

Beatriz García Rodríguez

# Estudio de factores genéticos de susceptibilidad para el desarrollo de enfermedad de Parkinson

Departamento  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es  
Giraldo Castellano, Pilar  
Pocoví Mieras, Miguel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

# ESTUDIO DE FACTORES GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDAD PARA EL DESARROLLO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

Autor

Beatriz García Rodríguez

Director/es

Giraldo Castellano, Pilar  
Pocoví Mieras, Miguel

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2010



**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y**  
**BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**



Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE FACTORES GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDAD**  
**PARA EL DESARROLLO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON**

Memoria presentada por:

Beatriz García Rodríguez, Licenciada en Ciencias Químicas, para optar al  
Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Zaragoza, Septiembre 2010.



Dña. PILAR GIRALDO CASTELLANO, Doctora en Medicina y Cirugía, Jefa de sección de Servicio de Hematología del Hospital Universitario Miguel Servet, profesora titular del Departamento de Medicina y Psiquiatría e investigadora asociada del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud; y

D. MIGUEL POCOVÍ MIERAS, Doctor en Ciencias Químicas, catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

codirectores de esta Tesis Doctoral,

CERTIFICAN:

que la memoria de Tesis Doctoral titulada: **“ESTUDIO DE FACTORES GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDAD PARA EL DESARROLLO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON”**, presentada por Dña. Beatriz García Rodríguez, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de esta Universidad bajo su dirección, y que reúne los requisitos necesarios para ser presentada por su autora para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza a 6 de Septiembre de 2010

D. Miguel Pocoví Mieras

D<sup>a</sup>. Pilar Giraldo Castellano



## ABREVIATURAS

<b>apoE</b>	Apolipoproteína E
<b>APS</b>	Adenosín-5-fosfosulfato
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>cDNA</b>	DNA codificante
<b>CG</b>	Células de Gaucher
<b>cHDL</b>	Colesterol transportado por lipoproteínas de alta densidad
<b>cLDL</b>	Colesterol transportado por lipoproteínas de baja densidad
<b>COMT</b>	Catecol-orto-metil-transferasa
<b>CT</b>	Colesterol total
<b>ddNTPs</b>	Didesoxinucleótidos trifosfato terminadores
<b>dITP</b>	Desoxiinosina trifosfato
<b>Da</b>	Dalton
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ECA</b>	Enzima convertidora de angiotensina
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EG</b>	Enfermedad de Gaucher
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GBA</b>	Gen glucocerebrosidasa
<b>GBAP</b>	Seudogén glucocerebrosidasa
<b>GC</b>	$\beta$ -glucocerebrosidasa ácida
<b>H&amp;Y</b>	Estadío evolutivo Hoehn y Yahr
<b>L-DOPA</b>	Levodopa
<b>MO</b>	Médula ósea
<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>OR</b>	Odds-ratio
<b>PCR</b>	Del inglés, <u>P</u> olimerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PPi</b>	Grupo pirofosfato
<b>QT</b>	Quitotriosidasa

<b>RM</b>	Resonancia magnética
<b>Sap C</b>	Saposina C
<b>SAP</b>	Del inglés, <u>S</u> hrimp <u>A</u> lkaline <u>P</u> hosphatase (Fosfatasa alcalina de camarón)
<b>SMF</b>	Sistema mononuclear fagocítico
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNCA</b>	Gen $\alpha$ -sinucleína
<b>TAC</b>	Tomografía axial ccomputerizada
<b>TES</b>	Tratamiento enzimático sustitutivo
<b>Tm</b>	Temperatura de hibridación
<b>TRAP</b>	Del inglés, <u>T</u> artrate <u>R</u> esistant <u>A</u> cid <u>P</u> hosphatase (Fosfatasa ácida resistente a tartrato)
<b>TRS</b>	Terapia de reducción de sustrato

## **INDICE DE CONTENIDOS**

<b><u>1. INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1. ENFERMEDAD DE GAUCHER</b>	<b>1</b>
1.1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	1
1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA	3
1.1.3. FISIOPATOLOGÍA	4
1.1.4. CLASIFICACIÓN CLÍNICA	7
1.1.5. MANIFESTACIONES CLÍNICO-PATOLÓGICAS	10
1.1.6. MANIFESTACIONES NEUROLÓGICAS EN LA ENFERMEDAD DE GAUCHER	14
1.1.7. ENFERMEDAD DE PARKINSON Y ENFERMEDAD DE GAUCHER	15
1.1.8. ALTERACIONES GENÉTICAS. CORRELACIÓN GENOTIPO/FENOTIPO EN LA EG	20
1.1.9. DIAGNÓSTICO	26
1.1.10. BIOMARCADORES	28
1.1.11. TRATAMIENTO	29
<b>1.2. ENFERMEDAD DE PARKINSON</b>	<b>32</b>
1.2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	32
1.2.2. EPIDEMIOLOGÍA	34
1.2.3. GENÉTICA EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	36
1.2.4. ANATOMÍA FUNCIONAL DE LOS GANGLIOS BASALES Y FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	41
1.2.5. CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO	46
1.2.6. TERAPÉUTICA FARMACOLÓGICA	47
<b><u>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u></b>	<b>51</b>
<b>2.1. HIPÓTESIS</b>	<b>51</b>
<b>2.2. OBJETIVOS</b>	<b>52</b>
<b><u>3. MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	<b>55</b>
<b>3.1. MATERIALES</b>	<b>57</b>
3.1.1. PACIENTES Y CONTROLES	57
3.1.2. DISEÑO DEL ESTUDIO	59
3.1.3. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	60
<b>3.2. MÉTODOS</b>	<b>61</b>

