



**Facultad de Medicina
Departamento de Medicina y Psiquiatría**

A 3D ribbon diagram of a protein structure is shown in the background. The structure is rendered in yellow and orange, with a blue ribbon tracing the path of the protein. The protein is a complex, multi-domain structure with several loops and helices. The title text is overlaid on a semi-transparent grey rectangular box in the center of the image.

**NIVELES SÉRICOS DE ÁCIDO ÚRICO Y
PROGRANULINA, FACTORES GENÉTICOS
QUE LOS REGULAN Y ENFERMEDAD DE
PARKINSON**

**TESIS DOCTORAL
ISABEL GONZÁLEZ ARAMBURU
SANTANDER, 2015**



FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA

TESIS DOCTORAL

**NIVELES SÉRICOS DE ÁCIDO ÚRICO Y PROGRANULINA,
FACTORES GENÉTICOS QUE LOS REGULAN Y
ENFERMEDAD DE PARKINSON**

Autora: Isabel González Aramburu

Directores: Dr. Jon Infante Ceberio

Dr. Onofre Combarros Pascual

Santander, 2015

D. Jon Infante Ceberio, Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, departamento de Medicina y Psiquiatría, y D. Onofre Combarros Pascual, Catedrático de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, departamento de Medicina y Psiquiatría

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “Niveles séricos de ácido úrico y progranulina, factores genéticos que los regulan y enfermedad de Parkinson” presentado por Dña. Isabel González Aramburu para optar al grado de Doctora en Medicina, ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Santander, a 25 de noviembre de 2015.

Prof. Jon Infante

Prof. Onofre Combarros

a Andrea, todo es mejor desde que tú llegaste

a Andrés, por hacer que fuese posible

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido directa o indirectamente en la realización de esta tesis, y me gustaría agradecer sinceramente su inestimable colaboración.

Mi primer agradecimiento va dirigido al Dr. Infante, mi director de tesis, quien confió en mí para introducirme en el mundo de la investigación y me ha apoyado en mis andaduras de beca en beca, siempre con su inmensa paciencia y dedicación. Jon, eres un ejemplo a seguir tanto en lo profesional como en lo personal, y espero poder seguir aprendiendo de ti muchos años más.

En segundo lugar a mi codirector, el Dr. Combarros, siempre dispuesto a echar ese último vistazo y ayudar a conseguir la perfección desde la sencillez.

Gracias al Dr. Berciano, jefe del Servicio de Neurología, que me ha permitido seguir formando parte de este grupo de profesionales tan fantástico que lidera, contra viento y marea, demostrando que la ilusión y la pasión por la Neurología pueden mantenerse hasta el final.

Esta tesis no podría haber salido adelante sin la colaboración y el apoyo de los Dres. Pascual Sánchez-Juan y María Sierra. Gracias, Pascual, por tu contribución al análisis estadístico y tu paciencia para explicármelo una y otra vez. Y a ti, María, por ir abriendo el camino y permitirme seguir tus pasos, transmitiéndome tu pasión por la enfermedad de Parkinson. Gracias a Coro Sánchez Quintana, técnico del laboratorio de Neurogenética, por enseñarme los secretos de un mundo nuevo para mí.

Mi más sincero agradecimiento para el resto de compañeros del Servicio de Neurología, por estar ahí en los momentos buenos y malos. En especial a Marta, mucho más que una secretaria, un miembro indispensable del Servicio para la que no existen problemas sin solución, un gran apoyo en los momentos más duros y la mejor compañía para el café de media mañana. Y al resto de las neurochicas, Andrea González Suárez y Ana Pozueta, por estar siempre dispuestas a permitirme desahogarme y echarme una mano.

Gracias a mi familia, que con su paciencia y apoyo me han ayudado a seguir adelante. Andrés, como siempre has conseguido que “quede bonito”, y has tenido que soportarme cuando ni yo misma lo hacía.

Y mi más sincero agradecimiento a todos los pacientes y sus familiares, que han colaborado de forma desinteresada y han conseguido hacer que me guste más mi trabajo.

Esta tesis doctoral ha sido cofinanciada por el Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL) gracias al Contrato Post-Mir Fin de Residencia (CFR 05/11), y por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) gracias a la Ayuda Predoctoral de Formación en Investigación en Salud (PFIS) (FI12/00229).

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
1. Aspectos generales de la enfermedad de Parkinson.....	5
2. Epidemiología	5
3. Etiología.....	6
4. Neuropatología.....	10
5. Manifestaciones clínicas	13
5.1. Manifestaciones motoras.....	13
5.2. Manifestaciones no motoras.....	15
5.2.1. Deterioro cognitivo y demencia asociada a la EP.....	16
5.2.1.a. Epidemiología de la EP-demencia	17
5.2.1.b. Manifestaciones clínicas de la EP-demencia	18
5.2.1.c. Criterios diagnósticos de la EP-demencia.....	20
5.2.1.d. Neuropatología de la EP-demencia.....	21
5.2.1.e. Etiopatogenia de la EP-demencia	24
5.2.1.f. Biomarcadores de deterioro cognitivo en la EP	24
6. Patogenia de la enfermedad de Parkinson.....	30
6.1. Disfunción sináptica.....	31
6.2. Disfunción mitocondrial	32
6.3. Estrés oxidativo.....	33
6.4. Fallo en los sistemas de degradación de proteínas.....	35
6.5. Mal plegamiento y patobiología de α -sinucleína	35
6.6. Neuroinflamación	37
6.7. Muerte neuronal mediada por apoptosis	38
7. El papel del ácido úrico en la neurodegeneración.....	39
7.1. Introducción	39
7.2. Funciones biológicas del ácido úrico	42
7.2.1. Ácido úrico y efecto antioxidante	42
7.2.2. Ácido úrico y neuroprotección	44
7.2.3. Ácido úrico y activación de respuestas inmunes e inflamatorias.....	45
7.3. El ácido úrico en la enfermedad de Parkinson	46
7.4. Ácido úrico y deterioro cognitivo	47
7.5. Factores genéticos reguladores de los niveles de ácido úrico	48
8. El papel de la progranulina en la neurodegeneración	55
8.1. Introducción	55
8.1.1. Mutaciones del gen <i>GRN</i>	56
8.2. Funciones biológicas de la progranulina.....	58
8.2.1. Funciones biológicas de la progranulina en el SNC	59
8.2.1.a. Expresión de progranulina en el cerebro.....	59
8.2.1.b. Funciones de progranulina en las neuronas	60

8.2.1.c. Funciones de progranulina en la microglía	63
8.3. La progranulina en la enfermedad de Parkinson	64
8.3.1. Mutaciones de <i>GRN</i> y enfermedad de Parkinson	65
8.3.2. Niveles séricos de progranulina y enfermedad de Parkinson	66
8.3.3. Niveles séricos de progranulina y <i>LRRK2</i>	67
8.4. Factores genéticos reguladores de los niveles de progranulina.....	68
II. HIPÓTESIS	75
1. Justificación del estudio.....	77
2. Hipótesis de trabajo.....	78
III. OBJETIVOS	79
IV. METODOLOGÍA.....	83
1. Pacientes.....	85
2. Valoración clínica	86
3. Análisis bioquímico y genético.....	86
3.1. Análisis bioquímico	86
3.2. Análisis genético	87
4. Análisis estadístico.....	87
V. RESULTADOS.....	89
1. Niveles séricos de AU y sus polimorfismos reguladores: efecto sobre el riesgo y fenotipo de la EP	91
1.1. Niveles séricos de AU en pacientes con EP y controles	92
1.2. Análisis de los SNPs reguladores de la uricemia sobre el riesgo de EP.....	93
1.3. Asociación entre los SNPs reguladores de la uricemia y los niveles de AU.....	94
1.4. Niveles séricos de AU en relación al fenotipo de la EP.....	96
1.4.1. Niveles séricos de AU en relación a la presencia de demencia en la EP	97
1.5. Asociación entre SNPs reguladores de la uricemia y el fenotipo de la EP	98
2. Niveles séricos de PGRN y sus polimorfismos reguladores: efecto sobre el riesgo y fenotipo de la EP.....	99
2.1. Niveles séricos de PGRN en pacientes con EP y controles	99
2.2. Análisis de los SNPs reguladores de los niveles séricos de PGRN sobre el riesgo de EP.....	100
2.3. Asociación entre los SNPs reguladores de PGRN y los niveles séricos de PGRN	101
2.4. Niveles séricos de PGRN en relación al fenotipo de la EP.....	102
2.4.1. Niveles séricos de PGRN en relación a la presencia de demencia en la EP ..	102
2.5. Asociación entre SNPs reguladores de los niveles séricos de PGRN y el fenotipo de la EP	103
VI. DISCUSIÓN	105
VII. CONCLUSIONES.....	117
VIII. BIBLIOGRAFÍA	121
IX. ANEXO	153

I. INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente y la causa más frecuente de parkinsonismo. Su hallazgo patológico fundamental es la formación de cuerpos de Lewy y la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *pars compacta* de la sustancia negra, con la consiguiente deficiencia de dopamina en la vía nigroestriatal (*Ehringer et al, 1960*).

Las manifestaciones clínicas más características de la EP son de naturaleza motora, siendo su forma típica de presentación la triada temblor de reposo, rigidez y bradicinesia y, eventualmente, la pérdida de los reflejos posturales. Se ha estimado que el inicio de la clínica motora requiere la pérdida de al menos el 60% de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (*Obeso et al, 2010*); se considera que hasta ese momento existe una hiperfunción compensadora de las neuronas remanentes en el estriado. El fracaso de dichos mecanismos compensadores sería el responsable de la aparición de las manifestaciones clínicas motoras.

Aunque tradicionalmente la EP ha sido considerada un trastorno del sistema motor, en los últimos años ha pasado a ser reconocida como una enfermedad mucho más compleja en la que, junto con la manifestaciones motoras, coexisten diversas manifestaciones de tipo no motor, atribuibles a lesiones cerebrales extranigricas. Entre dichas manifestaciones se encuentran la hiposmia, el trastorno de la conducta del sueño REM, el deterioro cognitivo, la disautonomía y los síntomas psiquiátricos, entre otros (*Langston, 2006*). En algunos pacientes, estos síntomas pueden preceder el inicio de las manifestaciones motoras hasta en más de 10 años.

2. EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Parkinson tiene una prevalencia aproximada del 0,3% en la población general >40 años y del 1-2% en >60 años (*De Lau y Breteler, 2006*). En base a estas cifras, se estima que aproximadamente 7,5 millones de personas en todo el mundo están afectas de EP. La prevalencia de la enfermedad aumenta con la edad, desde 41 casos por cada 100000 habitantes en el rango de edad de 40 a 49 años, hasta

1900 casos en personas de 80 o más años. La incidencia estimada varía desde 8 a 18,6 casos nuevos por cada 100000 habitantes (*Pringsheim et al, 2014*). La duración media de la enfermedad desde el diagnóstico hasta la muerte es de aproximadamente 15 años (*Lees et al, 2009*).

El aumento progresivo de la esperanza de vida en los países desarrollados es la responsable del aumento de la prevalencia de enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas en los últimos años, lo que representa un creciente problema socio-económico en estos países.

Aunque la prevalencia aumenta con la edad, existen formas de EP de inicio precoz. Se ha estimado que aproximadamente un 10% de los pacientes debutan antes de los 45 años. En una alta proporción de los casos, estas formas de inicio precoz son debidas a mutaciones genéticas, habiéndose observado una frecuencia de mutaciones de entre el 4% y el 16,6% en los pacientes con EP <50 años (*Macedo et al, 2009; Alcalay et al, 2010*).

La mayor parte de los estudios epidemiológicos encuentran una frecuencia ligeramente más alta en varones (*De Lau y Breteler, 2006; Pringsheim et al, 2014*), lo que sugiere que el sexo masculino podría ser un factor de riesgo de desarrollar EP.

3. ETIOLOGÍA

Aunque la causa de la enfermedad de Parkinson no es del todo conocida, en los últimos años se han realizado importantes avances en la comprensión de los mecanismos patogénicos subyacentes. Las evidencias señalan hacia un origen multifactorial, con la convergencia entre la susceptibilidad genética, los factores ambientales y la edad como desencadenantes del proceso neurodegenerativo (*Horowitz et al, 2010*).

▪ Edad

La edad es el factor de riesgo independiente más importante para el desarrollo y la progresión de la EP.

Afecta a múltiples procesos celulares que predisponen a la neurodegeneración. El acúmulo de daño somático asociado al envejecimiento, combinado con el fallo de los mecanismos de compensación, pueden conducir tanto a un aumento de la prevalencia como a una aceleración de la progresión de los síntomas con la edad (*Hindle, 2010*).

▪ Factores ambientales

Los factores ambientales que podrían modificar el riesgo de EP han sido ampliamente estudiados.

Numerosas evidencias sugieren que la exposición a pesticidas es un factor de riesgo para la EP (*Noyce et al, 2012*). Se han propuesto otros diversos posibles factores de riesgo, aunque las evidencias no son aún concluyentes (*Kieburz y Wunderle, 2013*).

También se han identificado algunos factores protectores que se asocian a un menor riesgo de EP, como el tabaquismo (*Noyce et al, 2012; Quik et al, 2012*), el consumo de cafeína (*Noyce et al, 2012*), la actividad física (*Thacker et al, 2008*) y el consumo de antiinflamatorios no esteroideos (*Samii et al, 2009; Rees et al, 2011*). Diversos trabajos han encontrado una asociación inversa entre los niveles séricos de algunos antioxidantes naturales, como el ácido úrico, y tanto el riesgo como la progresión de los síntomas en la EP, de modo que el ácido úrico podría constituir un factor protector endógeno para la enfermedad (*Davis et al, 1996; Ascherio et al, 2009*).

▪ Factores genéticos

Aunque la mayoría de los casos de EP parecen ser esporádicos, cada vez hay más evidencias de que los factores genéticos juegan un papel en la patogénesis de la enfermedad, sobre todo cuando la edad de inicio de los síntomas es menor de 50 años. De hecho, la existencia de antecedentes familiares de EP es uno de los principales factores de riesgo de desarrollar la enfermedad, multiplicando el riesgo hasta 3-4 veces (*Noyce et al, 2012*).

Los factores genéticos que pueden contribuir a la aparición de la EP, al igual que ocurre en otras enfermedades genéticamente determinadas, pueden ser de dos tipos: por un lado se encuentran las formas monogénicas de la enfermedad, causadas por

mutaciones de un único gen con un efecto grande sobre el riesgo de presentar la enfermedad. Estas formas representan una proporción muy pequeña de los casos de EP (5-10% de los casos), y se trata con frecuencia de formas familiares. Por otro lado, los estudios de asociación genómica (*Genome Wide Association* o GWAs) han permitido identificar numerosos polimorfismos en distintos genes que aparecen sobrerrepresentados en la población de pacientes con EP comparada con la población general, y tienen un efecto pequeño sobre el riesgo de la enfermedad. Un metaanálisis reciente de varios GWAs ha identificado y replicado 28 variantes genéticas de riesgo independientes de EP en 24 *loci* (Nalls et al, 2014).

El descubrimiento de las formas monogénicas de la EP ha permitido realizar importantes avances en el conocimiento de la patogenia de la enfermedad, ya que comparten muchas características bioquímicas, patológicas y clínicas con las formas esporádicas.

Durante la última década se han descrito hasta 18 *loci* relacionados con formas monogénicas de la enfermedad de Parkinson, habiendo sido identificado el gen responsable en la mayoría de ellos. La *Tabla 1* resume el listado de genes relacionados hasta la fecha con la EP y su patrón de herencia.

De todos ellos, la causa conocida más importante de EP son las mutaciones del gen *LRRK2* (*Leucine-rich repeat kinase-2*), habitualmente de tipo *missense*, que codifica para la proteína *lrrk2* o dardarina. La función de esta proteína multidominio no se conoce exactamente. Uno de los mecanismos de acción de la dardarina es su actividad como kinasa citoplásmica implicada en la fosforilación de proteínas. Entre sus posibles sustratos se ha investigado tanto a la proteína α -sinucleína como a tau (Zimprich et al, 2004). Las mutaciones de *LRRK2* se transmiten de forma autosómica dominante pero, debido a su reducida penetrancia, pueden dar lugar tanto a formas familiares como esporádicas de EP (Elbaz, 2008). Entre las mutaciones patogénicas de este gen, las más frecuentes son G2019S, R1441G o R1441C.

La mutación G2019S del gen *LRRK2* tiene una distribución mundial, es la mutación más frecuente y actualmente la causa conocida de EP más importante (Floris et al, 2009). Se localiza en el dominio MAP-kinasa y se postula que actúa a través de un

mecanismo de ganancia de función, ya que esta mutación introduce nuevos sitios de fosforilación de la proteína (*West et al, 2005*).

Tabla 1. Genes identificados asociados a formas monogénicas de EP.

PARK	Gen (proteína)	Locus	Herencia	Características clínicas
Establecidos				
PARK1/PARK4	<i>SNCA</i> (α -sinucleína)	4q21	AD	Inicio juvenil, características atípicas
PARK2	<i>Parkina</i>	6q25.2-q27	AR	Inicio juvenil con distonía, discinesias y disautonomía
PARK6	<i>PINK1</i>	1p35-36	AR	Inicio juvenil
PARK7	<i>DJ-1</i>	1p36	AR	Inicio juvenil
PARK8	<i>LRRK2</i> (Dardarina)	12q12	AD	Inicio edad media/tardío, respuesta a L-Dopa
PARK9	<i>ATP13A2</i>	1p36	AR	Parkinsonismo atípico de inicio precoz, piramidalismo, demencia, respuesta transitoria a L-Dopa
PARK14	<i>PLA2G6</i>	22q13.1	AR	Inicio edad adulta, distonía-parkinsonismo
Tentativos				
PARK3	?	2p13	AD	Inicio variable, demencia prominente
PARK5	<i>UCHL1</i>	4p14	AD?	Relevancia para EP desconocida
PARK10	?	1p32?	AD?	Inicio tardío
PARK11	<i>GIGYF2</i>	2q37	?	Relevancia para EP desconocida
PARK12	?	Xq21-q25?	Ligado al X	Inicio tardío
PARK13	<i>HTRA2</i> (Omi/HtrA2)	2p12	AD?	Relevancia para EP desconocida
PARK15	<i>FBXO7</i>	22q12-q13	AR	Inicio infancia, piramidalismo
PARK16	<i>PARK16</i>	1q32	?	Inicio tardío
PARK17	<i>VPS35</i>	16q11.2	AD	Inicio tardío
No asignado	<i>SNCAIP</i> (Sinfilina-1)	5q23.1-q23.3	?	Inicio tardío
No asignado	<i>NR4A2</i> (Nurr1)	2q22-q23	?	Inicio tardío
No asignado	<i>POLG</i> (DNA polimerasa gamma)	15q25	?	Inicio juvenil, neuropatía axonal
No asignado	<i>FGF20</i> (Factor de crecimiento fibroblástico 20)	8p22-p21.3	?	Inicio tardío

AD: Autosómico dominante; AR: Autosómico recesivo.

Uno de los aspectos más destacados de la mutación G2019S del gen *LRRK2* es que su penetrancia es incompleta y dependiente de la edad, lo que explica el hallazgo de esta mutación en un buen número de pacientes con enfermedad de Parkinson esporádica (*Brice, 2005*). Existen discordancias importantes entre los distintos estudios respecto a la penetrancia de esta mutación, con cifras variables desde el 30% hasta el 80% a los 80 años (*Goldwurm et al, 2007; Latourelle et al, 2008*). Estas diferencias se deben fundamentalmente a que su prevalencia es muy variable en las distintas etnias y en las diferentes áreas geográficas, lo que no permite que los estudios realizados hasta la fecha sean fácilmente comparables. Por tanto, la penetrancia real de la mutación permanece desconocida en la actualidad, y se desconocen los factores de los que depende. Diversos estudios han demostrado que la mutación es especialmente prevalente en algunas

poblaciones del norte de África, donde se consideran responsables de aproximadamente el 40% de los casos de EP familiar y esporádico (*Benamer et al, 2008*), seguida en frecuencia de la población de judíos Ashkenazi (15%) (*Thaler et al, 2009*).

En los últimos años, en Cantabria se han realizado sistemáticamente estudios genéticos en los pacientes con EP familiar y esporádica, encontrando una frecuencia de la mutación G2019S de *LRRK2* de aproximadamente el 9% de todos los casos de EP (*Infante et al, 2006*). Esta frecuencia es significativamente superior a la observada en otras regiones de España, así como en la inmensa mayoría de los países europeos, lo que sitúa a Cantabria como la tercera población mundial, después de los judíos Ashkenazi y los árabes del norte de África, en términos de frecuencia de esta mutación. Recientemente se ha llevado a cabo un estudio para determinar la penetrancia de esta mutación en esta población, encontrando una prevalencia de EP del 2% a los 50 años, 12% a los 60 años, 26% a los 70 años y 47% a los 80 años (*Sierra et al, 2011*).

Como se ha reflejado previamente, además de las mutaciones de genes directamente relacionados con la EP deben existir otros factores genéticos y ambientales que expliquen, por un lado, los casos esporádicos y, por otro, la gran variabilidad en la edad de inicio y en la penetrancia en los casos familiares, en particular aquellos relacionados con la mutación G2019S.

4. NEUROPATOLOGÍA

El hallazgo neuropatológico más característico de la EP es la pérdida de neuronas dopaminérgicas que contienen neuromelanina en la *pars compacta* de la sustancia negra, que se acompaña de despigmentación de este núcleo y gliosis. Se estima que la aparición de los primeros síntomas motores de la enfermedad requiere la pérdida de, al menos, el 60% de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (*Obeso et al, 2010*). La región de la sustancia negra que se afecta de forma más temprana en la EP es la parte ventrolateral, que proyecta hacia el putamen dorsal, lo que se traduce en una depleción progresiva de dopamina en el putamen (*Porritt et al, 2005*).

El otro hallazgo histopatológico característico de la enfermedad es la presencia de inclusiones en el citoplasma o en las neuritas de las neuronas supervivientes. Las

inclusiones intraneuronales pueden ser de tres tipos: las neuritas de Lewy, los cuerpos pálidos y los cuerpos de Lewy. Tanto las neuritas como los cuerpos de Lewy son agregados de diversas proteínas normales, proteínas anormalmente plegadas y residuos de ubiquitina (*Wakabayashi et al, 2007*). Los cuerpos pálidos se consideran los precursores de los cuerpos de Lewy típicos. El componente principal de estas inclusiones es la proteína α -sinucleína (*Wakabayashi et al, 2013*).

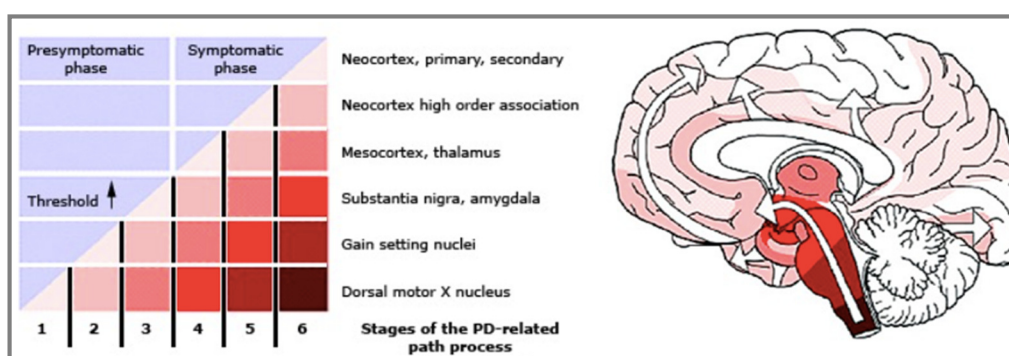
Los cuerpos de Lewy no son exclusivos de esta enfermedad y pueden aparecer en otras entidades neurológicas, como la enfermedad de Alzheimer (EA) o los parkinsonismos atípicos, y hasta en el 10-30% de las personas sanas de edad avanzada (*Adler et al, 2010*). El hallazgo neuropatológico de cuerpos de Lewy en sujetos que no cumplen criterios de EP se conoce como enfermedad por cuerpos de Lewy incidental, y su relevancia clínica no está clara. Por otra parte, a pesar de ser considerados el hallazgo neuropatológico fundamental en la EP, los cuerpos de Lewy pueden estar ausentes en algunas formas monogénicas de la enfermedad, como en la mayoría de los casos de EP asociada a la mutación de *Parkina* (*Mori et al, 1998*).

Los procesos patológicos de la enfermedad afectan también a estructuras extranigricas (*Jellinger, 2012*). Aunque la sustancia negra se considera la diana principal de la degeneración en la EP, ésta no es la primera estructura en la que aparecen los cambios patológicos. Basándose en el patrón temporal de aparición de los depósitos de α -sinucleína y la tendencia a la progresión caudo-rostral de las lesiones patológicas y de los síntomas característicos de la enfermedad se propuso estadiar, desde un punto de vista práctico, el proceso neuropatológico en seis etapas, conocidas como estadios de Braak (*Braak et al, 2004*) (*Figura 1*):

- Estadio 1: Aparición de cuerpos y neuritas de Lewy en el núcleo dorsal del vago del bulbo raquídeo y en estructuras olfatorias anteriores.
- Estadio 2: Aumento de las lesiones en el núcleo dorsal del vago y afectación de estructuras del puente (núcleos del rafe, formación reticular y *locus coeruleus*).
- Estadio 3: Aumento de las lesiones del estadio 2 y afectación de estructuras del mesencéfalo (*pars compacta* de la sustancia negra) y subnúcleos centrales de la amígdala.
- Estadio 4: Lesiones en mesocórtex temporal y cuerno de Ammon.

- Estadio 5: Lesiones más severas en mesocórtex temporal y neocórtex temporal.
- Estadio 6: Aumento en la severidad y extensión de las lesiones del neocórtex temporal.

Figura 1. Estadios en el desarrollo de las alteraciones neuropatológicas asociadas a la EP (adaptada de *Braak et al, 2004*).



Según la teoría propuesta por Braak, la afectación de las distintas estructuras en cada uno de los estadios explicaría las diferentes manifestaciones clínicas asociadas a la EP. Así, los estadios 1 y 2 se corresponderían con la fase premotora de la enfermedad, y se correlacionan clínicamente con la hiposmia y el trastorno de la conducta del sueño REM. Los estadios 3 y 4 corresponderían al inicio de la fase motora de la enfermedad, y los estadios 5 y 6 se correlacionarían con el rango completo de los síntomas de la enfermedad, incluyendo la aparición de deterioro cognitivo. Una extensión posterior de esta hipótesis sugirió que la sinucleinopatía se desarrollaría inicialmente fuera del SNC, afectando en primer lugar al bulbo olfatorio y/o los plexos entéricos, y se extendería después desde estas localizaciones hasta el cerebro. De este modo, se explicarían algunos de los síntomas no motores o preclínicos de la enfermedad, como la hiposmia, el estreñimiento y la disfunción autonómica (*Hawkes et al, 2007*).

La validez y utilidad predictiva de los estadios de Braak ha sido ampliamente cuestionada. Algunos estudios han puesto de manifiesto una falta de correlación entre los hallazgos patológicos y algunas de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, lo que sugiere que puede no existir una relación directa entre la presencia de cuerpos de Lewy en determinadas estructuras y la alteración funcional de las mismas. Además, la

presencia de cuerpos de Lewy incidentales dispersos afectando incluso al córtex en sujetos sanos de edad avanzada no apoyaría dicha hipótesis de progresión caudo-rostral de la patología. Algunos autores apuntan la posibilidad de que se trate de un proceso multicéntrico desde el inicio (*Parkkinen et al, 2005*).

5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

5.1. Manifestaciones motoras

Las manifestaciones principales de la EP son de tipo motor. Los síntomas motores cardinales son el temblor, la rigidez, la bradicinesia y la inestabilidad postural en etapas más avanzadas. La forma típica de presentación es unilateral, haciéndose bilateral habitualmente a lo largo del curso de la enfermedad, aunque suele mantenerse un cierto grado de asimetría con afectación predominante del hemicuerpo en el que se iniciaron los síntomas.

En la actualidad no existe ningún test de laboratorio ni de neuroimagen para confirmar el diagnóstico de la enfermedad, de modo que el diagnóstico de la EP es clínico, y se basa generalmente en los criterios establecidos por el Banco de Cerebros del Queen Square de Londres (*Lees et al, 2009*):

- Bradicinesia
- Al menos uno de los siguientes:
 - Rigidez muscular
 - Temblor
 - Inestabilidad postural no atribuible a disfunción visual, vestibular, cerebelosa o propioceptiva

Otras características clínicas que apoyan el diagnóstico de EP son la excelente respuesta a levodopa, el inicio unilateral, la presencia de temblor de reposo y la persistencia de la asimetría a lo largo del curso de la enfermedad (*Hughes et al, 1992*).

La severidad de los síntomas motores parece ser un factor de riesgo independiente de mortalidad en la EP (*Forsaa et al, 2010*).

Además de los síntomas cardinales, existen otras numerosas manifestaciones motoras que aparecen con frecuencia durante el curso de la enfermedad, algunas de ellas secundarias a las propias manifestaciones cardinales. A nivel craneofacial, son frecuentes la hipomimia facial, la reducción del parpadeo espontáneo, alteraciones del lenguaje como la disartria hipocinética, la hipofonía o la palilalia, y la disfagia. También son comunes las alteraciones visuales, como la borrosidad visual, la alteración en la percepción de los colores, las sacadas hipométricas, la alteración del reflejo vestibuloocular, la alteración de la supravversión de la mirada y la convergencia y la apraxia para la apertura ocular. En los pacientes parkinsonianos pueden aparecer numerosos trastornos musculoesqueléticos durante el curso de la enfermedad, como la anteroflexión del tronco, que en su grado más severo es conocida como camptocormia, la cifosis o la escoliosis. Es característica la aparición de otros trastornos del movimiento, como la distonía o las mioclonías.

En función de las manifestaciones motoras predominantes durante el curso de la enfermedad se han establecido cuatro subtipos clínicos de la enfermedad (*Zetuský et al, 1985; Jankovic et al, 1990*):

- Fenotipo tremórico o tembloroso
- Fenotipo rígido-acinético
- Fenotipo mixto
- Inestabilidad postural y dificultad para la marcha (PIGD o *postural instability and gait difficulty*)

Los diferentes fenotipos se han correlacionado con la progresión y el pronóstico de la enfermedad, de modo que las formas tremóricas tienen, en general, una evolución más lenta y una menor incidencia de trastornos neuropsicológicos, mientras que las formas rígido-acinéticas y PIGD presentan una progresión más rápida y un mayor riesgo de desarrollar demencia (*Rajput et al, 2009; Williams-Gray et al, 2013*). Aunque existen algunas alteraciones neuroquímicas diferenciales entre estas variantes fenotípicas (*Rajput et al, 2009*), se desconoce cuáles son los factores de los que dependen estos fenotipos. Además, existe una gran variabilidad en la progresión clínica de la EP, y los subtipos pueden cambiar en un mismo individuo a lo largo de la enfermedad. Por tanto, la clasificación de los pacientes en función del fenotipo no

permite predecir con precisión, desde un punto de vista práctico, el curso de la enfermedad en un paciente concreto.

El grado de afectación motora de la enfermedad se determina mediante escalas motoras. Las más utilizadas en la actualidad, tanto en la práctica clínica habitual como desde el punto de vista de la investigación, son la escala de Hoehn y Yahr (H&Y) (Hoehn y Yahr, 1967) y la *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* parte III (UPDRS-III) (Fahn et al, 1987).

La escala H&Y y su versión modificada describen la progresión de los síntomas en la EP, permitiendo clasificar a los pacientes en un estadio del 0 (asintomático) al 5 (incapacidad total) en función de la distribución y severidad de los síntomas.

La escala UPDRS-III es un sistema de clasificación diseñado para el seguimiento longitudinal clínico de los pacientes con EP, y evalúa cada uno de los síntomas motores de forma individual asignando una puntuación a cada ítem que varía desde 0 (normal o ausente) a 4 (grave).

5.2. Manifestaciones no motoras

Aunque la EP se ha considerado tradicionalmente una enfermedad que afectaba al sistema motor, hoy la entendemos como una enfermedad más compleja y extensa que abarca numerosas manifestaciones clínicas de tipo no motor, presentes en una buena parte de los pacientes (Barone et al, 2009). Entre los síntomas no motores más frecuentes se incluyen los siguientes:

- Deterioro cognitivo y demencia
- Trastornos neuropsiquiátricos, como alucinaciones y psicosis
- Trastornos del ánimo, principalmente depresión, ansiedad y apatía/abulia
- Trastornos del sueño, que incluyen insomnio, somnolencia diurna excesiva, trastorno de la conducta del sueño REM (TCREM), síndrome de piernas inquietas (SPI) y movimientos periódicos de las extremidades durante el sueño
- Fatiga
- Disfunción autonómica, incluyendo urgencia/frecuencia urinaria, estreñimiento, hipotensión ortostática, disfunción sexual y diaforesis

- Hiposmia
- Trastornos gastrointestinales, principalmente el estreñimiento
- Dolor y trastornos sensitivos
- Alteraciones dermatológicas, como la seborrea
- Sialorrea

Los síntomas no motores, particularmente las manifestaciones neuropsiquiátricas, pueden ocasionar más discapacidad que los propios síntomas motores, y pueden ser más difíciles de tratar (*Politis et al, 2010*).

Algunos síntomas no motores, como la disfunción olfatoria, el estreñimiento, la depresión o el TCREM, pueden preceder al inicio de los síntomas motores (*Langston 2006*). La hiposmia está presente en más del 80% de los pacientes con EP, y se ha observado que puede aparecer hasta 5-10 años antes que los síntomas motores en algunos pacientes (*Ross et al, 2008*). El TCREM es el marcador clínico que se asocia con un mayor riesgo de enfermedad neurodegenerativa, principalmente de sinucleinopatía; aproximadamente un 40% de los sujetos con TCREM desarrollan EP o demencia por cuerpos de Lewy a los 5 años de seguimiento (*Postuma et al, 2015*). El estreñimiento se asocia a un incremento de riesgo de EP de 2-5 veces, y es un marcador de riesgo muy temprano que puede preceder a la EP en más de 15 años (*Abbott et al, 2007*). La depresión es un síntoma común, presente en aproximadamente un 30% de los casos. Los pacientes diagnosticados de EP tienen una prevalencia de depresión incrementada hasta 3 veces en los 5 años previos al diagnóstico, y puede preceder al diagnóstico de la enfermedad hasta en más de 15 años (*Fang et al, 2010*).

5.2.1. Deterioro cognitivo y demencia asociada a la EP

La presencia de deterioro cognitivo es frecuente en la enfermedad de Parkinson, y su severidad es variable. Su prevalencia aumenta con la duración del trastorno motor. Cuando es muy severa, supone la principal causa de discapacidad y mortalidad, por encima de las alteraciones motoras.

Aunque la EP puede coexistir con otras causas comunes de demencia, como la enfermedad de Alzheimer o la demencia vascular, el deterioro cognitivo leve y la

demencia asociada a la EP se consideran parte de la enfermedad. Las características clínicas de la demencia permiten habitualmente distinguir entre la demencia asociada a la EP y otras formas de demencia asociadas a trastornos del movimiento, como la demencia por cuerpos de Lewy o la degeneración corticobasal. Sin embargo, en la actualidad todavía es objeto de debate si la EP-demencia y la demencia por cuerpos de Lewy son enfermedades distintas o representan diferentes presentaciones clínicas de la misma enfermedad.

5.2.1.a. Epidemiología de la EP-demencia

La prevalencia global de demencia en la EP es de aproximadamente el 30%, y comprende un 3,6% de todos los casos de demencia en la población general (*Aarsland et al, 2005*).

En estudios prospectivos, la incidencia de demencia en pacientes con EP se estima en unos 100 casos por cada 1000 habitantes/año, unas 5-6 veces mayor que en sujetos sin EP (*Aarsland et al, 2001; Hobson y Meara, 2004*). La incidencia acumulativa de demencia durante el curso de la enfermedad es del 80% (*Aarsland et al, 2003; Hely et al, 2008; Halliday et al, 2008*).

El deterioro cognitivo leve (DCL), definido como una disfunción cognitiva en ausencia de un déficit funcional suficiente para el diagnóstico de demencia, también es común en la EP, y puede estar presente incluso hasta en un tercio de los casos en el momento del diagnóstico de la enfermedad (*Foltnie et al, 2004; Muslimovic et al, 2005*). El DCL afecta principalmente a tareas de atención, memoria verbal, función ejecutiva y visuoespacial, y tiende a progresar con la evolución de la enfermedad. Por tanto, incluyendo el período de deterioro cognitivo previo a la progresión de demencia, una proporción muy alta de pacientes con EP presentan déficits cognitivos durante la mayor parte del curso de su enfermedad, lo que tiene importantes implicaciones socio-sanitarias.

Se han descrito numerosos factores de riesgo que influyen en la aparición de demencia en pacientes con EP (*Hughes et al, 2000; Anang et al, 2014; Zhu et al, 2014*):

- Edad avanzada

- Edad de inicio de la enfermedad ≥ 60 años
- Sexo masculino
- Duración de la enfermedad
- Severidad de los síntomas parkinsonianos, principalmente de la rigidez y la bradicinesia
- Deterioro cognitivo leve al inicio de los síntomas parkinsonianos
- Trastorno de la conducta del sueño REM
- Disfunción autonómica cardiovascular (cifras elevadas de tensión arterial basal e hipotensión ortostática)
- Síntomas psiquiátricos: alucinaciones visuales y trastorno depresivo
- Alteración en la discriminación de los colores
- Alteración de la marcha

5.2.1.b. Manifestaciones clínicas de la EP-demencia

▪ Alteraciones cognitivas

El deterioro cognitivo asociado a la EP tiene un perfil muy heterogéneo, lo que probablemente sea debido a la heterogeneidad de la neuropatología subyacente. A diferencia de la disfunción cognitiva en la EA, la demencia asociada a la EP se ha considerado clásicamente como una demencia subcortical, con un predominio de la disfunción ejecutiva y visuoespacial, un déficit de memoria menos prominente y la función del lenguaje relativamente preservada (*Muslimovic et al, 2005; Emre et al, 2007*).

La disfunción ejecutiva aparece con frecuencia en estadios iniciales del curso de la enfermedad, y se manifiesta por alteraciones en la alternancia de tareas, en la atención y en la planificación. También se encuentran frecuentes alteraciones en los tests de reconocimiento de caras, una medida de función visuoespacial, en fases tempranas de la enfermedad. Otras medidas de disfunción visuoespacial pueden detectarse en pacientes con cuadros más severos, principalmente en aquellos que cumplen criterios de demencia. Todos estos déficits pueden alterar significativamente el rendimiento funcional de los pacientes antes incluso de cumplir criterios de demencia.

Los déficits de memoria, aunque menos prominentes que en la EA, aparecen en la demencia asociada a la EP, aunque parecen estar relacionados con una alteración en la recuperación de la información aprendida que puede mejorar con pistas.

La demencia en la EP no se caracteriza, a diferencia de la EA, por un déficit del lenguaje intrínseco pero, con frecuencia, se objetivan dificultades en el procesamiento del lenguaje que se ha atribuido a la disfunción ejecutiva (*Grossman et al, 2012*).

Algunos autores proponen que la disfunción ejecutiva en la EP es un fenómeno temprano resultante de la alteración del tono dopaminérgico en el córtex frontal. Por el contrario, los déficits en la función visuoespacial y la memoria semántica serían debidos a las alteraciones neuropatológicas que aparecen más tardíamente en los córtex temporal y parietal, y estos “síntomas posteriores” conferirían un riesgo incrementado de progresión a demencia (*Williams-Gray et al, 2009*).

Las características de la disfunción cognitiva en la EP-demencia son similares y, con frecuencia, indistinguibles de las que aparecen en la demencia por cuerpos de Lewy (*Emre et al, 2007*), lo que apoya la hipótesis de que ambas enfermedades constituyen espectros diferentes del mismo trastorno.

▪ Síntomas neuropsiquiátricos

En la EP pueden aparecer una amplia variedad de alteraciones neuropsiquiátricas y conductuales. Aunque muchos de estos síntomas pueden estar presentes en sujetos sin demencia, su frecuencia aumenta a medida que lo hace la severidad del deterioro cognitivo. En un estudio se observó que el 89% de los pacientes con EP-demencia presentaban al menos un síntoma neuropsiquiátrico, y en el 60% este síntoma tenía una relevancia clínica significativa (*Aarsland et al, 2007*). Entre dichas manifestaciones neuropsiquiátricas se incluyen las alucinaciones visuales (*Aarsland et al, 2007*), los delirios (*Friedman 2010*), el trastorno ansioso-depresivo (*Aarsland et al, 2007*) y las alteraciones del sueño (*Marion et al, 2008*).

La presencia de alucinaciones visuales se asocia fuertemente con disfunción cognitiva y con un mayor riesgo de progresión a demencia (*Zhu et al, 2014; Wang et al, 2014*).

La depresión puede ser un factor predictivo de desarrollo de deterioro cognitivo (Riedel *et al*, 2010).

El TCREM está presente con mayor frecuencia en pacientes con EP y demencia (Marion *et al*, 2008). En sujetos sin demencia, se asocia a mayores tasas de disfunción cognitiva (Vendette *et al*, 2007).

5.2.1.c. Criterios diagnósticos de la EP-demencia

La *Movement Disorders Society (MDS) Task Force* propuso en 2007 unas recomendaciones para establecer el diagnóstico de demencia asociada a EP en las categorías de “posible” y “probable”, basándose en dos niveles: el Nivel 1 consiste en una serie de tests cognitivos de fácil aplicación que no requieren una particular experiencia en métodos neuropsicológicos y permite establecer la presencia o ausencia de demencia; el Nivel 2 tiene como objetivo definir el patrón y la severidad de la afectación cognitiva, y precisa de una evaluación neuropsicológica más exhaustiva (Dubois *et al*, 2007).

Los criterios propuestos por la *MDS Task Force* del Nivel 1 para establecer el diagnóstico de demencia “probable” asociada a EP son los siguientes:

- Diagnóstico de EP (según criterios del Banco de Cerebros de Londres)
- Inicio de EP previo al inicio de la demencia
- *MiniMental Status Examination* (MMSE) <26
- Los déficits cognitivos tienen un impacto significativo sobre las actividades básicas de la vida diaria
- Alteración de al menos dos dominios cognitivos:
 - Atención: Test de meses a la inversa o series de 7 a la inversa
 - Función cognitiva: Fluencia fonémica o test del reloj
 - Habilidad visuoespacial: Dibujo de los pentágonos del MMSE
 - Memoria reciente: Recuerdo diferido de 3 palabras del MMSE
- Ausencia de depresión mayor
- Ausencia de delirium
- Ausencia de otras alteraciones que puedan dificultar el diagnóstico

Una vez establecido el diagnóstico de demencia, los tests del Nivel 2 permiten caracterizar el patrón de disfunción cognitiva y monitorizar los distintos elementos que puedan ser subsidiarios de intervención en la práctica clínica, en el ámbito de la investigación o en ensayos clínicos farmacológicos. Los tests del Nivel 2 evalúan cuatro dominios cognitivos: eficiencia cognitiva global, funciones fronto-subcorticales (función ejecutiva), funciones instrumentales (corticales) y características neuropsiquiátricas, y se resumen en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Evaluación neuropsicológica del Nivel 2 de la *MDS Task Force*.

