentalmente con el déficit dopaminérgico y no se asociaría a demencia. En esta hipótesis, sería el deterioro en dominios tales como memoria o función visuoespacial, cuyo sustrato se encuentra en disfunción de regiones más posteriores en relación a la presencia de patología EA y extensión de los CL, el que se asocia con la progresión a demencia (Kehagia *et al.*, 2013). Por tanto, el hecho de que ninguno de los índices aquí estudiados se asocie con deterioro de en funciones ejecutivas y atención y sí con dominios de memoria y función visuoespacial refuerza su valor como candidatos biomarcadores de deterioro cognitivo.

Respecto a la inflamación, no hemos encontrado diferencias en los niveles de citoquinas en LCR o plasma entre pacientes con DCL-EP y pacientes con EPCN. En estudios previos, la IL-6 en LCR se ha encontrado aumentada en pacientes con DEP (Lindqvist *et al.*, 2013) o con DCL-EP (Yu *et al.*, 2014) y sus niveles correlacionaban de forma negativa con el rendimiento global en cognición (Lindqvist *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014). Esta discrepancia podría deberse a los diferentes métodos utilizados para medir las proteínas ya que estos estudios han utilizado ELISA, aunque también hay que tener en cuenta que el tamaño muestral de nuestra cohorte para encontrar diferencias entre ambos grupos puede ser pequeño. Sin embargo, si se encontró en nuestra cohorte una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de IL-6 y la puntuación del MoCA y la puntuación z del dominio de lenguaje. Este resultado converge parcialmente con los de estudios previos en los que se han encontrado correlaciones negativas entre los niveles plasmáticos de IL-6 y cognición global (Menza *et al.*, 2010; Scalzo *et al.*, 2010). Sin embargo, la correlación encontrada en nuestro trabajo con la puntuación z de lenguaje tiene especial interés, dado que el declive en este dominio se ha relacionado previamente con la progresión a demencia en la EP (Williams-Gray *et al.*, 2007; Pagonabarraga *et al.*, 2008).

La relación de la inflamación con el deterioro cognitivo en la EP es aún más desconocida que su papel en la patogenia de la enfermedad, previamente descrito. Son escasos los estudios que han evaluado el estado de diversas citoquinas en relación al deterioro cognitivo o la demencia en la EP. Sin embargo, existen múltiples evidencias que sugieren que la inflamación influye de forma negativa sobre la cognición. La edad

es un factor de riesgo para la EP y para el deterioro cognitivo en la población general y la neuroinflamación aumenta con la edad. De hecho, se ha demostrado que existe una relación inversa entre los niveles periféricos de TNF- $\alpha$  y la función cognitiva entre los 50 y los 60 años en sujetos sanos (Jefferson *et al.*, 2011). Además, se sabe que las enfermedades inflamatorias crónicas, como por ejemplo la periodontitis crónica, tienen un efecto deletéreo sobre la cognición (Kamer *et al.*, 2012). Por otro lado, en modelos animales se ha demostrado que como consecuencia de un proceso inflamatorio agudo se produce una pérdida de memoria que se asociaba con una microgliosis reactiva y un aumento de la transcripción y la expresión de IL-1 $\beta$  en el hipocampo (Cibelli *et al.*, 2010). De hecho, el bloqueo del receptor de IL-1 $\beta$  disminuía la disfunción cognitiva (Cibelli *et al.*, 2010). Los estudios que aportan datos sobre la relación de la inflamación con el deterioro cognitivo en la EP son muy escasos. Mediante PET con [ $^{11}\text{C}$ ] (R) PK11195(1-(2-chlorofenil)-N-metil-N-(1-metilpropil)-3-isoquinolina carboxamida) se ha observado que los pacientes con DEP comparados con los que no dementes tienen un aumento de la activación microglial en diversas áreas, incluyendo las cortezas frontal y temporal (Gerhard *et al.*, 2006).

### **Enzimas lisosomales y enfermedad de Parkinson**

En el Artículo IV se ha evaluado la actividad de 6 enzimas lisosomales en el LCR de pacientes y controles. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, al dividir la muestra de pacientes en pacientes con DCL-EP y pacientes con EPCN, se encontró un aumento en la actividad de la catepsina D en los primeros. Además, en la muestra global de pacientes la actividad de este enzima correlacionaba positivamente con las puntuaciones de la UPDRS I y IV, la HADS y la PDQ-39. Por otro lado, la  $\alpha$ -fucosidasa, mostró una correlación negativa con las puntuaciones de la escala de Hoehn y Yahr y la PDQ-39. Finalmente, se encontró que la actividad de la  $\beta$ -hexosaminidasa presentaba una correlación positiva con los niveles de  $\alpha$ -sinucleína,  $\beta\text{A}$  y tau total.

Los trabajos que han estudiado la actividad de enzimas lisosomales en LCR de pacientes con EP son escasos. La actividad de la catepsina D (van Dijk *et al.*, 2013),  $\beta$ -galactosidasa (van Dijk *et al.*, 2013), y  $\beta$ -hexosaminidasa (Parnetti *et al.*, 2014a) se han encontrado elevadas, y la de la  $\alpha$ -fucosidasa (van Dijk *et al.*, 2013), la  $\alpha$ - y  $\beta$ -manosidasa (Balducci *et al.*, 2007) y la glucocerebrosidasa (Balducci *et al.*, 2007; Parnetti *et al.*, 2014a) se han encontrado disminuidas en pacientes comparándolos con controles. Las líneas de investigación sobre función lisosomal en la EP se iniciaron fundamentalmente tras conocer que mutaciones en el gen *GBA* son un factor de riesgo de EP (Sidransky *et al.*, 2009; Anheim *et al.*, 2012) y que la actividad lisosomal a través de la autofagia es fundamental en la degradación de la  $\alpha$ -sinucleína. De hecho, en estudios en cultivos celulares la inhibición de este enzima induce la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína y disfunción mitocondrial (Cleeter *et al.*, 2013), y en la SN de pacientes con EP su actividad está disminuida (Gegg *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado que en tejido post mortem, la reducción de la actividad de la glucocerebrosidasa se asociaba con un aumento de la  $\alpha$ -sinucleína (Murphy *et al.*, 2014). Así pues, la disminución de la actividad de la glucocerebrosidasa encontrada en varios trabajos (Balducci *et al.*, 2007; Parnetti *et al.*, 2014a) en LCR podría reflejar esas deficiencias a nivel celular. Sin embargo, en uno de los estudios citados previamente, el déficit de actividad fue mayor en pacientes en fases más tempranas de la enfermedad que en aquellos con EP avanzada (Parnetti *et al.*, 2014a). Nuestros resultados no confirman ninguno de los hallazgos previos respecto a las diferencias en la actividad de las enzimas entre pacientes y controles.

La falta de diferencias en nuestro estudio podría deberse al tamaño muestral que es menor que en dos de los estudios previos (van Dijk *et al.*, 2013; Parnetti *et al.*, 2014a). Sin embargo, en el tercer estudio el tamaño muestral era notablemente menor que el nuestro (12 pacientes y 20 controles) por lo que otros factores han de influir en las diferencias de resultados. Es importante recordar que la actividad de los enzimas lisosomales puede ser susceptible a múltiples factores previos al análisis, que pueden influir en sus determinaciones. Se ha descrito que el tiempo entre la extracción y la centrifugación, el tiempo hasta su congelación, la duración del almacenamiento hasta

su análisis, y los ciclos de descongelado, son factores que pueden influir en el resultado final (Persichetti, 2014).

La actividad de la catepsina D correlacionó positivamente con la UPDRS I y IV, la escala HADS y la escala PDQ-39. Así, niveles de actividad elevados estarían asociados con un incremento de la gravedad en síntomas no motores, en complicaciones motoras, y en síntomas de ansiedad y depresión y con una disminución en la calidad de vida. Además, en los pacientes con DCL-EP, la actividad de este enzima se encontró más alta que en pacientes cognitivamente normales. La catepsina D es una proteasa aspártica que suele estar presente en compartimentos vacuolares ácidos. Entre sus funciones, se ha implicado en la degradación de la  $\alpha$ -sinucleína a través de la autofagia mediada por chaperonas (Vidoni *et al.*, 2016). De hecho, en ratones knock out para el gen de este enzima, se observa una gran acumulación de  $\alpha$ -sinucleína (Qiao *et al.*, 2008). Si asumimos que la actividad en LCR de este enzima refleja su actividad intracelular en las neuronas, su elevación en pacientes con mayor gravedad y en aquellos con DCL-EP podría interpretarse como un mecanismo compensador en un intento de la célula de degradar más  $\alpha$ -sinucleína. Sin embargo, se ha descrito que la actividad proteolítica de la catepsina D también puede inducir muerte neuronal. Cuando se produce la permeabilización de los lisosomas en respuesta a diversos estímulos, la catepsina D y otras hidrolasas del mismo tamaño, salen al citosol, donde terminan activando la apoptosis mediada por caspasas (Castino *et al.*, 2007; Comitato *et al.*, 2014). Uno de los estímulos que induce la permeabilización de los lisosomas es la peroxidación de su membrana lipídica, que se produce como consecuencia de la generación de especies de oxígeno reactivas, un proceso que está aumentado en la EP (Sanders and Greenamyre, 2013). También el acúmulo de oligómeros de  $\beta$ A en los lisosomas se ha relacionado con la salida de catepsina D al citosol y con la muerte neuronal (Umeda *et al.*, 2011). Así pues, aunque los niveles elevados de actividad de catepsina D en LCR podrían formar parte inicialmente de un mecanismo compensador, podrían finalmente ser un factor que indujera mayor muerte neuronal, incrementando el proceso de neurodegeneración.

La actividad de la  $\alpha$ -fucosidasa correlacionaba negativamente con la escala de Hoehn y Yahr y con la PDQ-39. El sentido de esta correlación, por el cual niveles mayores de actividad se asocian con una menor gravedad y una mayor calidad de vida, concuerda con el resultado de un estudio previo en el que se observó una menor actividad de este enzima en pacientes comparados con controles (van Dijk *et al.*, 2013). La  $\alpha$ -fucosidasa está implicada en la degradación de glucoproteínas y glucolípidos que contienen fucosa. Hasta ahora se desconoce la relación que puede tener este enzima con la neurodegeneración. Se conoce que en la fucosidosis, enfermedad muy rara causada por un defecto en la  $\alpha$ -fucosidasa, predominan las manifestaciones neurológicas, como deterioro motor y cognitivo progresivos y crisis epilépticas. En tejido post mortem de pacientes con esta grave afectación se han apreciado vacuolización de neuronas cerebrales en cerebelo y células de la glía, con pérdida de neuronas en el tálamo, el núcleo dentado y cerebelo (Bugiani and Borrone, 1976). Por el momento no hay ningún estudio que haya relacionado directamente la  $\alpha$ -fucosidasa con la patología tipo Lewy. Sin embargo, la disminución en la actividad de este enzima podría tener un papel similar al de otras enzimas, como la glucocerebrosidasa (Chu *et al.*, 2009).

Las correlaciones de la actividad de la  $\beta$ -hexosaminidasa con las proteínas de agregación en LCR no habían sido descritas hasta ahora. En el presente trabajo se ha encontrado una correlación positiva entre la actividad de este enzima y los niveles de  $\beta$ A,  $\alpha$ -sinucleína y T-Tau en LCR. Los niveles de  $\beta$ A y  $\alpha$ -sinucleína reducidos en LCR observados en la EP se interpretan como una medida subrogada del aumento de los depósitos de ambas proteínas a nivel cerebral. Así pues, de acuerdo con nuestros resultados, la disminución de la actividad en la  $\beta$ -hexosaminidasa se asociaría con una mayor carga patológica tanto de tipo Alzheimer como de tipo Lewy. Aunque no hay estudios neuropatológicos que hayan evaluado los niveles de este enzima a nivel neuronal, hay estudios *in vitro* y en animales que sugieren que este enzima podría estar implicado en los depósitos patológicos de proteínas. En un modelo en ratón de enfermedades lisosomal con deficiencia en  $\beta$ -hexosaminidasa se ha demostrado que tanto la  $\alpha$ -sinucleína como el  $\beta$ A se acumulan en la SN (Keilani *et al.*, 2012) y el acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína induce pérdida de neuronas dopaminérgicas (Cachon-Gonzalez *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2016). La relación de la  $\beta$ -hexosaminidasa con los

niveles de tau en LCR podría tener la misma explicación, ya que en ratones *knock out* para  $\beta$ -hexosaminidasa se han demostrado inclusiones similares a tau fosforilada (Keilani *et al.*, 2012). Sin embargo, dado que los niveles de tau en LCR de pacientes con EP muestra una gran heterogeneidad entre estudios (Andersen *et al.*, 2017) no se puede saber con seguridad si niveles crecientes traducen una mayor carga patológica o no y, por tanto, el papel de su correlación positiva con la actividad de la  $\beta$ -hexosaminidasa no queda claro.

### Consideraciones finales

En los estudio de biomarcadores en LCR o plasma en la EP hay un alto grado de dispersión de sus valores, muchas veces acompañado de un gran solapamiento entre los grupos de comparación. Además, la variabilidad de resultados entre estudios es muy considerable. Un aspecto clave que hay que tener en cuenta a la hora de estudiar biomarcadores de EP es la gran heterogeneidad clínica, genética y patológica de esta enfermedad. Así, por poner algunos ejemplos, bajo el paraguas de la EP encontramos formas tremóricas con mejor pronóstico y formas rigidoacinélicas o con trastorno de la marcha más graves; formas asociadas a mutaciones en GBA con patología tipo Lewy y formas asociadas a parkina sin cuerpos de Lewy; y pacientes con una mayor carga de patología tipo Alzheimer que otros. En este contexto quizás buscar un único biomarcador para todos los pacientes no sea una aproximación acertada. Puede que con el paso del tiempo el modo de entender la EP cambie pasando a ser más un síndrome con múltiples causas y diferentes biomarcadores. Nuestros resultados pueden ser relevantes, dado que pueden sentar las bases para futuros estudios en los que se intente diferenciar de una forma más exhaustiva todos los subtipos

Cabe destacar que la combinación de diferentes proteínas en forma de ratios o mediante modelos de regresión es una aproximación que se ha comenzado a explorar en los últimos años y mediante la cual se suelen obtener por regla general mejores resultados en cuanto a precisión diagnóstica que con los potenciales biomarcadores por

separado. De hecho, como se puede comprobar con nuestros resultados y en los de otros trabajos, ninguna de las proteínas asociadas con patología tipo Lewy o tipo Alzheimer ha demostrado tener una sensibilidad y especificidad suficientes para poder ser considerados biomarcadores diagnósticos de la EP. Sin embargo, al formar ratios como los descritos en esta tesis, se mejora considerablemente la sensibilidad y especificidad.

Respecto a la diferenciación entre pacientes con DCL-EP de pacientes cognitivamente normales se establece quizás un mayor nivel de dificultad a la hora de encontrar un biomarcador capaz de diferenciarlos. El DCL-EP no produce grandes alteraciones cognitivas en los pacientes y de hecho, como se ha visto, su diagnóstico requiere la utilización de unos criterios muy exhaustivos. Además, dentro del constructo DCL-EP existe a su vez una gran variabilidad clínica con afectación de dominios muy diferentes entre unos pacientes y otros. De hecho, muchos pacientes con DCL-EP permanecen estables a lo largo de la evolución de la enfermedad. Lo que sería crucial por tanto, es la identificación de aquellos pacientes con mayor riesgo de desarrollar demencia. Estaríamos hablando entonces de biomarcadores pronósticos y su descubrimiento es más complejo ya que se requieren estudios longitudinales.

A medida que se aportan más resultados de posibles biomarcadores de EP o de deterioro cognitivo en la EP estamos más cerca de conseguir un biomarcador preciso. Sin embargo, los resultados sobre los mecanismos patogénicos de la enfermedad están haciendo ver cada vez un escenario más complejo en el que múltiples mecanismos intervienen confluyendo en muchos puntos. De hecho, aunque existe una vía final en la que predomina la agregación de proteínas de forma patológica, es probable que los caminos que llevan a esta vía final sean diferentes en función del “tipo de EP”.

Por tanto, dada la complejidad de esta enfermedad, puede que la clave esté en desterrar la idea de obtener un solo biomarcador. Aunque es menos atractivo que tener un biomarcador único es probable que mediante la combinación de datos en LCR, clínicos y de imagen podamos estar más cerca de disponer de biomarcadores.



## VII. Conclusiones

- Los niveles de  $\beta$ -amiloide y  $\alpha$ -sinucleína en LCR están disminuidos en pacientes con EP de varios años de evolución comparados con controles, pero no en pacientes con EP de reciente diagnóstico. En este grupo, solo la reducción de  $\alpha$ -sinucleína, que se acercó a la significación estadística, podría tener valor diagnóstico.
- Las ratios formadas por T-Tau o P-Tau y  $\alpha$ -sinucleína sola o en combinación con  $\beta$ A1-42 están aumentadas en todos los pacientes con EP, independientemente de la evolución de la enfermedad.
- El rendimiento diagnóstico de estas ratios para diferenciar pacientes con EP de controles es mayor que el de las proteínas que las componen de forma aislada siendo la ratio P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína la que muestra mejor rendimiento diagnóstico en pacientes con enfermedad avanzada.
- La combinación de la ratio P-Tau/ $\alpha$ -sinucleína con los niveles de TNF- $\alpha$  tiene un mejor rendimiento diagnóstico que la de la ratio sola, por lo que podría servir como biomarcador diagnóstico de EP.
- La IL-6 en plasma se correlaciona con la gravedad de la EP, tanto en manifestaciones motoras como en no motoras y con su impacto en las actividades de la vida diaria, así como con deterioro cognitivo global, por lo que podría servir como biomarcador de la progresión de la EP.
- Las ratios T-Tau/ $\beta$ A1-42, T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína y T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína+ $\beta$ A1-42 son predictores independientes de empeoramiento en cognición global y en fluencia semántica y de progresión a demencia. Los valores de estas ratios por encima del 4º cuartil confieren un riesgo unas 5 veces superior de presentar demencia temprana (a los 3 años de evolución) en pacientes con EP *de novo*.
- Valores elevados de la ratio T-Tau/ $\beta$ A1-42 se asocian con deterioro de memoria y son predictores de declive temprano en este dominio cognitivo.

- Valores elevados de las ratios formadas por tau (T-tau and P-tau) y  $\alpha$ -sinucleína se asociaron con deterioro visuoespacial solo en el test de copia de los pentágonos.
- Diferentes ratios entre estas proteínas podrían ser útiles en la identificación de diferentes subtipos de DCL-EP y como biomarcadores de aquellos pacientes con más riesgo de demencia. a corto-medio plazo (T-Tau/ $\beta$ A1-42, T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína, P-Tau/  $\alpha$ -sinucleína y T-Tau/ $\alpha$ -sinucleína+ $\beta$ A1-42).
- Las proteínas aisladas no se asociaron con rendimiento cognitivo global ni en ningún dominio, ni con el deterioro a corto-medio plazo de los mismos, mostrando que las ratios entre proteínas tienen un mejor perfil diagnóstico.
- La actividad en LCR de la catepsina D está elevada en pacientes con DCL-EP y presenta una correlación positiva con índices de gravedad motora y no motora, por lo que podría ser útil como biomarcador de deterioro cognitivo y gravedad de la enfermedad.
- La actividad de la  $\beta$ -hexosaminidasa en LCR presenta una correlación positiva con los niveles de T-tau,  $\alpha$ -sinucleína y  $\beta$ A1-42, lo que sugiere que la actividad de esta enzima lisosomal pudiera ser relevante en la formación de los agregados proteicos cerebrales de la EP.

## VIII. Bibliografía

- Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Lolk A, Kragh-Sorensen P. Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study. *Arch Neurol* 2003a; 60(3): 387-92.
- Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Lolk A, Nielsen H, Kragh-Sorensen P. Risk of dementia in Parkinson's disease: a community-based, prospective study. *Neurology* 2001a; 56(6): 730-6.
- Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Perry R, Wentzel-Larsen T, Lolk A, *et al.* The rate of cognitive decline in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2004a; 61(12): 1906-11.
- Aarsland D, Ballard C, Larsen JP, McKeith I. A comparative study of psychiatric symptoms in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with and without dementia. *Int J Geriatr Psychiatry* 2001b; 16(5): 528-36.
- Aarsland D, Bronnick K, Ehrt U, De Deyn PP, Tekin S, Emre M, *et al.* Neuropsychiatric symptoms in patients with Parkinson's disease and dementia: frequency, profile and associated care giver stress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78(1): 36-42.
- Aarsland D, Bronnick K, Williams-Gray C, Weintraub D, Marder K, Kulisevsky J, *et al.* Mild cognitive impairment in Parkinson disease: a multicenter pooled analysis. *Neurology* 2010; 75(12): 1062-9.
- Aarsland D, Cummings JL, Larsen JP. Neuropsychiatric differences between Parkinson's disease with dementia and Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2001c; 16(2): 184-91.
- Aarsland D, Kramberger MG. Neuropsychiatric Symptoms in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* 2015; 5(3): 659-67.
- Aarsland D, Larsen JP, Karlsen K, Lim NG, Tandberg E. Mental symptoms in Parkinson's disease are important contributors to caregiver distress. *Int J Geriatr Psychiatry* 1999a; 14(10): 866-74.
- Aarsland D, Larsen JP, Lim NG, Janvin C, Karlsen K, Tandberg E, *et al.* Range of neuropsychiatric disturbances in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999b; 67(4): 492-6.
- Aarsland D, Larsen JP, Tandberg E, Laake K. Predictors of nursing home placement in Parkinson's disease: a population-based, prospective study. *J Am Geriatr Soc* 2000; 48(8): 938-42.
- Aarsland D, Litvan I, Larsen JP. Neuropsychiatric symptoms of patients with progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2001d; 13(1): 42-9.

- Aarsland D, Litvan I, Salmon D, Galasko D, Wentzel-Larsen T, Larsen JP. Performance on the dementia rating scale in Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies: comparison with progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003b; 74(9): 1215-20.
- Aarsland D, Mosimann UP, McKeith IG. Role of cholinesterase inhibitors in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2004b; 17(3): 164-71.
- Aarsland D, Perry R, Brown A, Larsen JP, Ballard C. Neuropathology of dementia in Parkinson's disease: a prospective, community-based study. *Ann Neurol* 2005a; 58(5): 773-6.
- Aarsland D, Zaccai J, Brayne C. A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005b; 20(10): 1255-63.
- Abbott RD, Ross GW, Petrovitch H, Tanner CM, Davis DG, Masaki KH, *et al.* Bowel movement frequency in late-life and incidental Lewy bodies. *Mov Disord* 2007; 22(11): 1581-6.
- Abe T, Isobe C, Murata T, Sato C, Tohgi H. Alteration of 8-hydroxyguanosine concentrations in the cerebrospinal fluid and serum from patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2003; 336(2): 105-8.
- Abramov AY, Gegg M, Grunewald A, Wood NW, Klein C, Schapira AH. Bioenergetic consequences of PINK1 mutations in Parkinson disease. *PLoS One* 2011; 6(10): e25622.
- Adler CH, Caviness JN, Sabbagh MN, Shill HA, Connor DJ, Sue L, *et al.* Heterogeneous neuropathological findings in Parkinson's disease with mild cognitive impairment. *Acta Neuropathol* 2010; 120(6): 827-8.
- Adler CH, Dugger BN, Hentz JG, Hinni ML, Lott DG, Driver-Dunckley E, *et al.* Peripheral Synucleinopathy in Early Parkinson's Disease: Submandibular Gland Needle Biopsy Findings. *Mov Disord* 2016; 31(2): 250-6.
- Agosta F, Canu E, Stojkovic T, Pievani M, Tomic A, Sarro L, *et al.* The topography of brain damage at different stages of Parkinson's disease. *Hum Brain Mapp* 2013; 34(11): 2798-807.
- Akaneya Y, Takahashi M, Hatanaka H. Interleukin-1 beta enhances survival and interleukin-6 protects against MPP+ neurotoxicity in cultures of fetal rat dopaminergic neurons. *Exp Neurol* 1995; 136(1): 44-52.

- Ala TA, Hughes LF, Kyrouac GA, Ghobrial MW, Elble RJ. Pentagon copying is more impaired in dementia with Lewy bodies than in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 70(4): 483-8.
- Alves G, Bronnick K, Aarsland D, Blennow K, Zetterberg H, Ballard C, *et al.* CSF amyloid-beta and tau proteins, and cognitive performance, in early and untreated Parkinson's disease: the Norwegian ParkWest study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81(10): 1080-6.
- Allan LM, Ballard CG, Burn DJ, Kenny RA. Prevalence and severity of gait disorders in Alzheimer's and non-Alzheimer's dementias. *J Am Geriatr Soc* 2005; 53(10): 1681-7.
- Andersen AD, Binzer M, Stenager E, Gramsbergen JB. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson's disease - a systematic review. *Acta Neurol Scand* 2017; 135(1): 34-56.
- Anheim M, Elbaz A, Lesage S, Durr A, Condroyer C, Viallet F, *et al.* Penetrance of Parkinson disease in glucocerebrosidase gene mutation carriers. *Neurology* 2012; 78(6): 417-20.
- Ansari R, Mahta A, Mallack E, Luo JJ. Hyperhomocysteinemia and neurologic disorders: a review. *J Clin Neurol* 2014; 10(4): 281-8.
- Apaydin H, Ahlskog JE, Parisi JE, Boeve BF, Dickson DW. Parkinson disease neuropathology: later-developing dementia and loss of the levodopa response. *Arch Neurol* 2002; 59(1): 102-12.
- Arnulf I, Konofal E, Merino-Andreu M, Houeto JL, Mesnage V, Welter ML, *et al.* Parkinson's disease and sleepiness: an integral part of PD. *Neurology* 2002; 58(7): 1019-24.
- Ascherio A, Zhang SM, Hernan MA, Kawachi I, Colditz GA, Speizer FE, *et al.* Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. *Ann Neurol* 2001; 50(1): 56-63.
- Athauda D, Foltynie T. The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 2015; 11(1): 25-40.
- Baggio HC, Sala-Llonch R, Segura B, Marti MJ, Valldeoriola F, Compta Y, *et al.* Functional brain networks and cognitive deficits in Parkinson's disease. *Hum Brain Mapp* 2014.
- Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 2008; 319(5865): 916-9.

- Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, *et al.* Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology* 2000; 55(9): 1358-63.
- Balducci C, Pierguidi L, Persichetti E, Parnetti L, Sbaragli M, Tassi C, *et al.* Lysosomal hydrolases in cerebrospinal fluid from subjects with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007; 22(10): 1481-4.
- Ballanger B, Strafella AP, van Eimeren T, Zurowski M, Rusjan PM, Houle S, *et al.* Serotonin 2A receptors and visual hallucinations in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2010; 67(4): 416-21.
- Ballard C, Holmes C, McKeith I, Neill D, O'Brien J, Cairns N, *et al.* Psychiatric morbidity in dementia with Lewy bodies: a prospective clinical and neuropathological comparative study with Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 1999; 156(7): 1039-45.
- Ballard CG, Aarsland D, McKeith I, O'Brien J, Gray A, Cormack F, *et al.* Fluctuations in attention: PD dementia vs DLB with parkinsonism. *Neurology* 2002; 59(11): 1714-20.
- Ballard PA, Tetrud JW, Langston JW. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology* 1985; 35(7): 949-56.
- Barnum CJ, Chen X, Chung J, Chang J, Williams M, Grigoryan N, *et al.* Peripheral administration of the selective inhibitor of soluble tumor necrosis factor (TNF) XPro(R)1595 attenuates nigral cell loss and glial activation in 6-OHDA hemiparkinsonian rats. *J Parkinsons Dis* 2014; 4(3): 349-60.
- Baudrexel S, Nurnberger L, Rub U, Seifried C, Klein JC, Deller T, *et al.* Quantitative mapping of T1 and T2\* discloses nigral and brainstem pathology in early Parkinson's disease. *Neuroimage* 2010; 51(2): 512-20.
- Beach TG, Adler CH, Lue L, Sue LI, Bachalakuri J, Henry-Watson J, *et al.* Unified staging system for Lewy body disorders: correlation with nigrostriatal degeneration, cognitive impairment and motor dysfunction. *Acta Neuropathol* 2009; 117(6): 613-34.
- Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, *et al.* Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 2010; 119(6): 689-702.



- Beach TG, Monsell SE, Phillips LE, Kukull W. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005-2010. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; 71(4): 266-73.
- Benarroch EE. The locus ceruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance. *Neurology* 2009; 73(20): 1699-704.
- Benito-Leon J, Bermejo-Pareja F, Morales-Gonzalez JM, Porta-Etessam J, Trincado R, Vega S, *et al.* Incidence of Parkinson disease and parkinsonism in three elderly populations of central Spain. *Neurology* 2004; 62(5): 734-41.
- Benoit M, Robert PH, Staccini P, Brocker P, Guerin O, Lechowski L, *et al.* One-year longitudinal evaluation of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. The REAL.FR Study. *J Nutr Health Aging* 2005; 9(2): 95-9.
- 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.
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O. [Distribution of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the human brain and its behavior in patients with Parkinson's syndrome]. *Klin Wochenschr* 1961; 39: 1056-9.
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 1973; 20(4): 415-55.
- Bertrand E, Lewandowska E, Stepien T, Szpak GM, Pasennik E, Modzelewska J. Amyloid angiopathy in idiopathic Parkinson's disease. Immunohistochemical and ultrastructural study. *Folia Neuropathol* 2008; 46(4): 255-70.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000; 3(12): 1301-6.
- Beyer MK, Alves G, Hwang KS, Babakchian S, Bronnick KS, Chou YY, *et al.* Cerebrospinal fluid Abeta levels correlate with structural brain changes in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013; 28(3): 302-10.
- Bialecka M, Kurzawski M, Roszmann A, Robowski P, Sitek EJ, Honczarenko K, *et al.* Association of COMT, MTHFR, and SLC19A1(RFC-1) polymorphisms with homocysteine blood levels and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Pharmacogenet Genomics* 2012; 22(10): 716-24.
- Bick RJ, Poindexter BJ, Kott MM, Liang YA, Dinh K, Kaur B, *et al.* Cytokines disrupt intracellular patterns of Parkinson's disease-associated proteins alpha-synuclein, tau and ubiquitin in cultured glial cells. *Brain Res* 2008; 1217: 203-12.

- Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69(3): 89-95.
- Birkmayer W, Hornykiewicz O. [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien Klin Wochenschr* 1961; 73: 787-8.
- Biundo R, Formento-Dojot P, Facchini S, Vallelunga A, Ghezzi L, Foscolo L, *et al.* Brain volume changes in Parkinson's disease and their relationship with cognitive and behavioural abnormalities. *J Neurol Sci* 2011; 310(1-2): 64-9.
- Biundo R, Weis L, Facchini S, Formento-Dojot P, Vallelunga A, Pilleri M, *et al.* Cognitive profiling of Parkinson disease patients with mild cognitive impairment and dementia. *Parkinsonism Relat Disord* 2014; 20(4): 394-9.
- Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8(1): 57-69.
- Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 1995; 202(1-2): 17-20.
- Bohnen NI, Albin RL, Koeppe RA, Wernette KA, Kilbourn MR, Minoshima S, *et al.* Positron emission tomography of monoaminergic vesicular binding in aging and Parkinson disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006a; 26(9): 1198-212.
- Bohnen NI, Albin RL, Muller ML, Petrou M, Kotagal V, Koeppe RA, *et al.* Frequency of cholinergic and caudate nucleus dopaminergic deficits across the predemented cognitive spectrum of Parkinson disease and evidence of interaction effects. *JAMA Neurol* 2015; 72(2): 194-200.
- Bohnen NI, Kaufer DI, Hendrickson R, Constantine GM, Mathis CA, Moore RY. Cortical cholinergic denervation is associated with depressive symptoms in Parkinson's disease and parkinsonian dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78(6): 641-3.
- Bohnen NI, Kaufer DI, Hendrickson R, Ivanco LS, Lopresti BJ, Constantine GM, *et al.* Cognitive correlates of cortical cholinergic denervation in Parkinson's disease and parkinsonian dementia. *J Neurol* 2006b; 253(2): 242-7.
- Bohnen NI, Kaufer DI, Ivanco LS, Lopresti B, Koeppe RA, Davis JG, *et al.* Cortical cholinergic function is more severely affected in parkinsonian dementia than in Alzheimer disease: an in vivo positron emission tomographic study. *Arch Neurol* 2003; 60(12): 1745-8.

- Bohnen NI, Koeppe RA, Minoshima S, Giordani B, Albin RL, Frey KA, *et al.* Cerebral glucose metabolic features of Parkinson disease and incident dementia: longitudinal study. *J Nucl Med* 2011; 52(6): 848-55.
- Bohnen NI, Muller ML, Koeppe RA, Studenski SA, Kilbourn MA, Frey KA, *et al.* History of falls in Parkinson disease is associated with reduced cholinergic activity. *Neurology* 2009; 73(20): 1670-6.
- Bohnen NI, Muller ML, Kotagal V, Koeppe RA, Kilbourn MA, Albin RL, *et al.* Olfactory dysfunction, central cholinergic integrity and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Brain* 2010; 133(Pt 6): 1747-54.
- Bolam JP, Pissadaki EK. Living on the edge with too many mouths to feed: why dopamine neurons die. *Mov Disord* 2012; 27(12): 1478-83.
- Bolin LM, Strycharska-Orczyk I, Murray R, Langston JW, Di Monte D. Increased vulnerability of dopaminergic neurons in MPTP-lesioned interleukin-6 deficient mice. *J Neurochem* 2002; 83(1): 167-75.
- Bosboom JL, Stoffers D, Wolters E. The role of acetylcholine and dopamine in dementia and psychosis in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 2003(65): 185-95.
- Bosboom JL, Stoffers D, Wolters E. Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 2004; 111(10-11): 1303-15.
- Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006; 396(1): 67-72.
- Braak H, Sastre M, Bohl JR, de Vos RA, Del Tredici K. Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol* 2007; 113(4): 421-9.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, Kozłowska E, Drela N, Chalimoniuk M, *et al.* Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci Lett* 2008; 441(2): 158-62.
- Broeders M, de Bie RM, Velseboer DC, Speelman JD, Muslimovic D, Schmand B. Evolution of mild cognitive impairment in Parkinson disease. *Neurology* 2013a; 81(4): 346-52.

- Broeders M, Velseboer DC, de Bie R, Speelman JD, Muslimovic D, Post B, *et al.* Cognitive change in newly-diagnosed patients with Parkinson's disease: a 5-year follow-up study. *J Int Neuropsychol Soc* 2013b; 19(6): 695-708.
- Broen MP, Narayen NE, Kuijf ML, Dissanayaka NN, Leentjens AF. Prevalence of anxiety in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 2016; 31(8): 1125-33.
- Bronner G, Royter V, Korczyn AD, Giladi N. Sexual dysfunction in Parkinson's disease. *J Sex Marital Ther* 2004; 30(2): 95-105.
- Bronnick K, Ehrt U, Emre M, De Deyn PP, Wesnes K, Tekin S, *et al.* Attentional deficits affect activities of daily living in dementia-associated with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77(10): 1136-42.
- Brooks DJ. Neuroimaging in Parkinson's disease. *NeuroRx* 2004; 1(2): 243-54.
- Broussolle E, Krack P, Thobois S, Xie-Brustolin J, Pollak P, Goetz CG. Contribution of Jules Froment to the study of parkinsonian rigidity. *Mov Disord* 2007; 22(7): 909-14.
- Bruck A, Portin R, Lindell A, Laihinen A, Bergman J, Haaparanta M, *et al.* Positron emission tomography shows that impaired frontal lobe functioning in Parkinson's disease is related to dopaminergic hypofunction in the caudate nucleus. *Neurosci Lett* 2001; 311(2): 81-4.
- Buddhala C, Campbell MC, Perlmutter JS, Kotzbauer PT. Correlation between decreased CSF alpha-synuclein and Aβeta(1-42) in Parkinson disease. *Neurobiol Aging* 2015; 36(1): 476-84.
- Bugiani O, Borrone C. Fucosidosis: a neuropathological study. *Riv Patol Nerv Ment* 1976; 97(3): 133-41.
- Burn DJ, Rowan EN, Allan LM, Molloy S, O'Brien JT, McKeith IG. Motor subtype and cognitive decline in Parkinson's disease, Parkinson's disease with dementia, and dementia with Lewy bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77(5): 585-9.
- Cachon-Gonzalez MB, Wang SZ, Ziegler R, Cheng SH, Cox TM. Reversibility of neuropathology in Tay-Sachs-related diseases. *Hum Mol Genet* 2014; 23(3): 730-48.
- Calne DB, Snow BJ, Lee C. Criteria for diagnosing Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1992; 32 Suppl: S125-7.

- Camicioli RM, Bouchard TP, Somerville MJ. Homocysteine is not associated with global motor or cognitive measures in nondemented older Parkinson's disease patients. *Mov Disord* 2009; 24(2): 176-82.
- Castino R, Bellio N, Nicotra G, Follo C, Trincheri NF, Isidoro C. Cathepsin D-Bax death pathway in oxidative stressed neuroblastoma cells. *Free Radic Biol Med* 2007; 42(9): 1305-16.
- Cerasa A, Messina D, Pugliese P, Morelli M, Lanza P, Salsone M, *et al.* Increased prefrontal volume in PD with levodopa-induced dyskinesias: a voxel-based morphometry study. *Mov Disord* 2011; 26(5): 807-12.
- Ceravolo R, Volterrani D, Frosini D, Bernardini S, Rossi C, Logi C, *et al.* Brain perfusion effects of cholinesterase inhibitors in Parkinson's disease with dementia. *J Neural Transm (Vienna)* 2006; 113(11): 1787-90.
- Cibelli M, Fidalgo AR, Terrando N, Ma D, Monaco C, Feldmann M, *et al.* Role of interleukin-1beta in postoperative cognitive dysfunction. *Ann Neurol* 2010; 68(3): 360-8.
- Cleeter MW, Chau KY, Gluck C, Mehta A, Hughes DA, Duchen M, *et al.* Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage. *Neurochem Int* 2013; 62(1): 1-7.
- Clinton LK, Blurton-Jones M, Myczek K, Trojanowski JQ, LaFerla FM. Synergistic Interactions between Abeta, tau, and alpha-synuclein: acceleration of neuropathology and cognitive decline. *J Neurosci* 2010; 30(21): 7281-9.
- Collins LM, Toulouse A, Connor TJ, Nolan YM. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 2012; 62(7): 2154-68.
- Colloby SJ, Williams ED, Burn DJ, Lloyd JJ, McKeith IG, O'Brien JT. Progression of dopaminergic degeneration in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with and without dementia assessed using 123I-FP-CIT SPECT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32(10): 1176-85.
- Comella CL, Nardine TM, Diederich NJ, Stebbins GT. Sleep-related violence, injury, and REM sleep behavior disorder in Parkinson's disease. *Neurology* 1998; 51(2): 526-9.
- Comitato A, Sanges D, Rossi A, Humphries MM, Marigo V. Activation of Bax in three models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(6): 3555-62.

- Compta Y, Ezquerra M, Munoz E, Tolosa E, Valldeoriola F, Rios J, *et al.* High cerebrospinal tau levels are associated with the rs242557 tau gene variant and low cerebrospinal beta-amyloid in Parkinson disease. *Neurosci Lett* 2011a; 487(2): 169-73.
- Compta Y, Marti MJ, Ibarretxe-Bilbao N, Junque C, Valldeoriola F, Munoz E, *et al.* Cerebrospinal tau, phospho-tau, and beta-amyloid and neuropsychological functions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2009; 24(15): 2203-10.
- Compta Y, Parkkinen L, O'Sullivan SS, Vandrovцова J, Holton JL, Collins C, *et al.* Lewy- and Alzheimer-type pathologies in Parkinson's disease dementia: which is more important? *Brain* 2011b; 134(Pt 5): 1493-505.
- Compta Y, Pereira JB, Rios J, Ibarretxe-Bilbao N, Junque C, Bargallo N, *et al.* Combined dementia-risk biomarkers in Parkinson's disease: a prospective longitudinal study. *Parkinsonism Relat Disord* 2013; 19(8): 717-24.
- Compta Y, Valente T, Saura J, Segura B, Iranzo A, Serradell M, *et al.* Correlates of cerebrospinal fluid levels of oligomeric- and total-alpha-synuclein in premotor, motor and dementia stages of Parkinson's disease. *J Neurol* 2015; 262(2): 294-306.
- Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, *et al.* Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 2006; 313(5785): 324-8.
- Cooper JA, Sagar HJ, Doherty SM, Jordan N, Tidswell P, Sullivan EV. Different effects of dopaminergic and anticholinergic therapies on cognitive and motor function in Parkinson's disease. A follow-up study of untreated patients. *Brain* 1992; 115 ( Pt 6): 1701-25.
- Cormack F, Aarsland D, Ballard C, Tovee MJ. Pentagon drawing and neuropsychological performance in Dementia with Lewy Bodies, Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Parkinson's disease with dementia. *Int J Geriatr Psychiatry* 2004; 19(4): 371-7.
- Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, Ritz B. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol* 2009; 169(8): 919-26.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R. Experimental treatment of parkinsonism with L-Dopa. *Neurology* 1968; 18(3): 276-7.
- Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med* 1967; 276(7): 374-9.

- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 2004; 305(5688): 1292-5.
- Cummings JL, Darkins A, Mendez M, Hill MA, Benson DF. Alzheimer's disease and Parkinson's disease: comparison of speech and language alterations. *Neurology* 1988; 38(5): 680-4.
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH, National Institute for Clinical E. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 2006; 5(3): 235-45.
- Chen-Plotkin AS, Hu WT, Siderowf A, Weintraub D, Goldmann Gross R, Hurtig HI, *et al.* Plasma epidermal growth factor levels predict cognitive decline in Parkinson disease. *Ann Neurol* 2011; 69(4): 655-63.
- Cheng AV, Ferrier IN, Morris CM, Jabeen S, Sahgal A, McKeith IG, *et al.* Cortical serotonin-2 receptor binding in Lewy body dementia, Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Neurol Sci* 1991; 106(1): 50-5.
- Cheng HC, Ulane CM, Burke RE. Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Ann Neurol* 2010; 67(6): 715-25.
- Cho ZH, Oh SH, Kim JM, Park SY, Kwon DH, Jeong HJ, *et al.* Direct visualization of Parkinson's disease by in vivo human brain imaging using 7.0T magnetic resonance imaging. *Mov Disord* 2011; 26(4): 713-8.
- Choi SA, Evidente VG, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Connor DJ, *et al.* Are there differences in cerebral white matter lesion burdens between Parkinson's disease patients with or without dementia? *Acta Neuropathol* 2010; 119(1): 147-9.
- Christopher L, Marras C, Duff-Canning S, Koshimori Y, Chen R, Boileau I, *et al.* Combined insular and striatal dopamine dysfunction are associated with executive deficits in Parkinson's disease with mild cognitive impairment. *Brain* 2014; 137(Pt 2): 565-75.
- Chu Y, Dodiya H, Aebischer P, Olanow CW, Kordower JH. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol Dis* 2009; 35(3): 385-98.
- Chung CY, Seo H, Sonntag KC, Brooks A, Lin L, Isacson O. Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. *Hum Mol Genet* 2005; 14(13): 1709-25.

- Dalrymple-Alford JC, Livingston L, MacAskill MR, Graham C, Melzer TR, Porter RJ, *et al.* Characterizing mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011; 26(4): 629-36.
- Dalrymple-Alford JC, MacAskill MR, Nakas CT, Livingston L, Graham C, Crucian GP, *et al.* The MoCA: well-suited screen for cognitive impairment in Parkinson disease. *Neurology* 2010; 75(19): 1717-25.
- Daniel SE, Lees AJ. Parkinson's Disease Society Brain Bank, London: overview and research. *J Neural Transm Suppl* 1993; 39: 165-72.
- Davis JW, Grandinetti A, Waslien CI, Ross GW, White LR, Morens DM. Observations on serum uric acid levels and the risk of idiopathic Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 1996; 144(5): 480-4.
- de Lau LM, Giesbergen PC, de Rijk MC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study. *Neurology* 2004; 63(7): 1240-4.
- de Lau LM, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Serum uric acid levels and the risk of Parkinson disease. *Ann Neurol* 2005a; 58(5): 797-800.
- de Lau LM, Schipper CM, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Prognosis of Parkinson disease: risk of dementia and mortality: the Rotterdam Study. *Arch Neurol* 2005b; 62(8): 1265-9.
- de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, *et al.* Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 2000; 54(11 Suppl 5): S21-3.
- Del Tredici K, Braak H. Dysfunction of the locus coeruleus-norepinephrine system and related circuitry in Parkinson's disease-related dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; 84(7): 774-83.
- Delgado-Alvarado M, de la Riva P, Jimenez-Urbieta H, Gago B, Gabilondo A, Bornstein B, *et al.* Parkinsonism, cognitive deficit and behavioural disturbance caused by a novel mutation in the polymerase gamma gene. *J Neurol Sci* 2015; 350(1-2): 93-7.
- den Brok MG, van Dalen JW, van Gool WA, Moll van Charante EP, de Bie RM, Richard E. Apathy in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 2015; 30(6): 759-69.
- Djaldetti R, Lev N, Melamed E. Lesions outside the CNS in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2009; 24(6): 793-800.