3.2.1.	OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO	61
3.2.1.1.	Reactivos necesarios	63
3.2.1.2.	Procedimiento	63
3.2.2.	CUANTIFICACIÓN E INTEGRIDAD DEL DNA GENÓMICO	65
3.2.2.1.	Análisis de la integridad del DNA en geles de agarosa	65
3.2.2.2.	Cuantificación espectrofotométrica de la concentración de DNA:	66
3.2.3.	PURIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO CON FENOL-CLOROFORMO	66
3.2.4.	AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	67
3.2.4.1	Diseño de cebadores para la amplificación del DNA	67
3.2.4.2	Amplificación del gen completo de la glucocerebrosidasa ( <i>GBA</i> )	69
3.2.4.3	Amplificación de un fragmento del gen de la glucocerebrosidasa ( <i>GBA</i> )	71
3.2.4.4	Amplificación de las regiones adyacentes a las mutaciones N370S y L444P del gen <i>GBA</i>	72
3.2.4.5	Amplificación de exones del gen <i>GBA</i> para su posterior secuenciación	74
3.2.4.6	Amplificación de la región adyacente a la variante c.(-203)A>G del gen <i>GBA</i>	75
3.2.4.7	Amplificación de un fragmento del exón 4 del gen de la apolipoproteína E ( <i>apoE</i> )	77
3.2.5.	ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS MEDIANTE PCR	78
3.2.6.	ANÁLISIS DE LA VARIANTE C.(-203)A>G MEDIANTE DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	80
3.2.7.	ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES N370S Y L444P EN EL GEN <i>GBA</i> Y GENOTIPO DEL GEN <i>APOE</i> MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN	82
3.2.8.	PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR MEDIANTE EXOSAP-IT® (USB)	84
3.2.9.	SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>GBA</i>	85
<b>3.3.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS</b>	<b>87</b>
<b>4.</b>	<b><u>RESULTADOS</u></b>	<b>89</b>
<b>4.1.</b>	<b>CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS SUJETOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO: GRUPO PARKINSON Y GRUPO CONTROL</b>	<b>89</b>
<b>4.2.</b>	<b>ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA</b>	<b>89</b>
<b>4.3.</b>	<b>GEN <i>APOE</i></b>	<b>92</b>
4.3.1.	DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DEL GEN <i>APOE</i>	92
4.3.2.	ASOCIACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DEL ALELO $\epsilon 4$ DEL GEN <i>APOE</i> Y EL RIESGO DE DESARROLLAR EP	95
<b>4.4.</b>	<b>GEN <i>GBA</i></b>	<b>96</b>
4.4.1.	INCIDENCIA DE LAS MUTACIONES N370S Y L444P EN EL GEN <i>GBA</i> EN POBLACIÓN GENERAL ARAGONESA	96
4.4.2.	ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN <i>GBA</i>	97

4.4.3. ASOCIACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE VARIANTES EN EL GEN <i>GBA</i> Y EL RIESGO DE DESARROLLAR ENFERMEDAD DE PARKINSON	101
4.4.4. ASOCIACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE VARIANTES EN EL GEN <i>GBA</i> Y EL RIESGO DE DESARROLLAR ENFERMEDAD DE PARKINSON DE INICIO PRECOZ	105
<b>4.5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON Y VARIANTES EN EL GEN <i>GBA</i></b>	<b>106</b>
<b>4.6. FACTORES DE RIESGO IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON</b>	<b>108</b>
<b><u>5. DISCUSIÓN</u></b>	<b><u>113</u></b>
<b>5.1. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS</b>	<b>113</b>
<b>5.2. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN EL GEN <i>APOE</i> Y PRESENCIA DE VARIANTES EN EL GEN <i>GBA</i> ASOCIADOS A ENFERMEDAD DE PARKINSON</b>	<b>114</b>
5.2.1. ASOCIACIÓN ENTRE ENFERMEDAD DE PARKINSON Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN EL GEN <i>APOE</i>	115
5.2.2. ASOCIACIÓN ENTRE ENFERMEDAD DE PARKINSON Y LA PRESENCIA DE VARIANTES EN EL GEN <i>GBA</i>	116
<b>5.3. ASOCIACIÓN ENTRE ENFERMEDAD DE PARKINSON DE INICIO PRECOZ Y VARIANTES EN EL GEN <i>GBA</i></b>	<b>124</b>
<b>5.4. ANÁLISIS DE LAS MANIFESTACIONES CLÍNICAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON Y VARIANTES EN EL GEN <i>GBA</i></b>	<b>125</b>
<b>5.5. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES EN LA APARICIÓN DE ENFERMEDAD DE PARKINSON</b>	<b>127</b>
<b><u>6. CONCLUSIONES</u></b>	<b><u>131</u></b>
<b><u>7. BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b><u>133</u></b>
<b><u>8. ANEXOS</u></b>	<b><u>155</u></b>

## **INDICE DE FIGURAS**

### **INTRODUCCIÓN**

- 1.1. Vía degradativa secuencial de gangliósidos y globósidos.
- 1.2. Estructura 3D de la glucocerebrosidasa.
- 1.3. Fenotipo continuo observado en la EG.
- 1.4. Fémur con deformidad en forma de matraz Erlenmeyer.
- 1.5. Representación esquemática y comparativa del gen *GBA* y el seudogén (*GBAP*).
- 1.6. Célula de Gaucher.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

- 3.1. Esquema general de trabajo.
- 3.2. Esquema de la extracción de DNA.
- 3.3. Análisis de la integridad del DNA mediante electroforesis.
- 3.4. Electroforesis de los amplicones obtenidos mediante PCR.
- 3.5. Análisis de la variante c.(-203A>G) mediante digestión con la enzima de restricción *BclI*.
- 3.6. Esquema del análisis mediante pirosecuenciación.
- 3.7. Electroferogramas obtenidos mediante secuenciación automática.

### **RESULTADOS**

- 4.1. Distribución de la muestra según el sexo.
- 4.2. Histograma: Edad de inicio de la EP.
- 4.3. Patrón esperado para el análisis del genotipo *apoE* mediante pirosecuenciación.
- 4.4. Pirogramas obtenidos para el análisis del genotipo *apoE*.
- 4.5. Frecuencias genotípicas y alélicas de *apoE* en los grupos Parkinson y control.
- 4.6. Pirogramas obtenidos mediante pirosecuenciación para el análisis de las mutaciones N370S y L444P del gen *GBA*.
- 4.7. Distribución de las variantes encontradas a lo largo del gen *GBA*.
- 4.8. Distribución de las variantes encontradas en el gen *GBA* en los grupos Parkinson y control.
- 4.9. Frecuencias alélicas para las variantes identificadas en el gen *GBA* en la población Parkinson y control.
- 4.10. Manifestaciones clínicas en pacientes con EP y variantes en el gen *GBA*.