Dominio cognitivo	Función cognitiva	Tests neuropsicológicos
I. Eficiencia cognitiva global		
		- <i>Mattis Dementia Rating Scale (DRS)</i>
II. Funciones ejecutivas		
	Memoria de trabajo	- <i>Digit span</i> - <i>Spatial span (CANTAB)</i> - <i>Digit ordering test</i>
	Conceptualización	- <i>Similarities (WAIS-R)</i> - <i>Wisconsin Card Sorting Test (WCST)</i>
	Activación	- <i>Verbal fluency</i>
	Abstracción	- <i>Trail Making Test (TMT)</i>
	Mantenimiento	- <i>Stroop test</i> - <i>Odd man out test</i>
	Control conductual	- <i>Prehension behaviour</i>
III. Memoria		
		- <i>Rey Auditory Verbal Learning Test (RAVLT)</i> - <i>Free and cued recall test</i>
IV. Funciones instrumentales		
	Lenguaje	- <i>Boston naming test</i>
	Visuo-constructiva	- <i>Copy of the clock</i>
	Visuo-espacial	- <i>Benton line orientation test</i> - <i>Cube analysis (VOSP)</i>
	Visuo-perceptiva	- <i>Benton face recognition test</i> - <i>Fragmented letters (VOSP)</i>
V. Funciones neuropsiquiátricas		
	Apatía	- <i>Apathy scale</i>
	Depresión	- <i>Montgomery and Asberg Depression Rating Scale (MADRS)</i> - <i>Hamilton Depression Rating Scale</i> - <i>Beck Depression Inventory</i> - <i>Geriatric Depression Scale (GDS-15)</i>
	Alucinaciones visuales	- <i>Parkinson Psychosis Questionnaire (PPQ-6)</i>
	Psicosis	- <i>Neuropsychiatric Inventory (NPI)</i>

5.2.1.d. Neuropatología de la EP-demencia

El sustrato patológico de la demencia y el deterioro cognitivo leve asociados a la EP no se conoce del todo, aunque se considera que es heterogéneo. Históricamente, la

aparición de demencia en pacientes con EP era atribuida a la coexistencia de patología de tipo EA y/o vascular. Sin embargo, los estudios neuropatológicos han demostrado que el grado de patología de tipo Lewy (cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy) en regiones corticales es el factor que más se correlaciona con el riesgo de EP-demencia. Son numerosos los estudios clínico-patológicos en los que se establece una relación entre la presencia de patología de tipo Lewy cortical y la existencia de deterioro cognitivo/demencia (*Mattila et al, 2000; Irwin et al, 2012; Schneider et al, 2012*), aunque esta asociación no se da en todos los casos. Algunos pacientes con EP sin criterios clínicos de demencia y algunos individuos con enfermedad por cuerpos de Lewy incidental muestran una importante carga de patología α -sinucleína cortical y límbica (*Hurtig et al, 2000; Parkkinen et al, 2008*). Por el contrario, una minoría de pacientes con demencia asociada a la EP presentan mínima patología de tipo cuerpos de Lewy en la autopsia (*Hurtig et al, 2000; Colosimo et al, 2003; Irwin et al, 2012*). Estos hallazgos sugieren que la patología α -sinucleína cortical y límbica es importante pero no imprescindible para el desarrollo de demencia en la EP, y que estos casos podrían ser el resultado de una afectación más subcortical o de la existencia de neuropatologías comórbidas.

La importancia de la coexistencia de patología tipo EA en la demencia asociada a la EP ha sido ampliamente debatida, y son varios los trabajos publicados tanto a favor (*Hurtig et al, 2000; Mattila et al, 2000; Irwin et al, 2012*) como en contra (*Apaydin et al, 2002; Aarsland et al, 2005; Hely et al, 2008*) de su implicación en la fisiopatología de la EP-demencia.

En un estudio realizado en 56 sujetos con EP se detectó una asociación significativa entre el riesgo de aparición de demencia y la densidad de placas de amiloide, depósito de proteína tau y patología α -sinucleína. Todos los tipos de patología mostraron una correlación positiva significativa entre ellos. Además, la combinación de todos ellos demostró ser un mejor predictor de demencia que la severidad de cada uno por separado (*Compta et al, 2011*).

A favor de la implicación de la patología amiloide estaría también el hecho de que el alelo E4 de la *apolipoproteína E*, factor genético de riesgo conocido para la EA,

podría influir de manera independiente sobre el riesgo de demencia en la EP (*Irwin et al, 2012*).

En base a algunos estudios, se entiende que es posible que exista un papel sinérgico entre la patología de tipo cuerpos de Lewy y EA. De hecho, en modelos celulares se ha comprobado que el depósito de α -sinucleína promueve la agregación intracelular de tau hiperfosforilada en ovillos neurofibrilares (*Waxman y Giasson, 2011*).

Este efecto aditivo de la patología α -sinucleína, las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares podría influir potencialmente en las características clínicas de la demencia asociada a la EP. La existencia de co-patología EP-demencia y EA es más frecuente en pacientes con una edad de inicio más tardía de los síntomas motores de la EP, y se ha asociado con un curso más agresivo de la enfermedad, una supervivencia más corta y una aparición más temprana de demencia (*Halliday et al, 2008; Compta et al, 2011*).

El papel de otros sustratos patológicos en la demencia asociada a la EP no está claro. La mayoría de las series de autopsias incluyen sujetos de edad avanzada, en los que la coexistencia de otros hallazgos neuropatológicos asociados al envejecimiento es frecuente y pueden actuar como un factor de confusión.

La presencia de lesiones vasculares ha sido involucrada en el riesgo de demencia asociada a EP (*Aarsland et al, 2005; Jellinger y Attems, 2008*), aunque su implicación es controvertida y es uno de los factores más difíciles de considerar por su alta prevalencia en sujetos de edad avanzada.

Se ha investigado la contribución de otras patologías al riesgo de desarrollar demencia en la EP. Un estudio identificó inclusiones TDP-43 positivas, características de la degeneración lobar frontotemporal, en mayor proporción en pacientes con EP con demencia respecto al grupo de sujetos sin demencia (19% vs 7,2%) (*Nakashima-Yasuda et al, 2007*), aunque estos resultados no han sido confirmados posteriormente. También se ha considerado una posible asociación entre la presencia de granos argirófilos y la demencia en la EP (*Sabbagh et al, 2009; Grau-Rivera et al, 2013*).

5.2.1.e. Etiopatogenia de la EP-demencia

En los últimos años, la EP ha pasado de ser considerada conceptualmente como una enfermedad secundaria a una disfunción pura del sistema dopaminérgico, a ser reconocida como el resultado de la disfunción de múltiples sistemas de neurotransmisores que, incluso, pueden ser más importantes que la dopamina en la fisiopatología de alguno de los síntomas no motores que acompañan a la enfermedad. Otros sistemas de neurotransmisión que se encuentran alterados en la EP además del dopaminérgico y que podrían estar implicados en la fisiopatología del deterioro cognitivo son los sistemas colinérgico (*Gaspar y Gray, 1984; Zweig et al, 1993; Klein et al, 2010 Yarnall et al, 2011*), noradrenérgico (*Gaspar y Gray, 1984; Zweig et al, 1993; Del Tredici y Braak, 2013*) y serotoninérgico (*Perry et al, 1993; Huot et al, 2010; Ballanger et al, 2010*).

5.2.1.f. Biomarcadores de deterioro cognitivo en la EP

La disfunción cognitiva en la EP produce un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes y empeora el pronóstico de la enfermedad más que cualquier otro síntoma motor o no motor. Por tanto, disponer de un marcador pronóstico que ayude a predecir la probabilidad de desarrollar deterioro cognitivo durante el curso de la enfermedad resultaría de gran importancia, y en la actualidad se ha convertido en una de las principales líneas de investigación en el campo de la EP.

▪ Biomarcadores de neuroimagen

Se están investigando diversos biomarcadores de neuroimagen. Algunos estudios de RMN estructural mediante morfometría basada en vóxel (*Song et al, 2011; Melzer et al, 2012*), RMN con tensor de difusión (*Carlesimo et al, 2012; Chen et al, 2015*) y RMN funcional (*Rektorova et al, 2012*) han identificado cambios entre sujetos sin y con demencia. Del mismo modo, se han detectado cambios con técnicas de imagen nuclear con marcador de glucosa (PET-FDG) (*Yong et al, 2007; Bohnen et al, 2011*), del sistema colinérgico (SPECT-¹²³IBVM) (*Kuhl et al, 1996*), del depósito amiloide (PET-¹¹C-PIB) (*Aarsland et al, 2005*) y de la activación microglial (PET-¹¹C-PK-11195)

(*Edison et al, 2013*). Actualmente no existe un marcador de neuroimagen específico para α -sinucleína, aunque está en desarrollo.

▪ Biomarcadores en LCR

Otro campo de investigación lo constituyen los biomarcadores en LCR. Aproximadamente el 80% de las proteínas del LCR proceden de la sangre periférica a través de la barrera hemato-encefálica; el 20% restante es sintetizado y liberado por células del SNC por secreción activa, desgaste fisiológico, daño celular o muerte neuronal. La importancia de los biomarcadores en LCR radica en que la detección de variaciones en su composición proteica permite evaluar de forma indirecta algunas de las alteraciones bioquímicas y celulares que tienen lugar en el SNC.

La α -sinucleína, principal componente de los cuerpos de Lewy, es el biomarcador más estudiado en el LCR, aunque los resultados no han sido consistentes. La mayoría de los estudios encuentra niveles reducidos de α -sinucleína total en el LCR de pacientes con sinucleinopatías, incluida la EP (*Tokuda et al, 2006; Parnetti et al, 2014, Stav et al, 2015*). Los estudios que investigan la asociación entre los niveles licuorales de α -sinucleína y la presencia de demencia asociada a la EP son muy limitados. Un estudio longitudinal detectó que los niveles bajos de α -sinucleína se asociaban con un mejor rendimiento cognitivo en pacientes con EP (*Stewart et al, 2014*). En la misma línea, un reciente estudio prospectivo ha encontrado que niveles más altos de α -sinucleína en el LCR se asocian con un deterioro motor y cognitivo más rápido en un seguimiento longitudinal de 2 años (*Hall et al, 2015*). Sin embargo, otros trabajos no han podido confirmar estos resultados (*Stav et al, 2015*).

Los péptidos A β están involucrados en el proceso de información neuronal, y son el componente principal de las placas amiloides que definen la neuropatología de la EA, aunque están presentes en otras enfermedades neurodegenerativas como la EP o la demencia por cuerpos de Lewy. El alto riesgo de aparición de demencia y la frecuente co-patología de EA en la EP convierten a estos péptidos en una diana interesante en la búsqueda de marcadores de riesgo de deterioro cognitivo en la EP. El fragmento más común en las placas amiloides es el A β ₁₋₄₂, cuyos niveles en LCR aparecen reducidos en la mayoría de los estudios en la EP (*Alves et al, 2010; Kang et al, 2013; Buddhala et*

al, 2015). Niveles más bajos de $A\beta_{1-42}$ se asocian con peores rendimientos en tests de memoria diferida en sujetos con EP (*Alves et al, 2010; Yarnall et al, 2014; Hall et al, 2015*). Además, se han encontrado niveles más bajos de $A\beta_{1-42}$ en LCR en pacientes con EP con demencia respecto a individuos con EP sin demencia (*Mollenhauer et al, 2006; Vranová et al, 2014*). Los niveles reducidos de $A\beta_{1-42}$ en LCR constituyen un factor predictor independiente de deterioro cognitivo en la EP (*Siderowf et al, 2010*).

En la EP, las diferencias en las concentraciones de tau en el LCR comparadas con controles son marginales (*Mollenhauer et al, 2006; Parnetti et al, 2008; Buddhala et al, 2015*). Sin embargo, se han encontrado niveles más altos de tau en pacientes con EP-demencia comparados con EP sin demencia (*Mollenhauer et al, 2006; Parnetti et al, 2008; Yu et al, 2014*). Además, los niveles elevados de P-tau en el LCR se han asociado con un mayor empeoramiento de los síntomas motores (*Hall et al, 2015*) y con una progresión más rápida del deterioro cognitivo en sujetos con EP (*Liu et al, 2015; Yu et al, 2014*).

▪ Biomarcadores en sangre periférica

Aunque la detección de biomarcadores en el LCR resulta más atractiva debido a su proximidad con el cerebro, presenta importantes inconvenientes que dificultan su utilización rutinaria en la práctica clínica, como el carácter invasivo de la técnica, la baja concentración de las proteínas en el LCR o la frecuente contaminación sanguínea durante la obtención de la muestra. Estos hechos han promovido la investigación de marcadores en otros fluidos biológicos más accesibles, principalmente en sangre periférica.

A pesar de que el número de estudios es muy limitado, los niveles bajos del factor de crecimiento epidérmico (*plasma epidermal growth factor, EGF*) en plasma se han correlacionado con un peor rendimiento cognitivo y con un riesgo incrementado de progresión a demencia en pacientes con EP (*Chen-Plotkin et al, 2011; Pellecchia et al, 2013*).

Como se detallará más adelante, niveles séricos bajos de ácido úrico se han correlacionado de manera consistente con un riesgo más alto de EP (*Shen et al, 2013*) y

un peor rendimiento cognitivo en pacientes con EP (Wang *et al*, 2009; Annanmaki *et al*, 2011). Sin embargo, la asociación entre la uricemia y el riesgo de demencia asociada a EP no ha sido investigada específicamente.

Mientras que en un pequeño número de trabajos los resultados han sido contradictorios, la mayoría ha detectado que los niveles plasmáticos elevados de homocisteína se correlacionan con el rendimiento cognitivo y el riesgo de demencia en la EP (Zoccolella *et al*, 2005; Martín-Fernández *et al*, 2010; Bialecka *et al*, 2012).

Las proteínas de unión a los ácidos grasos (*fatty acid binding protein*, FABP) pertenecen a una familia de proteínas transportadoras de ácidos grasos y otras sustancias lipofílicas que facilitan la transferencia de estas moléculas entre las membranas intra y extracelulares. Algunos miembros de esta familia se han propuesto como posibles biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas en sangre. Los niveles de FABP de tipo cerebral se han encontrado incrementados en pacientes con EP respecto a controles (Teunissen *et al*, 2011). Además, se han detectado concentraciones séricas más elevadas de FABP de tipo cardíaco en pacientes con EP-demencia y demencia por cuerpos de Lewy que en controles (Mollenhauer *et al*, 2007).

▪ Biomarcadores en otros fluidos biológicos

En los últimos años se ha avanzado en la búsqueda de biomarcadores de riesgo de enfermedades neurodegenerativas en fluidos biológicos periféricos de fácil accesibilidad, como la saliva. En la EP, se han encontrado concentraciones más elevadas de α -sinucleína en la saliva de pacientes respecto a controles sanos (Devic *et al*, 2011; Al-Nimer *et al*, 2014), y se ha propuesto que podría ser útil como marcador de riesgo de EP. Sin embargo, no se ha estudiado hasta el momento su posible papel como predictor de deterioro cognitivo y demencia en la EP.

▪ Biomarcadores genéticos

Las bases genéticas del DCL y la demencia en la EP no se conocen completamente, pero existen numerosas evidencias en la literatura a favor del impacto

de factores genéticos sobre la disfunción cognitiva en la EP. Alteraciones en los genes de *SNCA*, *GBA*, *MAPT* y *apoE* se han asociado a un mayor riesgo de demencia en la EP.

Todas las mutaciones del gen *SNCA* han sido asociadas en algún estudio con deterioro cognitivo, aunque la mutación E46K es la que se asocia más fuertemente con el riesgo de demencia en la EP, así como con la aparición de deterioro cognitivo en fases más tempranas de la enfermedad (Zarranz *et al*, 2004; Somme *et al*, 2011; Pimentel *et al*, 2015). Las duplicaciones y triplicaciones de este gen también se asocian con formas hereditarias autosómico dominantes de EP. Mientras que las duplicaciones cursan habitualmente con cuadros esporádicos de EP de inicio tardío con fenotipos más benignos, similares a las formas idiopáticas, las triplicaciones se han relacionado con un inicio más temprano tanto de los síntomas motores como de la disfunción cognitiva, a veces con cuadros clínicos más parecidos a la demencia por cuerpos de Lewy que a la demencia asociada a EP (Fuchs *et al*, 2007).

Los portadores de mutaciones de *GBA* presentan una edad más temprana de inicio de los síntomas parkinsonianos, una progresión más rápida de los síntomas motores, un mayor y más rápido deterioro cognitivo y menores índices de supervivencia (Brockmann *et al*, 2015). En una cohorte de 790 pacientes con EP, 33 de los cuales eran portadores de mutaciones de *GBA*, se encontró una mayor proporción de patología neocortical de tipo Lewy en el grupo con mutaciones de *GBA*; en este estudio, el 45% de los portadores de mutaciones cursaron con alucinaciones visuales y el 48% cumplían criterios clínicos de EP-demencia (Neumann *et al*, 2009).

El haplotipo H1/H1 del gen *MAPT* es un factor de riesgo independiente de deterioro cognitivo y desarrollo de demencia en pacientes con EP (Goris *et al*, 2007; Williams-Gray *et al*, 2009). Además, *MAPT* H1/H1 podría tener un efecto sinérgico sobre el riesgo de EP-demencia con un polimorfismo del gen *SNCA*: la combinación de ambas variantes genéticas duplicaría el riesgo de desarrollar demencia (Goris *et al*, 2007).

La mayoría de los estudios encuentran un riesgo incrementado de demencia de hasta 5 veces en sujetos con EP portadores del alelo $\epsilon 4$ de la *apoE* (Irwin *et al*, 2012; Tsuang *et al*, 2013; Monsell *et al*, 2014). A pesar de haberse sugerido que la influencia de *apoE* $\epsilon 4$ sobre la cognición en la EP podría estar mediada por cambios

neuropatológicos de EA (*Lashley et al, 2008*), dos estudios recientes han confirmado que el genotipo *apoE* $\epsilon 4$ es un factor predictor de EP-demencia independiente de la carga de patología EA coexistente (*Irwin et al, 2012; Tsuang et al, 2013*).

Los portadores del alelo metionina en la posición 158 (met158val) del gen *COMT* se han asociado con un peor rendimiento cognitivo en pacientes con EP (*Williams-Gray et al, 2007*), aunque estos resultados no han podido ser replicados por otros grupos (*Hoogland et al, 2010; Morley et al, 2012*).

▪ Biomarcadores clínicos

Hasta hace unos años, se consideraba que la marcha normal dependía exclusivamente de la integridad del sistema motor. Sin embargo, las evidencias cada vez más numerosas de los últimos años han demostrado que se basa en un modelo más complejo que refleja el control cognitivo de la marcha (*Montero-Odasso et al, 2012*). De este modo, alteraciones precoces en los procesos cognitivos como la atención, función ejecutiva y memoria de trabajo se han relacionado con una marcha más lenta e inestable, y son predictores de pérdida de movilidad en el futuro, caídas y progresión a demencia en personas de edad avanzada.

En la EP se ha encontrado que el subtipo motor asociado a alteración de la marcha y la postura (*Postural Instability and Gait Difficulty*, PIGD) es un factor de riesgo de deterioro cognitivo y demencia (*Burn et al, 2006; Alves et al, 2006*). Además, los sujetos con EP y DCL presentan mayor alteración de la marcha, y la inestabilidad de la marcha se correlaciona con la disfunción visuoespacial (*Amboni et al, 2012*).

La realización de más estudios en este campo es importante para definir la asociación de las distintas características de la marcha y su valor como biomarcador predictivo del riesgo de deterioro cognitivo y demencia en la EP.

▪ Otros posibles biomarcadores

Además de los ya mencionados se están investigando otros posibles candidatos como marcadores de riesgo de deterioro cognitivo en la EP, aunque los estudios son muy limitados y precisan ser confirmados.

En el campo de la Neurofisiología se ha sugerido que el enlentecimiento oscilatorio en la magnetoencefalografía (*Olde Dubbelink et al, 2014*), la inhibición aferente de latencia corta en los potenciales evocados motores (*Yarnall et al, 2013*), la frecuencia media baja y la alta variabilidad en el electroencefalograma (*Bonanni et al, 2008*) y la baja frecuencia del ritmo de fondo en el EEG cuantitativo (*Klassen et al, 2011*) pueden asociarse a un menor rendimiento cognitivo en la EP.

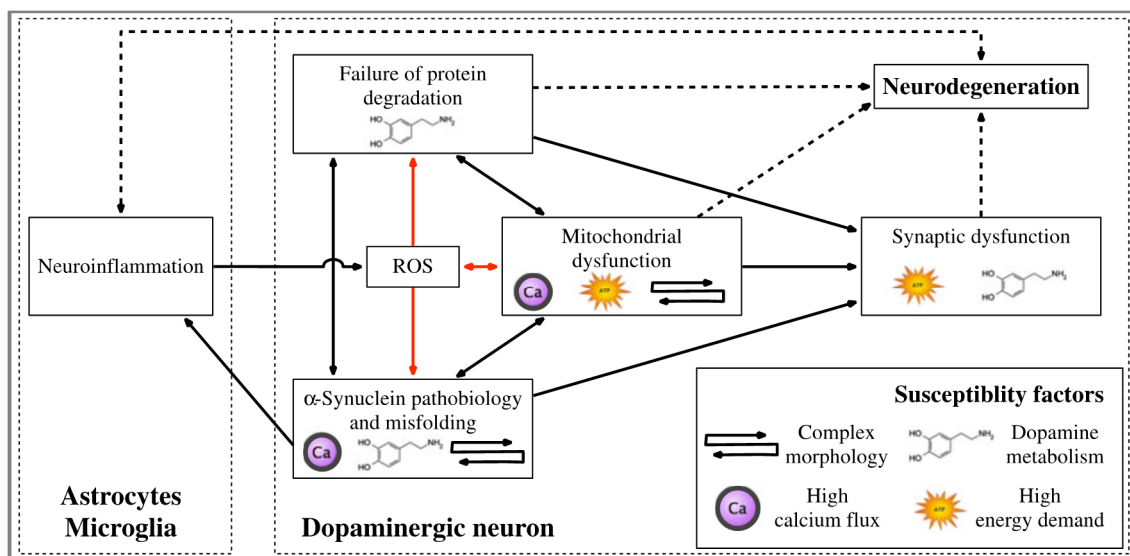
Del mismo modo, algunas características clínicas como la presencia de TCREM en el polisomnograma (*Gagnon et al, 2009; Anang et al, 2014*) y la hiposmia (*Stephenson et al, 2010; Baba et al, 2012*) se han propuesto como posibles marcadores de riesgo de deterioro cognitivo en pacientes con EP.

6. PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

A pesar de que en los últimos años se han realizado grandes avances en el conocimiento de la patogénesis de la EP, el mecanismo preciso que conduce a la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra todavía no está claro. Se considera una enfermedad multifactorial en la que están implicados diversos factores genéticos, ambientales y alteraciones epigenéticas (*Obeso et al, 2010; Ammal Kaidery et al, 2013*), los cuales conducen a una cascada de eventos que incluye alteraciones en el procesamiento de proteínas, disfunción del sistema ubiquitina-proteasoma, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad, neuroinflamación, disfunción sináptica, alteración de la regulación inmune y otros mecanismos aún desconocidos (*Figura 2*).

Aunque no son el único grupo neuronal que se afecta en el curso de la enfermedad, las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia negra son las células más vulnerables en la EP. Esta vulnerabilidad se debe principalmente a sus rasgos característicos, como su morfología compleja, su alta demanda energética, su alto flujo de calcio y al propio metabolismo de la dopamina (*Sulzer, 2007*).

Figura 2. Vías implicadas en la patogénesis de la EP y su relación con factores de susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia negra (tomada de *Fujita et al, 2014*).



6.1. Disfunción sináptica

Existen numerosas evidencias sobre la implicación de la disfunción sináptica en la patogenia de la EP.

La α -sinucleína es una proteína presináptica. En cultivos neuronales, se ha demostrado que se une de forma transitoria con las vesículas sinápticas para facilitar la liberación de los neurotransmisores (*Fortin et al, 2005*). Además, la sobreexpresión de la α -sinucleína en las sinapsis y los somas neuronales protege frente al estrés oxidativo y, por tanto, tiene un papel neuroprotector (*Quilty et al, 2006*). Sin embargo, este efecto protector está limitado a un estrecho rango de concentración, ya que los niveles altos de α -sinucleína son responsables de formas familiares de EP. De hecho, se ha detectado que incluso una modesta sobreexpresión de α -sinucleína puede inhibir la liberación del neurotransmisor en la sinapsis (*Nemani et al, 2010*). Por otra parte, las formas potencialmente patogénicas de α -sinucleína se encuentran formando microagregados en las sinapsis (*Spinelli et al, 2014*), lo que puede contribuir a la disfunción sináptica.

Otra proteína implicada en formas familiares y esporádicas de EP, *lrrk2*, también está presente en las sinapsis. A nivel experimental, tanto el exceso como el defecto de esta proteína altera la dinámica de la liberación y reciclaje de las vesículas sinápticas (*Piccoli et al, 2011*), aunque su influencia sobre los procesos que conducen a la EP no se ha establecido aún.

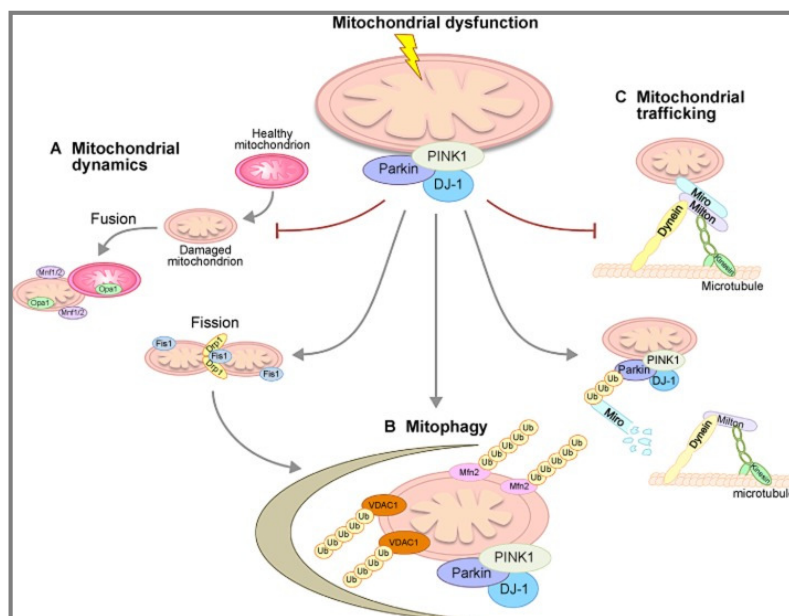
Existen otros eventos patológicos relacionados con la EP que podrían afectar a las sinapsis. Las sinapsis de la vía nigroestriatal contienen altos niveles de α -sinucleína y dopamina, y se ha propuesto que la oxidación de la dopamina podría influir sobre la agregación de α -sinucleína y, de esta forma, participar en el proceso neurodegenerativo (*Leong et al, 2009*). Además, las altas demandas de energía de estas sinapsis podrían verse comprometidas por la disfunción mitocondrial, el recambio de proteínas o el transporte axonal (*Perier y Vila, 2012*). Asimismo, la degradación y recambio de las proteínas disfuncionantes podrían afectar directamente a la función y plasticidad sináptica (*Tai y Schuman, 2008*).

6.2. Disfunción mitocondrial

Las mitocondrias son organelas muy dinámicas que resultan esenciales para un amplio número de procesos celulares, como la producción de adenosín trifosfato (ATP), el manejo de las especies reactivas del oxígeno (ERO), la homeostasis del calcio y la regulación de la apoptosis. El mantenimiento de la homeostasis mitocondrial por mitofagia involucra a múltiples factores, y estos procesos están fuertemente relacionados con proteínas implicadas en formas familiares y esporádicas de EP.

Algunas proteínas asociadas con la EP familiar, especialmente PINK1 y Parkina, se relacionan con la función mitocondrial (*Koopman et al, 2012*) (*Figura 3*). La regulación del recambio mitocondrial y la protección frente al estrés oxidativo están mediadas por la actividad kinasa de PINK1, entre cuyas proteínas diana se encuentra Parkina. Por otro lado, el proceso de mitofagia está dirigido por la translocación de Parkina desde el citosol a la mitocondria mediada por PINK1 (*Matsuda et al, 2010*). Además, tanto la mitofagia (*Gegg et al, 2010*) como el control postranscripcional de la biogénesis mitocondrial (*Scarpulla, 2008*) dependen de la actividad ligasa a la ubiquitina E3 de Parkina.

Figura 3. Modulación de la disfunción mitocondrial por la vía PINK1/Parkina (tomada de Celardo *et al*, 2014).



(A) En la disfunción mitocondrial, el ADN mitocondrial mutado o las proteínas mal plegadas se agregan. El eje PINK1/Parkina inhibe los procesos de fusión para evitar la propagación de los componentes mitocondriales dañados. Sin embargo, este eje sólo estimula el proceso de fisión para inducir la separación física de la mitocondria dañada. Los componentes sanos son rescatados y los dañados son eliminados por mitofagia. (B) La mitofagia es necesaria para eliminar las mitocondrias dañadas. Cuando la organela está profundamente dañada, PINK1 recluta a Parkina para la ubiquitinación de las proteínas de la membrana externa, lo que conduce irreversiblemente a la mitocondria dañada a la mitofagia. (C) El tráfico mitocondrial es detenido por la disfunción mitocondrial. PINK1 inhibe los movimientos mitocondriales a lo largo de los microtúbulos, recluta a Parkina para la ubiquitinación e induce la degradación dependiente de ubiquitina de Miro.

6.3. Estrés oxidativo

La cadena de transporte de electrones de la mitocondria es una de las fuentes principales de ERO en las células eucarióticas. En condiciones normales, estas ERO regulan numerosos procesos celulares de señalización y transcripción a través de la oxidación directa de numerosas proteínas. Sin embargo, ciertas situaciones pueden causar una producción de ERO que sobrepasa la capacidad antioxidante de la célula, lo que se conoce como estrés oxidativo, que produce un daño irreversible en las macromoléculas celulares y puede conducir a la muerte celular. En la EP esporádica se ha demostrado una reducción en la actividad del complejo I mitocondrial, que da lugar a

un incremento en los niveles de superóxido y, por consiguiente, a un aumento del estrés oxidativo (*Esteves et al, 2009*).

También se han encontrado alteraciones en los niveles de moléculas antioxidantes en cerebros de sujetos con EP. Un ejemplo es el glutatión, presente en pequeñas cantidades en la mayoría de las células, incluidas las neuronas y la glía (*Rice y Russo-Menna, 1998*). Los niveles de glutatión se encuentran reducidos en la *pars compacta* de la sustancia negra de sujetos con EP desde estadios muy iniciales de la enfermedad (*Perry et al, 1982; Dexter et al, 1994*). Por otro lado, los niveles de hierro están incrementados en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de pacientes con EP respecto a controles (*Oakley et al, 2007*), y su interacción con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) genera radicales libres que pueden ser perjudiciales para la supervivencia neuronal.

Otro mecanismo que favorece el estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia negra respecto a otras áreas cerebrales corresponde a la propia toxicidad de la dopamina. Por un lado, el propio metabolismo de la dopamina por la monoamina oxidasa genera H_2O_2 que, en combinación con el hierro, da lugar a la producción de ERO (*Spina y Cohen, 1989*). Además de estrés oxidativo, la oxidación de la dopamina induce disfunción mitocondrial y de los sistemas de degradación de proteínas proteasomal y lisosomal, y favorece la formación y estabilización de las protofibrillas neurotóxicas de α -sinucleína, jugando un papel clave en el proceso de neurodegeneración (*Segura-Aguilar et al, 2014*).

Debido al importante papel del estrés oxidativo en la neurodegeneración, se ha investigado el posible papel protector de numerosos agentes antioxidantes en la patogénesis de la EP (*Jayaraj et al, 2014; Zhang et al, 2015*), y se ha propuesto que antioxidantes naturales, como el ácido úrico, pudieran proporcionar una defensa endógena frente al desarrollo y progresión de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas.

6.4. Fallo en los sistemas de degradación de proteínas

Los sistemas de degradación de las células, incluidas las neuronas, aseguran la eliminación de las estructuras celulares dañadas o disfuncionantes, como las proteínas alteradas o mal plegadas u organelas defectuosas como las mitocondrias, y juegan un papel clave en la homeostasis celular. Los dos sistemas principales de degradación son el sistema ubiquitina-proteasoma (SUP) y el sistema autofágico-lisosomal (*Korolchuk et al, 2010*). La disfunción de estos sistemas en la EP, especialmente en las sinapsis, puede conducir a la acumulación de α -sinucleína y mitocondrias defectuosas. Éstas, a su vez, pueden interferir sobre la función sináptica, dando lugar a la formación de agregados tóxicos o alterando el metabolismo energético y causando estrés oxidativo.

Existen numerosas evidencias genéticas y patológicas que apoyan la implicación de los sistemas de aclaramiento defectuosos en la EP. Por ejemplo, los pacientes con enfermedad de Gaucher, un trastorno por depósito lisosomal secundario a la mutación del gen *GBA*, presentan un riesgo aumentado de EP y acumulación de α -sinucleína en el cerebro (*Westbroek et al, 2011*). Por otro lado, las formas mutantes de α -sinucleína pueden inhibir tanto su propia autodegradación como la de otras proteínas por autofagia mediada por chaperonas (*Martinez-Vicente et al, 2008*). Además, los estudios neuropatológicos han detectado un número incrementado de vacuolas y otros marcadores de autofagia en cerebros de pacientes y modelos animales de EP (*Alvarez-Erviti et al, 2010; Crews et al, 2010*). Asimismo, las neuronas que contienen cuerpos de Lewy muestran una reducción en los niveles de marcadores lisosomales y del SUP (*Chu et al, 2009*).

6.5. Mal plegamiento y patobiología de α -sinucleína

La α -sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos codificada por el gen *SNCA*, localizado en el cromosoma 4. Es una proteína específica neuronal que se encuentra en las terminaciones nerviosas presinápticas y en el núcleo (*Maroteaux et al, 1988*). Su función exacta aún se desconoce, aunque se ha propuesto su implicación en varias funciones, como la liberación y tráfico de vesículas sinápticas, la unión a ácidos grasos y la regulación de ciertas enzimas, transportadores y vesículas de neurotransmisores.

También parece jugar un papel importante en la supervivencia neuronal regulando los mecanismos de apoptosis celular. Además, interacciona con multitud de proteínas, lo que sugiere que puede tener una función importante en la señalización celular (*Dev et al, 2003*).

Mutaciones del gen *SNCA* se asocian con formas familiares de EP de inicio precoz (*Polymeropoulos et al, 1997*), y sus agregados constituyen el componente principal de los cuerpos de Lewy (*Spillantini et al, 1997*), hallazgo neuropatológico característico de la EP.

La α -sinucleína está implicada en varias de las vías patogénicas de la EP. Esta proteína puede adoptar de forma espontánea y dinámica una conformación fisiológica o mal plegada. Esta última contiene una estructura en lámina plegada β , que promueve su oligomerización y fibrilización (*Ullman et al, 2011*). La agregación de α -sinucleína está modulada por diversos factores, que incluyen mutaciones genéticas puntuales asociadas con formas familiares de EP, factores ambientales, modificaciones postranslacionales y la interacción con membranas celulares y diferentes proteínas. Aunque existe controversia en este aspecto, las formas oligoméricas y prefibrilares de α -sinucleína son consideradas citotóxicas, mientras que las formas fibrilares y agregadas podrían corresponder a depósitos detoxificados inofensivos (*Breydo et al, 2012*).

La α -sinucleína mutada, mal plegada o sobreexpresada está involucrada en numerosas vías asociadas a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia negra. Se ha involucrado en la alteración de la función sináptica (*Chung et al, 2009*), así como en la alteración del proceso de respiración, la morfología y el recambio de las mitocondrias (*Devi et al, 2008; Chinta et al, 2010*). También podría afectar al transporte axonal perturbando el ensamblaje de los microtúbulos, especialmente junto con la proteína tau (*Esposito et al, 2007*). Además, los oligómeros de la α -sinucleína mutada inducen estrés en el retículo endoplásmico, lo que parece formar parte de las etapas más precoces del proceso de neurodegeneración (*Colla et al, 2012*).

Finalmente, la degradación de α -sinucleína por autofagia mediada por chaperonas podría verse alterada por la α -sinucleína mutada o modificada por dopamina (*Xilouri et al, 2009*). Al mismo tiempo, la reducción de la actividad lisosomal por la

sobreexpresión de α -sinucleína podría conducir a la acumulación de esta proteína (Mazzulli *et al*, 2011). De este modo, se produciría un círculo vicioso entre la deficiencia en el proceso de autofagia mediada por chaperonas y el mal plegamiento y acumulación de α -sinucleína. También se ha descrito la inhibición del sistema UPS por α -sinucleína mutante o sus oligómeros (Tanaka *et al*, 2001; Lindersson *et al*, 2004).

En los últimos años han surgido numerosas evidencias acerca de la capacidad de propagación de los agregados de α -sinucleína entre las células, de manera similar a la propagación de la proteína priónica (Krammer *et al*, 2009; Masuda-Suzukake *et al*, 2013). La hipótesis de la existencia de un mecanismo de transferencia de neurona a neurona de la α -sinucleína mal plegada ha sido ampliamente comprobada en modelos animales y cultivos celulares, y se ha demostrado que la presencia de fibrillas preformadas de α -sinucleína exógenas puede promover la agregación de la α -sinucleína nativa en las neuronas (Desplats *et al*, 2009; Luk *et al*, 2012). Además, algunos de los mecanismos patogénicos descritos en la EP, como la disfunción mitocondrial o proteasomal, podrían incrementar tanto la secreción como la agregación de α -sinucleína (Jang *et al*, 2010), contribuyendo así a su propagación y al proceso neurodegenerativo.

6.6. Neuroinflamación

La neuroinflamación y la activación crónica del sistema inmune son procesos patológicos asociados con todas las enfermedades neurodegenerativas crónicas, incluida la EP (Mosley *et al*, 2012). En este contexto, la microglía adquiere un papel muy importante. En condiciones normales, la microglía se mantiene quiescente, y su papel consiste en mantener la homeostasis y realizar la vigilancia inmunológica examinando continuamente el microambiente a través de la extensión de sus procesos celulares. Ante cualquier situación estresante la microglía se activa, produciendo y liberando citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento (Lucin y Wyss-Coray, 2009). Las neuronas participan activamente en la regulación de la respuesta de la microglía (Tian *et al*, 2009), de forma que muchos de sus productos inhiben la activación de la microglía a través de su unión a receptores específicos microgliales (Mott *et al*, 2004; Majed *et al*, 2006).

La *pars compacta* de la sustancia negra posee una alta densidad de microglía y menos astrocitos en comparación con otras áreas cerebrales, lo que la hace una estructura especialmente vulnerable a la neuroinflamación (Kim *et al*, 2000).

Se ha descrito la presencia de microglía activada reactiva tanto en cerebros de pacientes con EP (McGeer *et al*, 1988) como en sujetos expuestas al 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Langston *et al*, 1999), neurotoxina utilizada para crear un modelo químico de EP, lo que apoya que la neuroinflamación está intrínsecamente relacionada con el proceso patológico de la EP. Además, existen numerosas evidencias de que el daño neuronal desencadena la activación de la microglía que, a su vez, potencia el proceso de neurodegeneración (Gao *et al*, 2003).

De este modo, el papel intrínsecamente protector de la microglía puede convertirse en perjudicial ante la presencia de algunos factores estresantes relacionados con la EP. La microglía puede detectar la α -sinucleína mal plegada y, en su intento de eliminarla, incrementar la neurotoxicidad mediante la producción de ERO y citocinas proinflamatorias (Alvarez-Erviti *et al*, 2011). Por otro lado, las células microgliales que sobreexpresan *lrrk2* mutada producen más citocinas proinflamatorias (Gillardon *et al*, 2012). En los últimos años han surgido numerosos trabajos investigando el posible papel protector de agentes antiinflamatorios en la EP y otras enfermedades neurodegenerativas crónicas (Jayaraj *et al*, 2014; Leem *et al*, 2014). En este campo resulta especialmente interesante el estudio del papel de sustancias endógenas con propiedades antiinflamatorias en el SNC sobre la génesis y progresión de la EP, como la progranulina (Tanaka *et al*, 2013) o el ácido úrico (Ljubisavljevic *et al*, 2013).

6.7. Muerte neuronal mediada por apoptosis

La neurodegeneración por apoptosis puede producirse a través de dos cascadas de señalización, denominadas la vía intrínseca y la vía extrínseca. Ambas vías parecen estar implicadas en el proceso degenerativo que conduce a la EP.

En la vía intrínseca, la muerte neuronal por apoptosis puede ser inducida por situaciones de estrés intracelular, que conducen a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, regulada por proteínas de la familia BCL-2. Como resultado, se

produce la liberación de citocromo C desde el espacio intermembrana mitocondrial, la formación del apoptosoma y la activación de caspasas, responsables de ejecutar finalmente el proceso apoptótico. En modelos animales de EP, la regulación de las proteínas de la familia BCL-2 constituye una diana clave para atenuar la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas (*Offen et al, 1998; Dietz et al, 2008*). Algunos de los genes implicados en formas familiares de EP, como las mutaciones de *LRRK2*, *PINK1* y *Parkina*, han demostrado favorecer la neurodegeneración estimulando la apoptosis neuronal por diversos mecanismos (*Darios et al, 2003; Iaccarino et al, 2007; Wang et al, 2007*). También se ha sugerido que los fallos en los sistemas de degradación de proteínas podrían contribuir a la apoptosis por la vía intrínseca (*Vila et al, 2011*). Además, la propia toxicidad de la dopamina puede activar la vía intrínseca y contribuir de ese modo a la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas (*Jeon et al, 2010*).

La vía extrínseca de la apoptosis es activada por señales extracelulares, y la neuroinflamación parece jugar un papel importante en este proceso favoreciendo la apoptosis por estrés oxidativo o por la presencia excesiva de citocinas proinflamatorias (*Gao et al, 2011*).

En base a su importante papel, la regulación de la apoptosis por ambas vías podría ser una buena diana para intervenciones terapéuticas con el objetivo de paliar el proceso neurodegenerativo de las neuronas dopaminérgicas en la EP.

7. EL PAPEL DEL ÁCIDO ÚRICO EN LA NEURODEGENERACIÓN

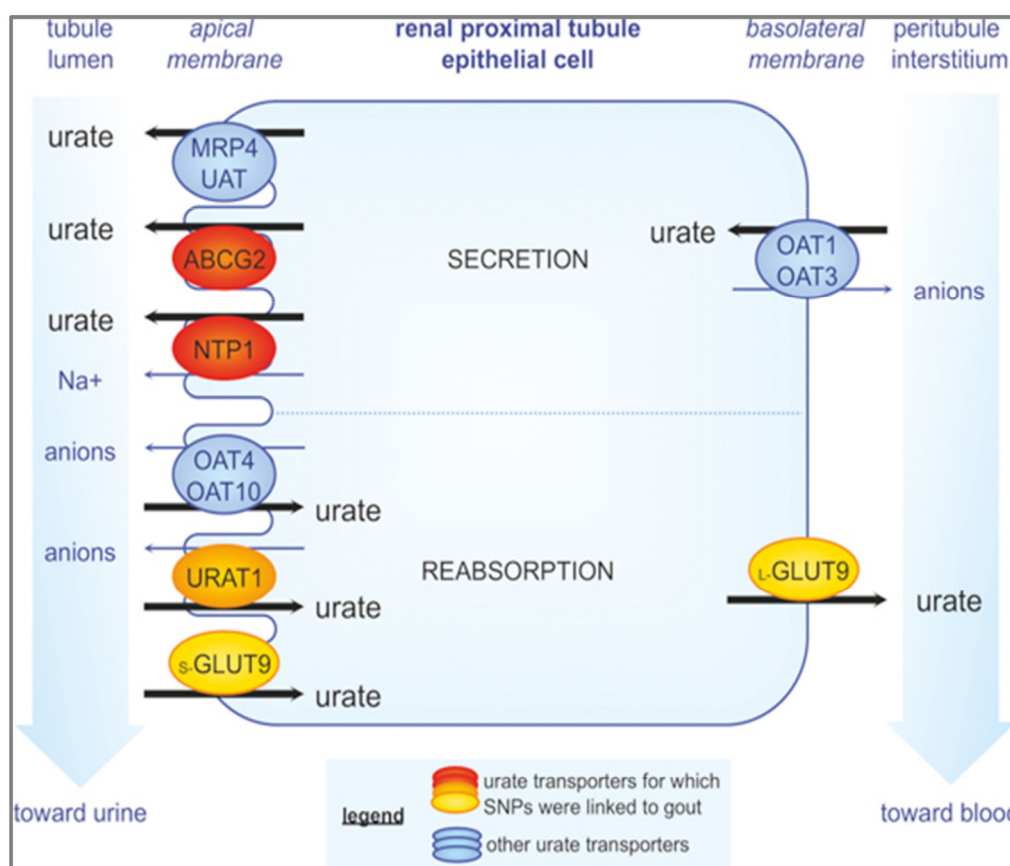
7.1. Introducción

El ácido úrico (AU) es el producto final del metabolismo de las purinas en humanos, y se produce principalmente en el hígado, músculos e intestino a partir del enzima xantina oxidasa.