- Dobbs RJ, Charlett A, Purkiss AG, Dobbs SM, Weller C, Peterson DW. Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurol Scand* 1999; 100(1): 34-41.
- Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, *et al.* Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 2007; 68(5): 384-6.
- Double KL, Reyes S, Werry EL, Halliday GM. Selective cell death in neurodegeneration: why are some neurons spared in vulnerable regions? *Prog Neurobiol* 2010; 92(3): 316-29.
- Driver JA, Logroschino G, Gaziano JM, Kurth T. Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. *Neurology* 2009; 72(5): 432-8.
- Du G, Lewis MM, Styner M, Shaffer ML, Sen S, Yang QX, *et al.* Combined R2\* and diffusion tensor imaging changes in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011; 26(9): 1627-32.
- Dujardin K, Sockeel P, Devos D, Delliaux M, Krystkowiak P, Destee A, *et al.* Characteristics of apathy in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007; 22(6): 778-84.
- Duke DC, Moran LB, Pearce RK, Graeber MB. The medial and lateral substantia nigra in Parkinson's disease: mRNA profiles associated with higher brain tissue vulnerability. *Neurogenetics* 2007; 8(2): 83-94.
- Dursun E, Gezen-Ak D, Hanagasi H, Bilgic B, Lohmann E, Ertan S, *et al.* The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *J Neuroimmunol* 2015; 283: 50-7.
- Edison P, Ahmed I, Fan Z, Hinz R, Gelosa G, Ray Chaudhuri K, *et al.* Microglia, amyloid, and glucose metabolism in Parkinson's disease with and without dementia. *Neuropsychopharmacology* 2013; 38(6): 938-49.
- Edison P, Rowe CC, Rinne JO, Ng S, Ahmed I, Kemppainen N, *et al.* Amyloid load in Parkinson's disease dementia and Lewy body dementia measured with [11C]PIB positron emission tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79(12): 1331-8.
- Edvardson S, Cinnamon Y, Ta-Shma A, Shaag A, Yim YI, Zenvirt S, *et al.* A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PLoS One* 2012; 7(5): e36458.

- Eisenberg E, Greene LE. Multiple roles of auxilin and hsc70 in clathrin-mediated endocytosis. *Traffic* 2007; 8(6): 640-6.
- Ekman U, Eriksson J, Forsgren L, Mo SJ, Riklund K, Nyberg L. Functional brain activity and presynaptic dopamine uptake in patients with Parkinson's disease and mild cognitive impairment: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2012; 11(8): 679-87.
- El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Curran MD, Gibson MJ, Court JA, *et al.* Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 2006; 20(3): 419-25.
- Elbaz A, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, *et al.* Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J Clin Epidemiol* 2002; 55(1): 25-31.
- Elgh E, Domellof M, Linder J, Edstrom M, Stenlund H, Forsgren L. Cognitive function in early Parkinson's disease: a population-based study. *Eur J Neurol* 2009; 16(12): 1278-84.
- Elizan TS, Sroka H, Maker H, Smith H, Yahr MD. Dementia in idiopathic Parkinson's disease. Variables associated with its occurrence in 203 patients. *J Neural Transm* 1986; 65(3-4): 285-302.
- Emre M. Treatment of dementia associated with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2007; 13 Suppl 3: S457-61.
- Emre M, Aarsland D, Albanese A, Byrne EJ, Deuschl G, De Deyn PP, *et al.* Rivastigmine for dementia associated with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2004; 351(24): 2509-18.
- Emre M, Aarsland D, Brown R, Burn DJ, Duyckaerts C, Mizuno Y, *et al.* Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007; 22(12): 1689-707; quiz 837.
- Engelborghs S, Maertens K, Nagels G, Vloeberghs E, Marien P, Symons A, *et al.* Neuropsychiatric symptoms of dementia: cross-sectional analysis from a prospective, longitudinal Belgian study. *Int J Geriatr Psychiatry* 2005; 20(11): 1028-37.
- Ergun U, Bozbas A, Akin U, Inan L. Musical hallucinations and Parkinson disease. *Neurologist* 2009; 15(3): 150-2.
- Fahn S, Libsch LR, Cutler RW. Monoamines in the human neostriatum: topographic distribution in normals and in Parkinson's disease and their role in akinesia, rigidity, chorea, and tremor. *J Neurol Sci* 1971; 14(4): 427-55.

- Fan Z, Aman Y, Ahmed I, Chetelat G, Landeau B, Ray Chaudhuri K, *et al.* Influence of microglial activation on neuronal function in Alzheimer's and Parkinson's disease dementia. *Alzheimers Dement* 2015; 11(6): 608-21 e7.
- Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991; 114 ( Pt 5): 2283-301.
- Feldmann A, Illes Z, Kosztolanyi P, Illes E, Mike A, Kover F, *et al.* Morphometric changes of gray matter in Parkinson's disease with depression: a voxel-based morphometry study. *Mov Disord* 2008; 23(1): 42-6.
- Fenelon G, Mahieux F, Huon R, Ziegler M. Hallucinations in Parkinson's disease: prevalence, phenomenology and risk factors. *Brain* 2000; 123 ( Pt 4): 733-45.
- Figiel G, Sadowsky C. A systematic review of the effectiveness of rivastigmine for the treatment of behavioral disturbances in dementia and other neurological disorders. *Curr Med Res Opin* 2008; 24(1): 157-66.
- Fleming CE, Nunes AF, Sousa MM. Transthyretin: more than meets the eye. *Prog Neurobiol* 2009; 89(3): 266-76.
- Fletcher P, Leake A, Marion MH. Patients with Parkinson's disease dementia stay in the hospital twice as long as those without dementia. *Mov Disord* 2011; 26(5): 919.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12(3): 189-98.
- Foltynie T, Brayne CE, Robbins TW, Barker RA. The cognitive ability of an incident cohort of Parkinson's patients in the UK. The CamPaIGN study. *Brain* 2004; 127(Pt 3): 550-60.
- Fornai F, di Poggio AB, Pellegrini A, Ruggieri S, Paparelli A. Noradrenaline in Parkinson's disease: from disease progression to current therapeutics. *Curr Med Chem* 2007; 14(22): 2330-4.
- Foulds PG, Mitchell JD, Parker A, Turner R, Green G, Diggle P, *et al.* Phosphorylated alpha-synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 2011; 25(12): 4127-37.
- Foulds PG, Yokota O, Thurston A, Davidson Y, Ahmed Z, Holton J, *et al.* Post mortem cerebrospinal fluid alpha-synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other alpha-synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 2012; 45(1): 188-95.

- Frasier M, Walzer M, McCarthy L, Magnuson D, Lee JM, Haas C, *et al.* Tau phosphorylation increases in symptomatic mice overexpressing A30P alpha-synuclein. *Exp Neurol* 2005; 192(2): 274-87.
- Friedlich AL, Beal MF. Prospects for redox-based therapy in neurodegenerative diseases. *Neurotox Res* 2000; 2(2-3): 229-37.
- Frigerio R, Sanft KR, Grossardt BR, Peterson BJ, Elbaz A, Bower JH, *et al.* Chemical exposures and Parkinson's disease: a population-based case-control study. *Mov Disord* 2006; 21(10): 1688-92.
- Frisina PG, Borod JC, Foldi NS, Tenenbaum HR. Depression in Parkinson's disease: health risks, etiology, and treatment options. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2008; 4(1): 81-91.
- Fumimura Y, Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Kanemaru K, Sawabe M, *et al.* Analysis of the adrenal gland is useful for evaluating pathology of the peripheral autonomic nervous system in lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66(5): 354-62.
- Galvin JE, Pollack J, Morris JC. Clinical phenotype of Parkinson disease dementia. *Neurology* 2006; 67(9): 1605-11.
- Gao X, Chen H, Schwarzschild MA, Ascherio A. Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology* 2011; 76(10): 863-9.
- Gao X, Simon KC, Schwarzschild MA, Ascherio A. Prospective study of statin use and risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 2012; 69(3): 380-4.
- Garcia-Garcia D, Clavero P, Gasca Salas C, Lamet I, Arbizu J, Gonzalez-Redondo R, *et al.* Posterior parietooccipital hypometabolism may differentiate mild cognitive impairment from dementia in Parkinson's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39(11): 1767-77.
- Gasca-Salas C, Estanga A, Clavero P, Aguilar-Palacio I, Gonzalez-Redondo R, Obeso JA, *et al.* Longitudinal Assessment of the Pattern of Cognitive Decline in Non-Demented Patients with Advanced Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* 2014.
- Gegg ME, Burke D, Heales SJ, Cooper JM, Hardy J, Wood NW, *et al.* Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Ann Neurol* 2012; 72(3): 455-63.
- Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol* 1999; 56(1): 33-9.

- 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.
- Geurtsen GJ, Hoogland J, Goldman JG, Schmand BA, Troster AI, Burn DJ, *et al.* Parkinson's disease mild cognitive impairment: application and validation of the criteria. *J Parkinsons Dis* 2014; 4(2): 131-7.
- Ghebremedhin E, Rosenberger A, Rub U, Vuksic M, Berhe T, Bickeboller H, *et al.* Inverse relationship between cerebrovascular lesions and severity of lewy body pathology in patients with lewy body diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; 69(5): 442-8.
- Gibb WR. Idiopathic Parkinson's disease and the Lewy body disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1986; 12(3): 223-34.
- Giladi N, Nieuwboer A. Understanding and treating freezing of gait in parkinsonism, proposed working definition, and setting the stage. *Mov Disord* 2008; 23 Suppl 2: S423-5.
- Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H. 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol* 2013; 9(1): 13-24.
- Goetz CG, Stebbins GT, Ouyang B. Visual plus nonvisual hallucinations in Parkinson's disease: development and evolution over 10 years. *Mov Disord* 2011; 26(12): 2196-200.
- Gonzalez-Redondo R, Garcia-Garcia D, Clavero P, Gasca-Salas C, Garcia-Eulate R, Zubieta JL, *et al.* Grey matter hypometabolism and atrophy in Parkinson's disease with cognitive impairment: a two-step process. *Brain* 2014; 137(Pt 8): 2356-67.
- Gonzalez-Redondo R, Toledo J, Clavero P, Lamet I, Garcia-Garcia D, Garcia-Eulate R, *et al.* The impact of silent vascular brain burden in cognitive impairment in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2012; 19(8): 1100-7.
- Gorostidi A, Ruiz-Martinez J, Lopez de Munain A, Alzualde A, Marti Masso JF. LRRK2 G2019S and R1441G mutations associated with Parkinson's disease are common in the Basque Country, but relative prevalence is determined by ethnicity. *Neurogenetics* 2009; 10(2): 157-9.
- Graham JM, Sagar HJ. A data-driven approach to the study of heterogeneity in idiopathic Parkinson's disease: identification of three distinct subtypes. *Mov Disord* 1999; 14(1): 10-20.
- Gratwicke J, Jahanshahi M, Foltynie T. Parkinson's disease dementia: a neural networks perspective. *Brain* 2015; 138(Pt 6): 1454-76.

- Guo JL, Covell DJ, Daniels JP, Iba M, Stieber A, Zhang B, *et al.* Distinct alpha-synuclein strains differentially promote tau inclusions in neurons. *Cell* 2013; 154(1): 103-17.
- Guttman M, Boileau I, Warsh J, Saint-Cyr JA, Ginovart N, McCluskey T, *et al.* Brain serotonin transporter binding in non-depressed patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2007; 14(5): 523-8.
- Hall S, Ohrfelt A, Constantinescu R, Andreasson U, Surova Y, Bostrom F, *et al.* Accuracy of a panel of 5 cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of patients with dementia and/or parkinsonian disorders. *Arch Neurol* 2012; 69(11): 1445-52.
- Halliday G, Hely M, Reid W, Morris J. The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2008; 115(4): 409-15.
- Halliday GM, Li YW, Blumbergs PC, Joh TH, Cotton RG, Howe PR, *et al.* Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1990; 27(4): 373-85.
- Hansson O, Hall S, Ohrfelt A, Zetterberg H, Blennow K, Minthon L, *et al.* Levels of cerebrospinal fluid alpha-synuclein oligomers are increased in Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies compared to Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2014; 6(3): 25.
- Hassin-Baer S, Cohen O, Vakil E, Sela BA, Nitsan Z, Schwartz R, *et al.* Plasma homocysteine levels and Parkinson disease: disease progression, carotid intima-media thickness and neuropsychiatric complications. *Clin Neuropharmacol* 2006; 29(6): 305-11.
- Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, *et al.* Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* 2008; 7(7): 583-90.
- Hely MA, Reid WG, Adena MA, Halliday GM, Morris JG. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *Mov Disord* 2008; 23(6): 837-44.
- Herbert MK, Eeftens JM, Aerts MB, Esselink RA, Bloem BR, Kuiperij HB, *et al.* CSF levels of DJ-1 and tau distinguish MSA patients from PD patients and controls. *Parkinsonism Relat Disord* 2014; 20(1): 112-5.
- Hernandez DG, Reed X, Singleton AB. Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. *J Neurochem* 2016; 139 Suppl 1: 59-74.

- Hickey WF, Kimura H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 1988; 239(4837): 290-2.
- Higginson CI, Wheelock VL, Carroll KE, Sigvardt KA. Recognition memory in Parkinson's disease with and without dementia: evidence inconsistent with the retrieval deficit hypothesis. *J Clin Exp Neuropsychol* 2005; 27(4): 516-28.
- Hilker R, Schweitzer K, Coburger S, Ghaemi M, Weisenbach S, Jacobs AH, *et al.* Nonlinear progression of Parkinson disease as determined by serial positron emission tomographic imaging of striatal fluorodopa F 18 activity. *Arch Neurol* 2005a; 62(3): 378-82.
- Hilker R, Thomas AV, Klein JC, Weisenbach S, Kalbe E, Burghaus L, *et al.* Dementia in Parkinson disease: functional imaging of cholinergic and dopaminergic pathways. *Neurology* 2005b; 65(11): 1716-22.
- Hirono N, Mori E, Tanimukai S, Kazui H, Hashimoto M, Hanihara T, *et al.* Distinctive neurobehavioral features among neurodegenerative dementias. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1999; 11(4): 498-503.
- Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology* 2007; 68(5): 326-37.
- Hishikawa N, Hashizume Y, Hirayama M, Imamura K, Washimi Y, Koike Y, *et al.* Brainstem-type Lewy body disease presenting with progressive autonomic failure and lethargy. *Clin Auton Res* 2000; 10(3): 139-43.
- Hobson P, Meara J. Risk and incidence of dementia in a cohort of older subjects with Parkinson's disease in the United Kingdom. *Mov Disord* 2004; 19(9): 1043-9.
- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967; 17(5): 427-42.
- Holmans P, Moskvina V, Jones L, Sharma M, International Parkinson's Disease Genomics C, Vedernikov A, *et al.* A pathway-based analysis provides additional support for an immune-related genetic susceptibility to Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2013; 22(5): 1039-49.
- Hong Z, Shi M, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, *et al.* DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain* 2010; 133(Pt 3): 713-26.
- Hornykiewicz O. The mechanisms of action of L-dopa in Parkinson's disease. *Life Sci* 1974; 15(7): 1249-59.

- Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, Lees AJ. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* 2002; 125(Pt 4): 861-70.
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55(3): 181-4.
- Hughes TA, Ross HF, Mindham RH, Spokes EG. Mortality in Parkinson's disease and its association with dementia and depression. *Acta Neurol Scand* 2004; 110(2): 118-23.
- Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, *et al.* FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci* 1999; 19(9): 3440-7.
- Huot P, Fox SH, Brotchie JM. The serotonergic system in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2011; 95(2): 163-212.
- Hurtig HI, Trojanowski JQ, Galvin J, Ewbank D, Schmidt ML, Lee VM, *et al.* Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology* 2000; 54(10): 1916-21.
- Hutchinson M, Raff U, Lebedev S. MRI correlates of pathology in parkinsonism: segmented inversion recovery ratio imaging (SIRRIM). *Neuroimage* 2003; 20(3): 1899-902.
- Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 2003; 106(6): 518-26.
- Ingelsson M. Alpha-Synuclein Oligomers-Neurotoxic Molecules in Parkinson's Disease and Other Lewy Body Disorders. *Front Neurosci* 2016; 10: 408.
- International Parkinson's Disease Genomics C, Wellcome Trust Case Control C. A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease. *PLoS Genet* 2011; 7(6): e1002142.
- Iranzo A, Molinuevo JL, Santamaria J, Serradell M, Marti MJ, Valldeoriola F, *et al.* Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study. *Lancet Neurol* 2006; 5(7): 572-7.



- Irwin DJ, White MT, Toledo JB, Xie SX, Robinson JL, Van Deerlin V, *et al.* Neuropathologic substrates of Parkinson disease dementia. *Ann Neurol* 2012; 72(4): 587-98.
- Ito K, Nagano-Saito A, Kato T, Arahata Y, Nakamura A, Kawasumi Y, *et al.* Striatal and extrastriatal dysfunction in Parkinson's disease with dementia: a 6-[18F]fluoro-L-dopa PET study. *Brain* 2002; 125(Pt 6): 1358-65.
- Jankovic J, Ben-Arie L, Schwartz K, Chen K, Khan M, Lai EC, *et al.* Movement and reaction times and fine coordination tasks following pallidotomy. *Mov Disord* 1999; 14(1): 57-62.
- Jansen Steur E, Vermes I, de Vos RA. Cerebrospinal-fluid tau protein and aspartate aminotransferase in Parkinson's disease. *Lancet* 1998; 351(9109): 1105-6.
- Janvin CC, Aarsland D, Larsen JP. Cognitive predictors of dementia in Parkinson's disease: a community-based, 4-year longitudinal study. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2005; 18(3): 149-54.
- Janvin CC, Larsen JP, Aarsland D, Hugdahl K. Subtypes of mild cognitive impairment in Parkinson's disease: progression to dementia. *Mov Disord* 2006; 21(9): 1343-9.
- Jefferson AL, Massaro JM, Beiser AS, Seshadri S, Larson MG, Wolf PA, *et al.* Inflammatory markers and neuropsychological functioning: the Framingham Heart Study. *Neuroepidemiology* 2011; 37(1): 21-30.
- Jellinger KA. Pathological substrate of dementia in Parkinson's disease--its relation to DLB and DLBD. *Parkinsonism Relat Disord* 2006; 12(2): 119-20.
- Jellinger KA. Neuropathology in Parkinson's disease with mild cognitive impairment. *Acta Neuropathol* 2010; 120(6): 829-30; author reply 31.
- Jia X, Liang P, Li Y, Shi L, Wang D, Li K. Longitudinal Study of Gray Matter Changes in Parkinson Disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015; 36(12): 2219-26.
- Jokinen P, Bruck A, Aalto S, Forsback S, Parkkola R, Rinne JO. Impaired cognitive performance in Parkinson's disease is related to caudate dopaminergic hypofunction and hippocampal atrophy. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15(2): 88-93.
- Jubault T, Gagnon JF, Karama S, Ptito A, Lafontaine AL, Evans AC, *et al.* Patterns of cortical thickness and surface area in early Parkinson's disease. *Neuroimage* 2011; 55(2): 462-7.
- Kamagata K, Motoi Y, Abe O, Shimoji K, Horii M, Nakanishi A, *et al.* White matter alteration of the cingulum in Parkinson disease with and without dementia:

- evaluation by diffusion tensor tract-specific analysis. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012; 33(5): 890-5.
- Kamer AR, Morse DE, Holm-Pedersen P, Mortensen EL, Avlund K. Periodontal inflammation in relation to cognitive function in an older adult Danish population. *J Alzheimers Dis* 2012; 28(3): 613-24.
- Kanemaru K, Kameda N, Yamanouchi H. Decreased CSF amyloid beta42 and normal tau levels in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2000; 54(9): 1875-6.
- Kang JH. Cerebrospinal Fluid Amyloid beta1-42, Tau, and Alpha-Synuclein Predict the Heterogeneous Progression of Cognitive Dysfunction in Parkinson's Disease. *J Mov Disord* 2016; 9(2): 89-96.
- Kang JH, Irwin DJ, Chen-Plotkin AS, Siderowf A, Caspell C, Coffey CS, *et al.* Association of cerebrospinal fluid beta-amyloid 1-42, T-tau, P-tau181, and alpha-synuclein levels with clinical features of drug-naive patients with early Parkinson disease. *JAMA Neurol* 2013; 70(10): 1277-87.
- Kaplan E, Goodglass H, Weintraub S (1983). Boston Naming Test. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Kaufmann H, Nahm K, Purohit D, Wolfe D. Autonomic failure as the initial presentation of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2004; 63(6): 1093-5.
- Kehagia AA, Barker RA, Robbins TW. Cognitive impairment in Parkinson's disease: the dual syndrome hypothesis. *Neurodegener Dis* 2013; 11(2): 79-92.
- Keilani S, Lun Y, Stevens AC, Williams HN, Sjoberg ER, Khanna R, *et al.* Lysosomal dysfunction in a mouse model of Sandhoff disease leads to accumulation of ganglioside-bound amyloid-beta peptide. *J Neurosci* 2012; 32(15): 5223-36.
- Kerenyi L, Ricaurte GA, Schretlen DJ, McCann U, Varga J, Mathews WB, *et al.* Positron emission tomography of striatal serotonin transporters in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2003; 60(9): 1223-9.
- Kida Y, Tachibana H, Takeda M, Yoshikawa H, Okita T. Recognition memory for unfamiliar faces in Parkinson's disease: behavioral and electrophysiologic measures. *Parkinsonism Relat Disord* 2007; 13(3): 157-64.
- Kikuchi A, Takeda A, Onodera H, Kimpara T, Hisanaga K, Sato N, *et al.* Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiol Dis* 2002; 9(2): 244-8.

- Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, Hayley S, Mount MP, Pownall S, *et al.* Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(14): 5215-20.
- Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med* 1988; 318(14): 876-80.
- Klegeris A, Giasson BI, Zhang H, Maguire J, Pelech S, McGeer PL. Alpha-synuclein and its disease-causing mutants induce ICAM-1 and IL-6 in human astrocytes and astrocytoma cells. *FASEB J* 2006; 20(12): 2000-8.
- Krebs CE, Karkheiran S, Powell JC, Cao M, Makarov V, Darvish H, *et al.* The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Hum Mutat* 2013; 34(9): 1200-7.
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, *et al.* Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998; 18(2): 106-8.
- Kulisevsky J. Role of dopamine in learning and memory: implications for the treatment of cognitive dysfunction in patients with Parkinson's disease. *Drugs Aging* 2000; 16(5): 365-79.
- Kulisevsky J, Avila A, Barbanoj M, Antonijoan R, Berthier ML, Gironell A. Acute effects of levodopa on neuropsychological performance in stable and fluctuating Parkinson's disease patients at different levodopa plasma levels. *Brain* 1996; 119 (Pt 6): 2121-32.
- Kumar KR, Weissbach A, Heldmann M, Kasten M, Tunc S, Sue CM, *et al.* Frequency of the D620N mutation in VPS35 in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2012; 69(10): 1360-4.
- Kwon DH, Kim JM, Oh SH, Jeong HJ, Park SY, Oh ES, *et al.* Seven-Tesla magnetic resonance images of the substantia nigra in Parkinson disease. *Ann Neurol* 2012; 71(2): 267-77.
- Lang AE, Obeso JA. Time to move beyond nigrostriatal dopamine deficiency in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; 55(6): 761-5.
- Lange KW, Robbins TW, Marsden CD, James M, Owen AM, Paul GM. L-dopa withdrawal in Parkinson's disease selectively impairs cognitive performance in tests sensitive to frontal lobe dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 1992; 107(2-3): 394-404.

- Latourelle JC, Sun M, Lew MF, Suchowersky O, Klein C, Golbe LI, *et al.* The Gly2019Ser mutation in LRRK2 is not fully penetrant in familial Parkinson's disease: the GenePD study. *BMC Med* 2008; 6: 32.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990; 39(1): 151-70.
- Lee PH, Lee G, Park HJ, Bang OY, Joo IS, Huh K. The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm (Vienna)* 2006; 113(10): 1435-9.
- Lee PH, Yong SW, An YS. Changes in cerebral glucose metabolism in patients with Parkinson disease with dementia after cholinesterase inhibitor therapy. *J Nucl Med* 2008; 49(12): 2006-11.
- Lee YC, Lin CH, Wu RM, Lin MS, Lin JW, Chang CH, *et al.* Discontinuation of statin therapy associates with Parkinson disease: a population-based study. *Neurology* 2013; 81(5): 410-6.
- Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 2009; 18(R1): R48-59.
- Lesage S, Condroyer C, Klebe S, Honore A, Tison F, Brefel-Courbon C, *et al.* Identification of VPS35 mutations replicated in French families with Parkinson disease. *Neurology* 2012; 78(18): 1449-50.
- Leverenz JB, Watson GS, Shofer J, Zabetian CP, Zhang J, Montine TJ. Cerebrospinal fluid biomarkers and cognitive performance in non-demented patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2011; 17(1): 61-4.
- Levin BE, Llabre MM, Reisman S, Weiner WJ, Sanchez-Ramos J, Singer C, *et al.* Visuospatial impairment in Parkinson's disease. *Neurology* 1991; 41(3): 365-9.
- Levy G, Jacobs DM, Tang MX, Cote LJ, Louis ED, Alfaró B, *et al.* Memory and executive function impairment predict dementia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2002; 17(6): 1221-6.
- Lewitt PA, Li J, Lu M, Beach TG, Adler CH, Guo L, *et al.* 3-hydroxykynurenine and other Parkinson's disease biomarkers discovered by metabolomic analysis. *Mov Disord* 2013; 28(12): 1653-60.
- Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, *et al.* Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 2008; 14(5): 501-3.

- Li QX, Mok SS, Laughton KM, McLean CA, Cappai R, Masters CL, *et al.* Plasma alpha-synuclein is decreased in subjects with Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2007; 204(2): 583-8.
- Lin X, Cook TJ, Zabetian CP, Leverenz JB, Peskind ER, Hu SC, *et al.* DJ-1 isoforms in whole blood as potential biomarkers of Parkinson disease. *Sci Rep* 2012; 2: 954.
- Lindqvist D, Hall S, Surova Y, Nielsen H, Janelidze S, Brundin L, *et al.* Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease - Associations with depression, fatigue, and cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 2013.
- 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.
- Litvan I, Aarsland D, Adler CH, Goldman JG, Kulisevsky J, Mollenhauer B, *et al.* MDS Task Force on mild cognitive impairment in Parkinson's disease: critical review of PD-MCI. *Mov Disord* 2011; 26(10): 1814-24.
- Litvan I, Goldman JG, Troster AI, Schmand BA, Weintraub D, Petersen RC, *et al.* Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines. *Mov Disord* 2012; 27(3): 349-56.
- Liu C, Cholerton B, Shi M, Gingham C, Cain KC, Auinger P, *et al.* CSF tau and tau/Abeta42 predict cognitive decline in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2015; 21(3): 271-6.
- Long D, Wang J, Xuan M, Gu Q, Xu X, Kong D, *et al.* Automatic classification of early Parkinson's disease with multi-modal MR imaging. *PLoS One* 2012; 7(11): e47714.
- Lotfipour AK, Wharton S, Schwarz ST, Gontu V, Schafer A, Peters AM, *et al.* High resolution magnetic susceptibility mapping of the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Magn Reson Imaging* 2012; 35(1): 48-55.
- Lowe JL, D.I. G, Leigh PN. Greenfield's Neuropathology. London; 1997.
- Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, *et al.* Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 2000; 342(21): 1560-7.
- Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, *et al.* Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 2012; 338(6109): 949-53.

- Llebaria G, Pagonabarraga J, Martinez-Corral M, Garcia-Sanchez C, Pascual-Sedano B, Gironell A, *et al.* Neuropsychological correlates of mild to severe hallucinations in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2010; 25(16): 2785-91.
- Ma J, Jiang Q, Xu J, Sun Q, Qiao Y, Chen W, *et al.* Plasma insulin-like growth factor 1 is associated with cognitive impairment in Parkinson's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2015; 93(5-6): 251-6.
- Maarouf CL, Beach TG, Adler CH, Shill HA, Sabbagh MN, Wu T, *et al.* Cerebrospinal fluid biomarkers of neuropathologically diagnosed Parkinson's disease subjects. *Neurol Res* 2012a; 34(7): 669-76.
- Maarouf CL, Beach TG, Adler CH, Shill HA, Sabbagh MN, Wu T, *et al.* Cerebrospinal fluid biomarkers of neuropathologically diagnosed Parkinson's disease subjects. *Neurol Res* 2012b; 34(7): 669-76.
- Maetzler W, Liepelt I, Reimold M, Reischl G, Solbach C, Becker C, *et al.* Cortical PIB binding in Lewy body disease is associated with Alzheimer-like characteristics. *Neurobiol Dis* 2009; 34(1): 107-12.
- Maetzler W, Tian Y, Baur SM, Gauger T, Odoj B, Schmid B, *et al.* Serum and cerebrospinal fluid levels of transthyretin in Lewy body disorders with and without dementia. *PLoS One* 2012; 7(10): e48042.
- Mahieux F, Fenelon G, Flahault A, Manificier MJ, Michelet D, Boller F. Neuropsychological prediction of dementia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64(2): 178-83.
- Mak E, Zhou J, Tan LC, Au WL, Sitoh YY, Kandiah N. Cognitive deficits in mild Parkinson's disease are associated with distinct areas of grey matter atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014; 85(5): 576-80.
- Malek-Ahmadi M, Kahlon V, Adler CH, Obradov A, Thind K, Shill HA, *et al.* Prevalence of Hippocampal Sclerosis in a Clinicopathologically Characterized Cohort. *Clin Exp Med Sci* 2013; 1(7): 317-27.
- Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Kruger R, *et al.* Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 2006; 296(6): 661-70.
- Marder K, Tang MX, Cote L, Stern Y, Mayeux R. The frequency and associated risk factors for dementia in patients with Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1995; 52(7): 695-701.

- Marder K, Wang Y, Alcalay RN, Mejia-Santana H, Tang MX, Lee A, *et al.* Age-specific penetrance of LRRK2 G2019S in the Michael J. Fox Ashkenazi Jewish LRRK2 Consortium. *Neurology* 2015; 85(1): 89-95.
- Marie RM, Barre L, Dupuy B, Viader F, Defer G, Baron JC. Relationships between striatal dopamine denervation and frontal executive tests in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1999; 260(2): 77-80.
- Marsh L, Biglan K, Gerstenhaber M, Williams JR. Atomoxetine for the treatment of executive dysfunction in Parkinson's disease: a pilot open-label study. *Mov Disord* 2009; 24(2): 277-82.
- Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, *et al.* Association of single-nucleotide polymorphisms of the tau gene with late-onset Parkinson disease. *JAMA* 2001; 286(18): 2245-50.
- Martin HL, Teismann P. Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J* 2009; 23(10): 3263-72.
- Marttila RJ, Rinne UK. Epidemiology of Parkinson's disease in Finland. *Acta Neurol Scand* 1976; 53(2): 81-102.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Sagara Y, Mallory M, Hashimoto M, *et al.* beta-amyloid peptides enhance alpha-synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(21): 12245-50.
- Mattila PM, Rinne JO, Helenius H, Dickson DW, Roytta M. Alpha-synuclein-immunoreactive cortical Lewy bodies are associated with cognitive impairment in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2000; 100(3): 285-90.
- Mattila PM, Roytta M, Torikka H, Dickson DW, Rinne JO. Cortical Lewy bodies and Alzheimer-type changes in patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 1998; 95(6): 576-82.
- McCoy MK, Cookson MR. Mitochondrial quality control and dynamics in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 2012; 16(9): 869-82.
- McNeill A, Duran R, Hughes DA, Mehta A, Schapira AH. A clinical and family history study of Parkinson's disease in heterozygous glucocerebrosidase mutation carriers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83(8): 853-4.
- Melzer TR, Watts R, MacAskill MR, Pitcher TL, Livingston L, Keenan RJ, *et al.* White matter microstructure deteriorates across cognitive stages in Parkinson disease. *Neurology* 2013; 80(20): 1841-9.

- Menke RA, Scholz J, Miller KL, Deoni S, Jbabdi S, Matthews PM, *et al.* MRI characteristics of the substantia nigra in Parkinson's disease: a combined quantitative T1 and DTI study. *Neuroimage* 2009; 47(2): 435-41.
- Menza M, Dobkin RD, Marin H, Mark MH, Gara M, Bienfait K, *et al.* The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Psychosomatics* 2010; 51(6): 474-9.
- Menza MA, Robertson-Hoffman DE, Bonapace AS. Parkinson's disease and anxiety: comorbidity with depression. *Biol Psychiatry* 1993; 34(7): 465-70.
- Minati L, Grisoli M, Carella F, De Simone T, Bruzzone MG, Savoiaro M. Imaging degeneration of the substantia nigra in Parkinson disease with inversion-recovery MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007; 28(2): 309-13.
- Mito Y, Yoshida K, Yabe I, Makino K, Hirotani M, Tashiro K, *et al.* Brain 3D-SSP SPECT analysis in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease with and without dementia, and Alzheimer's disease. *Clin Neurol Neurosurg* 2005; 107(5): 396-403.
- Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, *et al.* Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 1994a; 180(2): 147-50.
- Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1996; 211(1): 13-6.
- Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 1994b; 165(1-2): 208-10.
- Molina JA, Benito-Leon J, Jimenez-Jimenez FJ, Orti-Pareja M, Berbel A, Tallon-Barranco A, *et al.* Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of non-demented Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 1997; 238(3): 139-41.
- Mollenhauer B, Trautmann E, Taylor P, Manninger P, Sixel-Doring F, Ebentheuer J, *et al.* Total CSF alpha-synuclein is lower in de novo Parkinson patients than in healthy subjects. *Neurosci Lett* 2013; 532: 44-8.
- Mollenhauer B, Trenkwalder C, von Ahnen N, Bibl M, Steinacker P, Brechlin P, *et al.* Beta-amyloid 1-42 and tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006; 22(3): 200-8.



- Mondello S, Constantinescu R, Zetterberg H, Andreasson U, Holmberg B, Jeromin A. CSF alpha-synuclein and UCH-L1 levels in Parkinson's disease and atypical parkinsonian disorders. *Parkinsonism Relat Disord* 2014; 20(4): 382-7.
- Montine TJ, Shi M, Quinn JF, Peskind ER, Craft S, Ghingina C, *et al.* CSF Abeta(42) and tau in Parkinson's disease with cognitive impairment. *Mov Disord* 2010; 25(15): 2682-5.
- Mosimann UP, Mather G, Wesnes KA, O'Brien JT, Burn DJ, McKeith IG. Visual perception in Parkinson disease dementia and dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2004; 63(11): 2091-6.
- Mosimann UP, Rowan EN, Partington CE, Collerton D, Littlewood E, O'Brien JT, *et al.* Characteristics of visual hallucinations in Parkinson disease dementia and dementia with lewy bodies. *Am J Geriatr Psychiatry* 2006; 14(2): 153-60.
- Muftuoglu M, Elibol B, Dalmizrak O, Ercan A, Kulaksiz G, Ogus H, *et al.* Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. *Mov Disord* 2004; 19(5): 544-8.
- Muller T, Blum-Degen D, Przuntek H, Kuhn W. Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlate to severity of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 1998; 98(2): 142-4.
- Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Tayebi N, Kim WS, Sidransky E, *et al.* Reduced glucocerebrosidase is associated with increased alpha-synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Brain* 2014; 137(Pt 3): 834-48.
- Muslimovic D, Post B, Speelman JD, Schmand B. Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease. *Neurology* 2005; 65(8): 1239-45.
- Muslimovic D, Schmand B, Speelman JD, de Haan RJ. Course of cognitive decline in Parkinson's disease: a meta-analysis. *J Int Neuropsychol Soc* 2007; 13(6): 920-32.
- Nagano-Saito A, Habak C, Mejia-Constain B, Degroot C, Monetta L, Jubault T, *et al.* Effect of mild cognitive impairment on the patterns of neural activity in early Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2014; 35(1): 223-31.
- Nagano-Saito A, Kato T, Arahata Y, Washimi Y, Nakamura A, Abe Y, *et al.* Cognitive- and motor-related regions in Parkinson's disease: FDOPA and FDG PET studies. *Neuroimage* 2004; 22(2): 553-61.
- Nagano-Saito A, Leyton M, Monchi O, Goldberg YK, He Y, Dagher A. Dopamine depletion impairs frontostriatal functional connectivity during a set-shifting task. *J Neurosci* 2008; 28(14): 3697-706.

- Nagano-Saito A, Washimi Y, Arahata Y, Kachi T, Lerch JP, Evans AC, *et al.* Cerebral atrophy and its relation to cognitive impairment in Parkinson disease. *Neurology* 2005; 64(2): 224-9.
- Nakano I, Hirano A. Parkinson's disease: neuron loss in the nucleus basalis without concomitant Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1984; 15(5): 415-8.
- Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, Do CB, Hernandez DG, Saad M, *et al.* Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet* 2014; 46(9): 989-93.
- Nasreddine ZS, Phillips NA, Bedirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, *et al.* The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc* 2005; 53(4): 695-9.
- Nazem S, Siderowf AD, Duda JE, Brown GK, Ten Have T, Stern MB, *et al.* Suicidal and death ideation in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008; 23(11): 1573-9.
- Neves KR, Nobre HV, Jr., Leal LK, de Andrade GM, Brito GA, Viana GS. Pentoxifylline Neuroprotective Effects Are Possibly Related to Its Anti-Inflammatory and TNF-Alpha Inhibitory Properties, in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* 2015; 2015: 108179.
- Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 2000; 80(1): 315-60.
- Nielsen HM, Hall S, Surova Y, Nagga K, Nilsson C, Londos E, *et al.* Low levels of soluble NG2 in cerebrospinal fluid from patients with dementia with Lewy bodies. *J Alzheimers Dis* 2014; 40(2): 343-50.
- Noe E, Marder K, Bell KL, Jacobs DM, Manly JJ, Stern Y. Comparison of dementia with Lewy bodies to Alzheimer's disease and Parkinson's disease with dementia. *Mov Disord* 2004; 19(1): 60-7.
- Noyce AJ, Bestwick JP, Silveira-Moriyama L, Hawkes CH, Giovannoni G, Lees AJ, *et al.* Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann Neurol* 2012; 72(6): 893-901.
- O'Suilleabhain PE, Dewey RB, Jr. Contributions of dopaminergic drugs and disease severity to daytime sleepiness in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2002; 59(6): 986-9.
- O'Suilleabhain PE, Sung V, Hernandez C, Lacritz L, Dewey RB, Jr., Bottiglieri T, *et al.* Elevated plasma homocysteine level in patients with Parkinson disease: motor, affective, and cognitive associations. *Arch Neurol* 2004; 61(6): 865-8.

- Olanow CW, Stern MB, Sethi K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology* 2009; 72(21 Suppl 4): S1-136.
- Olgiati S, Quadri M, Fang M, Rood JP, Saute JA, Chien HF, *et al.* DNAJC6 Mutations Associated With Early-Onset Parkinson's Disease. *Ann Neurol* 2016; 79(2): 244-56.
- Osterrieth, P. A. Contribution a l'étude de la perception et de la memoire (The test of copying a complex figure: A contribution to the study of perception and memory). *Archive de Psychologie* 1944; 30: 286-350.
- Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, Ohmann E, Deligtisch A, Tagliati M, *et al.* LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2006; 354(4): 424-5.
- Pagonabarraga J, Corcuera-Solano I, Vives-Gilabert Y, Llebaria G, Garcia-Sanchez C, Pascual-Sedano B, *et al.* Pattern of regional cortical thinning associated with cognitive deterioration in Parkinson's disease. *PLoS One* 2013; 8(1): e54980.
- Pagonabarraga J, Kulisevsky J, Llebaria G, Garcia-Sanchez C, Pascual-Sedano B, Gironell A. Parkinson's disease-cognitive rating scale: a new cognitive scale specific for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008; 23(7): 998-1005.
- Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A, Hernandez D, Davis M, Wood NW, *et al.* Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* 2009; 65(1): 19-23.
- Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, *et al.* Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004; 44(4): 595-600.
- Parkinson Progression Marker I. The Parkinson Progression Marker Initiative (PPMI). *Prog Neurobiol* 2011; 95(4): 629-35.
- Parnetti L, Chiasserini D, Bellomo G, Giannandrea D, De Carlo C, Qureshi MM, *et al.* Cerebrospinal fluid Tau/alpha-synuclein ratio in Parkinson's disease and degenerative dementias. *Mov Disord* 2011; 26(8): 1428-35.
- Parnetti L, Chiasserini D, Persichetti E, Eusebi P, Varghese S, Qureshi MM, *et al.* Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2014a; 29(8): 1019-27.
- Parnetti L, Farotti L, Eusebi P, Chiasserini D, De Carlo C, Giannandrea D, *et al.* Differential role of CSF alpha-synuclein species, tau, and Abeta42 in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 2014b; 6: 53.

- Parnetti L, Tiraboschi P, Lanari A, Peducci M, Padiglioni C, D'Amore C, *et al.* Cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies. *Biol Psychiatry* 2008; 64(10): 850-5.
- Pedersen KF, Larsen JP, Tysnes OB, Alves G. Prognosis of mild cognitive impairment in early Parkinson disease: the Norwegian ParkWest study. *JAMA Neurol* 2013; 70(5): 580-6.
- Pellecchia MT, Santangelo G, Picillo M, Pivonello R, Longo K, Pivonello C, *et al.* Serum epidermal growth factor predicts cognitive functions in early, drug-naive Parkinson's disease patients. *J Neurol* 2013; 260(2): 438-44.
- Pellecchia MT, Santangelo G, Picillo M, Pivonello R, Longo K, Pivonello C, *et al.* Insulin-like growth factor-1 predicts cognitive functions at 2-year follow-up in early, drug-naive Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2014; 21(5): 802-7.
- Peran P, Cherubini A, Assogna F, Piras F, Quattrocchi C, Peppe A, *et al.* Magnetic resonance imaging markers of Parkinson's disease nigrostriatal signature. *Brain* 2010; 133(11): 3423-33.
- Perry EK, McKeith I, Thompson P, Marshall E, Kerwin J, Jabeen S, *et al.* Topography, extent, and clinical relevance of neurochemical deficits in dementia of Lewy body type, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 640: 197-202.
- Perry TL, Godin DV, Hansen S. Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci Lett* 1982; 33(3): 305-10.
- Persichetti E, Chiasserini D, Parnetti L, Eusebi P, Paciotti S, De Carlo C, *et al.* Factors influencing the measurement of lysosomal enzymes activity in human cerebrospinal fluid. *PLoS One* 2014; 9(7): e101453.
- Petersen RC, Roberts RO, Knopman DS, Boeve BF, Geda YE, Ivnik RJ, *et al.* Mild cognitive impairment: ten years later. *Arch Neurol* 2009; 66(12): 1447-55.
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 1999; 56(3): 303-8.
- Petrou M, Bohnen NI, Muller ML, Koeppe RA, Albin RL, Frey KA. Abeta-amyloid deposition in patients with Parkinson disease at risk for development of dementia. *Neurology* 2012; 79(11): 1161-7.
- Pillon B, Deweer B, Agid Y, Dubois B. Explicit memory in Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's diseases. *Arch Neurol* 1993; 50(4): 374-9.