## ÍNDICE DE TABLAS

### INTRODUCCIÓN

1.1. Tipo de EG en función de las mutaciones presentes en el gen *GBA*.

1.2. Mutaciones del gen *GBA* descritas en pacientes españoles

### MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cebadores empleados para amplificar el gen *GBA* completo, un fragmento del gen *GBA* y un fragmento del 4º exón del gen *apoE*.

3.2. Características de los cebadores empleados para la amplificación de los exones del gen *GBA*.

3.3. Condiciones térmicas utilizadas para la amplificación del gen *GBA*.

3.4. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados para la amplificación del gen *GBA*.

3.5. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados para la amplificación de un fragmento de 1954 pb del gen *GBA*.

3.6. Cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos adyacentes a las mutaciones N370S y L444P.

3.7. Cantidad y concentración de los reactivos empleados para amplificar los fragmentos adyacentes a las mutaciones N370S y L444P del gen *GBA*.

3.8. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados para la amplificación de los exones del gen *GBA*.

3.9. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados para la amplificación de la región adyacente a la variante c.(-203)A>G del gen *GBA*.

3.10. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados para la amplificación de un fragmento del exón 4 del gen *apoE*.

3.11. Composición de los geles de poliacrilamida para el análisis de la variante c.(-203)A>G

3.12. Secuencia de las sondas utilizadas para la pirosecuenciación de los fragmentos amplificados.

3.13. Condiciones de la reacción de secuenciación.

### RESULTADOS

4.1. Distribución de edad, peso y talla en los grupos Parkinson y control.

4.2. Frecuencias genotípicas y alélicas de *apoE* en los grupos Parkinson y control.

4.3. Frecuencias genotípicas y alélicas de las mutaciones N370S y L444P en el gen *GBA* en población general aragonesa.

4.4. Frecuencias genotípicas y alélicas de las mutaciones N370S y L444P en el gen *GBA* en los grupos Parkinson y control.

4.5. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante c.(-203)A>G del gen *GBA* en los grupos Parkinson y control.

4.6. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes E326K y T369M del gen *GBA* en los grupos Parkinson y control.

4.7. Variantes identificadas en el gen *GBA* en los grupos Parkinson y control.

4.8. Frecuencia global de las variantes identificadas en el gen *GBA* en los grupos Parkinson y control.

- 4.9.** Edad de aparición de EP estratificada según la presencia de variantes en el gen *GBA*.
- 4.10.** Frecuencia de factores de riesgo en los grupos Parkinson y control.
- 4.11.** Edad de aparición de EP estratificada en función de la exposición a agentes tóxicos.
- 4.12.** Edad de aparición de EP estratificada en función de la presencia de empastes dentales de amalgama de mercurio.
- 4.13.** Edad media de aparición de EP estratificada en función de los antecedentes familiares de enfermedad de Parkinson.

---

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

**ANEXO I:** Clasificación clínica de la enfermedad de Gaucher

**ANEXO II:** Genes y loci implicados en la enfermedad de Parkinson

**ANEXO III:** Enfermedades con formación de cuerpos de Lewy

**ANEXO IV:** Criterios clínicos diagnósticos del Banco de Cerebros de la Sociedad de la enfermedad de Parkinson del Reino Unido (UK Parkinson's Disease Society Brain Bank)

**ANEXO V:** Estadios de evolución de la Enfermedad de Parkinson según de Hoehn y Yahr

**ANEXO VI:** Protocolo de recogida de datos de los sujetos incluidos en el estudio

**ANEXO VII:** Documento de consentimiento informado

**ANEXO VIII:** Características antropométricas

**ANEXO IX:** Factores de riesgo para el desarrollo de EP



## 1. INTRODUCCIÓN

Los estudios publicados en los últimos años han sugerido una posible asociación entre la enfermedad de Parkinson y la presencia de mutaciones en el gen que codifica para la glucocerebrosidasa, responsable de la enfermedad de Gaucher.

### 1.1. ENFERMEDAD DE GAUCHER

La enfermedad de Gaucher (EG) (MIM 230800) es una enfermedad de depósito lisosomal, con un patrón de herencia autosómica recesiva, caracterizada por la hidrólisis disminuida de glucocerebrósido causada por la actividad deficiente de la enzima  $\beta$ -glucosidasa ácida lisosomal o glucocerebrosidasa (GC; EC 3.2.1.45). En la mayoría de los casos, la base molecular de la enfermedad se debe a mutaciones en el gen *GBA*, que codifica la enzima glucocerebrosidasa. Como resultado se produce la acumulación del material glucolipídico no degradado en el sistema retículoendotelial, principalmente en los macrófagos, que adquieren un citoplasma de mayor tamaño y aspecto espumoso y que se conocen como células de Gaucher (CG) (Beaudet, 1987; Chen and Wang, 2008). La enfermedad es heterogénea en sus manifestaciones clínicas y se caracteriza por la aparición de hepatomegalia y/o esplenomegalia, lesiones óseas, trastornos hematológicos, bioquímicos y afectación neurológica (Mehta, 2006).

#### 1.1.1. Antecedentes históricos

La primera referencia de esta alteración data de 1882 cuando, en su tesis doctoral, el médico francés Philippe Charles Ernest Gaucher describió un cuadro clínico similar a un tumor de origen esplénico, encontrando una acumulación de células anómalas de gran tamaño en el bazo de una paciente (Gaucher PCE, 1882). En homenaje a esta primera descripción la entidad recibió el nombre del investigador clínico francés y es conocida como enfermedad de Gaucher. Inicialmente se interpretó como una proliferación neoplásica de origen epitelial pero a principios del siglo XX se descartó esta hipótesis cuando se reconoce su incidencia familiar (Brill *et al.*, 1901, 1905).

Entre 1885 y 1910 se observó una gran diversidad en la sintomatología y edad de aparición de la enfermedad (Brill, 1904; Collier, 1985). Más tarde, Oberling y Woringer (1927)

(Oberling and Woringer, 1927) descubrieron el componente neurológico implicado en la EG, más común en las formas infantiles (Mehta, 2006).