Los niveles de AU en sangre dependen de varios factores, principalmente de la ingestión de purinas en la dieta, la biosíntesis de AU a partir de purinas endógenas y la

excreción de urato. La excreción renal representa aproximadamente el 60-70% de la excreción total del AU en el organismo, mientras que una pequeña proporción es secretada a nivel intestinal. La excreción urinaria de urato es el proceso más importante en la regulación de los niveles plasmáticos de AU y depende de diversos mecanismos, particularmente de los procesos de secreción y reabsorción. Aproximadamente el 90% de los metabolitos del AU filtrados por el riñón son reabsorbidos en forma de aniones mediante mecanismos que incluyen diversas moléculas transportadoras en el túbulo renal proximal (*Basseville y Bates, 2011; Bobulescu y Moe, 2012*) (*Figura 4*).

Figura 4. Transportadores de urato en las células epiteliales del túbulo proximal (tomada de *Basseville y Bates, 2011*).



Los transportadores de urato están implicados tanto en la secreción tubular como en la reabsorción posterior, lo que determina la excreción neta de urato. En el mecanismo de secreción de urato, los transportadores de aniones OAT1 y OAT3 (*organic anion transporter 1 y 3*), localizados en la membrana basolateral, transportan el urato dependiendo de gradientes generados por aniones intercambiados. En la membrana apical, cuatro transportadores están implicados en la secreción: UAT (*uric acid transporter*), NPT1 (*sodium phosphate transport protein 1*) y los transportadores de la familia *ATP-binding cassette* MRP4 (*multidrug resistance related protein 4*) y ABCG2 (*ATP-binding cassette transporter isoform G2*). En la reabsorción renal, el intercambiador de urato-anión URAT1 se considera esencial en la homeostasis del urato y responsable del 50% de la reabsorción de urato. OAT4 y OAT10 son otros mediadores apicales de urato. Además de estos transportadores, GLUT9 (*glucose transporter 9*) puede jugar un papel importante en la reabsorción. La isoforma corta, s-GLUT9, se localiza exclusivamente en la membrana apical, mientras que la isoforma larga, L-GLUT9, es considerado el mediador basolateral del flujo de urato.

Por tanto, la regulación de los niveles de AU es compleja, y está directamente influenciada por la dieta y, sobre todo, por los genes que codifican las proteínas transportadoras de urato en el riñón.

Se estima que un 20% de la población presenta cifras de AU elevadas, lo que se conoce como hiperuricemia (*Choi et al, 2007*). La hiperuricemia se define como cifras de AU en sangre $>7,0$ mg/dl en varones y $>5,7$ mg/dl en mujeres, y está asociada a numerosas condiciones patológicas.

Los niveles séricos de ácido úrico están influidos por factores como el sexo, la edad, la adiposidad, factores dietéticos, enfermedades crónicas y fármacos. En general, los niveles séricos de AU son aproximadamente 1,4 mg/dl más altos en varones que en mujeres (*Choi et al, 2007*). Se considera que las diferencias entre ambos sexos son debidas fundamentalmente al mayor aclaramiento renal de urato dependiente de estrógenos en las mujeres, especialmente antes de la menopausia (*Nicholls et al, 1973*). La edad, sin embargo, parece tener influencia sobre la uricemia sólo en mujeres, en las que los niveles de AU aumentan con la edad. La obesidad, en particular la proporción corporal de tejido adiposo o adiposidad, es uno de los factores de riesgo más determinantes de hiperuricemia (*Choi et al, 2005*). Los niveles séricos de AU aumentan con la dieta rica en carne y marisco, y disminuyen con el consumo de productos lácteos (*Choi et al, 2007*). También se incrementan con el consumo de alcohol, principalmente con la cerveza y los licores (*Choi et al, 2004*). Diversas condiciones médicas pueden incrementar los niveles séricos de AU y el riesgo de gota, como la hipertensión, la diabetes, los niveles elevados de colesterol o triglicéridos, la insuficiencia renal crónica, la insuficiencia cardiaca congestiva y otras situaciones asociadas a hipoxia tisular severa, así como enfermedades proliferativas e inflamatorias crónicas que cursan con altos índices de recambio celular (*Singh et al, 2011*). Entre los fármacos que pueden influir sobre los niveles séricos de AU se encuentran los diuréticos tiazídicos y de asa (*Choi et al, 2005*), el tratamiento hormonal sustitutivo postmenopáusico (*Hak y Choi, 2008*) y el ácido acetilsalicílico (*Yu y Gutman, 1959; Caspi et al, 2000*).

La hiperuricemia se ha relacionado con numerosas enfermedades, como la gota, la urolitiasis, la enfermedad renal, la hipertensión arterial, el síndrome metabólico, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes mellitus.

7.2. Funciones biológicas del ácido úrico

A diferencia de lo que ocurre en humanos, el resto de mamíferos dispone del enzima uricasa, que metaboliza el ácido úrico en alantoína. De este modo, la inactivación de la uricasa debida a diversas mutaciones durante la evolución de los homínidos es la responsable de que los seres humanos tengamos unos niveles de ácido úrico en sangre hasta diez veces superiores al resto de los mamíferos (*Kratzer et al, 2014*). Estas mutaciones han sido interpretadas como una ventaja evolutiva y, junto con el hecho de que la mayor parte del urato filtrado en el riñón sea reabsorbido en la nefrona (*Mount et al, 2006*), sugieren el posible efecto beneficioso de esta molécula en el organismo.

Sin embargo, todavía existe una gran controversia acerca de las ventajas de los altos niveles de AU. Se ha sugerido que el incremento en sus niveles respecto a otros primates puede estar asociado a la mayor inteligencia de los humanos (*Sofaer y Emery, 1981*). También se ha propuesto que podría actuar como un mecanismo para mantener la presión arterial en situaciones de baja ingesta de sal (*Watanabe et al, 2002*), lo cual pudo ser un hecho esencial para el mantenimiento de la posición erecta en los homínidos.

En la actualidad, los efectos beneficiosos más reconocidos del ácido úrico son su efecto antioxidante, su papel neuroprotector y sus acciones inmunes e inflamatorias.

7.2.1. Ácido úrico y efecto antioxidante

El AU es una de las sustancias antioxidantes endógenas más importantes presentes en los fluidos biológicos en humanos, y es responsable de neutralizar >50% de los radicales libres en sangre (*Glantzounis et al, 2005*).

Se han propuesto diversos mecanismos a través de los cuales el AU podría reducir el estrés oxidativo. *In vitro*, el AU es un potente neutralizador de radicales peróxido, hidroxirradicales y radicales de oxígeno (*Ames et al, 1981*). En concentraciones fisiológicas, el AU es tan efectivo como el ascorbato previniendo la peroxidación lipídica iniciada *in vivo* por el peróxido de hidrógeno y estabilizando el

ascorbato. Además, ha demostrado reducir el daño oxidativo causado por radicales libres en las moléculas de DNA (*Cohen et al, 1984*). El AU puede participar en la eliminación de superóxido previniendo la degradación de la enzima superóxido dismutasa, lo que ayudaría a evitar su reacción con el óxido nítrico y bloquearía la formación de peroxinitrito, que se comporta como un potente neurotóxico para las células dopaminérgicas de la sustancia negra (*Hink et al, 2002; Iravani et al, 2006*). También es eficaz evitando la formación de peroxinitrito a partir de la nitración de los residuos tirosina de las proteínas, previniendo así la inactivación de enzimas celulares y la modificación del citoesqueleto (*Pacher et al, 2007*). Por otra parte, el AU puede actuar como quelante de iones metálicos, como el hierro y el cobre, convirtiéndolos en formas poco reactivas incapaces de catalizar reacciones de radicales libres (*Davies et al, 1986*).

Basándose en sus efectos antioxidantes se sugirió que el AU podría influir sobre aquellas situaciones en las que el estrés oxidativo tiene un papel preferente, como el envejecimiento o la incidencia de cáncer (*Ames et al, 1981*). Sin embargo, no ha podido demostrarse que los niveles séricos altos de AU se asocien con una mayor esperanza de vida; por el contrario, los pacientes con hiperuricemia presentan un riesgo más alto de mortalidad por cualquier causa y por enfermedad cardiovascular (*Storhaug et al, 2013*). Del mismo modo, numerosos trabajos sugieren que la hiperuricemia no sólo no protege frente al desarrollo de tumores sino que aumenta el riesgo de muerte debida a cáncer, aunque podría no ser consecuencia directa del AU y reflejar un patrón de estilo de vida que favorece el incremento tanto en los niveles de AU como en el riesgo de cáncer (*Strasak et al, 2007*). Además, a pesar de las múltiples evidencias sobre su efecto antioxidante, el AU también posee acciones prooxidantes, que dependen del propio radical urato, de su papel estimulador de la síntesis de moléculas proinflamatorias o de la generación de radicales libres a partir de la actividad enzimática de la xantina oxidasa (*Glantzounis et al, 2005*). En base a estos datos, se ha postulado que el AU puede comportarse como agente antioxidante o prooxidante dependiendo de las circunstancias. En el caso del envejecimiento, la tumorigénesis y la enfermedad cardiovascular, los efectos prooxidantes del AU podrían predominar sobre los efectos antioxidantes, aunque también es posible que la hiperuricemia represente un mecanismo compensatorio o protector para intentar prevenir o corregir el daño oxidativo.

A pesar de las controversias, el potente efecto antioxidante natural del AU ha sido ampliamente demostrado. Debido a esto, en los últimos años han surgido numerosos trabajos investigando la posible asociación entre los niveles circulantes de AU y el riesgo o la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas crónicas en las que se conoce que el estrés oxidativo juega un papel clave, incluida la EP (*Davis et al, 1996; Ascherio et al, 2009; etc.*).

7.2.2. Ácido úrico y neuroprotección

El cerebro es un órgano muy vulnerable al daño oxidativo debido a su alto índice metabólico y a su gran contenido de material lipídico en forma de ácidos grasos insaturados. Por este motivo, los mecanismos de defensa frente a la peroxidación lipídica en el cerebro adquieren una gran importancia. En este contexto, la relación entre los niveles de AU y las enfermedades neurodegenerativas podría reflejar la acción neuroprotectora del AU relacionada con su efecto antioxidante (*Scott y Hooper, 2001*).

Los pacientes con esclerosis múltiple presentan niveles séricos de AU menores que los sujetos sanos, y estos niveles son más bajos en las fases activas de la enfermedad (*Toncev et al, 2002*). De este modo, se ha propuesto su posible utilidad como marcador de actividad y de respuesta al tratamiento en la esclerosis múltiple (*Guerrero et al, 2008*). Además, algunos estudios han encontrado beneficioso el uso terapéutico del incremento de los niveles séricos de AU con inosina en modelos animales y pacientes con esclerosis múltiple (*Markowitz et al, 2009*).

Aunque algunos metaanálisis recientes no han podido confirmar este hallazgo (*Schrag et al, 2013; Chen et al, 2014*), diversos trabajos han encontrado que los niveles séricos de AU y otras sustancias antioxidantes se encuentran reducidos en la EA (*Kim et al, 2006*). Los niveles aumentados de AU parecen asociarse con una progresión más lenta del deterioro cognitivo (*Irizarry et al, 2009*). El uso de suplementos de ácido ascórbico junto con precursores del AU, como la inosina o la hipoxantina, podría atenuar la progresión de la EA y el deterioro cognitivo (*Waugh, 2008*).

También se ha encontrado una asociación entre niveles más bajos de AU en suero y la progresión de la enfermedad en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica

(*Keizman et al, 2009*) y enfermedad de Huntington (*Auinger et al, 2010*), y se ha descrito un posible efecto beneficioso del AU como tratamiento neuroprotector en modelos murinos de lesión de médula espinal (*Scott et al, 2005*).

En la EP, los hallazgos discurren en la misma línea, y serán comentados en detalle en un apartado posterior (7.3).

En resumen, las evidencias acerca del papel neuroprotector de los niveles bajos de AU sobre el riesgo y la progresión de diversas enfermedades neurodegenerativas son numerosas.

7.2.3. Ácido úrico y activación de respuestas inmunes e inflamatorias

En los últimos años, se ha demostrado que el AU tiene un papel importante en la respuesta inmune innata. El AU es liberado por las células somáticas dañadas en forma de cristales de urato monosódico. Estos microcristales actúan como una señal de peligro que activa las defensas celulares del sistema inmune innato estimulando la maduración de células dendríticas y aumentando la respuesta de células T CD8⁺ (*Shi et al, 2003*), y se comporta como un adyuvante endógeno natural, es decir, favorece la respuesta inmune al antígeno (*Ghaemi-Oskouie y Shi, 2011*). La detección e ingestión de los cristales de urato por los fagocitos representa el primer paso de la cascada inflamatoria iniciada por el AU. Una vez dentro de los fagocitos, estos cristales desencadenan otras respuestas de estrés, como la generación de radicales libres, la salida de potasio o la liberación de catepsina B desde los lisosomas fracturados. Todas estas señales se consideran claves para la activación del inflammasoma, un complejo multiproteico citosólico que detecta patógenos o bien señales de peligro o estrés y participa en la inmunidad innata y en la iniciación de la inflamación (*Martinon et al, 2006*).

De este modo, se ha propuesto que la participación del AU en la activación del sistema inmune y la inflamación podría ser beneficioso en la lucha contra las infecciones y otros procesos nocivos.

7.3. El ácido úrico en la enfermedad de Parkinson

En los últimos años, numerosos estudios han determinado la existencia de una relación inversa entre los niveles plasmáticos de ácido úrico y el riesgo de desarrollar enfermedad de Parkinson (*Davis et al, 1996; De Lau et al, 2005, Winquist et al, 2010*), así como con una progresión más lenta de los síntomas (*Schwarzschild et al, 2008; Ascherio et al, 2009*). Aunque aún no tiene aplicación a nivel clínico, se ha propuesto la utilización de los niveles de AU en suero como biomarcador de riesgo, diagnóstico y pronóstico en la EP (*Cipriani et al, 2010*).

Mientras que la mayoría de los estudios ha establecido esta asociación en ambos sexos, algunos trabajos han encontrado diferencias entre varones y mujeres, con una asociación estadísticamente más débil (*Schwarzschild et al, 2008; Ascherio et al, 2009*) o incluso ausente (*Alonso et al, 2007*) en mujeres. La explicación para esta diferencia no está clara, aunque se ha postulado que podría ser el resultado de un efecto biológico diferente del urato sobre la enfermedad de Parkinson en ambos sexos (*Nilsen et al, 2004*), o también podría reflejar la existencia de un menor número de mujeres con niveles de uricemia suficientemente elevados como para ejercer un efecto significativo sobre la progresión de la enfermedad (*Ascherio et al, 2009*).

En base a numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* surgidos en los últimos años, existen suficientes evidencias que apoyan el efecto preventivo de la hiperuricemia sobre el estrés oxidativo en la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia negra en individuos con EP (*Duan et al, 2002; Jenner, 2003; Guerreiro et al, 2009*).

El metabolismo oxidativo de la dopamina puede generar peróxido de hidrógeno y otras especies de oxígeno reactivo, así como condiciones favorables al estrés oxidativo como el incremento de hierro y la disminución de glutathion (*Sofic et al, 1991*).

Por otro lado, se han encontrado niveles reducidos de ácido úrico en la sustancia negra de cerebros con EP respecto a controles (*Church et al, 1994*). Estos autores demostraron que la adición de AU reducía el grado de oxidación de la dopamina en el núcleo caudado y la sustancia negra, mientras que la uricasa aumentaba ésta significativamente. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que los niveles de AU están

disminuidos en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales en los pacientes con EP, lo que contribuiría a generar un ambiente vulnerable al estrés oxidativo, particularmente a través de reacciones de oxidación de la dopamina.

En un modelo animal de EP, el tratamiento con ácido úrico demostró suprimir el estrés oxidativo y prevenir la muerte de las neuronas dopaminérgicas causada por la administración de homocisteína o hierro (*Duan et al, 2002*). Se considera que esta protección puede ser debida a la inhibición de la neurotoxicidad mediada por peroxinitrito, un mecanismo también implicado en la patogénesis de la EP (*Iravani et al, 2006*).

Por tanto, son muchas las evidencias a favor de un papel protector del ácido úrico tanto sobre el riesgo como sobre la progresión de la EP, especialmente en varones. Esta acción se basa, probablemente, en la prevención de la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra debido a su potente efecto antioxidante.

7.4. Ácido úrico y deterioro cognitivo

El estrés oxidativo se considera un pilar importante en la patogénesis del deterioro cognitivo asociado al envejecimiento (*Molshatzki et al, 2015*). Debido a su papel como antioxidante natural y neuroprotector, en los últimos años se ha planteado la posibilidad de que la uricemia podría influir sobre la aparición de deterioro cognitivo en la población general.

Se ha descrito una asociación entre niveles más altos de AU y un mejor rendimiento cognitivo en personas sanas de edad avanzada (*Euser et al, 2009; Mendez-Hernandez et al, 2015*) y en pacientes con antecedentes de enfermedad cardiovascular (*Molshatzki et al, 2015*) y enfermedad renal (*Afsar et al, 2011*). Además, la hiperuricemia se asocia con un menor riesgo de deterioro cognitivo leve y demencia de tipo Alzheimer (*Euser et al, 2009; Li et al, 2010, Schrag et al, 2013*), así como con un menor riesgo de progresión de deterioro cognitivo leve a enfermedad de Alzheimer (*Irizarry et al, 2009*).

En el campo de la enfermedad de Parkinson sólo encontramos en la literatura dos trabajos que demuestran un mejor rendimiento cognitivo en sujetos con niveles

séricos de AU más altos (*Annanmaki et al, 2011; Wang et al, 2009*). La asociación entre la uricemia y la aparición de demencia asociada a la EP no ha sido estudiada hasta la fecha.

7.5. Factores genéticos reguladores de los niveles de ácido úrico

Además de los factores ambientales, los niveles séricos de ácido úrico tienen una fuerte influencia genética, con una heredabilidad estimada de hasta el 73% (*Whitfield et al, 1983*). En los últimos años, los estudios de asociación genómica (GWAs) han permitido identificar varios polimorfismos genéticos (*single nucleotid polymorphisms* o SNPs) que se relacionan con los niveles séricos de AU.

Un metaanálisis de los resultados de 14 GWAs (BRIGHT, CoLaus, CROATIA, Health 2000, KORA F3, KORA S4, ORCADES, PROCARDIS, NSPHS, SardiNIA, SHIP, SSAGA, MICROS and TwinsUK), con un total de 28141 participantes, permitió identificar nueve polimorfismos localizados en distintos *loci* que se relacionaban fuertemente con los niveles séricos de ácido úrico. Algunos de ellos están localizados en genes cuya influencia sobre la uricemia ya se conocía previamente, mientras que su relación con el ácido úrico era desconocida en el resto. La mayoría de estos genes codifican proteínas que actúan como transportadores de urato a nivel renal (*Figura 4*), y en otros el mecanismo exacto por el que influyen en la regulación del ácido úrico aún no está claro (*Kolz et al, 2009*).

▪ *SLC2A9* (rs734553)

El gen *SLC2A9* se localiza en el cromosoma 4p15.3-p16 y codifica el transportador renal de glucosa voltaje-dependiente GLUT9 (*facilitative glucose transporter 9*), que tiene un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. También ha sido ampliamente demostrado que está involucrado en la reabsorción de urato en el túbulo proximal del riñón (*Li et al, 2007*). Se han descrito dos variantes de la proteína: una isoforma GLUT9L, que se expresa fundamentalmente en la membrana basolateral de las células del túbulo proximal, y la isoforma GLUT9S, que se expresa exclusivamente en la membrana apical de dichas células (*Kimura et al, 2014*). La isoforma GLUT9S se considera responsable de la recaptación del ácido úrico

secretado, mientras que GLUT9L presumiblemente llevaría a cabo el transporte de urato al torrente sanguíneo. Las evidencias disponibles sugieren que GLUT9 podría ser la vía principal, y posiblemente la única, de transporte de urato en la membrana basolateral de las células del túbulo proximal renal (*Figura 4*). Algunos fármacos uricosúricos, como el probenecid, la benzbromarona o el losartán, actúan a través de la regulación de la actividad de GLUT9 (*Anzai et al, 2008*).

El gen *SLC2A9* es considerado el factor genético con mayor influencia sobre los niveles séricos de AU. Las mutaciones de este gen, a través de un mecanismo de pérdida de función, se han asociado a la hipouricemia renal tipo 2 (*Anzai et al, 2008*).

En el campo de la EP son muy pocos los trabajos publicados que investigan su posible relación con este gen. Se ha encontrado asociación entre algunas variantes genéticas de *SLC2A9* con el riesgo de EP y la edad de inicio de los síntomas (*Facheris et al, 2011*). Un estudio reciente analizó tres SNPs en el gen *SLC2A9* con influencia sobre los niveles de AU en una cohorte de pacientes con EP inicial, encontrando que los sujetos portadores de más alelos de riesgo tenían niveles más bajos de AU en suero y presentaban, a su vez, una progresión más rápida de los síntomas. Así, este trabajo ha permitido establecer, en el marco de la randomización mendeliana, una relación causal entre los niveles séricos de AU y la progresión de la EP (*Simon et al, 2014*).

También se ha descrito una relación entre este gen y el rendimiento cognitivo en la población general (*Houlihan et al, 2010*), y con un mayor riesgo de síntomas psicóticos en pacientes con EA (*Hollingworth et al, 2012*).

▪ *SLC22A12* (rs505802)

El gen *SLC22A12* está localizado en el cromosoma 11q13, y codifica el transportador transmembrana de urato URAT1. URAT1 pertenece a la familia de transportadores de aniones orgánicos (OAT), y se encuentra en la membrana apical de las células del túbulo proximal (*Enomoto et al, 2002*). Esta localización sugiere su participación, junto con GLUT9S, en la recaptación luminal de urato en el túbulo proximal, que posteriormente sería transportado al torrente sanguíneo a través de GLUT9L en la membrana basolateral (*Figura 4*).

Los polimorfismos en este gen tienen una importante influencia sobre los niveles séricos de AU. También se han descrito mutaciones de pérdida de función de *SLC22A12* asociadas a la hipouricemia renal tipo 1 (*Enomoto et al, 2002*).

Hasta la fecha, no existe en la literatura ningún trabajo publicado estudiando la relación entre este gen y el riesgo de EP o de deterioro cognitivo.

▪ ***ABCG2* (rs2231142)**

El gen *ABCG2* se localiza en el cromosoma 4q22 y codifica la subfamilia G de transportadores de membrana ABC (*ATP-binding cassette*), miembro 2, también conocido como *Breast Cancer Resistant Protein* (BCRP).

A nivel renal, la proteína ABCG2 actúa como un transportador secretor de urato en la membrana apical de las células del túbulo proximal, que favorece la excreción renal de AU (*Woodward et al, 2009*). Sin embargo, el importante papel de ABCG2 en la homeostasis del urato se produce a través de la excreción de urato tanto a nivel renal como, en mayor medida, extrarrenal (*Nakayama et al, 2011*). Por tanto, las variantes genéticas funcionales en *ABCG2* son causa de hiperuricemia por reducción de la excreción renal y extrarrenal de urato.

En el SNC, los transportadores ABC se han identificado en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica y en células parenquimatosas del cerebro, y se ha sugerido que pueden estar implicados en el transporte de β -amiloide, pudiendo contribuir a la agregación de amiloide en el cerebro y en las células endoteliales del sistema nervioso central y, de esta forma, conducir a un incremento de riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer (*Xiong et al, 2009*). El efecto de ABCG2 sobre el incremento de riesgo de EA es más pronunciado en portadores del alelo *apoE* ϵ 4 (*Fehér et al, 2013*). También se ha demostrado que ABCG2 puede reducir el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria en el cerebro en modelos animales y cerebros de pacientes con EA (*Shen et al, 2010; Zeng et al, 2012*).

En la EP se ha investigado el papel de ABCG2 en el transporte de algunos fármacos a través de la barrera hematoencefálica (*Vautier et al, 2009; Liu et al, 2014*).

Sin embargo, su posible relación con el riesgo, la progresión de la enfermedad o el desarrollo de demencia asociada a la EP no ha sido estudiado.

▪ ***SLC17A1* (rs1183201)**

El gen *SLC17A1*, localizado en el cromosoma 6p23-p21.3, codifica la proteína NPT1 (*sodium-dependent phosphate transport protein 1*), perteneciente a la superfamilia de cotransportadores voltaje-dependiente de sodio/aniones. Se expresa en la membrana apical de las células tubulares renales, el hígado, el cerebro y los oocitos, y su principal función es la excreción de fosfato en el riñón. También se ha descrito que NPT1 es un transportador de urato que participa en los mecanismos de excreción de urato en el riñón a través de su secreción apical en la células del túbulo proximal renal (Iharada et al, 2010).

Los polimorfismos funcionales de este gen se han asociado con hiperuricemia debido a un mecanismo de pérdida de función y reducción de la excreción renal de urato (Iharada et al, 2010).

La posible relación de los polimorfismos de este gen con la enfermedad de Parkinson o la prevalencia de demencia no ha sido investigada previamente.

▪ ***SLC22A11* (rs17300741)**

El gen *SLC22A11* se localiza en el cromosoma 11q13.1 y codifica el transportador transmembrana de urato OAT4 (*organic anion transporter 4*). Esta proteína se encuentra en la placenta y en la membrana apical de las células del túbulo proximal del riñón, y participa en los mecanismos de reabsorción del urato a nivel renal (Hagos et al, 2007).

El polimorfismo funcional de *SLC22A11* rs17300741 se asocia a hiperuricemia a través de la reducción en la excreción de urato en el riñón por una disminución en la actividad del transportador OAT4 (Sakiyama et al, 2014).

Tampoco existe hasta la actualidad ningún estudio sobre la relación entre este gen y la EP o la demencia.

▪ **GCKR (rs780094)**

El gen *GCKR* se encuentra localizado en el cromosoma 2p23.3-p23.2, y codifica la proteína reguladora de la glucoquinasa *GCKR* (*glucokinase regulatory protein*). La proteína *GCKR* está presente en los hepatocitos, y su función principal es la fosforilación de la glucosa para su transformación en glucógeno. Las alteraciones genéticas en *GCKR* se asocian a la alteración en los niveles séricos de glucosa, tanto a la diabetes mellitus como a casos de hipoglucemia hiperinsulinémica.

A pesar de haberse confirmado su asociación con los niveles séricos de ácido úrico en varios GWAs posteriores (*Köttgen et al, 2013; Matsuo et al, 2015*), la proteína *GCKR* no parece actuar a nivel renal, y el mecanismo por el que regula los niveles séricos de ácido úrico se desconoce. Se ha propuesto que el SNP rs780094 de *GCKR* podría influir sobre las concentraciones séricas de AU y de triglicéridos a través de un mediador común aún no identificado (*Van der Harst et al, 2010*).

Sólo encontramos en la literatura dos trabajos que no encuentran asociación entre variantes genéticas en *GCKR* y la capacidad cognitiva en personas de edad avanzada (*Alfred et al, 2013*) o el riesgo de demencia (*Reynolds et al, 2010*).

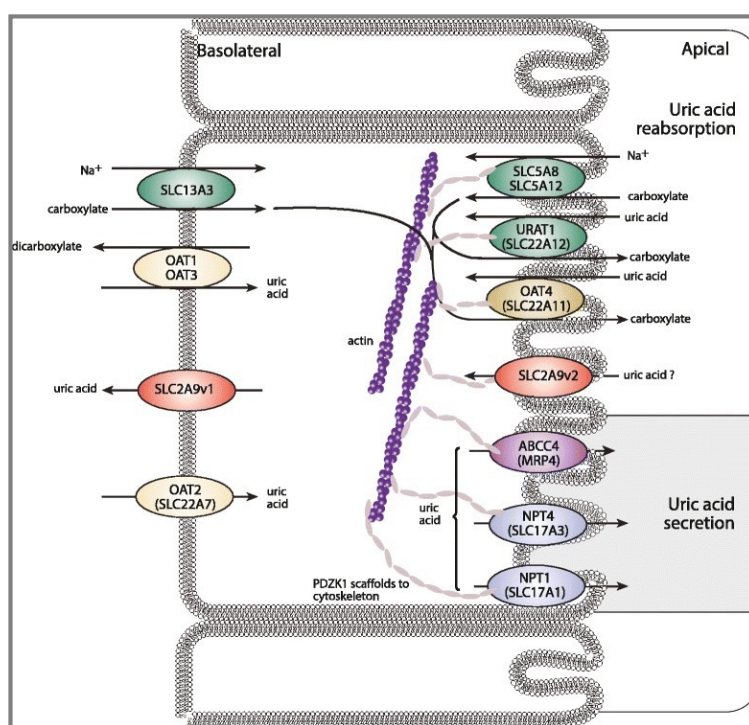
▪ **PDZK1 (rs12129861)**

El gen *PDZK1* se localiza en el cromosoma 1q21 y codifica la proteína *PDZK1* (*PDZ domain containing 1*). La proteína *PDZK1* se ubica principalmente en la membrana apical de las células del túbulo proximal renal. Es una proteína de anclaje que conecta una gran variedad de proteínas de la membrana plasmática apical con otras proteínas reguladoras, regulando así la expresión de superficie de estas proteínas (*Gisler et al, 2003*). De este modo, participa en la regulación de múltiples procesos biológicos, ensamblando proteínas en complejos de señalización celular o regulando la función de transportadores de membrana.

La proteína *PDZK1* se une, entre otras, a las proteínas *OAT4* (*Miyazaki et al, 2005*), *URAT1* (*Anzai et al, 2004*) y *NPT1* (*Ichida, 2009*) en la membrana apical de las células del túbulo proximal renal, regulando la actividad de estos receptores en la membrana celular. El papel emergente de esta proteína como molécula de anclaje para

los transportadores renales de la membrana apical ha dado lugar a un nuevo concepto de transporte renal de urato, el transporteosoma de urato (*Figura 5*), un complejo multimolecular de transportadores de urato unidos y estabilizados por la proteína PDZK1, que conforman una unidad funcional (*Anzai et al, 2007; Merriman, 2015*).

Figura 5. El transporteosoma del ácido úrico (tomada de *Merriman, 2015*).



Los carboxilatos se acumulan en la célula del túbulo proximal a través de los transportadores de monocarboxilato dependientes de sodio SLC5A8 y SLC5A12, y a través de SLC13A3. El ácido úrico entra en la célula por intercambio con carboxilato por vía URAT1 y OAT4. SLC2A9v2 en la membrana apical juega un importante papel en la reabsorción del urato, que sale de la célula a través del SLC2A9v1 por la membrana basolateral. MRP4, OAT1, NPT1 y NPT4 secretan el AU a la luz del túbulo proximal. OAT1 y OAT3 son transportadores conocidos del urato, pero la dirección del transporte no está clara. PDZK1 es una proteína de anclaje implicada en el ensamblaje del complejo de transportadores en la membrana apical.

La influencia de *PDZK1* sobre los niveles séricos de AU (*Yang et al, 2010*) y el riesgo de gota (*Phipps-Green et al, 2014*) ha sido confirmada en estudios posteriores.

▪ *LRRC16A*+*SCGN* (rs742132)

El gen *LRRC16A*, en proximidad con el gen *SCGN* de la secretagoguina, se localiza en el cromosoma 6p22.2 y codifica la proteína CARMIL (*capping protein*

ARP2/3 and myosin-I linker), presente en el riñón y en las células epiteliales. Esta proteína actúa como un inhibidor de una proteína reguladora de la polimerización de la actina (*Yang et al, 2005*).

Se ha propuesto que la proteína CARMIL influiría sobre el transporte renal del AU favoreciendo el anclaje del transporteosoma al citoesqueleto de actina, a través de la regulación de la polimerización de ésta (*Sakiyama et al, 2014*).

▪ ***SLC16A9* (rs12356193)**

El gen *SLC16A9* está localizado en el cromosoma 10q21.3 y codifica la proteína MCT9 (transportador 9 del ácido monocarboxílico), una proteína transportadora sodio-dependiente que se expresa en el riñón y en el intestino. El sustrato o sustratos de este transportador se desconocen, y su papel en el transporte de urato no está claro en la actualidad, aunque se ha sugerido que podría influir sobre los niveles séricos de AU regulando la excreción de urato a nivel intestinal (*Nakayama et al, 2013*).

Por tanto, el metaanálisis de *Kolz et al* ha permitido, por un lado, confirmar el papel regulador de algunos de estos genes sobre la uricemia y, por otro lado, identificar nuevos factores genéticos implicados en la regulación de los niveles séricos de ácido úrico. De todos ellos, *SLC2A9* es el único gen en el que se ha estudiado su posible asociación con la EP.

De la misma manera que en otros trabajos se han descrito diferencias en la asociación entre los niveles séricos de AU y el riesgo de EP en varones y mujeres (*Alonso et al, 2007; Schwarzschild et al, 2008; Ascherio et al, 2009*), estas diferencias dependientes del sexo se encontraron también en el mencionado metaanálisis. Aunque los resultados al analizar los estudios previos en función del sexo no mostraron la existencia de ningún nuevo *locus*, permitieron identificar algunas diferencias en los efectos de algunos de los anteriores SNPs sobre los niveles séricos de ácido úrico según el sexo. En el caso del gen *SLC2A9* se detectó que el SNP más fuertemente relacionado con la concentración de ácido úrico en varones seguía siendo el rs734553, mientras que en mujeres era el rs12498742; para ambos SNPs, el tamaño del efecto del alelo menor

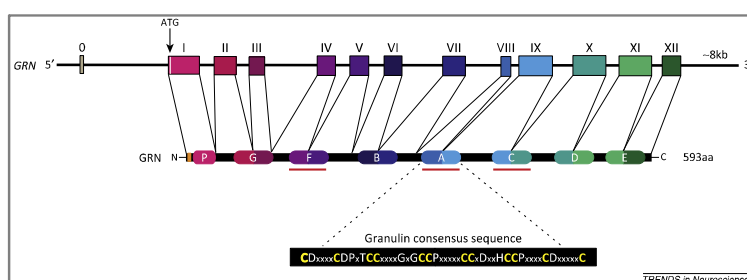
fue 2 veces mayor en mujeres que en varones. En el gen *ABCG2* también se identificó un SNP más fuerte en varones, el rs2199936; tanto este polimorfismo como el rs2231142 mostraron un efecto significativamente mayor en hombres que en mujeres. El tamaño del efecto de los otros SNPs descritos fue comparable en ambos sexos.

8. EL PAPEL DE LA PROGRANULINA EN LA NEURODEGENERACIÓN

8.1. Introducción

La progranulina (PGRN) es una glicoproteína secretada de 593 aminoácidos compuesta por 7,5 repeticiones en tándem de motivos altamente conservados de 12 cisteínas, que puede ser escindida proteolíticamente para formar una familia de péptidos de 6 kDa (granulinas A a G y paragranulina P). Está codificada por el gen *GRN*, localizado en el cromosoma 17q21 (*Figura 6*). Se desconoce en qué medida las diversas funciones biológicas de la PGRN se deben a la proteína precursora completa, a las granulinas (GRNs) o a ambas.

Figura 6. La estructura del gen y la proteína progranulina humana (tomada de *Petkau y Leavitt, 2014*).



La PGRN se expresa ampliamente en las células epiteliales, médula ósea, células inmunes, órganos sólidos y en el sistema nervioso (*Daniel et al, 2000*). En el cerebro, la expresión intracelular es mayor en las neuronas y en la microglía activada (*Petkau et al, 2010*).

Aunque esta proteína ya había sido descubierta varios años antes y se conocían algunas de sus funciones biológicas, adquirió realmente importancia cuando se identificaron mutaciones del gen que la codifica asociadas a una forma de demencia, la degeneración lobar frontotemporal (*Cruts et al, 2006; Baker et al, 2006*).

8.1.1. Mutaciones del gen *GRN*

En la actualidad, la deficiencia en la proteína PGRN en el sistema nervioso central es una causa conocida de neurodegeneración: el déficit parcial de esta proteína en sujetos con mutaciones heterocigotas del gen *GRN* se asocia a la degeneración lobar frontotemporal ubiquitín-positiva (DLFT-u) ligada al cromosoma 17, con inclusiones TDP-43 positivas (*Baker et al, 2006; Cruts et al, 2006*), que es la segunda causa de demencia presenil más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer. El déficit total de la proteína en portadores de mutaciones homocigotas de este gen ha sido relacionado con la lipofuscinosis neuronal ceroida, una enfermedad por depósito lisosomal de aparición en la edad adulta temprana que cursa con pérdida de visión progresiva, distrofia retiniana, ataxia cerebelosa y crisis epilépticas (*Smith et al, 2012*).

Las mutaciones patogénicas del gen *GRN* dan lugar a una rápida degradación de la proteína mutante, lo que llevó a la conclusión de que su asociación con procesos neurodegenerativos como la DLFT era el resultado de un mecanismo de pérdida de proteína funcional o haploinsuficiencia en lugar de un acúmulo de proteína mutante. *In vitro*, la supresión de la expresión de PGRN en cultivos celulares demostró favorecer la escisión de TDP-43 dependiente de caspasas, lo que se tradujo en la acumulación de fragmentos de TDP-43 en el citoplasma de las neuronas y células gliales, que corresponde al sustrato neuropatológico de la DLFT con inclusiones TDP-43 positivas. Estos resultados sugieren que el metabolismo anormal de TDP-43 mediado por la PGRN puede jugar un papel básico en el proceso de neurodegeneración (*Zhang et al, 2007*).

Se han identificado más de 70 mutaciones patogénicas del gen *GRN* hasta la actualidad, de las cuales la mayoría corresponde a mutaciones nulas o *missense*, que resultan en niveles reducidos de PGRN por reducción en la transcripción de la proteína o por alteración de su estructura y estabilidad, respectivamente.

La pérdida completa de un alelo funcional del gen daría lugar a una reducción de, al menos, el 50% de los niveles de progranulina, tanto en el cerebro como en otros fluidos circulantes. De hecho, la reducción de los niveles de proteína puede detectarse en LCR y en sangre periférica (*Ghidoni et al, 2008*). De este modo, la determinación de los niveles de progranulina en el suero constituye un método rápido y poco invasivo que permite conocer de manera indirecta los niveles de la proteína en el SNC, así como predecir con alta sensibilidad y especificidad la presencia de mutaciones de *GRN* en enfermos y portadores asintomáticos. Recientemente, se ha propuesto un valor de corte de progranulina en sangre periférica para la detección de mutaciones de *GRN* de 61,55 mg/ml, con una especificidad del 99,6% y una sensibilidad del 95,8% (*Ghidoni et al, 2012*).

La DLFT asociada a mutaciones del gen *GRN* se caracteriza por presentar una gran heterogeneidad fenotípica, con casos con claro predominio conductual, alteración predominante del lenguaje, signos extrapiramidales prominentes e incluso otras manifestaciones clínicas más atípicas, como alteración precoz de la memoria o fenotipo corticobasal-like (*Kelley et al, 2009*). La variabilidad clínica está presente incluso entre miembros de una misma familia portadores de la misma mutación, dificultando la correlación genotipo-fenotipo.

Por otra parte, diversas mutaciones potencialmente patogénicas de *GRN* han sido identificadas en otras enfermedades neurodegenerativas distintas de la DLFT, incluido en pacientes con diagnóstico clínico de enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer (*Brouwers et al, 2007*), esclerosis lateral amiotrófica (*Sleegers et al, 2008*), síndrome corticobasal (*Masellis et al, 2006*) o demencia por cuerpos de Lewy (*Le Ber et al, 2008*).

Como se describirá con más detalle más adelante, además de las mutaciones patogénicas, variantes genéticas comunes en el gen *GRN* se han asociado con un riesgo aumentado de DLFT (*Rademakers et al, 2008*), EA (*Brouwers et al, 2008; Viswanathan et al, 2009; Chen et al, 2015*) y EP (*Chang et al, 2013; Chen et al, 2015*), así como con una edad de inicio y una progresión más rápida de los síntomas en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (*Sleegers et al, 2008*). Estos hallazgos sugieren que una pérdida parcial de función de la PGRN menor que la que tiene lugar en las mutaciones

patogénicas podría contribuir también a la patogénesis de la DLFT y otras enfermedades neurodegenerativas.

Además, se han identificado polimorfismos genéticos en regiones distintas al gen *GRN* que también parecen influir sobre los niveles de PGRN y el riesgo de enfermedades neurodegenerativas, como los SNPs en el gen *TMEM106b* (Van Deerlin *et al*, 2010) o el polimorfismo rs646776 asociado a *SORT1* (Carrasquillo *et al*, 2010). Estas variantes genéticas, posiblemente junto con factores ambientales, podrían contribuir a explicar el amplio rango que presentan los niveles circulantes de PGRN, incluso en controles sanos, y ayudar a aclarar otras incógnitas como la penetrancia incompleta y la amplia variedad fenotípica que presentan los sujetos portadores de mutaciones de *GRN*.

8.2. Funciones biológicas de la progranulina

La PGRN está implicada en numerosas funciones fisiológicas y participa en multitud de procesos patológicos. Es bien conocido que esta glicoproteína participa en procesos de reparación de heridas, inflamación y formación de tumores, así como en procesos neurodegenerativos; sin embargo, su función exacta en el sistema nervioso central o el mecanismo por el que conduce a la neurodegeneración no están claros. Aunque es un glicoproteína secretada, la PGRN puede actuar a nivel del citoplasma y el núcleo. De hecho, se han descrito más de 20 proteínas que se unen a la PGRN (Jian *et al*, 2013) (Tabla 3), lo que podría explicar en gran medida la amplia variedad de procesos biológicos en los que está implicada.

Fuera del SNC, las principales funciones biológicas en las que se ha implicado a PGRN son la inflamación crónica (Zhu *et al*, 2002; Kojima *et al*, 2009; Kessenbrock *et al*, 2008), la regulación del sistema inmune y la infección (Lazuardi *et al*, 2009; Park *et al*, 2011, Zhu *et al*, 2002), la reparación de heridas (Zhu *et al*, 2002; He *et al*, 2003), la tumorigénesis (He y Bateman, 1999; He *et al*, 2002; Tangkeangsirisin y Serrero, 2004), la embriogénesis (Diaz-Cueto *et al*, 2000, Suzuki y Nishiahara, 2002), la condrogénesis (Feng *et al*, 2010), la aterosclerosis (Kojima *et al*, 2009; Yoo *et al*, 2013) y la resistencia a la insulina y obesidad (Matsubara *et al*, 2012; Qu *et al*, 2013).