- Poewe W, Wolters E, Emre M, Onofrij M, Hsu C, Tekin S, *et al.* Long-term benefits of rivastigmine in dementia associated with Parkinson's disease: an active treatment extension study. *Mov Disord* 2006; 21(4): 456-61.
- Politis M, Oertel WH, Wu K, Quinn NP, Pogarell O, Brooks DJ, *et al.* Graft-induced dyskinesias in Parkinson's disease: High striatal serotonin/dopamine transporter ratio. *Mov Disord* 2011; 26(11): 1997-2003.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276(5321): 2045-7.
- Popescu A, Lippa CF, Lee VM, Trojanowski JQ. Lewy bodies in the amygdala: increase of alpha-synuclein aggregates in neurodegenerative diseases with tau-based inclusions. *Arch Neurol* 2004; 61(12): 1915-9.
- Poryazova RG, Zachariev ZI. REM sleep behavior disorder in patients with Parkinson's disease. *Folia Med (Plovdiv)* 2005; 47(1): 5-10.
- 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.
- Postuma RB, Bertrand JA, Montplaisir J, Desjardins C, Vendette M, Rios Romenets S, *et al.* Rapid eye movement sleep behavior disorder and risk of dementia in Parkinson's disease: a prospective study. *Mov Disord* 2012; 27(6): 720-6.
- Poulopoulos M, Levy OA, Alcalay RN. The neuropathology of genetic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27(7): 831-42.
- Prikrylova Vranova H, Mares J, Nevrlý M, Stejskal D, Zapletalova J, Hlustik P, *et al.* CSF markers of neurodegeneration in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 2010; 117(10): 1177-81.
- Pulkes T, Papsing C, Mahasirimongkol S, Busabaratana M, Kulkantrakorn K, Tiamkao S. Frequencies of LRRK2 variants in Thai patients with Parkinson's disease: evidence for an R1628P founder. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82(10): 1179-80.
- Qiang JK, Wong YC, Siderowf A, Hurtig HI, Xie SX, Lee VM, *et al.* Plasma apolipoprotein A1 as a biomarker for Parkinson disease. *Ann Neurol* 2013; 74(1): 119-27.
- Qiao L, Hamamichi S, Caldwell KA, Caldwell GA, Yacoubian TA, Wilson S, *et al.* Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity. *Mol Brain* 2008; 1: 17.

- Rajput AH, Sitte HH, Rajput A, Fenton ME, Pifl C, Hornykiewicz O. Globus pallidus dopamine and Parkinson motor subtypes: clinical and brain biochemical correlation. *Neurology* 2008; 70(16 Pt 2): 1403-10.
- Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, *et al.* Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006; 38(10): 1184-91.
- Ransmayr GN, Holliger S, Schletterer K, Heidler H, Deibl M, Poewe W, *et al.* Lower urinary tract symptoms in dementia with Lewy bodies, Parkinson disease, and Alzheimer disease. *Neurology* 2008; 70(4): 299-303.
- Recasens A, Dehay B, Bove J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Perez-Villalba A, *et al.* Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol* 2014; 75(3): 351-62.
- Reijnders JS, Ehrt U, Weber WE, Aarsland D, Leentjens AF. A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008; 23(2): 183-9; quiz 313.
- Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, Crook T. Global Deterioration Scale (GDS). *Psychopharmacol Bull* 1988; 24(4): 661-3.
- Reitan RM. The relation of the trail making test to organic brain damage. *J Consult Psychol* 1955; 19(5): 393-4.
- Rektorova I, Krajcovicova L, Marecek R, Mikl M. Default mode network and extrastriate visual resting state network in patients with Parkinson's disease dementia. *Neurodegener Dis* 2012; 10(1-4): 232-7.
- Rektorova I, Srovnalova H, Kubikova R, Prasek J. Striatal dopamine transporter imaging correlates with depressive symptoms and tower of London task performance in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008; 23(11): 1580-7.
- Rey, A (1964). L'examen clinique en psychologie. Paris, Presses Universitaires de France.
- Rocha NP, Scalzo PL, Barbosa IG, Souza MS, Morato IB, Vieira EL, *et al.* Cognitive Status Correlates with CXCL10/IP-10 Levels in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* 2014; 2014: 903796.
- Rodriguez-Oroz MC, Jahanshahi M, Krack P, Litvan I, Macias R, Bezard E, *et al.* Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol* 2009a; 8(12): 1128-39.

- Rodriguez-Oroz MC, Lage PM, Sanchez-Mut J, Lamet I, Pagonabarraga J, Toledo JB, *et al.* Homocysteine and cognitive impairment in Parkinson's disease: a biochemical, neuroimaging, and genetic study. *Mov Disord* 2009b; 24(10): 1437-44.
- Roosen DA, Cookson MR. LRRK2 at the interface of autophagosomes, endosomes and lysosomes. *Mol Neurodegener* 2016; 11(1): 73.
- Rosenthal E, Brennan L, Xie S, Hurtig H, Milber J, Weintraub D, *et al.* Association between cognition and function in patients with Parkinson disease with and without dementia. *Mov Disord* 2010; 25(9): 1170-6.
- Ross GW, Abbott RD, Petrovitch H, Morens DM, Grandinetti A, Tung KH, *et al.* Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *JAMA* 2000; 283(20): 2674-9.
- Ross OA, Wu YR, Lee MC, Funayama M, Chen ML, Soto AI, *et al.* Analysis of Lrrk2 R1628P as a risk factor for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2008; 64(1): 88-92.
- Roze E, Coelho-Braga MC, Gayraud D, Legrand AP, Trocello JM, Fenelon G, *et al.* Head tremor in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; 21(8): 1245-8.
- Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 2006; 443(7113): 780-6.
- Sabbagh MN, Adler CH, Lahti TJ, Connor DJ, Vedders L, Peterson LK, *et al.* Parkinson disease with dementia: comparing patients with and without Alzheimer pathology. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2009; 23(3): 295-7.
- Saito Y. Oxidized DJ-1 as a possible biomarker of Parkinson's disease. *J Clin Biochem Nutr* 2014; 54(3): 138-44.
- Sanders LH, Greenamyre JT. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radic Biol Med* 2013; 62: 111-20.
- Sawamoto N, Piccini P, Hotton G, Pavese N, Thielemans K, Brooks DJ. Cognitive deficits and striato-frontal dopamine release in Parkinson's disease. *Brain* 2008; 131(Pt 5): 1294-302.
- Scalzo P, Kummer A, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of interleukin-6 are elevated in patients with Parkinson's disease and correlate with physical performance. *Neurosci Lett* 2010; 468(1): 56-8.
- Scatton B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubois B, Agid Y. Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res* 1983; 275(2): 321-8.

- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1989; 1(8649): 1269.
- Schneider JA, Arvanitakis Z, Yu L, Boyle PA, Leurgans SE, Bennett DA. Cognitive impairment, decline and fluctuations in older community-dwelling subjects with Lewy bodies. *Brain* 2012; 135(Pt 10): 3005-14.
- Schoenberg BS, Anderson DW, Haerer AF. Prevalence of Parkinson's disease in the biracial population of Copiah County, Mississippi. *Neurology* 1985; 35(6): 841-5.
- Schrag A, Schott JM. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. *Lancet Neurol* 2006; 5(4): 355-63.
- Schwarzschild MA, Schwid SR, Marek K, Watts A, Lang AE, Oakes D, *et al.* Serum urate as a predictor of clinical and radiographic progression in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2008; 65(6): 716-23.
- Seibert TM, Murphy EA, Kaestner EJ, Brewer JB. Interregional correlations in Parkinson disease and Parkinson-related dementia with resting functional MR imaging. *Radiology* 2012; 263(1): 226-34.
- Shi M, Bradner J, Hancock AM, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, *et al.* Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Ann Neurol* 2011; 69(3): 570-80.
- Shi M, Zabetian CP, Hancock AM, Ghingina C, Hong Z, Yearout D, *et al.* Significance and confounders of peripheral DJ-1 and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2010; 480(1): 78-82.
- Shimada H, Hirano S, Shinotoh H, Aotsuka A, Sato K, Tanaka N, *et al.* Mapping of brain acetylcholinesterase alterations in Lewy body disease by PET. *Neurology* 2009; 73(4): 273-8.
- Shimada H, Shinotoh H, Hirano S, Miyoshi M, Sato K, Tanaka N, *et al.* beta-Amyloid in Lewy body disease is related to Alzheimer's disease-like atrophy. *Mov Disord* 2013; 28(2): 169-75.
- Shojaee S, Sina F, Banihosseini SS, Kazemi MH, Kalhor R, Shahidi GA, *et al.* Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays. *Am J Hum Genet* 2008; 82(6): 1375-84.
- Shults CW, Flint Beal M, Song D, Fontaine D. Pilot trial of high dosages of coenzyme Q10 in patients with Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2004; 188(2): 491-4.



- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, *et al.* Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 1994; 36(3): 348-55.
- Siderowf A, Xie SX, Hurtig H, Weintraub D, Duda J, Chen-Plotkin A, *et al.* CSF amyloid {beta} 1-42 predicts cognitive decline in Parkinson disease. *Neurology* 2010; 75(12): 1055-61.
- Sidransky E, Lopez G. The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol* 2012; 11(11): 986-98.
- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, *et al.* Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2009; 361(17): 1651-61.
- Simon-Sanchez J, Marti-Masso JF, Sanchez-Mut JV, Paisan-Ruiz C, Martinez-Gil A, Ruiz-Martinez J, *et al.* Parkinson's disease due to the R1441G mutation in Dardarin: a founder effect in the Basques. *Mov Disord* 2006; 21(11): 1954-9.
- Simuni T, Sethi K. Nonmotor manifestations of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2008; 64 Suppl 2: S65-80.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, *et al.* alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302(5646): 841.
- Singleton AB, Farrer MJ, Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov Disord* 2013; 28(1): 14-23.
- Sjogren M, Minthon L, Davidsson P, Granerus AK, Clarberg A, Vanderstichele H, *et al.* CSF levels of tau, beta-amyloid(1-42) and GAP-43 in frontotemporal dementia, other types of dementia and normal aging. *J Neural Transm (Vienna)* 2000; 107(5): 563-79.
- Skidmore FM, Yang M, Baxter L, von Deneen KM, Collingwood J, He G, *et al.* Reliability analysis of the resting state can sensitively and specifically identify the presence of Parkinson disease. *Neuroimage* 2013; 75: 249-61.
- Smeyne RJ, Jackson-Lewis V. The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 134(1): 57-66.
- Song IU, Kim JS, Park IS, Kim YD, Cho HJ, Chung SW, *et al.* Clinical significance of homocysteine (hcy) on dementia in Parkinson's disease (PD). *Arch Gerontol Geriatr* 2013a; 57(3): 288-91.

- Song IU, Kim YD, Cho HJ, Chung SW. Is neuroinflammation involved in the development of dementia in patients with Parkinson's disease? *Intern Med* 2013b; 52(16): 1787-92.
- Song IU, Kim YD, Cho HJ, Chung SW, Chung YA. An FP-CIT PET comparison of the differences in dopaminergic neuronal loss between idiopathic Parkinson disease with dementia and without dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2013c; 27(1): 51-5.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388(6645): 839-40.
- Stamey W, Davidson A, Jankovic J. Shoulder pain: a presenting symptom of Parkinson disease. *J Clin Rheumatol* 2008; 14(4): 253-4.
- Starkstein SE, Sabe L, Petracca G, Chemerinski E, Kuzis G, Merello M, *et al.* Neuropsychological and psychiatric differences between Alzheimer's disease and Parkinson's disease with dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61(4): 381-7.
- Stav AL, Aarsland D, Johansen KK, Hessen E, Auning E, Fladby T. Amyloid-beta and alpha-synuclein cerebrospinal fluid biomarkers and cognition in early Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2015; 21(7): 758-64.
- Stefanis L. alpha-Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(2): a009399.
- Stewart T, Liu C, Ghingina C, Cain KC, Auinger P, Cholerton B, *et al.* Cerebrospinal fluid alpha-synuclein predicts cognitive decline in Parkinson disease progression in the DATATOP cohort. *Am J Pathol* 2014; 184(4): 966-75.
- Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 2010; 5(6): 463-6.
- Summerfield C, Junque C, Tolosa E, Salgado-Pineda P, Gomez-Anson B, Marti MJ, *et al.* Structural brain changes in Parkinson disease with dementia: a voxel-based morphometry study. *Arch Neurol* 2005; 62(2): 281-5.
- Sussmuth SD, Uttner I, Landwehrmeyer B, Pinkhardt EH, Brettschneider J, Petzold A, *et al.* Differential pattern of brain-specific CSF proteins tau and amyloid-beta in Parkinsonian syndromes. *Mov Disord* 2010; 25(9): 1284-8.
- Suzuki K, Yamaguchi A, Yamanaka S, Kanzaki S, Kawashima M, Togo T, *et al.* Accumulated alpha-synuclein affects the progression of GM2 gangliosidosis. *Exp Neurol* 2016; 284(Pt A): 38-49.

- Swinn L, Schrag A, Viswanathan R, Bloem BR, Lees A, Quinn N. Sweating dysfunction in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003; 18(12): 1459-63.
- Tagliavini F, Pilleri G, Bouras C, Constantinidis J. The basal nucleus of Meynert in idiopathic Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 1984; 70(1): 20-8.
- Tan EK, Zhao Y, Skipper L, Tan MG, Di Fonzo A, Sun L, *et al.* The LRRK2 Gly2385Arg variant is associated with Parkinson's disease: genetic and functional evidence. *Hum Genet* 2007; 120(6): 857-63.
- Tang P, Chong L, Li X, Liu Y, Liu P, Hou C, *et al.* Correlation between serum RANTES levels and the severity of Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 208408.
- Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis* 2010; 37(3): 510-8.
- Taylor KS, Cook JA, Counsell CE. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78(8): 905-6.
- Tessitore A, Amboni M, Cirillo G, Corbo D, Picillo M, Russo A, *et al.* Regional gray matter atrophy in patients with Parkinson disease and freezing of gait. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012; 33(9): 1804-9.
- Thacker EL, O'Reilly EJ, Weisskopf MG, Chen H, Schwarzschild MA, McCullough ML, *et al.* Temporal relationship between cigarette smoking and risk of Parkinson disease. *Neurology* 2007; 68(10): 764-8.
- Tinaz S, Courtney MG, Stern CE. Focal cortical and subcortical atrophy in early Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011; 26(3): 436-41.
- Tokuda T, Qureshi MM, Ardah MT, Varghese S, Shehab SA, Kasai T, *et al.* Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* 2010; 75(20): 1766-72.
- Toledo JB, Korff A, Shaw LM, Trojanowski JQ, Zhang J. CSF alpha-synuclein improves diagnostic and prognostic performance of CSF tau and Abeta in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2013; 126(5): 683-97.
- Trupp M, Jonsson P, Ohrfelt A, Zetterberg H, Obudulu O, Malm L, *et al.* Metabolite and peptide levels in plasma and CSF differentiating healthy controls from patients with newly diagnosed Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2014; 4(3): 549-60.

- Umeda T, Tomiyama T, Sakama N, Tanaka S, Lambert MP, Klein WL, *et al.* Intraneuronal amyloid beta oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J Neurosci Res* 2011; 89(7): 1031-42.
- Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, *et al.* Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol* 2003; 157(11): 1015-22.
- van Dijk KD, Persichetti E, Chiasserini D, Eusebi P, Beccari T, Calabresi P, *et al.* Changes in endolysosomal enzyme activities in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013; 28(6): 747-54.
- Vidoni C, Follo C, Savino M, Melone MA, Isidoro C. The Role of Cathepsin D in the Pathogenesis of Human Neurodegenerative Disorders. *Med Res Rev* 2016; 36(5): 845-70.
- Volpicelli-Daley LA, Gamble KL, Schultheiss CE, Riddle DM, West AB, Lee VM. Formation of alpha-synuclein Lewy neurite-like aggregates in axons impedes the transport of distinct endosomes. *Mol Biol Cell* 2014; 25(25): 4010-23.
- Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, *et al.* Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* 2011; 72(1): 57-71.
- Vossius C, Larsen JP, Janvin C, Aarsland D. The economic impact of cognitive impairment in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011; 26(8): 1541-4.
- Vranova HP, Henykova E, Kaiserova M, Mensikova K, Vastik M, Mares J, *et al.* Tau protein, beta-amyloid(1-)(-)(4)(2) and clusterin CSF levels in the differential diagnosis of Parkinsonian syndrome with dementia. *J Neurol Sci* 2014; 343(1-2): 120-4.
- Wang MX, Cheng XY, Jin M, Cao YL, Yang YP, Wang JD, *et al.* TNF compromises lysosome acidification and reduces alpha-synuclein degradation via autophagy in dopaminergic cells. *Exp Neurol* 2015; 271: 112-21.
- Wang Y, Butros SR, Shuai X, Dai Y, Chen C, Liu M, *et al.* Different iron-deposition patterns of multiple system atrophy with predominant parkinsonism and idiopathic Parkinson diseases demonstrated by phase-corrected susceptibility-weighted imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012; 33(2): 266-73.
- Waragai M, Wei J, Fujita M, Nakai M, Ho GJ, Masliah E, *et al.* Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345(3): 967-72.

- Ward CD, Gibb WR. Research diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1990; 53: 245-9.
- Warrington EK, James M (1991) The Visual Object and Space Perception Battery. Bury St Edmunds, England: Thames Valley Test Company.
- Wechsler, D (1997). Wechsler Adult Intelligence Scale-III. San Antonio, TX. The Psychological Corporation.
- Weerkamp NJ, Tissingh G, Poels PJ, Zuidema SU, Munneke M, Koopmans RT, *et al.* Nonmotor symptoms in nursing home residents with Parkinson's disease: prevalence and effect on quality of life. *J Am Geriatr Soc* 2013; 61(10): 1714-21.
- Weintraub D, Newberg AB, Cary MS, Siderowf AD, Moberg PJ, Kleiner-Fisman G, *et al.* Striatal dopamine transporter imaging correlates with anxiety and depression symptoms in Parkinson's disease. *J Nucl Med* 2005; 46(2): 227-32.
- Weisskopf MG, O'Reilly E, Chen H, Schwarzschild MA, Ascherio A. Plasma urate and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 2007; 166(5): 561-7.
- Wennstrom M, Surova Y, Hall S, Nilsson C, Minthon L, Bostrom F, *et al.* Low CSF levels of both alpha-synuclein and the alpha-synuclein cleaving enzyme neurosin in patients with synucleinopathy. *PLoS One* 2013; 8(1): e53250.
- Whittington CJ, Podd J, Kan MM. Recognition memory impairment in Parkinson's disease: power and meta-analyses. *Neuropsychology* 2000; 14(2): 233-46.
- Williams-Gray CH, Evans JR, Goris A, Foltynie T, Ban M, Robbins TW, *et al.* The distinct cognitive syndromes of Parkinson's disease: 5 year follow-up of the CamPaIGN cohort. *Brain* 2009; 132(Pt 11): 2958-69.
- Williams-Gray CH, Foltynie T, Brayne CE, Robbins TW, Barker RA. Evolution of cognitive dysfunction in an incident Parkinson's disease cohort. *Brain* 2007; 130(Pt 7): 1787-98.
- Williams-Gray CH, Mason SL, Evans JR, Foltynie T, Brayne C, Robbins TW, *et al.* The CamPaIGN study of Parkinson's disease: 10-year outlook in an incident population-based cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; 84(11): 1258-64.
- Winder-Rhodes SE, Evans JR, Ban M, Mason SL, Williams-Gray CH, Foltynie T, *et al.* Glucocerebrosidase mutations influence the natural history of Parkinson's disease in a community-based incident cohort. *Brain* 2013; 136(Pt 2): 392-9.
- Winner B, Melrose HL, Zhao C, Hinkle KM, Yue M, Kent C, *et al.* Adult neurogenesis and neurite outgrowth are impaired in LRRK2 G2019S mice. *Neurobiol Dis* 2011; 41(3): 706-16.

- Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* 2011; 26 Suppl 1: S1-58.
- Wood BH, Bilclough JA, Bowron A, Walker RW. Incidence and prediction of falls in Parkinson's disease: a prospective multidisciplinary study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 72(6): 721-5.
- Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75(4): 637-9.
- Xilouri M, Vogiatzi T, Vekrellis K, Park D, Stefanis L. Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLoS One* 2009; 4(5): e5515.
- Yu SY, Zuo LJ, Wang F, Chen ZJ, Hu Y, Wang YJ, *et al.* Potential biomarkers relating pathological proteins, neuroinflammatory factors and free radicals in PD patients with cognitive impairment: a cross-sectional study. *BMC Neurol* 2014; 14(1): 113.
- Yue Z, Yang XW. Dangerous duet: LRRK2 and alpha-synuclein jam at CMA. *Nat Neurosci* 2013; 16(4): 375-7.
- Zabetian CP, Yamamoto M, Lopez AN, Ujike H, Mata IF, Izumi Y, *et al.* LRRK2 mutations and risk variants in Japanese patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2009; 24(7): 1034-41.
- Zarow C, Lyness SA, Mortimer JA, Chui HC. Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch Neurol* 2003; 60(3): 337-41.
- Zhan W, Kang GA, Glass GA, Zhang Y, Shirley C, Millin R, *et al.* Regional alterations of brain microstructure in Parkinson's disease using diffusion tensor imaging. *Mov Disord* 2012; 27(1): 90-7.
- Zhang J, Sokal I, Peskind ER, Quinn JF, Jankovic J, Kenney C, *et al.* CSF multianalyte profile distinguishes Alzheimer and Parkinson diseases. *Am J Clin Pathol* 2008; 129(4): 526-9.
- Zhang J, Yu KF. What's the relative risk? A method of correcting the odds ratio in cohort studies of common outcomes. *JAMA* 1998; 280(19): 1690-1.
- Zhang L, Shimoji M, Thomas B, Moore DJ, Yu SW, Marupudi NI, *et al.* Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2005; 14(14): 2063-73.

Zheng B, Liao Z, Locascio JJ, Lesniak KA, Roderick SS, Watt ML, *et al.* PGC-1alpha, a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 2010; 2(52): 52ra73.

Zweig RM, Cardillo JE, Cohen M, Giere S, Hedreen JC. The locus ceruleus and dementia in Parkinson's disease. *Neurology* 1993; 43(5): 986-91.

# Anexo



## ARTÍCULO I

### **Biomarkers for Dementia and Mild Cognitive Impairment in Parkinson's Disease**

Manuel Delgado-Alvarado, Belén Gago, Irene Navalpotro-Gomez, Haritz Jiménez-Urbieto, María C. Rodríguez-Oroz

Movement Disorders. 2016 Jun;31(6):861-81.

## Biomarkers for Dementia and Mild Cognitive Impairment in Parkinson's Disease

Manuel Delgado-Alvarado, MD,<sup>1,2</sup> Belén Gago, PhD,<sup>1,2†</sup> Irene Navalpotro-Gomez, MD,<sup>1,2</sup> Haritz Jiménez-Urbieta,<sup>1,2</sup> and María C. Rodríguez-Oroz, MD, PhD<sup>1,2,3,4,5,6\*</sup>

<sup>1</sup>*Biodonostia Health Research Institute, San Sebastián, Spain*

<sup>2</sup>*Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain*

<sup>3</sup>*Neurology Department, University Hospital Donostia, San Sebastián, Spain*

<sup>4</sup>*Ikerbasque (Basque Foundation for Science), Bilbao, Spain*

<sup>5</sup>*Basque Center on Cognition, Brain and Language (BCBL), San Sebastián, Spain*

<sup>6</sup>*Physiology Department, Medical School University of Navarra, Pamplona, Spain*

**ABSTRACT:** Cognitive decline is one of the most frequent and disabling nonmotor features of Parkinson's disease. Around 30% of patients with Parkinson's disease experience mild cognitive impairment, a well-established risk factor for the development of dementia. However, mild cognitive impairment in patients with Parkinson's disease is a heterogeneous entity that involves different types and extents of cognitive deficits. Because it is not currently known which type of mild cognitive impairment confers a higher risk of progression to dementia, it would be useful to define biomarkers that could identify these patients to better study disease progression and possible interventions. In this sense, the identification among patients with Parkinson's disease and mild cognitive impairment of biomarkers associated with dementia would allow the early detection of this process. This review summarizes studies from the past 25 years that have assessed the

potential biomarkers of dementia and mild cognitive impairment in Parkinson's disease patients. Despite the potential importance, no biomarker has as yet been validated. However, features such as low levels of epidermal and insulin-like growth factors or uric acid in plasma/serum and of A $\beta$  in CSF, reduction of cerebral cholinergic innervation and metabolism measured by PET mainly in posterior areas, and hippocampal atrophy in MRI might be indicative of distinct deficits with a distinct risk of dementia in subgroups of patients. Longitudinal studies combining the existing techniques and new approaches are needed to identify patients at higher risk of dementia. © 2016 International Parkinson and Movement Disorder Society

**Key Words:** Parkinson's disease; mild cognitive impairment; biomarkers; dementia

\*Correspondence to: Dr. María C. Rodríguez-Oroz Universidad de Málaga, Instituto de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, Málaga, Spain; maria.rodriguezoroz@biodonostia.org

Dr. Gago is currently with the Universidad de Málaga, Instituto de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, Málaga, Spain

**Funding agencies:** Institute of Health Carlos III (ISCIII), grants PI08/1539 and PI14/00763; Government of the Basque Country, grants 2011111074 and SAIO12-PE12BN012; and CIBERNED. M.D.-A. is funded by a Basque Country Ph.D. studentship and a Jesús de Gangoiti Barrera Foundation grant.

**Relevant conflicts of interests/financial disclosures:** Nothing to report.

**Received:** 30 January 2016; **Revised:** 15 April 2016; **Accepted:** 18 April 2016

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/mds.26662

It is only in recent decades that cognitive impairment has become recognized as a relevant clinical manifestation of PD, the prevalence of dementia reaching 80% in long-term patients.<sup>1,2</sup> Mild cognitive impairment (MCI) is also highly prevalent in PD (PD-MCI) (mean 26.7%; range 18.9%–38.2%),<sup>3</sup> and it is known to be a risk factor for PD with dementia (PDD).<sup>3–7</sup> PD-MCI is defined as cognitive decline that is not normal for the age and educational level of the patient but that is not associated with impaired functional activity.<sup>8</sup> However, PD-MCI is a heterogeneous entity that covers several forms of cognitive impairment in function of the number and type of cognitive domains affected.<sup>8</sup> It is not currently known which types of PD-MCI confer a higher risk of progression to dementia. In this sense, useful biomarkers are

needed that can predict future outcome or that are useful to longitudinally track the underlying disease pathology in an objective way. Thus, there is increasing interest in the search for biomarkers that could aid in the identification of such PD-MCI patients. The assessment of biomarkers already associated with PDD in PD-MCI patients is one interesting approach to define subtypes of MCI that share biological features with dementia. In this review, we summarize the data currently available regarding the biological markers of dementia and MCI in PD.

## Literature Searching Strategy

The literature in Medline (PubMed) from January 1990 to July 2015 was reviewed using the free search terms “Parkinson’s disease AND (dementia OR mild cognitive impairment)” combined with the following terms/sets of terms: cerebrospinal fluid; blood OR plasma; genes OR DNA OR polymorphism; magnetic resonance imaging; PET; SPECT; electroencephalogram; magnetoencephalography; evoked potentials. The search was limited to articles in English, and the reference lists were searched for additional publications. Because the concept of PD-MCI was introduced only a few years ago and the diagnostic criteria (MDS Task Force)<sup>8</sup> were only recently adopted, some studies only distinguished between PDD and nondemented PD patients (PDND), whereas in others cognitively normal PD patients (PDCN) and PD-MCI were considered. Notably, several studies did not specify whether PD patients were PDCN or PDND, referring to them only as PD. In this review, we maintain the nomenclature used in the original papers. In addition to the studies in which a diagnosis of PDD or PD-MCI was indicated, those studying correlations between biomarkers and cognitive performance have been considered. Studies in which cognitive diagnosis was only based on subjective medical assessment without any formal neuropsychological evaluation, case reports, and case series were excluded.

## Cerebrospinal Fluid

The presence of Lewy bodies (LB), amyloid plaques, and neurofibrillary tangles in the neocortex and limbic system is associated with dementia<sup>9-13</sup> and MCI<sup>14,15</sup> in PD. Hence, the levels of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ), tau protein, and  $\alpha$ -synuclein have been studied in the cerebrospinal fluid (CSF) of PD patients (Table 1). In most studies, there was less A $\beta$  in PDD than in healthy controls<sup>16-20</sup> and PDND<sup>16,18,19</sup> patients, and lower levels of A $\beta$  were associated with progression to dementia in PDND patients<sup>21</sup> and a deterioration in attention,<sup>22</sup> executive function,<sup>22,23</sup> memory,<sup>22,23</sup> and global cognition.<sup>24</sup> By contrast, the data for total (t-tau) and

phosphorylated tau (p-tau) are less consistent, with increased<sup>16,18,25,26</sup> or unchanged levels<sup>17,27-30</sup> in PDD patients. In PD-MCI patients, there was less<sup>17</sup> or similar<sup>31,32</sup> A $\beta$  to that in PDCN patients, whereas t-tau was higher<sup>32</sup> or no different,<sup>17,31</sup> and p-tau was comparable in both.<sup>17,31,32</sup> Interestingly, in PDND patients, low levels of A $\beta$ <sup>24,25,33-35</sup> and a low A $\beta$  1-42/total tau<sup>24,34</sup> ratio were associated with impairment in several cognitive domains or tests: attention and working memory,<sup>34</sup> executive function,<sup>35</sup> memory,<sup>33,35</sup> and phonemic<sup>21</sup> and semantic fluency.<sup>34</sup> Although the total  $\alpha$ -synuclein was similar in PDD and PDND patients or controls in initial studies,<sup>26,36</sup> technically more advanced analyses show that PDD patients have more oligomeric forms of  $\alpha$ -synuclein,<sup>18,37</sup> and a higher total  $\alpha$ -synuclein concentration was associated with a faster decline in cognitive performance in de novo patients.<sup>38</sup> However, most studies fail to find any association between total or oligomeric  $\alpha$ -synuclein and cognition in PDND patients.<sup>24,35,39</sup>

Proteins involved in inflammatory processes, oxidative stress, and neuronal viability have also been investigated (Supplementary Table 1). More C-reactive protein was found in PDD patients than in PDND and controls,<sup>40</sup> and interleukin-6 and interleukin-1 $\beta$  were more elevated in PD-MCI than in PDCN patients or controls.<sup>32</sup> PD-MCI patients also had less interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$ , and higher levels of nitric oxide and hydroxyl radical than controls.<sup>32</sup> In addition, some of these proteins were associated with global cognition in PDND<sup>40</sup> and PD-MCI patients.<sup>32</sup> Uric acid (UA),<sup>41</sup> a scavenger of free radicals, and cystatin C,<sup>42</sup> which has anti-amyloidogenic properties, were also reduced in PDD and dementia with Lewy bodies patients. Other proteins, such as brain derived neurotrophic factor (BDNF), eotaxin, ferritin, hypocretin, and transthyretin<sup>32,34,40,43,44</sup> did not differ between PDD and PDND or controls. Finally, recent proteomic analyses reveal that some proteins involved in signaling pathways, axonal guiding, or protein folding<sup>45,46</sup> were differentially expressed in PDD and PDND patients. Interestingly, a profile characterized by low A $\beta$ 1-42, high neurofilament light chain protein, and high heart fatty acid-binding protein was associated with progression to PDD, with a relatively high diagnostic accuracy.<sup>47</sup>

Despite some variability, reduced A $\beta$  in PDD patients and in PDND who progressed to dementia appears to be relatively consistent.<sup>16-24</sup> Along with the heterogeneity in A $\beta$  concentrations in PD-MCI<sup>17,31,32</sup> and the fact that low A $\beta$  correlates with specific cognitive deficits in PDND patients,<sup>24,25,33-35</sup> this suggests that the A $\beta$  protein might represent a useful biomarker to identify specific types of PD-MCI that might be at higher risk of suffering dementia (patients with

**TABLE 1.** Summary of the studies that evaluated CSF amyloid  $\beta$ 1-42 (A $\beta$ 1-42), total tau (t-tau), phosphorylated tau (p-tau), total  $\alpha$ -synuclein (t- $\alpha$ -syn), and oligomeric  $\alpha$ -synuclein (o- $\alpha$ -syn) as potential biomarkers for PDD or PD-MCI

	Studied Biomarkers					Patients					Cognitive Evaluation/Diagnostic Criteria	Main Results/Findings
	A $\beta$ 1-42	T-tau	P-tau	T- $\alpha$ -syn	O- $\alpha$ -syn	PDND	PDCN	PDD	PD-MCI	Control		
<b>PDD</b>												
Jansen et al, 1998 <sup>27</sup>		+	+			67		48		41	MMSE/PDD if < 26	No differences
Parnetti et al, 2008 <sup>28</sup>	+	+	+			20		8		20	MMSE/PDD by McKeith et al, 1996	
Maetzler et al, 2011 <sup>41</sup>	+	+				21		10		39	MMSE/PDD by DSM-IV	
Maetzler et al, 2012 <sup>30</sup>	+	+				77		26		72	MMSE/PDD by DSM-IV and MDS Task Force	
Wennström et al, 2013 <sup>36</sup>				+		38		22		52	MMSE/PDD by MDS Task Force	PDD vs PDND and C: ↓ A $\beta$ 1-42 PDD vs C: ↑ t-tau
Mollenhauer et al, 2006 <sup>16</sup>	+	+				23		73		41	MMSE/PDD if < 25	
Maetzler et al, 2009 <sup>20</sup>	+					14		12			MMSE/PDD by DSM-IV	PDD vs PDND: ↓ A $\beta$ 42
Compta et al, 2009 <sup>25</sup>	+	+				20		20		30	MMSE, attention and working memory, executive, memory, language, visuospatial/PDD by DSM-IV-R and MDS Task Force	PDD vs PDND and C: ↑ t-tau PDND: ↓ A $\beta$ 1-42 positively correlated with phonemic fluency
Compta et al, 2011 <sup>19</sup>	+	+	+			19		19		9	MMSE/PDD by DSM-IV-R and MDS Task Force	PDD vs PDND and C: ↓ A $\beta$ 1-42 ↑ t-tau and p-tau in a subgroup of PDND and PDD with the rs242557 A-allele of <i>MAPT</i> and with levels of A $\beta$ 1-42 < 500 pg/mL
Hall et al, 2012 <sup>26</sup>	+	+	+	+		90		33		107	MMSE/PDD by MDS Task Force	PDD vs PDND: ↑ p-tau No differences in A $\beta$ 1-42 or t- $\alpha$ -syn
Vranová et al, 2014 <sup>29</sup>	+	+				27		14		24	MMSE, attention and working memory, executive, memory / PDD by MDS Task Force	PDD vs PDND: ↑ t-tau/A $\beta$ 1-42 index No differences in A $\beta$ 1-42 or t-tau
Hansson et al, 2014 <sup>37</sup>				+	+	30				98	MMSE/PDD by MDS Task Force	PDD vs C: ↑ o- $\alpha$ -syn
Compta et al, 2015 <sup>18</sup>	+	+		+	+	21		20		13	MMSE/PDD by MDS Task Force	PDD vs PDND and C: ↓ A $\beta$ 1-42 and ↑ t-tau PDD vs C: ↑ o- $\alpha$ -syn
<b>PD-MCI</b>												
Beyer et al, 2013 <sup>31</sup>	+ A $\beta$ 38, A $\beta$ 40	+	+				73		18		MMSE, attention and working memory, executive, memory, visuospatial/PD-MCI if performance < 1.5 SDs below predicted level in ≥1 cognitive domains	No differences
Montine et al, 2010 <sup>17</sup>	+	+	+				41	11	58	150	CDR/PDD by MDS Task Force; PD-MCI by CDR = 0.5	PDD vs C: ↓ A $\beta$ 1-42 PD-MCI vs C: ↓ A $\beta$ 1-42 No differences in t-tau and p-tau
Yu et al, 2014 <sup>32</sup>	+	+	+				26		36	31	MMSE, MOCA/PDD, and PD-MCI by MDS Task Force	PD-MCI vs PDCN and C: ↑ t-tau PD-MCI: MOCA negatively correlated with t-tau
<b>PDND<sup>a</sup></b>												
Alves et al, 2010 <sup>33</sup>	+ A $\beta$ 38, A $\beta$ 40	+	+			109				36	MMSE, attention and working memory, executive, memory, visuospatial/PDD by MDS Task Force	Positive correlation between A $\beta$ 42, A $\beta$ 38 and A $\beta$ 40 and memory

(Continued)

TABLE 1. Continued

	Studied Biomarkers					Patients					Cognitive Evaluation/Diagnostic Criteria	Main Results/Findings
	Aβ1-42	T-tau	P-tau	T-α-syn	O-α-syn	PDND	PDCN	PDD	PD-MCI	Control		
Siderowf et al, 2010 <sup>22b</sup>	+	+	+			45					DRS-2, memory, attention and working memory, initiation-perseveration, construction, and conceptualization/PDD if DRS-2 <124	↓ Aβ1-42 associated with decline in attention, conceptualization, memory and initiation/perseveration
Leverenz et al, 2011 <sup>34</sup>	+	+				22					MMSE, attention and working memory, memory, semantic fluency, executive, processing speed/PDD by consensus panel based on CDR	Positive correlation between Aβ1-42, attention and working memory Positive correlation between Aβ42/t-tau and working memory, attention and semantic fluency
Compta et al, 2013 <sup>21b</sup>	+					27					MMSE, executive, memory, language, visuospatial/PDD by MDS Task Force	↓ Aβ1-42 in dementia-converters Positive correlation between Aβ1-42 and lower phonemic fluency
Stewart et al, 2014 <sup>38b</sup>				+		304					MMSE, attention and working memory, memory, visuospatial/PDD if MMSE < 23	↑ t-α-syn at baseline predicts faster cognitive decline
Parnetti et al, 2014 <sup>24b</sup>	+	+	+	+	+	44				25	MMSE, MOCA	Aβ1-42 negative correlation with decline in MMSE and MOCA Aβ1-42 and t-tau negative correlation with decline in MMSE
Liu et al, 2015 <sup>23b</sup>	+	+	+			403					MMSE, attention and working memory, executive, memory, visuospatial	No association with cognitive function at baseline T-tau and p-tau/Aβ1-42 predicted decline in memory and executive function
Buddhala et al, 2015 <sup>39</sup>	+	+	+	+		77				30	CDR, attention and working memory, executive, memory, language, visuospatial/PDD by CDR	No association with cognition
Stav et al, 2015 <sup>35</sup>	+	+	+	+		31				34	Attention and working memory, executive, visuospatial	Positive correlation between Aβ1-42 and memory and response inhibition
Backstrom et al, 2015 <sup>47b</sup>	+	+	+	+		99					Attention and working memory, executive, memory, visuospatial/PDD and PD-MCI by modified MDS Task Force	↓ Aβ1-42 associated with progression to PDD

Abbreviations. SD, standard deviation. Subjects: PDND, Parkinson's disease nondemented; PDD, Parkinson's disease with dementia; PD-MCI, Parkinson's disease with mild cognitive impairment; PDCN, Parkinson's disease cognitively normal; C, control. Cognitive assessment: MMSE, Mini Mental State Examination; MOCA, Montreal Cognitive Assessment; DRS-2, Mattis Dementia Rating Scale (version 2); MDS, Movement Disorders Society; CDR, Clinical Dementia Rating; DSM-IV, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*; DSM-IV-R, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Revised Fourth Edition*.

<sup>a</sup>In these studies, PDD patients were excluded according to the criteria shown. No distinction between PDCN and PD-MCI was considered in PDND patients.

<sup>b</sup>Longitudinal studies.

concomitant Alzheimer's disease [AD] or AD pathological changes). Although based on few studies, an increase in  $\alpha$ -synuclein oligomers should also be considered.<sup>18,26,36-38</sup> Differences in proteins related to inflammation,<sup>32,40</sup> oxidative stress,<sup>41</sup> and cell survival are also promising.<sup>45,46</sup> Proteomic analysis might also be considered to validate and expand current data in future studies.

## Other Biological Fluids: Plasma/Serum and Urine

Apart from CSF, other biological fluids represent an attractive source of biomarkers because of the ease of obtaining samples (Supplementary Table 1). Regarding plasmatic homocysteine, whereas some studies associated higher levels with dementia and worse cognitive outcome,<sup>48-50</sup> others failed to find any relationship with PD-MCI, dementia, or neuropsychological performance.<sup>51-53</sup>

Plasma or serum levels of proteins involved in inflammation (C-reactive protein), oxidative stress (UA), or neuroprotection (vitamin D, transthyretin) were not different in PDD and PDND patients.<sup>30,54-56</sup> However, in PDND patients, low UA concentrations was associated with a worse outcome in global cognition,<sup>57,58</sup> attention, and memory<sup>59</sup>; high vitamin D levels with better semantic fluency and memory<sup>54</sup>; and high concentrations of IL-6,<sup>60,61</sup> tumor necrosis factor  $\alpha$ ,<sup>60</sup> and interferon- $\gamma$ -induced protein 10<sup>62</sup> with lower cognitive scores. Importantly, low levels of epidermal growth factor (EGF)<sup>63,64</sup> and insulin-like growth factor (ILGF)<sup>65</sup> have certain predictive values for the development of dementia and cognitive decline, and ILGF positively correlates with global cognition<sup>66</sup> and executive function.<sup>65</sup> Interestingly, after cognitive rehabilitation, plasma BDNF levels increased in PD-MCI patients.<sup>67</sup>

In addition to proteins, lipids have also been evaluated because abnormal lipid peroxidation may play a role in the pathogenesis of PD and other neurodegenerative diseases.<sup>68,69</sup> Whereas plasma levels of phospholipids were higher in PD-MCI than in PDCN patients,<sup>70</sup> prostaglandin isomers derived from free radical peroxidation of polyunsaturated fatty acids<sup>71</sup> (ie, F2-isoprostanes) did not differ between PDD and PDND patients, nor were they associated with the severity of cognitive impairment.<sup>72</sup> Lipids involved in the metabolism of glucosylceramide (a glucocerebrosidase [GBA] substrate) have also been investigated, and interestingly, in the absence of mutations in GBA, the levels of some ceramide species were higher in PD-MCI or PDD than in PDCN patients.<sup>73</sup>

Regarding urine, only UA has been studied to date, and in keeping with findings in plasma, low UA

levels are associated with poor neuropsychological performance.<sup>57</sup>

In summary, the fact that cognitive outcomes are associated with neurotrophic factors and markers of inflammation and that a few longitudinal studies in small cohorts with early PD show that EGF,<sup>63,64</sup> ILGF,<sup>65</sup> and UA<sup>59</sup> may predict cognitive decline, it is suggested that these proteins could be useful as biomarkers of dementia in PD. The differences in some lipids between groups of PD patients with distinct cognitive states may also be of potential value.<sup>70,73</sup> These findings are consistent with recent data linking neurodegeneration and aging with disturbances in lipid metabolism<sup>74,75</sup> and neuroinflammation.<sup>76</sup>

## Genetic Background

Genes are part of our inborn biological fingerprint and although they can be useful to predict outcome (ie, risk of dementia), they are not useful to track disease course (ie, cognitive evolution in a patient with PD). Thus, genetic factors are better considered as "predictive markers" rather than true biomarkers. Genes related to the aggregated proteins encountered in the brain of PDD patients<sup>9-13</sup> (Table 2) have been extensively pursued. The  $\epsilon 4$  allele of apolipoprotein E gene (*APOE*) is associated with increased amyloid plaque load,<sup>77</sup> and it was found to be more prevalent in PDD than in PDND patients<sup>78-81</sup> as well as being associated with lower performance in memory,<sup>82,83</sup> working memory, executive function, and semantic fluency<sup>83</sup> in PDND. However, such results were not evident elsewhere,<sup>31,84-90</sup> and this discrepancy is most likely a result of the significant methodological variability among the studies (Table 2). Most of these cross-sectional studies have been pooled in 1 meta-analysis,<sup>91</sup> suggesting an overrepresentation of *APOE*  $\epsilon 4$  carriers among PDD patients. In addition, although not uniformly,<sup>22,89,91</sup> longitudinal studies show that *APOE*  $\epsilon 4$ <sup>92-95</sup> and *APOE*  $\epsilon 2$ <sup>94,95</sup> are associated with more rapid cognitive decline and a risk of PDD. In relation to the tau gene (*MAPT*), despite the absence of uniform data,<sup>83,88,92</sup> the H1 haplotype in PD patients was found to be associated with dementia<sup>96</sup> and with a higher risk of progression to dementia<sup>97</sup> and cognitive decline<sup>98</sup> in the more extensive cross-sectional<sup>96</sup> and longitudinal studies.<sup>97,98</sup> In addition, in PDND patients, the H1/H1 genotype was associated with poor visual and memory outcomes,<sup>92,99</sup> although this finding was not replicated in a larger study.<sup>83</sup> Duplications, triplications,<sup>100,101</sup> and some mutations of the *SNCA* gene that encodes the  $\alpha$ -synuclein protein<sup>102,103</sup> are associated with early onset dementia, although patients with idiopathic PDD and PDND did not show different polymorphisms of this gene.<sup>104</sup> Interestingly, a recent multicenter study in a

**TABLE 2.** Summary of genetic studies assessing *APOE*, *MAPT*, and *GBA* as potential biomarkers of PD-MCI and PDD

Author	Patients			Cognitive evaluation/diagnostic criteria	Main results/findings
	PDND	PDD	PD-MCI		
<i>APOE</i> cross-sectional					
Koller et al, 1995 <sup>84</sup>	61	52			No differences
Parsian et al, 2002 <sup>85</sup>	250	34		96	
Camicoli et al, 2005 <sup>86</sup>	19	28			MMSE/PDD by DSM-IV MMSE, attention and working memory, executive, memory, language, visuospatial/ PDD by ICD-10 and DSM-IV
Jasinska-Myga et al, 2007 <sup>87</sup>	100	98			
Ezquerro et al, 2008 <sup>88</sup>	138	86		91	NA/PDD by MDS Task Force MMSE, executive, memory, visuospatial/PD-MCI if cognitive performance < 1.5 SDs below predicted level
Beyer et al, 2013 <sup>31</sup>	73 <sup>a</sup>		18		
Feldman et al, 2006 <sup>79</sup>	49	38			NA/DSM-IV DRS, attention and working memory, executive, memory, language
Tröster et al, 2006 <sup>90</sup>	62			146	
Pankratz et al, 2006 <sup>80</sup>	274	50			PDD by MMSE with education-specific cutoff
Papapetropoulos et al, 2007 <sup>81</sup>	33	39			PDD by American Psychiatric Association 1987, 1994 or MMSE < 24
Blazquez et al, 2006 <sup>78</sup>	276	212			MMSE/PDD if < 24
Mata et al, 2014 <sup>83</sup>	1079 <sup>b</sup>				MOCA, attention and working memory, executive, memory, language, visuospatial
<i>APOE</i> longitudinal					
Harhangi et al, 2000 <sup>95</sup>	79	25		4673	PDD by DSM-III-R
de Lau et al, 2005 <sup>94</sup>	139				MMSE/PDD by DSM-III-R
Kurz et al, 2009 <sup>89</sup>	95			73	MMSE/PDD by DSM-IV
Williams-Gray et al, 2009 <sup>91</sup>	101				MMSE, executive, memory, language/PDD by MMSE ≤ 24 and DSM-IV
Siderowf et al, 2010 <sup>22</sup>	45				DRS-2/PDD if < 124
Morley et al, 2012 <sup>92</sup>	212				DRS-2
<i>MAPT</i> cross-sectional					
Ezquerro et al, 2008 <sup>88</sup>	138	86		91	PDD by MDS Task Force MOCA, attention and working memory, executive, memory, language, visuospatial
Mata et al, 2014 <sup>83</sup>	1079 <sup>b</sup>				
Setó-Salvia et al, 2011 <sup>96</sup>	2154	48		374	DRS/PDD by DSM IV-R
<i>MAPT</i> longitudinal					
Goris et al, 2007 <sup>98</sup>	109 <sup>b</sup>				MMSE MMSE, executive, memory, language/PDD by MMSE ≤ 24 and DSM-IV
Williams-Gray et al, 2009 <sup>97</sup>	126				

(Continued)

TABLE 2. Continued

Author	Patients			Controls	Cognitive evaluation/diagnostic criteria	Main results/findings
	PDND	PDD	PD-MCI			
Morley et al, 2012 <sup>92</sup>	212 <sup>b</sup>				DRS-2, attention, memory, initiation-perseveration, construction, and conceptualization	H1/H1 associated with ↓ memory at baseline, but not with changes over time
<i>GBA</i> cross-sectional						
Alcalay et al 2010 <sup>107</sup>	699				MMSE, self-report of cognitive impairment	Association with self-reported cognitive impairment
Setó-Salvia et al, 2011 <sup>96</sup>	225 <sup>a</sup>			186	Clinical Dementia Rating Scale/PDD by DSM IV-R	Association with PDD
Alcalay et al, 2012 <sup>106</sup>	72 <sup>a</sup>				MMSE, CDR, executive, memory, visuospatial	Association with ↓ memory and visuospatial function
<i>GBA</i> longitudinal						
Winder-Rhodes et al, 2013 <sup>109</sup>	121				MMSE/PDD by DSM IV	Associated with progression to PDD
Brockmann et al, 2015 <sup>108</sup>	39				MOCA	Associated with ↑ cognitive decline

Abbreviations. NA, not available; SD, standard deviation. Genes: *APOE*, Apolipoprotein E; *MAPT*, Microtubule Associated Protein Tau; H1, haplotype H1; H2, haplotype H2; *GBA*, Glucocerebrosidase. Subjects: PDND, Parkinson's disease non-demented; PDD, Parkinson's disease dementia; PD-MCI, Parkinson's disease mild cognitive impairment; PDCN, Parkinson's disease cognitively normal; C, control. Cognitive assessment: DRS, Mattis Dementia Rating Scale; DRS-2, Mattis Dementia Rating Scale (version 2); NINCDS, National Institute of Neurological Disorders and Stroke; MMSE, Mini Mental State Examination; MOCA, Montreal Cognitive Assessment; DSM-III-R, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Revised Third Edition*; DSM-IV, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*; ICD-10, International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision; MDS, Movement Disorders Society.