La naturaleza metabólica de la EG fue apreciada por Marchand en 1907 (Marchand, 1907), y fue en 1924 cuando el médico alemán H. Lieb aisló un compuesto graso del material acumulado en el bazo de un paciente con EG, identificándolo erróneamente con un galactocerebrósido (Lieb, 1924). Una década después E. Aghion identificó el compuesto como un glucocerebrósido (Aghion, 1934). Miyatake y Suzuki sugirieron un papel fisiopatológico de la glucosilceramida en las enfermedades de almacenamiento lisosomal (Miyatake and Suzuki, 1973). Sin embargo, en 1984 se demostró el almacenamiento en menor cantidad de una sustancia posiblemente tóxica, un análogo a la glucosilesfigosina deacetilada, en las variantes neuronopáticas de la enfermedad (Conradi *et al.*, 1984).

En 1965, el grupo de Brady consiguió determinar por primera vez la actividad enzimática de la GC en tejidos, demostrando la reducción de glucocerebrósidos en plasma y tejidos en dos pacientes esplenectomizados tras la infusión de un extracto purificado de la enzima obtenida a partir de placenta (Brady *et al.*, 1974). Posteriormente, Beutler *et al.* (1971) demostraron la deficiencia de GC en fibroblastos en un adulto con EG y constataron que los heterocigotos para la enfermedad mostraban una actividad enzimática intermedia entre sujetos sanos y enfermos (Beutler *et al.*, 1971). La determinación de la actividad de la GC se convirtió en el método idóneo de diagnóstico de la EG (Beutler and Kuhl, 1970b) desplazando al método clásico consistente en la determinación de la presencia de células de Gaucher mediante microscopía óptica a partir de una muestra de médula ósea (MO) del paciente (Chen and Wang, 2008).

Otro hito importante en la historia de la EG fue el descubrimiento del mecanismo de receptor glucoproteico para radicales manosa presente en la membrana plasmática de los macrófagos, publicado en 1978, que se convirtió en la base del desarrollo del tratamiento mediante sustitución enzimática dirigida a los macrófagos (Achord *et al.*, 1978; Furbish *et al.*, 1978; Pentchev *et al.*, 1978; Stahl *et al.*, 1978). A principio de la década de los 90 se demostró la eficacia terapéutica de la enzima (Barton *et al.*, 1991; Beutler *et al.*, 1991b; Rosenthal *et al.*, 1995; Zimran *et al.*, 1993), comercializándose en los Estados Unidos de América a partir de 1991 y en España en 1994 (Connock *et al.*, 2006).

Las bases genéticas de la enfermedad fueron elucidadas, cuando, en 1981, Shafit-Zagardo localizó cromosómicamente el gen de la glucocerebrosidasa humana (GBA) (Shafit-Zagardo *et*

*al.*, 1981) y Barneveld lo asignó a la región q21-q31 del cromosoma 1 (Barneveld *et al.*, 1983). Entre 1984 y 1988 se clonaron y caracterizaron el DNA codificante (cDNA) del gen *GBA* (Ginns *et al.*, 1984; Sorge *et al.*, 1985; Tsuji *et al.*, 1986), su gen estructural (Ginns *et al.*, 1985) y su pseudogén (*GBAP*) (Horowitz *et al.*, 1989).

### 1.1.2. Epidemiología

La enfermedad de Gaucher tiene baja prevalencia, se estima entre 1:40000 y 1:60000 (Grabowski, 1993a). Es por ello que la EG está incluida dentro del grupo de enfermedades raras, que son aquellas que presentan una incidencia muy baja en la población (menos de 5 de cada 10000 habitantes, en Europa). La EG afecta a todas las razas, aunque su prevalencia es mayor entre la población judía de origen Ashkenazi, donde presenta una incidencia de 1:1000 aproximadamente (Beutler, 1995). No obstante, distintos autores han obtenido resultados muy diversos en la predicción de la incidencia de la enfermedad basándose en las medidas de la actividad de GC (Grabowski *et al.*, 1982; Kolodny *et al.*, 1982; Matoth *et al.*, 1987).

La EG se clasifica clínicamente en tres tipos, presentando una incidencia diferente para cada tipo.

La EG tipo 1 es la variedad más frecuente con una incidencia en población no judía de 1:200.000 habitantes (Lee, 1995), mientras que en la población judía de origen Ashkenazi la prevalencia es mucho mayor con una incidencia esperada entre 1 y 2 casos por cada 1000 nacimientos (Beutler, 2001; Beutler *et al.*, 1993; Horowitz *et al.*, 1998).

La frecuencia de la EG tipo 2 se estima aproximadamente en 1:100.000 nacidos vivos, sin que se haya descrito para ella ningún predominio étnico (Kolodny *et al.*, 1982). Esto es probable debido a la gran incidencia de abortos que ocasiona esta forma de presentación, así como a la poca viabilidad de los recién nacidos. La supervivencia media de los niños con EG tipo 2 oscila en torno a los dos años (Wenger *et al.*, 1983).

La EG tipo 3 presenta una incidencia entre 1:50.000 y 1:100.000 recién nacidos, y tiene mayor prevalencia en la región de Norrbottnian al norte de Suecia (Grabowski, 1993b).

### 1.1.3. Fisiopatología

La enfermedad de Gaucher es un error congénito del metabolismo causado por un defecto en la biogénesis de la hidrolasa lisosomal conocida con el nombre  $\beta$ -glucosidasa ácida, ceramida  $\beta$ -glucosidasa, glucosilceramidasa o glucocerebrosidasa (GC). Aunque muy raramente, la inactividad de la enzima puede producirse por la ausencia de una molécula denominada "sphingolipid activator protein", o saposina C, un cofactor requerido para la función catalítica normal de la GC (Giraldo *et al.*, 2003; Rafi *et al.*, 1993; Schnabel *et al.*, 1991). La ausencia o baja actividad de esta enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -glucosídicos para dar glucosa y ceramida, provoca la acumulación progresiva en el sistema mononuclear fagocítico (SMF) del sustrato no degradado: glucocerebrósido,  $\beta$ -glucósido ceramida, o glucosilceramida. Se trata de un lípido extremadamente insoluble, componente esencial de las membranas celulares, con funciones en el crecimiento y diferenciación celular, particularmente en las neuronas (Boldin and Futerman, 1997; Schwarz and Futerman, 1997), aunque se desconoce la relación de estos efectos con la patogenia de la EG. Un sustrato menor de la GC, pero también importante, es un análogo deacetilado de la glucosilceramida, la glucosilesfingosina. Esta molécula no se detecta en cantidades significativas en los tejidos.