Tabla 3. Proteínas que interaccionan con Progranulina (adaptada de *Jian et al, 2013*).

Proteínas asociadas a PGRN	Sitios de interacción	Dominios de interacción	Función
ADAMTS7	Matriz extracelular	GRN A-G	Inhibición de la actividad de ADAMTS7
ADAMTS12	Matriz extracelular	GRN A-G	Inhibición de la actividad de ADAMTS12
COMP	Matriz extracelular	GRN A	COMP favorece la proliferación inducida por PGRN
Perlecan dominio V	Matriz extracelular	GRN F+B	Promueve el crecimiento tumoral
HDL/apo A-I	Circulación	Desconocido	HDL inhibe la conversión de PGRN en GRN
SLPI	Circulación	Desconocido	Conversión de PGRN en GRN
Tat (de HIV-1, HIV-2 y CAEV)	Circulación	GRN B+A	Desconocido
TNFR1 y TNFR2	Membrana	GRN F+A+C	Inhibición de la señalización de TNF α
TLR9	Membrana	GRN ACDE	Ayuda a la unión de CpG a TLR9
Sortilina	Membrana	GRN E	Entrega la PGRN al lisosoma para su degradación
Hexokinasa	Citoplasma	Desconocido	Desconocido
TPM3	Citoplasma	Desconocido	Favorece la hepatocarcinogénesis
BiP, calreticulina, GRP94, ERp57, ERp5, HSP70	Retículo endoplásmico	Desconocido	Funcionamiento en red de las chaperonas
Ciclina T1	Núcleo	GRN PFGBA DE	Inhibición de la transcripción
Tat de HIV	Núcleo	GRN PFGBA DE	Inhibición de la transcripción

ADAMTS: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs; apo A-I: apolipoproteína A-I; BiP: immunoglobulin heavy chain binding protein; CAEV: caprine arthritis encephalitis virus; CpG: cytosine-guanine sites; COMP: cartilage oligomeric matrix protein; ERp57: endoplasmic reticulum protein 57; GRN: granulina; GRP94: glucose-regulated protein 94; HDL: high density lipoprotein; HIV: human immunodeficiency virus; HSP70: heat shock protein 70; PGRN: progranulina; SLPI: secretory leukocyte protease inhibitors; Tat: trans-activator of transcription; TLR9: toll-like receptor 9; TNFR: tumor necrosis factor receptor.

8.2.1. Funciones biológicas de la progranulina en el SNC

8.2.1.a. Expresión de progranulina en el cerebro

La expresión de PGRN en el cerebro es baja en las fases tempranas del desarrollo y aumenta con la edad (*Petkau et al, 2010; Matsuwaki et al, 2011*). En el cerebro adulto, se expresa principalmente en las neuronas maduras y en la microglía, aunque también puede estar presente en niveles más bajos en astrocitos y células endimarias (*Ahmed et al, 2010*). Numerosos estudios han demostrado que, en respuesta a un daño o insulto, la microglía activada estimula la expresión de PGRN (*Tanaka et al, 2013*).

También se ha detectado intensa expresión de PGRN tanto en pacientes como en modelos animales de diversas enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica (*Malaspina et al, 2001; Philips et al, 2010*), la demencia por cuerpos de Lewy (*Revuelta et al, 2008*), la EA (*Gliebus et al, 2009; Pereson et al, 2009*) y la esclerosis múltiple (*Vercellino et al, 2011*).

En sujetos con DFLT portadores de mutaciones de pérdida de función de *GRN* se encontró que, como era de esperar, en las áreas cerebrales con escasa o nula patología los niveles de RNAm de *GRN* estaban significativamente reducidos. Por el contrario, en las áreas con mayor patología los niveles de RNAm de *GRN* estaban aumentados, y el incremento se correlacionaba tanto con el número como con el estado de activación de la microglía (*Chen-Plotkin et al, 2010*).

Las numerosas evidencias del incremento en la expresión de PGRN en la microglía activada tras diversos tipos de lesión aguda o crónica, incluso en portadores de mutaciones de pérdida de función del gen *GRN*, indican que la PGRN juega un papel importante en los procesos neurodegenerativos.

8.2.1.b. Funciones de progranulina en las neuronas

▪ Función neurotrófica / Desarrollo de neuritas

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la PGRN, a través de la proteína completa o bien de su escisión en GRNs, puede actuar como un factor de crecimiento neurotrófico. Tanto la forma larga de la PGRN como la granulina E promueven el desarrollo de las neuritas en cultivos murinos de neuronas corticales y motoras, incrementando la viabilidad y supervivencia neuronal (*Van Damme et al, 2008; Ryan et al, 2009*).

Confirmando estos hallazgos, en cultivos de neuronas del hipocampo derivados de ratones *GRN^{-/-}* se demostró una reducción en la arborización de las neuritas, que podía ser revertida mediante el tratamiento con PGRN recombinante (*Gass et al, 2012*).

Dado que la expresión de PGRN en el cerebro en desarrollo es muy baja, se ha propuesto que el papel de la PGRN estimulando el desarrollo de las neuritas podría ser más relevante en el contexto de la plasticidad y remodelación de las neuritas en el cerebro adulto.

▪ Agregación de TDP-43

La relación entre la disminución de los niveles de PGRN en la DLFT-u y la patología TDP-43 no está clara. Algunos grupos han observado alteraciones en la localización y/o escisión del TDP-43 por la caspasa 3 mediada por PGRN (*Zhang et al, 2007; Guo et al, 2010; Kleinberger et al, 2010*), pero los resultados han sido contradictorios en diversos estudios.

Por otro lado, el TDP-43 es una proteína de unión al RNA capaz de unirse a moléculas de RNAm de *GRN* en el citoplasma y desestabilizarlo, y se ha postulado que esta acción podría disminuir los niveles de PGRN (*Colombrita et al, 2012*). Este mecanismo puede representar un bucle en el que los niveles reducidos de PGRN contribuirían al estrés celular, causando una mislocalización de TDP-43 al citoplasma, lo que daría lugar, a su vez, a una reducción en los niveles de PGRN debido a interacciones entre TDP-43 y RNAm de *GRN*, y ambos acontecimientos derivarían finalmente en el proceso de neurodegeneración (*Petkau y Leavitt, 2014*).

▪ Sortilina y PGRN

La sortilina es una proteína transmembrana presente en neuronas con varios ligandos identificados, como el factor neurotrófico pro-NGF (*pro-nerve growth factor*) y el neuropéptido neurotensina. La sortilina se une a la PGRN y facilita su endocitosis y rápido transporte al lisosoma (*Hu et al, 2010*), por lo que se ha propuesto que actúa como un receptor específico para PGRN en neuronas. De este modo, la endocitosis mediada por sortilina regula los niveles de PGRN en el espacio extracelular.

Sin embargo, algunas de las propiedades neurotróficas de la PGRN son independientes de la presencia de sortilina (*Gass et al, 2012; De Muynck et al, 2013*). Por tanto, el papel de la sortilina en la biología de la PGRN podría limitarse al control de los niveles extracelulares de esta proteína, lo que sería en sí mismo un factor importante para la patogénesis de la DLFT.

▪ Papel en las sinapsis

Las evidencias sobre el papel de la PGRN en la biología de las sinapsis son cada vez más numerosas.

Se ha observado una alteración en el número y en la probabilidad de liberación de vesículas sinápticas en determinadas sinapsis tanto en cultivos celulares de hipocampo de roedores con deficiencia de PGRN (*Petkau et al, 2012*) como en cerebros postmortem de sujetos con DLFT portadores de mutaciones patogénicas del gen *GRN* (*Tapia et al, 2011*).

Por otra parte, se ha demostrado que la PGRN es secretada en las sinapsis, y que esta secreción está regulada por el grado de actividad neuronal; además, el tratamiento con PGRN recombinante produce un incremento en la densidad sináptica, disminuye el tamaño del compartimento sináptico y reduce el número de vesículas sinápticas por sinapsis (*Petoukhov et al, 2013*). Esto indica que la secreción de PGRN dependiente de la actividad neuronal permite regular el número y estructura de las sinapsis, y apoya el papel de esta proteína en la biología de las sinapsis.

▪ Respuesta al estrés / daño neuronal agudo

El papel de la PGRN en respuesta a diversos agentes estresantes exógenos ha sido ampliamente estudiado, y los datos que apoyan el papel de esta proteína sobre la muerte neuronal inducida por el estrés causado por agentes externos son numerosos.

La deficiencia de PGRN en cultivos neuronales murinos produjo un incremento de la sensibilidad al H₂O₂ y de la excitotoxicidad mediada por NMDA (*Guo et al, 2010*). En neuronas diferenciadas derivadas de células pluripotentes procedentes de portadores de mutaciones de *GRN* se ha demostrado una sensibilidad aumentada a los inhibidores de kinasas (*Almeida et al, 2012*). En ratones *GRN*^{-/-}, la administración de MPTP, ejemplo de modelo químico de enfermedad de Parkinson, provocó un mayor índice de muerte neuronal en la sustancia negra (*Martens et al, 2012*).

Por otra parte, en cultivos de neuronas del hipocampo de ratas, la PGRN se comporta como un factor protector frente a la neurotoxicidad causada por beta-amiloide

1-42 (Ab₁₋₄₂) (Kim *et al*, 2012). Este hallazgo ha sido recientemente confirmado en un modelo animal de ratón de enfermedad de Alzheimer, en el que la PGRN demostró inhibir el depósito de Ab₁₋₄₂ y proteger frente a la toxicidad causada por las placas amiloides en el hipocampo (Minami *et al*, 2014).

In vivo, la sobreexpresión de PGRN en el cerebro es un factor protector frente al daño vascular producido por la oclusión de la arteria cerebral media (Tao *et al*, 2012).

La expresión tanto de la forma completa de la proteína como de las GRNs y sus fragmentos intermedios se encontró inducida de manera significativa tras la lesión aguda de la médula espinal y el ganglio de la raíz dorsal en ratones, especialmente en las neuronas del asta anterior y posterior y en la microglía activada. Los ratones *GRN*^{-/-} desarrollaron una hipersensibilidad nociceptiva más intensa tras la lesión nerviosa, y presentaron una menor supervivencia neuronal y menor desarrollo de neuritas (Lim *et al*, 2012).

8.2.1.c. Funciones de progranulina en la microglía

▪ Función antiinflamatoria

Aunque el número de estudios que han examinado directamente el papel de la PGRN en la microglía es limitado, las evidencias sugieren una función principalmente antiinflamatoria.

A nivel del sistema nervioso central, la expresión de PGRN es inducida por estímulos inflamatorios en la microglía (Tanaka *et al*, 2013). En respuesta a la estimulación a través de diversos receptores TLR (*Toll-like receptors*), en modelos animales *GRN*^{-/-} los macrófagos (Yin *et al*, 2010) y las células de la microglía (Suh *et al*, 2012; Martens *et al*, 2012) producen y secretan cantidades más altas de citocinas, que resultan citotóxicas para las neuronas.

In vivo, se han observado resultados similares en modelos murinos con deficiencia de PGRN, en los que se producía un mayor índice de muerte celular en la sustancia negra en respuesta a la administración de MPTP (Martens *et al*, 2012).

En la esclerosis múltiple, un clásico ejemplo de neuroinflamación, se detectó una expresión aumentada de esta proteína en la microglía de las placas desmielinizantes activas en estudios postmortem, así como niveles más altos de PGRN en el LCR durante los brotes y en las formas progresivas de la enfermedad (*Vercellino et al, 2011*).

▪ **Factor quimiotáctico**

La PGRN también se comporta como un factor quimiotáctico para la microglía ante diversas situaciones. Se ha observado un incremento en la cantidad de microglía activada alrededor del punto de inyección tras la administración intracortical de PGRN en ratones (*Pickford et al, 2011*).

En ratas, la administración de PGRN recombinante en el hipocampo no produjo un incremento en el número total de microglía, pero aumentó la proporción de microglía activada tras un estatus epiléptico inducido por pilocarpina (*Zhu et al, 2013*).

▪ **Papel en la fagocitosis**

Por último, la PGRN parece estar implicada en los procesos de endocitosis en macrófagos y microglía. En cultivos de células animales con deficiencia para el gen *GRN* se observó un incremento en el aclaramiento fagocítico de células apoptóticas y otros sustratos fisiológicos y no fisiológicos (*Kao et al, 2011*).

Por otro lado, la presencia de PGRN recombinante en la microglía de ratones demostró favorecer la endocitosis del péptido Ab₁₋₄₂ (*Pickford et al, 2011*).

8.3. La progranulina en la enfermedad de Parkinson

Desde el descubrimiento de la asociación entre mutaciones del gen *GRN* y la DLFT, y las múltiples evidencias descritas previamente de su implicación en la neurodegeneración, han surgido numerosos trabajos tratando de establecer un posible papel de esta proteína en otros procesos neurodegenerativos, incluida la enfermedad de Parkinson.

Además, aunque la DLFT asociada a mutaciones de *GRN* muestra una gran variedad fenotípica, la aparición de signos parkinsonianos tanto al inicio como durante el curso de la enfermedad es un hecho frecuente, a veces difícil de distinguir de la enfermedad de Parkinson. Incluso se ha descrito un caso con una mutación de *GRN* que debutó con un cuadro de parkinsonismo asimétrico indistinguible de una EP idiopática, y desarrolló en los dos años posteriores deterioro cognitivo y alteración del lenguaje, así como atrofia frontoparietal asimétrica leve en la RMN craneal, siendo finalmente diagnosticado de DLFT. En este sujeto, el DaTSCAN demostró un déficit asimétrico de los transportadores dopaminérgicos presinápticos en el putamen, hallazgo característico de la EP (*Carecchio et al, 2014*).

En este campo, los trabajos publicados hasta la fecha que estudian la asociación entre la PGRN y la EP son muy escasos, y sus resultados son contradictorios.

8.3.1. Mutaciones de *GRN* y enfermedad de Parkinson

Un estudio belga que incluyó pacientes con diagnóstico clínico de DLFT, EA y EP identificó una mutación de pérdida de función de *GRN* en uno de los sujetos con EP y en dos con EA. Posteriormente relacionaron a estos tres individuos con una amplia familia fundadora en la que la mayoría de los miembros afectados se correspondían clínicamente con cuadros de DLFT. El paciente con criterios clínicos de EP desarrolló en los años siguientes un deterioro cognitivo de predominio frontal y alteraciones conductuales que eran compatibles clínicamente con el diagnóstico de DLFT. En el estudio postmortem se identificó una combinación de patología de cuerpos de Lewy y hallazgos patológicos severos característicos de DLFT-u. Los sujetos diagnosticados de EA también presentaban neuropatología concomitante de EA y DLFT (*Brouwers et al, 2008*). Como conclusión, estos autores determinaron que las mutaciones nulas de PGRN no son una causa mayor de EP ni de EA, aunque pusieron de manifiesto la heterogeneidad clínica intrafamiliar de estas mutaciones. Además, plantearon la duda de que la manifestación clínica en forma de EP o EA pudiera ser explicada por un espectro fenotípico amplio de las mutaciones de *GRN*, o bien que la coexistencia de DLFT y EP o EA pudiese deberse a otros factores dependientes de la edad.

Este mismo grupo identificó en la misma cohorte de 255 pacientes con EP variantes genéticas de *GRN* en 20 de los sujetos (7,84%). Estas variantes genéticas habían sido descritas en otras enfermedades neurodegenerativas e incluso estaban presentes en un pequeño porcentaje del grupo control. Además, no encontraron asociación significativa entre ninguno de los polimorfismos genéticos y el riesgo de EP (Nuytemans *et al*, 2008). En línea con su trabajo anterior, concluyeron que es improbable que la variabilidad genética de *GRN* contribuya de manera significativa a la susceptibilidad de la EP. No obstante, plantearon la hipótesis de que los niveles reducidos de PGRN podrían contribuir a formas más tempranas y severas de la enfermedad en sujetos portadores de mutaciones conocidas causantes de EP, aunque ninguno de los sujetos con variaciones genéticas en la PGRN en su cohorte era portador de ninguna de las mutaciones frecuentes de EP.

Otro trabajo realizado en 68 sujetos con DLFT detectó una delección heterocigota en el gen *GRN* en un caso confirmado neuropatológicamente. El caso índice tenía varios familiares de primer grado afectados de demencia presenil, ya fallecidos. La misma alteración genética estaba presente en una hermana viva del paciente, que cumplía criterios clínicos de EP de 5 años de evolución, sin deterioro cognitivo ni alteraciones conductuales que hicieran sospechar una DLFT (Rovelet-Lecrux *et al*, 2008). En este contexto, los autores sugirieron que la haploinsuficiencia de *GRN* podría desencadenar distintos patrones de neurodegeneración, manifestándose clínicamente de forma heterogénea incluso dentro de una misma familia en función de la localización predominante del daño neuronal.

8.3.2. Niveles séricos de progranulina y enfermedad de Parkinson

Nuestro grupo elaboró recientemente un trabajo para determinar si existía asociación entre los niveles plasmáticos de PGRN y el riesgo de diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la EP. Sólo el grupo de 304 sujetos con EP presentó niveles de PGRN significativamente más bajos que el grupo control (319,6 ng/ml vs 371,5 ng/ml; $p=0,009$). Para intentar entender mejor la variabilidad de los niveles circulantes de PGRN, genotipamos dos variantes genéticas comunes que habían sido descritas previamente que modificaban dichos niveles: rs5848 (Hsiung *et al*, 2011) y

rs646776 (*Carrasquillo et al, 2010*). En nuestra cohorte, el alelo menor de rs646776 se asoció a niveles plasmáticos más bajos de PGRN en todos los grupos. Sin embargo, no observamos asociación entre el polimorfismo rs5848 y los niveles de PGRN en ninguna de las poblaciones estudiadas (*Mateo et al, 2013*).

Hasta la fecha, éste es el único trabajo publicado analizando la asociación entre los niveles plasmáticos de PGRN y el riesgo de EP. Además, considerando que la mayor parte de las mutaciones patogénicas de *GRN* se traducen en una reducción de los niveles circulantes de PGRN, secuenciamos este gen en aquellos sujetos que mostraron los niveles sanguíneos de PGRN más bajos (<140 ng/ml). De las 32 muestras secuenciadas, encontramos 11 variantes genéticas en 24 sujetos. No detectamos ninguna mutación nula, y únicamente identificamos una mutación *missense* en un individuo con fenotipo clínico de síndrome corticobasal.

En nuestra opinión, esto apoya el hecho de que las mutaciones de *GRN* probablemente tienen una baja prevalencia en fenotipos distintos de la DLFT (*Rodríguez-Rodríguez et al, 2013*).

8.3.3. Niveles séricos de progranulina y *LRRK2*

Un estudio reciente puso de manifiesto una posible relación entre mutaciones del gen *LRRK2* causantes de EP y la PGRN (*Caesar et al, 2014*). Este trabajo identificó la existencia de una interacción a nivel intracelular entre la proteína *lrrk2* y la PGRN, así como de una influencia significativa sobre la secreción de PGRN en sujetos portadores de las mutaciones más frecuentes de *LRRK2* (G2019S y R1441C/G). La presencia de estas mutaciones demostró reducir la secreción de PGRN en cultivos celulares de células inmunitarias de ratones, incluidas células de la microglía. Además, detectaron niveles más bajos de PGRN en el LCR de ratones en fases presintomáticas o tempranas de la enfermedad. Sin embargo, los niveles de PGRN estaban aumentados en el LCR en fases más tardías en ratones, y también en humanos portadores de dichas mutaciones. Los niveles séricos de PGRN no diferían en los sujetos con EP asociada a mutaciones de *LRRK2* respecto a pacientes con EP idiopática o controles.

Estos autores concluyeron que los niveles reducidos de PGRN podrían tener una importancia fisiopatológica en fases tempranas de la enfermedad, mientras que el aumento en los niveles en estadios más avanzados podría corresponder a un mecanismo compensador para intentar reducir el proceso neuroinflamatorio/neurodegenerativo.

Hasta la actualidad, no encontramos en la literatura otros trabajos que investiguen la relación entre mutaciones asociadas a la EP y los niveles de PGRN.

8.4. Factores genéticos reguladores de los niveles de progranulina

▪ *GRN* (rs5848)

El polimorfismo rs5848 se localiza en el extremo terminal 3' UTR del gen *GRN*, y corresponde a un sitio de unión para el micro-RNA (miRNA) miR-659. Se ha propuesto que rs5848 podría modificar los niveles de PGRN alterando la regulación de la expresión de *GRN* a través de miR-659. La presencia del alelo menor T de rs5848 contribuiría a una unión más fuerte del miR-659 al RNAm de *GRN*, lo que resultaría en una inhibición más eficiente de la traslación de *GRN* y, de este modo, a una reducción en la expresión de *GRN*.

Este SNP fue identificado por primera vez en una cohorte de 378 sujetos con DLFT. En esta población, el genotipo TT se encontraba significativamente incrementado en los pacientes con DLFT (*Rademakers et al, 2008*). Además, estos autores detectaron una reducción significativa de los niveles de PGRN del 30% en el cerebro de los portadores del genotipo TT respecto al CC.

El papel de rs5848 como regulador de los niveles plasmáticos de PGRN ha sido confirmado en estudios posteriores (*Hsiung et al, 2011; Nicholson et al, 2014*). Sin embargo, nuestro grupo no detectó asociación entre este polimorfismo y los niveles de PGRN en una cohorte de 778 sujetos compuesta por 304 individuos que cumplían criterios clínicos de EP, 217 de EA, 131 de deterioro cognitivo leve y 126 controles (*Mateo et al, 2013*).

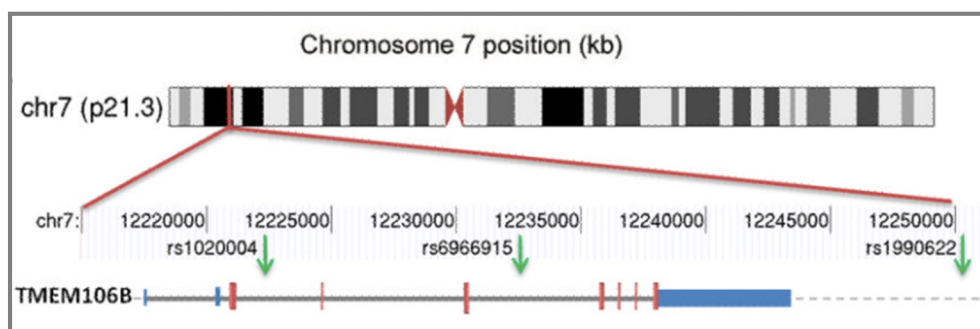
Otros estudios no han podido replicar la asociación entre la variante genética común rs5848 y el riesgo de DLFT (*Rollinson et al, 2011; Simón-Sánchez et al, 2009*), por lo que su contribución a la etiología de la DLFT aún no está clara.

Un metaanálisis reciente de 16 estudios de casos y controles investigó la posible asociación entre rs5848 y el riesgo de diversas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo DLFT, EA, EP y esclerosis lateral amiotrófica. Este trabajo encontró que rs5848 se asociaba con un riesgo aumentado de enfermedades neurodegenerativas en los modelos homocigoto y recesivo. El análisis estratificado demostró asociación de rs5848 con un mayor riesgo de EA y EP en ambos modelos (*Chen et al, 2015*).

▪ ***TMEM106b* (rs6966915, rs1020004 y rs1990622)**

Varios polimorfismos en el gen *TMEM106b* asociados a la DLFT-u fueron identificados en un GWA que incluía 515 casos confirmados neuropatológica y/o genéticamente y 2509 controles (*Van Deerlin et al, 2010*). En este estudio, 3 SNPs alcanzaron significación genómica tras corrección por Bonferroni: rs6966915, rs1020004 y rs1990622, siendo este último el que mostraba una asociación más fuerte. Los 3 SNPs se localizaban muy próximos en la región 7p21.3, que corresponde al gen *TMEM106b* (*Figura 7*). La identificación de 3 variantes genéticas comunes localizadas con tanta proximidad en la región 7p21.3 apoya fuertemente la existencia de una asociación entre este *locus* y el gen *TMEM106b* con la DLFT-u.

Figura 7. Región de asociación genómica en 7p21 (adaptada de *Van Deerlin et al, 2010*).



Localización de los 3 SNPs (flechas verdes) en relación a la estructura del gen *TMEM106b* y su localización en el cromosoma 7.

Además, estos autores encontraron que la expresión de *TMEM106b* estaba incrementada 2,5 veces en el cerebro de los pacientes respecto a los controles, y los individuos portadores de alelos de riesgo mostraban una expresión mayor de este gen. Adicionalmente, observaron que los sujetos homocigotos para el alelo A presentaban una forma más severa de la enfermedad.

Estos resultados han sido replicado en estudios posteriores (*Finch et al, 2011; Van der Zee et al, 2011; Nicholson et al, 2013*).

TMEM106b es una glicoproteína transmembrana tipo 2 de 274 aminoácidos que se localiza primariamente en la membrana de los endosomas tardíos y los lisosomas en el cuerpo neuronal y en las dendritas (*Lang et al, 2012; Chen-Plotkin et al, 2012; Brady et al, 2013*). Como ha sido descrito en otros trabajos, su expresión se encuentra incrementada en el cerebro de sujetos con DLFT-u, particularmente en portadores de mutaciones del gen *GRN* (*Finch et al, 2011; Nicholson et al, 2013*). Aunque su función no está clara, se conoce que la expresión de *TMEM106b* se encuentra reprimida por los micro-RNAs miR-132/212, cuya expresión está claramente reducida en el cerebro de sujetos con DLFT. Por mecanismos aún desconocidos, la sobreexpresión resultante de TMEM106b daría lugar a la inhibición de la función lisosomal. TMEM106b se colocaliza en estas organelas con la PGRN y, como consecuencia, se produciría un secuestro de PGRN en los endosomas tardíos y en los lisosomas, y se incrementarían los niveles intracelulares de PGRN. De este modo, TMEM106b alteraría las vías metabólicas de la PGRN, lo que podría explicar su papel en la patogenia de la DLFT-u (*Chen-Plotkin et al, 2012*).

Por otra parte, TMEM106b también podría estar implicada en la morfogénesis y mantenimiento de las dendritas controlando el tráfico lisosomal a través de éstas (*Schwenk et al, 2014*). Estos cambios derivarían en una debilidad de las uniones sinápticas y una alteración en la plasticidad sináptica, los cuales son hallazgos comunes en las enfermedades neurodegenerativas y han sido descritos en la DLFT-u (*Petkau et al, 2012*).

La implicación de la disfunción lisosomal en la patogenia de la DLFT se encuentra reforzada por el hecho de que varias de las mutaciones asociadas a la DLFT resultan en la acumulación de vacuolas de gran tamaño y en un defecto en el transporte

endolisosomal o en la maduración del autofagosoma (*Lee et al, 2007; Han et al, 2012*). Además, se ha descrito que la PGRN participa en la regulación de las funciones del lisosoma (*Belcastro et al, 2011*). De hecho, los pacientes con mutaciones homocigotas del gen *GRN* presentan un cuadro clínico denominado lipofuscinosis neuronal ceroida, que corresponde a una enfermedad por depósito caracterizada por una disfunción lisosomal (*Smith et al, 2012*).

A parte de en la DLFT, el papel de los polimorfismos genéticos de *TMEM106b* ha sido estudiado en otras enfermedades neurodegenerativas. Los genotipos de *TMEM106b* parecen influir sobre el desarrollo de deterioro cognitivo en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (*Vass et al, 2011*). También se ha encontrado una frecuencia reducida del alelo protector C del SNP rs1990622 en sujetos con EA confirmada neuropatológicamente que presentaban co-patología TDP-43 (*Rutherford et al, 2012*). Dos trabajos recientes determinaron que el riesgo de EA está significativamente influido por la interacción entre *apoE* y variantes genéticas en *TMEM106b* (*Lu et al, 2014; Jun et al, 2015*). Además, se han encontrado niveles de expresión de *TMEM106b* significativamente reducidos en cerebros de pacientes con EA (*Sato et al, 2014*). Por tanto, todas estas observaciones sugieren que *TMEM106b* podría participar en la patología no sólo de la DLFT-u, sino también de otras enfermedades neurodegenerativas. Su posible papel en la enfermedad de Parkinson no ha sido estudiado específicamente.

▪ **rs646776-SORT1**

El polimorfismo rs646776 fue identificado por primera vez en un GWA como un factor regulador mayor de los niveles circulantes de LDL-colesterol (*Sandhu et al, 2008*). Poco tiempo después, este SNP fue identificado nuevamente en otro GWA de niveles plasmáticos de PGRN en una cohorte de 533 sujetos sanos. En este estudio, cada copia del alelo menor C se asociaba a una reducción de los niveles plasmáticos de PGRN de aproximadamente un 16% (*Carrasquillo et al, 2010*).

El SNP rs646776 se encuentra en el *locus* 1p13.3, y es un factor regulador de la expresión de varios genes localizados en proximidad en la misma región cromosómica. De todos ellos, presenta una asociación más robusta con los niveles de RNAm de

SORT1, llegando a explicar hasta el 86% de la variabilidad interindividual en la expresión de este gen (*Kathiresan et al, 2008*).

El gen *SORT1* codifica para una proteína transmembrana denominada sortilina. La sortilina es un miembro de una familia de receptores neuronales definido por un dominio VPS10 (*vacuolar protein sorting 10*), que se une a factores neurotróficos y neuropéptidos y regula el tráfico intracelular de diversas proteínas. Además, está implicada en el inicio del proceso de apoptosis neuronal a través de su unión al receptor neurotrófico p75 (*Hermey, 2009*).

La sortilina ha sido identificada como el principal sitio de unión neuronal para la PGRN. La PGRN se une a la sortilina en la superficie celular y es rápidamente endocitada y transportada a los lisosomas. La endocitosis de PGRN mediada por sortilina es un determinante mayor de los niveles de PGRN en los compartimentos intra y extracelular, por lo que esta proteína podría tener un papel importante en la patogénesis de la DLFT (*Hu et al, 2010*).

Sin embargo, en base a los mecanismos de acción de otras variantes genéticas localizadas en el mismo *locus* y que también han demostrado tener un papel regulador de la expresión de *SORT1* (*Musunuru et al, 2010*), se ha sugerido que la influencia de rs646776 sobre la expresión de RNAm de *SORT1* podría tener lugar específicamente a nivel hepático. Esto se traduciría en que rs646776 influiría sobre los niveles periféricos de PGRN a través de la regulación de los niveles de RNAm de *SORT1* en el hígado, pero es poco probable que tuviese un efecto sobre los niveles de PGRN en el cerebro. El hecho de que algunos factores pudiesen regular los niveles de PGRN de una manera tejido- u órgano-específica sugiere que los niveles plasmáticos de PGRN podrían no reflejar de una forma precisa los niveles de PGRN en el cerebro. Esto es contrario a lo que ocurre ante la presencia de mutaciones patogénicas del gen *GRN*, en las que los niveles de PGRN se encuentran reducidos a todos los niveles, y podría explicar algunos de los resultados inesperados en la literatura, como la falta de asociación entre los niveles plasmáticos reducidos de PGRN y el riesgo de DLFT en algunos trabajos, o la ausencia de asociación con la edad de inicio de los síntomas en familias portadoras de mutaciones del gen *GRN* (*Carrasquillo et al, 2010*).

Un estudio más reciente encontró que rs646776 se asociaba con los niveles plasmáticos de PGRN, pero no con los niveles de esta proteína en el LCR (*Nicholson et al, 2014*). Estos resultados apoyan la hipótesis de *Carrasquillo et al* de que la regulación de los niveles de PGRN por este polimorfismo podría tener lugar exclusivamente a nivel periférico, y que las concentraciones plasmáticas de PGRN podrían no predecir con exactitud los cambios en los niveles de PGRN en el cerebro.

Nuestro grupo intentó replicar la asociación del polimorfismo rs646776 con los niveles séricos de PGRN en una población heterogénea de sujetos con diversas enfermedades neurodegenerativas, incluidos sujetos con EA, EP y DCL. El alelo menor G de rs646776 se asociaba con niveles más bajos de PGRN en un modo dosis génica-dependiente en las 3 poblaciones estudiadas. Sin embargo, la frecuencia de los distintos genotipos de este polimorfismo no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos (*Mateo et al, 2013*).

Hasta la actualidad, este trabajo es el único publicado en la literatura que investiga la posible influencia de la variante genética rs646776 sobre el riesgo de enfermedades neurodegenerativas, incluida la EP.

II. HIPÓTESIS

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente, y su prevalencia se encuentra en constante aumento debido al envejecimiento progresivo de la población. En ausencia de un tratamiento curativo, el conocimiento de los mecanismos patogénicos que influyen en la aparición y la progresión de la enfermedad adquiere una gran importancia.

Por otro lado, la demencia es una de las manifestaciones más invalidantes en la EP, para la que además no existe tratamiento específico en la actualidad. La posibilidad de conocer los factores modificables que pueden influir en el riesgo de aparición de demencia en estos pacientes nos proporcionaría la ventaja de poder intervenir precozmente sobre ellos.

El campo de los biomarcadores en la EP y en las enfermedades neurodegenerativas en general tiene un enorme interés en la actualidad. Numerosas investigaciones se centran en la búsqueda de biomarcadores genéticos de riesgo y de marcadores bioquímicos de progresión de la enfermedad que puedan ser aplicables tanto a la identificación temprana de individuos en riesgo como a la monitorización de la progresión de la enfermedad. Los niveles de ácido úrico y progranulina son farmacológicamente modificables. Si se demostrara su utilidad como biomarcadores se abriría una puerta para posibles fármacos modificadores de la progresión de la enfermedad.

Los factores genéticos de los que dependen en gran medida los niveles de uricemia en el organismo han sido identificados recientemente, y apenas se han publicado estudios relacionando los mismos con el riesgo o con la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

En el caso de la progranulina, las mutaciones patogénicas se asocian a una pérdida de función teórica de al menos el 50%. En este sentido, es lógico pensar que variantes genéticas en el gen *GRN* asociadas a disminuciones menores de los niveles de proteína en el suero también podrían incrementar el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas e influir sobre su progresión.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Nuestra principal hipótesis de trabajo es que los niveles séricos de ácido úrico y de progranulina pueden tener una influencia sobre el riesgo de enfermedad de Parkinson y su fenotipo. La demostración de que las variaciones en los genes que influyen sobre los niveles plasmáticos de ambas moléculas se asocian también con la enfermedad apoyaría una relación de causalidad.

III. OBJETIVOS

1. Estudiar si existe una asociación entre los niveles séricos de ácido úrico y el riesgo de EP.
2. Investigar si los niveles séricos de ácido úrico se asocian con el fenotipo de la EP (edad de inicio, subtipo clínico, progresión clínica y aparición de demencia).
3. Determinar si existe relación entre los polimorfismos de los genes *SLC2A9*, *ABCG2*, *SLC17A1*, *SLC22A11*, *SLC22A12*, *GCKR*, *PDZK1*, *LRRC16A+SCGN* y *SLC16A9* y los niveles séricos de ácido úrico.
4. Analizar si los polimorfismos de los genes *SLC2A9*, *ABCG2*, *SLC17A1*, *SLC22A11*, *SLC22A12*, *GCKR*, *PDZK1*, *LRRC16A+SCGN* y *SLC16A9*, solos o analizados en conjunto, modifican significativamente el riesgo de EP.
5. Comprobar si los polimorfismos de los genes *SLC2A9*, *ABCG2*, *SLC17A1*, *SLC22A11*, *SLC22A12*, *GCKR*, *PDZK1*, *LRRC16A+SCGN* y *SLC16A9*, solos o analizados en conjunto, se asocian al fenotipo de la EP (edad de inicio, subtipo clínico, progresión clínica y aparición de demencia).
6. Estudiar si existe una asociación entre los niveles séricos de progranulina y el riesgo de EP.
7. Determinar si los niveles séricos de progranulina se asocian con el fenotipo de la EP (edad de inicio, subtipo clínico, progresión clínica y aparición de demencia).
8. Investigar si existe relación entre los polimorfismos de los genes *GRN*, *TMEM106b* y rs646776-*SORT1* y los niveles séricos de progranulina.
9. Analizar si los polimorfismos de los genes *GRN*, *TMEM106b* y rs646776-*SORT1*, solos o analizados en conjunto, modifican significativamente el riesgo de EP.
10. Comprobar si los polimorfismos de los genes *GRN*, *TMEM106b* y rs646776-*SORT1*, solos o analizados en conjunto, se asocian al fenotipo de la EP (edad de inicio, subtipo clínico, progresión clínica y aparición de demencia).

IV. METODOLOGÍA

1. PACIENTES

El estudio incluyó una muestra total de 1061 pacientes diagnosticados de enfermedad de Parkinson según los criterios del Banco de Cerebros de Londres (43,6% mujeres, edad media de inicio de los síntomas: $59,5 \pm 1,9$ años, edad media al estudio: $68,9 \pm 0,3$ años). Los pacientes fueron reclutados consecutivamente en las Consultas Externas de Neurología de tres centros médicos españoles entre los años 2004 y 2012: el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander), el Hospital Donostia (San Sebastián) y el Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla). El grupo control estaba constituido por 754 sujetos sanos reclutados de los mismos centros (49,6% mujeres, edad media al estudio: $64,7 \pm 0,4$ años), 188 de ellos cónyuges sanos de pacientes con enfermedad de Parkinson, y el resto sujetos sanos no relacionados. Ninguno de los controles tenía evidencias clínicas de enfermedad neurológica. Ambos grupos eran de raza caucásica y compartían similares características demográficas.

En todas las muestras se genotiparon los nueve polimorfismos genéticos relacionados con los niveles séricos de AU identificados en el metaanálisis de Kolz et al. Los niveles séricos de ácido úrico fueron determinados en una subpoblación de 365 pacientes con EP (43% mujeres, edad media de inicio de los síntomas: $64,8 \pm 0,6$ años, edad media al estudio: $70,2 \pm 0,5$ años) y 132 controles (68,2% mujeres, edad media al estudio: $65,2 \pm 0,8$ años), correspondientes a la cohorte local.

El genotipado de los cinco SNPs asociados a los niveles séricos de PGRN en los GWAs mencionados (*Rademakers et al, 2008; Van Deerlin et al, 2010; Carrasquillo et al, 2010*) se realizó en un subgrupo de 414 pacientes con EP (43% mujeres; edad media de inicio de los síntomas: $64,4 \pm 11,3$ años, edad media al estudio: $70,9 \pm 10,6$ años) y 569 controles (59% mujeres, edad media al estudio: $68,5 \pm 12,4$ años) pertenecientes a la cohorte de nuestro hospital. En este estudio se incluyó también una población familiar de 50 pacientes con EP asociada a la mutación G2019S del gen *LRRK2* (48,0% mujeres, edad media de inicio de los síntomas: $64,1 \pm 10,9$ años, edad media al estudio: $70,2 \pm 10,7$ años) y 50 portadores asintomáticos de la mutación (60,0% mujeres, edad media al estudio: $58,5 \pm 11,6$ años). Los niveles de progranulina en suero se analizaron en 395 de los casos diagnosticados en nuestro centro (43,0% mujeres; edad media de inicio de los

síntomas: $64,4 \pm 11,3$ años, edad media al estudio: $70,9 \pm 10,6$ años) y 314 controles ($61,5\%$ mujeres, $70,03 \pm 12,8$ años).

De la cohorte local, 343 sujetos con EP (43% mujeres; edad media de inicio $63,4 \pm 11,3$ años, edad media al estudio: $8,5 \pm 5,4$ años) fueron reevaluados clínicamente para caracterizar el fenotipo.

2. VALORACIÓN CLÍNICA

Se obtuvieron datos demográficos e información sobre los factores de riesgo cardiovascular (hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, tabaquismo) de cada participante en el estudio.

En los pacientes que accedieron a ser reevaluados clínicamente, se determinó la presencia de demencia según los criterios del nivel 1 de la *MDS Task Force* (Dubois *et al*, 2007), el fenotipo clínico predominante (tembloroso, rígido-acinético o mixto) (Zettsky *et al*, 1985; Jankovic *et al*, 1990) y se recogieron las puntuaciones en las escalas UPDRS-III y Hoehn y Yahr. Todos los pacientes tenían un rendimiento cognitivo normal en el momento del diagnóstico de la EP.

3. ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y GENÉTICO

3.1. Análisis bioquímico

Las muestras de sangre fueron extraídas tras la obtención de un consentimiento informado de los sujetos o sus representantes. Las muestras de suero fueron extraídas en ayunas y almacenadas a -80°C en el Laboratorio de Neurogenética de nuestro hospital hasta el momento de su utilización.

Los niveles séricos de AU fueron determinados mediante el sistema bioquímico ADVIA 2400 (Siemens Healthcare, Erlangen, Alemania), con la colaboración del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Las concentraciones de progranulina en suero fueron analizadas por duplicado mediante un kit comercial (*Human Progranulin ELISA kit*, Adipo-Gen, Seoul, Korea).

3.2. Análisis genético

Por un lado, se genotiparon los nueve polimorfismos genéticos reguladores de los niveles séricos de AU: *SLC2A9* rs734553, *ABCG2* rs2231142, *SLC17A1* rs1183201, *SLC22A11* rs17300741, *SLC22A12* rs505802, *GCKR* rs780094, *PDZK1* rs12129861, *LRRC16A+SCGN* rs742132 y *SLC16A9* rs12356193.

A continuación, se estudiaron las cinco variantes genéticas descritas asociadas a los niveles de PGRN: *GRN* rs5848, *TMEM106b* rs6966915, rs1020004 y rs1990622, y rs646776-*SORT1*.

El genotipado de los SNPs fue realizado mediante sondas Taq-man (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), y la lectura tuvo lugar en un sistema RT-PCR 7500 Fast Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*) y en un instrumento LightCycler480 (*Roche Applied Science*, Indianapolis, IN, USA).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las medias de los niveles séricos de AU y PGRN fueron comparadas mediante el test *t* Student o ANOVA, en función de los grupos comparados. En base a los estudios previos, se repitieron los análisis tras estratificación por sexo y ajustando por edad usando regresión lineal.

Los niveles séricos de AU y PGRN en pacientes con y sin demencia fueron comparados por *t* Student, repitiendo los análisis tras estratificar por sexo y ajustar por edad, duración de la enfermedad y presencia de factores de riesgo cardiovascular mediante regresión lineal. También se utilizó el análisis de regresión para estudiar la correlación entre los niveles séricos y el estadio H&Y, la puntuación en la escala UPDRS-III y en el MMSE.

Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) para cada SNP mediante χ^2 de Pearson. Se realizó análisis univariante χ^2 para cada polimorfismo, excluyendo del análisis aquellos que estaban desviados del HWE y, posteriormente, aplicamos una corrección para test múltiples por Bonferroni.

Para cada sujeto, calculamos el efecto acumulativo de los polimorfismos reguladores de los niveles séricos de AU a través del *Genetic Risk Score* (GRS), asignando 1 punto por cada alelo asociado significativamente con niveles más bajos de AU de acuerdo al metaanálisis de *Kolz et al* (rango 2-15). Además, calculamos el GRS ponderado, considerando la variación proporcional en los niveles séricos de AU explicada por cada gen. Para ello, multiplicamos el número de alelos de riesgo para cada *locus* por el coeficiente beta proporcionado por el citado metaanálisis.