<sup>a</sup>PD cognitively normal.

<sup>b</sup>PD (the cognitive status is not specified).

large cohort of PD patients show that the *APOE* ε4 allele but not the *MAPT* and *SNCA* genes was associated with lower cognitive performance.<sup>83</sup>

Recently, a higher prevalence of dementia,<sup>105,106</sup> MCI,<sup>106</sup> and poor outcomes in global cognition,<sup>107</sup> memory, and visuospatial function<sup>106</sup> were observed in PD patients carrying *GBA* mutations. Moreover, *GBA* mutations are associated with greater cognitive decline<sup>108</sup> and development of PDD<sup>109</sup> in longitudinal studies, and with higher LB burden.<sup>110</sup> It has been postulated that the poorer lysosomal activity linked to *GBA* mutations could reduce the turnover of α-synuclein through chaperone-mediated autophagy, leading to LB formation.<sup>110</sup>

Genes related to defective neurotransmission relevant to cognition in PD have also been studied. In relation to dopamine metabolism, the Val158Met polymorphism of the catechol-o-methyl transferase (*COMT*) gene is associated with poor performance in executive function or attention,<sup>92,111-115</sup> but apparently not with dementia.<sup>97</sup> No studies have assessed genes related to acetylcholine metabolism in PDD or PD-MCI patients, and no association between polymorphisms in the nicotinic receptor subunit α-4 gene and cognition have been encountered in PDCN patients.<sup>116</sup> Similarly, an association between genes related to the metabolism of homocysteine and cognition in PD has not been observed.<sup>48,51</sup> Conversely, polymorphisms in the *IL-17A*<sup>117</sup> and *BDNF*

genes<sup>118,119</sup> have been associated with poorer global cognition<sup>119</sup> and delayed recall.<sup>118</sup>

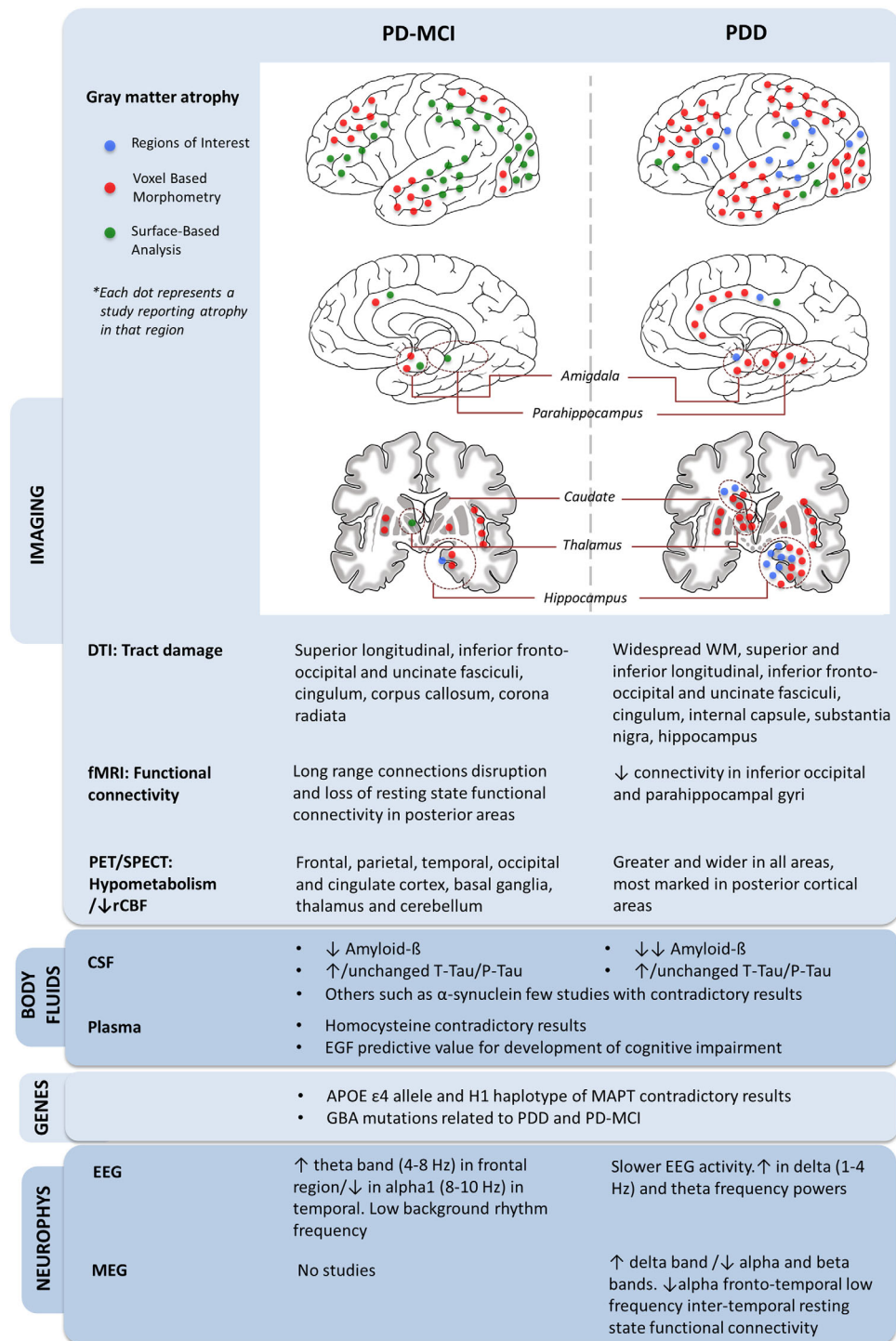
In summary, although there are contradictory results regarding the *APOE* ε4 allele and the H1 haplotype of the *MAPT* gene, methodological issues (ie, differences in the size of the cohorts studied, the cognitive assessment and diagnostic accuracy for dementia and MCI, disease duration, the age of the patients, etc.) impair making comparisons between them. Meta-analysis of cross-sectional studies<sup>91</sup> and longitudinal studies with larger cohorts<sup>92,94,95,97</sup> suggest that these genetic variants can be considered risk factors for dementia in PD. Recently, *GBA* mutations emerged as the strongest genetic predictive marker of dementia.<sup>105,106,108,109</sup> These genetic variations may account for, or have a great impact on, the subtype of PD-MCI and the risk of dementia.

## MRI

### Gray Matter Changes

Several cross-sectional studies have demonstrated higher brain atrophy in PDD and PD-MCI patients (more extensive in PDD) than in controls or PDCN or PDND patients,<sup>31,120-153</sup> particularly in the parietal, occipital, temporal, and frontal lobes, yet also in the hippocampus, amygdala, caudate, putamen, thalamus, and substantia innominata (Fig. 1). As expected, PDD patients had less gray matter (GM) volume than PD-





**FIG. 1.** Summary of the potential biomarkers of PD with dementia (PDD) and PD with mild cognitive impairment (PD-MCI) found in studies of MRI, PET (cerebral metabolism), and single-photon emission computed tomography (regional cerebral blood flow), body fluids, genetic background, and neurophysiology. DTI, diffusion tensor imaging; EGF, epidermal growth factor; fMRI, functional MRI; MEG, magnetoencephalography; rCBF, regional cerebral blood flow; SPECT, single-photon emission computed tomography.

MCI patients in several temporal and prefrontal areas,<sup>137</sup> including the amygdala,<sup>123</sup> and they had reduced cortical thickness in the anterior cingulate and entorhinal and orbitofrontal cortices as well as in the parahippocampus, temporal pole, precuneus, and fusiform and lingual areas.<sup>121</sup> Interestingly, several

studies report correlations between different areas of GM loss and cognitive function,<sup>31,121,123,127,131,134,142,146,150,154-162</sup> although in terms of biomarkers of dementia and MCI, longitudinal studies are much more valuable. Thus, reduced cortical thickness in the right precentral and superior frontal

gyri as well as in the anterior cingulate cortex<sup>21</sup> and less GM volume in the prefrontal areas, insular cortex, and caudate nucleus<sup>163</sup> along with hippocampal atrophy were observed in PD patients who developed dementia during follow-up.<sup>164</sup> Interestingly, hippocampal volume was also a major factor predicting the development of MCI in PD patients,<sup>164</sup> and a sophisticated analysis using Bayesian network classifiers showed that PDD, PD-MCI, and PDND patients were classified on this basis with high sensitivity and specificity.<sup>165</sup> In this study, reduced GM in the left hippocampus and right entorhinal cortex and enlargement of the lateral ventricles identified PDD patients, and brain stem and left hippocampus atrophy was seen in PD-MCI patients.<sup>165</sup>

In summary (Fig. 1), although there are many studies in this field, the most valuable are those with larger cohorts<sup>31,122,131,138,142,152,153,158</sup> and more advanced analytic approaches,<sup>121,125,148,152,157,165</sup> especially the longitudinal studies.<sup>21,152,163,164</sup> Accordingly, reduced cortical volume or thickness in several areas, and especially in the hippocampus,<sup>164</sup> appear to be associated with progression to dementia and MCI. This is a promising avenue to be followed, in which well-designed prospective studies using modern analytical models might help to validate these findings or identify new patterns that could serve as potential biomarkers.

### White Matter Microstructure: Diffusion Tensor Imaging

Reduced fractional anisotropy (FA) or increased mean diffusivity (MD) in diffusion tensor imaging studies can indicate alterations in the microstructure of white matter (WM) tracts. Both approaches show that dementia and MCI in PD are associated with extensive areas of modified WM microstructure (Fig. 1).<sup>153,166-172</sup> Reduced FA is widespread in PDD when compared with PDND patients or controls, compromising the main tracts (the superior and inferior longitudinal, inferior fronto-occipital and uncinate fasciculi, the cingulum, the anterior limb of the internal capsule, and the hippocampus).<sup>153,166-170</sup> In PD-MCI patients, the superior longitudinal, inferior fronto-occipital, and uncinate fasciculi as well as the cingulum, corpus callosum, and corona radiata had a lower FA than in PDCN or controls.<sup>153,166,169,171</sup> Notably, although PDD patients had reduced GM volume and FA, PD-MCI patients only showed FA abnormalities in the main WM tracts,<sup>153</sup> suggesting that tract damage may precede GM atrophy. Regarding MD, results are analogous to those found in FA for both PD-MCI and PDD patients.<sup>166,168,172</sup> On the other hand, both FA and MD values have been correlated with cognitive outcomes,<sup>153,161,167-170,172-175</sup> possibly indicating a role in the detection of subtypes of cognitive failure associated with PD.

Overall, the corpus callosum,<sup>153,171</sup> corona radiata,<sup>166,171</sup> and the inferior and superior longitudinal fasciculi are the areas most consistently altered in PDD and PD-MCI patients.<sup>153,166,171</sup> The fact that in the absence of GM changes, PD-MCI patients exhibited alterations in the main WM tracts<sup>153</sup> suggests that diffusion tensor imaging studies might help in the early diagnosis of cognitive decline. Longitudinal studies are not currently available, and they will be needed to determine whether any of these changes may be considered as true biomarkers of MCI or dementia in PD.

### Functional MRI: Cerebral Blood Flow

Functional MRI (fMRI) in resting state or during the execution of tasks indirectly measures neural activity and is used to study the regional activation of the brain and the association or dependency between 2 or more anatomic locations, termed *functional connectivity*. During the execution of working memory or executive function tasks, PD-MCI patients more weakly recruit the anterior cingulate cortex, caudate, medial and dorsolateral prefrontal cortex, and left precentral gyrus than PDCN patients.<sup>176-178</sup> However, similar findings were observed in PDCN patients when compared with controls,<sup>179</sup> suggesting that these changes are associated with executive dysfunction in PD.<sup>180,181</sup> Interestingly, genetic variants in PDND patients are associated with reduced recruitment of specific brain areas when executing certain tasks: the *MAPT* H1 haplotype in parietal<sup>115</sup> and medial temporal<sup>99</sup> regions when performing visuospatial and memory tests;<sup>99</sup> *APOE* ε4 allele in the temporo-parietal network in relation to memory encoding;<sup>115</sup> and *COMT* met/met homozygosity of the Val158Met polymorphism in the prefrontal cortices, frontoparietal network, and caudate nuclei when executing frontal tasks.<sup>111,113,115</sup>

In the resting state, reduced interregional correlations have been encountered in PDD (caudate nucleus-posterior cingulate cortex/precuneus<sup>182</sup> and inferior occipital-right parahippocampal gyri<sup>172,183</sup>) and in PD-MCI (long-range connections)<sup>184,185</sup> patients. In addition, reduced connectivity in the frontoparietal network is associated with poor cognitive outcome in PD-MCI,<sup>186</sup> and progressive loss of functional connectivity in posterior parts of the brain was associated with cognitive decline in the only longitudinal study available.<sup>187</sup> One interesting approach is to study the default network that reflects the predominant activity at rest, which is dampened when switching to a cognitive task. In PDD patients, this network has weaker connectivity in the right inferior frontal gyrus<sup>188</sup> and is less intensely deactivated than in controls when confronted with a complex visual task.<sup>183</sup>

Considering the data available (Fig. 1), it can be speculated that there are 2 main functional networks in the resting state: one more anterior that seems to be

related to executive dysfunction and another more posterior one that might herald the evolution to dementia.<sup>187</sup> Activation studies indicate that fMRI might be helpful in the diagnosis of PD-MCI subtypes, which may also complement studies of genetic predictive markers in patients.

### Proton Magnetic Resonance Spectroscopy: Metabolite Spectra

Proton magnetic resonance spectroscopy allows certain metabolites to be quantified *in vivo*, reflecting the integrity of different elements in the brain, such as N-acetyl aspartate (NAA, neurons), choline compounds (Cho, cell membranes), and creatine (Cr, energy metabolism).<sup>189</sup> PDD patients have less NAA<sup>190</sup> and PD-MCI patients have a lower NAA/Cr ratio<sup>191</sup> than PDND patients in the occipital lobe, which correlates with poorer visuospatial and working memory function.<sup>190</sup> In addition, PDD<sup>191</sup> and PD-MCI<sup>189</sup> patients had lower respective NAA/Cr and Cho/Cr ratios in the cingulate cortex than controls. Moreover, levels of NAA were reduced in the dorsolateral prefrontal cortex of PD-MCI patients and in the hippocampus of PDD patients,<sup>192</sup> and they were positively correlated with frontal tasks and language function,<sup>192</sup> respectively. A correlation between the NAA/Cr ratio in the anterior cingulate cortex with short-term memory<sup>193</sup> and with executive function and perception<sup>194</sup> has also been observed. Finally, the inorganic phosphate/adenosine triphosphate ratio, a measure of oxidative metabolism, was negatively correlated with global cognition and language in PDND patients.<sup>195</sup> Longitudinal studies are needed to decipher whether the biochemical alterations described might predict conversion to dementia or identify subtypes of PD-MCI.

In summary, despite the number of studies undertaken with MRI, no reliable biomarker of dementia has been identified. From the information provided by the different MRI modalities in the few longitudinal studies available, the most consistent conclusion points to the fact that a lower hippocampal volume and dysfunction of the posterior-hippocampal network, witnessed either by fMRI or spectroscopy, might signal the eventual development of dementia. Nevertheless, their value at the individual level has to be further explored.

## PET and Single-Photon Emission Computed Tomography Imaging

### Dopaminergic Denervation

Several studies have identified dopaminergic deficits in the striatum, anterior cingulate, and midbrain in PDD patients and in the striatum and the insula of PD-MCI patients compared with PDCN patients.<sup>176,196-199</sup> However, in all types of patients (PDCN, PD-MCI, and PDD), these deficits are associ-

ated with poor executive function, especially those in the striatum,<sup>176,200-206</sup> and less consistently with verbal and visual memory<sup>126</sup> or global cognition.<sup>196</sup> In addition, several studies failed to find an association between dopamine depletion and cognitive impairment.<sup>207-209</sup> Therefore, the assessment of the dopaminergic system with these imaging techniques could serve as a biomarker of executive PD-MCI, an important entity with implications for functional performance. However, this does not seem to be sufficiently reliable to serve as a biomarker of dementia or MCI.

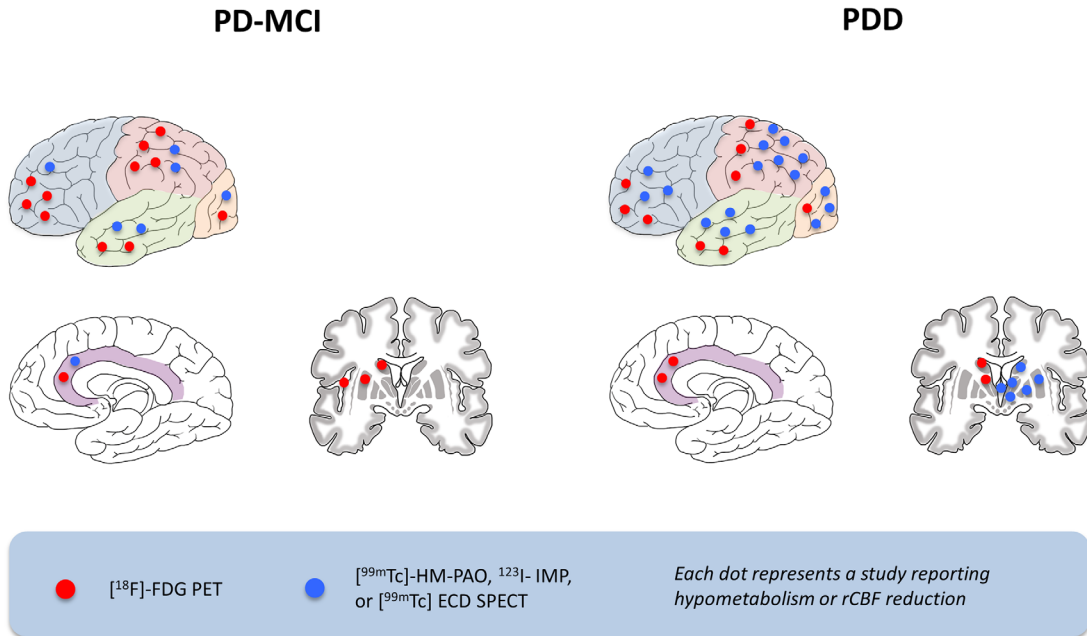
### Cholinergic Denervation

Pathological studies<sup>210</sup> and pharmacological trials with acetylcholinesterase inhibitors<sup>211</sup> indicate that the cholinergic dysfunction is relevant in dementia in PD. Studies using different radiotracers (Supplementary Table 2) show that the cholinergic activity in PDD patients was weaker in the whole cortex<sup>212-214</sup> and in the occipital,<sup>213</sup> precentral, parietal, temporal, and posterior cingulate cortex<sup>215</sup> than in PDND patients and healthy controls.<sup>216,217</sup> Compared with controls, cholinergic deficits were evident in the midbrain, pons, and cerebellum in 1 study of PD-MCI patients,<sup>218</sup> but not in another that included more patients.<sup>198</sup> In addition, lower cortical cholinergic activity has been associated with worse global cognition<sup>219,220</sup> and language<sup>221</sup> and with working memory impairment in PDD and PDND patients.<sup>217</sup>

PET studies indicate that assessing the cholinergic state might be useful as a biomarker of dementia in PD. Despite the evidence available, the current accessibility of the radiotracers precludes more extensive research and the clinical use of this technique.

### Imaging Amyloid

Fibrils of A $\beta$  can be assessed *in vivo* by [<sup>11</sup>C]-Pittsburgh compound B (PiB) PET imaging. From the few such studies undertaken in PD patients (Supplementary Table 2), 15% to 80% of PDD cases<sup>20,222-226</sup> and only 2 of 30 PD-MCI patients had elevated cortical PiB binding.<sup>224</sup> Although no differences were evident between PDD and controls<sup>227-229</sup> or between PD-MCI and PDCN patients in several studies,<sup>228,229</sup> higher PiB retention in PD-MCI patients predicted a greater risk of cognitive worsening.<sup>230</sup> In addition, a robust correlation between global cognition and PiB binding was observed in PDCN, PD-MCI, and PDD patients.<sup>224,231</sup> Therefore, although it can be argued that amyloid load might contribute to the development of cognitive impairment in PD,<sup>10,14,232</sup> the *in vivo* results of PiB-PET studies are rather variable,<sup>233</sup> with low sensitivity and specificity in the diagnosis of dementia and MCI in PD patients. Nonetheless, the paucity of studies and the heterogeneity in the cognitive deficits of PDD and PD-MCI patients could



**FIG. 2.** Summary of PET and single-photon emission computed tomography studies that have assessed cerebral metabolism or regional cerebral blood flow, respectively, as potential biomarkers of PD with dementia (PDD) and PD with mild cognitive impairment (PD-MCI). rCBF, regional cerebral blood flow; FDG, fluorodeoxyglucose; HM-PAO, hexamethylpropyleneamine oxime; IMP, N-isopropyl[123I]-p-iodoamphetamine; ECD, ethylcysteinate dimer.

explain these inconsistent findings. As mentioned for other biomarkers related to A $\beta$ , PiB-PET might represent a useful biomarker for specific types of PDD with concurrent AD but not for all types of PDD (eg, purer LB-type cases). Another factor to be considered is that PiB retention in PDD patients seems to be related to diffuse A $\beta$  plaques and not to mature plaques, which are not associated with AD but with pathological aging.<sup>226</sup>

### Imaging Brain Perfusion and Metabolism

Regional cerebral blood flow (rCBF) and glucose consumption (FDG [fluorodeoxyglucose] uptake-metabolism) can be measured by single-photon emission computed tomography and PET, respectively (Fig. 2). In several studies, PDD and PD-MCI patients exhibit areas of reduced rCBF<sup>234-249</sup> and metabolism (more extensive in PDD),<sup>212,250-258</sup> such as in the frontal, parietal, temporal, occipital and cingulate cortex, the basal ganglia, thalamus, and cerebellum. Interestingly, when compared with PD-MCI patients, hypometabolism is more widespread in PDD patients, especially in the posterior cortical areas,<sup>251</sup> and this heralds the progression to dementia in PD patients when considered in conjunction with the hypometabolism in the posterior cingulate and caudate nucleus.<sup>259,260</sup> Moreover, impairment in specific cognitive domains is correlated with patterns of rCBF and hypometabolism in several studies.<sup>235,251,261-267</sup> Furthermore, a recent study in a cohort of PDD patients with a multimodal PET approach show a correlation

between hypometabolism, amyloid load, and microglial activation ([<sup>11</sup>C]-(R)PK11195 PET) in the anterior and posterior cingulate, striatum and frontal, temporal, parietal, and occipital cortical regions.<sup>250</sup>

In summary, reduced rCBF and FDG uptake in the posterior cortical areas seems to be a useful biomarker of dementia in PD,<sup>251</sup> in line with functional and spectroscopic MRI data.<sup>187,190</sup> In addition, considering the heterogeneity of PD-MCI, a multitracer approach might be worth studying to decipher biomarkers of MCI that could eventually develop into dementia.

## Neurophysiology

### Electroencephalography (EEG) and Magnetoencephalography

PDD patients have slow EEG activity,<sup>268-271</sup> with an increase in power at the delta (1-4 Hz) and theta (4-8 Hz) frequencies.<sup>272-274</sup> In addition, PD-MCI patients have increased activity in the theta band in the frontal region<sup>275</sup> and reduced alpha activity (8-10 Hz) in the right temporal region<sup>276</sup> when compared with PDCN patients. Moreover, PDND patients with a low background rhythm frequency had a higher ratio of progression to dementia<sup>277</sup> or global cognitive decline,<sup>278</sup> and low background EEG frequencies have also been associated with poor outcomes in global cognition,<sup>279,280</sup> attention, executive function, verbal fluency, and long-term memory.<sup>281,282</sup>

Although expensive and with restricted accessibility, another way to measure cortical neuron activity is

magnetoencephalography, which provides a measure of rhythmic activity and of the synchronization of oscillatory activity over long distances with higher temporal resolution. In addition to a widespread increase in the relative power of the delta band and a decreased power of the alpha and beta bands,<sup>283</sup> PDD patients have reduced long distance intrahemispheric bilateral fronto-temporal and intertemporal synchronization.<sup>284</sup> As such, current evidence indicates a clear association between low frequency oscillatory activity and cognitive impairment. Thus, the use of novel analytical EEG approaches should be considered in the search for biomarkers of dementia in PD, particularly because they are cheap and easy to employ.

## Event-Related Potentials

Event-related potentials (ERPs) involve cortical responses associated with sensory, motor, or cognitive events<sup>285</sup> in which later components (after 100 ms) are thought to reflect cognitive processing. The most widely studied in PD is the P3 or P300 (elicited by visual or auditory stimuli), which appears to be delayed in PDD when compared with controls<sup>286-289</sup> or PDND patients.<sup>290,291</sup> Indeed, P300 correlates with many cognitive functions in PDND patients such as memory, visual perception, and executive functions.<sup>292-296</sup> A recently developed transcranial magnetic stimulation method that is coupled to simultaneous peripheral nerve stimulation at different intervals can produce short latency afferent inhibition (SAI), which is thought to provide a measure of cholinergic function. Several studies show that SAI is dampened in patients with PDD<sup>297</sup> and PD-MCI,<sup>298</sup> whereas there is no difference in SAI between PDCN patients and controls. Because of the relevance of the cholinergic system in the cognitive deficits in PD, this is a promising technique to be considered in the search for biomarkers of PD-MCI with higher risk of dementia.

## Conclusions and Future Directions

An important factor to consider when evaluating the potential biomarkers studied is the fact that dementia and MCI in PD are heterogeneous, both from clinical and pathological perspectives. In addition, different biomarkers may provide complementary information that could be combined to achieve better sensitivity and specificity in the detection of dementia and MCI with a high risk of progressing to dementia (Table 3). The data currently available indicate that genetic information could aid the detection of PD patients at a high risk of dementia at the time of diagnosis, yet this sheds no light on the probability and the time lag in this cognitive decline. By contrast, other biomarkers

aim to prematurely detect dementia during the evolution of the disease, and they could be especially useful to flag those PD-MCI patients at high risk of developing dementia in the short- to mid-term.

The data available allow us to conclude that genetic variants in *COMT* may account for differences in frontal dopaminergic function; they are typically associated with an executive subtype of PD-MCI with a low risk of dementia.<sup>92,97,111-115</sup> By contrast, the *APOE*  $\epsilon 4$  allele,<sup>92,94,95</sup> the H1 haplotype of the *MAPT* gene,<sup>97,98</sup> and mutations in the *GBA* gene<sup>109</sup> all seem to be risk factors of dementia. However, they might be associated with different PD-MCI subtypes and probability of progression to dementia with slightly different cerebral pathology. Indeed, even in PDCN patients these mutations are associated with deficient activation in restricted brain territories when confronted with specific cognitive tests.<sup>99,111,113,115</sup> Thus, *APOE*  $\epsilon 4$  might be associated with a more amnesic AD-like phenotype of PD-MCI, whereas *MAPT* and *GBA* might be involved in more visuospatial patterns.

Regarding the proteins related to pathological cerebral inclusions, currently only low A $\beta$  levels in the CSF and PiB PET studies detecting A $\beta$  fibrils in the brain could have some potential to detect early dementia among PD-MCI patients. This could reflect a subgroup of patients with concurrent AD or AD pathological changes in whom the *APOE*  $\epsilon 4$  allele might be also overrepresented. In this sense, these markers might not be useful for the purer LB cases of PDD, which could in turn be more related to *GBA* mutations.<sup>108-110</sup> Oligomers of  $\alpha$ -synuclein in the CSF are worth pursuing, both in sporadic PD but importantly also in patients with *GBA* mutations. In addition, the ratios of tau, A $\beta$ , and  $\alpha$ -synuclein could improve the predictive value of each protein independently or help to differentiate between different forms of PD-MCI. New PET radiotracers to reliably mark in vivo tau and  $\alpha$ -synuclein are needed to derive a complete picture of the clinical and pathological phenotypes of MCI subtypes and how they progress toward dementia.

In addition, independently of the genetic fingerprint and pathological cerebral inclusions, it may be worth pursuing the study of lipids and of proteins related to metabolic processes (inflammation, oxidative stress, etc.) in CSF or plasma/serum as well as neurotrophic factors putatively involved in neurodegeneration such as EGF, ILGF, UA, neurofilament light chain protein, and fatty acid binding-protein.<sup>47,59,63-65</sup> Besides their diagnostic value, these fluid biomarkers may be particularly relevant in revealing dysfunctional biological processes that might be targets for pharmacological modulation (eg, inflammation).

On the other hand, the cerebral cholinergic deficits detected by PET also seem to be a promising

**TABLE 3.** Summary of the potential biomarkers of PDD and PD-MCI in function of the pathological processes implicated

Biomarker	CSF		Plasma		Genes		PET/SPECT imaging	
	PDD	PD-MCI	PDD	PD-MCI	PDD	PD-MCI	PDD	PD-MCI
<b>Pathology-related</b>								
Amyloid-β <sup>c</sup>	↓/ =	↓/ =	-	-	↑ <i>APOE 4</i> <sup>a</sup>	-	↑ PiB uptake/ =	↑ PiB uptake/ =
Tau <sup>c</sup>	↑/ =	↑/ =	-	-	↑ H1 haplotype and H1/H1 genotype/ No association	-	-	-
P-tau	↑/ =	↑/ =	-	-	Duplication, triplication	-	-	-
α-synuclein	↑/ =	-	-	-				
<b>Neurotransmitter dysfunction</b>								
Dopamine	-	-	-	-	=	-	↓ subcortical DaT or fluorodopa uptake/ =	↓ subcortical DaT or fluorodopa uptake / =
					<i>COMT</i> (Val158Met) associated with ↓ executive function in PDND			
Acetylcholine	-	-	-	-	-	-	↓ cortical AChE activity/ =	-
<b>Inflammation/inmune response</b>								
CRP	↑	-	=	-	-	-	↑ microglial activation in the cingulate, striatum, frontal, temporal, parietal, and occipital cortices	-
IL-1β	-	↑	-	-	-	-		
IL-6 <sup>c</sup>	=	↑	-	-	-	-		
IL-17A	-	-	-	-	Genotype C/C of the rs8193036 polymorphism; MMSE < 26	-		
IL-10	-	-	-	-	Polymorphism RS1800896; no association	-		
TNF-α <sup>c</sup>	=	↓	-	-	-	-		
INF-γ	-	↓	-	-	Polymorphism T874A; no association	-		
PGE <sub>2</sub>	-	=	-	-	-	-		
IP10	=	-	-	-	-	-		
MIP1β	=	-	-	-	-	-		
MCP1	=	-	-	-	-	-		
<b>Oxidative stress</b>								
Uric acid <sup>b,c</sup>	↓	-	=	-	-	-	-	-
<b>Neurotrophic/neuroprotection</b>								
EGF <sup>c</sup>	-	-	↓	-	-	-	-	-
BDNF	=	-	-	-	Polymorphism Val196Met; no association	-	-	-
Vitamin D	-	-	=	-	-	-	-	-
<b>Other</b>								
Homocysteine <sup>c</sup>	↑/ =	=	↑/ =	=	Variants in <i>MTHFR</i> , <i>COMT</i> and other genes related to homocysteine metabolism; no association	-	-	-

Abbreviations “ = ”, no differences; SPECT, single-photon emission computed tomography. Biomarkers: CRP, C reactive protein; IL-1β, interleukin-1β; IL-6, interleukin-6; L-17A, interleukin 17A; IL-10, interleukin 10; TNF-α, tumor necrosis factor alpha; INF-γ, interferon gamma; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; IP10, interferon gamma-induced protein-10; MIP1β, macrophage inflammatory protein-1; MCP1, monocyte chemoattractant protein-1; EGF, epidermal growth factor; BDNF, brain derived neurotrophic factor; PiB, Pittsburgh compound B; DaT, dopamine transporter; AChE, acetylcholine. Subjects: PDND, Parkinson's disease nondemented; PDD, Parkinson's disease with dementia; PD-MCI, Parkinson's disease with mild cognitive impairment.

<sup>a</sup>APOE encodes for apolipoprotein E, and it is associated with the cerebral Amyloid-β load.  
<sup>b</sup>Low urine uric acid levels associated with worse performance in several cognitive outcomes.  
<sup>c</sup>Association with cognition in PDND, PD-MCI, or PDD.

biomarker of dementia,<sup>212-215,219,220</sup> but as a result of practical issues, alternative cheap and easy ways to evaluate cholinergic function should be considered, such as new neurophysiological studies (transcranial magnetic stimulation combined with ERP).<sup>297,298</sup>

Pathological inclusions and neurotransmission deficits provoke neuronal dysfunction and death, which can be assessed by structural and functional imaging. Despite the fact that atrophy in structures such as the hippocampus<sup>21,163,164</sup> and reduced activity/metabolism

in posterior cerebral areas<sup>187,251</sup> are associated with progression to dementia, no MRI modalities or FDG-PET are sufficiently reliable as to accurately predict progression to dementia at the single-patient level, as seen in CSF and peripheral fluid studies. Similar to what has been discussed for other biomarkers, it could be that these findings are associated with subtypes of MCI (ie, hippocampal atrophy with AD/amnesic type and posterior dysfunction with visuospatial/LB type). The coupling of different PET studies, multimodal MRI, and classic and modern neurophysiological approaches (EEG and ERP) to more sophisticated analytical methods (ie, neuronal networks, classifiers, etc.) represents a promising approach that might give rise to new tools to identify and stratify patients with distinct types of cognitive impairment and risk of dementia.

Multidisciplinary prospective studies in large cohorts of properly classified PD-MCI patients that assess the most promising biomarkers encountered in PDD patients are now necessary to diagnose PD-MCI patients that are at high risk of progressing to dementia. In addition, studies in early PD patients could also allow subtypes of PD with precocious development of dementia to be identified. ■

## References

- Hely MA, Reid WG, Adena MA, Halliday GM, Morris JG. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *Mov Disord* 2008;23(6):837-844.
- Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Lolk A, Kragh-Sorensen P. Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study. *Arch Neurol* 2003;60(3):387-392.
- Litvan I, Aarsland D, Adler CH, et al. MDS Task Force on mild cognitive impairment in Parkinson's disease: critical review of PD-MCI. *Mov Disord* 2011;26(10):1814-1824.
- Janvin CC, Larsen JP, Aarsland D, Hugdahl K. Subtypes of mild cognitive impairment in Parkinson's disease: progression to dementia. *Mov Disord* 2006;21(9):1343-1349.
- Gasca-Salas C, Estanga A, Clavero P, et al. Longitudinal assessment of the pattern of cognitive decline in non-demented patients with advanced Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* 2014;4(4):677-686.
- Pedersen KF, Larsen JP, Tysnes OB, Alves G. Prognosis of mild cognitive impairment in early Parkinson disease: the Norwegian ParkWest study. *JAMA Neurol* 2013;70(5):580-586.
- Broeders M, de Bie RM, Velseboer DC, Speelman JD, Muslimovic D, Schmand B. Evolution of mild cognitive impairment in Parkinson disease. *Neurology* 2013;81(4):346-352.
- Litvan I, Goldman JG, Troster AI, et al. Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines. *Mov Disord* 2012;27(3):349-356.
- Aarsland D, Perry R, Brown A, Larsen JP, Ballard C. Neuropathology of dementia in Parkinson's disease: a prospective, community-based study. *Ann Neurol* 2005;58(5):773-776.
- Sabbagh MN, Adler CH, Lahti TJ, et al. Parkinson disease with dementia: comparing patients with and without Alzheimer pathology. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2009;23(3):295-297.
- Braak H, Rub U, Jansen Steur EN, Del Tredici K, de Vos RA. Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease. *Neurology* 2005;64(8):1404-1410.
- Compta Y, Parkkinen L, O'Sullivan SS, et al. Lewy- and Alzheimer-type pathologies in Parkinson's disease dementia: which is more important? *Brain* 2011;134(Pt 5):1493-1505.
- Halliday GM, Leverenz JB, Schneider JS, Adler CH. The neurobiological basis of cognitive impairment in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2014;29(5):634-650.
- Adler CH, Caviness JN, Sabbagh MN, et al. Heterogeneous neuropathological findings in Parkinson's disease with mild cognitive impairment. *Acta Neuropathol* 2010;120(6):827-828.
- Jellinger K. Heterogenous mechanisms of mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2012;119(3):381-382.
- Mollenhauer B, Trenkwalder C, von Ahnen N, et al. Beta-amyloid 1-42 and tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006;22(3):200-208.
- Montine TJ, Shi M, Quinn JF, et al. CSF Abeta(42) and tau in Parkinson's disease with cognitive impairment. *Mov Disord* 2010;25(15):2682-2685.
- Compta Y, Valente T, Saura J, et al. Correlates of cerebrospinal fluid levels of oligomeric- and total-alpha-synuclein in premotor, motor and dementia stages of Parkinson's disease. *J Neurol* 2015;262(2):294-306.
- Compta Y, Ezquerro M, Munoz E, et al. High cerebrospinal tau levels are associated with the rs242557 tau gene variant and low cerebrospinal beta-amyloid in Parkinson disease. *Neurosci Lett* 2011;487(2):169-173.
- Maetzler W, Liepelt I, Reimold M, et al. Cortical PIB binding in Lewy body disease is associated with Alzheimer-like characteristics. *Neurobiol Dis* 2009;34(1):107-112.
- Compta Y, Pereira JB, Rios J, et al. Combined dementia-risk biomarkers in Parkinson's disease: a prospective longitudinal study. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;19(8):717-724.
- Siderowf A, Xie SX, Hurtig H, et al. CSF amyloid {beta} 1-42 predicts cognitive decline in Parkinson disease. *Neurology* 2010;75(12):1055-1061.
- Liu C, Cholerton B, Shi M, et al. CSF tau and tau/Abeta42 predict cognitive decline in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2015;21(3):271-276.
- Parnetti L, Farotti L, Eusebi P, et al. Differential role of CSF alpha-synuclein species, tau, and Abeta42 in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 2014;6:53.
- Compta Y, Marti MJ, Ibarretxe-Bilbao N, et al. Cerebrospinal tau, phospho-tau, and beta-amyloid and neuropsychological functions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2009;24(15):2203-2210.
- Hall S, Ohrfelt A, Constantinescu R, et al. Accuracy of a panel of 5 cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of patients with dementia and/or parkinsonian disorders. *Arch Neurol* 2012;69(11):1445-1452.
- Jansen Steur E, Vermes I, de Vos RA. Cerebrospinal-fluid tau protein and aspartate aminotransferase in Parkinson's disease. *Lancet* 1998;351(9109):1105-1106.
- Parnetti L, Tiraboschi P, Lanari A, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies. *Biol Psychiatry* 2008;64(10):850-855.
- Vranová HP, Henykova E, Kaiserova M, et al. Tau protein, beta-amyloid(1-42) and clusterin CSF levels in the differential diagnosis of Parkinsonian syndrome with dementia. *J Neurol Sci* 2014;343(1-2):120-124.
- Maetzler W, Tian Y, Baur SM, et al. Serum and cerebrospinal fluid levels of transthyretin in Lewy body disorders with and without dementia. *PLoS One* 2012;7(10):e48042.
- Beyer MK, Alves G, Hwang KS, et al. Cerebrospinal fluid Abeta levels correlate with structural brain changes in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013;28(3):302-310.
- Yu SY, Zuo LJ, Wang F, et al. Potential biomarkers relating pathological proteins, neuroinflammatory factors and free radicals in PD patients with cognitive impairment: a cross-sectional study. *BMC Neurol* 2014;14(1):113.
- Alves G, Bronnick K, Aarsland D, et al. CSF amyloid-beta and tau proteins, and cognitive performance, in early and untreated Parkinson's disease: the Norwegian ParkWest study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81(10):1080-1086.
- Leverenz JB, Watson GS, Shofar J, Zabetian CP, Zhang J, Montine TJ. Cerebrospinal fluid biomarkers and cognitive performance in non-demented patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2011;17(1):61-64.