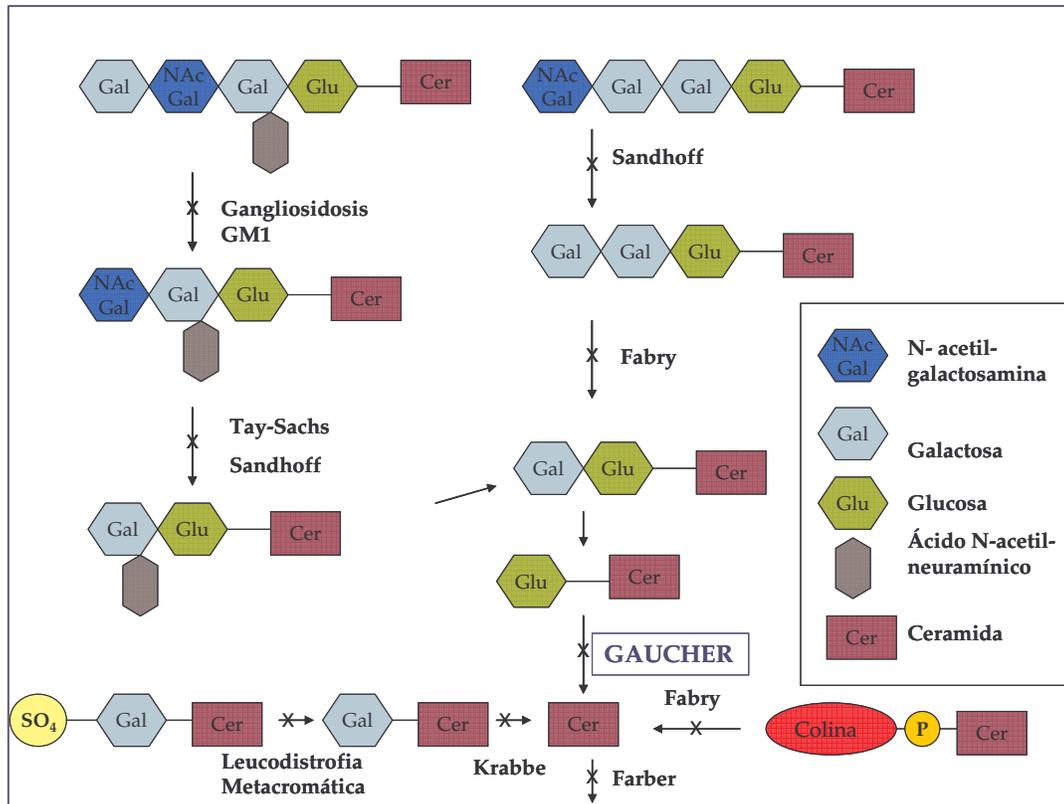
La glucosilceramida (*N*- acilesfingosin-1-O- $\beta$ -D-glucósido) es sintetizada a partir de ceramida y de UDP-glucosa por la glucosilceramida sintetasa (Basu *et al.*, 1968, 1973). Este compuesto está ampliamente distribuido en las membranas celulares de la mayoría de los tejidos de los mamíferos y es un metabolito intermedio normal en la síntesis y degradación de los glucoesfingolípidos complejos como los gangliósidos y los globósidos.

La degradación de glucosilceramida por la GC da lugar a glucosa y ceramida que, en última instancia, será metabolizada por la ceramidasa ácida a esfingosina y ácidos grasos (Gatt, 1966).

La GC interviene en la penúltima reacción de la vía degradativa secuencial de los glucoesfingolípidos más complejos catalizando la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -glucosídicos (figura 1.1). La incapacidad enzimática para hidrolizar estos glucocerebrósidos que contienen azúcares unidos por un enlace covalente a la ceramida, provoca que el glucocerebrósido y otros glucoesfingolípidos se acumulen primariamente en los lisosomas de los macrófagos del SMF (Giraldo *et al.*, 2003). La fagocitosis de eritrocitos constituye la fuente principal de lípidos

intracelulares acumulados puesto que la membrana de los hematíes contiene gran cantidad de glucolípidos (Fredrickson and Sloan, 1972; Hibbs *et al.*, 1970; Pennelli *et al.*, 1969).

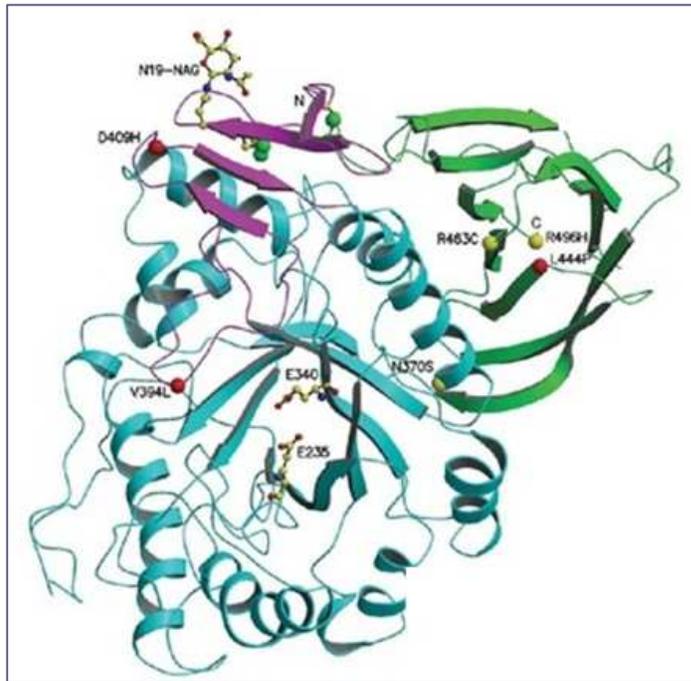
FIGURA 1.1. Vía degradativa secuencial de gangliósidos y globósidos.