La asociación entre el GRS y el riesgo de EP fue estudiada mediante χ^2 de Pearson, y posteriormente se llevó a cabo un análisis multivariante ajustando por edad y sexo por regresión logística. La media del GRS fue comparada entre pacientes con EP con y sin demencia mediante *t* Student, y se utilizó χ^2 de Pearson para estudiar la asociación entre el GRS dividido en terciles y la EP-demencia, realizando después un análisis multivariante ajustando por edad y sexo mediante regresión logística.

El efecto de cada genotipo sobre los niveles séricos de AU y PGRN en las distintas poblaciones fue determinado por test ANOVA. El GRS absoluto se correlacionó con la uricemia mediante χ^2 de Pearson, y se utilizó test ANOVA corregido por Bonferroni cuando el GRS fue dividido en terciles.

La media del GRS fue comparada entre pacientes con EP con y sin demencia mediante *t* Student, y se utilizó χ^2 de Pearson para estudiar la asociación entre el GRS dividido en terciles y la EP-demencia, realizando después un análisis multivariante ajustando por edad y sexo mediante regresión logística.

V. RESULTADOS

1. NIVELES SÉRICOS DE AU Y SUS POLIMORFISMOS REGULADORES: EFECTO SOBRE EL RIESGO Y FENOTIPO DE LA EP

El estudio genético se realizó en el conjunto total de la población estudiada, mientras que la determinación de los niveles séricos de AU tuvo lugar en un subgrupo de la población correspondiente a la cohorte local. Las características de la población total y la cohorte local se resumen en las *Tablas 4 y 5*, respectivamente.

Tabla 4. Características de los pacientes con EP y controles de la población total.

	EP (n= 1061)	Controles (n= 754)	p
Sexo (V/M) (%)	56,4 / 43,6	50,4 / 49,6	ns
Edad de inicio, años (SD)	59,5 (1,9)	-	-
Edad al estudio, años (SD)	68,9 (0,3)	64,7 (0,4)	ns

ns: no significativo (p> 0,05).

Tabla 5. Características de los pacientes con EP y controles de la cohorte local.

	EP (n= 365)	Controles (n= 132)	p
Sexo (V/M) (%)	57,0 / 43,0	31,8 / 68,2	< 0.001
Edad de inicio, años (SD)	64,8 (0,6)	-	-
Duración de la enfermedad, años (SD)	5,6 (5,5)	-	-
Edad al estudio, años (SD)	70,2 (0,5)	65,2 (0,8)	< 0.001
Fenotipo (RA/Mx/TD) (%)	35,2 / 37,7 / 27,1	-	-
Estadio H&Y (SD)	2,51 (1,07)	-	-
UPDRS-III (SD)	35,4 (15,8)	-	-
MMSE (SD)	27,05 (4,14)	-	-
Niveles séricos medios AU (mg/dl) (SD)	5,3 (1,5)	5,2 (1,7)	ns

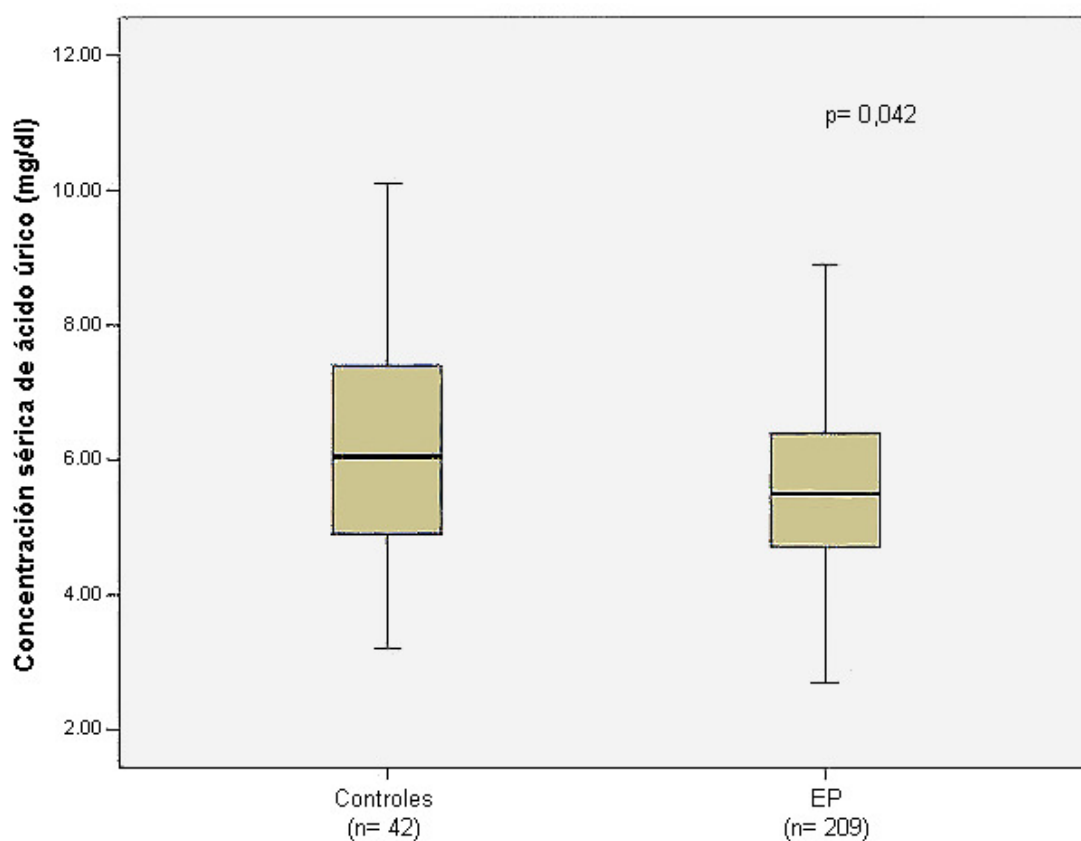
Fenotipo RA: rígido-acinético; Mx: mixto; TD: tembloroso; H&Y: Estadio Hoehn y Yahr; UPDRS-III: *Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III* (motor); MMSE: *Folstein's Mini Mental State Examination* (0-30); AU: Ácido úrico; ns: no significativo (p> 0,05).

1.1. Niveles séricos de AU en pacientes con EP y controles

Los niveles medios de AU en suero no fueron diferentes en pacientes con EP y controles ($5,27 \pm 1,46$ mg/dl vs $5,22 \pm 1,72$ mg/dl, $p=0,43$).

Tras estratificar por sexo, encontramos que los pacientes varones con EP tenían niveles séricos de AU más bajos que los controles ($5,61 \pm 1,37$ mg/dl vs $6,27 \pm 1,96$ mg/dl, $p=0,04$) (*Figura 8*). Esta asociación continuaba siendo significativa después de ajustar por edad ($p=0,02$). Sin embargo, no observamos asociación entre los niveles séricos de AU y el riesgo de EP en mujeres ($4,73 \pm 1,36$ mg/dl vs $4,82 \pm 1,47$ mg/dl, $p=0,09$).

Figura 8. Concentración sérica de ácido úrico en sujetos varones con EP y controles



1.2. Análisis de los SNPs reguladores de la uricemia sobre el riesgo de EP

Uno de los 9 polimorfismos analizados (*SLC22A11* rs17300741) estaba desviado del HWE y, por tanto, fue excluido del estudio.

No detectamos asociación entre ninguno de los SNPs analizados de forma individual y el riesgo de EP en nuestra muestra (*Tabla 6*).

Tabla 6. Asociación entre los polimorfismos reguladores de la uricemia y el riesgo de EP.

SNP	EP (n)	Controles (n)	p
rs734553 (<i>SLC2A9</i>)			
GG	63	55	0,674
GT	311	228	
TT	544	402	
rs2231142 (<i>ABCG2</i>)			
GG	857	539	0,073
GT	97	86	
TT	10	9	
rs1183201 (<i>SLC17A1</i>)			
AA	240	156	0,340
AT	412	265	
TT	235	126	
rs505802 (<i>SLC22A12</i>)			
CC	86	51	0,697
CT	380	264	
TT	536	354	
rs780094 (<i>GCKR</i>)			
CC	310	208	0,212
CT	475	326	
TT	202	169	
rs12129861 (<i>PDZK1</i>)			
AA	224	131	0,409
AG	437	293	
GG	254	180	
rs742132 (<i>LRRIC16A1/SCGN</i>)			
AA	469	343	0,017
AG	407	237	
GG	92	42	
rs12356193 (<i>SLC16A9</i>)			
AA	593	389	0,144
AG	271	175	
GG	75	32	

Sin embargo, cuando analizamos el efecto combinado de los ocho SNPs mediante el GRS (máximo 16, tras exclusión de *SLC22A11*) encontramos asociación entre el número de alelos de riesgo y el riesgo de EP: los sujetos en el tercer tercil (GRS>9 alelos de riesgo) tenían un riesgo de EP significativamente más alto

(OR=1,55; IC95%=1,10-2,18; p=0,012) comparados con los del primer tercil (GRS<8 alelos de riesgo). La estratificación por sexo mostró una tendencia no significativa a la asociación entre el tercer tercil de GRS y el incremento de riesgo de EP en ambos sexos (Tabla 7).

Tabla 7. Asociación entre el GRS asociado a niveles séricos bajos de ácido úrico y el riesgo de enfermedad de Parkinson.

GRS	EP (n)	Controles (n)	OR (95% IC)	p
Toda la muestra				
2-7	282	226	Ref	Ref ^a
8-9	282	188	1,19 (0,92-1,54)	0,20 ^a
10-15	137	73	1,55 (1,10-2,18)	0,012 ^a
Mujeres				
2-7	114	102	Ref	0,20 ^b
8-9	126	81	1,07 (0,75-1,50)	0,71 ^b
10-15	66	38	1,53 (0,95-2,47)	0,078 ^b
Varones				
2-7	168	124	Ref	0,129 ^b
8-9	156	107	1,35 (0,91-2,00)	0,133 ^b
10-15	71	35	1,58 (0,97-2,59)	0,068 ^b

El GRS representa el número de alelos de riesgo asociados a niveles séricos bajos de ácido úrico, divididos en primer tercil (2-7), segundo tercil (8) y tercer tercil (9-15). El GRS máximo tras la exclusión de SLC22A11 fue 16.

^aAjustado por edad y sexo.

^bAjustado por edad.

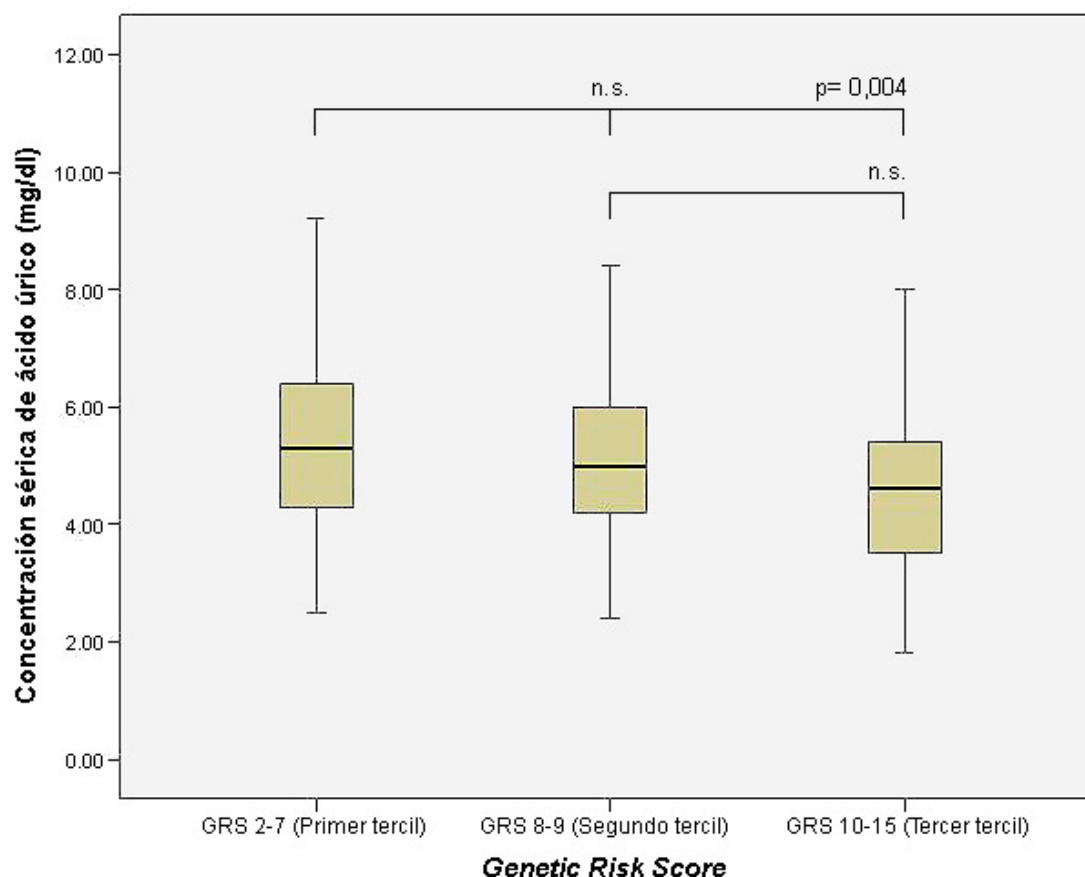
GRS: Genetic Risk Score; EP: enfermedad de Parkinson; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza.

1.3. Asociación entre los SNPs reguladores de la uricemia y los niveles de AU

No detectamos diferencias en los niveles de AU entre los distintos genotipos de los SNPs estudiados: *SLC2A9* rs734553 (p=0,139), *ABCG2* rs2231142 (p=0,274), *SLC17A1* rs1183201 (p=0,915), *SLC22A11* rs17300741 (p=0,379), *SLC22A12* rs505802 (p=0,190), *GCKR* rs780094 (p=0,621), *PDZK1* rs12129861 (p=0,540), *LRRC16A+SCGN* rs742132 (p=0,662) y *SLC16A9* rs12356193 (p=0,325).

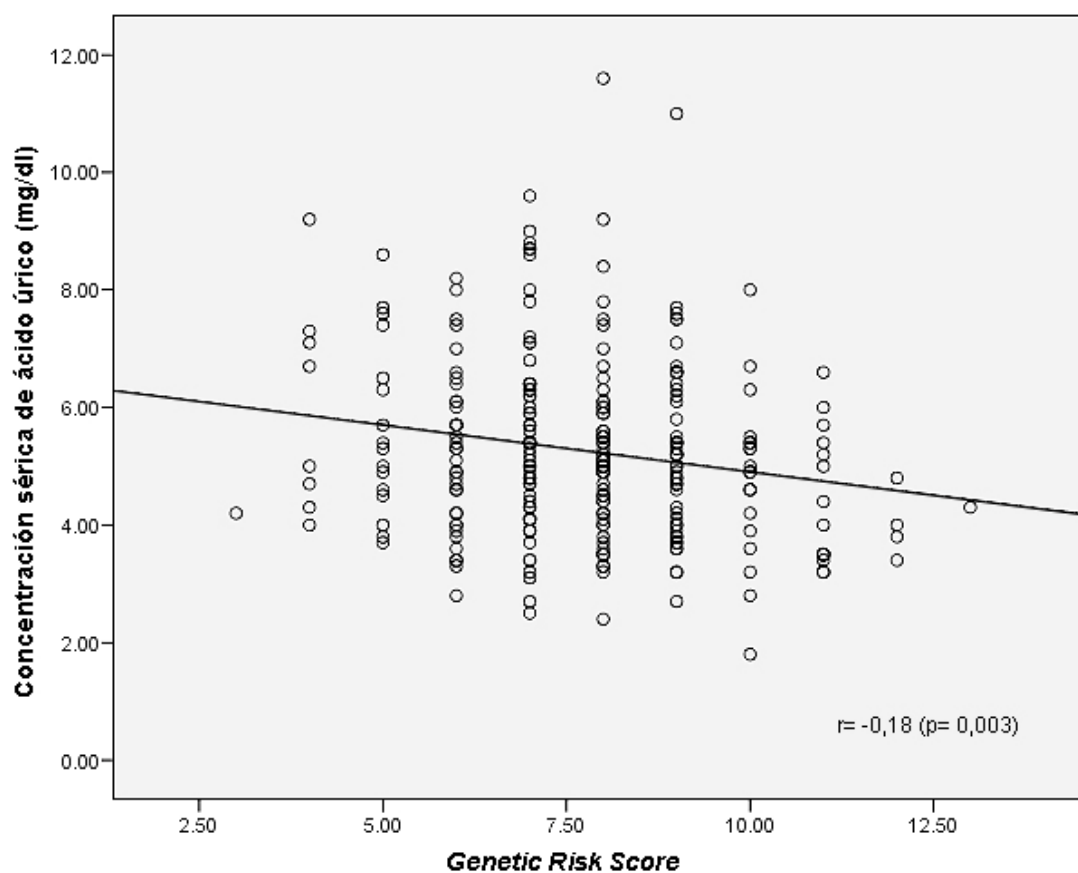
Los sujetos en el tercer tercil de GRS (>9 alelos de riesgo) presentaban unos niveles séricos de AU significativamente menores que los del primer tercil (2-7 alelos de riesgo) (p_{ajustada por Bonferroni}=0,004) (Figura 9).

Figura 9. Asociación entre los niveles séricos de AU y el GRS en casos y controles.



Concentración sérica de ácido úrico en pacientes con EP y controles de acuerdo al *Genetic Risk Score* (GRS) basado en los 8 SNPs estudiados. La distribución del GRS entre pacientes y controles fue dividida en terciles. El GRS indica el número de alelos de riesgo asociados a niveles séricos bajos de ácido úrico (basado en el metaanálisis de GWAs de Kolz *et al*, 2009). Tras la exclusión de *SLC22A11*, el GRS máximo fue 16.

El GRS mostró una correlación inversa con los niveles séricos de AU en nuestra población ($r=-0,18$, $p=0,003$) (*Figura 10*). Al estratificar por sexo, esta correlación se mantuvo significativa en varones ($r=-0,18$, $p=0,03$; $p_{\text{ajustada por edad}}=0,03$) y con tendencia a la significación en mujeres ($r=-0,17$, $p=0,06$; $p_{\text{ajustada por edad}}=0,08$). Los resultados fueron similares cuando se consideró la correlación entre los niveles séricos de AU y el GRS ponderado.

Figura 10. Correlación entre los niveles séricos de AU y el GRS.

1.4. Niveles séricos de AU en relación al fenotipo de la EP

No observamos correlación entre los niveles séricos de ácido úrico y la edad de inicio ($r=0,05$; $p=0,36$), el tiempo de evolución de la enfermedad ($r=-0,06$; $p=0,28$) y el estadio H&Y ($r=-0,09$; $p=0,15$).

Los niveles medios de AU fueron similares en los pacientes con EP con fenotipo rígido-acinético y tembloroso ($5,39 \pm 1,27$ mg/dl vs $5,20 \pm 1,56$ mg/dl, $p_{ajustada}=0,55$).

1.4.1. Niveles séricos de AU en relación a la presencia de demencia en la EP

De los 343 pacientes con EP reevaluados clínicamente durante el estudio, 72 cumplían criterios clínicos de demencia en nuestra cohorte (21%). Las características clínicas de los pacientes con EP-demencia se resumen en la *Tabla 8*.

Tabla 8. Características de los pacientes con EP clasificados según la presencia de demencia.

	EP con demencia (n= 72)	EP sin demencia (n= 271)	p	p*
Sexo (V/M) (%)	48,6 / 51,4	62,0 / 38,0	0,06	0,22
Edad de inicio, años (SD)	66,6 (10,7)	63,6 (11,4)	0,05	< 0,001
Duración de la enfermedad, años (SD)	13,8 (6,3)	9,1 (6,2)	< 0,001	< 0,001
Edad al estudio, años (SD)	79,2 (8,5)	71,2 (11,5)	< 0,001	< 0,001
Estadio H&Y (SD)	3,8 (0,9)	2,2 (0,8)	< 0,001	< 0,001
UPDRS-III (SD)	55,1 (11,7)	32,9 (14,5)	< 0,001	< 0,001
MMSE (SD)	18,8 (5,6)	28,1 (2,2)	< 0,001	< 0,001
Niveles séricos medios AU (mg/dl) (SD)	5,0 (1,7)	5,3 (1,4)	0,12	0,12

EP: Enfermedad de Parkinson; H&Y: Estadio Hoehn y Yahr; UPDRS-III: *Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III* (motor); MMSE: *Folstein's Mini Mental State Examination* (0-30); AU: Ácido úrico.

*Ajustado por edad, sexo y duración de la enfermedad, por regresión lineal.

Los sujetos con demencia tenían unos niveles séricos de AU similares a los pacientes sin demencia ($5,04 \pm 1,69$ mg/dl vs $5,35 \pm 1,40$ mg/dl, $p=0,12$). Tras estratificar por sexo y ajustar por factores de riesgo cardiovascular los resultados fueron similares ($p=0,12$). Se compararon también los pacientes en el tercer tercil de AU (niveles más altos) con los del primer tercil (niveles más bajos), y no había diferencias significativas en la frecuencia de demencia (17,1% vs 26,4%, $p=0,24$).

Los pacientes con demencia presentaban significativamente una mayor duración de la enfermedad, mayor puntuación en la escala H&Y y UDPRS III, y peor puntuación en el MMSE. Sin embargo, los niveles séricos de AU no se correlacionaron con ninguna de estas variables en un modelo de regresión logística.

1.5. Asociación entre SNPs reguladores de la uricemia y el fenotipo de la EP

No encontramos asociación entre ninguno de los polimorfismos estudiados y la edad de inicio de la enfermedad en nuestra cohorte ($p=0,3$).

Tampoco detectamos asociación entre ninguno de los SNPs analizados de forma individual ni combinada a través del GRS con el riesgo de demencia. Los sujetos en el tercer tercil de GRS (>9 alelos de riesgo) mostraron un riesgo de demencia similar a los del primer tercil (2-7 alelos de riesgo) ($p=0,3$). La estratificación por sexo tampoco reveló diferencias (Tabla 9). El GRS medio ponderado también fue similar en pacientes con y sin demencia ($0,45 \pm 0,2$ mg/dl vs $0,44 \pm 0,2$ mg/dl, $p=0,71$).

Tabla 9. Asociación entre el *Genetic Risk Score* (GRS) y el riesgo de EP-demencia.

GRS	EP con demencia (n)	EP sin demencia (n)	OR (95% IC)	p*
2-7	15	78	Ref	Ref
8	18	74	1,1 (0,5-2,6)	0,66
9-15	21	77	1,5 (0,7-3,0)	0,31

El GRS representa el número de alelos de riesgo asociados a niveles séricos bajos de ácido úrico, divididos en primer tercil (2-7), segundo tercil (8) y tercer tercil (9-15). El GRS máximo tras la exclusión de SLC22A11 fue 16.

*Ajustado por edad y sexo.

GRS: *Genetic Risk Score*; EP: enfermedad de Parkinson; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza.

2. NIVELES SÉRICOS DE PGRN Y SUS POLIMORFISMOS REGULADORES: EFECTO SOBRE EL RIESGO Y FENOTIPO DE LA EP

La *Tabla 10* resume las características de la población en la que se determinaron los niveles séricos de progranulina y se estudiaron sus polimorfismos reguladores.

Tabla 10. Características de los pacientes con EP y controles.

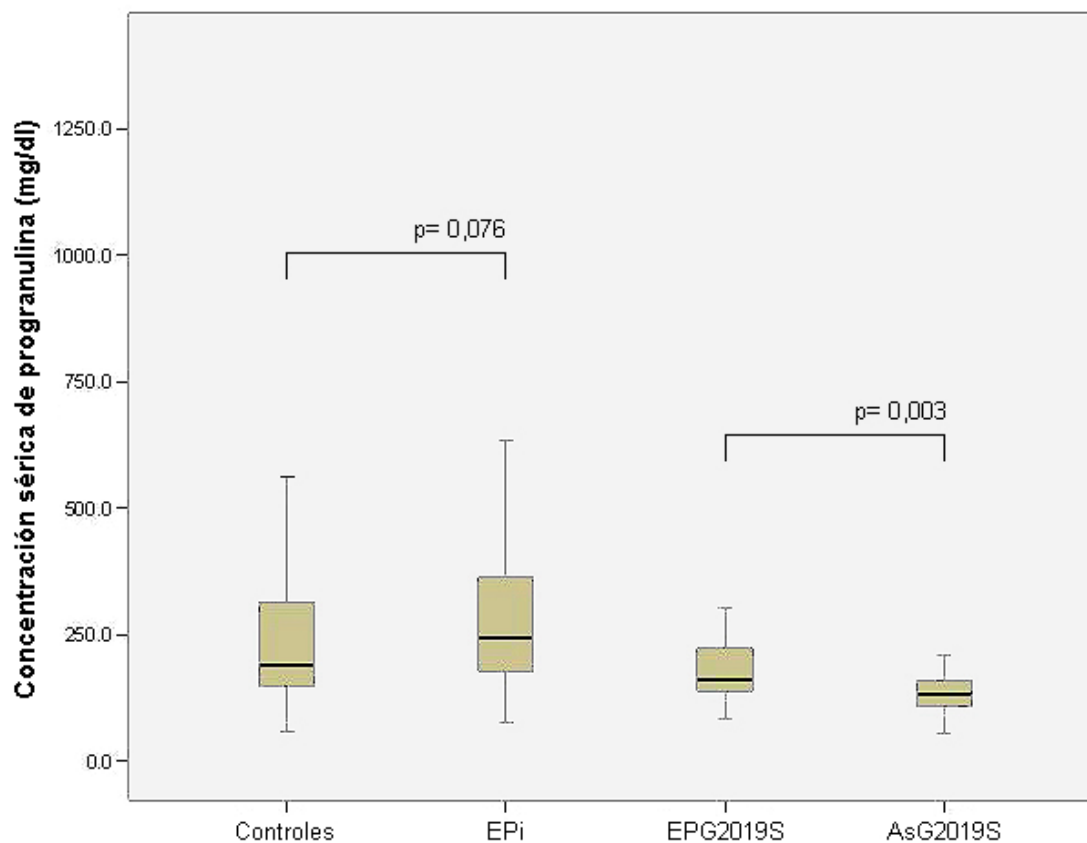
	EPI (n= 414)	Controles (n= 569)	EPG2019S (n= 50)	AsG2019S (n= 50)	p
Sexo (V/M) (%)	56,3 / 43,7	41,3 / 58,7	52,0 / 48,0	40,0 / 60,0	<0.001
Edad de inicio, años (SD)	64,4 (11,3)	-	64,1 (10,9)	-	0,840
Duración de la enfermedad, años (SD)	6,5 (5,8)	-	5,9 (5,3)	-	0,524
Edad al estudio, años (SD)	70,9 (10,6)	68,5 (12,4)	70,2 (10,7)	58,5 (11,6)	<0.001
Estadio H&Y (SD)	2,5 (1,1)	-	2,0 (1,0)	-	0,442
UPDRS-III (SD)	35,2 (16,0)	-	26,9 (14,2)	-	<0.001
MMSE (SD)	27,1 (4,1)	-	26,2 (2,9)	28,2 (3,1)	0,064
Niveles séricos medios PGRN (mg/dl) (SD)	284,0 (145,3)	260,2 (184,2)	203,0 (119,9)	141,4 (60,8)	<0.001

EPI: Enfermedad de Parkinson idiopática; EPG2019S: Casos de enfermedad de Parkinson asociada a la mutación G2019S; AsG2019S: Portadores asintomáticos de la mutación G2019S; Fenotipo RA: rígido-acinético; Mx: mixto; TD: tembloroso; H&Y: Estadio Hoehn y Yahr; UPDRS-III: *Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III* (motor); MMSE: *Folstein's Mini Mental State Examination* (0-30); PGRN: Progranulina.

2.1. Niveles séricos de PGRN en pacientes con EP y controles

La comparación de las medias de los niveles séricos de PGRN en las cuatro poblaciones estudiadas (EP idiopática, controles, EP asociada a la mutación G2019S y portadores asintomáticos de la mutación) reveló diferencias significativas ($283,99 \pm 145,33$ mg/dl vs $260,21 \pm 184,22$ mg/dl vs $203,01 \pm 119,95$ mg/dl vs $141,44 \pm 60,84$ mg/dl, $p < 0,001$) (*Figura 11*). Estas diferencias se observaron al comparar entre los grupos de sujetos portadores de la mutación G2019S, de forma que los pacientes con EP asociada a la mutación presentaban niveles de PGRN significativamente más altos que los portadores asintomáticos ($p = 0,003$). Sin embargo, los niveles medios de PGRN no fueron diferentes al comparar a los pacientes con EP idiopática con los controles sanos ($p = 0,076$).

Figura 11. Concentración sérica de PGRN en sujetos con EP idiopática, controles, EP asociada a la mutación G2019S y portadores asintomáticos de la mutación.



No encontramos diferencias en los niveles de PGRN entre ambos sexos ($255,92 \pm 153,81$ mg/dl en varones vs $266,50 \pm 168,01$ en mujeres, $p=0,35$).

Los niveles de PGRN se correlacionaron con la edad al estudio únicamente en el grupo control ($r=0,33$, $p<0,001$) pero no en los pacientes con EP.

2.2. Análisis de los SNPs reguladores de los niveles séricos de PGRN sobre el riesgo de EP

Detectamos una asociación significativa entre dos de los polimorfismos estudiados (rs1990622 y rs1020004) y el riesgo de EP en nuestra población (Tabla 11).

Sin embargo, tras corregir por Bonferroni no se mantuvo dicha asociación en el SNP rs1990622.

Tabla 11. Asociación entre los polimorfismos reguladores de los niveles séricos de progranulina y el riesgo de EP.

SNP	EPI (n= 414)	Controles (n= 569)	p
rs5848 (GRN)			
GG	201	175	0,882
AG	143	123	
AA	40	39	
rs1990622 (TMEM106b)			
AA	126	110	0,033
AG	155	199	
GG	76	66	
rs1020004 (TMEM106b)			
CC	46	34	0,003
CT	132	191	
TT	178	166	
rs6966915 (TMEM106b)			
CC	129	110	0,052
CT	153	182	
TT	66	51	
rs646776 (SORT1)			
AA	21	33	0,111
AG	149	136	
GG	233	269	

2.3. Asociación entre los SNPs reguladores de PGRN y los niveles séricos de PGRN

Los sujetos portadores del alelo menor G del polimorfismo rs646776-*SORT1* presentaban niveles de PGRN significativamente más bajos en una manera dosis-génica dependiente, es decir, los sujetos homocigotos para el alelo G presentaban niveles de PGRN más bajos que los individuos homocigotos para el alelo A ($269,88 \pm 167,74$ vs $215,03 \pm 119,34$; $p=0,01$).

No detectamos asociación entre los otros SNPs estudiados y los niveles séricos de PGRN: *GRN* rs5848 ($p=0,36$), *TMEM106b* rs6966915 ($p=0,79$), *TMEM106b* rs1020004 ($p=0,59$) y *TMEM106b* rs1990622 ($p=0,47$).

2.4. Niveles séricos de PGRN en relación al fenotipo de la EP

Los niveles séricos de PGRN no se correlacionaron con la edad al estudio ($r=0,04$; $p=0,45$) ni la edad de inicio de los síntomas ($r=0,02$; $p=0,69$) en nuestra cohorte. Tampoco observamos correlación entre los niveles de PGRN y el estadio H&Y ($r=0,08$; $p=0,22$), la puntuación en la UPDRS-III ($r=0,09$; $p=0,16$) o el tiempo transcurrido para alcanzar un estadio $H\&Y \geq 3$ ($r=-0,07$; $p=0,46$).

Clasificamos a los pacientes según la clínica motora predominante en fenotipo rígido-acinético (34,4%), tembloroso (27,8%) y mixto (37,8%). Los niveles séricos de PGRN no fueron diferentes entre pacientes con EP subtipo rígido-acinético y aquellos con un fenotipo predominante tembloroso ($279,12 \pm 146,24$ mg/dl vs $258,25 \pm 126,19$ mg/dl; $p=0,27$).

Tampoco encontramos asociación entre los niveles séricos de PGRN y la edad de inicio de los síntomas en los pacientes con EP asociada a la mutación G2019S del gen *LRRK2* ($p=0,82$).

2.4.1. Niveles séricos de PGRN en relación a la presencia de demencia en la EP

Las características clínicas de los pacientes con demencia asociada a la EP se resumen en la *Tabla 12*.

Los sujetos con EP y demencia tenían similares niveles séricos de PGRN que aquellos sin demencia ($272,11 \pm 136$ mg/dl vs $287,50 \pm 136,56$ mg/dl; $p=0,4$). Tras ajustar por edad y sexo se obtuvieron resultados similares.

Los pacientes con demencia presentaban una duración más larga de la enfermedad ($p=0,002$), una puntuación más alta en la escala H&Y y UPDRS-III ($p<0,001$), y una peor puntuación en el MMSE ($p<0,001$) que los sujetos con EP sin demencia. Sin embargo, los niveles séricos de PGRN no se correlacionaron con ninguna de estas variables en un modelo de regresión lineal.

Tabla 12. Características de los pacientes con EP clasificados según la presencia de demencia.

	EP con demencia (n= 72)	EP sin demencia (n= 264)	p
Sexo (V/M) (%)	48,6 / 51,4	61,8 / 38,2	0,06
Edad de inicio, años (SD)	66,7 (10,8)	63,7 (11,5)	0,05
Duración de la enfermedad, años (SD)	8,4 (6,0)	6,1 (5,6)	0,002
Edad al estudio, años (SD)	75,2 (7,9)	69,9 (11,1)	< 0,001
Estadio H&Y (SD)	3,8 (1,0)	2,2 (0,8)	< 0,001
UPDRS-III (SD)	55,1 (11,7)	32,9 (14,5)	< 0,001
MMSE (SD)	18,7 (5,7)	28,1 (2,3)	< 0,001
Niveles séricos medios PGRN (mg/dl) (SD)	272,1 (136,0)	287,5 (136,6)	0,40

EP: Enfermedad de Parkinson; H&Y: Estadio Hoehn y Yahr; UPDRS-III: *Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III* (motor); MMSE: *Folstein's Mini Mental State Examination* (0-30); PGRN: Progranulina.

2.5. Asociación entre SNPs reguladores de los niveles séricos de PGRN y el fenotipo de la EP

Considerando que rs646776 era el único polimorfismo que se asociaba con los niveles séricos de PGRN en nuestra población, estudiamos su posible asociación con el fenotipo de la EP. El alelo A de rs646776 se asoció a un mayor riesgo de demencia en los pacientes con EP en nuestra cohorte ($p_{\text{ajustada por edad al estudio}}=0,04$).

El SNP rs646776 también se asoció con la edad de inicio de los síntomas motores, de modo que los pacientes homocigotos para el alelo A tenían una edad de inicio más tardía ($p=0,016$).

No detectamos asociación entre el polimorfismo rs1020004 y la edad de inicio de los síntomas ($p=0,81$).

VI. DISCUSIÓN

En la primera parte de este trabajo analizamos la influencia de los niveles séricos de ácido úrico y las variables genéticas que los regulan sobre el riesgo de EP y su fenotipo. La asociación de niveles bajos de ácido úrico con la enfermedad de Parkinson es bien conocida desde hace algunos años. Sin embargo, si esta relación es causal o no, o si los niveles de AU influyen sobre el fenotipo de la enfermedad, apenas ha sido estudiado. Nosotros encontramos niveles séricos más bajos de ácido úrico en los pacientes varones con EP que en los controles sanos, pero no en las mujeres. En la literatura son varios los estudios en los que se ha descrito una asociación más débil e incluso ausente en mujeres (*Alonso et al, 2007; Schwarzschild et al, 2008; Ascherio et al, 2009*). No podemos descartar que esta falta de asociación en mujeres en nuestro estudio sea debida al número limitado de sujetos analizados, pero muy posiblemente pueda atribuirse a los diferentes efectos biológicos del sexo sobre los mecanismos del urato en la enfermedad de Parkinson (*Nilsen et al, 2004*), o al hecho de que los niveles séricos de ácido úrico son generalmente menores en mujeres y, por tanto, su efecto sobre el riesgo de enfermedad de Parkinson sería menos pronunciado.

Uno de los resultados más destacables de este estudio es que se demuestra que el efecto combinado de ocho polimorfismos genéticos asociados con concentraciones séricas bajas de AU modifica también el riesgo de EP. Esta asociación no se observó cuando analizamos de forma individual cada uno de los SNPs, y se puso de manifiesto únicamente tras el análisis combinado. Esto probablemente se deba al hecho de que las variantes genéticas estudiadas tienen un efecto muy modesto sobre los niveles de AU. En un estudio previo se estimó que estos polimorfismos son responsables tan sólo de aproximadamente un 5% de la variabilidad de la uricemia (*Kolz et al, 2009*).

La herramienta que utilizamos para analizar el efecto sumatorio de todos los SNPs fue el *Genetic Risk Score* (GRS). Esta herramienta estadística proporciona una medida del efecto acumulativo de varios polimorfismos con efectos modestos sobre un resultado común cuando se consideran de forma individual, pero cuyo resultado es más pronunciado cuando se tiene en cuenta su efecto conjunto. Este enfoque ha demostrado ser de gran utilidad en enfermedades genéticamente complejas, como la EP (*Smith et al, 2015; Labos et al, 2015*). El GRS no ponderado se calcula asignando un punto a cada alelo de riesgo y, de ese modo, la puntuación total corresponde al número total de alelos de riesgo de todos los polimorfismos estudiados. El GRS ponderado considera, además,

el efecto relativo de cada polimorfismo a través del coeficiente beta, que puede obtenerse a partir de un modelo de riesgo o directamente de un metaanálisis. En nuestro trabajo, calculamos el GRS no ponderado como el número total de alelos de riesgo asociados a niveles séricos bajos de AU (rango 2-15), y el GRS ponderado considerando el coeficiente beta proporcionado por el metaanálisis de *Kolz et al.*

Mediante la utilización del GRS hemos mejorado la identificación de sujetos en riesgo de presentar EP. De este modo, los sujetos en el tercer tercil del GRS ($GRS > 9$ alelos de riesgo) mostraron un riesgo significativamente más alto de EP comparados con los del primer tercil ($GRS < 8$ alelos de riesgo). Aunque la magnitud del riesgo conferida por este conjunto de polimorfismos fue baja (OR 1,55), la validez de este hallazgo fue reforzada por otro: observamos que las puntuaciones del GRS también se correlacionaban de manera inversa con los niveles de AU. Otros autores han encontrado igualmente una correlación entre el GRS basado en ocho polimorfismos genéticos localizados en casi los mismos genes que en nuestro estudio y los niveles séricos de AU (*Yang et al, 2010; Gunjaca et al, 2010*).

Nuestros resultados, interpretados en el marco de la Randomización Mendeliana, apoyan la existencia de una asociación causal entre la uricemia y el riesgo de EP, descartando razonablemente la posibilidad de que se trate de un factor de confusión o una relación causal inversa. El modelo de Randomización Mendeliana establece que, cuando existe una asociación causal entre un factor de riesgo (ácido úrico) y una enfermedad (enfermedad de Parkinson), la variante genética que regula el factor de riesgo debería tener una asociación proporcional con dicha enfermedad (*Lawlor et al, 2008*).

En relación con la posible asociación entre niveles séricos de ácido úrico y el fenotipo cognitivo de la EP, en este trabajo no hemos encontrado diferencias en los niveles séricos de AU en los pacientes con EP con y sin demencia. En la literatura sólo encontramos dos trabajos que estudian la relación entre la concentración sérica de ácido úrico y la cognición en sujetos con EP (*Annanmaki et al, 2011; Wang et al, 2009*). Ambos estudios encontraron que los niveles séricos de AU más altos se asociaban a un mejor rendimiento cognitivo en este grupo de pacientes. Sin embargo, la presencia de demencia no fue investigada específicamente en este estudio. Otros autores han

analizado la asociación entre la uricemia y la cognición en la población general. La mayoría de ellos refleja un beneficio de los niveles altos de AU sobre la cognición. En el estudio prospectivo más amplio realizado hasta la fecha se determinó que los niveles séricos altos de AU se asociaban a un menor riesgo de demencia y una mejor función cognitiva en personas de edad avanzada, pero sólo después de ajustar por los factores de riesgo cardiovascular (*Euser et al, 2009*). Más recientemente se ha confirmado esta asociación entre los niveles séricos de AU y el rendimiento cognitivo en sujetos con enfermedad cardiovascular previa (*Molshatzki et al, 2015*). En nuestro trabajo observamos una correlación significativa entre los niveles séricos de AU y la presencia de hipertensión, diabetes e hipercolesterolemia pero, tras ajustar por estas variables, los niveles de AU no tuvieron un impacto significativo sobre el riesgo de demencia asociada a la EP. En la misma línea, tampoco encontramos correlación entre la puntuación en el MMSE y la uricemia.

Como era de esperar, los sujetos con demencia tenían un mayor tiempo de evolución de la enfermedad y puntuaciones más altas en las escalas H&Y y UPDRS-III comparados con los pacientes sin demencia. Sin embargo, los niveles séricos de AU no se correlacionaron con ninguna de estas variables en el análisis de regresión. Diversos estudios apuntan a que el riesgo de deterioro cognitivo es mayor en pacientes con fenotipo rígido-acinético respecto a aquellos con fenotipo tembloroso (*Rajput et al, 2009*). En nuestra muestra también detectamos una frecuencia ligeramente superior de demencia en los casos con fenotipo rígido-acinético comparados con aquellos con fenotipo tembloroso pero, sin embargo, los niveles séricos de AU no difirieron de manera significativa entre ambos grupos.

En línea con la falta de asociación observada entre los niveles de ácido úrico y el fenotipo cognitivo, en el análisis genético ninguno de los SNPs reguladores de la uricemia mostró asociación con la demencia asociada a la EP, tanto individualmente como considerados de forma conjunta mediante el GRS. Nuestros resultados, por tanto, sugieren que los niveles séricos de AU no tienen un impacto significativo sobre el riesgo de demencia en la EP.

Esta parte del estudio no está exenta de limitaciones que pueden haber influido en los resultados: el tamaño de la muestra fue relativamente pequeño, particularmente el

número de pacientes con demencia. Además, es un hecho reconocido que el MMSE no es el test cognitivo más adecuado para detectar los casos de demencia en la EP. Por este motivo, para el diagnóstico de demencia en nuestra población seguimos las recomendaciones de la *MDS Task Force* (nivel 1), utilizando el MMSE en asociación con tests de atención y función ejecutiva, y estableciendo como criterio el impacto del déficit cognitivo sobre las actividades de la vida diaria. Estas recomendaciones han mostrado una especificidad del 100%, pero una sensibilidad más baja para el diagnóstico de demencia en la EP comparado con una evaluación neuropsicológica completa (*Barton et al, 2012*). Por otro lado, los niveles séricos de AU son variables y fueron medidos en una única ocasión, en el momento del estudio. Tratamos de minimizar este fenómeno analizando variantes genéticas estables que influyen sobre la uricemia, y la ausencia de asociación de estos polimorfismos con el riesgo de demencia fue concordante con los resultados bioquímicos.

En la segunda parte del trabajo investigamos la posible implicación de la progranulina sobre el riesgo y el fenotipo de la enfermedad de Parkinson. Las evidencias a favor del papel neuroprotector de la progranulina y su implicación en la neurodegeneración son numerosas. La haploinsuficiencia de PGRN por mutaciones de pérdida de función en humanos se asocian a la DLFT y a distintos patrones de enfermedad neurodegenerativa con una gran variabilidad fenotípica incluso dentro de una misma familia (*Rovelet-Lecrux et al, 2008*), incluyendo frecuentes manifestaciones parkinsonianas (*Kelley et al, 2009*). Además, se han detectado mutaciones de *GRN* en sujetos diagnosticados clínicamente de EP (*Brouwers et al, 2007*). A nivel experimental, los modelos animales deficientes en progranulina presentan una mayor susceptibilidad al daño neuronal causado por la exposición a MPTP (*Martens et al, 2012*). Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que la deficiencia en PGRN podría influir también sobre el proceso degenerativo que conduce a la EP. Sin embargo, los estudios realizados en el campo de la EP son muy escasos y con resultados poco concluyentes.