35. Stav AL, Aarsland D, Johansen KK, Hessen E, Auning E, Fladby T. Amyloid-beta and alpha-synuclein cerebrospinal fluid biomarkers and cognition in early Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2015;21(7):758-764.
36. Wennström M, Surova Y, Hall S, et al. Low CSF levels of both alpha-synuclein and the alpha-synuclein cleaving enzyme neurosin in patients with synucleinopathy. *PLoS ONE* 2013;8(1):e53250.
37. Hansson O, Hall S, Ohrfelt A, et al. Levels of cerebrospinal fluid alpha-synuclein oligomers are increased in Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies compared to Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2014;6(3):25.
38. Stewart T, Liu C, Ghingina C, et al. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein predicts cognitive decline in Parkinson disease progression in the DATATOP cohort. *Am J Pathol* 2014;184(4):966-975.
39. Buddhala C, Campbell MC, Perlmuter JS, Kotzbauer PT. Correlation between decreased CSF alpha-synuclein and Aβeta(1)-(4)(2) in Parkinson disease. *Neurobiol Aging* 2015;36(1):476-484.
40. Lindqvist D, Hall S, Surova Y, et al. Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease—associations with depression, fatigue, and cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 2013;33:183-189.
41. Maetzler W, Stapf AK, Schulte C, et al. Serum and cerebrospinal fluid uric acid levels in lewy body disorders: associations with disease occurrence and amyloid-beta pathway. *J Alzheimers Dis* 2011;27(1):119-126.
42. Maetzler W, Schmid B, Synofzik M, et al. The CST3 BB genotype and low cystatin C cerebrospinal fluid levels are associated with dementia in Lewy body disease. *J Alzheimers Dis* 2010;19(3):937-942.
43. Kuiper MA, Mulder C, van Kamp GJ, Scheltens P, Wolters EC. Cerebrospinal fluid ferritin levels of patients with Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and multiple system atrophy. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1994;7(2):109-114.
44. Compta Y, Santamaria J, Ratti L, et al. Cerebrospinal hypocretin, daytime sleepiness and sleep architecture in Parkinson's disease dementia. *Brain* 2009;132(Pt 12):3308-3317.
45. Jesse S, Lehnert S, Jahn O, et al. Differential sialylation of serpin A1 in the early diagnosis of Parkinson's disease dementia. *PLoS ONE* 2012;7(11):e48783.
46. Lehnert S, Jesse S, Rist W, et al. iTRAQ and multiple reaction monitoring as proteomic tools for biomarker search in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease dementia. *Exp Neurol* 2012;234(2):499-505.
47. Backstrom DC, Eriksson Domellof M, Linder J, et al. Cerebrospinal fluid patterns and the risk of future dementia in early, incident Parkinson Disease. *JAMA Neurol* 2015;72(10):1175-1182.
48. Bialecka M, Kurzawski M, Roszmann A, et al. Association of COMT, MTHFR, and SLC19A1(RFC-1) polymorphisms with homocysteine blood levels and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Pharmacogenet Genomics* 2012;22(10):716-724.
49. Song IU, Kim JS, Park IS, et al. Clinical significance of homocysteine (hcy) on dementia in Parkinson's disease (PD). *Arch Geriatr Geriatr* 2013;57(3):288-291.
50. O'Suilleabhain PE, Sung V, Hernandez C, et al. Elevated plasma homocysteine level in patients with Parkinson disease: motor, affective, and cognitive associations. *Arch Neurol* 2004;61(6):865-868.
51. Rodriguez-Oroz MC, Lage PM, Sanchez-Mut J, et al. Homocysteine and cognitive impairment in Parkinson's disease: a biochemical, neuroimaging, and genetic study. *Mov Disord* 2009;24(10):1437-1444.
52. Hassin-Baer S, Cohen O, Vakil E, et al. Plasma homocysteine levels and Parkinson disease: disease progression, carotid intima-media thickness and neuropsychiatric complications. *Clin Neuropharmacol* 2006;29(6):305-311.
53. Camicioli RM, Bouchard TP, Somerville MJ. Homocysteine is not associated with global motor or cognitive measures in nondemented older Parkinson's disease patients. *Mov Disord* 2009;24(2):176-182.
54. Peterson AL, Murchison C, Zabetian C, et al. Memory, mood, and vitamin d in persons with Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2013;3(4):547-555.
55. Gonzalez-Aramburu I, Sanchez-Juan P, Sierra M, et al. Serum uric acid and risk of dementia in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(6):637-639.
56. Song IU, Kim YD, Cho HJ, Chung SW. Is neuroinflammation involved in the development of dementia in patients with Parkinson's disease? *Intern Med* 2013;52(16):1787-1792.
57. Annanmaki T, Pessala-Driver A, Hokkanen L, Murros K. Uric acid associates with cognition in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14(7):576-578.
58. Moccia M, Picillo M, Erro R, et al. Is serum uric acid related to non-motor symptoms in de-novo Parkinson's disease patients? *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(7):772-775.
59. Moccia M, Picillo M, Erro R, et al. Presence and progression of non-motor symptoms in relation to uric acid in de novo Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2014.
60. Menza M, Dobkin RD, Marin H, et al. The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Psychosomatics* 2010;51(6):474-479.
61. Scalzo P, Kummer A, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of interleukin-6 are elevated in patients with Parkinson's disease and correlate with physical performance. *Neurosci Lett* 2010;468(1):56-58.
62. Rocha NP, Scalzo PL, Barbosa IG, et al. Cognitive status correlates with CXCL10/IP-10 levels in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 2014;2014:903796.
63. Pellicchia MT, Santangelo G, Picillo M, et al. Serum epidermal growth factor predicts cognitive functions in early, drug-naive Parkinson's disease patients. *J Neurol* 2013;260(2):438-444.
64. Chen-Plotkin AS, Hu WT, Siderowf A, et al. Plasma epidermal growth factor levels predict cognitive decline in Parkinson disease. *Ann Neurol* 2011;69(4):655-663.
65. Pellicchia MT, Santangelo G, Picillo M, et al. Insulin-like growth factor-1 predicts cognitive functions at 2-year follow-up in early, drug-naive Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2014;21(5):802-807.
66. Ma J, Jiang Q, Xu J, et al. Plasma insulin-like growth factor 1 is associated with cognitive impairment in Parkinson's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2015;93(5-6):251-256.
67. Angelucci F, Peppe A, Carlesimo GA, et al. A pilot study on the effect of cognitive training on BDNF serum levels in individuals with Parkinson's disease. *Front Hum Neurosci* 2015;9:130.
68. Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Mov Disord* 1994;9(1):92-97.
69. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;53(suppl 3):S26-S36; discussion S36-28.
70. Li Z, Zhang J, Sun H. Increased plasma levels of phospholipid in Parkinson's disease with mild cognitive impairment. *J Clin Neurosci* 2015;22(8):1268-1271.
71. Pratico D. F(2)-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis* 1999;147(1):1-10.
72. Connolly J, Siderowf A, Clark CM, Mu D, Pratico D. F2 isoprostane levels in plasma and urine do not support increased lipid peroxidation in cognitively impaired Parkinson disease patients. *Cogn Behav Neurol* 2008;21(2):83-86.
73. Mielke MM, Maetzler W, Haughey NJ, et al. Plasma ceramide and glucosylceramide metabolism is altered in sporadic Parkinson's disease and associated with cognitive impairment: a pilot study. *PLoS ONE* 2013;8(9):e73094.
74. Witt SN. Lipid disequilibrium in biological membranes, a possible pathway to neurodegeneration. *Commun Integr Biol* 2014;7(6):e993266.
75. Norris SE, Friedrich MG, Mitchell TW, Truscott RJ, Else PL. Human prefrontal cortex phospholipids containing docosahexaenoic acid increase during normal adult aging, whereas those containing arachidonic acid decrease. *Neurobiol Aging* 2015;36(4):1659-1669.
76. von Bernhardi R, Eugenin-von Bernhardi L, Eugenin J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* 2015;7:124.
77. Drzezga A, Grimmer T, Henriksen G, et al. Effect of APOE genotype on amyloid plaque load and gray matter volume in Alzheimer disease. *Neurology* 2009;72(17):1487-1494.
78. Blazquez L, Otaegui D, Saenz A, et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele in familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2006;406(3):235-239.



79. Feldman B, Chapman J, Korczyn AD. Apolipoprotein epsilon4 advances appearance of psychosis in patients with Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 2006;113(1):14-17.
80. Pankratz N, Byder L, Halter C, et al. Presence of an APOE4 allele results in significantly earlier onset of Parkinson's disease and a higher risk with dementia. *Mov Disord* 2006;21(1):45-49.
81. Papapetropoulos S, Farrer MJ, Stone JT, et al. Phenotypic associations of tau and ApoE in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2007;414(2):141-144.
82. Monsell SE, Besser LM, Heller KB, Checkoway H, Litvan I, Kukull WA. Clinical and pathologic presentation in Parkinson's disease by apolipoprotein e4 allele status. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(5):503-507.
83. Mata IF, Leverenz JB, Weintraub D, et al. APOE, MAPT, and SNCA genes and cognitive performance in Parkinson disease. *JAMA Neurol* 2014;71(11):1405-1412.
84. Koller WC, Glatt SL, Hubble JP, et al. Apolipoprotein E genotypes in Parkinson's disease with and without dementia. *Ann Neurol* 1995;37(2):242-245.
85. Parsian A, Racette B, Goldsmith LJ, Perlmutter JS. Parkinson's disease and apolipoprotein E: possible association with dementia but not age at onset. *Genomics* 2002;79(3):458-461.
86. Camicioli R, Rajput A, Rajput M, et al. Apolipoprotein E epsilon4 and catechol-O-methyltransferase alleles in autopsy-proven Parkinson's disease: relationship to dementia and hallucinations. *Mov Disord* 2005;20(8):989-994.
87. Jasinska-Myga B, Opala G, Goetz CG, et al. Apolipoprotein E gene polymorphism, total plasma cholesterol level, and Parkinson disease dementia. *Arch Neurol* 2007;64(2):261-265.
88. Ezquerra M, Campdelacreu J, Gaig C, et al. Lack of association of APOE and tau polymorphisms with dementia in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2008;448(1):20-23.
89. Kurz MW, Dekomien G, Nilsen OB, Larsen JP, Aarsland D, Alves G. APOE alleles in Parkinson disease and their relationship to cognitive decline: a population-based, longitudinal study. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2009;22(3):166-170.
90. Troster AI, Fields JA, Paolo AM, Koller WC. Absence of the apolipoprotein E epsilon4 allele is associated with working memory impairment in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2006;248(1-2):62-67.
91. Williams-Gray CH, Goris A, Saiki M, et al. Apolipoprotein E genotype as a risk factor for susceptibility to and dementia in Parkinson's disease. *J Neurol* 2009;256(3):493-498.
92. Morley JF, Xie SX, Hurtig HI, et al. Genetic influences on cognitive decline in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012;27(4):512-518.
93. Lane R, He Y, Morris C, Leverenz JB, Emre M, Ballard C. BuChE-K and APOE epsilon4 allele frequencies in Lewy body dementias, and influence of genotype and hyperhomocysteinemia on cognitive decline. *Mov Disord* 2009;24(3):392-400.
94. de Lau LM, Schipper CM, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Prognosis of Parkinson disease: risk of dementia and mortality: the Rotterdam Study. *Arch Neurol* 2005;62(8):1265-1269.
95. Harhangi BS, de Rijk MC, van Duijn CM, Van Broeckhoven C, Hofman A, Breteler MM. APOE and the risk of PD with or without dementia in a population-based study. *Neurology* 2000;54(6):1272-1276.
96. Setó-Salvia N, Clarimon J, Pagonabarraga J, et al. Dementia risk in Parkinson disease: disentangling the role of MAPT haplotypes. *Arch Neurol* 2011;68(3):359-364.
97. Williams-Gray CH, Evans JR, Goris A, et al. The distinct cognitive syndromes of Parkinson's disease: 5 year follow-up of the CamPaIGN cohort. *Brain* 2009;132(Pt 11):2958-2969.
98. Goris A, Williams-Gray CH, Clark GR, et al. Tau and alpha-synuclein in susceptibility to, and dementia in, Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2007;62(2):145-153.
99. Winder-Rhodes SE, Hampshire A, Rowe JB, et al. Association between MAPT haplotype and memory function in patients with Parkinson's disease and healthy aging individuals. *Neurobiol Aging* 2015;36(3):1519-1528.
100. Nishioka K, Ross OA, Ishii K, et al. Expanding the clinical phenotype of SNCA duplication carriers. *Mov Disord* 2009;24(12):1811-1819.
101. Farrer M, Kachergus J, Forno L, et al. Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol* 2004;55(2):174-179.
102. Somme JH, Gomez-Esteban JC, Molano A, Tijero B, Lezcano E, Zarranz JJ. Initial neuropsychological impairments in patients with the E46K mutation of the alpha-synuclein gene (PARK 1). *J Neurol Sci* 2011;310(1-2):86-89.
103. Tokutake T, Ishikawa A, Yoshimura N, et al. Clinical and neuroimaging features of patient with early-onset Parkinson's disease with dementia carrying SNCA p.G51D mutation. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(2):262-264.
104. De Marco EV, Tarantino P, Rocca FE, et al. Alpha-synuclein promoter haplotypes and dementia in Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008;147(3):403-407.
105. Seto-Salvia N, Pagonabarraga J, Houlden H, et al. Glucocerebrosidase mutations confer a greater risk of dementia during Parkinson's disease course. *Mov Disord* 2012;27(3):393-399.
106. Alcalay RN, Caccappolo E, Mejia-Santana H, et al. Cognitive performance of GBA mutation carriers with early-onset PD: the CORE-PD study. *Neurology* 2012;78(18):1434-1440.
107. Alcalay RN, Mejia-Santana H, Tang MX, et al. Self-report of cognitive impairment and mini-mental state examination performance in PRKN, LRRK2, and GBA carriers with early onset Parkinson's disease. *J Clin Exp Neuropsychol* 2010;32(7):775-779.
108. Brockmann K, Sruļijes K, Pfloderer S, et al. GBA-associated Parkinson's disease: reduced survival and more rapid progression in a prospective longitudinal study. *Mov Disord* 2015;30(3):407-411.
109. Winder-Rhodes SE, Evans JR, Ban M, et al. Glucocerebrosidase mutations influence the natural history of Parkinson's disease in a community-based incident cohort. *Brain* 2013;136(Pt 2):392-399.
110. Beavan MS, Schapira AH. Glucocerebrosidase mutations and the pathogenesis of Parkinson disease. *Ann Med* 2013;45(8):511-521.
111. Williams-Gray CH, Hampshire A, Robbins TW, Owen AM, Barker RA. Catechol O-methyltransferase Val158Met genotype influences frontoparietal activity during planning in patients with Parkinson's disease. *J Neurosci* 2007;27(18):4832-4838.
112. Foltynie T, Goldberg TE, Lewis SG, et al. Planning ability in Parkinson's disease is influenced by the COMT val158met polymorphism. *Mov Disord* 2004;19(8):885-891.
113. Williams-Gray CH, Hampshire A, Barker RA, Owen AM. Attentional control in Parkinson's disease is dependent on COMT val158 met genotype. *Brain* 2008;131(Pt 2):397-408.
114. Hoogland J, de Bie RM, Williams-Gray CH, Muslimovic D, Schmand B, Post B. Catechol-O-methyltransferase val158met and cognitive function in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2010;25(15):2550-2554.
115. Nombela C, Rowe JB, Winder-Rhodes SE, et al. Genetic impact on cognition and brain function in newly diagnosed Parkinson's disease: ICICLE-PD study. *Brain* 2014;137(Pt 10):2743-2758.
116. Hudson G, Stutt A, Eccles M, et al. Genetic variation of CHRNA4 does not modulate attention in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2010;479(2):123-125.
117. Nie K, Zhang Y, Gan R, et al. Polymorphisms in immune/inflammatory cytokine genes are related to Parkinson's disease with cognitive impairment in the Han Chinese population. *Neurosci Lett* 2013;541:111-115.
118. Bialecka M, Kurzawski M, Roszmann A, et al. BDNF G196A (Val66Met) polymorphism associated with cognitive impairment in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2014;561:86-90.
119. Guerini FR, Beghi E, Riboldazzi G, et al. BDNF Val66Met polymorphism is associated with cognitive impairment in Italian patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2009;16(11):1240-1245.
120. Burton EJ, McKeith IG, Burn DJ, Williams ED, O'Brien JT. Cerebral atrophy in Parkinson's disease with and without dementia: a comparison with Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and controls. *Brain* 2004;127(Pt 4):791-800.
121. Pagonabarraga J, Corcuera-Solano I, Vives-Gilbert Y, et al. Pattern of regional cortical thinning associated with cognitive deterioration in Parkinson's disease. *PLoS ONE* 2013;8(1):e54980.
122. Tam CW, Burton EJ, McKeith IG, Burn DJ, O'Brien JT. Temporal lobe atrophy on MRI in Parkinson disease with dementia: a

- comparison with Alzheimer disease and dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2005;64(5):861-865.
123. Choi SH, Jung TM, Lee JE, Lee SK, Sohn YH, Lee PH. Volumetric analysis of the substantia innominata in patients with Parkinson's disease according to cognitive status. *Neurobiol Aging* 2012;33(7):1265-1272.
  124. Borroni B, Premi E, Formenti A, et al. Structural and functional imaging study in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. *Parkinsonism Relat Disord* 2015;21(9):1049-1055.
  125. Biundo R, Calabrese M, Weis L, et al. Anatomical correlates of cognitive functions in early Parkinson's disease patients. *PLoS ONE* 2013;8(5):e64222.
  126. Jokinen P, Bruck A, Aalto S, Forsback S, Parkkola R, Rinne JO. Impaired cognitive performance in Parkinson's disease is related to caudate dopaminergic hypofunction and hippocampal atrophy. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15(2):88-93.
  127. Mak E, Zhou J, Tan LC, Au WL, Sitoh YY, Kandiah N. Cognitive deficits in mild Parkinson's disease are associated with distinct areas of grey matter atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;85(5):576-580.
  128. Noh SW, Han YH, Mun CW, et al. Analysis among cognitive profiles and gray matter volume in newly diagnosed Parkinson's disease with mild cognitive impairment. *J Neurol Sci* 2014;347(1-2):210-213.
  129. Apostolova LG, Beyer M, Green AE, et al. Hippocampal, caudate, and ventricular changes in Parkinson's disease with and without dementia. *Mov Disord* 2010;25(6):687-695.
  130. Compta Y, Ibarretxe-Bilbao N, Pereira JB, et al. Grey matter volume correlates of cerebrospinal markers of Alzheimer-pathology in Parkinson's disease and related dementia. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18(8):941-947.
  131. Kenny ER, Burton EJ, O'Brien JT. A volumetric magnetic resonance imaging study of entorhinal cortex volume in dementia with lewy bodies. A comparison with Alzheimer's disease and Parkinson's disease with and without dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2008;26(3):218-225.
  132. Junque C, Ramirez-Ruiz B, Tolosa E, et al. Amygdalar and hippocampal MRI volumetric reductions in Parkinson's disease with dementia. *Mov Disord* 2005;20(5):540-544.
  133. Camicioli R, Moore MM, Kinney A, Corbridge E, Glassberg K, Kaye JA. Parkinson's disease is associated with hippocampal atrophy. *Mov Disord* 2003;18(7):784-790.
  134. Nagano-Saito A, Washimi Y, Arahata Y, et al. Cerebral atrophy and its relation to cognitive impairment in Parkinson disease. *Neurology* 2005;64(2):224-229.
  135. Summerfield C, Junque C, Tolosa E, et al. Structural brain changes in Parkinson disease with dementia: a voxel-based morphometry study. *Arch Neurol* 2005;62(2):281-285.
  136. Beyer MK, Janvin CC, Larsen JP, Aarsland D. A magnetic resonance imaging study of patients with Parkinson's disease with mild cognitive impairment and dementia using voxel-based morphometry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78(3):254-259.
  137. Song SK, Lee JE, Park HJ, Sohn YH, Lee JD, Lee PH. The pattern of cortical atrophy in patients with Parkinson's disease according to cognitive status. *Mov Disord* 2011;26(2):289-296.
  138. Melzer TR, Watts R, MacAskill MR, et al. Grey matter atrophy in cognitively impaired Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83(2):188-194.
  139. Goldman JG, Stebbins GT, Bernard B, Stoub TR, Goetz CG, deToledo-Morrell L. Entorhinal cortex atrophy differentiates Parkinson's disease patients with and without dementia. *Mov Disord* 2012;27(6):727-734.
  140. Ibarretxe-Bilbao N, Ramirez-Ruiz B, Tolosa E, et al. Hippocampal head atrophy predominance in Parkinson's disease with hallucinations and with dementia. *J Neurol* 2008;255(9):1324-1331.
  141. Nishio Y, Hirayama K, Takeda A, et al. Corticolimbic gray matter loss in Parkinson's disease without dementia. *Eur J Neurol* 2010;17(8):1090-1097.
  142. Weintraub D, Doshi J, Koka D, et al. Neurodegeneration across stages of cognitive decline in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2011;68(12):1562-1568.
  143. Hwang KS, Beyer MK, Green AE, et al. Mapping cortical atrophy in Parkinson's disease patients with dementia. *J Parkinsons Dis* 2013;3(1):69-76.
  144. Lee SH, Kim SS, Tae WS, Lee SY, Lee KU, Jhoo J. Brain volumetry in Parkinson's disease with and without dementia: where are the differences? *Acta Radiol* 2013;54(5):581-586.
  145. Zarei M, Ibarretxe-Bilbao N, Compta Y, et al. Cortical thinning is associated with disease stages and dementia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84(8):875-881.
  146. Pereira JB, Svenningsson P, Weintraub D, et al. Initial cognitive decline is associated with cortical thinning in early Parkinson disease. *Neurology* 2014;82(22):2017-2025.
  147. Kim HJ, Lee JE, Shin SJ, Sohn YH, Lee PH. Analysis of the substantia innominata volume in patients with Parkinson's disease with dementia, dementia with lewy bodies, and Alzheimer's disease. *J Mov Disord* 2011;4(2):68-72.
  148. Hanganu A, Bedetti C, Jubault T, et al. Mild cognitive impairment in patients with Parkinson's disease is associated with increased cortical degeneration. *Mov Disord* 2013;28(10):1360-1369.
  149. Danti S, Toschi N, Diciotti S, et al. Cortical thickness in de novo patients with Parkinson disease and mild cognitive impairment with consideration of clinical phenotype and motor laterality. *Eur J Neurol* 2015;22(12):1564-1572.
  150. Segura B, Baggio HC, Marti MJ, et al. Cortical thinning associated with mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2014;29(12):1495-1503.
  151. Lee JE, Park B, Song SK, Sohn YH, Park HJ, Lee PH. A comparison of gray and white matter density in patients with Parkinson's disease dementia and dementia with Lewy bodies using voxel-based morphometry. *Mov Disord* 2010;25(1):28-34.
  152. Mak E, Su L, Williams GB, et al. Baseline and longitudinal grey matter changes in newly diagnosed Parkinson's disease: ICICLE-PD study. *Brain* 2015;138(Pt 10):2974-2986.
  153. Hattori T, Orimo S, Aoki S, et al. Cognitive status correlates with white matter alteration in Parkinson's disease. *Hum Brain Mapp* 2012;33(3):727-739.
  154. Laakso MP, Partanen K, Riekkinen P, et al. Hippocampal volumes in Alzheimer's disease, Parkinson's disease with and without dementia, and in vascular dementia: An MRI study. *Neurology* 1996;46(3):678-681.
  155. Bruck A, Kurki T, Kaasinen V, Vahlberg T, Rinne JO. Hippocampal and prefrontal atrophy in patients with early non-demented Parkinson's disease is related to cognitive impairment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75(10):1467-1469.
  156. Oikawa H, Sasaki M, Ehara S, Abe T. Substantia innominata: MR findings in Parkinson's disease. *Neuroradiology* 2004;46(10):817-821.
  157. Filoteo JV, Reed JD, Litvan I, Harrington DL. Volumetric correlates of cognitive functioning in nondemented patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2014;29(3):360-367.
  158. Camicioli R, Gee M, Bouchard TP, et al. Voxel-based morphometry reveals extra-nigral atrophy patterns associated with dopamine refractory cognitive and motor impairment in parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15(3):187-195.
  159. Ibarretxe-Bilbao N, Junque C, Tolosa E, et al. Neuroanatomical correlates of impaired decision-making and facial emotion recognition in early Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2009;30(6):1162-1171.
  160. Duncan GW, Firbank MJ, Yarnall AJ, et al. Gray and white matter imaging: A biomarker for cognitive impairment in early Parkinson's disease? *Mov Disord* 2016;31(1):103-110.
  161. Koshimori Y, Segura B, Christopher L, et al. Imaging changes associated with cognitive abnormalities in Parkinson's disease. *Brain Struct Funct* 2015;220(4):2249-2261.
  162. Garcia-Diaz AI, Segura B, Baggio HC, et al. Structural MRI correlates of the MMSE and pentagon copying test in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(12):1405-1410.
  163. Lee JE, Cho KH, Song SK, et al. Exploratory analysis of neuropsychological and neuroanatomical correlates of progressive mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;85(1):7-16.
  164. Kandiah N, Zainal NH, Narasimhalu K, et al. Hippocampal volume and white matter disease in the prediction of dementia in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(11):1203-1208.

165. Morales DA, Vives-Gilbert Y, Gomez-Anson B, et al. Predicting dementia development in Parkinson's disease using Bayesian network classifiers. *Psychiatry Res* 2013;213(2):92-98.
166. Melzer TR, Watts R, MacAskill MR, et al. White matter microstructure deteriorates across cognitive stages in Parkinson disease. *Neurology* 2013;80(20):1841-1849.
167. Kamagata K, Motoi Y, Abe O, et al. White matter alteration of the cingulum in Parkinson disease with and without dementia: evaluation by diffusion tensor tract-specific analysis. *Am J Neuro-radiol* 2012;33(5):890-895.
168. Kamagata K, Motoi Y, Tomiyama H, et al. Relationship between cognitive impairment and white-matter alteration in Parkinson's disease with dementia: tract-based spatial statistics and tract-specific analysis. *Eur Radiol* 2013;23(7):1946-1955.
169. Deng B, Zhang Y, Wang L, et al. Diffusion tensor imaging reveals white matter changes associated with cognitive status in patients with Parkinson's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 2013;28(2):154-164.
170. Matsui H, Nishinaka K, Oda M, Niikawa H, Kubori T, Udaka F. Dementia in Parkinson's disease: diffusion tensor imaging. *Acta Neurol Scand* 2007;116(3):177-181.
171. Agosta F, Canu E, Stefanova E, et al. Mild cognitive impairment in Parkinson's disease is associated with a distributed pattern of brain white matter damage. *Hum Brain Mapp* 2014;35(5):1921-1929.
172. Chen B, Fan GG, Liu H, Wang S. Changes in anatomical and functional connectivity of Parkinson's disease patients according to cognitive status. *Eur J Radiol* 2015;84(7):1318-1324.
173. Agosta F, Canu E, Stojkovic T, et al. The topography of brain damage at different stages of Parkinson's disease. *Hum Brain Mapp* 2013;34(11):2798-2807.
174. Zheng Z, Shemmassian S, Wijekoon C, Kim W, Bookheimer SY, Pouratian N. DTI correlates of distinct cognitive impairments in Parkinson's disease. *Hum Brain Mapp* 2014;35(4):1325-1333.
175. Theilmann RJ, Reed JD, Song DD, et al. White-matter changes correlate with cognitive functioning in Parkinson's disease. *Front Neurol* 2013;4:37.
176. Ekman U, Eriksson J, Forsgren L, Mo SJ, Riklund K, Nyberg L. Functional brain activity and presynaptic dopamine uptake in patients with Parkinson's disease and mild cognitive impairment: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2012;11(8):679-687.
177. Nagano-Saito A, Habak C, Mejia-Constain B, et al. Effect of mild cognitive impairment on the patterns of neural activity in early Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2014;35(1):223-231.
178. Ekman U, Eriksson J, Forsgren L, et al. Longitudinal changes in task-evoked brain responses in Parkinson's disease patients with and without mild cognitive impairment. *Front Neurosci* 2014;8:207.
179. Lewis SJ, Dove A, Robbins TW, Barker RA, Owen AM. Cognitive impairments in early Parkinson's disease are accompanied by reductions in activity in frontostriatal neural circuitry. *J Neurosci* 2003;23(15):6351-6356.
180. Williams-Gray CH, Mason SL, Evans JR, et al. The CamPaIGN study of Parkinson's disease: 10-year outlook in an incident population-based cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84(11):1258-1264.
181. Pagonabarraga J, Kulisevsky J, Llebaria G, Garcia-Sanchez C, Pascual-Sedano B, Gironell A. Parkinson's disease-cognitive rating scale: a new cognitive scale specific for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008;23(7):998-1005.
182. Seibert TM, Murphy EA, Kaestner EJ, Brewer JB. Interregional correlations in Parkinson disease and Parkinson-related dementia with resting functional MR imaging. *Radiology* 2012;263(1):226-234.
183. Rektorova I, Krajcovicova L, Marecek R, Mikl M. Default mode network and extrastriate visual resting state network in patients with Parkinson's disease dementia. *Neurodegener Dis* 2012;10(1-4):232-237.
184. Baggio HC, Sala-Llonch R, Segura B, et al. Functional brain networks and cognitive deficits in Parkinson's disease. *Hum Brain Mapp* 2014;35(9):4620-4634.
185. Pereira JB, Aarsland D, Ginestet CE, et al. Aberrant cerebral network topology and mild cognitive impairment in early Parkinson's disease. *Hum Brain Mapp* 2015;36(8):2980-2995.
186. Amboni M, Tessitore A, Esposito F, et al. Resting-state functional connectivity associated with mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *J Neurol* 2015;262(2):425-434.
187. Olde Dubbelink KT, Schoonheim MM, Deijen JB, Twisk JW, Barkhof F, Berendse HW. Functional connectivity and cognitive decline over 3 years in Parkinson disease. *Neurology* 2014;83(22):2046-2053.
188. Rektorova I, Krajcovicova L, Marecek R, Novakova M, Mikl M. Default mode network connectivity patterns associated with visual processing at different stages of Parkinson's disease. *J Alzheimers Dis* 2014;42(suppl 3):S217-S228.
189. Nie K, Zhang Y, Huang B, et al. Marked N-acetylaspartate and choline metabolite changes in Parkinson's disease patients with mild cognitive impairment. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;19(3):329-334.
190. Summerfield C, Gomez-Anson B, Tolosa E, et al. Dementia in Parkinson disease: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Arch Neurol* 2002;59(9):1415-1420.
191. Griffith HR, den Hollander JA, Okonkwo OC, O'Brien T, Watts RL, Marson DC. Brain N-acetylaspartate is reduced in Parkinson disease with dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2008;22(1):54-60.
192. Pagonabarraga J, Gomez-Anson B, Rotger R, et al. Spectroscopic changes associated with mild cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2012;34(5-6):312-318.
193. Camicioli RM, Korzan JR, Foster SL, et al. Posterior cingulate metabolic changes occur in Parkinson's disease patients without dementia. *Neurosci Lett* 2004;354(3):177-180.
194. Lewis SJ, Shine JM, Duffy S, Halliday G, Naismith SL. Anterior cingulate integrity: executive and neuropsychiatric features in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012;27(10):1262-1267.
195. Hu MT, Taylor-Robinson SD, Chaudhuri KR, et al. Cortical dysfunction in non-demented Parkinson's disease patients: a combined (31)P-MRS and (18)FDG-PET study. *Brain* 2000;123(Pt 2):340-352.
196. Ito K, Nagano-Saito A, Kato T, et al. Striatal and extrastriatal dysfunction in Parkinson's disease with dementia: a 6-[18F]fluoro-L-dopa PET study. *Brain* 2002;125(Pt 6):1358-1365.
197. Christopher L, Marras C, Duff-Canning S, et al. Combined insular and striatal dopamine dysfunction are associated with executive deficits in Parkinson's disease with mild cognitive impairment. *Brain* 2014;137(Pt 2):565-575.
198. Chou KL, Lenhart A, Koeppe RA, Bohnen NI. Abnormal MoCA and normal range MMSE scores in Parkinson disease without dementia: cognitive and neurochemical correlates. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(10):1076-1080.
199. Christopher L, Duff-Canning S, Koshimori Y, et al. Salience network and parahippocampal dopamine dysfunction in memory-impaired Parkinson disease. *Ann Neurol* 2015;77(2):269-280.
200. van Beilen M, Leenders KL. Putamen FDOPA uptake and its relationship to cognitive functioning in PD. *J Neurol Sci* 2006;248(1-2):68-71.
201. Nobili F, Campus C, Arnaldi D, et al. Cognitive-nigrostriatal relationships in de novo, drug-naive Parkinson's disease patients: a [I-123]FP-CIT SPECT study. *Mov Disord* 2010;25(1):35-43.
202. Siepel FJ, Bronnick KS, Booij J, et al. Cognitive executive impairment and dopaminergic deficits in de novo Parkinson's disease. *Mov Disord* 2014;29(14):1802-1808.
203. Pellicchia MT, Picillo M, Santangelo G, et al. Cognitive performances and DAT imaging in early Parkinson's disease with mild cognitive impairment: a preliminary study. *Acta Neurol Scand* 2015;131(5):275-281.
204. Bruck A, Portin R, Lindell A, et al. Positron emission tomography shows that impaired frontal lobe functioning in Parkinson's disease is related to dopaminergic hypofunction in the caudate nucleus. *Neurosci Lett* 2001;311(2):81-84.
205. Rektorova I, Srovnalova H, Kubikova R, Prasek J. Striatal dopamine transporter imaging correlates with depressive symptoms and tower of London task performance in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008;23(11):1580-1587.
206. Lebedev AV, Westman E, Simmons A, et al. Large-scale resting state network correlates of cognitive impairment in Parkinson's

- disease and related dopaminergic deficits. *Front Syst Neurosci* 2014;8:45.
207. Colloby SJ, Williams ED, Burn DJ, Lloyd JJ, McKeith IG, O'Brien JT. Progression of dopaminergic degeneration in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with and without dementia assessed using 123I-FP-CIT SPECT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32(10):1176-1185.
  208. Broussolle E, Dentresangle C, Landais P, et al. The relation of putamen and caudate nucleus 18F-Dopa uptake to motor and cognitive performances in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1999; 166(2):141-151.
  209. Song IU, Kim YD, Cho HJ, Chung SW, Chung YA. An FP-CIT PET comparison of the differences in dopaminergic neuronal loss between idiopathic Parkinson disease with dementia and without dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2013;27(1):51-55.
  210. Liu AK, Chang RC, Pearce RK, Gentleman SM. Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2015;129(4):527-540.
  211. Poewe W, Wolters E, Emre M, et al. Long-term benefits of rivastigmine in dementia associated with Parkinson's disease: an active treatment extension study. *Mov Disord* 2006;21(4):456-461.
  212. Klein JC, Eggers C, Kalbe E, et al. Neurotransmitter changes in dementia with Lewy bodies and Parkinson disease dementia in vivo. *Neurology* 2010;74(11):885-892.
  213. Shimada H, Hirano S, Shinotoh H, et al. Mapping of brain acetylcholinesterase alterations in Lewy body disease by PET. *Neurology* 2009;73(4):273-278.
  214. Kuhl DE, Minoshima S, Fessler JA, et al. In vivo mapping of cholinergic terminals in normal aging, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1996;40(3):399-410.
  215. Hilker R, Thomas AV, Klein JC, et al. Dementia in Parkinson disease: functional imaging of cholinergic and dopaminergic pathways. *Neurology* 2005;65(11):1716-1722.
  216. Bohnen NI, Kaufer DI, Ivanco LS, et al. Cortical cholinergic function is more severely affected in parkinsonian dementia than in Alzheimer disease: an in vivo positron emission tomographic study. *Arch Neurol* 2003;60(12):1745-1748.
  217. Bohnen NI, Kaufer DI, Hendrickson R, et al. Cognitive correlates of cortical cholinergic denervation in Parkinson's disease and parkinsonian dementia. *J Neurol* 2006;253(2):242-247.
  218. Meyer PM, Strecker K, Kendziorra K, et al. Reduced alpha4beta2\*-nicotinic acetylcholine receptor binding and its relationship to mild cognitive and depressive symptoms in Parkinson disease. *Arch Gen Psychiatry* 2009;66(8):866-877.
  219. Bohnen NI, Muller ML, Kotagal V, et al. Heterogeneity of cholinergic denervation in Parkinson's disease without dementia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012;32(8):1609-1617.
  220. Bohnen NI, Albin RL, Muller ML, et al. Frequency of cholinergic and caudate nucleus dopaminergic deficits across the predemented cognitive spectrum of Parkinson disease and evidence of interaction effects. *JAMA Neurol* 2015;72(2):194-200.
  221. Lorenz R, Samnick S, Dillmann U, et al. Nicotinic alpha4beta2 acetylcholine receptors and cognitive function in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 2014;130(3):164-171.
  222. Edison P, Rowe CC, Rinne JO, et al. Amyloid load in Parkinson's disease dementia and Lewy body dementia measured with [11C]PIB positron emission tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79(12):1331-1338.
  223. Shimada H, Shinotoh H, Hirano S, et al. beta-Amyloid in Lewy body disease is related to Alzheimer's disease-like atrophy. *Mov Disord* 2013;28(2):169-175.
  224. Petrou M, Bohnen NI, Muller ML, Koeppe RA, Albin RL, Frey KA. Abeta-amyloid deposition in patients with Parkinson disease at risk for development of dementia. *Neurology* 2012;79(11):1161-1167.
  225. Maetzler W, Reimold M, Liepelt I, et al. [11C]PIB binding in Parkinson's disease dementia. *Neuroimage* 2008;39(3):1027-1033.
  226. Burack MA, Hartlein J, Flores HP, Taylor-Reinwald L, Perlmutter JS, Cairns NJ. In vivo amyloid imaging in autopsy-confirmed Parkinson disease with dementia. *Neurology* 2010; 74(1):77-84.
  227. Campbell MC, Markham J, Flores H, et al. Principal component analysis of PiB distribution in Parkinson and Alzheimer diseases. *Neurology* 2013;81(6):520-527.
  228. Gomperts SN, Locascio JJ, Marquie M, et al. Brain amyloid and cognition in Lewy body diseases. *Mov Disord* 2012;27(8):965-973.
  229. Foster ER, Campbell MC, Burack MA, et al. Amyloid imaging of Lewy body-associated disorders. *Mov Disord* 2010;25(15):2516-2523.
  230. Gomperts SN, Locascio JJ, Rentz D, et al. Amyloid is linked to cognitive decline in patients with Parkinson disease without dementia. *Neurology* 2013;80(1):85-91.
  231. Lucero C, Campbell MC, Flores H, Maiti B, Perlmutter JS, Foster ER. Cognitive reserve and beta-amyloid pathology in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2015;21(8):899-904.
  232. Irwin DJ, White MT, Toledo JB, et al. Neuropathologic substrates of Parkinson disease dementia. *Ann Neurol* 2012;72(4): 587-598.
  233. Petrou M, Dwamena BA, Foerster BR, et al. Amyloid deposition in Parkinson's disease and cognitive impairment: a systematic review. *Mov Disord* 2015;30(7):928-935.
  234. Osaki Y, Morita Y, Fukumoto M, Akagi N, Yoshida S, Doi Y. Three-dimensional stereotactic surface projection SPECT analysis in Parkinson's disease with and without dementia. *Mov Disord* 2005;20(8):999-1005.
  235. Matsui H, Udaka F, Miyoshi T, et al. N-isopropyl-p- 123I iodoamphetamine single photon emission computed tomography study of Parkinson's disease with dementia. *Intern Med* 2005; 44(10):1046-1050.
  236. Derejko M, Slawek J, Wieczorek D, Brockhuis B, Dubaniewicz M, Lass P. Regional cerebral blood flow in Parkinson's disease as an indicator of cognitive impairment. *Nucl Med Commun* 2006; 27(12):945-951.
  237. Wallin A, Ekberg S, Lind K, Milos V, Granerus AK, Granerus G. Posterior cortical brain dysfunction in cognitively impaired patients with Parkinson's disease—a rCBF scintigraphy study. *Acta Neurol Scand* 2007;116(6):347-354.
  238. Wang SJ, Liu RS, Liu HC, et al. Technetium-99m hexamethylpropylene amine oxime single photon emission tomography of the brain in early Parkinson's disease: correlation with dementia and lateralization. *Eur J Nucl Med* 1993;20(4):339-344.
  239. Liu RS, Lin KN, Wang SJ, et al. Cognition and 99Tcm-HMPAO SPECT in Parkinson's disease. *Nucl Med Commun* 1992;13(10): 744-748.
  240. Spampinato U, Habert MO, Mas JL, et al. (99mTc)-HM-PAO SPECT and cognitive impairment in Parkinson's disease: a comparison with dementia of the Alzheimer type. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54(9):787-792.
  241. Kawabata K, Tachibana H, Sugita M. Cerebral blood flow and dementia in Parkinson's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 1991;4(4):194-203.
  242. Kasama S, Tachibana H, Kawabata K, Yoshikawa H. Cerebral blood flow in Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and Alzheimer's disease according to three-dimensional stereotactic surface projection imaging. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2005;19(5-6):266-275.
  243. Hattori N, Yabe I, Hirata K, et al. Brain regions associated with cognitive impairment in patients with Parkinson disease: quantitative analysis of cerebral blood flow using 123I iodoamphetamine SPECT. *Clin Nucl Med* 2013;38(5):315-320.
  244. Nobili F, Abbruzzese G, Morbelli S, et al. Amnesic mild cognitive impairment in Parkinson's disease: a brain perfusion SPECT study. *Mov Disord* 2009;24(3):414-421.
  245. Song IU, Chung YA, Chung SW, Jeong J. Early diagnosis of Alzheimer's disease and Parkinson's disease associated with dementia using cerebral perfusion SPECT. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2014;37(5-6):276-285.
  246. Matsui H, Nishinaka K, Oda M, et al. Heterogeneous factors in dementia with Parkinson's disease: IMP-SPECT study. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13(3):174-181.
  247. Sawada H, Udaka F, Kameyama M, et al. SPECT findings in Parkinson's disease associated with dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55(10):960-963.
  248. Antonini A, De Notaris R, Benti R, De Gaspari D, Pezzoli G. Perfusion ECD/SPECT in the characterization of cognitive deficits in Parkinson's disease. *Neurol Sci* 2001;22(1):45-46.