Se muestran los diferentes trastornos causados por el defecto en cada una de las rutas metabólicas. Adaptada de Metha, 2006. *Eur J Intern Med*

La glucocerebrosidasa (EC 3.2.1.45) humana es una glicoproteína homomérica compacta de la membrana celular. La secuencia completa de aminoácidos, así como la secuencia de nucleótidos del cDNA fue descrita por Tsuji *et al.* en 1986 (Tsuji *et al.*, 1986). La proteína humana madura está constituida por 497 aminoácidos con un peso molecular (PM) calculado de 55.575 Dalton (Da). Alrededor del 13% de los residuos de la enzima son básicos (lisina, arginina o histidina), contiene aproximadamente un 11% de residuos leucina y un 45% de aminoácidos no polares.

FIGURA 1.2. Estructura 3D de la glucocerebrosidasa.



Se muestran los 3 dominios de la glucocerebrosidasa diferenciados por colores distintos. Se indican las seis mutaciones más frecuentes que provocan EG, los residuos implicados (E235 y E340) en el sitio activo de la enzima y el sitio de glicosilación en Asn19. Adaptada de Dvir *et al.*, 2003. *EMBO Rep*

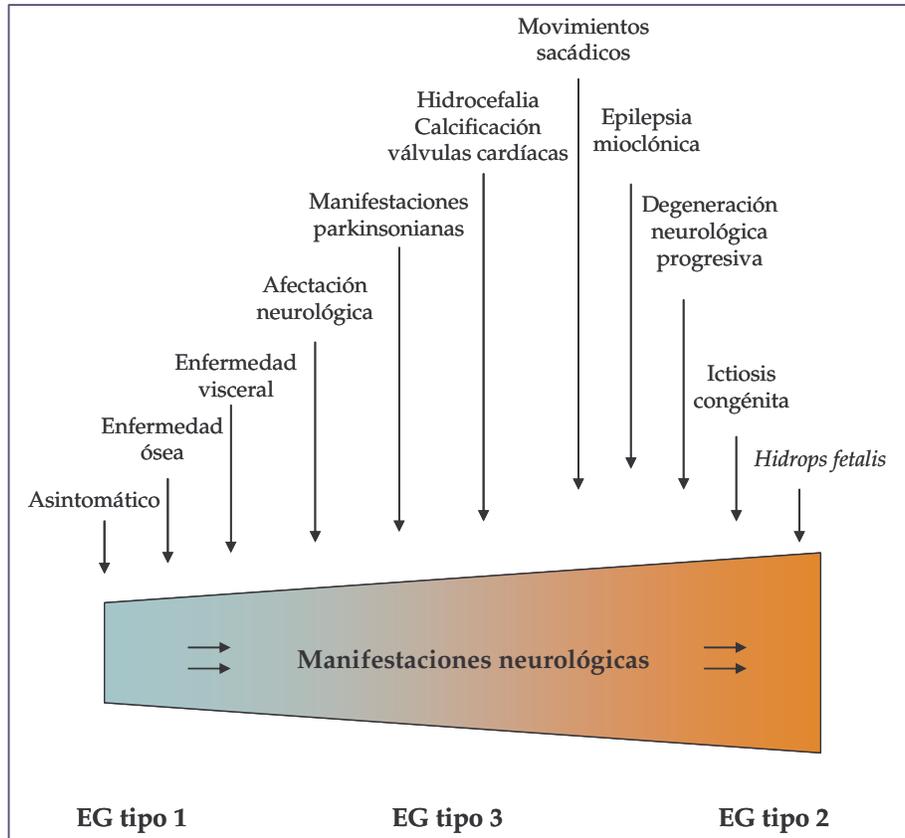
La glucocerebrosidasa está formada por 3 dominios. El dominio I (residuos 1-27 y 383-414) contiene dos puentes disulfuro, los cuales parecen estar implicados en el correcto plegamiento de la enzima. El dominio II (residuos 30-75 y 431-497) constituye un dominio tipo inmunoglobulina, mientras que el dominio III (residuos 76-381 y 416-430) contiene el sitio catalítico de la enzima (Dvir *et al.*, 2003). Grabowsky *et al.*, apoyándose en sus resultados (Grabowski *et al.*, 1984; Grace *et al.*, 1990; Greenberg *et al.*, 1990), han propuesto un modelo cinético del centro activo de la enzima glucocerebrosidasa que incluye tres sitios de unión, para el grupo glucídico, la zona de la esfingosina y la cadena del ácido graso de la glucosilceramida. En un principio se pensó que, en la enzima humana, el centro activo estaba localizado a nivel del residuo asparragina en posición 443. En la actualidad, se conoce que los residuos catalíticos corresponden a los aminoácidos Glu<sup>235</sup> y Glu<sup>340</sup>, respectivamente (Dinur *et al.*, 1986; Fabrega *et al.*, 2002; Grabowski *et al.*, 1990).

Se ha sugerido la existencia de diversas enzimas mutantes implicadas en la EG, basadas en las diferentes respuestas experimentadas en la actividad, procesamiento y estabilidad de la glucocerebrosidasa ante distintos modificadores. De esta manera, se han propuesto dos tipos de enzimas mutadas: 1) aquellas con descenso de la estabilidad, que mantienen una interacción normal con el sustrato y presentan un decrecimiento drástico de las constantes catalíticas y, 2) aquellas con una estabilidad normal pero con una reducción de la afinidad del centro activo de la enzima por el sustrato y una moderada disminución de las constantes catalíticas. Otro tercer tipo de enzima sería aquella que fuera completamente inactiva o truncada, procedente de una mutación *GBA* grave (Grace *et al.*, 1997; Horowitz and Zimran, 1994; Hruska *et al.*, 2008).