La mayoría de los trabajos publicados estudian la relación de mutaciones patogénicas del gen *GRN* con diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la EP. Estas mutaciones patogénicas producen una reducción teórica de los niveles de PGRN en el cerebro de al menos el 50%, que puede detectarse en distintos fluidos

biológicos incluido el suero (*Ghidoni et al, 2008*). Por este motivo, se tuvo en cuenta la posibilidad de que alguno de los sujetos incluidos en el estudio pudiese ser portador de alguna mutación patogénica del gen *GRN*, lo cual se descartó de forma indirecta por no presentar ninguno de los individuos niveles inferiores a los considerados indicativos de la presencia de mutaciones de pérdida de función (*Ghidoni et al, 2012*). Se ha planteado que, dado su aparente papel clave en el proceso neurodegenerativo en estas enfermedades, reducciones inferiores al 50% en los niveles de PGRN también podrían ser patogénicas. De este modo, surge el estudio de variantes genéticas frecuentes que modifican los niveles de PGRN y su posible asociación con enfermedades neurológicas, como la EP (*Chang et al, 2013; Chen et al, 2015*).

En este trabajo no hemos encontrado diferencias en las concentraciones séricas de PGRN entre pacientes con EP idiopática y controles, de manera que los niveles de PGRN no parecen influir sobre el riesgo de EP en nuestra población. Hasta ahora, sólo nuestro grupo había estudiado los niveles séricos de PGRN en una población heterogénea de sujetos con enfermedades neurodegenerativas que incluía un subgrupo de pacientes con EP (*Mateo et al, 2013*). A diferencia de los resultados actuales, encontramos entonces que los individuos con EP presentaban unos niveles séricos de PGRN significativamente más bajos que las otras poblaciones de enfermos neurológicos estudiadas y el grupo control. A pesar de haber aumentado ligeramente el tamaño muestral, particularmente del grupo control, no hemos conseguido replicar dicha asociación en este trabajo. A la luz de estos resultados no podemos descartar que la asociación anteriormente encontrada obedezca a un error estadístico de tipo 1. Por otro lado, la falta de estudios similares no nos permite comparar nuestros resultados con otras cohortes. Todo ello nos dificulta sacar conclusiones sobre la posible influencia de la PGRN en los mecanismos patogénicos que desencadenan la EP.

Aunque no detectamos diferencias significativas en los niveles de PGRN entre sujetos con EP idiopática y controles, sí que la hubo entre los portadores de la mutación G2019S de *LRRK2*: los pacientes con EP y mutación de *LRRK2* presentaban niveles de PGRN más altos que los portadores asintomáticos. Este hallazgo es concordante con algunos de los resultados de un trabajo reciente realizado en portadores de mutaciones de *LRRK2* (*Caesar et al, 2014*). Este grupo demostró que la proteína *Lrrk2* interaccionaba a nivel intracelular con la PGRN, y que la secreción de PGRN se

encontraba reducida en cultivos de fibroblastos y células inmunes de ratones y humanos portadores de mutaciones de *LRRK2* por un mecanismo desconocido independiente de la actividad kinasa de *Lrrk2*. A continuación, determinaron los niveles de PGRN en el LCR de ratones con mutaciones de *LRRK2*, y detectaron que en las fases presintomáticas o sintomáticas tempranas los ratones transgénicos mostraban niveles reducidos de PGRN en LCR, mientras que en estadios sintomáticos más avanzados los niveles se encontraban incrementados. También observaron que los niveles de PGRN estaban significativamente aumentados en el LCR de pacientes con mutaciones sintomáticas de *LRRK2*, pero no en individuos con EP idiopática ni en controles sanos. Estos autores sugieren que mientras que la elevación tardía de los niveles de esta proteína con función antiinflamatoria y neurotrófica podría representar un intento fallido de reducir el proceso neuroinflamatorio y/o neurodegenerativo que acontece en la EP, la reducción temprana de los niveles de PGRN podría tener un papel fisiopatológico. Un razonamiento similar podría aplicarse a los hallazgos de nuestro trabajo, en el que los sujetos con mutación G2019S del gen *LRRK2* que no presentan aún síntomas de EP presentan niveles significativamente más bajos de PGRN que los portadores sintomáticos de la mutación.

Los niveles de PGRN en el suero pueden variar en función de diversas situaciones y, además, podrían no reflejar de manera precisa sus concentraciones en una región concreta del cerebro (*Carrasquillo et al, 2010*). Según esto, el estudio de los factores genéticos que regulan su expresión podría representar una diana más fiable que los niveles circulantes para el conocimiento de su implicación en el riesgo de desarrollar la enfermedad. Por dicho motivo, nos planteamos estudiar la asociación entre cinco polimorfismos genéticos localizados en tres genes distintos que han demostrado influir sobre los niveles séricos de PGRN en estudios previos (*Rademakers et al, 2008; Van Deerlin et al, 2010; Carrasquillo et al, 2010*).

De los cinco polimorfismos estudiados, sólo rs646776-*SORT1* se asoció a los niveles de PGRN en nuestra cohorte. La asociación del SNP rs646776-*SORT1* con los niveles séricos de progranulina ha sido comunicada previamente por varios grupos, incluido el nuestro (*Carrasquillo et al, 2010; Mateo et al, 2013; Nicholson et al, 2014*). Nuestros resultados coinciden con los reportados en el trabajo de *Carrasquillo et al*, en el que el alelo menor G de rs646776 se asociaba con una reducción de los niveles de

PGRN en suero, y estimaban que cada copia de este alelo disminuía los niveles de PGRN en aproximadamente un 16%. Como en nuestro caso, a pesar de su influencia sobre los niveles séricos de PGRN, no encontraron asociación entre esta variante genética y el riesgo de EP. Estos autores argumentan que, a diferencia del efecto de las mutaciones del gen *GRN* que afectan a los niveles de PGRN en cada célula y tejido, el efecto del polimorfismo rs646776 sobre la PGRN resultaría probablemente de una regulación específica en el hígado de *SORT1*, de modo que los niveles de PGRN en el suero no reflejarían con precisión los niveles de PGRN en el cerebro. El hallazgo posterior de que este SNP se asociaba con los niveles plasmáticos de PGRN pero no con sus niveles en el LCR (*Nicholson et al, 2014*) refuerza la hipótesis de que la regulación de los niveles de PGRN por este polimorfismo podría tener lugar exclusivamente a nivel periférico y, de ese modo, no influir sobre el riesgo de la enfermedad.

En línea con los resultados obtenidos en un trabajo previo de nuestro grupo (*Mateo et al, 2013*), no detectamos asociación entre el polimorfismo rs5848 del gen *GRN* y los niveles séricos de PGRN. Estos resultados difieren de los observados por otros grupos, que encontraban que el alelo menor T se asociaba con niveles más bajos de PGRN (*Hsiung et al, 2011; Nicholson et al, 2014*). Sin embargo, otros autores no han podido establecer dicha asociación (*Galimberti et al, 2012*).

Las variantes genéticas en el gen *TMEM106b* tampoco influyen sobre los niveles séricos de PGRN en nuestra población. La asociación de estos SNPs sobre los niveles periféricos de PGRN es controvertida. Algunos grupos han observado que los alelos menores de estos polimorfismos se asocian con niveles más altos de PGRN en sangre, principalmente para el rs1990622 (*Finch et al, 2011; Cruchaga et al, 2011*). Por el contrario, otros trabajos recientes tampoco han encontrado que los SNPs de *TMEM106b* modifiquen los niveles de PGRN en suero (*Gallagher et al, 2014; Serpente et al, 2015*). La falta de asociación entre estas variantes genéticas y los niveles de PGRN podría radicar en un tamaño muestral insuficiente, aunque los hallazgos contradictorios que encontramos en la literatura no permite descartar que estos polimorfismos no influyan realmente sobre los niveles de PGRN en suero.

Con otro de los SNPs estudiados, el rs1020004-*TMEM106b*, observamos el fenómeno contrario: detectamos una asociación estadísticamente significativa con el

riesgo de EP y, sin embargo, no vimos una correlación de los genotipos de dicho SNP con los niveles séricos de progranulina. Una posible explicación para este hallazgo, en la misma línea que lo argumentado para el SNP rs646776-*SORT1*, podría ser que la regulación de los niveles de PGRN se produciría de una manera órgano-específica, en este caso a nivel del SNC, y no se vería reflejada en sangre periférica. Alternativamente, podría suceder que el efecto de dicho SNP sobre el riesgo de la enfermedad tuviese lugar a través de mecanismos diferentes de la regulación de la PGRN. No podemos descartar tampoco que debido al limitado tamaño muestral esta asociación observada entre rs1020004 y el riesgo de EP corresponda a un falso positivo. Otros estudios tendrán que replicar estos hallazgos en poblaciones mayores para concederles validez. Desde nuestro punto de vista y a pesar de los datos positivos de asociación anteriormente referidos, vistos todos los resultados en su conjunto y considerando tanto los datos bioquímicos como genéticos, entendemos que los niveles séricos de progranulina y los factores genéticos que teóricamente los regulan no tienen una influencia significativa en el riesgo de la EP.

Tras el análisis del riesgo y dadas las propiedades neuroprotectoras de la progranulina quisimos ver si los niveles séricos de progranulina y los factores genéticos que los regulan tenían un efecto sobre aspectos del fenotipo de la enfermedad y la gravedad del curso clínico. Los niveles séricos de PGRN se han asociado con un riesgo incrementado de desarrollo de enfermedades neurodegenerativas en las que la demencia es una característica principal, como la DLFT (*Baker et al, 2006; Cruts et al, 2006*), la EA (*Brouwers et al, 2007*), el síndrome corticobasal (*Masellis et al, 2006*) o la demencia por cuerpos de Lewy (*Le Ber et al, 2008*). Además, la demencia asociada a la EP se caracteriza por la coexistencia de diversas neuropatologías, y la patología de tipo EA parece jugar un importante papel en el desarrollo de demencia en pacientes con EP (*Apaydin et al, 2002; Irwin et al, 2012*). Los niveles séricos de progranulina fueron similares en nuestro estudio en los pacientes de EP con y sin demencia. Tampoco observamos una correlación entre dichos niveles y la severidad de la enfermedad medida a través de las escalas motoras Hoehn y Yahr y UPDRS-III. La edad de inicio de los síntomas o el subtipo clínico tampoco se vieron modificados en función de los niveles séricos de progranulina.

A la hora de estudiar el efecto sobre el fenotipo de la EP de las variantes en los genes relacionados con los niveles séricos de progranulina seleccionamos únicamente dos de los cinco SNPs analizados: el rs646776-*SORT1*, por ser el único en el que habíamos detectado una asociación con los niveles séricos de PGRN, y el rs1020004, por estar asociado al riesgo de enfermedad. Encontramos una asociación débil ($p=0,04$) entre el SNP rs646776-*SORT1* y el riesgo de demencia en la EP; no obstante, la falta de asociación entre niveles de PGRN y demencia sugiere que muy probablemente éste no constituye un biomarcador útil de riesgo de demencia en la EP. Aunque también observamos un retraso de la edad de inicio de la enfermedad en los sujetos homocigotos para el alelo A, el hecho de no detectar un efecto de dosis génica nos hace dudar igualmente de la validez de dicho hallazgo. En relación al SNP rs1020004, asociado al riesgo de EP en nuestro estudio, no vimos que modificara la edad de inicio de la enfermedad en los sujetos con EP.

Con los matices mencionados anteriormente y teniendo en cuenta las limitaciones existentes podemos concluir este apartado señalando que los resultados derivados de este estudio no apoyan la hipótesis de que los niveles séricos de progranulina y los factores genéticos que los regulan ejerzan un papel importante en el riesgo de padecer EP o en su fenotipo.

VII. CONCLUSIONES

1. Los niveles séricos de ácido úrico son menores en los varones con enfermedad de Parkinson.
2. El efecto combinado de ocho SNPs en los genes *SLC2A9*, *ABCG2*, *SLC17A1*, *SLC22A11*, *SLC22A12*, *GCKR*, *PDZK1*, *LRRC16A+SCGN* y *SLC16A9* se asocia a niveles séricos bajos de ácido úrico.
3. El efecto combinado de los ocho SNPs asociados a niveles bajos de uricemia incrementa el riesgo de enfermedad de Parkinson.
4. Los niveles séricos de ácido úrico no se asocian a la presencia de demencia en la enfermedad de Parkinson, tampoco se asocian con el fenotipo, la duración de la enfermedad o la severidad de la afectación clínica.
5. Los SNPs reguladores de la uricemia no modifican el riesgo de demencia asociada a la enfermedad de Parkinson.
6. Los niveles séricos de progranulina no se asocian con la enfermedad de Parkinson.
7. De los cinco polimorfismos relacionados con las concentraciones plasmáticas de progranulina, *GRN* rs5848, *TMEM106b* rs6966915, rs1020004 y rs1990622, y rs646776-*SORT1*, sólo este último se asocia a los niveles séricos de progranulina en nuestra población.
8. El polimorfismo rs1020004-*TMEM106b* se asocia al riesgo de enfermedad de Parkinson.
9. Los niveles séricos de progranulina no se asocian a la presencia de demencia en la enfermedad de Parkinson, tampoco se asocian con el fenotipo, la duración de la enfermedad o la severidad de la afectación clínica.
10. Los SNPs reguladores de los niveles séricos de progranulina no modifican el riesgo de demencia asociada a la enfermedad de Parkinson.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Lolk A, Nielsen H, Kragh-Sørensen P. Risk of dementia in Parkinson's disease: a community-based, prospective study. *Neurology*. 2001 Mar 27;56(6):730-6.
- Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Lolk A, Kragh-Sørensen P. Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study. *Arch Neurol*. 2003 Mar;60(3):387-92.
- Aarsland D, Brønneck 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 Jan;78(1):36-42.
- 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 Nov;58(5):773-6.
- Aarsland D, Zaccai J, Brayne C. A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2005 Oct;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 Aug 15;22(11):1581-6.
- Adler CH, Connor DJ, Hentz JG, Sabbagh MN, Caviness JN, Shill HA, et al. Incidental Lewy body disease: clinical comparison to a control cohort. *Mov Disord*. 2010 Apr 15;25(5):642-6.
- Afsar B, Elsurur R, Covic A, Johnson RJ, Kanbay M. Relationship between uric acid and subtle cognitive dysfunction in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2011;34(1):49-54.
- Ahmed Z, Sheng H, Xu YF, Lin WL, Innes AE, Gass J, et al. Accelerated lipofuscinosis and ubiquitination in granulin knockout mice suggest a role for progranulin in successful aging. *Am J Pathol*. 2010 Jul;177(1):311-24.
- Alcalay RN, Caccappolo E, Mejia-Santana H, Tang MX, Rosado L, Ross BM, et al. Frequency of known mutations in early-onset Parkinson disease: implication for genetic counseling: the consortium on risk for early onset Parkinson disease study. *Arch Neurol*. 2010 Sep;67(9):1116-22.
- Alfred T, Ben-Shlomo Y, Cooper R, Hardy R, Deary IJ, Elliott J, et al; HALCyon study team. Associations between a polymorphism in the pleiotropic GCKR and Age-related phenotypes: the HALCyon programme. *PLoS One*. 2013 Jul 23;8(7):e70045.
- Almeida S, Zhang Z, Coppola G, Mao W, Futai K, Karydas A, et al. Induced pluripotent stem cell models of progranulin-deficient frontotemporal dementia uncover specific reversible neuronal defects. *Cell Rep*. 2012 Oct 25;2(4):789-98.
- Alonso A, Rodríguez LA, Logroscino G, Hernán MA. Gout and risk of Parkinson disease: a prospective study. *Neurology* 2007 Oct 23;69(17):1696-1700.
- Alvarez-Erviti L, Couch Y, Richardson J, Cooper JM, Wood MJ. Alpha-synuclein release by neurons activates the inflammatory response in a microglial cell line. *Neurosci Res*. 2011 Apr;69(4):337-42.

- Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, et al. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch Neurol*. 2010 Dec;67(12):1464-72.
- Alves G, Brønneck 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 Oct;81(10):1080-6.
- Alves G, Larsen JP, Emre M, Wentzel-Larsen T, Aarsland D. Changes in motor subtype and risk for incident dementia in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2006 Aug;21(8):1123-30.
- Al-Nimer MS, Mshatat SF, Abdulla HI. Saliva α -Synuclein and A High Extinction Coefficient Protein: A Novel Approach in Assessment Biomarkers of Parkinson's Disease. *N Am J Med Sci*. 2014 Dec;6(12):633-7.
- Amboni M, Barone P, Iuppariello L, Lista I, Tranfaglia R, Fasano A, et al. Gait patterns in Parkinsonian patients with or without mild cognitive impairment. *Mov Disord*. 2012 Oct;27(12):1536-43.
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981 Nov;78(11):6858-62.
- Ammal Kaidery N, Tarannum S, Thomas B. Epigenetic landscape of Parkinson's disease: emerging role in disease mechanisms and therapeutic modalities. *Neurotherapeutics*. 2013 Oct;10(4):698-708.
- Anang JB, Gagnon JF, Bertrand JA, Romenets SR, Latreille V, Panisset M, et al. Predictors of dementia in Parkinson disease: a prospective cohort study. *Neurology*. 2014 Sep 30;83(14):1253-60.
- Annamaki T, Pohja M, Parviainen T, Hakkinen P, Murros K. Uric acid and cognition in Parkinson's disease: a follow-up study. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011 Jun;17(5):333-7.
- Anzai N, Ichida K, Jutabha P, Kimura T, Babu E, Jin CJ, et al. Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. *J Biol Chem*. 2008 Oct 3;283(40):26834-8.
- Anzai N, Kanai Y, Endou H. New insights into renal transport of urate. *Curr Opin Rheumatol*. 2007 Mar;19(2):151-7.
- Anzai N, Miyazaki H, Noshiro R, Khamdang S, Chairoungdua A, Shin HJ, et al. The multivalent PDZ domain-containing protein PDZK1 regulates transport activity of renal urate-anion exchanger URAT1 via its C terminus. *J Biol Chem*. 2004 Oct 29;279(44):45942-50.
- 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 Jan;59(1):102-12.
- Ascherio A, LeWitt PA, Xu K, Eberly S, Watts A, Matson WR, et al; Parkinson Study Group DATATOP Investigators. Urate as a predictor of the rate of clinical decline in Parkinson disease. *Arch Neurol*. 2009 Dec;66(12):1460-8.

- Auinger P, Kieburzt K, McDermott MP. The relationship between uric acid levels and Huntington's disease progression. *Mov Disord*. 2010 Jan 30;25(2):224-8.
- Baba T, Kikuchi A, Hirayama K, Nishio Y, Hosokai Y, Kanno S, et al. Severe olfactory dysfunction is a prodromal symptom of dementia associated with Parkinson's disease: a 3 year longitudinal study. *Brain*. 2012 Jan;135(Pt 1):161-9.
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, et al. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature*. 2006 Aug 24;442(7105):916-9.
- 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 Apr;67(4):416-21.
- Barone P, Antonini A, Colosimo C, Marconi R, Morgante L, Avarello TP, et al; The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2009 Aug 15;24(11):1641-9.
- Barton B, Gragli D, Bernard B, Czernecki V, Goldman JG, Stebbins G, et al. Clinical validation of Movement Disorder Society-recommended diagnostic criteria for Parkinson's disease with dementia. *Mov Disord*. 2012 Feb;27(2):248-53.
- Basseville A, Bates SE. Gout, genetics and ABC transporters. *F1000 Biol Rep*. 2011;3:23.
- Belcastro V, Siciliano V, Gregoretti F, Mithbaokar P, Dharmalingam G, Berlingieri S, et al. Transcriptional gene network inference from a massive dataset elucidates transcriptome organization and gene function. *Nucleic Acids Res*. 2011 Nov 1;39(20):8677-88.
- Benamer HT, de Silva R, Siddiqui KA, Grosset DGT. Parkinson's disease in Arabs: a systematic review. *Mov Disord*. 2008 Jul 15;23(9):1205-10.
- 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 Oct;22(10):716-24.
- Bobulescu IA, Moe OW. Renal transport of uric acid: evolving concepts and uncertainties. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2012 Nov;19(6):358-71.
- 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 Jun;52(6):848-55.
- 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 Mar;131(Pt 3):690-705.
- Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*. 2004 Oct;318(1):121-34.
- Brady OA, Zheng Y, Murphy K, Huang M, Hu F. The frontotemporal lobar degeneration risk factor, TMEM106b, regulates lysosomal morphology and function. *Hum Mol Genet*. 2013 Feb 15;22(4):685-95.
- Breydo L, Wu JW, Uversky VN. A-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Feb;1822(2):261-85.

- Brice A. How much does dardarin contribute to Parkinson's disease? *Lancet*. 2005 Jan 29-Feb 4;365(9457):363-4.
- Brockmann K, Srulijes K, Pflederer S, Hauser AK, Schulte C, Maetzler W, et al. GBA-associated Parkinson's disease: reduced survival and more rapid progression in a prospective longitudinal study. *Mov Disord*. 2015 Mar;30(3):407-11.
- Brouwers N, Nuytemans K, van der Zee J, Gijssels I, Engelborghs S, Theuns J, et al. Alzheimer and Parkinson diagnoses in progranulin null mutation carriers in an extended founder family. *Arch Neurol*. 2007 Oct;64(10):1436-46.
- Brouwers N, Sleegers K, Engelborghs S, Maurer-Stroh S, Gijssels I, van der Zee J, et al. Genetic variability in progranulin contributes to risk for clinically diagnosed Alzheimer disease. *Neurology*. 2008 Aug 26;71(9):656-64.
- Buddhala C, Campbell MC, Perlmutter JS, Kotzbauer PT. Correlation between decreased CSF α -synuclein and A β ₁₋₄₂ in Parkinson disease. *Neurobiol Aging*. 2015 Jan;36(1):476-84.
- 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 May;77(5):585-9.
- Caesar M, Felk S, Zach S, Brønstad G, Aasly JO, Gasser T, et al. Changes in matrix metalloprotease activity and progranulin levels may contribute to the pathophysiological function of mutant leucine-rich repeat kinase 2. *Glia*. 2014 Jul;62(7):1075-92.
- Carecchio M, Galimberti D, Fenoglio C, Serpente M, Scarpini E, Comi C, et al. Evidence of pre-synaptic dopaminergic deficit in a patient with a novel progranulin mutation presenting with atypical parkinsonism. *J Alzheimers Dis*. 2014;38(4):747-52.
- Carlesimo GA, Piras F, Assogna F, Pontieri FE, Caltagirone C, Spalletta G. Hippocampal abnormalities and memory deficits in Parkinson disease: a multimodal imaging study. *Neurology*. 2012 Jun 12;78(24):1939-45.
- Carrasquillo MM, Nicholson AM, Finch N, Gibbs JR, Baker M, Rutherford NJ, et al. Genome-wide screen identifies rs646776 near sortilin as a regulator of progranulin levels in human plasma. *Am J Hum Genet*. 2010 Dec 10;87(6):890-7.
- Caspi D, Lubart E, Graff E, Habot B, Yaron M, Segal R. The effect of mini-dose aspirin on renal function and uric acid handling in elderly patients. *Arthritis Rheum*. 2000 Jan;43(1):103-8.
- Celardo I, Martins LM, Gandhi S. Unravelling mitochondrial pathways to Parkinson's disease. *Br J Pharmacol*. 2014 Apr;171(8):1943-57.
- Chang KH, Chen CM, Chen YC, Hsiao YC, Huang CC, Kuo HC, et al. Association between GRN rs5848 polymorphism and Parkinson's disease in Taiwanese population. *PLoS One*. 2013;8(1):e54448.
- 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 Jul;84(7):1318-24.
- Chen X, Guo X, Huang R, Chen Y, Zheng Z, Shang H. Serum uric acid levels in patients with Alzheimer's disease: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Apr 8;9(4):e94084.

- Chen Y, Li S, Su L, Sheng J, Lv W, Chen G, et al. Association of progranulin polymorphism rs5848 with neurodegenerative diseases: a meta-analysis. *J Neurol*. 2015 Apr;262(4):814-22.
- 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 Apr;69(4):655-63.
- Chen-Plotkin AS, Unger TL, Gallagher MD, Bill E, Kwong LK, Volpicelli-Daley L, et al. TMEM106b, the risk gene for frontotemporal dementia, is regulated by the microRNA-132/212 cluster and affects progranulin pathways. *J Neurosci*. 2012 Aug 15;32(33):11213-27.
- Chen-Plotkin AS, Xiao J, Geser F, Martinez-Lage M, Grossman M, Unger T, et al. Brain progranulin expression in GRN-associated frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol*. 2010 Jan;119(1):111-22.
- Chinta SJ, Mallajosyula JK, Rane A, Andersen JK. Mitochondrial α -synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neurosci Lett*. 2010 Dec 17;486(3):235-9.
- Choi HK, Atkinson K, Karlson EW, Curhan G. Obesity, weight change, hypertension, diuretic use, and risk of gout in men: the health professionals follow-up study. *Arch Intern Med*. 2005 Apr 11;165(7):742-8.
- Choi HK, Atkinson K, Karlson EW, Willett W, Curhan G. Alcohol intake and risk of incident gout in men: a prospective study. *Lancet*. 2004 Apr 17;363(9417):1277-81.
- Choi HK, Curhan G. Coffee, tea, and caffeine consumption and serum uric acid level: the third national health and nutrition examination survey. *Arthritis Rheum*. 2007 Jun 15;57(5):816-21.
- Choi HK, Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome in individuals with hyperuricemia. *Am J Med*. 2007 May;120(5):442-7.
- Choi HK, Ford ES, Li C, Curhan G. Prevalence of the metabolic syndrome in patients with gout: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Rheum*. 2007; 57(1):109-115.
- 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 Sep;35(3):385-98.
- Chung CY, Koprach JB, Siddiqi H, Isacson O. Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy. *J Neurosci*. 2009 Mar 18;29(11):3365-73.
- Church WH, Ward VL. Uric acid is reduced in the substantia nigra in Parkinson's disease: effect on dopamine oxidation. *Brain Res Bull*. 1994;33(4):419-25.
- Cipriani S, Chen X, Schwarzschild MA. Urate: a novel biomarker of Parkinson's disease risk, diagnosis and prognosis. *Biomark Med*. 2010 Oct;4(5):701-12.
- Cohen AM, Aberdroth RE, Hochstein P. Inhibition of free radical-induced DNA damage by uric acid. *FEBS Lett*. 1984 Aug 20;174(1):147-50.

- Colla E, Jensen PH, Pletnikova O, Troncoso JC, Glabe C, Lee MK. Accumulation of toxic α -synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in α -synucleinopathy in vivo. *J Neurosci*. 2012 Mar 7;32(10):3301-5.
- Colombrita C, Onesto E, Megiorni F, Pizzuti A, Baralle FE, Buratti E, et al. TDP-43 and FUS RNA-binding proteins bind distinct sets of cytoplasmic messenger RNAs and differently regulate their post-transcriptional fate in motoneuron-like cells. *J Biol Chem*. 2012 May 4;287(19):15635-47.
- Colosimo C, Hughes AJ, Kilford L, Lees AJ. Lewy body cortical involvement may not always predict dementia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003 Jul;74(7):852-6.
- Compta Y, Parkkinen L, O'Sullivan SS, Vandrovcova J, Holton JL, Collins C, et al. Lewy- and Alzheimer-type pathologies in Parkinson's disease dementia: which is more important? *Brain*. 2011 May;134(Pt 5):1493-505.
- Crews L, Spencer B, Desplats P, Patrick C, Paulino A, Rockenstein E, et al. Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease and in models of alpha-synucleinopathy. *PLoS One*. 2010 Feb 19;5(2):e9313.
- Cruchaga C, Graff C, Chiang HH, Wang J, Hinrichs AL, Spiegel N, et al. Association of TMEM106B gene polymorphism with age at onset in granulin mutation carriers and plasma granulin protein levels. *Arch Neurol*. 2011 May;68(5):581-6.
- Cruts M, Gijselink I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, et al. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature*. 2006 Aug 24;442(7105):920-4.
- Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A. Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem*. 2000 Jul;48(7):999-1009.
- Darios F, Corti O, Lücking CB, Hampe C, Muriel MP, Abbas N, et al. Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet*. 2003 Mar 1;12(5):517-26.
- Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J*. 1986 May 1;235(3):747-54.
- 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 Sep 1;144(5):480-4.
- De Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006 Jun;5(6):525-35.
- De Lau LM, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Serum uric acid levels and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2005 Nov;58(5):797-800.
- 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 Jul;84(7):774-83.
- De Muynck L, Herdewyn S, Beel S, Scheveneels W, Van Den Bosch L, Robberecht W, et al. The neurotrophic properties of progranulin depend on the granulin E domain but do not require sortilin binding. *Neurobiol Aging*. 2013 Nov;34(11):2541-7.

- Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 4;106(31):13010-5.
- Dev KK, Hofele K, Barbieri S, Buchman VL, van der Putten H. Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*. 2003 Jul;45(1):14-44.
- Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem*. 2008 Apr 4;283(14):9089-100.
- Devic I, Hwang H, Edgar JS, Izutsu K, Presland R, Pan C, et al. Salivary α -synuclein and DJ-1: potential biomarkers for Parkinson's disease. *Brain*. 2011 Jul;134(Pt 7):e178.
- Dexter DT, Sian J, Rose S, Hindmarsh JG, Mann VM, Cooper JM, et al. Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol*. 1994 Jan;35(1):38-44.
- Diaz-Cueto L, Stein P, Jacobs A, Schultz RM, Gerton GL. Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). *Dev Biol*. 2000; 217:406-18.
- Dietz GP, Stockhausen KV, Dietz B, Falkenburger BH, Valbuena P, Opazo F, et al. Membrane-permeable Bcl-xL prevents MPTP-induced dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra. *J Neurochem*. 2008 Feb;104(3):757-65.
- Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2002 Jan;80(1):101-10.
- Dubois B, Burn D, Goetz C, Aarsland D, Brown RG, Broe GA, et al. Diagnostic procedures for Parkinson's disease dementia: recommendations from the movement disorder society task force. *Mov Disord*. 2007 Dec;22(16):2314-24.
- 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 May;38(6):938-49.
- Ehringer H, Hornykiewicz O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr*. 1960 Dec 15;38:1236-9.
- Elbaz A. LRRK2: bridging the gap between sporadic and hereditary Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2008 Jul;7(7):562-4.
- 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 Sep 15;22(12):1689-707.
- Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature*. 2002 May 23; 417(6887):447-52.

- Esposito A, Dohm CP, Kermer P, Bähr M, Wouters FS. alpha-Synuclein and its disease-related mutants interact differentially with the microtubule protein tau and associate with the actin cytoskeleton. *Neurobiol Dis.* 2007 Jun;26(3):521-31.
- Esteves AR, Arduíno DM, Swerdlow RH, Oliveira CR, Cardoso SM. Oxidative stress involvement in alpha-synuclein oligomerization in Parkinson's disease cybrids. *Antioxid Redox Signal.* 2009 Mar;11(3):439-48.
- Euser SM, Hofman A, Westendorp RG, Breteler MM. Serum uric acid and cognitive function and dementia. *Brain.* 2009 Feb;132(Pt 2):377-82.
- Facheris MF, Hicks AA, Minelli C, Hagenah JM, Kostic V, Campbell S, et al. Variation in the uric acid transporter gene SLC2A9 and its association with AAO of Parkinson's disease. *J Mol Neurosci.* 2011 Mar;43(3):246-50.
- Fahn S, Elton RL, and members of the UPDRS committee. Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In: Fahn S, Marsden CD, Goldstein M, Calne DB, eds. *Recent developments in Parkinson's Disease.* New Jersey: McMillan Health Care, 1987:153-163.
- Fang F, Xu Q, Park Y, Huang X, Hollenbeck A, Blair A, et al. Depression and the subsequent risk of Parkinson's disease in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Mov Disord.* 2010 Jul 15; 25(9):1157-62.
- Fehér Á, Juhász A, László A, Pákási M, Kálmán J, Janka Z. Association between the ABCG2 C421A polymorphism and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2013 Aug 29;550:51-4.
- Feng JQ, Guo FJ, Jiang BC, Zhang Y, Frenkel S, Wang DW, et al. Granulin epithelin precursor: a bone morphogenic protein 2-inducible growth factor that activates Erk1/2 signaling and JunB transcription factor in chondrogenesis. *FASEB J.* 2010 Jun;24(6):1879-92.
- Finch N, Carrasquillo MM, Baker M, Rutherford NJ, Coppola G, Dejesus-Hernandez M, et al. TMEM106b regulates progranulin levels and the penetrance of FTL in GRN mutation carriers. *Neurology.* 2011 Feb 1;76(5):467-74.
- Floris G, Cannas A, Solla P, Murru MR, Tranquilli S, Corongiu D, et al. Genetic analysis for five LRRK2 mutations in a Sardinian parkinsonian population: importance of G2019S and R1441C mutations in sporadic Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009 May;15(4):277-80.
- Foltnie 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 Mar;127(Pt 3):550-60.
- Forsaa EB, Larsen JP, Wentzel-Larsen T, Alves G. What predicts mortality in Parkinson disease?: a prospective population-based long-term study. *Neurology.* 2010 Oct 5;75(14):1270-6.
- Fortin DL, Nemani VM, Voglmaier SM, Anthony MD, Ryan TA, Edwards RH. Neural activity controls the synaptic accumulation of alpha-synuclein. *J Neurosci.* 2005 Nov 23;25(47):10913-21.
- Friedman JH. Parkinson's disease psychosis 2010: a review article. *Parkinsonism Relat Disord.* 2010 Nov;16(9):553-60.

- Fuchs J, Nilsson C, Kachergus J, Munz M, Larsson EM, Schüle B, et al. Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. *Neurology*. 2007 Mar 20;68(12):916-22.
- Fujita KA, Ostaszewski M, Matsuoka Y, Ghosh S, Glaab E, Trefois C, et al. Integrating pathways of Parkinson's disease in a molecular interaction map. *Mol Neurobiol*. 2014 Feb;49(1):88-102.
- Gagnon JF, Vendette M, Postuma RB, Desjardins C, Massicotte-Marquez J, Panisset M, et al. Mild cognitive impairment in rapid eye movement sleep behavior disorder and Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2009 Jul;66(1):39-47.
- Galimberti D, Dell'Osso B, Fenoglio C, Villa C, Cortini F, Serpente M, et al. Progranulin gene variability and plasma levels in bipolar disorder and schizophrenia. *PLoS One*. 2012;7(4):e32164.
- Gallagher MD, Suh E, Grossman M, Elman L, McCluskey L, Van Swieten JC, et al. TMEM106B is a genetic modifier of frontotemporal lobar degeneration with C9orf72 hexanucleotide repeat expansions. *Acta Neuropathol*. 2014 Mar;127(3):407-18.
- Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB J*. 2003 Oct;17(13):1954-6.
- Gao HM, Zhou H, Zhang F, Wilson BC, Kam W, Hong JS. HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive neurodegeneration. *J Neurosci*. 2011 Jan 19;31(3):1081-92.
- Gaspar P, Gray F. Dementia in idiopathic Parkinson's disease. A neuropathological study of 32 cases. *Acta Neuropathol*. 1984;64(1):43-52.
- Gass J, Lee WC, Cook C, Finch N, Stetler C, Jansen-West K, et al. Progranulin regulates neuronal outgrowth independent of sortilin. *Mol Neurodegener*. 2012 Jul 10;7:33.
- Gass J, Prudencio M, Stetler C, Petrucelli L. Progranulin: an emerging target for FTL D therapies. *Brain Res*. 2012 Jun 26;1462:118-28.
- Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet*. 2010 Dec 15;19(24):4861-70.
- Ghaemi-Oskouie F, Shi Y. The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation. *Curr Rheumatol Rep*. 2011 Apr;13(2):160-6.
- Ghidoni R, Benussi L, Glionna M, Franzoni M, Binetti G. Low plasma progranulin levels predict progranulin mutations in frontotemporal lobar degeneration. *Neurology*. 2008 Oct 14;71(16):1235-9.
- Ghidoni R, Stoppani E, Rossi G, Piccoli E, Albertini V, Paterlini A, et al. Optimal plasma progranulin cutoff value for predicting null progranulin mutations in neurodegenerative diseases: a multicenter Italian study. *Neurodegener Dis*. 2012;9(3):121-7.
- Gillardon F, Schmid R, Draheim H. Parkinson's disease-linked leucine-rich repeat kinase 2(R1441G) mutation increases proinflammatory cytokine release from activated primary microglial cells and resultant neurotoxicity. *Neuroscience*. 2012 Apr 19;208:41-8.

- Gisler SM, Pribanic S, Bacic D, Forrer P, Gantenbein A, Sabourin LA, et al. PDZK1: I. a major scaffold in brush borders of proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2003 Nov; 64(5):1733-45.
- Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA. Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des.* 2005;11(32):4145-51.
- Gliebus G, Rosso A, Lippa CF. Progranulin and beta-amyloid distribution: a case report of the brain from preclinical PS-1 mutation carrier. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2009 Dec-2010 Jan;24(6):456-60.
- Goldwurm S, Zini M, Mariani L, Tesei S, Miceli R, Sironi F, et al. Evaluation of LRRK2 G2019S penetrance: relevance for genetic counseling in Parkinson disease. *Neurology.* 2007 Apr 3; 68(14):1141-3.
- Goris A, Williams-Gray CH, Clark GR, Foltynie T, Lewis SJ, Brown J, et al. Tau and alpha-synuclein in susceptibility to, and dementia in, Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2007 Aug;62(2):145-53.
- Grau-Rivera O, Gelpi E, Rey MJ, Valldeoriola F, Tolosa E, Compta Y, et al. Prominent psychiatric symptoms in patients with Parkinson's disease and concomitant argyrophilic grain disease. *J Neurol.* 2013 Dec;260(12):3002-9.
- Grossman M, Gross RG, Moore P, Dreyfuss M, McMillan CT, Cook PA, et al. Difficulty processing temporary syntactic ambiguities in Lewy body spectrum disorder. *Brain Lang.* 2012 Jan;120(1):52-60.
- Guerreiro S, Ponceau A, Toulorge D, Martin E, Alvarez-Fischer D, Hirsch EC, et al. Protection of midbrain dopaminergic neurons by the end-product of purine metabolism uric acid: potentiation by low-level depolarization. *J Neurochem.* 2009 May;109(4):1118-28.
- Guerrero AL, Martín-Polo J, Laherrán E, Gutiérrez F, Iglesias F, Tejero MA, et al. Variation of serum uric acid levels in multiple sclerosis during relapses and immunomodulatory treatment. *Eur J Neurol.* 2008 Apr;15(4):394-7.
- Gunjaca C, Boban MN, Pehlić M, Zemunik T, Budimir D, Kolčić I, et al. Predictive value of 8 genetic loci for serum uric acid concentration. *Croat Med J.* 2010 Feb;51(1):23-31.
- Guo A, Tapia L, Bamji SX, Cynader MS, Jia W. Progranulin deficiency leads to enhanced cell vulnerability and TDP-43 translocation in primary neuronal cultures. *Brain Res.* 2010 Dec 17;1366:1-8.
- Hagos Y, Stein D, Ugele B, Burckhardt G, Bahn A. Human renal organic anion transporter 4 operates as an asymmetric urate transporter. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Feb;18(2):430-9.
- Hak AE, Choi HK. Menopause, postmenopausal hormone use and serum uric acid levels in US women--the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):R116.
- Hall S, Surova Y, Öhrfelt A, Zetterberg H, Lindqvist D, Hansson O. CSF biomarkers and clinical progression of Parkinson disease. *Neurology.* 2015 Jan 6;84(1):57-63.
- Halliday G, Hely M, Reid W, Morris J. The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2008 Apr;115(4):409-15.

- Han JH, Ryu HH, Jun MH, Jang DJ, Lee JA. The functional analysis of the CHMP2B missense mutation associated with neurodegenerative diseases in the endo-lysosomal pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 May 11;421(3):544-9.
- Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007 Dec; 33(6):599-614.
- He Z, Bateman A. Progranulin gene expression regulates epithelial cell growth and promotes tumor growth in vivo. *Cancer Res*. 1999 Jul 1;59(13):3222-9.
- He Z, Ismail A, Kriazhev L, Sadvakassova G, Bateman A. Progranulin (PC cell-derived growth factor/acrogranin) regulates invasion and cell survival. *Cancer Res*. 2002 Oct 1;62(19):5590-6..
- He Z, Ong CH, Halper J, Bateman A. Progranulin is a mediator of the wound response. *Nat Med*. 2003 Feb;9(2):225-9.
- 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 Apr 30;23(6):837-44.
- Hermey G. The Vps10p-domain receptor family. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Aug; 66(16):2677-89.
- Hindle JV. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing*. 2010 Mar;39(2):156-61.
- Hink HU, Santanam N, Dikalov S, McCann L, Nguyen AD, Parthasarathy S, et al. Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Sep 1;22(9):1402-8.
- 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 Sep;19(9):1043-9.
- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*. 1967 May;17(5):427-42.
- Hollingworth P, Sweet R, Sims R, Harold D, Russo G, Abraham R, et al. Genome-wide association study of Alzheimer's disease with psychotic symptoms. *Mol Psychiatry*. 2012 Dec;17(12):1316-27.
- Hoogland J, de Bie RM, Williams-Gray CH, Muslimović D, Schmand B, Post B. Catechol-O-methyltransferase val158met and cognitive function in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2010 Nov 15;25(15):2550-4.
- Horowitz MP, Greenamyre JT. Gene-environment interactions in Parkinson's disease: the importance of animal modeling. *Clin Pharmacol Ther*. 2010 Oct;88(4):467-74.
- Houlihan LM, Wyatt ND, Harris SE, Hayward C, Gow AJ, Marioni RE, et al. Variation in the uric acid transporter gene (SLC2A9) and memory performance. *Hum Mol Genet*. 2010 Jun 1;19(11):2321-30.
- Hsiung GY, Fok A, Feldman HH, Rademakers R, Mackenzie IR. rs5848 polymorphism and serum progranulin level. *J Neurol Sci* 2011;300:28-32.