249. Mito Y, Yoshida K, Yabe I, et al. Brain 3D-SSP SPECT analysis in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease with and without dementia, and Alzheimer's disease. *Clin Neurol Neurosurg* 2005;107(5):396-403.
250. Edison P, Ahmed I, Fan Z, et al. Microglia, amyloid, and glucose metabolism in Parkinson's disease with and without dementia. *Neuropsychopharmacology* 2013;38(6):938-949.
251. Garcia-Garcia D, Clavero P, Gasca Salas C, et al. Posterior parietooccipital hypometabolism may differentiate mild cognitive impairment from dementia in Parkinson's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012;39(11):1767-1777.
252. Gonzalez-Redondo R, Garcia-Garcia D, Clavero P, et al. Grey matter hypometabolism and atrophy in Parkinson's disease with cognitive impairment: a two-step process. *Brain* 2014;137(Pt 8):2356-2367.
253. Jokinen P, Scheinin N, Aalto S, et al. [(11)C]PIB-, [(18)F]FDG-PET and MRI imaging in patients with Parkinson's disease with and without dementia. *Parkinsonism Relat Disord* 2010;16(10):666-670.
254. Yong SW, Yoon JK, An YS, Lee PH. A comparison of cerebral glucose metabolism in Parkinson's disease, Parkinson's disease dementia and dementia with Lewy bodies. *Eur J Neurol* 2007;14(12):1357-1362.
255. Huang C, Mattis P, Perrine K, Brown N, Dhawan V, Eidelberg D. Metabolic abnormalities associated with mild cognitive impairment in Parkinson disease. *Neurology* 2008;70(16 Pt 2):1470-1477.
256. Hosokai Y, Nishio Y, Hirayama K, et al. Distinct patterns of regional cerebral glucose metabolism in Parkinson's disease with and without mild cognitive impairment. *Mov Disord* 2009;24(6):854-862.
257. Lyoo CH, Jeong Y, Ryu YH, Rinne JO, Lee MS. Cerebral glucose metabolism of Parkinson's disease patients with mild cognitive impairment. *Eur Neurol* 2010;64(2):65-73.
258. Pappata S, Santangelo G, Aarsland D, et al. Mild cognitive impairment in drug-naive patients with PD is associated with cerebral hypometabolism. *Neurology* 2011;77(14):1357-1362.
259. Bohnen NI, Koeppe RA, Minoshima S, et al. Cerebral glucose metabolic features of Parkinson disease and incident dementia: longitudinal study. *J Nucl Med* 2011;52(6):848-855.
260. Shoji Y, Nishio Y, Baba T, et al. Neural substrates of cognitive subtypes in Parkinson's disease: a 3-year longitudinal study. *PLoS ONE* 2014;9(10):e110547.
261. Huang C, Mattis P, Tang C, Perrine K, Carbon M, Eidelberg D. Metabolic brain networks associated with cognitive function in Parkinson's disease. *Neuroimage* 2007;34(2):714-723.
262. Huang C, Ravdin LD, Nirenberg MJ, et al. Neuroimaging markers of motor and nonmotor features of Parkinson's disease: an 18f fluorodeoxyglucose positron emission computed tomography study. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2013;35(3-4):183-196.
263. Nagano-Saito A, Kato T, Arahata Y, et al. Cognitive- and motor-related regions in Parkinson's disease: FDOPA and FDG PET studies. *Neuroimage* 2004;22(2):553-561.
264. Lozza C, Baron JC, Eidelberg D, Mentis MJ, Carbon M, Marie RM. Executive processes in Parkinson's disease: FDG-PET and network analysis. *Hum Brain Mapp* 2004;22(3):236-245.
265. Abe Y, Kachi T, Kato T, et al. Occipital hypoperfusion in Parkinson's disease without dementia: correlation to impaired cortical visual processing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74(4):419-422.
266. Paschali A, Messinis L, Lyros E, et al. Neuropsychological functions and rCBF SPECT in Parkinson's disease patients considered candidates for deep brain stimulation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009;36(11):1851-1858.
267. Kramberger MG, Stukovnik V, Cus A, et al. Parkinson's disease dementia: clinical correlates of brain spect perfusion and treatment. *Psychiatr Danub* 2010;22(3):446-449.
268. Neufeld MY, Inzelberg R, Korczyn AD. EEG in demented and non-demented parkinsonian patients. *Acta Neurol Scand* 1988;78(1):1-5.
269. Neufeld MY, Blumen S, Aitkin I, Parmet Y, Korczyn AD. EEG frequency analysis in demented and nondemented parkinsonian patients. *Dementia* 1994;5(1):23-28.
270. Bonanni L, Thomas A, Tiraboschi P, Perfetti B, Varanese S, Onofri M. EEG comparisons in early Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia patients with a 2-year follow-up. *Brain* 2008;131(Pt 3):690-705.
271. Serizawa K, Kamei S, Morita A, et al. Comparison of quantitative EEGs between Parkinson disease and age-adjusted normal controls. *J Clin Neurophysiol* 2008;25(6):361-366.
272. Soikkeli R, Partanen J, Soininen H, Paakkonen A, Riekkinen P Sr. Slowing of EEG in Parkinson's disease. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1991;79(3):159-165.
273. Fonseca LC, Tedrus GM, Carvas PN, Machado EC. Comparison of quantitative EEG between patients with Alzheimer's disease and those with Parkinson's disease dementia. *Clin Neurophysiol* 2013;124(10):1970-1974.
274. Domitrz I, Friedman A. Electroencephalography of demented and non-demented Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat Disord* 1999;5(1-2):37-41.
275. Caviness JN, Hentz JG, Evidente VG, et al. Both early and late cognitive dysfunction affects the electroencephalogram in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13(6):348-354.
276. Bousleiman H, Zimmermann R, Ahmed S, et al. Power spectra for screening parkinsonian patients for mild cognitive impairment. *Ann Clin Transl Neurol* 2014;1(11):884-890.
277. Klassen BT, Hentz JG, Shill HA, et al. Quantitative EEG as a predictive biomarker for Parkinson disease dementia. *Neurology* 2011;77(2):118-124.
278. Caviness JN, Hentz JG, Belden CM, et al. Longitudinal EEG changes correlate with cognitive measure deterioration in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2015;5(1):117-124.
279. Schlede N, Zimmermann R, Ehrensperger MM, et al. Clinical EEG in cognitively impaired patients with Parkinson's Disease. *J Neurol Sci* 2011;310(1-2):75-78.
280. Morita A, Kamei S, Mizutani T. Relationship between slowing of the EEG and cognitive impairment in Parkinson disease. *J Clin Neurophysiol* 2011;28(4):384-387.
281. Zimmermann R, Gschwandtner U, Hatz F, et al. Correlation of EEG slowing with cognitive domains in nondemented patients with Parkinson's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2015;39(3-4):207-214.
282. Kamei S, Morita A, Serizawa K, Mizutani T, Hirayanagi K. Quantitative EEG analysis of executive dysfunction in Parkinson disease. *J Clin Neurophysiol* 2010;27(3):193-197.
283. Bosboom JL, Stoffers D, Stam CJ, et al. Resting state oscillatory brain dynamics in Parkinson's disease: an MEG study. *Clin Neurophysiol* 2006;117(11):2521-2531.
284. Bosboom JL, Stoffers D, Wolters E, Stam CJ, Berendse HW. MEG resting state functional connectivity in Parkinson's disease related dementia. *J Neural Transm* 2009;116(2):193-202.
285. Picton TW, Bentin S, Berg P, et al. Guidelines for using human event-related potentials to study cognition: recording standards and publication criteria. *Psychophysiology* 2000;37(2):127-152.
286. Hanafusa H, Motomura N, Fukai M. Event-related potentials in senile dementia of Alzheimer's type, multiinfarct dementia and Parkinson's disease. *Jpn J Psychiatry Neurol* 1991;45(3):667-670.
287. Toda K, Tachibana H, Sugita M, Konishi K. P300 and reaction time in Parkinson's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 1993;6(3):131-136.
288. Ito J. Somatosensory event-related potentials (ERPs) in patients with different types of dementia. *J Neurol Sci* 1994;121(2):139-146.
289. O'Mahony D, Rowan M, Feely J, O'Neill D, Walsh JB, Coakley D. Parkinson's dementia and Alzheimer's dementia: an evoked potential comparison. *Gerontology* 1993;39(4):228-240.
290. Matsui H, Nishinaka K, Oda M, Kubori T, Udaka F. Auditory event-related potentials in Parkinson's disease: prominent correlation with attention. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13(7):394-398.
291. Tanaka H, Koenig T, Pascual-Marqui RD, Hirata K, Kochi K, Lehmann D. Event-related potential and EEG measures in Parkinson's disease without and with dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2000;11(1):39-45.
292. Pang S, Borod JC, Hernandez A, et al. The auditory P 300 correlates with specific cognitive deficits in Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1990;2(4):249-264.

293. Bodis-Wollner I, Borod JC, Cicero B, et al. Modality dependent changes in event-related potentials correlate with specific cognitive functions in nondemented patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1995;9(2-3):197-209.
294. Aotsuka A, Weate SJ, Drake ME Jr, Paulson GW. Event-related potentials in Parkinson's disease. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 1996;36(4):215-220.
295. Chen KJ, Lin RT, Liu CK, Tai CT, Lai CL. Relationship between event-related potentials and frontal-subcortical dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2006;12(7):453-458.
296. Bokura H, Yamaguchi S, Kobayashi S. Event-related potentials for response inhibition in Parkinson's disease. *Neuropsychologia* 2005;43(6):967-975.
297. Celebi O, Temucin CM, Elibol B, Saka E. Short latency afferent inhibition in Parkinson's disease patients with dementia. *Mov Disord* 2012;27(8):1052-1055.
298. Yarnall AJ, Rochester L, Baker MR, et al. Short latency afferent inhibition: a biomarker for mild cognitive impairment in Parkinson's disease? *Mov Disord* 2013;28(9):1285-1288.

## Supporting Data

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

## ARTÍCULO II

### **Tau/ $\alpha$ -synuclein ratio and inflammatory proteins in Parkinson's disease: an exploratory study**

Manuel Delgado-Alvarado, Belén Gago, Ana Gorostidi, Haritz Jimenez-Urbieta, Rosalía Dacosta-Aguayo, Irene Navalpotro-Gómez, Javier Ruiz-Martinez, Alberto Bergareche, José F. Martí-Masso, Pablo Martinez-Lage, Andrea Izagirre, María C. Rodríguez-Oroz

Movement Disorders. 2017 May 26. doi: 10.1002/mds.27001. [Epub ahead of print]

## Tau/ $\alpha$ -Synuclein Ratio and Inflammatory Proteins in Parkinson's Disease: An Exploratory Study

Manuel Delgado-Alvarado, MD,<sup>1,2</sup> Belén Gago, PhD,<sup>1,2</sup> Ana Gorostidi, PhD,<sup>1,2,3</sup> Haritz Jiménez-Urbieta, MSc,<sup>1,2</sup> Rosalía Dacosta-Aguayo, PhD,<sup>1,2</sup> Irene Navalpotro-Gómez, MD,<sup>1,2</sup> Javier Ruiz-Martínez, MD, PhD,<sup>1,2,4</sup> Alberto Bergareche, MD,<sup>1,2,4</sup> José F. Martí-Massó, MD, PhD,<sup>1,2,4</sup> Pablo Martínez-Lage, MD, PhD,<sup>5</sup> Andrea Izagirre, MHS,<sup>5</sup> and María C. Rodríguez-Oroz, MD, PhD<sup>1,2,4,6,7\*</sup>

<sup>1</sup>Neurodegenerative Disorders Area, Biodonostia Health Research Institute, San Sebastián, Spain

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

<sup>3</sup>Genomics Platform, Biodonostia Research Institute, San Sebastián, Spain

<sup>4</sup>Movement Disorders Unit, Department of Neurology, University Hospital Donostia, San Sebastián, Spain

<sup>5</sup>Department of Neurology, CITA-Alzheimer Foundation, San Sebastián, Spain

<sup>6</sup>Ikerbasque (Basque Foundation for Science), Bilbao, Spain

<sup>7</sup>Basque Center on Cognition Brain and Language (BCBL), San Sebastián, Spain

**ABSTRACT: Background:** No CSF or plasma biomarker has been validated for diagnosis or progression of PD.

**Objectives:** To assess whether the CSF and plasma levels of proteins associated with PD neuropathological inclusions and with neuroinflammation might have value in the diagnosis of PD or in relation to disease severity.

**Methods:** CSF levels of  $\alpha$ -synuclein, amyloid- $\beta$ 1-42, total tau, and threonine-181 phosphorylated tau, as well as CSF and plasma levels of cytokines (interleukin-1 $\beta$ , interleukin-2, interleukin, interferon- $\gamma$ , and tumor necrosis factor  $\alpha$ ) were studied in 40 PD patients and 40 healthy controls. Plasma levels of cytokines were measured in 51 patients and 26 additional controls. We also explored the Parkinson's Progression Markers Initiative data set as a replication cohort.

**Results:** CSF levels of  $\alpha$ -synuclein, amyloid- $\beta$ 1-42, and tumor necrosis factor  $\alpha$  were lower in patients than in controls, and the total tau/ $\alpha$ -synuclein, phosphorylated tau/ $\alpha$ -synuclein, total tau/amyloid- $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -synuclein, and phosphorylated tau/amyloid- $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -synuclein ratios

were higher in patients. The best area under the curve value was obtained for the phosphorylated tau/ $\alpha$ -synuclein ratio alone (0.86) and also when this was combined with tumor necrosis factor  $\alpha$  in CSF (0.91; sensitivity 92.9%, specificity 75% for a cut-off value of  $\leq 0.71$ ). Phosphorylated tau/ $\alpha$ -synuclein and phosphorylated tau/amyloid- $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -synuclein were higher in patients than in controls of the Parkinson's Progression Markers Initiative database. Plasma cytokines did not differ between groups, although interleukin-6 levels were positively correlated with UPDRS-I, -II, and -III scores.

**Conclusions:** The CSF phosphorylated tau/ $\alpha$ -synuclein ratio alone, and in combination with tumor necrosis factor  $\alpha$  and plasma interleukin-6 levels, might serve as biomarkers to diagnose PD and monitor its severity. © 2017 International Parkinson and Movement Disorder Society

**Key Words:** Parkinson's disease; biomarkers;  $\alpha$ -synuclein; IL-6; cerebrospinal fluid

\*Correspondence to: Dr. María C. Rodríguez-Oroz, Movement Disorders Unit, Department of Neurology, University Hospital Donostia, Paseo del Doctor Begiristain s/n, 20014, San Sebastián, Spain; E-mail: maria.rodri-guezoroz@biodonostia.org

Current address for Dr. Delgado-Alvarado: Neurology Department and IDIVAL, University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

**Funding agencies:** This work was supported by grants from the Institute of Health Carlos III (ISCIII; grants PI08/1539 and PI14/00763), the Government of the Basque Country (grants 2011111074 and SAIO12-PE12BN012) and CIBERNED. M.D.-A. was funded by a Basque Country Ph.D. Studentship and Jesús de Gangoiti Barrera by a Foundation grant.

**Relevant conflicts of interest/financial disclosures:** P.M.-L. received honoraria for giving lectures or participating in advisory boards from Lilly, Piramal, General Electric, and Nutricia. M.C.R.-O. received honoraria for lectures, travel, and accommodation to attend scientific meetings from AbbVie, TEVA, and Boston Scientific.

Full financial disclosures and author roles may be found in the online version of this article.

**Received:** 7 November 2016; **Revised:** 1 March 2017; **Accepted:** 3 March 2017

**Published online 00 Month 2017 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/mds.27001**



The diagnosis of Parkinson's disease (PD) is based on the serial clinical examination of its cardinal features, which generally improve after dopaminergic treatment, and the absence of atypical features indicative of other forms of parkinsonism. Neurologists generally diagnose PD accurately in around 75% of cases, although this improves to above 90% for movement disorder specialists.<sup>1</sup> In conjunction with the clinical features, imaging studies to assess dopaminergic nigrostriatal projections improve the diagnostic accuracy of this disease.<sup>2</sup> This loss of dopamine is linked to the presence of Lewy bodies (LB) in the SNc and other brain regions,<sup>3</sup> deposits that are mainly composed of aggregated  $\alpha$ -synuclein.<sup>4</sup>

It is noteworthy that neurodegeneration and the deposition of  $\alpha$ -synuclein, as well as a number of premotor features,<sup>5</sup> are generally present years before the diagnosis of PD. Thus, there is a clear need for biomarkers to improve the diagnostic accuracy of PD when motor features appear, as well as to diagnose the disease in earlier phases. Indeed,  $\alpha$ -synuclein in the cerebrospinal fluid (CSF) has been studied as a potential biomarker for PD diagnosis, albeit with somewhat heterogeneous results.<sup>6,7</sup> The total tau/ $\alpha$ -synuclein ratio in the CSF has been proposed to have a better predictive value in the diagnosis of PD than  $\alpha$ -synuclein alone (89% sensitivity and 61% specificity).<sup>8</sup> Thus, studying other proteins in the distinct pathological inclusions present in PD brains,<sup>9</sup> and the ratios among them, could improve the diagnostic value of these markers.<sup>10</sup>

In addition, there is evidence that neuroinflammation may play a role in the pathogenesis of PD. Indeed, microglia activation, and astrogliosis in the SNc and other affected areas, has been detected in postmortem brains of PD patients, as well as increased levels of proinflammatory cytokines (see a previous work<sup>11</sup> for a review). However, few studies have assessed the possible increases in proinflammatory cytokines in plasma and CSF of PD patients, and hence their possible value in the diagnosis or tracking of the progress of PD is not clear.<sup>12-16</sup>

As such, we set out to study the levels of  $\alpha$ -synuclein, amyloid  $\beta$  (A $\beta$ )1-42, total tau (T-Tau) and Thr<sup>181</sup> phosphorylated tau (P-Tau) in the CSF, as well as their respective ratios, and the CSF and plasma levels of cytokines (interleukin [IL]-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, interferon-gamma [IFN $\gamma$ ], and tumor necrosis factor  $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ]), in a cohort of patients with PD. In this way, we aimed to assess their value for the diagnosis of PD and their relationship with the severity of this disease. To further validate our results regarding the  $\alpha$ -synuclein, A $\beta$ 1-42, T-Tau, and P-Tau in the CSF, as well as their respective ratios, we analyzed these variables in the Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI) database.<sup>17</sup>

## Materials and Methods

### Subjects

This study was carried out on 51 patients with PD<sup>18</sup> not associated with dementia who were recruited at the Movement Disorders Unit of the University Hospital Donostia (Spain) and on 40 healthy controls without neurological or psychiatric diseases and with normal cognition (Mini-Mental State Examination [MMSE]  $\geq 28$ ) who were recruited for the CSF study from the CITA-Alzheimer Foundation (San Sebastián, Spain). Because plasma measurements were not available for these individuals, another 24 healthy controls with no history of any neurological condition or cognitive complaint, and with a normal clinical and cognitive evaluation, were recruited from among the partners of the PD patients or those who accompanied them for blood extraction. Dementia was diagnosed in PD patients according to the International Parkinson and Movement Disorder Society (MDS) Task Force criteria.<sup>19</sup> This study was approved by the local ethics committee, and written informed consent was obtained from all the subjects.

### Clinical Examination

A thorough clinical and neuropsychological examination,<sup>20</sup> including two tests for global cognition (MMSE and Montreal Cognitive Assessment) and at least two tests for each cognitive domain, was performed on all subjects to exclude patients with dementia. In PD patients, it was undertaken under the effect of their habitual antiparkinsonian medication. An MRI examination was also undertaken to exclude other abnormalities. MDS-UPDRS Parts I, II, III, and IV were used to evaluate nonmotor issues, daily living activities, motor features, and motor complications.

### Sample Collection and Biomarker Analyses

CSF samples were obtained by lumbar puncture in the L4 to L5 interspace, which was performed between 9:00 AM and 11:00 AM after overnight fasting. The first 2 to 3 mL were used for routine testing (cell count, total protein, and glucose levels) to exclude any relevant CSF abnormalities. Another 8 to 10 mL of CSF were collected in polypropylene tubes and centrifuged at 2,000g for 10 minutes within 10 minutes of extraction, subsequently storing the supernatants in polypropylene tubes at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Blood was also extracted after overnight fasting and it was collected in ethylenediaminetetraacetic acid-treated tubes. It was centrifuged at 2,000g for 15 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  within 20 minutes of collection, and the plasma was aliquoted into separate polypropylene tubes and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . While plasma was available from the whole PD cohort, CSF was only obtained from 40 of these PD patients.

The concentrations of T-Tau, P-Tau, and the Aβ1-42 peptide in the CSF were determined using Innotech enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Fujirebio Europe N.V., Gent, Belgium), and total α-synuclein was assessed with the LEGEND MAX Human α-Synuclein ELISA Kit (BioLegend, San Diego, CA; previously Covance Dedham, MA), in each case following the manufacturer's instructions. Hemoglobin was chosen to indicate the degree of red blood cell contamination in the CSF, as reported previously,<sup>21</sup> and after diluting the samples 10-fold for analysis, it was measured using a human hemoglobin ELISA quantification kit (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX). Samples with levels of hemoglobin above 200 ng/mL (5 patients and 6 controls) were excluded from the α-synuclein analysis to avoid pre-analytical bias. In addition to these protein values, protein ratios were obtained by simple division of the protein concentrations, and the combined ratios were calculated by using the sum of Aβ1-42+α-synuclein as the denominator.

Cytokine levels in CSF (IL-1β, IL-2, IL-6, IFNγ, and TNF-α) were assessed by Luminex technology using a premixed multiplex assay, the Multiplex Map Human High Sensitivity T cell Magnetic Bead Panel Kit (Millipore, Billerica, MA) and reading the analytes on a MAGPIX system. The data obtained were analyzed with Milliplex Analyst 5.1 and the lower detection limits were: IL-1β = 0.16 pg/mL; IL-2 = 0.19 pg/mL; IFNγ = 0.17 pg/mL; IL-6 = 0.18 pg/mL; and TNF-α = 0.22. Only the cytokines detected in CSF were analyzed in plasma. Accordingly, IL-6 and TNF-α were measured in plasma using the Quantikine ELISA kits for Human TNF-α and IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, MN), according to the manufacturer's instructions. The lower detection limits of these assays were 5.5 pg/mL for TNF-α and 0.7 pg/mL for IL-6.

### PPMI Data Acquisition and Management

The PPMI is an international multicenter, prospective, longitudinal, observational study, designed to discover and validate biomarkers for progression of PD.<sup>17</sup> A critical part of the PPMI study is the deposition of samples and data in a repository that is readily accessible to the scientific and clinical community. The core PPMI data set centers on the acquisition of data from newly diagnosed PD cases, healthy controls, and individuals with scans without evidence of dopaminergic deficit. On July 4, 2016, data from 423 PD patients and 240 controls were obtained from the PPMI database ([www.ppmi-info.org/data](http://www.ppmi-info.org/data)). CSF values of Aβ1-42, T-Tau, P-Tau, and α-synuclein were used from PD patients and controls. Only data from the first visit were used when more than one CSF extraction was available, and samples with levels of hemoglobin above 200 ng/mL (106 patients and 46

controls) were excluded from the α-synuclein analysis. Inflammatory cytokines in CSF or plasma were not available in this repository.

### Statistical Analysis

Quantitative variables were compared using a *t* test or Mann-Whitney U test, as appropriate. Qualitative variables were compared with a chi-squared test. To adjust for age, this variable was entered as a covariate in a multiple linear logistic regression analysis. A logarithmic transformation was performed for those variables that were not normally distributed. The diagnostic accuracy was determined using a receiver operating characteristic (ROC) analysis and in order to assess the diagnostic performance of more than one variable, the predictive values obtained from a binary logistic regression analysis were entered into the ROC analysis. In order to assess the correlations between the protein levels or ratios and the clinical outcomes, a bivariate correlation analysis was used, and, again, age and disease duration were entered as covariates in a linear regression model. Data from the PPMI were handled in the same way as our own data. All the analyses were undertaken with SPSS software (v.22; SPSS Inc., Chicago, IL).

## Results

### CSF

The PD patients were older than the controls ( $P = 0.02$ ), and yet adjusting for age, the CSF levels of α-synuclein ( $P = 0.007$ ) and Aβ1-42 ( $P = 0.048$ ) were lower in PD patients than in controls. By contrast, the T-Tau and P-Tau, as well as the T-Tau/Aβ1-42 and P-Tau/Aβ1-42 ratios, were no different in PD patients and controls. Conversely, the T-Tau/α-synuclein ( $P < 0.001$ ) and P-Tau/α-synuclein ( $P < 0.001$ ) ratios, as well as the T-Tau/Aβ1-42+α-synuclein ( $P = 0.005$ ) and P-Tau/Aβ1-42+α-synuclein ( $P = 0.001$ ) values were higher in PD patients than in the controls (Table 1).

The levels of IL-1β, IL-2, and IFNγ in CSF were below the detection threshold in all the subjects, and although IL-6 could be detected in the CSF from 39 PD patients and 38 controls, there were no significant differences in the mean concentrations of this cytokine ( $P = 0.346$ ; Table 1). TNF-α levels were below the detection threshold in 8 patients and 13 controls ( $P = 0.137$ ).

Among the remaining subjects (32 PD patients and 27 controls), the age-adjusted mean concentration of TNF-α was higher in PD patients ( $P = 0.021$ ; Table 1). To determine whether any variable influenced the detection of TNF-α, we assessed whether any of the main clinical and demographical variables of the subjects in each group (controls and patients) were associated with the detection of this cytokine. No

**TABLE 1.** Summary of the demographic, clinical, and biochemical characteristics of PD patients and controls

	PD (n = 51)	Controls (n = 64)	P Value
Age (years)	71.0 ± 6.2	68.2 ± 5.0	0.028
Sex (men)	28 (70%)	21 (53.8%)	0.168
Disease duration (years)	7.9 ± 4.1	—	—
H & Y	2.3 ± 0.5	—	—
UPDRS-III	22.2 ± 7.9	—	—
<hr/>			
	PD (n = 40)	Controls (n = 40)	
CSF			
Aβ (pg/mL)	736.8 ± 239.1	877.6 ± 289.5	0.048 <sup>a</sup>
T-Tau (pg/mL)	231.2 ± 113.7	210.7 ± 115.9	0.656
P-Tau (pg/mL)	46.6 ± 17.8	46.2 ± 16.5	0.865
T-Tau/Aβ	0.3309 ± 0.193	0.279 ± 0.245	0.513
P-Tau/Aβ	0.0662 ± 0.0279	0.0593 ± 0.0368	0.600
α-synuclein (pg/mL) <sup>b</sup>	1,048.9 ± 492.0	1,170.3 ± 392.3	0.007 <sup>a</sup>
T-Tau/α-synuclein <sup>b</sup>	0.2379 ± 0.007	0.1654 ± 0.06	<0.001 <sup>a</sup>
P-Tau/α-synuclein <sup>b</sup>	0.0490 ± 0.008	0.0385 ± 0.007	<0.001 <sup>a</sup>
T-Tau/Aβ + α-synuclein <sup>b</sup>	0.1359 ± 0.051	0.0951 ± 0.045	0.005 <sup>a</sup>
P-Tau/Aβ + α-synuclein <sup>b</sup>	0.0276 ± 0.006	0.0215 ± 0.005	0.001 <sup>a</sup>
IL-6 (pg/mL) <sup>c</sup>	0.617 ± 0.30	0.531 ± 0.22	0.346
TNF-α (pg/mL) <sup>d</sup>	0.4013 ± 0.158	0.3078 ± 0.124	0.021 <sup>a</sup>
IL-1β (pg/mL)	Undetectable	Undetectable	
IL-2 (pg/mL)	Undetectable	Undetectable	
IFNγ (pg/mL)	Undetectable	Undetectable	
<hr/>			
Plasma	PD (n = 51)	Control (n = 24)	
IL-6 (pg/mL) <sup>e</sup>	2.294 ± 2.66	1.917 ± 1.27	0.742
TNF-α (pg/mL)	Undetectable	Undetectable	

<sup>a</sup>P value adjusted for age. Only those comparisons with a significant P value in the univariate analysis were corrected for age.

<sup>b</sup>PD patients (n = 35; male = 25; age, 71.43 ± 6.48), controls (n = 34; male = 18; age, 68.12 ± 5.01): P value for age = 0.021 and for sex P = 0.140.

<sup>c</sup>PD patients (n = 39; male 28; age, 71.28 ± 6.22), controls (n = 38; male = 20; age, 68.13 ± 4.87): P value for age = 0.016 and for sex P = 0.083.

<sup>d</sup>PD patients (n = 32; male = 22; age, 71.16 ± 6.66), controls (n = 27; male = 13; age, 68.26 ± 4.28): P value for age = 0.049 and for sex P = 0.109.

<sup>e</sup>PD patients (n = 51; male = 34; age, 71.02 ± 6.32), controls (n = 24; male = 12; age, 68.25 ± 5.51): P value for age = 0.070 and for sex P = 0.167.

differences were obtained in the controls with respect to age ( $P = 0.811$ ) and sex ( $P = 0.427$ ), or in the PD patients with regard to age ( $P = 0.791$ ), sex ( $P = 0.649$ ), disease duration ( $P = 0.839$ ), UPDRS-III ( $P = 0.619$ ), or total UPDRS ( $P = 0.299$ ).

In order to assess the sensitivity and specificity of the CSF proteins, and the ratios that differed between these two groups that served to discriminate the PD patients from the controls, a ROC analysis was performed (Fig. 1). The best results were observed for the ratio P-Tau/α-synuclein alone or in combination with the levels of TNF-α. The area under the curve (AUC) of P-Tau/α-synuclein combined with TNF-α was above 0.9, with a sensitivity of 92.9% and a specificity of 75% for a cut-off value ≤ 0.710. The P-Tau/α-synuclein ratio alone showed an AUC of 0.856, with a sensitivity of 97.1% and a specificity of 61.8% for a cut-off value ≥ 0.392. However, the P-Tau/α-synuclein ratio or the combination of this ratio with TNF-α, as

well as the other ratios or single protein values, did not correlate with any of the UPDRS scores (I-IV).

### Plasma

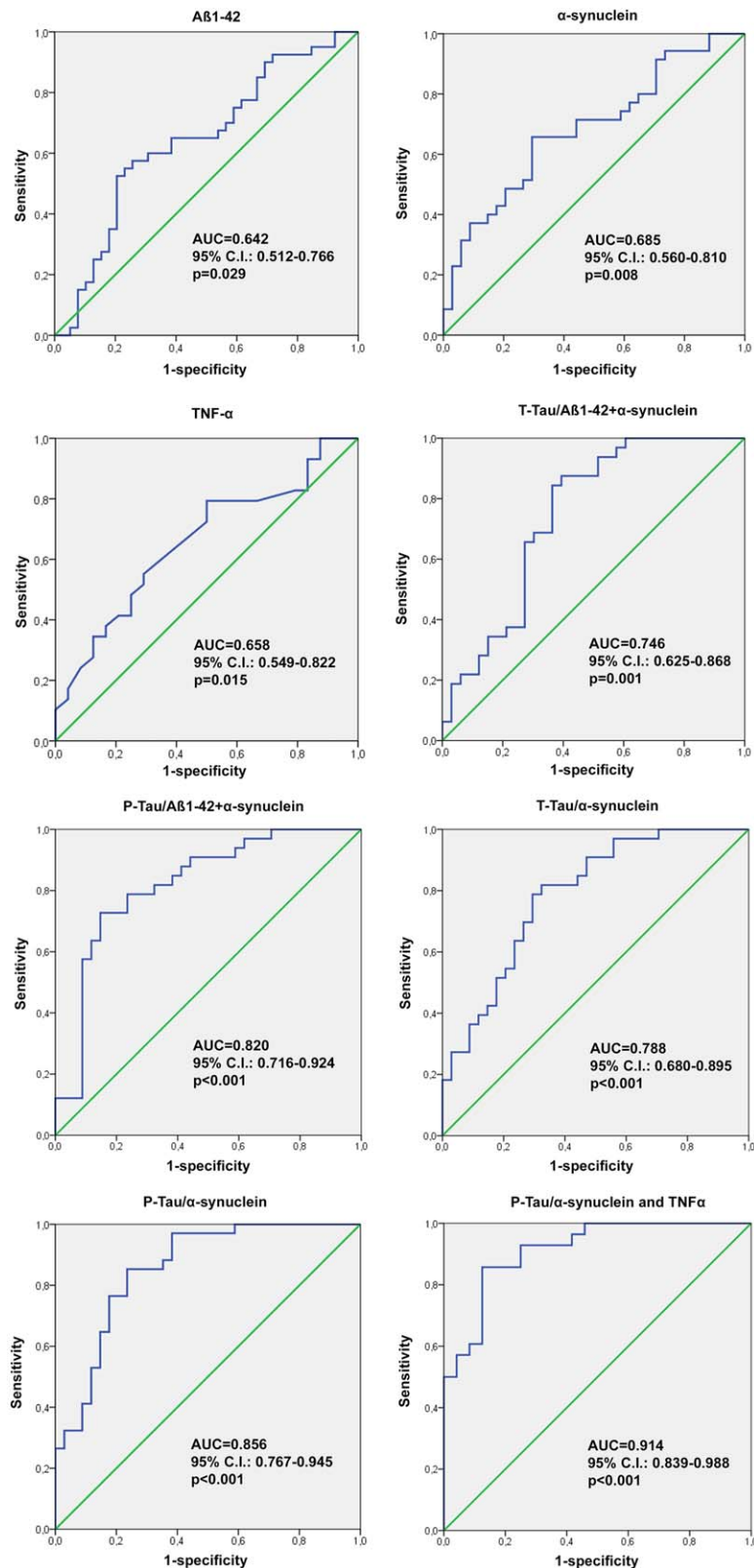
Because only TNF-α and IL-6 were detectable in the CSF, only these cytokines were measured in plasma. TNF-α levels remained below the threshold of detection in both PD patients and controls, whereas there was no difference in IL-6 levels between PD patients and controls ( $P = 0.742$ ; Table 1). However, a multiple linear regression analysis showed that plasma IL-6 levels, adjusted for age and disease duration, were positively correlated in PD patients with UPDRS I ( $\beta = 0.490$ ;  $P = 0.002$ ), UPDRS II ( $\beta = 0.492$ ;  $P < 0.001$ ) and UPDRS III ( $\beta = 0.367$ ;  $P = 0.020$ ; Fig. 2). Nevertheless, the levels of IL-6 in the CSF and plasma were not correlated ( $r = 0.226$ ;  $P = 0.172$ ). Moreover, the ratio plasma IL-6/CSF IL-6 was not correlated with any of the clinical variables assessed (data not shown).

### Validation PPMI Cohort

There was a trend for the PD patients to be older than the controls ( $P = 0.051$ ; Table 2). However, none of the single proteins in CSF differed between PD patients and controls when adjusted for age. Only α-synuclein approximated toward a significant difference ( $P = 0.066$ , lower values in PD patients). By contrast, the P-Tau/α-synuclein ( $P = 0.030$ ) and the P-Tau/Aβ1-42+α-synuclein ( $P = 0.034$ ) ratios were significantly higher in PD patients than in the controls, as observed in our cohort. Nevertheless, their performance of the ROC analysis was far from acceptable with an AUC of 0.551 ( $P = 0.113$ ) for P-Tau/α-synuclein and 0.553 ( $P = 0.098$ ) for P-Tau/Aβ1-42+α-synuclein.

### Discussion

The main finding of this study is that the ratio of P-Tau/α-synuclein in the CSF, and that of P-Tau/α-synuclein combined with the TNF-α values, more accurately diagnose PD than any of the proteins studied on their own. Indeed, in terms of the classification of PD patients relative to controls, the P-Tau/α-synuclein ratio had an AUC of 0.856, with a sensitivity of 97.1% and a specificity of 61.8, and the combination of P-Tau/α-synuclein and TNF-α had an AUC > 0.9, with a sensitivity of 92.9% and a specificity of 75%, giving a cut-off value of ≤ 0.71. Our results are reinforced by the finding of a significant higher P-Tau/α-synuclein ratio in a larger sample of PD patients obtained from the PPMI than in controls. In addition, plasma IL-6 levels did not appear to be useful in the diagnosis of PD, but rather they were correlated with disease severity.



**FIG. 1.** ROC curves of the different proteins and the ratios of the CSF proteins. CI, confidence interval. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

As in earlier studies, low levels of  $\alpha$ -synuclein<sup>22-27</sup> and A $\beta$ 1-42<sup>21-23,28-32</sup> were detected in the CSF of PD patients, and the diagnostic value of these proteins to differentiate PD from controls was poor.<sup>22</sup> However,

the ratios derived when the  $\alpha$ -synuclein levels were considered along with specific Tau isoforms (T-Tau/ $\alpha$ -synuclein and mainly, P-Tau/ $\alpha$ -synuclein) proved to be more-accurate diagnostic markers, in accord with

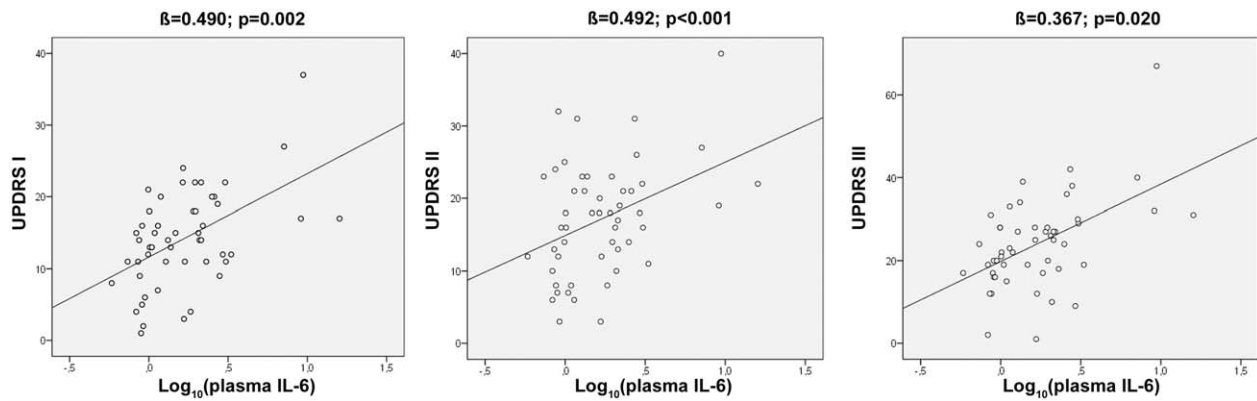


FIG. 2. Correlation analysis between plasma IL-6 and UPDRS I to IV.

an earlier report.<sup>8</sup> Because the Aβ1-42 levels were lower in our patients than in the controls, consistent with a previous study,<sup>33</sup> we also investigated the T-Tau/Aβ1-42 and P-Tau/Aβ1-42 ratios, as well as the T-Tau or P-Tau/Aβ1-42+α-synuclein values. These combinations did not improve the efficiency of the T-Tau/α-synuclein or P-Tau/α-synuclein ratios in the diagnosis of PD, consistent with the relevance of the deposits of α-synuclein in PD. Thus, although the deposition of Aβ may be observed in association with PD, this is probably related to specific features of some PD patients, such as cognitive decline.<sup>9</sup> Interestingly, analyzing the PPMI database shows that the P-Tau/α-synuclein ratio increases in PD patients compared to controls, reinforcing our results. However, the ROC analysis did not show as high performance as in our cohort.

Regarding cytokines, there was more TNF-α in the CSF from PD patients than in that from controls, consistent with a study undertaken on a small cohort<sup>34</sup> but not with another one where no differences were found.<sup>12</sup> Interestingly, the combination of TNF-α with the ratio of P-Tau/α-synuclein was that which best

classified PD patients. Conversely, there were no differences in plasma IL-6 levels in PD patients and controls, in contrast to earlier studies that reported increases<sup>13,14,35-37</sup> or decreases<sup>38</sup> in this parameter. However, the levels of IL-6 in PD patients apparently augment as the disease becomes more severe, both in terms of motor and nonmotor features, as shown by the positive correlations with the UPDRS scores I to III. We do not know if the plasma IL-6 levels are equivalent to the central nervous system concentrations, and indeed there was no correlation between the two fluids analyzed. However, it might be speculated that the association of plasma IL-6 levels with disease severity might indicate that systemic inflammation is related to the progression of PD.<sup>39</sup> Unfortunately, IL-6 is not evaluated in the PPMI data set, so this part of our study could not be replicated. Thus, further longitudinal studies are warranted to establish the role of IL-6 in the progression of the disease.

The diagnostic value of CSF biomarkers in PD is far from ideal. Although expectations have focused on several individual biomarkers, our findings suggest that a unique biomarker might not be the solution

TABLE 2. Summary of demographic, clinical, and biochemical characteristics of PD patients and controls of PPMI database

CSF	PD (n = 314)	Control (n = 111)	P Value	Adjusted P Value
Age (years)	61.3 ± 9.7	59.1 ± 11.5	0.051	
Sex (men)	203 (64.4%)	68 (61.3%)	0.523	
Disease duration (months)	6.9 ± 6.7	—		
Aβ1-42 (pg/mL)	374.0 ± 102.4	385.3 ± 75.1	0.054	0.120
T-Tau (pg/mL)	44.6 ± 18.0	43.8 ± 15.1	0.993	0.617
P-Tau (pg/mL)	15.9 ± 10.3	14.2 ± 6.5	0.329	0.446
T-Tau/Aβ1-42	0.1259 ± 0.06	0.1131 ± 0.02	0.126	0.490
P-Tau/Aβ1-42	0.0443 ± 0.036	0.0371 ± 0.014	0.030	0.088
α-synuclein (pg/mL)	1,836.9 ± 734.4	1,978.1 ± 796.5	0.109	0.066
T-Tau/α-synuclein	0.0256 ± 0.008	0.0234 ± 0.005	0.017	0.061
P-Tau/α-synuclein	0.00964 ± 0.008	0.00785 ± 0.0035	0.035	<b>0.030</b>
T-Tau/Aβ+α-synuclein	0.0207 ± 0.006	0.0191 ± 0.003	0.017	0.082
P-Tau/Aβ+α-synuclein	0.00768 ± 0.006	0.00640 ± 0.0027	0.020	<b>0.034</b>

Significant P values in bold

and that a combination of molecules related to different pathophysiological pathways could represent a better approach. Actually, longitudinal data suggest that  $\alpha$ -synuclein, tau, and an inflammatory marker in CSF increase as the disease progresses.<sup>40</sup> According to our study, the best diagnostic performance would be achieved by the P-Tau/ $\alpha$ -synuclein ratio alone and combined with TNF- $\alpha$ . Although  $\alpha$ -synuclein and tau are related to different pathological mechanisms, namely LB formation and the aggregation of abnormally phosphorylated tau, respectively, there is evidence that both proteins interact in several ways (see a previous work<sup>41</sup> for a review). The ratios obtained with  $\alpha$ -synuclein and tau could reflect their interaction, and therefore, their value as a biomarker of the specific neurodegeneration in PD could be higher.<sup>7</sup> This supposition is further supported by the fact that the addition of TNF- $\alpha$  to the P-tau/ $\alpha$ -synuclein ratio increases its diagnostic value, indicating the importance of different complementary pathophysiological mechanisms in PD. Indeed, the involvement of inflammation and microglia in the pathogenesis of PD has already been suggested.<sup>11,42</sup> Microglia enhance the release of TNF- $\alpha$  in response to cell damage, and, in turn, this provokes synaptic and mitochondrial dysfunction, as well as the accumulation of pathological proteins.<sup>43</sup> Therefore, it is not surprising that the addition of this protein to the P-tau/ $\alpha$ -synuclein ratio better distinguishes PD patients from the controls. Before this study, there was only one previous study into the use of a combined approach, showing that the complement 3/A $\beta$ 1-42 and factor H/A $\beta$ 1-42 ratios were higher in PD than in controls, yet without improving the diagnostic value of inflammatory proteins alone, which, in turn, rendered a low discrimination value.<sup>44</sup>

There are several limitations to this study that should be noted. The sample size of our own cohort is relatively small, which may have hampered the detection of differences in some of the proteins assessed. However, we carefully selected the patients with PD without dementia to avoid findings that might not be specific to PD, but that are rather associated with cognitive decline. In addition, we validated our results in the PPMI cohort where the ratio P-tau/ $\alpha$ -synuclein also differs between patients and controls. However, this ratio did not reach acceptable values in the ROC analysis to discriminate PD patients from controls. This discrepancy might be attributed to the different assay procedures used in this study and to differences in the cohorts of PD patients in the PPMI, which are de novo cases (mean disease duration: 6.9 months) and not treated with dopaminergic drugs, possibly biological confounders in the CSF analysis.<sup>10</sup> In addition, although less probable, the short disease duration potentially implies a poorer diagnostic accuracy.<sup>45</sup> In addition, our study focused on the difference between

PD and healthy subjects, and thus our results cannot be extrapolated to distinguish PD from other forms of parkinsonism or other neurodegenerative diseases. Hence, further studies will be necessary to assess these differences. Finally, several cytokines could not be detected in the CSF and/or plasma, probably attributed to the detection methods used given that IL-1 $\beta$ , IL-2, and IFN $\gamma$  have previously been detected in the CSF<sup>12,15,46</sup> and TNF- $\alpha$  in plasma<sup>35,47</sup> from PD patients using different assays. Nevertheless, to our knowledge, this is the first time that this specific multiplex panel has been used to measure cytokines in the CSF of PD patients. Moreover, the plasma levels of TNF- $\alpha$  may remain below the detection threshold in healthy controls or subjects with disorders that are not primarily inflammatory.<sup>48</sup>

In summary, our results indicate that the CSF P-Tau/ $\alpha$ -synuclein ratio alone, and combined with TNF- $\alpha$ , could represent a suitable biomarker for the diagnosis of PD. In addition, plasma IL-6 levels might represent a biomarker for disease severity. Further research on large samples with a longitudinal follow-up that includes pathologically confirmed PD, other forms of parkinsonism, and healthy controls is warranted to better define the specific role of these proteins in the diagnosis and progression of PD. ■

**Acknowledgments:** Some data from the Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI) database ([www.ppmi-info.org/data](http://www.ppmi-info.org/data)) was used to prepare this article. For up-to-date information on the study, visit [www.ppmi-info.org](http://www.ppmi-info.org).

PPMI—a public-private partnership—is funded by the Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research and other funding partners, including AbbVie, Avid Radiopharmaceuticals, Biogen, Bristol-Myers Squibb, Covance, GE Healthcare, Genentech, GlaxoSmithKline, Lilly, Lundbeck, Merck, Meso Scale Discovery, Pfizer, Piramal, Roche, Servier, Teva, UCSB, and Golub Capital.

## References

1. Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, Lees AJ. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* 2002;125(Pt 4):861-870.
2. Brooks DJ, Frey KA, Marek KL, et al. Assessment of neuroimaging techniques as biomarkers of the progression of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2003;184(Suppl 1):S68-S79.
3. Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rüb U. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol* 2002;249(Suppl 3):III/1-5.
4. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;388:839-840.
5. Berg D, Postuma RB, Adler CH, et al. MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord* 2015;30:1600-1611.
6. Parnetti L, Cicognola C, Eusebi P, Chiasserini D. Value of cerebrospinal fluid alpha-synuclein species as biomarker in Parkinson's diagnosis and prognosis. *Biomark Med* 2016;10:35-49.
7. Mollenhauer B, Locascio JJ, Schulz-Schaeffer W, Sixel-Doring F, Trenkwalder C, Schlossmacher MG. alpha-Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. *Lancet Neurol* 2011;10:230-240.
8. Parnetti L, Chiasserini D, Bellomo G, et al. Cerebrospinal fluid Tau/alpha-synuclein ratio in Parkinson's disease and degenerative dementias. *Mov Disord* 2011;26:1428-1435.