#### 1.1.4. Clasificación clínica

En 1962 se publicó por primera vez una clasificación de la EG basada en las características clínicas, considerando la presencia o ausencia de afectación del sistema nervioso central y en la progresión de los síntomas neurológicos. Esta clasificación ha evolucionado hasta otra más reciente propuesta por el “Neuronopathic Gaucher Disease Task Force” del “European Working Group on Gaucher Disease”, que divide la EG en: tipo 1 o no neuronopático, tipo 2 o neuronopático agudo y tipo 3 o neuronopático crónico (Stirnemann *et al.*, 2003). Existe una gran heterogeneidad en la forma y momento de presentación de la EG así como en la presencia, intensidad y gravedad de los síntomas (Giraldo *et al.*, 2003) (Anexo I). De tal forma, en la actualidad se cuestiona si realmente son enfermedades distintas o son diferentes fases de una misma enfermedad en la que influyen diversos factores en el desarrollo de síntomas neurológicos y así se hablaría de un “continuo” (figura 1.3), desde las formas neurológicas muy graves, ya en la vida fetal, hasta el paciente totalmente asintomático (Sidransky, 2004).

FIGURA 1.3. Fenotipo continuo observado en la EG.



Adaptada de Sidransky *et al.*, 2004. *Mol Genet Metab*

La descripción de los tipos es la siguiente:

- **EG tipo 1:** Es la forma más común, conocida también como forma del adulto o no neuronopática, aunque también puede aparecer en edad infantil (Beutler, 2001; Giraldo *et al.*, 2003). La primera manifestación suele ser la esplenomegalia acompañada o no de hepatomegalia. Las alteraciones hematológicas, que incluyen trombocitopenia, leucopenia y anemia, son consecuencia de la infiltración medular por células de Gaucher y del secuestro esplénico. También puede aparecer un cuadro de hipermetabolismo y caquexia (Barton *et al.*, 1989). Las manifestaciones esqueléticas pueden revelarse a lo largo de la enfermedad y representan el primer punto de morbilidad de la EG tipo 1 (Connock *et al.*, 2006). Hasta la fecha la EG tipo 1 se ha relacionado con la no aparición de alteraciones neurológicas pero en algunos pacientes esta situación no se mantiene de forma indefinida. De esta manera, algunos pacientes no presentan alteraciones neurológicas en el nacimiento y son diagnosticados y clasificados en el tipo 1, pero los síntomas neurológicos aparecen en las siguientes dos décadas obligando a su reclasificación en el tipo 3 (Capablo *et al.*, 2008).

- EG tipo 2: Conocida como forma neurológica aguda infantil, se caracteriza por un inicio precoz (neonatal o en los primeros meses de la vida) y por una implicación grave del sistema nervioso central (SNC). Los recién nacidos presentan signos neurológicos desde el nacimiento con hipertonía, rigidez, opistótonos, dificultad para la deglución y hepatoesplenomegalia masiva. Además de este cuadro clínico de afectación neurológica y visceral, existe una manifestación dermatológica característica, que en las formas sintomáticas adopta la forma de “ictiosis congénita” o con menos frecuencia de “recién nacido tipo colodión” (Lui *et al.*, 1988), pero incluso en los casos aparentemente asintomáticos el examen bioquímico y ultraestructural de la piel pone en evidencia el desequilibrio lipoideo y la alteración de la capa córnea (Fujimoto *et al.*, 1995; Sidransky *et al.*, 1996).
  
- EG tipo 3: También denominada EG neuronopática crónica o EG juvenil, es de gravedad intermedia entre los dos tipos anteriores. Se observan síntomas neurológicos similares a los de la EG de tipo 2, pero de aparición más tardía y de menor intensidad. Desde el punto de vista clínico se subdivide en los tipos 3a, 3b y 3c en función del predominio de la afectación neurológica o visceral, de la presencia de opacidad corneal o calcificación en válvulas cardíacas.
  - El tipo 3a tiene un comienzo tardío (infancia o adolescencia). Se caracteriza por una moderada afectación visceral y deterioro grave y progresivo del sistema nervioso que incluye oftalmoplegia supranuclear horizontal, demencia (Patterson *et al.*, 1993) y convulsiones mioclónicas (Brady *et al.*, 1993).
  - El tipo 3b presenta hepatoesplenomegalia grave frecuentemente acompañada de hipertensión portal y varices esofágicas. Existe un predominio de la afectación visceral y ósea sobre los síntomas neurológicos. Las afectaciones neurológicas características en este subtipo son la oftalmoplegia supranuclear horizontal (Hill *et al.*, 1996; Patterson *et al.*, 1993) y la apraxia oculomotora (Elstein *et al.*, 2001).
  - El tipo 3c es característico de los pacientes homocigotos para la mutación D409H del gen *GBA*. No presenta manifestaciones a nivel óseo, se caracteriza por esplenomegalia leve con ausencia de hepatomegalia, apraxia oculomotora y, principalmente, por calcificación y engrosamiento de las válvulas cardíacas mitral y aórtica (Abrahamov *et al.*, 1995; Chabas *et al.*, 1998).

### 1.1.5. Manifestaciones clínico-patológicas

Las manifestaciones clínicas más destacadas de la enfermedad derivan de la infiltración por macrófagos en los distintos órganos. La acumulación del material glucolipídico no degradado es almacenado en las células del SMF y es por ello todos los órganos que contengan elementos del SMF pueden estar afectados (Giraldo *et al.*, 2003; Horowitz *et al.*, 1998; Lee, 1995; Lee, 1982).

Los dominios fundamentales de la enfermedad incluyen afectación visceral con hepatoesplenomegalia; infiltración de médula ósea con citopenias y enfermedad ósea. Con una menor frecuencia puede ocasionar manifestaciones neurológicas, pulmonares, cardiovasculares, cutáneas, renales y mayor incidencia de enfermedades malignas (Beutler, 2001; Giraldo *et al.*, 2003).

La EG se caracteriza por un gran polimorfismo clínico, con afectación de gran diversidad de órganos:

- Afectación visceral: Las manifestaciones viscerales de la EG vienen definidas por el aumento del volumen esplénico que aparece en el 95% de los pacientes con EG de tipo 1, debido a que el 10% del tejido hepatoesplénico está constituido por células del SMF (Hoffman, 1995). La esplenomegalia cuando es muy voluminosa, impacta sobre diafragma y provoca compresión del pulmón y otros órganos abdominales. El aumento de volumen esplénico induce el secuestro de las células sanguíneas y provoca anemia, leucopenia y trombocitopenia y como consecuencia hay mayor tendencia al sangrado mucocutáneo (Zimran *et al.*, 1992). La progresión de la esplenomegalia puede ocasionar situaciones graves, aparición de complicaciones hemorrágicas derivadas de la trombocitopenia y otras posibles deficiencias en factores plasmáticos de la coagulación.