- Hu F, Padukavidana T, Vægter CB, Brady OA, Zheng Y, Mackenzie IR, et al. Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron*. 2010 Nov 18;68(4):654-67.
- 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 Mar;55(3):181-4.
- Hughes TA, Ross HF, Musa S, Bhattacharjee S, Nathan RN, Mindham RH, Spokes EG. A 10-year study of the incidence of and factors predicting dementia in Parkinson's disease. *Neurology*. 2000 Apr 25;54(8):1596-602.
- Huot P, Johnston TH, Darr T, Hazrati LN, Visanji NP, Pires D, et al. Increased 5-HT_{2A} receptors in the temporal cortex of parkinsonian patients with visual hallucinations. *Mov Disord*. 2010 Jul 30;25(10):1399-408.
- 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 May 23;54(10):1916-21.
- Iaccarino C, Crosio C, Vitale C, Sanna G, Carrì MT, Barone P. Apoptotic mechanisms in mutant LRRK2-mediated cell death. *Hum Mol Genet*. 2007 Jun 1;16(11):1319-26.
- Ichida K. What lies behind serum urate concentration? Insights from genetic and genomic studies. *Genome Med*. 2009 Dec 29;1(12):118.
- Iharada M, Miyaji T, Fujimoto T, Hiasa M, Anzai N, Omote H, et al. Type 1 sodium-dependent phosphate transporter (SLC17A1 Protein) is a Cl⁻-dependent urate exporter. *J Biol Chem*. 2010 Aug 20;285(34):26107-13.
- Infante J, Rodríguez E, Combarros O, Mateo I, Fontalba A, Pascual J, et al. LRRK2 G2019S is a common mutation in Spanish patients with late-onset Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2006 Mar 13;395(3):224-6.
- Iravani MM, Haddon CO, Rose S, Jenner P. 3-Nitrotyrosine-dependent dopaminergic neurotoxicity following direct nigral administration of a peroxynitrite but not a nitric oxide donor. *Brain Res*. 2006 Jan 5;1067(1):256-62.
- Irizarry MC, Raman R, Schwarzschild MA, Becerra LM, Thomas RG, Peterson RC, et al. Plasma urate and progression of mild cognitive impairment. *Neurodegener Dis*. 2009;6(1-2):23-8.
- Irwin DJ, White MT, Toledo JB, Xie SX, Robinson JL, Van Deerlin V, et al. Neuropathologic substrates of Parkinson disease dementia. *Ann Neurol*. 2012 Oct;72(4):587-98.
- Jang A, Lee HJ, Suk JE, Jung JW, Kim KP, Lee SJ. Non-classical exocytosis of alpha-synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. *J Neurochem*. 2010 Jun;113(5):1263-74.
- Jankovic J, McDermott M, Carter J, Gauthier S, Goetz C, Golbe L, et al. Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study Group. *Neurology*. 1990 Oct;40(10):1529-34.
- Jayaraj RL, Elangovan N, Dhanalakshmi C, Manivasagam T, Essa MM. CNB-001, a novel pyrazole derivative mitigates motor impairments associated with neurodegeneration via

- suppression of neuroinflammatory and apoptotic response in experimental Parkinson's disease mice. *Chem Biol Interact.* 2014 Sep 5;220:149-57.
- Jayaraj RL, Elangovan N, Manigandan K, Singh S, Shukla S. CNB-001 a novel curcumin derivative, guards dopamine neurons in MPTP model of Parkinson's disease. *Biomed Res Int.* 2014;2014:236182.
- Jellinger KA. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Mov Disord.* 2012 Jan;27(1):8-30.
- Jellinger KA, Attems J. Prevalence and impact of vascular and Alzheimer pathologies in Lewy body disease. *Acta Neuropathol.* 2008 Apr;115(4):427-36.
- Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53 Suppl 3:S26-S36.
- Jeon SM, Cheon SM, Bae HR, Kim JW, Kim SU. Selective susceptibility of human dopaminergic neural stem cells to dopamine-induced apoptosis. *Exp Neurobiol.* 2010 Dec;19(3):155-64.
- Jian J, Konopka J, Liu C. Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2013 Feb;93(2):199-208.
- Jun G, Ibrahim-Verbaas CA, Vronskaya M, Lambert JC, Chung J, Naj AC, et al. A novel Alzheimer disease locus located near the gene encoding tau protein. *Mol Psychiatry.* 2015 Mar 17 (in press).
- Kang JH, Irwin DJ, Chen-Plotkin AS, Siderowf A, Caspell C, Coffey CS, et al; Parkinson's Progression Markers Initiative. Association of cerebrospinal fluid β -amyloid 1-42, T-tau, P-tau181, and α -synuclein levels with clinical features of drug-naïve patients with early Parkinson disease. *JAMA Neurol.* 2013 Oct;70(10):1277-87.
- Kao AW, Eisenhut RJ, Martens LH, Nakamura A, Huang A, Bagley JA, et al. A neurodegenerative disease mutation that accelerates the clearance of apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15;108(11):4441-6.
- Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt NP, Rieder MJ, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet.* 2008 Feb;40(2):189-97.
- Keizman D, Ish-Shalom M, Berliner S, Maimon N, Vered Y, Artamonov I, et al. Low uric acid levels in serum of patients with ALS: further evidence for oxidative stress? *J Neurol Sci.* 2009 Oct 15;285(1-2):95-9.
- Kelley BJ, Haidar W, Boeve BF, Baker M, Graff-Radford NR, Krefft T, et al. Prominent phenotypic variability associated with mutations in Progranulin. *Neurobiol Aging.* 2009 May;30(5):739-51.
- Kessenbrock K, Fröhlich L, Sixt M, Lämmermann T, Pfister H, Bateman A, et al. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *J Clin Invest.* 2008 Jul;118(7):2438-47.
- Kiebertz K, Wunderle KB. Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. *Mov Disord.* 2013 Jan;28(1):8-13.
- Kim JY, Kim DH, Kim JH, Yang YS, Oh W, Lee EH, et al. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells protect amyloid- β 42 neurotoxicity via paracrine. *World J Stem Cells.* 2012 Nov 26;4(11):110-6.

- Kim TS, Pae CU, Yoon SJ, Jang WY, Lee NJ, Kim JJ, et al. Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2006 Apr;21(4):344-8.
- Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci*. 2000 Aug 15;20(16):6309-16.
- Kimura T, Takahashi M, Yan K, Sakurai H. Expression of SLC2A9 isoforms in the kidney and their localization in polarized epithelial cells. *PLoS One*. 2014; 9(1):e84996.
- Klassen BT, Hentz JG, Shill HA, Driver-Dunckley E, Evidente VG, Sabbagh MN, et al. Quantitative EEG as a predictive biomarker for Parkinson disease dementia. *Neurology*. 2011 Jul 12;77(2):118-24.
- Klein JC, Eggers C, Kalbe E, Weisenbach S, Hohmann C, Vollmar S, et al. Neurotransmitter changes in dementia with Lewy bodies and Parkinson disease dementia in vivo. *Neurology*. 2010 Mar 16;74(11):885-92.
- Kleinberger G, Wils H, Ponsaerts P, Joris G, Timmermans JP, Van Broeckhoven C, et al. Increased caspase activation and decreased TDP-43 solubility in progranulin knockout cortical cultures. *J Neurochem*. 2010 Nov;115(3):735-47.
- Kojima Y, Ono K, Inoue K, Takagi Y, Kikuta K, Nishimura M, et al. Progranulin expression in advanced human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis*. 2009 Sep;206(1):102-8.
- Kolz M, Johnson T, Sanna S, Teumer A, Vitart V, Perola M, et al. Meta-analysis of 28,141 individuals identifies common variants within five new loci that influence uric acid concentrations. *PLoS Genet*. 2009 Jun;5(6):e1000504.
- Koopman WJ, Willems PH, Smeitink JA. Monogenic mitochondrial disorders. *N Engl J Med*. 2012 Mar 22;366(12):1132-41.
- Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett*. 2010 Apr 2;584(7):1393-8.
- Köttgen A, Albrecht E, Teumer A, Vitart V, Krumsiek J, Hundertmark C, et al. Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations. *Nat Genet*. 2013 Feb;45(2):145-54.
- Krammer C, Schätzl HM, Vorberg I. Prion-like propagation of cytosolic protein aggregates: insights from cell culture models. *Prion*. 2009 Oct-Dec;3(4):206-12.
- Kratzer JT, Lanaspá MA, Murphy MN, Cicerchi C, Graves CL, Tipton PA, et al. Evolutionary history and metabolic insights of ancient mammalian uricases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 11; 111(10):3763-8.
- Kuhl DE, Minoshima S, Fessler JA, Frey KA, Foster NL, Ficaró EP, et al. In vivo mapping of cholinergic terminals in normal aging, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1996 Sep;40(3):399-410.
- Labos C, Martínez SC, Leo Wang RH, Lenzini PA, Pilote L, Bogaty P, Brophy JM, Engert JC, Cresci S, Thanassoulis G. Utility of a genetic risk score to predict recurrent cardiovascular events 1 year after an acute coronary syndrome: A pooled analysis of the RISCA, PRAXY, and TRIUMPH cohorts. *Atherosclerosis*. 2015 Sep;242(1):261-7.

- Lang CM, Fellerer K, Schwenk BM, Kuhn PH, Kremmer E, Edbauer D, et al. Membrane orientation and subcellular localization of transmembrane protein 106B (TMEM106b), a major risk factor for frontotemporal lobar degeneration. *J Biol Chem*. 2012 Jun 1;287(23):19355-65.
- Langston JW. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann Neurol*. 2006 Apr;59(4):591-6.
- Langston JW, Forno LS, Tetrad J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol*. 1999 Oct;46(4):598-605.
- Lashley T, Holton JL, Gray E, Kirkham K, O'Sullivan SS, Hilbig A, et al. Cortical alpha-synuclein load is associated with amyloid-beta plaque burden in a subset of Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol*. 2008 Apr;115(4):417-25.
- Latourelle JC, Sun M, Lew MF, Suchowersky O, Klein C, Golbe LI, et al. The Gly209Ser mutation in LRRK2 is not fully penetrant in familial Parkinson's disease: the GenePD study. *BMC Med*. 2008 Nov 5;6:32.
- Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JA, Timpson N, Davey Smith G. Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. *Stat Med*. 2008 Apr 15;27(8):1133-63.
- Lazuardi L, Herndler-Brandstetter D, Brunner S, Laschober GT, Lepperdinger G, Grubeck-Loeben B. Microarray analysis reveals similarity between CD8+CD28- T cells from young and elderly persons, but not of CD8+CD28+ T cells. *Biogerontology*. 2009 Apr;10(2):191-202.
- Le Ber I, Camuzat A, Hannequin D, Pasquier F, Guedj E, Rovelet-Lecrux A, et al; French research network on FTD/FTD-MND. Phenotype variability in progranulin mutation carriers: a clinical, neuropsychological, imaging and genetic study. *Brain*. 2008 Mar;131(Pt 3):732-46.
- Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao FB. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol*. 2007 Sep 18;17(18):1561-7.
- Leem E, Nam JH, Jeon MT, Shin WH, Won SY, Park SJ, et al. Naringin protects the nigrostriatal dopaminergic projection through induction of GDNF in a neurotoxin model of Parkinson's disease. *J Nutr Biochem*. 2014 Jul;25(7):801-6.
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet*. 2009 Jun 13;373(9680):2055-66.
- Leong SL, Cappai R, Barnham KJ, Pham CL. Modulation of alpha-synuclein aggregation by dopamine: a review. *Neurochem Res*. 2009 Oct;34(10):1838-46.
- Li J, Dong BR, Lin P, Zhang J, Liu GJ. Association of cognitive function with serum uric acid level among Chinese nonagenarians and centenarians. *Exp Geront*. 2010 May;45(5):331-5.
- Li S, Sanna S, Maschio A, Busonero F, Usala G, Mulas A, et al. The GLUT9 gene is associated with serum uric acid levels in Sardinia and Chianti cohorts. *PLoS Genet*. 2007 Nov;3(11):e194.

- Lim HY, Albuquerque B, Häussler A, Myrczek T, Ding A, Tegeder I. Progranulin contributes to endogenous mechanisms of pain defense after nerve injury in mice. *J Cell Mol Med*. 2012 Apr;16(4):708-21.
- Lindersson E, Beedholm R, Højrup P, Moos T, Gai W, Hendil KB, et al. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *J Biol Chem*. 2004 Mar 26;279(13):12924-34.
- Liu C, Cholerton B, Shi M, Ginghina C, Cain KC, Auinger P; Parkinson Study Group DATATOP Investigators, Zhang J. CSF tau and tau/A β 42 predict cognitive decline in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015 Mar;21(3):271-6.
- Liu Q, Hou J, Chen X, Liu G, Zhang D, Sun H, et al. P-glycoprotein mediated efflux limits the transport of the novel anti-Parkinson's disease candidate drug FLZ across the physiological and PD pathological in vitro BBB models. *PLoS One*. 2014 Jul 18;9(7):e102442.
- Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Vojinovic S, Milojkovic M, Dunjic O, Stojanov D, et al. Association of serum bilirubin and uric acid levels changes during neuroinflammation in patients with initial and relapsed demyelination attacks. *Metab Brain Dis*. 2013 Dec;28(4):629-38.
- Lu RC, Wang H, Tan MS, Yu JT, Tan L. TMEM106b and APOE polymorphisms interact to confer risk for late-onset Alzheimer's disease in Han Chinese. *J Neural Transm*. 2014; 121(3):283-7.
- Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron*. 2009 Oct 15;64(1):110-22.
- Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, et al. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*. 2012 Nov 16;338(6109):949-53.
- Macedo MG, Verbaan D, Fang Y, van Rooden SM, Visser M, Anar B, et al. Genotypic and phenotypic characteristics of Dutch patients with early onset Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2009 Jan 30;24(2):196-203.
- Majed HH, Chandran S, Niclou SP, Nicholas RS, Wilkins A, Wing MG, et al. A novel role for Sema3A in neuroprotection from injury mediated by activated microglia. *J Neurosci*. 2006 Feb 8;26(6):1730-8.
- Malaspina A, Kaushik N, de Belleruche J. Differential expression of 14 genes in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord detected using gridded cDNA arrays. *J Neurochem*. 2001 Apr;77(1):132-45.
- Marion MH, Qurashi M, Marshall G, Foster O. Is REM sleep behaviour disorder (RBD) a risk factor of dementia in idiopathic Parkinson's disease? *J Neurol*. 2008 Feb;255(2):192-6.
- Markowitz CE, Spitsin S, Zimmerman V, Jacobs D, Udupa JK, Hooper DC, et al. The treatment of multiple sclerosis with inosine. *J Altern Complement Med*. 2009 Jun;15(6):619-25.
- Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*. 1988 Aug;8(8):2804-15.

- Martens LH, Zhang J, Barmada SJ, Zhou P, Kamiya S, Sun B, et al. Progranulin deficiency promotes neuroinflammation and neuron loss following toxin-induced injury. *J Clin Invest*. 2012 Nov;122(11):3955-9.
- Martín-Fernández JJ, Carles-Díes R, Cañizares F, Parra S, Avilés F, Villegas I, et al. Homocysteine and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Rev Neurol*. 2010 Feb 1-15;50(3):145-51.
- Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Kaushik S, Massey AC, Mazzulli J, Mosharov EV, et al. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest*. 2008 Feb;118(2):777-88.
- Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006 Mar 9;440(7081):237-41.
- Masellis M, Momeni P, Meschino W, Heffner R Jr, Elder J, Sato C, et al. Novel splicing mutation in the progranulin gene causing familial corticobasal syndrome. *Brain*. 2006 Nov;129(Pt 11):3115-23.
- Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, et al. Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain*. 2013 Apr;136(Pt 4):1128-38.
- Mateo I, González-Aramburu I, Pozueta A, Vázquez-Higuera JL, Rodríguez-Rodríguez E, Sánchez-Juan P, et al. *Eur J Neurol*. 2013 Dec;20(12):1571-3.
- Matsubara T, Mita A, Minami K, Hosooka T, Kitazawa S, Takahashi K, et al. PGRN is a key adipokine mediating high fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue. *Cell Metab*. 2012 Jan 4;15(1):38-50.
- Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol*. 2010 Apr 19;189(2):211-21.
- Matsuo H, Yamamoto K, Nakaoka H, Nakayama A, Sakiyama M, Chiba T, et al. Genome-wide association study of clinically defined gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes. *Ann Rheum Dis*. 2015 Feb 2 (in press).
- Matsuwaki T, Asakura R, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Age-dependent changes in progranulin expression in the mouse brain. *J Reprod Dev*. 2011 Feb;57(1):113-9.
- Mattila PM, Rinne JO, Helenius H, Dickson DW, Røyttä M. Alpha-synuclein-immunoreactive cortical Lewy bodies are associated with cognitive impairment in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2000 Sep;100(3):285-90.
- Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell*. 2011 Jul 8;146(1):37-52.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*. 1988 Aug;38(8):1285-91.
- Melzer TR, Watts R, MacAskill MR, Pitcher TL, Livingston L, Keenan RJ, et al. Grey matter atrophy in cognitively impaired Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 Feb;83(2):188-94.

- Mendez-Hernandez E, Salas-Pacheco J, Ruano-Calderon L, Tellez-Valencia A, Cisneros-Martinez J, Barraza-Salas M, et al. Lower uric Acid linked with cognitive dysfunction in the elderly. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2015;14(5):564-6.
- Merriman TR. An update on the genetic architecture of hyperuricemia and gout. *Arthritis Res Ther*. 2015 Apr 10;17(1):98.
- Minami SS, Min SW, Krabbe G, Wang C, Zhou Y, Asgarov R, et al. Progranulin protects against amyloid β deposition and toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Nat Med*. 2014 Oct;20(10):1157-64.
- Miyazaki H, Anzai N, Ekaratanawong S, Sakata T, Shin HJ, Jutabha P, et al. Modulation of renal apical organic anion transporter 4 function by two PDZ domain-containing proteins. *Am Soc Nephrol*. 2005 Dec;16(12):3498-506.
- Mollenhauer B, Steinacker P, Bahn E, Bibl M, Brechlin P, Schlossmacher MG, et al. Serum heart-type fatty acid-binding protein and cerebrospinal fluid tau: marker candidates for dementia with Lewy bodies. *Neurodegener Dis*. 2007;4(5):366-75.
- Mollenhauer B, Trenkwalder C, von Ahsen 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.
- Molshatzki N, Weinstein G, Streifler JY, Goldbourt U, Tanne D. Serum uric acid and subsequent cognitive performance in patients with pre-existing cardiovascular disease. *PLoS One*. 2015 Mar 20;10(3):e0120862.
- 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 May;20(5):503-7.
- Montero-Odasso M, Verghese J, Beauchet O, Hausdorff JM. Gait and cognition: a complementary approach to understanding brain function and the risk of falling. *J Am Geriatr Soc*. 2012 Nov;60(11):2127-36.
- Mori H, Kondo T, Yokochi M, Matsumine H, Nakagawa-Hattori Y, Miyake T, et al. Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology*. 1998 Sep;51(3):890-2.
- Morley JF, Xie SX, Hurtig HI, Stern MB, Colcher A, Horn S, et al. Genetic influences on cognitive decline in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012 Apr;27(4):512-8.
- Mosley RL, Hutter-Saunders JA, Stone DK, Gendelman HE. Inflammation and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Jan;2(1):a009381.
- Mott RT, Ait-Ghezala G, Town T, Mori T, Vendrame M, Zeng J, et al. Neuronal expression of CD22: novel mechanism for inhibiting microglial proinflammatory cytokine production. *Glia*. 2004 May;46(4):369-79.
- Mount DB, Kwon CY, Zandi-Nejad K. Renal urate transport. *Rheum Dis Clin North Am*. 2006 May;32(2):313-31, vi.
- Muslimovic D, Post B, Speelman JD, Schmand B. Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease. *Neurology*. 2005 Oct 25;65(8):1239-45.

- Musunuru K, Strong A, Frank-Kamenetsky M, Lee NE, Ahfeldt T, Sachs KV, et al. From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature*. 2010 Aug 5;466(7307):714-9.
- Nakashima-Yasuda H, Uryu K, Robinson J, Xie SX, Hurtig H, Duda JE, et al. Comorbidity of TDP-43 proteinopathy in Lewy body related diseases. *Acta Neuropathol*. 2007 Sep;114(3):221-9.
- Nakayama A, Matsuo H, Shimizu T, Ogata H, Takada Y, Nakashima H, et al. Common missense variant of monocarboxylate transporter 9 (MCT9/SLC16A9) gene is associated with renal overload gout, but not with all gout susceptibility. *Hum Cell*. 2013 Dec;26(4):133-6.
- Nakayama A, Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Ikebuchi Y, et al. ABCG2 is a high-capacity urate transporter and its genetic impairment increases serum uric acid levels in humans. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2011 Dec;30(12):1091-7.
- 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 Sep;46(9):989-93.
- Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Lee MK, et al. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron*. 2010 Jan 14;65(1):66-79.
- Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH, et al. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain*. 2009 Jul;132(Pt 7):1783-94.
- Nicholls A, Snaith ML, Scott JT. Effect of oestrogen therapy on plasma and urinary levels of uric acid. *Br Med J*. 1973 Feb 24; 1(5851):449-51.
- Nicholson AM, Finch NA, Thomas CS, Wojtas A, Rutherford NJ, Mielke MM, et al. Progranulin protein levels are differently regulated in plasma and CSF. *Neurology*. 2014 May 27;82(21):1871-8.
- Nicholson AM, Finch NA, Wojtas A, Baker MC, Perkerson RB 3rd, Castanedes-Casey M, et al. TMEM106b p.T185S regulates TMEM106b protein levels: implications for frontotemporal dementia. *J Neurochem*. 2013 Sep;126(6):781-91.
- Nilsen J, Brinton RD. Mitochondria as therapeutic targets of estrogen action in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2004 Aug;3(4):297- 313.
- 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 Dec;72(6):893-901.
- Nuytemans K, Pals P, Sleegers K, Engelborghs S, Corsmit E, Peeters K, et al. Progranulin variability has no major role in Parkinson disease genetic etiology. *Neurology*. 2008;71:1147-51.
- Oakley AE, Collingwood JF, Dobson J, Love G, Perrott HR, Edwardson JA, et al. Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. *Neurology*. 2007 May 22;68(21):1820-5.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med*. 2010 Jun;16(6):653-61.

- Offen D, Beart PM, Cheung NS, Pascoe CJ, Hochman A, Gorodin S, et al. Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 12;95(10):5789-94.
- Olde Dubbelink KT, Hillebrand A, Twisk JW, Deijen JB, Stoffers D, Schmand BA, et al. Predicting dementia in Parkinson disease by combining neurophysiologic and cognitive markers. *Neurology*. 2014 Jan 21;82(3):263-70.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):315-424.
- Park B, Buti L, Lee S, Matsuwaki T, Spooner E, Brinkmann MM, et al. Granulin is a soluble cofactor for toll-like receptor 9 signaling. *Immunity*. 2011 Apr 22;34(4):505-13.
- Parkkinen L, Kauppinen T, Pirttilä T, Autere JM, Alafuzoff I. Alpha-synuclein pathology does not predict extrapyramidal symptoms or dementia. *Ann Neurol*. 2005 Jan;57(1):82-91.
- Parkkinen L, Pirttilä T, Alafuzoff I. Applicability of current staging/categorization of alpha-synuclein pathology and their clinical relevance. *Acta Neuropathol*. 2008 Apr;115(4):399-407.
- 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*. 2014 Jul;29(8):1019-27.
- 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 Nov 15;64(10):850-5.
- Pellecchia MT, Santangelo G, Picillo M, Pivonello R, Longo K, Pivonello C, et al. Serum epidermal growth factor predicts cognitive functions in early, drug-naïve Parkinson's disease patients. *J Neurol*. 2013 Feb;260(2):438-44.
- Pereson S, Wils H, Kleinberger G, McGowan E, Vandewoestyne M, Van Broeck B, et al. Progranulin expression correlates with dense-core amyloid plaque burden in Alzheimer disease mouse models. *J Pathol*. 2009 Oct;219(2):173-81.
- Perier C, Vila M. Mitochondrial biology and Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Feb;2(2):a009332.
- Perry EK, Marshall E, Thompson P, McKeith IG, Collerton D, Fairbairn AF, et al. Monoaminergic activities in Lewy body dementia: relation to hallucinosis and extrapyramidal features. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*. 1993;6(3):167-77.
- Perry TL, Godin DV, Hansen S. Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci Lett*. 1982 Dec 13;33(3):305-10.
- Petkau TL, Leavitt BR. Progranulin in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci*. 2014 Jul;37(7):388-98.
- Petkau TL, Neal SJ, Milnerwood A, Mew A, Hill AM, Orban P, et al. Synaptic dysfunction in progranulin-deficient mice. *Neurobiol Dis*. 2012 Feb;45(2):711-22.
- Petkau TL, Neal SJ, Orban PC, MacDonald JL, Hill AM, Lu G, et al. Progranulin expression in the developing and adult murine brain. *J Comp Neurol*. 2010 Oct 1;518(19):3931-47.

- Petoukhov E, Fernando S, Mills F, Shivji F, Hunter D, Krieger C, et al. Activity-dependent secretion of progranulin from synapses. *J Cell Sci.* 2013 Dec 1;126(Pt 23):5412-21.
- Philips T, De Muynck L, Thu HN, Weynants B, Vanacker P, Dhondt J, et al. Microglial upregulation of progranulin as a marker of motor neuron degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010 Dec;69(12):1191-200. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181fc9aea.
- Phipps-Green AJ, Merriman ME, Topless R, Altaf S, Montgomery GW, Franklin C, et al. Twenty-eight loci that influence serum urate levels: analysis of association with gout. *Ann Rheum Dis.* 2014 Sep 3 (in press).
- Piccoli G, Condcliffe SB, Bauer M, Giesert F, Boldt K, De Astis S, et al. LRRK2 controls synaptic vesicle storage and mobilization within the recycling pool. *J Neurosci.* 2011 Feb 9;31(6):2225-37.
- Pickford F, Marcus J, Camargo LM, Xiao Q, Graham D, Mo JR, et al. Progranulin is a chemoattractant for microglia and stimulates their endocytic activity. *Am J Pathol.* 2011 Jan;178(1):284-95.
- Pimentel MM, Rodrigues FC, Leite MA, Campos Júnior M, Rosso AL, Nicaretta DH, et al. Parkinson disease: α -synuclein mutational screening and new clinical insight into the p.E46K mutation. *Parkinsonism Relat Disord.* 2015 Jun;21(6):586-9.
- Politis M, Wu K, Molloy S, G Bain P, Chaudhuri KR, Piccini P. Parkinson's disease symptoms: the patient's perspective. *Mov Disord.* 2010 Aug 15;25(11):1646-51.
- 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 Jun 27;276(5321):2045-7.
- Porritt M, Stanic D, Finkelstein D, Batchelor P, Lockhart S, Hughes A, et al. Dopaminergic innervation of the human striatum in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2005 Jul;20(7):810-8.
- Postuma RB, Iranzo A, Hogl B, Arnulf I, Ferini-Strambi L, Manni R, et al. Risk factors for neurodegeneration in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: a multicenter study. *Ann Neurol.* 2015 May;77(5):830-9.
- Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TD. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 2014 Nov;29(13):1583-90.
- Qu H, Deng H, Hu Z. Plasma progranulin concentrations are increased in patients with type 2 diabetes and obesity and correlated with insulin resistance. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:360190.
- Quik M, Perez XA, Bordia T. Nicotine as a potential neuroprotective agent for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2012 Jul;27(8):947-57.
- Quilty MC, King AE, Gai WP, Pountney DL, West AK, Vickers JC, et al. Alpha-synuclein is upregulated in neurones in response to chronic oxidative stress and is associated with neuroprotection. *Exp Neurol.* 2006 Jun;199(2):249-56.
- Rademakers R, Eriksen JL, Baker M, Robinson T, Ahmed Z, Lincoln SJ, et al. Common variation in the miR-659 binding-site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet.* 2008 Dec 1;17(23):3631-42.
- Rajput AH, Voll A, Rajput ML, Robinson CA, Rajput A. Course in Parkinson disease subtypes: A 39-year clinicopathologic study. *Neurology.* 2009 Jul 21;73(3):206-12.

- Rees K, Stowe R, Patel S, Ives N, Breen K, Clarke CE, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as disease-modifying agents for Parkinson's disease: evidence from observational studies. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Nov 9;(11):CD008454.
- 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.
- Revelta GJ, Rosso A, Lippa CF. Association between progranulin and beta-amyloid in dementia with Lewy bodies. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*. 2008 Oct-Nov;23(5):488-93.
- Reynolds CA, Hong MG, Eriksson UK, Blennow K, Wiklund F, Johansson B, et al. Analysis of lipid pathway genes indicates association of sequence variation near SREBF1/TOM1L2/ATPAF2 with dementia risk. *Hum Mol Genet*. 2010 May 15;19(10):2068-78.
- Rice ME, Russo-Menna I. Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience*. 1998 Feb;82(4):1213-23.
- Riedel O, Heuser I, Klotsche J, Dodel R, Wittchen HU; GEPAD Study Group. Occurrence risk and structure of depression in Parkinson disease with and without dementia: results from the GEPAD Study. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010 Mar;23(1):27-34.
- Rodríguez-Rodríguez E, Vázquez-Higuera JL, Sánchez-Juan P, González-Aramburu I, Pozueta A, Mateo I, et al. Screening for progranulin mutations by serum protein dosage in common neurodegenerative disorders. *Parkinsonism Relat Disord*. 2013 Aug;19(8):768-9.
- Rollinson S, Rohrer JD, van der Zee J, Sleegers K, Mead S, Engelborghs S, et al. No association of PGRN 3'UTR rs5848 in frontotemporal lobar degeneration. *Neurobiol Aging*. 2011 Apr;32(4):754-5.
- Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Tanner CM, Popper J, Masaki K, et al. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2008 Feb;63(2):167-73.
- Rovelet-Lecrux A, Deramecourt V, Legallic S, Maurage CA, Le Ber I, Brice A, et al. Deletion of the progranulin gene in patients with frontotemporal lobar degeneration or Parkinson disease. *Neurobiol Dis*. 2008 Jul;31(1):41-5.
- Rutherford NJ, Carrasquillo MM, Li M, Bisceglia G, Menke J, Josephs KA, et al. TMEM106b risk variant is implicated in the pathologic presentation of Alzheimer disease. *Neurology*. 2012 Aug 14; 79(7):717-8.
- Ryan CL, KöttgenKöttgen, Chitramuthu BP, Malik S, Li Z, Cao M, et al. Progranulin is expressed within motor neurons and promotes neuronal cell survival. *BMC Neurosci*. 2009 Oct 27;10:130.
- 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 Jul-Sep;23(3):295-7.
- Sandhu MS, Waterworth DM, Debenham SL, Wheeler E, Papadakis K, Zhao JH, et al. LDL-cholesterol concentrations: a genome-wide association study. *Lancet*. 2008 Feb 9;371(9611):483-91.

- Sakiyama M, Matsuo H, Shimizu S, Chiba T, Nakayama A, Takada Y, et al. Common variant of leucine-rich repeat-containing 16A (LRRC16A) gene is associated with gout susceptibility. *Hum Cell*. 2014 Jan;27(1):1-4.
- Sakiyama M, Matsuo H, Shimizu S, Nakashima H, Nakayama A, Chiba T, et al. A common variant of organic anion transporter 4 (OAT4/SLC22A11) gene is associated with renal underexcretion type gout. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2014;29(2):208-10.
- Samii A, Etminan M, Wiens MO, Jafari S. NSAID use and the risk of Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Drugs Aging*. 2009;26(9):769-79.
- Satoh J, Kino Y, Kawana N, Yamamoto Y, Ishida T, Saito Y, et al. TMEM106b expression is reduced in Alzheimer's disease brains. *Alzheimers Res Ther*. 2014 Mar 31;6(2):17.
- Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*. 2008 Apr;88(2):611-38.
- 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 Oct;135(Pt 10):3005-14.
- Schrag M, Mueller C, Zabel M, Crofton A, Kirsch WM, Ghribi O, et al. Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. *Neurobiol Dis*. 2013 Nov;59:100-10.
- 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 Jun;65(6):716-23.
- Schwenk BM, Lang CM, Hogg S, Tahirovic S, Orozco D, Rentzsch K, et al. The FTL D risk factor TMEM106b and MAP6 control dendritic trafficking of lysosomes. *EMBO J*. 2014 Mar 3;33(5):450-67.
- Scott GS, Cuzzocrea S, Genovese T, Koprowski H, Hooper DC. Uric acid protects against secondary damage after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 1;102(9):3483-8.
- Scott GS, Hooper DC. The role of uric acid in protection against peroxynitrite-mediated pathology. *Med Hypotheses*. 2001 Jan;56(1):95-100.
- Segura-Aguilar J, Paris I, Muñoz P, Ferrari E, Zecca L, Zucca FA. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2014 Jun;129(6):898-915.
- Serpente M, Fenoglio C, Clerici F, Bonsi R, Arosio B, Cioffi SM, et al. Transmembrane protein 106B gene (TMEM106B) variability and influence on progranulin plasma levels in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2015;43(3):757-61.
- Shen C, Guo Y, Luo W, Lin C, Ding M. Serum urate and the risk of Parkinson's disease: results from a meta-analysis. *Can J Neurol Sci*. 2013 Jan;40(1):73-9.
- Shen S, Callaghan D, Juzwik C, Xiong H, Huang P, Zhang W. ABCG2 reduces ROS-mediated toxicity and inflammation: a potential role in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2010 Sep;114(6):1590-604.
- Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003 Oct 2;425(6957):516-21.

- 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 Sep 21;75(12):1055-61.
- Sierra M, González-Aramburu I, Sánchez-Juan P, Sánchez-Quintana C, Polo JM, Berciano J, et al. High frequency and reduced penetrance of LRRK2 G2019S mutation among Parkinson's disease patients in Cantabria (Spain). *Mov Disord*. 2011 Nov;26(13):2343-6.
- Simon KC, Eberly S, Gao X, Oakes D, Tanner CM, Shoulson I, et al; Parkinson Study Group. Mendelian randomization of serum urate and parkinson disease progression. *Ann Neurol*. 2014 Dec;76(6):862-8.
- Simón-Sánchez J, Seelaar H, Bochtanovits Z, Deeg DJ, van Swieten JC, Heutink P. Variation at GRN 3'-UTR rs5848 is not associated with a risk of frontotemporal lobar degeneration in Dutch population. *PLoS One*. 2009 Oct 22;4(10):e7494.
- Singh JA, Reddy SG, Kundukulam J. Risk factors for gout and prevention: a systematic review of the literature. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 Mar;23(2):192-202.
- Slegers K, Brouwers N, Maurer-Stroh S, van Es MA, Van Damme P, van Vught PW, et al. Progranulin genetic variability contributes to amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2008 Jul 22;71(4):253-9.
- Smith KR, Damiano J, Franceschetti S, Carpenter S, Canafoglia L, Morbin M, et al. Strikingly different clinicopathological phenotypes determined by progranulin-mutation dosage. *Am J Hum Genet*. 2012 Jun 8;90(6):1102-7.
- Smith JA, Ware EB, Middha P, Beacher L, Kardia SL. Current Applications of Genetic Risk Scores to Cardiovascular Outcomes and Subclinical Phenotypes. *Curr Epidemiol Rep*. 2015;2(3):180-190.
- Sofaer JA, Emery AE. Genes for super-intelligence? *J Med Genet*. 1981 Dec;18(6):410-3.
- Sofic E, Paulus W, Jellinger K, Riederer P, Youdim MB. Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J Neurochem*. 1991 Mar;56(3):978-82.
- 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). *Journal of the Neurological Sciences*. 2011; 310(1-2):86-89.
- 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 Feb 1;26(2):289-96.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997 Aug 28;388(6645):839-40.
- Spina MB, Cohen G. Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Feb;86(4):1398-400.
- Spinelli KJ, Taylor JK, Osterberg VR, Churchill MJ, Pollock E, Moore C, et al. Presynaptic alpha-synuclein aggregation in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2014 Feb 5;34(6):2037-50.

- Stav AL, Aarsland D, Johansen KK, Hessen E, Auning E, Fladby T. Amyloid- β and α -synuclein cerebrospinal fluid biomarkers and cognition in early Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015 Jul;21(7):758-64.
- Stephenson R, Houghton D, Sundararajan S, Doty RL, Stern M, Xie SX, et al. Odor identification deficits are associated with increased risk of neuropsychiatric complications in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2010 Oct 15;25(13):2099-104.
- Stewart T, Liu C, Ghingina C, Cain KC, Auinger P, Cholerton B, et al; Parkinson Study Group DATATOP Investigators. Cerebrospinal fluid α -synuclein predicts cognitive decline in Parkinson disease progression in the DATATOP cohort. *Am J Pathol*. 2014 Apr;184(4):966-75.
- Storhaug HM, Norvik JV, Toft I, Eriksen BO, Løchen ML, Zykova S, et al. Uric acid is a risk factor for ischemic stroke and all-cause mortality in the general population: a gender specific analysis from The Tromsø Study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2013 Dec 11;13:115.
- Strasak AM, Rapp K, Hilbe W, Oberaigner W, Ruttman E, Concin H, et al; VHM&PP Study Group. Serum uric acid and risk of cancer mortality in a large prospective male cohort. *Cancer Causes Control*. 2007 Nov;18(9):1021-9.
- Suh HS, Choi N, Tarassishin L, Lee SC. Regulation of progranulin expression in human microglia and proteolysis of progranulin by matrix metalloproteinase-12 (MMP-12). *PLoS One*. 2012;7(4):e35115.
- Sulzer D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 2007 May;30(5):244-50.
- Suzuki M, Nishihara M. Granulin precursor gene: a sex steroid-inducible gene involved in sexual differentiation of the rat brain. *Mol Genet Metab*. 2002; 75:31-7.
- Tai HC, Schuman EM. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Nov;9(11):826-38.
- Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, Rao RK, Wanner T, Tanzi RE, et al. Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet*. 2001 Apr 15;10(9):919-26.
- Tanaka Y, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. Exacerbated inflammatory responses related to activated microglia after traumatic brain injury in progranulin-deficient mice. *Neuroscience*. 2013 Feb 12;231:49-60.
- Tangkeangsirisin W, Serrero G. PC cell-derived growth factor (PCDGF/GP88, progranulin) stimulates migration, invasiveness, and VEGF expression in breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2004 Sep;25(9):1587-92.
- Tao J, Ji F, Wang F, Liu B, Zhu Y. Neuroprotective effects of progranulin in ischemic mice. *Brain Res*. 2012 Feb 3;1436:130-6.
- Tapia L, Milnerwood A, Guo A, Mills F, Yoshida E, Vasuta C, et al. Progranulin deficiency decreases gross neural connectivity but enhances transmission at individual synapses. *J Neurosci*. 2011 Aug 3;31(31):11126-32.

- Teunissen CE, Veerhuis R, De Vente J, Verhey FR, Vreeling F, van Boxtel MP, et al. Brain-specific fatty acid-binding protein is elevated in serum of patients with dementia-related diseases. *Eur J Neurol*. 2011 Jun;18(6):865-71.
- Thacker EL, Chen H, Patel AV, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, et al. Recreational physical activity and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2008 Jan;23(1):69-74.
- Thaler A, Ash E, Gan-Or Z, Orr-Urtreger A, Giladi N. The LRRK2 G2019S mutation as the cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *J Neural Transm*. 2009;116(11):1473-82.
- Tian L, Rauvala H, Gahmberg CG. Neuronal regulation of immune responses in the central nervous system. *Trends Immunol*. 2009 Feb;30(2):91-9.
- Tokuda T, Salem SA, Allsop D, Mizuno T, Nakagawa M, Qureshi MM, et al. Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Oct 13;349(1):162-6.
- Toncev G, Milicic B, Toncev S, Samardzic G. Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction. *Eur J Neurol*. 2002 May;9(3):221-6.
- Tsuang D, Leverenz JB, Lopez OL, Hamilton RL, Bennett DA, Schneider JA, et al. APOE ϵ 4 increases risk for dementia in pure synucleinopathies. *JAMA Neurol*. 2013 Feb;70(2):223-8.
- Ullman O, Fisher CK, Stultz CM. Explaining the structural plasticity of α -synuclein. *J Am Chem Soc*. 2011 Dec 7;133(48):19536-46.
- Van Damme P, Van Hoecke A, Lambrechts D, Vanacker P, Bogaert E, van Swieten J, et al. Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *J Cell Biol*. 2008 Apr 7;181(1):37-41.
- Van Deerlin VM, Sleiman PM, Martinez-Lage M, Chen-Plotkin A, Wang LS, Graff-Radford NR, et al. Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *Nat Genet*. 2010 Mar;42(3):234-9.
- Van der Harst P, Bakker SJ, de Boer RA, Wolffenbuttel BH, Johnson T, Caulfield MJ, et al. Replication of the five novel loci for uric acid concentrations and potential mediating mechanisms. *Hum Mol Genet*. 2010 Jan 15;19(2):387-95.
- Van der Zee J, Van Langenhove T, Kleinberger G, Sleegers K, Engelborghs S, Vandenberghe R, et al. TMEM106b is associated with frontotemporal lobar degeneration in a clinically diagnosed patient cohort. *Brain*. 2011 Mar;134(Pt 3):808-15.
- Vass R, Ashbridge E, Geser F, Hu WT, Grossman M, Clay-Falcone D, et al. Risk genotypes at TMEM106b are associated with cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2011 Mar;121(3):373-80.
- Vautier S, Milane A, Fernandez C, Chacun H, Lacomblez L, Farinotti R. Role of two efflux proteins, ABCB1 and ABCG2 in blood-brain barrier transport of bromocriptine in a murine model of MPTP-induced dopaminergic degeneration. *J Pharm Pharm Sci*. 2009;12(2):199-208.

- Vendette M, Gagnon JF, Décary A, Massicotte-Marquez J, Postuma RB, Doyon J, et al. REM sleep behavior disorder predicts cognitive impairment in Parkinson disease without dementia. *Neurology*. 2007 Nov 6;69(19):1843-9.
- Vercellino M, Grifoni S, Romagnolo A, Masera S, Mattioda A, Trebini C, et al. Progranulin expression in brain tissue and cerebrospinal fluid levels in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2011 Oct;17(10):1194-201.
- Vila M, Bové J, Dehay B, Rodríguez-Muela N, Boya P. Lysosomal membrane permeabilization in Parkinson disease. *Autophagy*. 2011 Jan;7(1):98-100.
- Viswanathan J, Mäkinen P, Helisalmi S, Haapasalo A, Soininen H, Hiltunen M. An association study between granulin gene polymorphisms and Alzheimer's disease in Finnish population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2009 Jul 5;150B(5):747-50.
- Vranová HP, Hényková E, Kaiserová M, Menšíková K, Vašík M, Mareš J, et al. Tau protein, beta-amyloid₁₋₄₂ and clusterin CSF levels in the differential diagnosis of Parkinsonian syndrome with dementia. *J Neurol Sci*. 2014 Aug 15;343(1-2):120-4.
- Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology*. 2007 Oct;27(5):494-506.
- Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol*. 2013 Apr;47(2):495-508.
- Wang HL, Chou AH, Yeh TH, Li AH, Chen YL, Kuo YL, et al. PINK1 mutants associated with recessive Parkinson's disease are defective in inhibiting mitochondrial release of cytochrome c. *Neurobiol Dis*. 2007 Nov;28(2):216-26.
- Wang Q, Zhang Z, Li L, Wen H, Xu Q. Assessment of cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: prevalence and risk factors. *Clin Interv Aging*. 2014 Feb 12;9:275-81.
- Wang XJ, Luo WF, Wang LJ, Mao CJ, Wang L, Liu CF. Study on uric acid and the related factors associated with cognition in the patients with Parkinson's disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009 Jun 16;89(23):1633-5.
- Watanabe S, Kang DH, Feng L, Nakagawa T, Kanellis J, Lan H, et al. Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. *Hypertension*. 2002 Sep;40(3):355-60.
- Waugh WH. Inhibition of iron-catalyzed oxidations by attainable uric acid and ascorbic acid levels: therapeutic implications for Alzheimer's disease and late cognitive impairment. *Gerontology*. 2008;54(4):238-43.
- Waxman EA, Giasson BI. Induction of intracellular tau aggregation is promoted by α -synuclein seeds and provides novel insights into the hyperphosphorylation of tau. *J Neurosci*. 2011 May 25;31(21):7604-18.
- West AB, Moore DJ, Biskup S, Bugayenko A, Smith WW, Ross CA, et al. Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 15;102(46):16842-7.