9. Halliday GM, Leverenz JB, Schneider JS, Adler CH. The neurobiological basis of cognitive impairment in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2014;29:634-650.
10. Mollenhauer B, Parnetti L, Rektorova I, et al. Biological confounders for the values of cerebrospinal fluid proteins in Parkinson's disease and related disorders. *J Neurochem* 2016;139(Suppl 1):290-317.
11. Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis* 2010;37:510-518.
12. Lindqvist D, Hall S, Surova Y, et al. Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease—associations with depression, fatigue, and cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 2013;33:183-189.
13. Scalzo P, Kummer A, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of interleukin-6 are elevated in patients with Parkinson's disease and correlate with physical performance. *Neurosci Lett* 2010;468:56-58.
14. Dobbs RJ, Charlett A, Purkiss AG, Dobbs SM, Weller C, Peterson DW. Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurol Scand* 1999;100:34-41.
15. Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1996;211:13-16.
16. Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 1995;202:17-20.
17. Parkinson Progression Marker Initiative. The Parkinson Progression Marker Initiative (PPMI). *Prog Neurobiol* 2011;95:629-635.
18. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:181-184.
19. Emre M, Aarsland D, Brown R, et al. Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007;22:1689-1707; quiz, 1837.
20. Gonzalez-Redondo R, Garcia-Garcia D, Clavero P, et al. Grey matter hypometabolism and atrophy in Parkinson's disease with cognitive impairment: a two-step process. *Brain* 2014;137(Pt 8):2356-2367.
21. Shi M, Bradner J, Hancock AM, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Ann Neurol* 2011;69:570-580.
22. Kang JH, Irwin DJ, Chen-Plotkin AS, et al.; Parkinson's Progression Markers Initiative. Association of cerebrospinal fluid beta-amyloid 1-42, T-tau, P-tau181, and alpha-synuclein levels with clinical features of drug-naïve patients with early Parkinson disease. *JAMA Neurol* 2013;70:1277-1287.
23. Toledo JB, Korff A, Shaw LM, Trojanowski JQ, Zhang J. CSF alpha-synuclein improves diagnostic and prognostic performance of CSF tau and Aβeta in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2013;126:683-697.
24. Parnetti L, Farotti L, Eusebi P, et al. Differential role of CSF alpha-synuclein species, tau, and Aβeta in Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* 2014;6:53.
25. Hall S, Ohrfelt A, Constantinescu R, et al. Accuracy of a panel of 5 cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of patients with dementia and/or parkinsonian disorders. *Arch Neurol* 2012;69:1445-1452.
26. Stav AL, Aarsland D, Johansen KK, Hessen E, Auning E, Fladby T. Amyloid-beta and alpha-synuclein cerebrospinal fluid biomarkers and cognition in early Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2015;21:758-764.
27. Wennstrom M, Surova Y, Hall S, et al. Low CSF levels of both alpha-synuclein and the alpha-synuclein cleaving enzyme neurosin in patients with synucleinopathy. *PLoS One* 2013;8:e53250.
28. Mollenhauer B, Trenkwalder C, von Ahsen N, et al. Beta-amyloid 1-42 and tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006;22:200-208.
29. Montine TJ, Shi M, Quinn JF, et al. CSF Aβeta(42) and tau in Parkinson's disease with cognitive impairment. *Mov Disord* 2010;25:2682-2685.
30. Parnetti L, Tiraboschi P, Lanari A, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies. *Biol Psychiatry* 2008;64:850-855.
31. Compta Y, Marti MJ, Ibarretxe-Bilbao N, et al. Cerebrospinal tau, phospho-tau, and beta-amyloid and neuropsychological functions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2009;24:2203-2210.
32. Alves G, Bronnick K, Aarsland D, et al. CSF amyloid-beta and tau proteins, and cognitive performance, in early and untreated Parkinson's disease: the Norwegian ParkWest study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:1080-1086.
33. Vranova HP, Henykova E, Kaiserova M, et al. Tau protein, beta-amyloid(1-42) and clusterin CSF levels in the differential diagnosis of Parkinsonian syndrome with dementia. *J Neurol Sci* 2014;343:120-124.
34. Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 1994;165:208-210.
35. Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, et al. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci Lett* 2008;441:158-162.
36. 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:e47387.
37. Tang P, Chong L, Li X, et al. Correlation between serum RANTES levels and the severity of Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2014;2014:208408.
38. Dursun E, Gezen-Ak D, Hanağasi H, et al. The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *J Neuroimmunol* 2015;283:50-57.
39. 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;73:1316-1324.
40. Hall S, Surova Y, Ohrfelt A, et al. Longitudinal measurements of cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2016;31:898-905.
41. Sengupta U, Guerrero-Munoz MJ, Castillo-Carranza DL, et al. Pathological interface between oligomeric alpha-synuclein and tau in synucleinopathies. *Biol Psychiatry* 2015;78:672-683.
42. Edison P, Ahmed I, Fan Z, et al. Microglia, amyloid, and glucose metabolism in Parkinson's disease with and without dementia. *Neuropsychopharmacology* 2013;38:938-949.
43. Clark IA, Alleva LM, Vissel B. The roles of TNF in brain dysfunction and disease. *Pharmacol Ther* 2010;128:519-548.
44. Wang Y, Hancock AM, Bradner J, et al. Complement 3 and factor h in human cerebrospinal fluid in Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and multiple-system atrophy. *Am J Pathol* 2011;178:1509-1516.
45. Ward CD, Gibb WR. Research diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1990;53:245-249.
46. Yu SY, Zuo LJ, Wang F, et al. Potential biomarkers relating pathological proteins, neuroinflammatory factors and free radicals in PD patients with cognitive impairment: a cross-sectional study. *BMC Neurol* 2014;14:113.
47. Menza M, Dobkin RD, Marin H, et al. The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Psychosomatics* 2010;51:474-479.
48. Raghupathy R, Haider MZ, Azizieh F, D'Souza TM, Abdelsalam R, Adekile AD. Tumor necrosis factor-alpha is undetectable in the plasma of SS patients with elevated Hb F. *Am J Hematol* 2000;64:91-94.

### ARTÍCULO III

**Exploratory study of the ratios of pathological proteins and cytokines in cerebrospinal fluid in cognitive decline and dementia in Parkinson's disease**

Manuel Manuel Delgado-Alvarado, Rosalía Dacosta-Aguayo, Irene Navalpotro-Gómez, Belén Gago, Ana Gorostidi, Haritz Jimenez-Urbieta, José F. Martí-Masso, Javier Ruiz-Martinez, Alberto Bergareche, María C. Rodríguez-Oroz

JAMA Neurology (en revisión)



**Exploratory study of the ratios of pathological proteins and cytokines in cerebrospinal fluid in cognitive decline and dementia in Parkinson's disease**

Manuel Delgado-Alvarado, MD<sup>1,\*</sup>, Rosalía Dacosta-Aguayo, PhD<sup>1,2</sup>, Irene Navalpotro-Gómez, MD<sup>1,2</sup>, Belén Gago, PhD<sup>1,2,†</sup>, Ana Gorostidi PhD<sup>1,2,3</sup>, Haritz Jimenez-Urbieta<sup>1,2</sup>, José F. Martí-Masso, MD, PhD<sup>1,2,4</sup>, Javier Ruiz-Martinez, MD, PhD<sup>1,2,4</sup>, Alberto Bergareche, MD<sup>1,2,4</sup>, María C. Rodríguez-Oroz, MD, PhD<sup>1,2,4,5,6</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Neurodegenerative Disorders Area, Biodonostia Health Research Institute, San Sebastián, Spain.

<sup>2</sup>Network Center for Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain.

<sup>3</sup>Genomics Platform, Biodonostia Research Institute, San Sebastián, Spain.

<sup>4</sup>Movement Disorders Unit, Department of Neurology, University Hospital Donostia, San Sebastián, Spain.

<sup>5</sup>Ikerbasque (Basque Foundation for Science), Bilbao, Spain.

<sup>6</sup>Basque Center on Cognition Brain and Language (BCBL), San Sebastián, Spain.

\*Current position at IDIVAL, University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain.

†Current position at Universidad de Málaga, Instituto de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, Málaga, Spain.

**Corresponding author:** Maria C Rodríguez-Oroz. Tel.: +34943006258; Fax: +34943005250; E-mail address: maria.rodriguezoroz@biodonostia.org

**Article content:** 28 pages; 3107 words; 37 references; 3 tables; 2 figures; 1 online text; 1 online table

**Running Title:** CSF protein ratios and dementia in Parkinson's disease

**Keywords:** Parkinson's disease, dementia, biomarkers, plasma IL-6, cerebrospinal fluid, cognition.

### **Key Points**

**Question:** What value have cerebrospinal fluid proteins and their relative ratios as biomarkers of cognitive decline and dementia in Parkinson's disease (PD)?

**Findings:** In a cross-sectional study of 40 PD patients and in a longitudinal study of 281 patients, the ratios of several proteins from pathological cerebral inclusions were associated with worse performance and a decline in global cognition and specific cognitive functions. Higher ratios were also associated with a 5-fold increase in the relative risk of dementia.

**Meaning:** The ratios of specific proteins in cerebrospinal fluid may be of value as biomarkers for dementia in PD.

## Abstract

**Importance:** There is a clear need for biomarkers that track or predict the progression of cognitive decline to dementia in Parkinson's disease (PD).

**Objective:** To determine if the level of CSF proteins and their ratios, and those of CSF and plasma cytokines, are associated with a worsening in cognition, or with progression to dementia in PD.

**Design:** A center-based cross-sectional study of PD patients recruited between January 2012 and 2015 and a longitudinal study of PD patients with 3-year follow-up in the framework of the Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI).

**Setting:** The center-based cohort was recruited at an institutional out-patients referral clinic. PPMI is an international multi-centric referral cohort.

**Participants:** A consecutive sample of non-demented PD patients and PD patients included in PPMI with a 3-year follow-up and baseline CSF values.

**Main Outcome(s) and Measure(s):** A $\beta$ 1-42, T-Tau, P-Tau and  $\alpha$ -synuclein in the CSF, and ratios among them were assessed, as were the cytokines in CSF and plasma, correlating these variables to the cognitive measures of global cognition (MoCA) and the different cognitive domains. The results of the first cohort were used to predict the decline in global or specific cognitive functions and the onset of dementia in the PPMI cohort.

**Results:** 40 PD patients (15 with mild cognitive impairment [PD-MCI], 25 cognitively normal [PDCN]) (mean [SD] age 71 [6] years, 28 male [70%]) were studied in the cross-sectional study. The ratios T-Tau/A $\beta$ 1-42 ( $r=-0.450$ ;  $p=0.018$ ) and T-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -synuclein ( $r=-0.501$ ;  $p=0.007$ ) correlated with the memory z score; T-Tau/ $\alpha$ -synuclein ( $r=-0.490$ ;  $p=0.003$ ) and P-Tau/ $\alpha$ -synuclein ( $r=-0.347$ ;  $p=0.007$ ) with the intersecting pentagons test score; T-Tau/ $\alpha$ -synuclein with the MoCA score ( $r=-0.432$ ;  $p=0.030$ ); and plasma IL-6 levels with the MoCA score ( $r=-0.429$ ;  $p=0.024$ ) and the language z-score ( $r=-0.553$ ;  $p=0.002$ ). 281 PD patients of the PPMI cohort were included (mean [SD] age 61 [9] years, 67.7% men) for longitudinal analysis. Values above the 4<sup>th</sup> quartile of the ratios T-Tau/A $\beta$ 1-42 (0.137), T-Tau/ $\alpha$ -synuclein (0.029) and T-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -synuclein (0.023) conferred a relative risk of developing dementia within three years of 5.26 (95% CI 1.61-14.77,

p=0.007), 5.26 (95% CI 1.61-14.77, p=0.007) and 5.36 (95% CI 1.64-14.99, p=0.006), respectively when compared to the patients in the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> quartiles.

**Conclusions and Relevance:** The ratios between the main neuropathological CSF proteins appear to be valuable as predictors of dementia and decline in specific cognitive domains in PD. IL-6 in plasma might also be associated to cognitive decline.

Dementia is one of the most disabling and frequent long-term problems in patients with Parkinson's disease (PD).<sup>1</sup> Prior to reaching the state of dementia, most of PD patients suffer a decline in their cognitive abilities that is referred to as mild cognitive impairment (PD-MCI), a condition that can encompass several types of cognitive deficits depending on the number and type of cognitive domains affected.<sup>2</sup> Not all PD-MCI patients develop dementia (PDD) and indeed, the risk factors for such ongoing cognitive decline in this population are not well known. Thus, although PD-MCI on its own is a risk factor for dementia<sup>3-8</sup>, there is a need to identify more reliable biomarkers that point to PD-MCI patients at higher risk of progressing to dementia in order to optimize their clinical care and to aid the development of disease-modifying treatments.

The detection in the cerebrospinal fluid (CSF) of the main proteins contained in the pathological inclusions of PDD<sup>9</sup> might provide a means to assess disease progression. Patients with PDD and PD patients who progressed to dementia generally have lower levels of amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ), yet high variability in the total tau (T-tau), Thr<sup>181</sup> phosphorylated tau (P-Tau) and  $\alpha$ -synuclein.<sup>10-17</sup> More heterogeneous values are obtained in PD-MCI patients, probably reflecting their clinico-pathological heterogeneity.<sup>17</sup> However, the ratios among these proteins have been little explored. There is evidence of a higher T-tau/A $\beta$ 1-42 ratio in PDD than in non-demented PD (PDND) patients,<sup>18</sup> and that P-tau/A $\beta$ 1-42 predicts a decline in memory and executive function in PDND patients.<sup>16</sup> Nevertheless, such parameters have not been explored in PD-MCI patients or in longitudinal cohorts. Moreover, although the extension of cortical Lewy bodies (LBs) is a key aspect in the pathophysiology of PDD, ratios between other proteins and  $\alpha$ -synuclein have not been assessed.

Inflammation also seems to participate in the pathogenesis of cognitive impairment in PD. Indeed, there is an increase in C reactive protein (CRP) in the CSF of PDD patients<sup>19</sup> and of IL-6 in PD-MCI patients<sup>20</sup>, as well as negative correlations between plasma IL-6 and TNF- $\alpha$  and global cognition scores.<sup>21, 22</sup>

In the light of this situation, this study set out to assess the levels of  $\alpha$ -synuclein, A $\beta$ 1-42, T-Tau and P-Tau in the CSF, as well as their respective ratios, and the CSF and plasma levels of cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ), in a cohort of PD patients with PD-MCI and cognitively normal (PDCN), in order to assess their value in the diagnosis of PD-MCI and the clinical subtypes of PD-MCI. Furthermore, we assessed whether the results obtained in this cohort could predict dementia, as well as global or specific cognitive decline in the Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI) database.

## **METHODS**

### **First cohort**

#### **Study participants**

This study was carried out on 51 PD patients<sup>23</sup> recruited from the Movement Disorders Unit at the University Hospital Donostia (Spain) between January 2012 and 2015. Patients with dementia,<sup>24</sup> depression, MRI abnormalities or other clinical conditions that could influence the cognitive outcome were excluded. The study was approved by the local ethics committee and written informed consent was obtained from all the subjects.

#### **Clinical examination**

The patients' non-motor and motor issues were evaluated with the Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS) Parts I, II, III and IV, and their daily living activities with the Interview for the Deterioration in Daily living activities in Dementia (IDDD). A neuropsychological evaluation was performed with the Mini Mental State Examination (MMSE) and Montreal Cognitive Assessment (MoCA) for global cognition, and with a comprehensive neuropsychological battery (eTable 1) for cognitive

domains for which a z score value was obtained by averaging the z scores of the individual tests that evaluate each domain. Given its predictive value in the progression to dementia, the intersecting pentagons copying item from the MMSE was used to evaluate visuospatial function and to explore potential associations with the CSF or plasma proteins.<sup>3,4</sup> Diagnosis of PD-MCI was achieved according to the MDS Task Force criteria (level II category<sup>2</sup> – see online text).

### **Sample collection and biomarker analyses**

CSF and blood samples were obtained after overnight fasting (online text), and while plasma was available from the whole PD cohort, CSF was only obtained from 40 of these PD patients. The T-Tau, P-Tau and A $\beta$ 1-42 peptide concentrations in CSF were determined using the Innostest ELISA kits (Fujirebio, Belgium), and total  $\alpha$ -synuclein was measured with the Alpha-Synuclein ELISA kit from Covance (Dedham, MA, USA; currently from BioLegend, San Diego, CA, USA), each according to the manufacturer's instructions. Hemoglobin was chosen as an index of the degree of red blood cell contamination of CSF, as reported previously,<sup>25</sup> and it was measured using a human hemoglobin ELISA quantitation kit from Bethyl Lab Inc (Montgomery, TX, USA). Samples with levels of hemoglobin above 200 ng/mL (5 patients) were excluded from the  $\alpha$ -synuclein analysis to avoid pre-analytical bias. Protein ratios were obtained by simple division between the protein concentrations, and the combined ratios were calculated by using the sum of A $\beta$ 1-42 +  $\alpha$ -synuclein as the denominator of the ratios.

Cytokine levels in CSF (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN and TNF- $\alpha$ ) were determined using multiplex technology from Luminex® (online text). The lower detection limits were: IL-1 $\beta$ , 0.16 pg/mL; IL-2, 0.19 pg/mL; IFN $\gamma$ , 0.17 pg/mL; IL-6, 0.18 pg/mL; TNF- $\alpha$ , 0.22. IL-6 and TNF- $\alpha$  in plasma were measured using the Quantikine ELISA kits for Human TNF- $\alpha$  and IL-6, respectively (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. The lower detection limits were 5.5 pg/mL for TNF- $\alpha$  and 0.7 pg/mL for IL-6.

### **PPMI cohort: data acquisition and management**

The PPMI is an international multicenter, prospective, longitudinal, observational study, designed to discover and validate biomarkers for progression of PD<sup>26</sup> (online text). On July 4th, 2016, data from 423 PD patients and 240 controls were obtained from the PPMI database, selecting patients with baseline values of A $\beta$ 1-42, T-Tau, P-Tau and  $\alpha$ -synuclein in the CSF, and whose cognitive state was assessed after a 3-year follow-up (n=281). At this point, the subjects were classified as PDND and PDD according to their MoCA score (dementia when score < 21).<sup>27</sup> Composite z scores were calculated for memory, and attention and working memory domains (online text). For other cognitive domains that were only assessed with one test (i.e.: Benton Judgement of Line Orientation for visuospatial and semantic fluency for language) the raw scores were used. The cognitive decline over the 3 years was calculated simply as the difference between the MoCA score, the z scores of the domains, or the raw scores of the tests at baseline and at the 3-year follow up visit. The baseline CSF values of A $\beta$ 1-42, T-Tau, P-Tau and  $\alpha$ -synuclein were used. According to our methodology, samples with hemoglobin levels above 200 ng/mL (106 patients) were excluded. Inflammatory cytokines in CSF or plasma are not available in this repository.

### **Statistical analysis**

Quantitative variables were compared with a T test or Mann-Whitney U test as appropriate and qualitative variables with a Chi-squared test. Potential confounders were controlled by introducing them as independent variables in a linear regression model. When the dependent variable was not normally distributed, a logarithmic transformation was performed. In order to assess the correlations between the protein levels or their ratios and cognition in the first cohort, a bivariate correlation analysis was performed. To confirm the association between the ratios of CSF proteins of interest with cognitive decline in the PPMI database, multiple regression models were built using the change in composite domain z scores or in the single test raw scores between three year follow up and baseline as the dependent variable, and CSF ratios of interest as predictor variables. Age and/or MoCA were entered as potential confounders when they were significant predictors in the univariate regression model. In addition, the relative risk of developing dementia was estimated by logistic regression and using the equation proposed by Zhang et al.<sup>28</sup> After categorizing the ratios of interest into

quartiles, the risk of developing dementia among patients of the higher quartile (4<sup>th</sup>) was computed relative to that of patients in the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> quartiles.

## RESULTS

### First cohort

#### Cerebrospinal fluid

The PD-MCI patients (n=25) studied were older (p=0.001) and less educated (p=0.01) than the PDCN patients (n=15), performing worse in several cognitive tests and domains (eTable 1). When adjusted by age, there were no differences between the two groups of patients in terms of the proteins assessed in the CSF or in their ratios (Table 1). The concentration of TNF- $\alpha$  was below the detection threshold in 7 patients (2 PD-MCI and 5 PDCN), although no differences were detected between the patients with undetectable and detectable levels of this protein (age, p=0.791; sex, p=0.649; cognitive status [PD-MCI or PDCN], p=0.999; disease duration, p=0.839; UPDRS-III, p= 0.619; total UPDRS, p=0.299). IL-1 $\beta$ , IL-2 and IFN- $\gamma$  were not detected in any subjects.

A correlation analysis (Figure 1A) of the levels of the proteins and their ratios with the z scores of the cognitive domains, with the MoCa score, and with the score of the intersecting pentagons, showed that when adjusted by age, the T-Tau/A $\beta$ 1-42 (r=-0.450; p= 0.018) and T-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -synuclein (r=-0.501; p=0.007) ratios were negatively correlated with the memory z score. Moreover, the T-Tau/ $\alpha$ -synuclein (r=-0.490; p=0.003) and P-Tau/ $\alpha$ -synuclein (r=-0.347; p=0.007) ratios were negatively correlated with the score of the intersecting pentagons, while the T-Tau/ $\alpha$ -synuclein ratio was also negatively correlated with the MoCA score (r=-0.432; p=0.012).

#### Plasma

As only TNF- $\alpha$  and IL-6 could be detected in the CSF, we focused on these proteins in plasma. Age-adjusted levels of IL-6 were not different between PDCN and PD-MCI patients (p=0.707) and the amounts of TNF- $\alpha$  were below the detection threshold (Table 1). When adjusted for age, the plasma IL-6 levels were negatively correlated with the MoCA score (r=-0.429; p=0.024) and the language z score (r=-0.553; p=0.002: Figure 1B).



## PPMI cohort

In this cohort, we studied whether the CSF ratios associated with cognitive deficits obtained in our cohort were useful to predict dementia, as well as a worsening in global cognition and in specific cognitive functions. After a 3-year follow-up (mean follow-up  $36 \pm 1$  months), 11 patients in the cohort were categorized as PDD and at baseline, these patients were older and had a lower MoCA score than those patients that remained without dementia (Table 2). The baseline T-Tau/A $\beta$ 1-42, T-Tau/ $\alpha$ -synuclein and T-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -synuclein ratios were higher in the PD patients that developed dementia, even after adjusting for age and MoCA score ( $p=0.001$ ,  $p=0.004$  and  $p<0.001$ ). In the linear regression model, the ratios of interest and age and/or MoCA were introduced as independent variables, and a decline in the MoCA score, in cognitive domains and in single tests were used as dependent variables. Whereas the T-Tau/A $\beta$ 1-42, T-Tau/ $\alpha$ -synuclein and T-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -synuclein ratios were independent predictors of a decline in MoCA scores ( $\beta=0.236$ ,  $p<0.001$ ;  $\beta=0.231$ ,  $p<0.001$ ;  $\beta=0.274$ ,  $p<0.001$ ; respectively) and in semantic fluency ( $\beta=0.176$ ,  $p=0.005$ ;  $\beta=0.126$ ,  $p=0.038$ ;  $\beta=0.147$ ,  $p=0.017$ ; respectively), only the T-Tau/A $\beta$ 1-42 ratio was a predictor of decline in the memory z score ( $\beta=0.141$ ;  $p=0.026$ : Table 3). The logistic models showed that patients in the higher quartile of the T-Tau/A $\beta$ 1-42 (ratio  $\geq 0.137$ ), T-Tau/ $\alpha$ -synuclein (ratio  $\geq 0.029$ ) and T-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -synuclein (ratio  $\geq 0.023$ ) ratios had a relative risk of developing dementia within three years of 5.26 (95% CI 1.61-14.77,  $p=0.007$ ), 5.26 (95% CI 1.61-14.77,  $p=0.007$ ) and 5.36 (95% CI 1.64-14.99,  $p=0.006$ ), respectively when compared to the patients in the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> quartiles (Figure 2).

## DISCUSSION

The present study evaluated the levels of proteins associated with pathological brain deposits present in PDD, and their ratios, in the CSF of PD patients without dementia, in two separate cohorts: a) a center-based cohort evaluated using a comprehensive neuropsychological battery to diagnose PD-MCI according to the MDS Task Force criteria (level II); and b), the PPMI cohort that includes early PD patients. This latter cohort was assessed in order to perform a longitudinal validation of the findings obtained in the first cohort. In addition, the cytokines in CSF and plasma were also assessed in the first of these cohorts.

Although in the initial cohort studied there were no differences between PD-MCI and PDCN patients in terms of any protein or ratio studied, negative correlations were evident between the T-tau/ $\alpha$ -synuclein ratio and global cognition (MoCA score), the T-Tau/A $\beta$ 1-42 and T-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -synuclein ratios and memory, and the ratios formed by both forms of tau (T-tau and P-tau) and  $\alpha$ -synuclein with visuospatial performance (copy of the pentagons). In the PPMI cohort, the baseline ratios formed by T-tau with either A $\beta$ 1-42,  $\alpha$ -synuclein or with A $\beta$ 1-42 and  $\alpha$ -synuclein were higher in patients who progressed to dementia after a 3 year follow-up than in non-demented patients. Moreover, these ratios at baseline were also independent predictors of a decline in global cognition (MoCA score) and in semantic fluency at 3 years, good predictors of dementia<sup>29</sup>. In addition, patients with values of these ratios in the fourth quartile had around a 5-fold higher risk of developing dementia after three years than patients with values in the 1<sup>st</sup> to 3<sup>rd</sup> quartiles. By contrast, only the ratios with A $\beta$ 1-42 predicted a worsening in memory, reinforcing our results.

In both cohorts the outcomes in terms of cognition are associated with the ratios among all studied proteins (T-tau,  $\alpha$ -synuclein and A $\beta$ 1-42) but not with the proteins alone. This suggests that cognitive impairment and dementia in PD is associated with AD and Lewy body pathology, as supported by pathological studies.<sup>9</sup> In addition, our results support the fact that PD-MCI is a heterogeneous clinico-pathological entity and that the cognitive evolution of PD is linked to the relative burden of the cerebral inclusions associated with dementia in PD.<sup>30</sup> The fact that ratios involving T-tau/A $\beta$ 1-42 (alone or plus  $\alpha$ -synuclein) are specifically correlated with memory in our cohort, along with its predictive value in memory decline in the PPMI, suggest that these ratios might represent a useful biomarker to identify specific types of PD-MCI (patients with concomitant Alzheimer's disease [AD] or AD pathological changes) possibly at higher risk of suffering dementia with significant memory decline.<sup>31, 32</sup> Interestingly, although T-Tau/ $\alpha$ -synuclein was not associated with the z score of visuospatial performance in the first cohort, or with the test assessing this function (Benton Judgement of Line Orientation Test) in the PPMI cohort, this ratio was negatively correlated with the execution of the intersecting pentagons, poor performance in which is a risk factor for dementia.<sup>3, 4</sup> This finding should be interpreted with caution, as although it might indicate a superior value of this test in the diagnosis of visuospatial dysfunction and dementia in close relationship with LB pathology,<sup>33</sup> confirmation is needed.

Taken together, our results indicate that the ratios studied here are related to the process of dementia,<sup>3, 4, 30</sup> and that different ratios may provide complementary information that could help achieve better sensitivity and specificity in detecting subtypes of PD-MCI at high risk of progressing to dementia in the short term. This is critically important as, to date, only low A $\beta$  levels in the CSF and Pittsburg Component B PET studies detecting cerebral A $\beta$  fibrils displayed some potential to detect early dementia among PD-MCI patients, albeit with a large degree of heterogeneity and poor predictive value.<sup>17</sup>

It is noteworthy that executive function and attention and working memory, which seem more closely related to dopaminergic deficits,<sup>34</sup> were not associated to any ratio in either cohort. This is also in consistent with clinical studies showing that although executive function is altered in a large proportion of PD-MCI patients,<sup>5</sup> it is the impairment in memory,<sup>31</sup> visuospatial activity (copy of pentagons in some studies)<sup>4, 29</sup> and semantic fluency<sup>29</sup> that is associated with progression to PDD.

Conversely, we found no difference in CSF or plasma IL-6 and TNF- $\alpha$  levels between PD-MCI and PDCN, nor any correlation of their CSF levels with cognitive performance. Our results are at odds with previous studies showing that CSF IL-6<sup>20</sup> was elevated in PDD<sup>19</sup> and PD-MCI patients,<sup>20</sup> and negatively correlated with global cognition.<sup>19, 20</sup> These discrepancies could be due to the cohort size or to the different methods used to quantify these proteins. However, plasma levels of IL-6 were negatively correlated with global cognition, in keeping with earlier data<sup>21</sup>, and with language outcome (z score of the domain). Interestingly, poor semantic fluency has a predictive value in the progression of cognitive decline to dementia in PD<sup>29, 35</sup> but unfortunately, we could not verify this hypothesis in the PPMI as cytokine levels are not available in this database.

### **Limitations**

Several limitations of this study should be noted. The sample size of the first cohort could hamper the identification of differences between PD-MCI and PDCN, although the heterogeneity of the PD-MCI population has also to be considered. However, to our knowledge this is the first study to evaluate the ratios of CSF proteins and to include  $\alpha$ -synuclein in these ratios as a candidate biomarker to identify patients with PD-MCI diagnosed according to the MDS diagnostic criteria, or to assess correlations with specific cognitive deficits. In addition, we validated our main results in the longitudinal PPMI

cohort, showing that some ratios among the CSF proteins may identify PD patients at higher risk of dementia even soon after PD diagnosis. A limitation in this part of the study is the low number of patients categorized as having PDD at follow-up (n=11), probably due to the short disease duration in this cohort. Nevertheless, the fact that even with such small numbers the ratios significant in the first cohort appeared to be correlated with cognitive outcomes could be regarded as strength of this data. Conversely, several cytokines could not be detected in CSF and plasma, which may be due to the detection method used that differed from that used in previous studies.<sup>19, 20, 22 36, 37</sup> Nevertheless, to our knowledge this is the first time that this specific multiplex panel is used to measure cytokines in CSF or plasma of PD patients.

## **CONCLUSIONS**

The results of this study suggest that the ratios formed by tau species, A $\beta$ 1-42 and  $\alpha$ -synuclein in CSF could improve the predictive value of each protein independently in the diagnosis of cognitive deficits, and that these may be useful as biomarkers for the progression of cognitive impairment in PD. In particular, T-Tau/A $\beta$ 1-42, T-Tau/ $\alpha$ -synuclein and T-Tau/ $\alpha$ -synuclein+A $\beta$ 1-42 might be useful to identify PD-MCI patients at high risk of progressing towards dementia and to identify subtypes of this evolution. Indeed, ratios with A $\beta$ 1-42 are more closely related to memory decline. We also timidly suggest that the copy of the pentagons and the ratios between tau and  $\alpha$ -synuclein might be sensitive tools in the study of visuospatial deficits. Plasma IL-6 might also be useful as a biomarker of cognitive impairment in PD. Further research in longitudinal studies is warranted to better define the utility of these ratios as true biomarkers of PD-MCI subtypes at high risk of dementia in the short to mid-term, and to clarify the relationship between IL-6 and cognition in PD.

## **Acknowledgements**

### **Authors' contributions**

Drs Delgado-Alvarado and Rodriguez-Oroz had full access to all the data in the study, and they take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Study concept and design:** Rodriguez-Oroz and Delgado-Alvarado.

**Acquisition, analysis, or interpretation of data:** Delgado-Alvarado, Gorostidi, Dacosta-Aguayo, Navalpotro-Gomez, Rodriguez-Oroz

**Drafting of the manuscript:** Delgado Alvarado and Rodriguez-Oroz

**Critical revision of the manuscript for important intellectual content:** Dacosta-Aguayo, Navalpotro-Gómez, Gago, Gorostidi, Jimenez-Urbieta, Ruiz-Martinez, Bergareche, Martí-Masso, Rodriguez-Oroz.

**Statistical analysis:** Delgado-Alvarado, Dacosta-Aguayo, Rodriguez-Oroz

**Study supervision:** Rodriguez-Oroz

#### **Conflict of interest disclosures**

Dr. Rodriguez-Oroz received honoraria for lectures, travel and accommodation to attend scientific meetings from Abbvie, TEVA and Boston Scientific, and she received financial support for her research from national and local government bodies in Spain (Institute of Health Carlos III, Basque Country Government, Diputacion Foral Guipuzcoa and CIBERNED).

Dr. Delgado-Alvarado received honoraria for travel and accommodation to attend scientific meetings from UCB.

#### **Funding/support**

This study was funded by Basque Country Government research grants (2011111074 and SAIOTEK 2012 S- PE12BN012).

Dr Delgado-Alvarado held a Basque Country Government Predoctoral Research Grant and received a research award from the Fundación Jesús de Gangoiti Barrera. Jimenez-Urbieta holds a Basque Country Government Predoctoral Research Grant.

Some data used to prepare this article were obtained from the Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI) database ([www.ppmi-info.org/data](http://www.ppmi-info.org/data)). For up-to-date information on the study, visit [www.ppmi-info.org](http://www.ppmi-info.org).

PPMI – a public-private partnership – is funded by the Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research and its funding partners, including Abbvie, Avid Radiopharmaceuticals, Biogen, Bristol-Myers Squibb, Covance, GE Healthcare, Genentech, Glaxo Smith Kline, Lilly, Lundbeck, Merck, Meso Scale Discovery, Pfizer, Piramal, Roche, Servier, Teva, UCB, Golub Capital.

## References

1. Hely MA, Reid WG, Adena MA, Halliday GM, Morris JG. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *Mov Disord.* Apr 30 2008;23(6):837-844.
2. Litvan I, Goldman JG, Troster AI, et al. Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines. *Mov Disord.* Mar 2012;27(3):349-356.
3. Williams-Gray CH, Mason SL, Evans JR, et al. The CamPaIGN study of Parkinson's disease: 10-year outlook in an incident population-based cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* Nov 2013;84(11):1258-1264.
4. Gasca-Salas C, Estanga A, Clavero P, et al. Longitudinal Assessment of the Pattern of Cognitive Decline in Non-Demented Patients with Advanced Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* Sep 10 2014.
5. Litvan I, Aarsland D, Adler CH, et al. MDS Task Force on mild cognitive impairment in Parkinson's disease: critical review of PD-MCI. *Mov Disord.* Aug 15 2011;26(10):1814-1824.
6. Janvin CC, Larsen JP, Aarsland D, Hugdahl K. Subtypes of mild cognitive impairment in Parkinson's disease: progression to dementia. *Mov Disord.* Sep 2006;21(9):1343-1349.
7. Pedersen KF, Larsen JP, Tysnes OB, Alves G. Prognosis of mild cognitive impairment in early Parkinson disease: the Norwegian ParkWest study. *JAMA Neurol.* May 2013;70(5):580-586.

8. Broeders M, de Bie RM, Velseboer DC, Speelman JD, Muslimovic D, Schmand B. Evolution of mild cognitive impairment in Parkinson disease. *Neurology*. Jul 23 2013;81(4):346-352.
9. Halliday GM, Leverenz JB, Schneider JS, Adler CH. The neurobiological basis of cognitive impairment in Parkinson's disease. *Mov Disord*. Apr 15 2014;29(5):634-650.
10. Mollenhauer B, Trenkwalder C, von Ahsen N, et al. Beta-amyloid 1-42 and tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2006;22(3):200-208.
11. Compta Y, Valente T, Saura J, et al. Correlates of cerebrospinal fluid levels of oligomeric- and total-alpha-synuclein in premotor, motor and dementia stages of Parkinson's disease. *J Neurol*. Feb 2015;262(2):294-306.
12. Montine TJ, Shi M, Quinn JF, et al. CSF Aβ(42) and tau in Parkinson's disease with cognitive impairment. *Mov Disord*. Nov 15 2010;25(15):2682-2685.
13. Compta Y, Ezquerra M, Munoz E, et al. High cerebrospinal tau levels are associated with the rs242557 tau gene variant and low cerebrospinal beta-amyloid in Parkinson disease. *Neurosci Lett*. Jan 7 2011;487(2):169-173.
14. Maetzler W, Liepelt I, Reimold M, et al. Cortical PIB binding in Lewy body disease is associated with Alzheimer-like characteristics. *Neurobiol Dis*. Apr 2009;34(1):107-112.
15. Siderowf A, Xie SX, Hurtig H, et al. CSF amyloid {beta} 1-42 predicts cognitive decline in Parkinson disease. *Neurology*. Sep 21 2010;75(12):1055-1061.
16. Liu C, Cholerton B, Shi M, et al. CSF tau and tau/Aβ42 predict cognitive decline in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. Mar 2015;21(3):271-276.
17. Delgado-Alvarado M, Gago B, Navalpotro-Gomez I, Jimenez-Urbieta H, Rodriguez-Oroz MC. Biomarkers for dementia and mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *Mov Disord*. May 19 2016.

18. Vranova HP, Henykova E, Kaiserova M, et al. Tau protein, beta-amyloid(1)-(4)(2) and clusterin CSF levels in the differential diagnosis of Parkinsonian syndrome with dementia. *J Neurol Sci.* Aug 15 2014;343(1-2):120-124.
19. Lindqvist D, Hall S, Surova Y, et al. Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease - Associations with depression, fatigue, and cognitive impairment. *Brain Behav Immun.* Jul 31 2013.
20. Yu SY, Zuo LJ, Wang F, et al. Potential biomarkers relating pathological proteins, neuroinflammatory factors and free radicals in PD patients with cognitive impairment: a cross-sectional study. *BMC Neurol.* 2014;14(1):113.
21. Scalzo P, Kummer A, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of interleukin-6 are elevated in patients with Parkinson's disease and correlate with physical performance. *Neurosci Lett.* Jan 1 2010;468(1):56-58.
22. Menza M, Dobkin RD, Marin H, et al. The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Psychosomatics.* Nov-Dec 2010;51(6):474-479.
23. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* Mar 1992;55(3):181-184.
24. Emre M, Aarsland D, Brown R, et al. Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. *Mov Disord.* Sep 2007;22(12):1689-707; quiz 1837. Review.
25. Shi M, Bradner J, Hancock AM, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Ann Neurol.* Mar 2011;69(3):570-580.
26. Parkinson Progression Marker I. The Parkinson Progression Marker Initiative (PPMI). *Prog Neurobiol.* Dec 2011;95(4):629-635.
27. Dalrymple-Alford JC, MacAskill MR, Nakas CT, et al. The MoCA: well-suited screen for cognitive impairment in Parkinson disease. *Neurology.* Nov 09 2010;75(19):1717-1725.



28. Zhang J, Yu KF. What's the relative risk? A method of correcting the odds ratio in cohort studies of common outcomes. *JAMA*. Nov 18 1998;280(19):1690-1691.
29. Williams-Gray CH, Foltynie T, Brayne CE, Robbins TW, Barker RA. Evolution of cognitive dysfunction in an incident Parkinson's disease cohort. *Brain*. Jul 2007;130(Pt 7):1787-1798.
30. Kehagia AA, Barker RA, Robbins TW. Cognitive impairment in Parkinson's disease: the dual syndrome hypothesis. *Neurodegener Dis*. 2013;11(2):79-92.
31. Muslimovic D, Schmand B, Speelman JD, de Haan RJ. Course of cognitive decline in Parkinson's disease: a meta-analysis. *J Int Neuropsychol Soc*. Nov 2007;13(6):920-932.
32. Williams-Gray CH, Evans JR, Goris A, et al. The distinct cognitive syndromes of Parkinson's disease: 5 year follow-up of the CamPaIGN cohort. *Brain*. Nov 2009;132(Pt 11):2958-2969.
33. Schneider JA, Arvanitakis Z, Yu L, Boyle PA, Leurgans SE, Bennett DA. Cognitive impairment, decline and fluctuations in older community-dwelling subjects with Lewy bodies. *Brain*. Oct 2012;135(Pt 10):3005-3014.
34. Siepel FJ, Bronnick KS, Booij J, et al. Cognitive executive impairment and dopaminergic deficits in de novo Parkinson's disease. *Mov Disord*. Dec 2014;29(14):1802-1808.
35. Pagonabarraga J, Kulisevsky J, Llebaria G, Garcia-Sanchez C, Pascual-Sedano B, Gironell A. Parkinson's disease-cognitive rating scale: a new cognitive scale specific for Parkinson's disease. *Mov Disord*. May 15 2008;23(7):998-1005.
36. Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. Jun 14 1996;211(1):13-16.
37. Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, et al. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci Lett*. Aug 22 2008;441(2):158-162.

## Tables

**Table 1.** Summary of the biochemical characteristics of PDCN and PD-MCI patients in the first cohort.

	PDCN (n=15)	PD-MCI (n=25)	p-value	Adjusted p-value
<b>CSF</b>				
<b>Aβ1-42, mean (SD), pg/mL</b>	703.5 (235.9)	756.7 (243.6)	0.503	0.968
<b>T-Tau, mean (SD), pg/mL</b>	206.1 (99.6)	246.9 (121)	0.248	0.678
<b>P-Tau, mean (SD), pg/mL</b>	41.9 (13.2)	49.2 (19.6)	0.335	0.926
<b>T-Tau/Aβ1-42, mean (SD)</b>	0.3208 (0.224)	0.3375 (0.1754)	0.317	0.710
<b>P-Tau/Aβ1-42, mean (SD)</b>	0.0647 (0.0279)	0.0670 (0.0284)	0.621	0.984
<b>α-synuclein, mean (SD), pg/mL<sup>a</sup></b>	903.8 (252.5)	947.8 (393.6)	0.714	0.879
<b>T-Tau/α-synuclein, mean (SD)<sup>a</sup></b>	0.2394 (0.09)	0.2467 (0.05)	0.178	0.289
<b>P-Tau/α-synuclein, mean (SD)<sup>a</sup></b>	0.0499 (0.009)	0.0506 (0.009)	0.929	0.789
<b>T-Tau/Aβ1-42+α-synuclein, mean (SD)<sup>a</sup></b>	0.1362 (0.06)	0.1351 (0.03)	0.447	0.321
<b>P-Tau/Aβ1-42+α-synuclein, mean (SD)<sup>a</sup></b>	0.0280 (0.007)	0.0274 (0.005)	0.776	0.549
<b>IL-6, mean (SD), pg/mL<sup>b</sup></b>	0.555 (0.24)	0.625 (0.33)	0.650	0.709
<b>TNF-α, mean (SD), pg/mL<sup>c</sup></b>	0.448 (0.16)	0.373 (0.15)	0.199	0.372
<b>IL-1β (pg/mL)</b>	Undetectable	Undetectable		
<b>IL-2 (pg/mL)</b>	Undetectable	Undetectable		
<b>IFNγ (pg/mL)</b>	Undetectable	Undetectable		
<b>PLASMA</b>				
<b>IL-6, mean (SD), pg/mL<sup>d</sup></b>	1.70 (1.4)	2.24 (2)	0.040	0.707
<b>TNF-α (pg/mL)</b>	Undetectable	Undetectable		

<sup>a</sup>PDCN (n=14; male 12; age 66.8 [6.5]), PD-MCI (n=21; male 16; age 74.4 [4.3]): p=0.001 for age and p=0.445 for gender.

<sup>b</sup>PDCN (n=14; male 12; age 66.9 [6.5]), PD-MCI (n=25; male 16; age 73.7 [4.5]): p=0.001 for age and p=0.148 for gender.

<sup>c</sup>PDCN (n=12; male 10; age 67.3 [6.3]), PD-MCI (n=20; male 12; age 74.1 [4.5]): p=0.001 for age and p=0.168 for gender.

<sup>d</sup>PDCN (n=21; male 15; age 67.3 [6.3]), PD-MCI (n=29; male 18; age 74.0 [4.4]): p<0.001 for age and p=0.490 for gender.

Abbreviations: CSF, Cerebrospinal fluid; PDCN, Parkinson's disease cognitively normal; PD-MCI, Parkinson's disease mild cognitive impairment.

**Table 2.** Summary of the baseline characteristics of PD patients in the PPMI study classified according to their cognitive status at the 3-year follow up.

	<b>PDND (n=270)</b>	<b>PDD (n=11)</b>	<b>p-value</b>
<b>Age, mean (SD), y</b>	60.9 (9.9)	67.2 (4)	<0.001
<b>Male sex, No. (%)</b>	173 (64.1%)	6 (54.5%)	0.519
<b>Education, mean (SD), y</b>	15.7 (2.9)	14.5 (2.5)	0.187
<b>Hoehn and Yahr, mean (SD)</b>	1.5 (0.5)	1.5 (0.5)	0.977
<b>UPDRS III, mean (SD)</b>	20.2 (8.6)	19.0 (5.9)	0.752
<b>MoCA, mean (SD)</b>	27.2 (2.1)	25.5 (2.8)	0.027
<b>CSF</b>			
<b>Aβ1-42, mean (SD), pg/mL</b>	374.2 (98.2)	326.7 (114.0)	0.342
<b>T-Tau, mean (SD), pg/mL</b>	43.8 (16.8)	60.2 (29.3)	0.072
<b>P-Tau, mean (SD), pg/mL</b>	15.8 (10.5)	16.2 (7.6)	0.509
<b>T-Tau/Aβ1-42, mean (SD)</b>	0.122 (0.06)	0.207 (0.12)	0.010
<b>P-Tau/Aβ1-42, mean (SD)</b>	0.044 (0.03)	0.056 (0.03)	0.151
<b>α-synuclein, mean (SD), pg/mL</b>	1833.4 (722.1)	1638.5 (455.2)	0.609

<b>T-Tau/<math>\alpha</math>-synuclein, mean (SD)</b>	0.0253 (0.007)	0.0367 (0.013)	0.004
<b>P-Tau/<math>\alpha</math>-synuclein, mean (SD)</b>	0.0096 (0.008)	0.0098 (0.003)	0.125
<b>T-Tau/A<math>\beta</math>1-42+<math>\alpha</math>-synuclein, mean (SD)</b>	0.0204 (0.005)	0.0305 (0.01)	0.003
<b>P-Tau/A<math>\beta</math>1-42+<math>\alpha</math>-synuclein, mean (SD)</b>	0.0077 (0.006)	0.0082 (0.002)	>0.999

Abbreviations: CSF, Cerebrospinal fluid; PDD, Parkinson's disease dementia; PDND, Parkinson's disease non-demented.

**Table 3.** Linear regression analysis of the main ratios as predictors of decline in global cognition, memory, attention and working memory, semantic fluency and Benton Judgement of Line Orientation test.

	UNIVARIABLE		MULTIVARIABLE	
	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value
<b>Change in MoCA</b>				
Age	0.229	<0.001		
Basal MoCA	0.309	<0.001		
T-Tau/A $\beta$ 1-42	0.295	<0.001	0.236	<0.001
T-Tau/ $\alpha$ -synuclein	0.237	<0.001	0.231	<0.001
T-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -synuclein	0.297	<0.001	0.274	<0.001
<b>Change in the MEMORY z score</b>				
Age	0.133	0.028		
Basal MoCA	-0.102	0.094		
T-Tau/A $\beta$ 1-42	0.169	0.005	0.141	0.026
T-Tau/ $\alpha$ -synuclein	0.056	0.357		
T-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -synuclein	0.097	0.113		
<b>Change in the ATTENTION AND WORKING MEMORY z score</b>				
Age	0.005	0.195		
Basal MoCA	0.089	0.159		
T-Tau/A $\beta$ 1-42	0.012	0.855		
T-Tau/ $\alpha$ -synuclein	-0.088	0.163		
T-Tau/A $\beta$ 1-42+ $\alpha$ -synuclein	-0.058	0.357		

<b>Change in semantic fluency</b>				
Age	0.125	0.038		
Basal MoCA	0.012	0.837		
T-Tau/AB1-42	0.198	0.001	0.176	0.005
T-Tau/ $\alpha$ -synuclein	0.141	0.020	0.126	0.038
T-Tau/AB1-42+ $\alpha$ -synuclein	0.166	0.006	0.147	0.017
<b>Change in Benton Judgement of Line Orientation</b>				
Age	0.093	0.124		
Basal MoCA	-0.077	0.203		
T-Tau/AB1-42	-0.021	0.723		
T-Tau/ $\alpha$ -synuclein	-0.064	0.292		
T-Tau/AB1-42+ $\alpha$ -synuclein	-0.051	0.401		

The multivariable models included age and/or MoCA score as covariates if they were significant predictors in the univariate analysis.

### Online-only Tables

**eTable 1. Summary of clinical, demographic and neuropsychological features of the first cohort.**

	<b>PDCN (n=15)</b>	<b>PD-MCI (n=25)</b>	<b>p value</b>
<b>Age, mean (SD), y</b>	66.6 (6.3)	73.7 (4.5)	<0.001
<b>Male sex, No. (%)</b>	12 (80%)	16 (64 %)	0.285
<b>Education, mean (SD), y</b>	14 (5)	8 (4)	<0.001
<b>Disease duration, mean (SD), y</b>	6 (2)	8 (4)	0.108
<b>Hoehn and Yahr, mean (SD), score</b>	2.1 (0.5)	2.4 (0.4)	0.185
<b>UPDRS I, mean (SD), score</b>	10.6 (6.7)	14.8 (4.8)	0.028
<b>UPDRS II, mean (SD), score</b>	14.2 (8.0)	18.2 (6.3)	0.090

<b>UPDRS III, mean (SD), score</b>	18.2 (7.1)	24.6 (7.4)	0.011
<b>UPDRS IV, mean (SD), score</b>	2.0 (4.0)	3.0 (3.5)	0.151
<b>LEDD, mean (SD), mg</b>	1041.2 (545.9)	1080.8 (484.9)	0.813
<b>IDDD, mean (SD), score</b>	34.47(10.6)	39.9 (6.7)	0.031
<b>MMSE, mean (SD), score</b>	28.4 (2.6)	27.2 (1.8)	0.010
<b>MoCA, mean (SD), score</b>	24.47 (5.43)	20.32 (3.77)	0.005
<b>Attention and working memory z score, mean (SD)</b>	-0.37 (0.41)	-1.52 (0.36)	<0.001
*SDMT, mean (SD), correct items	32.1 (6.8)	12.6 (6.7)	<0.001
*Digits backwards, mean (SD), max spam	4.0 (1.0)	3.3 (0.8)	<0.001
<b>Executive function z score, mean (SD)</b>	-0.35 (0.87)	-2.79 (1.40)	<0.001
*TMTB, mean (SD), secs	119.3 (59.0)	304.6 (118.8)	<0.001
*Phonemic fluency, mean (SD), words	14.6 (7.0)	10.0 (4.0)	0.013
<b>Memory z score, mean (SD)</b>	-0.58 (0.67)	-1.25 (0.76)	0.011
*RAVLT delayed, mean (SD), words	5.2 (2.6)	4.6 (2.7)	0.565
*RCFT immediate recall, mean (SD), score	15.2 (4.3)	8.8 (5.8)	0.001
<b>Language z score, mean (SD)</b>	0.18 (0.82)	-1.30 (1.09)	<0.001
*Semantic fluency, mean (SD), words	19.4 (6.2)	14.8 (4.9)	0.013
*BNT, mean (SD), correct items	52.7 (5.7)	45.0 (8.7)	0.004
<b>Visuospatial function z score, mean (SD)</b>	-0.54 (1.21)	-1.83 (1.69)	0.011
*Object decision (VOSP), mean (SD), correct items	15.9 (2.2)	13.6 (2.7)	0.011
*Number location (VOSP), mean (SD), correct items	8.5 (1.7)	7.3 (2.0)	0.047
<sup>a</sup> Copy of intersecting pentagons, frequency (%), score	0: 1 (6.7%) 1: 0 2: 14 (93.3%)	0: 3 (12%) 1: 6 (24%) 2: 16 (64%)	0.084

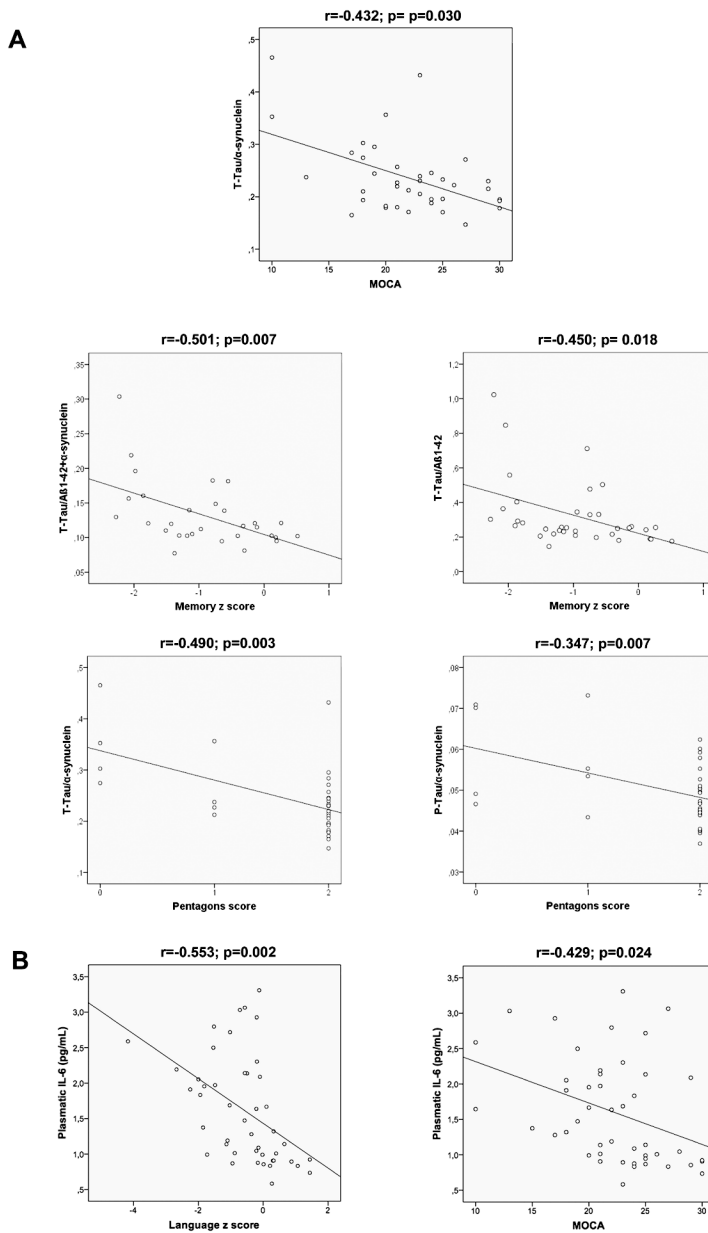
\*Test used for the diagnosis of MCI following MDS level II guidelines. Impairment in a neuropsychological test was considered when z score was  $\leq -1.5$  respect to the mean of control group.

<sup>a</sup>Scored using a 0-2 rating scale in which 2 points indicated that all 10 angles were present and the 2 pentagons were intersecting, 1 point indicated that the two intersecting figures were present and one of them had 5 angles, and 0 indicating a poorer performance than the first two cases (Ala, Hughes et al. 2001).

Abbreviations: BNT, Boston Naming Test; MMSE, Mini Mental State Examination; LEDD, Levodopa equivalent daily dose; IDDD, Interview for Deterioration in Daily Activities in Dementia; MOCA, Montreal Cognitive Assessment; RAVLT delayed, Rey Auditory Verbal Learning Test delayed recall; RCFT, Rey Complex Figure Test; SDMT, Symbol Digit Modality Test; TMTB, Trail Making test B; UPDRS, Unified Parkinson's Disease Rating Scale; VOSP, Visual Object and Space Perception Battery

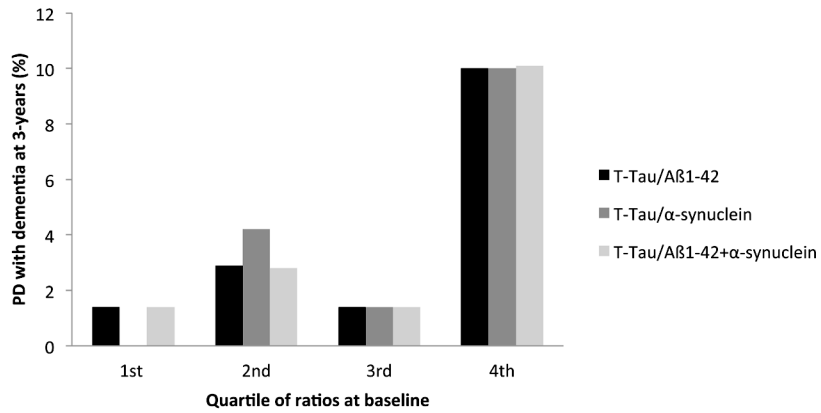
## Figure Titles and Legends (Captions)

**Figure 1.** (A) Correlation analysis between the CSF protein ratios and cognitive measures, and (B) between plasma IL-6 and cognitive measures.





**Figure 2.** Proportion of patients within each quartile of the interest ratios that progressed to dementia after the three year follow-up.



Ratio	4th quartile	RR	95% CI	p
T-Tau/Aβ1-42	0.137	5.26	1.61-14.77	0.007
T-Tau/α-synuclein	0.029	5.26	1.61-14.77	0.007
T-Tau/Aβ1-42+α-synuclein	0.023	5.36	1.64-14.99	0.006

## ARTÍCULO IV

### **Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and neuropathological proteins in Parkinson's disease and associated cognitive impairment**

Manuel Delgado-Alvarado, Belén Gago, Ana Gorostidi, Haritz Jiménez-Urbieta, Pablo  
Martínez-Lage, Andrea Izagirre, Silvia Paciotti, Lucilla Parnetti, Paolo Calabresi,  
Tommaso Beccari, and María C. Rodríguez-Oroz

Neurobiology of disease (en preparación)

**Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and neuropathological proteins in Parkinson's disease and associated cognitive impairment**

Manuel Delgado-Alvarado, MD<sup>1,2</sup>, Belén Gago, PhD<sup>1,2</sup>, Ana Gorostidi, PhD<sup>1</sup>, Haritz Jiménez-Urbieto<sup>1,2</sup>, Pablo Martínez-Lage, MD, PhD<sup>3</sup>, Andrea Izagirre<sup>3</sup>, Silvia Paciotti, PhD<sup>4</sup>, Lucilla Parnetti, MD, PhD<sup>5</sup>, Paolo Calabresi, MD, PhD<sup>5</sup>, Tommaso Beccari, PhD<sup>4</sup>, and María C. Rodríguez-Oroz, MD, PhD<sup>1,2,6,7,8</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Neurodegenerative Diseases Area, Biodonostia Health Research Institute, San Sebastián, Spain.

<sup>2</sup>CIBERNED, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, Madrid, Spain.

<sup>3</sup>CITA-Alzheimer Foundation, San Sebastián, Spain.

<sup>4</sup>Pharmaceutical Sciences, and <sup>5</sup>Dipartimento di Medicina Sezione di Neurologia, University of Perugia, Perugia, Italy

<sup>6</sup>Parkinson's Disease and Movement Disorders Unit, University Hospital Donostia, San Sebastián, Spain.

<sup>7</sup>BCBL, Basque Center on Cognition, Brain and Language, San Sebastián, Spain.

<sup>8</sup>Ikerbasque: Basque Foundation for Science, Bilbao, Vizcaya, Spain.

\*Current position at IDIVAL, University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain.

**Corresponding author:** Maria C Rodriguez-Oroz Tel.: +34943006258; Fax: +34943005250; E-mail address: maria.rodriguezoroz@biodonostia.org

**Article content:** 20 pages; 2897 words; 40 references; 2 tables; 1 image

## Abstract

Parkinson's disease (PD) diagnosis is based on clinical criteria. When the disease is diagnosed, the neurodegenerative process is rather advanced. In addition, non-motor manifestations such as cognitive impairment appear in a substantial proportion of patients and progresses to dementia in many of them. Mild cognitive impairment in PD (PD-MCI) has been shown to be a risk factor for the development of dementia. However, so far no biomarker for PD diagnosis or detection of PD-MCI has been validated. Abnormalities in autophagy have been linked to  $\alpha$ -synuclein aggregation, one of the neuropathological hallmarks of PD. The objective of the present study was to determine whether cerebrospinal fluid (CSF) activity of a set of lysosomal enzymes differed PD patients from controls and PD-MCI patients from those cognitively normal. In addition, we aimed to determine if there were any correlation between lysosomal activity and neuropathological proteins in CSF.

Activity of

$\beta$ -glucocerebrosidase,  $\beta$ -hexosaminidase,  $\alpha$ -fucosidase,  $\beta$ -galactosidase and cathepsin D was assessed in 41 PD patients and 41 controls.  $\alpha$ -synuclein, amyloid $\beta$ 1-42, total tau, and phosphorylated tau were studied in a subgroup of 37 patients. PD-MCI patients showed lower cathepsin D activity with respect to those cognitively normal ( $55.2 \pm 1.2$  vs.  $66.6 \pm 1.7$  pmol/min/mL;  $p=0.018$ ). In addition, higher cathepsin D activity correlated with higher motor and non-motor severity, and quality of life.  $\beta$ -hexosaminidase activity positively correlated with A $\beta$ 1-42 ( $\beta=0.372$ ;  $p=0.027$ ), T-Tau ( $\beta=0.578$ ;  $p=0.002$ ), and  $\alpha$ -synuclein ( $\beta=0.459$ ;  $p=0.028$ ) CSF levels. These results suggest that impaired lysosomal activity may link with aggregation of misfolded proteins and may be associated with cognitive impairment in PD. Further research is needed to delineate the value of these lysosomal enzymes as biomarkers of PD or cognitive impairment.

**Keywords:** Parkinson's disease, cognitive impairment, cerebrospinal fluid, lysosomes, biomarkers,  $\alpha$ -synuclein, beta amyloid, tau

## INTRODUCTION

The aggregation of  $\alpha$ -synuclein plays a central role in the pathogenesis of PD. Several mechanisms have been involved in the accumulation and aggregation of  $\alpha$ -synuclein. As many other intracellular proteins,  $\alpha$ -synuclein may be degraded by both the ubiquitin proteasome system and the autophagy system. Abnormalities of any of these systems may lead to the accumulation of  $\alpha$ -synuclein and, subsequently to LB formation (Cuervo et al., 2004). A compelling body of evidence suggests that autophagy dysfunction is critical in PD pathogenesis. Decreased autophagy activity has been observed in the *substantia nigra* (SN) of PD patients (Alvarez-Erviti et al., 2010) and the induction of autophagy may reduce  $\alpha$ -synuclein aggregation (Xilouri et al., 2013). Moreover, heterozygous mutations in the gene (*GBA*) of the lysosomal hydrolase glucocerebrosidase increase the risk of PD (Aharon-Peretz et al., 2004; Sidransky et al., 2009). Indeed, glucocerebrosidase activity is decreased in the SN of PD patients with *GBA* mutations and, interestingly, it is also reduced in patients with sporadic PD (Gegg et al., 2012). In addition to  $\alpha$ -synuclein, accumulation of misfolded amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) and tau (Alzheimer's disease pathology) are a frequent finding in PD brains (32%-44%), specially in patients with associated dementia (Galvin et al., 2006; Mattila et al., 1998; Sabbagh et al., 2009). Autophagy dysfunction has also been linked to the accumulation of these proteins (Ciechanover and Kwon, 2015).

Currently, PD diagnosis is based on the serial clinical examination of the cardinal features, which generally improve after dopaminergic treatment, and the absence of atypical features indicative of other forms of parkinsonism. However, neurologists generally diagnose PD accurately in about 75% of cases, although this improves to above 90% for movement disorder specialists (Hughes et al., 2002). Yet, when PD is diagnosed around 30% of dopaminergic neurons have been lost, suggesting that neurodegeneration is present years before the diagnosis (Cheng et al., 2010). On the other hand, PD is a rather heterogeneous

disease considering that there may be several motor endophenotypes and different forms of evolution. Of special relevance is the development of dementia, which takes place in 78% of patients at 8 years follow-up (Aarsland et al., 2003), given the deleterious consequences associated with it. Even at the time of diagnosis a substantial proportion of patients exhibit mild cognitive impairment (PD-MCI), which has been established as a risk factor for dementia (Litvan et al., 2011). Again, the diagnosis of PD-MCI relies on clinical and neuropsychological criteria (Litvan et al., 2012), which may introduce a significant variability in the classification of patients. In addition, not all patients diagnosed as PD-MCI develop dementia. Thus, the discovery of biomarkers both for aiding the diagnosis of PD and the detection of patients at higher risk of dementia remains as one of the main unmet needs in PD research.

Cerebrospinal fluid as a source of biomarkers has been extensively studied, yet results are inconclusive. In this setting, the CSF lysosomal enzymes activity has been scarcely studied in PD with varied results. Thus, whereas the activity of cathepsin E (van Dijk et al., 2013),  $\beta$ -galactosidase (van Dijk et al., 2013), and  $\beta$ -hexosaminidase (Parnetti et al., 2014) was increased, that of  $\alpha$ -fucosidase (van Dijk et al., 2013),  $\alpha$  and  $\beta$ -mannosidase (Balducci et al., 2007) and glucocerebrosidase (Balducci et al., 2007; Parnetti et al., 2014) was found to be lower.

As such, we set out to study the activity of  $\beta$ -glucocerebrosidase,  $\beta$ -hexosaminidase,  $\alpha$ -fucosidase,  $\beta$ -galactosidase and cathepsin D in the CSF of a cohort of PD patients and controls in order to assess their value for the diagnosis of PD or if they are associated with the severity of the disease or with cognitive impairment. In addition, we aimed to assess if lysosomal activity is associated with CSF levels of proteins involved in PD neuropathology:  $\alpha$ -synuclein, A $\beta$ 1-42, total tau (T-Tau), threonine-181 phosphorylated tau (P-Tau)

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study participants**

Forty one patients with PD (Hughes et al., 1992) were recruited from the Movement Disorders Unit of University Hospital Donostia, Spain. Exclusion criteria were dementia (Emre et al., 2007), depression, MRI abnormalities or other clinical conditions that could

impact cognitive outcome. Forty one healthy controls without neurological or psychiatric diseases and with normal cognition (MMSS $\geq$ 28) were obtained from CITA-Alzheimer Foundation, San Sebastián, Spain. The study was approved by the local ethics committee, and written informed consent was obtained from all subjects.

### **Clinical examination**

Motor and neuropsychological assessments in PD patients were undertaken under the effect of their habitual medication. The Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS) Parts I, II, III and IV, Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) and Parkinson's disease Questionnaire (PDQ-39) were used to evaluate non-motor and motor features, motor complications, and quality of life.

Neuropsychological evaluation was performed with the Mini Mental State Examination (MMSE) and MOCA for global cognition and with a comprehensive neuropsychological battery that included two tests per cognitive domain, as previously described (referencia del paper de cognicion). Diagnosis of PD-MCI was done according to the MDS Task Force criteria (level II category).

### **Sample collection and biomarker analyses**

CSF samples were obtained between 9 and 11 am after overnight fasting by lumbar puncture performed in the L4-L5 interspace. The first 2-3 mL were used for routine testing (cell count, total protein and glucose levels) to exclude relevant CSF abnormalities. Another 8-10 mL were collected in polypropylene tubes and centrifuged within 10 minutes from extraction at 2000g for 10 minutes. The supernatants were stored in polypropylene tubes at -80°C until ready for assay.

The activities of the lysosomal enzymes  $\beta$ -glucocerebrosidase,  $\beta$ -hexosaminidase,  $\alpha$ -fucosidase,  $\beta$ -galactosidase, and cathepsin D were measured using fluorogenic substrates, according to previously published procedures (Persichetti et al., 2014). For  $\beta$ -hexosaminidase and  $\alpha$ -fucosidase activities, 10mL of CSF were incubated with 40mL of the specific substrate solutions for 10 min at 37°C.  $\beta$ -glucocerebrosidase and  $\beta$ -galactosidase activities were measured by incubating 20 mL of CSF with 40 mL of the specific substrate solutions for 3 hrs. 0.2% taurodeoxicolic acid (TDC) was even added to  $\beta$ -glucocerebrosidase reaction mix. All the reactions were stopped by adding ice-cold 0.2 M

glycine-NaOH buffer, pH 10.4, to a final volume of 0.3 mL. The fluorescence of the liberated fluorophore (4-methylumbelliferone) was measured on a BMG LabtechFLUOstar OPTIMA fluorometer (excitation wavelength = 360 nm; emission wavelength = 446 nm). Cathepsin D activity was determined using Mca-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-NH<sub>2</sub> substrate. 30 mL CSF samples were incubated with the substrate for 90 min at 40°C. The reactions were stopped by adding 5% (w/v) trichloroacetic acid to a final volume of 0.3 mL. The fluorescence was measured by using an excitation wavelength of 328 nm and an emission wavelength of 393 nm. The protein concentration was determined using the Bradford's method (Bradford, 1976). All of the measurements were performed in triplicate. For all of the assays the acceptance specification for within-run coefficient of variation was fixed at less than 10%.

The concentrations of T-Tau, P-Tau and the A $\beta$ 1-42 peptide in the CSF were determined in a subgroup of patients using Innostest ELISA kits (Fujirebio, Belgium), and total  $\alpha$ -synuclein was assessed with the LEGEND MAX™ Human  $\alpha$ -Synuclein ELISA Kit (BioLegend, San Diego, CA, USA; previously Covance Dedham, MA, USA), in each case following the manufacturer's instructions. Hemoglobin was chosen to indicate the degree of red blood cell contamination in the CSF, as reported previously (Shi et al., 2011), and after diluting the samples 10-fold for analysis, it was measured using a human hemoglobin ELISA quantification kit (Bethyl Lab Inc., Montgomery, TX, USA). Samples with levels of hemoglobin above 200 ng/mL were excluded from the  $\alpha$ -synuclein analysis to avoid pre-analytical bias.

### **Statistical analysis**

Quantitative variables were compared with T test or Mann-Whitney U test as appropriate and qualitative variables with Chi-square test. Bivariate correlations were undertaken with Pearson or Spearman correlation coefficients, as appropriate. Age was entered as an independent variable in a lineal regression model as a potential confounder. When the dependent variable did not meet criteria for normality, a logarithmic transformation was undertaken. All the analyses were undertaken with SPSS v.22 (SPSS Inc., Chiacago, IL, USA).



## RESULTS

There were no correlation between total CSF proteins and any of the enzymes activity, so their values were not normalized. Although lysosomal activities were lower for all the studied enzymes in PD patients compared with controls, these differences were not statistically significant (Table 1). 24 PD patients had PD-MCI and the remaining 17 were cognitively normal (PDCN). PD-MCI patients were older and had less years of education than PDCN patients. Adjusting for age, cathepsin D activity was lower in PDCN patients as compared to those with PD-MCI ( $55.2 \pm 1.2$  vs.  $66.6 \pm 1.7$  pmol/min/mL;  $p = 0.018$ ) (Table 2).

A correlation analysis showed that, adjusted for age, cathepsin D activity positively correlated with UPDRS I ( $r=0.331$ ;  $p=0.024$ ), UPDRS IV ( $r=0.351$ ;  $p=0.022$ ), HADS ( $r=0.378$ ;  $p=0.019$ ), and PDQ-39 ( $r=0.330$ ;  $p=0.044$ ). On the other hand,  $\alpha$ -fucosidase negatively correlated with Hoehn and Yahr ( $-0.335$ ;  $p=0.021$ ) and PDQ-39 ( $r=-0.462$ ;  $p=0.002$ )

The subgroup of patients for which T-Tau, P-Tau and the A $\beta$ 1-42 peptide was available consisted of 37 patients (34 for  $\alpha$ -synuclein after excluding those with hemoglobine > 200 ng/mL). In a bivariate correlation analysis the activity of  $\beta$ -hexosaminidase positively correlated with A $\beta$ 1-42 levels and both  $\beta$ -hexosaminidase and  $\alpha$ -fucosidase activities positively correlated with the CSF levels of T-Tau, P-Tau, and  $\alpha$ -synuclein. As the activity of both enzymes had a positive correlation ( $r=0.606$ ;  $p<0.001$ ) they were introduced as independent variables together with age in a linear regression models with each protein. This showed that only the activity of  $\beta$ -hexosaminidase remained as independently associated with the levels of  $\alpha$ -synuclein ( $\beta=0.459$ ;  $p=0.028$ ) and T-Tau ( $\beta=0.578$ ;  $p=0.002$ ). The correlation with A $\beta$ 1-42 levels was only adjusted for age, remaining significant as well ( $\beta=0.372$ ;  $p=0.027$ ) (Figure 1).

## DISCUSSION

Although no differences have been disclosed in the CSF lysosomal activity of the set of enzymes studied between PD patients and controls, there are several findings in the present

work that may have relevance. 1) PD-MCI patients exhibit a higher cathepsin D activity than PDCN patients. 2) Cathepsin D and  $\alpha$ -fucosidase activities are associated with measures of disease severity in terms of motor and non-motor manifestations and quality of life. 3)  $\beta$ -hexosaminidase activity correlates with A $\beta$ 1-42, T-Tau, and  $\alpha$ -synuclein levels.

No differences were found between PD and controls. Previous works evaluating lysosomal enzymes in CSF exhibit rather heterogeneous results regarding different enzymes, with increases of cathepsin E (van Dijk et al., 2013),  $\beta$ -galactosidase (van Dijk et al., 2013), and  $\beta$ -hexosaminidase (Parnetti et al., 2014) activities, and reductions in the activity of  $\alpha$ -fucosidase (van Dijk et al., 2013),  $\alpha$  and  $\beta$ -mannosidase (Balducci et al., 2007) and glucocerebrosidase (Balducci et al., 2007; Parnetti et al., 2014) in PD patients. It is clearly established that mutations in the GBA gene are a risk factor for PD (Aharon-Peretz et al., 2004; Sidransky et al., 2009). In fact, the inhibition or down-regulation of  $\beta$ -glucocerebrosidase is associated with  $\alpha$ -synuclein deposition and mitochondrial dysfunction in cultured cells (Cleeter et al., 2013), which links with the finding of decreased  $\beta$ -glucocerebrosidase activity in the cerebellum and SN of PD patients (Gegg et al., 2012). Moreover, in post-mortem brain tissue of PD patients reduced glucocerebrosidase was associated with increased  $\alpha$ -synuclein (Murphy et al., 2014). Thus, low CSF activity of glucocerebrosidase may reflect deficiency of this enzyme at the cellular level in central nervous system. However, a more pronounced decrease was found in PD patients at earlier stages (Parnetti et al., 2014), which would be at odds with this idea, and raise the need for further studies. Our results do not confirm previous findings. Issues regarding the clinical features of the patient and control samples may always account for variability between studies. However, analytical procedures may be excluded as a source of variability as our study was performed in the same only laboratory as the previous cited works. Nevertheless, several pre-analytical factors have been shown to potentially affect the measurement of the activities of some lysosomal enzymes (Persichetti et al., 2014). Thus, the time-delay between sample extraction and centrifugation, the time delay until freezing storage, the duration of storage and the number of freezing-thaw cycles may influence the lysosomal activity. However, even when these factors may be different across studies, our PD patient and control samples were handled and stored under the same conditions, somehow controlling for these variability.

Cathepsin D activity positively correlated with UPDRS I and IV, HADS and PDQ-39, indicating that increasing levels are associated with increasing non-motor severity and motor complications of the disease and worse quality of life. Accordingly, PD-MCI patients exhibited higher cathepsin D activity than PDCN patients. This is, to the best of our knowledge, the first time that CSF lysosomal enzyme activity has been studied in relation to MCI in PD. Cathepsin D is an aspartic protease typically present in acid vacuolar compartments (Vidoni et al., 2016). It has been involved in  $\alpha$ -synuclein degradation via chaperon-mediated autophagy (Vidoni et al., 2016), and the lack of cathepsin D in mice produces extensive accumulation of endogenous  $\alpha$ -synuclein (Qiao et al., 2008). Thus, assuming that CSF cathepsin D activity reflects the intracellular enzyme activity, its increase could be a compensatory mechanism in an attempt to degrade misfolded  $\alpha$ -synuclein. However, cathepsin D proteolytic activity may also induce neuronal death. Following lysosome permeabilization, it leaks in the cytosol and triggers caspase-mediated apoptosis (Castino et al., 2007). In addition, lysosome permeabilization may be the consequence of lysosomal membrane lipid-peroxidation, which is associated with the generation of reactive oxygen species, a process largely known to be enhanced in PD (Sanders and Greenamyre, 2013). On the other hand, the accumulation of A $\beta$  oligomers in lysosomes has been shown to cause cathepsin D leakage and neuronal death (Umeda et al., 2011). So, the role of increased levels of cathepsin D in PD could range from an initial compensatory mechanism that at some point in the disease evolution turns into a deleterious mechanism that disrupt the cellular integrity and enhance the neurodegenerative process. Nevertheless further research to delineate this issue is warranted.

$\alpha$ -fucosidase activity negatively correlated with Hoehn and Yahr and PDQ-39, measures of disease severity and quality of life, respectively. The direction of this correlation, in which increasing levels are associated with decreased disease severity, is in keeping with a previous result showing lower activity of this enzyme in PD patients compared with controls (van Dijk et al., 2013).  $\alpha$ -fucosidase is involved in the degradation of fucose-containing glycoproteins and glycolipids. Apart from the severe neurological manifestations and neuropathological changes observed in human fucosidosis or in mice models of this disorder (Wolf et al., 2016), little is known about the role of  $\alpha$ -fucosidase in neurodegeneration. So far there is no in vitro or post-mortem evidence for a direct association between  $\alpha$ -fucosidase and Lewy body pathology. So the decrease of this enzyme could be in line with

reductions in other lysosomal enzymes observed in PD brains (Chu et al., 2009).

$\beta$ -hexosaminidase activity positively correlated with A $\beta$ 1-42, T-Tau, and  $\alpha$ -synuclein CSF levels. No previous study has reported correlations between lysosomal activity and proteins related to neuropathology in PD. Most of CSF studies in PD patients have disclosed reduced  $\beta$ 1-42 (Jimenez-Jimenez et al., 2014) and  $\alpha$ -synuclein levels (Gao et al., 2015; Zhou et al., 2015). These changes are understood as a surrogate measure of the neuropathological changes taking place in the brain of PD patients, namely an increase in the deposits of misfolded  $\alpha$ -synuclein and A $\beta$ 1-42. Indeed, it has been recently shown that antemortem CSF A $\beta$ 1-42 correlated with pathologically proven concomitant AD pathology in dementia with Lewy bodies (Brunnstrom et al., 2013).

Thus, according to our results, lower CSF activity of  $\beta$ -hexosaminidase, would be associated with a higher burden of pathological changes. Although  $\beta$ -hexosaminidase content has not been reported in neuropathological studies, *in vitro* and animal evidence suggest that this enzyme could be linked to neuropathological deposits. Interestingly, in mice models of lysosomal storage diseases caused by  $\beta$ -hexosaminidase deficiency, it has been shown that  $\alpha$ -synuclein accumulates in neurons, and induces dopaminergic neuronal loss (Cachon-Gonzalez et al., 2014; Suzuki et al., 2016). Moreover, both  $\alpha$ -synuclein and A $\beta$  deposits were found to accumulate in different regions of the substantia nigra of the same mouse model (Keilani et al., 2012). The association of  $\beta$ -hexosaminidase with tau CSF levels might follow the same reasoning, as phospho-tau-like immunoreactivity has been also observed in the brains of  $\beta$ -hexosaminidase knock-out mice (Keilani et al., 2012). However, it is not yet clear whether lower CSF tau levels reflect a higher burden of tau aggregation in PD brains given the heterogeneity of results (Andersen et al., 2017).

Several limitations should be noted. First, the relatively small sample size may account for the lack of differences between PD and controls. Second, the control sample lack of protein measurement in CSF, which did not allow us to assess correlations with lysosomal activity to know whether the associations found in PD patients are specific for the disease or they are present in healthy subjects.

## **Conclusions**

This is the first study to show differences in cathepsin D activity in the CSF of PD-MCI patients compared with PDCN patients. Further research is needed to confirm this result. As well, for the first time, correlations between increase in proteins involved in neuropathology in PD and decreased  $\beta$ -hexosaminidase activity in CSF of PD patients has been demonstrated. These findings reinforce the involvement of autophagy abnormalities in the pathological protein aggregation process in PD. Further studies involving correlation between CSF lysosomal activity and lysosomal content in neurons are needed to understand the meaning of CSF lysosomal activity abnormalities.

## **Funding Sources**

This work was supported by grants from the Institute of Health Carlos III (ISCIII: grants PI08/1539 and PI14/00763), the Government of the Basque Country (grants 2011111074 and SAIO12-PE12BN012) and CIBERNED. M.D-A. was funded by a Basque Country Ph.D. Studentship and Jesús de Gangoiti Barrera by a Foundation grant.

## **Disclosures**

P.M.-L. received honoraria for participating in lectures or advisory boards from Lilly, Piramal, General Electric and Nutricia. M.C.R-O. received honoraria for lectures, travel and accommodation to attend scientific meetings from AbbVie, TEVA and Boston Scientific.

## References

- Aarsland, D., et al., 2003. Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study. *Arch Neurol.* 60, 387-92.
- Aharon-Peretz, J., et al., 2004. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med.* 351, 1972-7.
- Alvarez-Erviti, L., et al., 2010. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch Neurol.* 67, 1464-72.
- Andersen, A. D., et al., 2017. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson's disease - a systematic review. *Acta Neurol Scand.* 135, 34-56.
- Balducci, C., et al., 2007. Lysosomal hydrolases in cerebrospinal fluid from subjects with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 22, 1481-4.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.
- Brunnstrom, H., et al., 2013. Correlations of CSF tau and amyloid levels with Alzheimer pathology in neuropathologically verified dementia with Lewy bodies. *Int J Geriatr Psychiatry.* 28, 738-44.
- Cachon-Gonzalez, M. B., et al., 2014. Reversibility of neuropathology in Tay-Sachs-related diseases. *Hum Mol Genet.* 23, 730-48.
- Castino, R., et al., 2007. Cathepsin D-Bax death pathway in oxidative stressed neuroblastoma cells. *Free Radic Biol Med.* 42, 1305-16.
- Ciechanover, A., Kwon, Y. T., 2015. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp Mol Med.* 47, e147.
- Cleeter, M. W., et al., 2013. Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage. *Neurochem Int.* 62, 1-7.
- Cuervo, A. M., et al., 2004. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science.* 305, 1292-5.
- Cheng, H. C., et al., 2010. Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Ann Neurol.* 67, 715-25.

- Chu, Y., et al., 2009. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol Dis.* 35, 385-98.
- Emre, M., et al., 2007. Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 22, 1689-707; quiz 1837.
- Galvin, J. E., et al., 2006. Clinical phenotype of Parkinson disease dementia. *Neurology.* 67, 1605-11.
- Gao, L., et al., 2015. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein as a biomarker for Parkinson's disease diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Neurosci.* 125, 645-54.
- Gegg, M. E., et al., 2012. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Ann Neurol.* 72, 455-63.
- Hughes, A. J., et al., 2002. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain.* 125, 861-70.
- Hughes, A. J., et al., 1992. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 55, 181-4.
- Jimenez-Jimenez, F. J., et al., 2014. Cerebrospinal fluid biochemical studies in patients with Parkinson's disease: toward a potential search for biomarkers for this disease. *Front Cell Neurosci.* 8, 369.
- Keilani, S., et al., 2012. Lysosomal dysfunction in a mouse model of Sandhoff disease leads to accumulation of ganglioside-bound amyloid-beta peptide. *J Neurosci.* 32, 5223-36.
- Litvan, I., et al., 2011. MDS Task Force on mild cognitive impairment in Parkinson's disease: critical review of PD-MCI. *Mov Disord.* 26, 1814-24.
- Litvan, I., et al., 2012. Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines. *Mov Disord.* 27, 349-56.
- Mattila, P. M., et al., 1998. Cortical Lewy bodies and Alzheimer-type changes in patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 95, 576-82.
- Murphy, K. E., et al., 2014. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased alpha-synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Brain.* 137, 834-48.
- Parnetti, L., et al., 2014. Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 29, 1019-27.

- Persichetti, E., et al., 2014. Factors influencing the measurement of lysosomal enzymes activity in human cerebrospinal fluid. *PLoS One*. 9, e101453.
- Qiao, L., et al., 2008. Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity. *Mol Brain*. 1, 17.
- Sabbagh, M. N., et al., 2009. Parkinson disease with dementia: comparing patients with and without Alzheimer pathology. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 23, 295-7.
- Sanders, L. H., Greenamyre, J. T., 2013. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radic Biol Med*. 62, 111-20.
- Shi, M., et al., 2011. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Ann Neurol*. 69, 570-80.
- Sidransky, E., et al., 2009. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 361, 1651-61.
- Suzuki, K., et al., 2016. Accumulated alpha-synuclein affects the progression of GM2 gangliosidosis. *Exp Neurol*. 284, 38-49.
- Umeda, T., et al., 2011. Intraneuronal amyloid beta oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J Neurosci Res*. 89, 1031-42.
- van Dijk, K. D., et al., 2013. Changes in endolysosomal enzyme activities in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 28, 747-54.
- Vidoni, C., et al., 2016. The Role of Cathepsin D in the Pathogenesis of Human Neurodegenerative Disorders. *Med Res Rev*. 36, 845-70.
- Wolf, H., et al., 2016. A mouse model for fucosidosis recapitulates storage pathology and neurological features of the milder form of the human disease. *Dis Model Mech*. 9, 1015-28.
- Xilouri, M., et al., 2013. Boosting chaperone-mediated autophagy in vivo mitigates alpha-synuclein-induced neurodegeneration. *Brain*. 136, 2130-46.
- Zhou, B., et al., 2015. The Diagnostic and Differential Diagnosis Utility of Cerebrospinal Fluid alpha -Synuclein Levels in Parkinson's Disease: A Meta-Analysis. *Parkinsons Dis*. 2015, 567386.



## Tables

**Table 1.** Demographic and clinical features, and CSF enzymatic activities of PD patients and controls.

	<b>PD (n=41)</b>	<b>Control (n=41)</b>	<b>p</b>
<b>Age (years)</b>	70.9 ± 5.7	69.1 ± 4.2	0.110
<b>Sex (men)</b>	27 (65.9%)	27 (65.9%)	>0.999
<b>Disease duration (years)</b>	7.8 ± 3.9	-	-
<b>Hoehn and Yahr</b>	2.2 ± 0.5	-	-
<b>UPDRS III</b>	22.3 ± 7.6	-	-
<b>β-hexosaminidase (pmol/min/ml)</b>	2444.7 ± 558.2	2482.9 ± 390.4	0.721
<b>α-fucosidase (pmol/min/ml)</b>	433.7 ± 148.1	443.4 ± 1014.3	0.731
<b>Cathepsin D (pmol/min/ml)</b>	61.9 ± 16.3	64.7 ± 14.3	0.386
<b>β-glucocerebrosidase (pmol/min/ml)</b>	6.1 ± 1.6	6.5 ± 1.4	0.308
<b>β-galactosidase (pmol/min/ml)</b>	6.1 ± 2.4	7.1 ± 2.4	0.062

**Table 2.** Demographic and clinical features, and CSF enzymatic activities of PD-MCI and PDCN patients.

	<b>PDCN (n=17)</b>	<b>PD-MCI (n=24)</b>	<b>p</b>
<b>Age (years)</b>	67.1 ± 5.9	73.6 ± 3.8	0.001
<b>Sex (men)</b>	13 (76.5%)	14 (58.3%)	0.228
<b>Disease duration (years)</b>	6.9 ± 3.0	8.5 ± 4.5	0.285
<b>Education (years)</b>	13 ± 5	8 ± 4	0.001
<b>H&amp;Y</b>	2 ± 0.4	2.4 ± 0.5	0.062
<b>UPDRS-III</b>	19.6 ± 7.9	24.2 ± 7	0.058
<b>MMSE</b>	28.2 ± 2.4	27.2 ± 1.9	0.028
<b>MOCA</b>	25.0 ± 5.0	20.0 ± 3.6	0.001
<b>β-hexosaminidase (pmol/min/ml)</b>	2362.1 ± 533.6	2503.2 ± 579.0	0.432

<b><math>\alpha</math>-fucosidase (pmol/min/ml)</b>	421.4 $\pm$ 93.5	442.4 $\pm$ 178.5	0.627
<b>Cathepsin D (pmol/min/ml)</b>	55.2 $\pm$ 12.0	66.6 $\pm$ 17.5	0.018*
<b><math>\beta</math>-glucocerebrosidase (pmol/min/ml)</b>	5.5 $\pm$ 1.2	6.5 $\pm$ 1.7	0.058
<b><math>\beta</math>-galactosidase (pmol/min/ml)</b>	5.8 $\pm$ 1.6	6.3 $\pm$ 2.8	0.460

Age-adjusted:  $p = 0.021$

### Figures

**Figure 1.** Correlation between  $\beta$ -hexosaminidase (pmol/min/ml) and CSF levels of  $\alpha$ -synuclein and A $\beta$ 1-42 levels