- Westbroek W, Gustafson AM, Sidransky E. Exploring the link between glucocerebrosidase mutations and parkinsonism. *Trends Mol Med*. 2011 Sep;17(9):485-93.
- Whitfield JB, Martin NG. Inheritance and alcohol as factors influencing plasma uric acid levels. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)*. 1983;32(2):117-26.
- 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 Nov;132(Pt 11):2958-69.
- 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 May 2;27(18):4832-8.
- 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 Nov;84(11):1258-64.
- Winqvist A, Steenland K, Shankar A. Higher serum uric acid associated with decreased Parkinson's disease prevalence in a large community-based survey. *Mov Disord*. 2010 May 15;25(7):932-6.
- Woodward OM, Köttgen A, Coresh J, Boerwinkle E, Guggino WB, Köttgen M. Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 23;106(25):10338-42.
- 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.
- Xiong H, Callaghan D, Jones A, Bai J, Rasquinha I, Smith C, et al. ABCG2 is upregulated in Alzheimer's brain with cerebral amyloid angiopathy and may act as a gatekeeper at the blood-barrier for Abeta (1-40) peptides. *J Neurosci*. 2009 Apr 29;29(17):5463-75.
- Yang C, Pring M, Wear MA, Huang M, Cooper JA, Svitkina TM, et al. Mammalian CARMIL inhibits actin filament capping by capping protein. *Dev Cell*. 2005 Aug;9(2):209-21.
- Yang Q, Köttgen A, Dehghan A, Smith AV, Glazer NL, Chen MH, et al. Multiple genetic loci influence serum urate levels and their relationship with gout and cardiovascular disease risk factors. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 Dec;3(6):523-30.
- Yarnall AJ, Breen DP, Duncan GW, Khoo TK, Coleman SY, Firbank MJ, et al; ICICLE-PD Study Group. Characterizing mild cognitive impairment in incident Parkinson disease: the ICICLE-PD study. *Neurology*. 2014 Jan 28;82(4):308-16.
- Yarnall AJ, Rochester L, Baker MR, David R, Khoo TK, Duncan GW, et al. Short latency afferent inhibition: a biomarker for mild cognitive impairment in Parkinson's disease? *Mov Disord*. 2013 Aug;28(9):1285-8.
- Yarnall A, Rochester L, Burn DJ. The interplay of cholinergic function, attention, and falls in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2011 Dec;26(14):2496-503.
- Yin F, Banerjee R, Thomas B, Zhou P, Qian L, Jia T, et al. Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. *J Exp Med*. 2010 Jan 18;207(1):117-28.

- 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 Dec;14(12):1357-62.
- Yoo HJ, Hwang SY, Hong HC, Choi HY, Yang SJ, Choi DS, et al. Implication of progranulin and C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3) on inflammation and atherosclerosis in subjects with or without metabolic syndrome. *PLoS One*. 2013;8(2):e55744.
- 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 May 22;14:113.
- Yu TF, Gutman AB. Study of the paradoxical effects of salicylate in low, intermediate and high dosage on the renal mechanisms for excretion of urate in man. *J Clin Invest*. 1959 Aug; 38(8):1298-315.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*. 2004 Feb;55(2):164-73.
- Zeng Y, Callaghan D, Xiong H, Yang Z, Huang P, Zhang W. Abcg2 deficiency augments oxidative stress and cognitive deficits in Tg-SwDI transgenic mice. *J Neurochem*. 2012 Jul;122(2):456-69.
- Zetuský WJ, Jankovic J, Pirozzolo FJ. The heterogeneity of Parkinson's disease: clinical and prognostic implications. *Neurology*. 1985 Apr;35(4):522-6.
- Zhang YJ, Xu YF, Dickey CA, Buratti E, Baralle F, Bailey R, et al. Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43. *J Neurosci*. 2007 Sep 26;27(39):10530-4.
- Zhang Z, Li G, Szeto SS, Chong CM, Quan Q, Huang C, et al. Examining the neuroprotective effects of protocatechuic acid and chrysin on in vitro and in vivo models of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*. 2015 Mar 11;84:331-343.
- Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, et al. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell*. 2002 Dec 13;111(6):867-78.
- Zhu K, van Hilten JJ, Marinus J. Predictors of dementia in Parkinson's disease; findings from a 5-year prospective study using the SCOPA-COG. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014 Sep;20(9):980-5.
- Zhu S, Tai C, Petkau TL, Zhang S, Liao C, Dong Z, et al. Progranulin promotes activation of microglia/macrophage after pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res*. 2013 Sep 12;1530:54-65.
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 2004 Nov 18;44(4):601-7.
- Zoccolella S, Lamberti P, Iliceto G, Diroma C, Armenise E, Defazio G, et al. Plasma homocysteine levels in L-dopa-treated Parkinson's disease patients with cognitive dysfunctions. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(10):1107-10.

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

IX. ANEXO

Genetic Variability Related to Serum Uric Acid Concentration and Risk of Parkinson's Disease

Isabel González-Aramburu, MD,¹
 Pascual Sánchez-Juan, MD,^{1,2} Silvia Jesús, MD,³
 Ana Gorostidi, PhD,^{2,4,5} Eduardo Fernández-Juan, MD,⁶
 Fátima Carrillo, MD,³ María Sierra, MD,^{1,2}
 Pilar Gómez-Garre, PhD,^{2,3} María T. Cáceres-
 Redondo, MD,³ José Berciano, MD,^{1,2}
 Javier Ruiz-Martínez, MD,^{2,4,5} Onofre Combarros, MD,^{1,2}
 Pablo Mir, MD, PhD^{2,3} and Jon Infante, MD^{1,2*}

¹Service of Neurology, University Hospital Marqués de Valdecilla (IFIMAV), University of Cantabria (UC), Santander, Spain ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain ³Movement Disorders Unit, Neurology and Clinical Neurophysiology Services, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Seville, Spain ⁴Biodonostia Research Institute, Neurosciences Area, Donostia, Gipuzkoa, Spain ⁵Hospital Universitario Donostia, Department of Neurology, Movement Disorders Unit, Donostia, Gipuzkoa, Spain ⁶Department of Biochemistry, University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

ABSTRACT

Background: Low serum uric acid (UA) levels have been associated with increased Parkinson's disease (PD) risk and accelerated disease progression. We analyzed the effect of polymorphisms in 9 genes influencing serum UA concentration on the risk of PD.

Methods: We genotyped *SLC2A9* rs734553, *ABCG2* rs2231142, *SLC17A1* rs1183201, *SLC22A11* rs17300741, *SLC22A12* rs505802, *GCKR* rs780094, *PDZK1* rs12129861, *LRRC16A+SCGN* rs742132, and *SLC16A9* rs12356193 in 1061 PD patients and 754 controls. For each subject we calculated a cumulative genetic risk score (GRS), defined as the total number of PD-risk alleles (range, 2–15) associated to lower serum UA levels. Serum UA levels were measured in a subgroup of 365 PD cases and 132 controls.

Results: Serum UA levels were significantly lower in men with PD than in controls. Subjects (both men and women) carrying more than 9 risk alleles (third GRS tertile) had a 1.5 higher risk of developing PD than subjects with less than 8 risk alleles (first GRS tertile). An inverse correlation was observed between higher GRS and lower serum UA concentration in both men and women.

Conclusions: Genetic variability influencing serum UA levels might modify susceptibility to PD. © 2013 International Parkinson and Movement Disorder Society

Key Words: uric acid, Parkinson's disease, genetics

A natural antioxidant effect of uric acid (UA) on dopaminergic neurons has been suggested,^{1,2} with low serum UA levels being associated with a higher risk and faster progression of Parkinson's disease (PD).^{3–6} In addition to environmental factors, serum UA levels are largely determined by genetic factors with an estimated heritability of 73%.⁷ A recent meta-analysis of 14 genome-wide association studies has identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) at 9 different loci that are associated with serum UA levels.⁸ These results have been subsequently replicated.⁹ The joint effect of these genetic variants aggregated as a genetic risk score (GRS) has improved the prediction of serum UA concentration.¹⁰

In a large cohort of PD patients and controls from Spain we analyzed whether a GRS based on the variation on these 9 SNPs related to low serum UA concentration might be associated with PD risk.

Patients and Methods

Patients

The study included 1061 PD patients (43.6% women; mean age at onset 59.5 ± 1.9 years, mean age at study 68.9 ± 0.3 years), and 754 controls (49.6% women; mean age at study 64.7 ± 0.4 years). Patients fulfilling UK PD Society Brain Bank criteria for PD were consecutively recruited from outpatients at 3 Medical Centers in Spain; 2 in the North (University Hospital “Marqués de Valdecilla” in Santander and Donostia University Hospital in San Sebastian) and 1 in the South (University Hospital “Virgen del Rocío” in Seville). Control group consisted of unrelated individuals comprising 188 spouses of PD patients and 566 unaffected relatives of non-PD

Correspondence to: Dr. Jon Infante Ceberio, Service of Neurology, University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander 39008, Spain; jinfante@humv.es

Funding agencies: Marqués de Valdecilla Foundation-IFIMAV (CFR 05/11 to I.G.-A.); Instituto de Investigación Carlos III (FI12/00229 to I.G.-A.); Fondo de Investigación Sanitaria (Instituto de Investigación Carlos III) (PI11/00228 to J.I.); Ministerio de Economía y Competitividad de España (SAF2007–60700 to S.J., F.C., P.G.-G., P.M.); Instituto de Salud Carlos III (PI10/01674 and CP08/00174 to S.J., F.C., P.G.-G., P.M.); Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía (CVI-02526 and CTS-7685 to S.J., F.C., P.G.-G., P.M.); Consejería de Salud y Bienestar Social de la Junta de Andalucía (PI-0377/2007, PI-0741/2010, and PI-0437–2012 to S.J., F.C., P.G.-G., P.M.); Sociedad Andaluza de Neurología (to S.J., F.C., P.G.-G., P.M.); Jacques and Gloria Gossweiler Foundation (to S.J., F.C., P.G.-G., P.M.); Fundación Alicia Koplowitz (to S.J., F.C., P.G.-G., P.M.); “Miguel Servet” program from the Instituto de Salud Carlos III (to P.G.-G.); Marqués de Valdecilla Foundation-IFIMAV (WLA 04/11 to M.S.).

Relevant conflicts of interest/financial disclosures: Nothing to report. Full financial disclosures and author roles may be found in the online version of this article.

Received: 11 December 2012; **Revised:** 28 March 2013; **Accepted:** 9 April 2013

Published online 27 May 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/mds.25507

TABLE 1. Association between low serum uric acid concentration-related GRS and the risk of PD

GRS	PD cases (n)	Controls (n)	OR (95% CI)	P
All sample				
2–7	282	226	Ref	Ref ^a
8–9	282	188	1.19 (0.92–1.54)	.20 ^a
10–15	137	73	1.55 (1.10–2.18)	.012 ^a
Women				
2–7	114	102	Ref	.20 ^b
8–9	126	81	1.07 (0.75–1.50)	.71 ^b
10–15	66	38	1.53 (0.95–2.47)	.078 ^b
Men				
2–7	168	124	Ref	.129 ^b
8–9	156	107	1.35 (0.91–2.00)	.133 ^b
10–15	71	35	1.58 (0.97–2.59)	.068 ^b

The GRS represents the number of risk alleles related to low serum uric acid levels, divided into first tertile (2–7), second tertile (8–9), and third tertile (10–15). Maximum GRS after exclusion of *SLC22A11* was 16.

^aAdjusted for age and sex.

^bAdjusted for age.

GRS, Genetic Risk Score; PD, Parkinson's disease; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

neurological patients drawn from the same outpatient clinics; none of the controls had clinical evidence of neurological disease. Both patients and controls were Caucasians arising from the same base population. Serum UA levels were measured in a subgroup of 365 PD patients (42.7% women; mean age at onset 64.8 ± 0.6 years, mean age at study 70.2 ± 0.5 years) and 132 controls (68.2% women; mean age at study 65.2 ± 0.8 years) from Santander.

Biochemical and Genetic Analysis

The study was approved by the local ethical committees and blood samples were taken after informed consent was obtained from the subjects or their representatives. Fasting serum samples were collected and stored at -80°C until use. Serum UA levels were determined using the ADVIA 2400 chemistry system (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). Genotyping of the 9 SNPs described in the meta-analysis⁸ (*SLC2A9* rs734553, *ABCG2* rs2231142, *SLC17A1* rs1183201, *SLC22A11* rs17300741, *SLC22A12* rs505802, *GCKR* rs780094, *PDZK1* rs12129861, *LRRC16A+SCGN* rs742132, and *SLC16A9* rs12356193) were typed using TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a RT-PCR 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) and in a LightCycler480 instrument (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA).

Statistical Analysis

Serum UA levels in PD patients and controls were compared by Student *t* test. Based on previous studies, analyses were repeated after stratification by sex, and adjusting for age using linear regression. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was calculated for each

SNP using Pearson's χ^2 test. Univariate χ^2 test was performed for each polymorphism, excluding from the analysis those that were deviated from HWE, and subsequently corrected for multiple testing by Bonferroni's adjustment. In addition, we calculated for each subject the cumulative effect of all the SNPs (GRS), assigning 1 point for each allele that was significantly associated with lower levels of serum UA according to the GWAs meta-analysis by Kolz et al.⁸ We also calculated a weighed GRS, with weights proportional to the percent of variance explained for a given gene. For that purpose, we multiplied, for each locus, the number of risk alleles by the beta coefficient from the meta-analysis.⁸

Association between GRS and PD was tested using Pearson's χ^2 test. A further multivariate analysis adjusted for sex and age was carried out by logistic regression. The effect of each genotype on serum UA concentration was determined by ANOVA test in PD cases and controls. The GRS was correlated with serum UA levels using Pearson's r^2 test, and we used ANOVA test and post-hoc Bonferroni corrected Student *t* test when the GRS was divided into tertiles.

Results

Following sex stratification, men with PD had lower serum UA levels than control men (5.61 ± 1.37 mg/dL vs 6.27 ± 1.96 mg/dL, $P = .04$). This association remained statistically significant after age adjustment ($P = .02$). On the other hand, such association was not observed between women with PD (4.73 ± 1.36 mg/dL) and control women (4.82 ± 1.47 mg/dL, $P = .09$). One of the 9 SNPs analyzed (*SLC22A11* rs17300741) was deviated from HWE and therefore excluded from the study. No significant association was detected between any single SNP and the risk of PD or serum UA levels (data not shown). However, when we analyzed the combined effect of the 8 SNPs using the cumulative GRS (maximum 16, after exclusion of *SLC22A11*), we found a significant association between the number of risk alleles and the risk of PD (Table 1): subjects in the third GRS tertile (GRS >9 risk alleles) had a significant higher risk of PD (odds ratio [OR], 1.55; 95% confidence interval [CI], 1.10–2.18; $P = .012$) when compared with those in the first tertile (GRS <8 risk alleles). Stratification by sex revealed a statistically nonsignificant trend toward a connection between the third GRS tertile and increased risk of PD in both men and women (Table 1).

Subjects in the third GRS tertile had significantly lower serum UA levels than those in the first tertile (Bonferroni adjusted P value = .004) (Fig. 1). Both sexes, analyzed separately, showed a significant inverse correlation between GRS and serum UA levels in men ($r^2 = -0.18$, $P = .03$; adjusted by age, $P = .03$), and these data were less significant in women ($r^2 = -0.17$, $P = .06$; adjusted by age, $P = .08$). The correlation

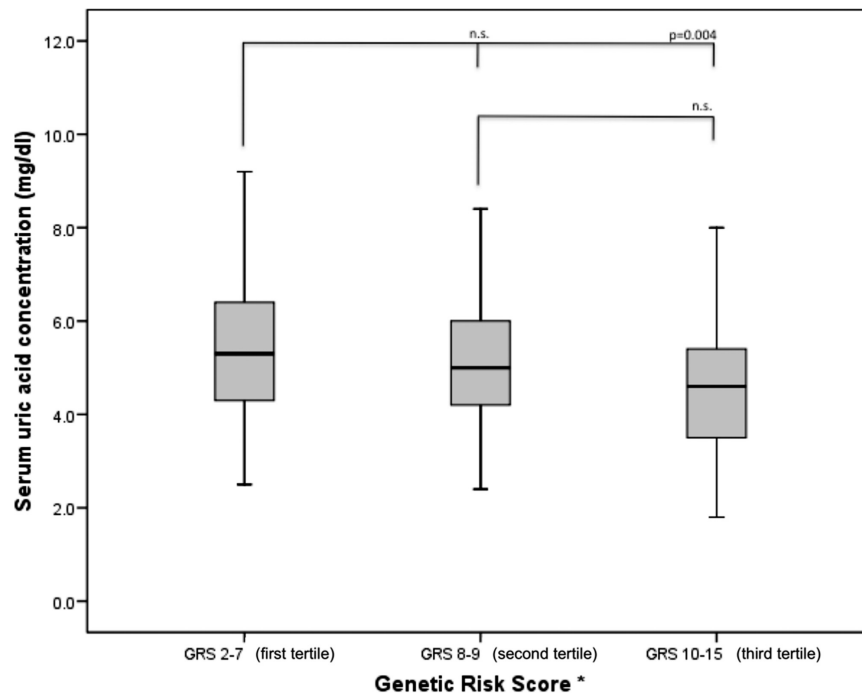


FIG. 1. Serum uric acid concentration in PD patients and controls according to the 8 SNP-based Genetic Risk Score (GRS). *GRS distribution across patients and controls divided into tertiles. GRS indicates the number of risk alleles related to low serum uric acid levels (according to the GWAS meta-analysis by Kolz et al.⁸). Maximum GRS after exclusion of SLC22A11 was 16.

between weighed GRS and UA levels yielded similar results than with the unweighted GRS.

Discussion

This study shows that the combined effect of 8 SNPs associated with low serum UA concentration modifies PD risk. This association, however, was not observed with any single SNP, nor with PD risk or serum UA levels. Nevertheless, this lack of association in the individual analysis is not unexpected since the studied SNPs have been previously reported to have a very modest effect on serum UA levels (accounted for 5% of serum UA variance).⁸ Our approach of combining multiple genetic loci with modest effect into a global GRS has improved the identification of those who are at risk for PD. Hence, subjects in the third GRS tertile (GRS >9 risk alleles) had a significant higher risk of PD when compared with those in the first tertile (GRS <8 risk alleles). While the magnitude of the risk conferred by this set of SNPs was mild (OR, 1.55), the validity of this finding was strengthened by the observed inverse correlation between high GRS and low serum UA concentration. Similarly, the GRS based in 8 loci located in almost the same genes than those in our study was also shown to correlate with serum UA levels in a recent meta-analysis of GWAS,¹⁰ as well as in a Croatian population in a different study.¹¹

Our results, interpreted in the framework of Mendelian Randomization (MR), support the existence of a real connection between serum UA and PD risk, rea-

sonably ruling out the possibility of confounding and reverse causation. Indeed, according to the MR approach, when a causal association exists between risk factor (UA) and disease endpoint (PD), the genetic variant that governs that risk factor should have a commensurate association with the disease itself.¹²

Differences in serum UA levels between PD patients and controls were only observed in men in our study, with lower UA levels in men with PD than in control men. While most of the studies have reported this association in both genders, it has also been noted to be absent or weaker in women.^{13,14} The lack of association between low serum UA levels and PD in women, as observed here, might be related to the limited number of subjects analyzed, but could also be attributed to a gender-based differential effect of urate mechanisms in PD as already suggested.¹⁵ Alternatively, it might reflect the fact that serum UA levels are usually lower in women than in men, and therefore their effect on PD risk could be less pronounced.

To sum up, this study provides evidence from a genetic perspective for reinforcing the notion that serum urate modulates PD risk. While the major genetic background associated to UA variability is yet to be determined, additional studies including newly described variants are needed to puzzle out the link between UA-related genes and PD risk. In this scenario, the GRS represents a useful tool for capturing the effect of variants that could otherwise be missed in underpowered studies.^{16,17}

References

- Cipriani S, Desjardins CA, Burdett TC, Xu Y, Xu K, Schwarzschild MA. Urate and its transgenic depletion modulate neuronal vulnerability in a cellular model of Parkinson's disease. *PLoS One* 2012;7:e37331.
- Gong L, Zhang QL, Zhang N, et al. Neuroprotection by urate on 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease: linking to Akt/GSK3 β signaling pathway. *J Neurochem* 2012;123:876–885.
- Davis JW, Grandinetti A, Waslien CI, Ross GW, White LR, Morens DM. Observations of serum uric acid levels and the risk of idiopathic Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 1996;144:480–484.
- Ascherio A, LeWitt PA, Xu K, et al.; Parkinson Study Group DATATOP Investigators. Urate as a predictor of the rate of clinical decline in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2009;66:1460–1468.
- de Lau LM, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Serum uric acid levels and the risk of Parkinson disease. *Ann Neurol* 2005;58:797–800.
- Jesús S, Pérez I, Cáceres-Redondo MT, et al. Low serum uric acid concentration in Parkinson's disease in Southern Spain. *Eur J Neurol* 2013;20:208–210.
- Yang Q, Guo CY, Cupples LA, Levy D, Wilson PW, Fox CS. Genome-wide search for genes affecting serum uric acid levels: the Framingham Heart Study. *Metabolism* 2005;54:1435–1441.
- Kolz M, Johnson T, Sanna S, et al. Meta-analysis of 28,141 individuals identifies common variants within five new loci that influence uric acid concentrations. *PLoS Genet* 2009;5:e1000504.
- van der Harst P, Bakker SJ, de Boer RA, et al. Replication of the five novel loci for uric acid concentrations and potential mediating mechanisms. *Hum Mol Genet* 2010;19:387–395.
- Yang Q, Köttgen A, Dehghan A, et al. Multiple genetic loci influence serum urate and their relationship with gout and cardiovascular risk factors. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3:523–530.
- Gunjaca G, Boban M, Pehlić M, et al. Predictive value of 8 genetic loci for serum uric acid concentration. *Croat Med J* 2010;51:23–31.
- Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JA, et al. Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. *Stat Med* 2008;27:1133–1163.
- Alonso A, Rodríguez LA, Logroscino G, Hernán MA. Gout and risk of Parkinson disease: a prospective study. *Neurology* 2007;69:1696–1700.
- O'Reilly EJ, Gao X, Weisskopf MG, et al. Plasma urate and Parkinson's disease in women. *Am J Epidemiol* 2010;172:666–670.
- Nilsen J, Brinton RD. Mitochondria as therapeutic targets of estrogen action in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2004;3:297–313.
- Wang K, Li M, Bucan M. Pathway-based approaches for analysis of genomewide association studies. *Am J Hum Genet* 2007;81:1278–1283.
- Zhong H, Yang X, Kaplan LM, Molony C, Schadt EE. Integrating pathway analysis and genetics of gene expression for genome-wide association studies. *Am J Hum Genet* 2010;86:581–591.
- Laura Brighina, MD, PhD,¹² Jonathan Carr, MD,¹³ Marie-Christine Chartier-Harlin, PhD,^{14,15} Efthymios Dardiotis, MD,^{16,17} Dennis W. Dickson, MD,² Nancy N. Diehl, BS,¹ Alexis Elbaz, MD, PhD,^{18,19} Carlo Ferrarese, MD, PhD,¹² Brian Fiske, PhD,²⁰ J. Mark Gibson[†], MD,²¹ Rachel Gibson, PhD,²² Georgios M. Hadjigeorgiou, MD,^{16,17} Nobutaka Hattori, MD, PhD,²³ John P.A. Ioannidis, MD, DSc,^{24,25} Magdalena Boczarska-Jedynak, MD, PhD,²⁶ Barbara Jasinska-Myga, MD, PhD,²⁶ Beom S. Jeon, MD, PhD,²⁷ Yun Joong Kim, MD, PhD,²⁸ Christine Klein, MD,²⁹ Rejko Kruger, MD,³⁰ Elli Kyrtazi, MD,³¹ Suzanne Lesage, PhD,^{8,9,10} Chin-Hsien Lin, MD,³² Timothy Lynch, FRCPI,³³ Demetrius M. Maraganore, MD,³⁴ George D. Mellick, PhD,³⁵ Eugénie Mutez, MD,^{14,15,36} Christer Nilsson, MD, PhD,³⁷ Grzegorz Opala, MD, PhD,²⁶ Sung Sup Park, MD,³⁸ Simona Petrucci, MD,³⁹ Andreas Puschmann, MD, PhD,^{40,41} Aldo Quattrone, MD,⁴² Manu Sharma, PhD,³⁰ Peter A. Silburn, PhD,⁴³ Young Ho Sohn, MD, PhD,⁴⁴ Leonidas Stefanis, MD,³¹ Vera Tadic, MD,²⁹ Jessie Theuns, PhD,^{45,46} Hiroyuki Tomiyama, MD, PhD,²³ Ryan J. Uitti, MD,⁴⁷ Enza Maria Valente, MD, PhD,³⁹ Christine Van Broeckhoven, PhD,^{45,46} Simone van de Loo, PhD,⁴ Demetrios K. Vassilatis, PhD,³¹ Carles Vilariño-Güell, PhD,⁴⁸ Linda R. White, PhD,⁴⁹ Karin Wirdefeldt, MD, PhD,⁵⁰ Zbigniew K. Wszolek, MD,⁴⁷ Ruey-Meei Wu, MD,⁵¹ Faycal Hentati, MD,⁵² Matthew J. Farrer, PhD,⁴⁸ Owen A. Ross, PhD² and * and on behalf of the Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium

¹Biostatistics Unit, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA ²Department of Neuroscience, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

³Department of Neuroscience, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway ⁴Department of Neurology, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany ⁵Institute of Neurological Sciences, National Research Council, Cosenza, Italy ⁶Division of Molecular Biology and Human Genetics, University of Stellenbosch, Cape Town, South Africa ⁷General Hospital of Syros, Syros, Greece

⁸Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Épinrière, Medical Research Unit S975, Paris, France ⁹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unit 975, Paris, France ¹⁰Centre National de la Recherche Scientifique, Medical Research Unit 7225, Paris, France

¹¹Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

¹²Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

¹³Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

¹⁴Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

¹⁵Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

¹⁶Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

¹⁷Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

¹⁸Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

¹⁹Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

²⁰Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

²¹Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

²²Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

²³Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

²⁴Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

²⁵Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

²⁶Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

²⁷Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

²⁸Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

²⁹Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

³⁰Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

³¹Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

³²Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

³³Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

³⁴Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

³⁵Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

³⁶Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

³⁷Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

³⁸Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

³⁹Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

⁴⁰Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

⁴¹Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

⁴²Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

⁴³Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

⁴⁴Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

⁴⁵Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

⁴⁶Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

⁴⁷Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

⁴⁸Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

⁴⁹Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

⁵⁰Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

⁵¹Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

⁵²Department of Neurology, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA

Population-specific Frequencies for *LRRK2* Susceptibility Variants in the Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium

Michael G. Heckman, MS,¹
Alexandra I. Soto-Ortolaza, BSc,² Jan O. Aasly, MD,³
Nadine Abahuni, MD,⁴ Grazia Annesi, PhD,⁵
Justin A. Bacon, BSc,² Soraya Bardien, PhD,⁶
Maria Bozi, MD,⁷ Alexis Brice, MD,^{8,9,10,11}

Additional Supporting Information may be found in the online version of the article.

Correspondence to: Dr. Owen A. Ross, Department of Neuroscience, Mayo Clinic Jacksonville, 4500 San Pablo Road, Jacksonville, FL 32224; ross.owen@mayo.edu

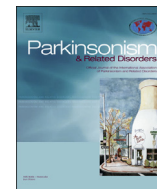
[†]Dr J. M. Gibson passed away during the course of the present study (RIP).

Funding agencies: The present study and original funding for the GEO-PD Consortium was supported by grants from the Michael J. Fox Foundation. The Mayo Clinic is a Morris K. Udall Center of Excellence in PD Research (P50 NS072187).

Relevant conflicts of interest/financial disclosures: Nothing to report. Full financial disclosures and author roles may be found in the Acknowledgments section online.

Received: 20 August 2012; **Revised:** 7 November 2012; **Accepted:** 27 January 2013

Published online 2 August 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/mds.25600



Short communication

Serum uric acid and risk of dementia in Parkinson's disease



Isabel González-Aramburu^a, Pascual Sánchez-Juan^{a,b}, María Sierra^a,
Eduardo Fernández-Juan^c, Coro Sánchez-Quintana^a, José Berciano^{a,b},
Onofre Combarros^{a,b}, Jon Infante^{a,b,*}

^a Service of Neurology, University Hospital Marqués de Valdecilla (IFIMAV), University of Cantabria (UC), Santander, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain

^c Department of Clinical Analysis, University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2013

Received in revised form

9 February 2014

Accepted 24 February 2014

Keywords:

Parkinson's disease

Uric acid

Genetics

Dementia

Serum

ABSTRACT

Objective: Low serum uric acid (UA) levels have been associated with a worse cognitive function later in life and also with a higher risk and faster progression of Parkinson's disease (PD). Here we studied whether serum UA levels and the genetic variants related to its variability are associated with the presence of dementia in a cohort of patients with PD.

Methods: The study included 343 PD patients, which were examined for the presence of dementia according to the MDS Task Force criteria (level 1). The predominant PD phenotype and UPDRS-III and Hoehn-Yahr scales were recorded. Serum UA levels were determined in each participant. Genotyping of *SLC2A9* rs734553, *ABCG2* rs2231142, *SLC17A1* rs1183201, *SLC22A11* rs17300741, *SLC22A12* rs505802, *GCKR* rs780094, *PDZK1* rs12129861, *LRRIC16A* + *SCGN* rs742132, and *SLC16A9* rs12356193 was carried out by Taqman analysis. For each subject we calculated a cumulative genetic risk score (GRS), defined as the total number of risk alleles (range 2–15) associated to lower serum UA levels.

Results: 72 out of 343 PD patients (21%) presented dementia. Serum UA levels were not different between PD patients with or without dementia. No significant association was detected between any single SNP and the risk of PD-dementia. When we analyzed the combined effect of the eight SNPs using the cumulative GRS no significant association between the number of risk alleles and the risk of PD was observed.

Conclusions: Our data suggest that serum UA levels have not a significant impact on the risk of dementia in PD.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Uric acid (UA) is a major natural antioxidant that might have neuroprotective properties [1]. Low UA levels have been associated with an increased risk of dementia and worse cognitive function later in life [2], and also with a higher risk and faster progression of Parkinson's disease (PD) [3,4]. However, the association of low UA levels with the risk of dementia in PD has not been previously studied. A recent meta-analysis of 14 genome-wide association studies has identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) at nine different *loci* that are associated with serum UA levels [5]. The joint effect of these genetic variants aggregated as a genetic risk score (GRS) has improved the prediction of serum UA concentration

and has been shown to correlate both with serum UA levels and the risk of PD in a previous report from our group [6]. Here we studied whether both low serum UA levels and the genetic variants influencing lower UA levels are associated with the presence of dementia in a cohort of patients with PD.

2. Patients and methods

2.1. Subjects

The study included 343 PD patients (43% women; mean age at onset 63.4 ± 11.3 years, mean disease duration 8.5 ± 5.4 years) consecutively recruited from outpatients at the University Hospital "Marques de Valdecilla" in Santander (Northern Spain) between 2004 and 2012. All patients fulfilled UK PD Society Brain Bank criteria for PD. This sample is part of a cohort reported previously and includes all PD patients from that cohort that were available for clinical re-assessment in 2012 [6]. All subjects had normal cognition at the time of diagnosis. Demographical data and information about cardiovascular risk factors (hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, smoking habits) were obtained from each participant. The neurological examination was carried out by an

* Corresponding author. Service of Neurology, University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander 39008, Spain. Tel.: +34 042202520.

E-mail address: jinfante@humv.es (J. Infante).

expert neurologist in the field of movement disorders (IGA) and included a cognitive evaluation, Hoehn & Yahr (HY) and UPDRS part III scales. The diagnosis of dementia was made in accordance with the recommendations of the Movement Disorders Society Task Force (Level I) [7]: PD developed prior to the onset of dementia, PD associated with a decreased global cognitive efficiency (MMSE < 26), cognitive deficiency severe enough to impair daily life (caregiver interview), impairment in more than one cognitive domain, attention (months reversed), executive function (lexical fluency), visuo-constructive (drawing pentagons), memory impairment (3-word recall). We also recorded the predominant PD phenotype of each patient during the course of the disease (tremor dominant: TD, akinetic/rigid: AR or mixed).

2.2. Biochemical and genetic analysis

The study was approved by the local ethical committee and blood samples were taken after informed consent was obtained from the subjects or their representatives. Fasting serum samples were collected at the time of the clinical examination for the present study and stored at -80°C until use. Serum UA levels were determined using the ADVIA 2400 chemistry system. Genotyping of the nine SNPs described in the meta-analysis (5) (*SLC2A9* rs734553, *ABCG2* rs2231142, *SLC17A1* rs1183201, *SLC22A11* rs17300741, *SLC22A12* rs505802, *GCKR* rs780094, *PDZK1* rs12129861, *LRRRC16A* + *SCGN* rs742132, *SLC16A9* rs12356193) were typed using TaqMan assays (Applied Biosystem, Foster City, Calif., USA) in an RT-PCR 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) and in a LightCycler480 instrument (Roche Applied Science, Indianapolis, Ind., USA).

2.3. Statistical analysis

Serum UA levels in PD patients with and without dementia were compared by Student's *T*-test. Based on previous studies, analyses were repeated after stratification by sex, and adjusted for age, disease duration and cardiovascular risk factors, using linear regression. Regression analysis was also used for analyzing the correlation between serum UA levels and HY, UPDRS-III and Mini Mental Scale Examination (MMSE) scales. Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was calculated for each SNP using Pearson's χ^2 test. Univariate χ^2 test were performed for each polymorphism, excluding from the analysis those that were deviated from HWE, and subsequently corrected for multiple testing by Bonferroni's adjustment. In addition, we calculated for each subject the cumulative effect of all the SNPs (GRS), assigning one point for each allele that was significantly associated with lower levels of serum UA weighted for their β coefficient according to the GWAs meta-analysis by Kolz M et al. [5]. Mean GRS was compared between PD patients with and without dementia using Student's *T*-test. Association between GRS tertiles and PD-dementia was tested using Pearson's χ^2 test. A further multivariate analysis adjusted for sex and age was carried out by logistic regression.

3. Results

72 out of 343 PD patients (21%) presented dementia in this cohort. Dementia was of the PD-dementia type. Clinical and demographic features of patients with and without dementia are summarized in Table 1. PD patients with dementia had similar serum UA levels than those without dementia (5.04 ± 1.7 mg/dl vs 5.35 ± 1.4 mg/dl; $p = 0.12$). Similar results were obtained after sex stratification and after adjusting for cardiovascular risk factors ($p = 0.12$). In line with this, PD patients in the third tertile of UA (higher UA levels) showed dementia with the same frequency than those in the first tertile (lower UA levels) (17.1% vs 26.4%, $p = 0.24$). PD patients with dementia showed significantly longer disease duration, higher HY and UPDRS-III scores and a worse MMSE score (Table 1), however, serum UA levels were not correlated with any of these variables in a linear regression model (data not shown). Mean serum UA levels were similar in PD patients with the AR and TD phenotypes (5.39 ± 1.2 mg/dl vs 5.2 ± 1.6 mg/dl; adjusted $p = 0.5$). One of the nine SNPs analyzed (*SLC22A11* rs 17300741) was deviated from HWE and therefore excluded from the study. No significant association was detected between any single SNP and the risk of PD-dementia (data not shown). When we analyzed the combined effect of the eight SNPs using the cumulative GRS (maximum 16, after exclusion of *SLC22A11*), no significant association was observed between the number of risk alleles and the risk of PD-dementia (Table 2): subjects in the third GRS tertile (GRS >8 risk alleles for low serum

Table 1

Characteristics of PD patients classified according to the presence of dementia.

	PD with dementia (n = 72)	PD without dementia (n = 271)	p	p ^a
Age at onset, years (SD)	66.6 (10.7)	63.6 (11.4)	0.05	<0.001
Sex (M/F) (%)	17.9/26.3	82.1/73.7	0.06	0.22
Disease duration, years (SD)	13.8 (6.3)	9.1 (6.2)	<0.001	<0.001
H&Y stage (SD)	3.8 (0.9)	2.2 (0.8)	<0.001	<0.001
UPDRS-III (SD)	55.1 (11.7)	32.9 (14.5)	<0.001	<0.001
MMSE (SD)	18.8 (5.6)	28.1 (2.2)	<0.001	<0.001
Age of study, years (SD)	79.2 (8.5)	71.2 (11.5)	<0.001	<0.001
Mean serum UA (mg/dl) (SD)^b	5.04 (1.7)	5.35 (1.4)	0.12	0.12

H&Y : Hoehn-Yahr stage.

UPDRS-III: Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III (motor).

MMSE: Folstein's Mini Mental State Examination (0–30).

^a Adjusted by age, sex and disease duration, by linear regression.

^b Measured at the age of study.

UA concentration) had similar risk of PD-dementia when compared with those in the first tertile (GRS <8 risk alleles for low serum UA concentration) ($p = 0.3$). Stratification by sex revealed no differences (data not shown). Mean weighted GRS was also similar in PD patients with and without dementia (0.45 ± 0.2 vs 0.44 ± 0.2 ; adjusted $p = 0.7$).

4. Discussion

In this series, PD patients with dementia had similar serum UA levels than those without cognitive impairment. Also, the cumulative effect of genetic variants associated with lower UA levels didn't have an impact on the risk of PD-dementia.

Only one small previous study carried on 40 PD patients has also addressed the relation of serum UA with cognition [8], with lower serum UA levels being associated with a worse cognitive performance, but the presence of dementia was not specifically investigated. A few previous reports have examined the relation between serum UA levels and cognition in the general population, with some studies reflecting a benefit of higher serum UA levels on cognition and others reporting findings in the opposite direction [2,9–11]. In the largest prospective study to date, Euser et al., reported that higher levels of serum UA were associated with a decreased risk of dementia and better cognitive function later in life, but only after adjusting for cardiovascular risk factors [2]. We observed a significant correlation between serum UA levels and the presence of hypertension, diabetes and hypercholesterolemia, and after adjusting for these variables serum UA levels did not have a significant impact on the risk of PD-dementia. In line with this, we didn't observe any correlation between MMSE score and serum UA concentration either. As reported by others we found higher serum

Table 2

Association between low serum uric acid concentration-related Genetic Risk Score (GRS) and the risk of PD-dementia.

GRS ^a	PD without dementia (n)	PD with dementia (n)	OR (95% IC)	p ^b
2–7	78	15	Ref	Ref
8	74	18	1.1 (0.5–2.6)	0.66
9–15	77	21	1.5 (0.7–3.0)	0.31

^a The GRS represents the number of risk alleles related to low serum uric acid levels, divided into first tertile (2–7), second tertile (8) and third tertile (9–15). Maximum GRS after exclusion of *SLC22A11* was 16.

^b Adjusted for age and sex.

UA levels in males than in females and therefore we adjusted all our results for sex. As would be expected, disease duration, HY stage and UPDRS-III score were higher in subjects with dementia compared with those without, however, serum UA levels did not correlate with any of these variables in the regression analysis. The risk of cognitive impairment has been reported to be higher in PD patients with AR phenotype compared with TD phenotype [12]. While we also observed a slightly higher frequency of dementia in AR cases compared to TD, serum UA levels didn't differ significantly between the phenotypes.

The study has some potential limitations: serum UA levels are variable and were measured just once, at the time of the study. Also, our sample was relatively small, in particular the number of PD patients with dementia. On the other hand MMSE might not be considered the best test for testing dementia in PD. For the identification of PD-dementia we followed the recommendations of the MDS Task Force (level 1) using MMSE together with attention and executive function tests and demonstrating that cognitive deficiency was severe enough to impair daily life. These screening tests have shown 100% specificity but lower sensitivity for diagnosing PD-dementia compared to full neuropsychological assessment [13]. We tried to minimize the effect of serum UA levels variability on our results by analyzing stable genetic variants influencing serum UA concentration. The estimated heritability of serum UA levels is 73% [14]. We have recently reported that the cumulative effect of genetic variants related to lower serum UA levels were significantly associated with lower serum UA and an increased risk of PD [6]. This is the basis of Mendelian Randomization approach, used for elucidating potential associations between a risk factor and a disease endpoint. According to this, when a causal association exists between a risk factor (UA) and disease endpoint (PD-dementia), the genetic variant that governs that risk factor should have a commensurate association with the disease itself [15]. In this study none of the SNPs known to be related with serum UA levels showed and association with PD-dementia, either individually or jointly through the GRS. Although the influence of these genetic variations on serum UA concentration variability is known to be small [5] the results of the genetic approach is coincident with the results of the biochemical analysis and altogether support the notion that serum UA levels do not have a significant impact on the risk of dementia in PD.

Acknowledgments

This work was supported by grants FI12/00229 and PI11/00228 from Instituto de Investigación Carlos III (ISCIII) to IGA and JI, respectively.

References

- [1] Cipriani S, Desjardins CA, Burdett TC, Xu Y, Xu K, Schwarzschild MA. Urate and its transgenic depletion modulate neuronal vulnerability in a cellular model of Parkinson's disease. *PLoS One* 2012;7(5):e37331.
- [2] Euser SM, Hofman A, Westendorp RG, Breteler MM. Serum uric acid and cognitive function and dementia. *Brain* 2009;132:377–82.
- [3] Ascherio A, LeWitt PA, Xu K, Eberly S, Watts A, Matson WR, et al., Parkinson Study Group DATATOP Investigators. Urate as a predictor of the rate of clinical decline in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2009;66:1460–8.
- [4] de Lau LM, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Serum uric acid levels and the risk of Parkinson disease. *Ann Neurol* 2005;58:797–800.
- [5] Kolz M, Johnson T, Sanna S, Teumer A, Vitart V, Perola M, et al. Meta-analysis of 28,141 individuals identifies common variants within five new loci that influence uric acid concentrations. *PLoS Genet* 2009;5:e1000504.
- [6] González-Aramburu I, Sánchez-Juan P, Jesús S, Gorostidi A, Fernández-Juan E, Carrillo F, et al. Genetic variability related to serum uric acid concentration and risk of Parkinson's Disease. *Mov Disord* 2013;28:1737–40.
- [7] Dubois B, Burn D, Goetz C, Aarsland D, Brown RG, Broe GA, et al. Diagnostic procedures for Parkinson's disease dementia: recommendations from the movement disorder society task force. *Mov Disord* 2007;22:2314–24.
- [8] Annamaki T, Pessala-Driver A, Hokkanen L, Murros K. Uric acid associates with cognition in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14:576–8.
- [9] Li J, Dong BR, Lin P, Zhang J, Liu GJ. Association of cognitive function with serum uric acid level among Chinese nonagenarians and centenarians. *Exp Gerontol* 2010;45:331–5.
- [10] Schretlen DJ, Inscore AB, Jinnah HA, Rao V, Gordon B, Pearlson GD. Serum uric acid and cognitive function in community dwelling older adults. *Neuropsychology* 2007;21:136–40.
- [11] Ruggiero C, Cherubini A, Lauretani F, Bandinelli S, Maggio M, Di Iorio A, et al. Uric acid and dementia in community-dwelling older persons. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2009;27:382–9.
- [12] Rajput AH, Voll A, Rajput ML, Robinson CA, Rajput A. Course in Parkinson disease subtypes: a 39-year clinicopathologic study. *Neurology* 2009;73:206–12.
- [13] Barton B, Grabli D, Bernard B, Czernecki V, Goldman JG, Stebbins G, et al. Clinical validation of movement disorder society-recommended diagnostic criteria for Parkinson's disease with dementia. *Mov Disord* 2012;27:248–53.
- [14] Yang Q, Guo CY, Cupples LA, Levy D, Wilson PW, Fox CS. Genomewide search for genes affecting serum uric acid levels: the Framingham Heart Study. *Metabolism* 2005;54(11):1435–41.
- [15] Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JA, Timpson N, Davey Smith G. Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. *Stat Med* 2008;27:1133–63.