El incremento en el volumen del hígado es más moderado, si el paciente no está esplenectomizado, y se aprecia en el 70-80% de los pacientes con EG de tipo 1. De ellos, sólo en el 50% repercute en la capacidad funcional, el 10% desarrolla cirrosis con hipertensión portal y varices esofágicas (Kolodny *et al.*, 1982; Lee, 1982). En estos casos la existencia de ictericia, eritema palmar y/o arañas vasculares son características de la mayor disfunción hepática. Si se analiza desde el punto de vista histológico, además de la presencia de células de Gaucher, se detectan septos fibrosos que rodean a las células, originados en parte por la producción aumentada de citoquinas, en un intento de autodefensa del organismo para

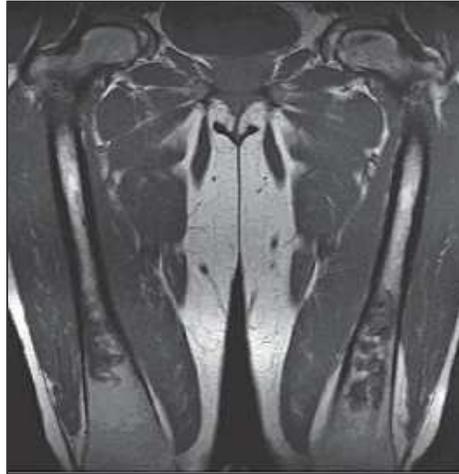
aislar las acumulaciones celulares o por un desequilibrio en el metabolismo lipídico (Cox and Schofield, 1997).

- Afectación ósea: Es la segunda estructura más frecuentemente afectada en la EG y condiciona en gran medida la calidad de vida del paciente. Por medio de radiografía simple, escintigrafía, tomografía axial computerizada (TAC), o resonancia magnética (RM) se ha observado que el 80% de los pacientes con EG presentan algún grado de afectación ósea y más de la mitad sufren complicaciones serias, incluyendo fracturas patológicas y osteonecrosis (Hermann *et al.*, 1997). La acumulación celular provoca infiltración de la MO (con mayor afectación en cabezas y diáfisis femorales, húmeros, cuerpos vertebrales, tibias, costillas, pelvis, huesos del pie y mandíbula) con presencia de grupos de CG irregularmente distribuidas y fibrosis pericelular en forma de fibras de reticulina, contribuyendo también a la presencia de anemia, trombocitopenia y leucopenia (Giraldo *et al.*, 2003; Wenstrup *et al.*, 2002).

La afectación ósea en la enfermedad de Gaucher es compleja y se manifiesta de diversas maneras:

- Osteopenia generalizada, ocasionada por el adelgazamiento de la capa cortical y la pérdida de trabéculas, que favorece la aparición de fracturas.
- Osteonecrosis producida por infarto crónico del hueso debido al compromiso de la microcirculación intraósea con isquemia localizada y obstrucción, lo que genera crisis óseas, que se definen como un cuadro doloroso agudo, más frecuente en edad infantil, y que clínicamente se caracteriza por fiebre y dolor intenso en huesos largos generalmente el fémur.
- Osteosclerosis, asociada a infartos óseos por calcificación distrófica de la MO necrótica (Pastores, 1995).
- Remodelación inadecuada del hueso femoral y tibial en crecimiento dando lugar a una deformación en forma de matraz de Erlenmeyer (figura 1.4) que se caracteriza por ser bilateral y simétrica. Es una alteración característica que se produce en el 80% de pacientes pero no es patognomónica de la enfermedad (Tran HA, 2004) ni confiere significado de gravedad.

**FIGURA 1.4: Fémur con deformidad en forma de matraz Erlenmeyer.**



La patogénesis de las alteraciones óseas no se conoce con exactitud. Además de la propia infiltración celular, se especula que las CG intervienen directa o indirectamente en la función de los osteoclastos y osteoblastos, ya que están implicadas en la liberación de citoquinas que inducen la actividad osteoclástica (Elstein *et al.*, 1997; Gery *et al.*, 1981; Pastores, 1995).

- Alteraciones hematológicas y bioquímicas: A nivel hematológico es característico encontrar citopenias en los pacientes con EG. Son debidas al desplazamiento del tejido hematopoyético por infiltración medular y a la esplenomegalia. La anemia es frecuente en los pacientes con EG tipo 1, provocada por hemodilución, secuestro esplénico, así como menor hematopoyesis. La leucopenia es la citopenia menos intensa pero con un significado clínico importante porque puede contribuir a la aparición de infecciones recurrentes (Aerts and Hollak, 1997). La trombocitopenia, condicionada por el hiperesplenismo y la menor producción medular, es la responsable de la mayor predisposición a hemorragias y aparición de hematomas que presentan estos pacientes. A menudo es una de las manifestaciones que pone en marcha los procedimientos diagnósticos que permiten identificar la enfermedad.

Como consecuencia de la aparición de hemorragias (epistaxis, gingivorragias), se origina un perfil de distribución del hierro de tipo carencial. Sin embargo, en estos pacientes se encuentran con frecuencia niveles de ferritina anormalmente elevados y existe acumulación del metal en el SMF secundariamente al perfil inflamatorio del proceso y al estímulo constante del monocito-macrófago (Stein *et al.*; Zimran *et al.*, 1992).

Por otro lado, el estímulo constante del sistema inmune provoca el aumento policlonal de la fracción gammaglobulínica sérica y la aparición de gammapatías monoclonales con mayor frecuencia que en población general, estas alteraciones se relacionan igualmente con la mayor incidencia de mieloma múltiple entre los pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 (Giraldo, 1998).

Diversos autores han analizado la concentración de glucosilceramida en plasma (Nilsson *et al.*, 1982; Strasberg *et al.*, 1983), observando que por término medio la concentración de este glucocerebrósido se duplica en sujetos afectados de EG en relación a sujetos controles, aunque en estos últimos existe una gran variabilidad en la concentraciones plasmáticas de glucosilceramida. Un sustrato menor, pero también importante, es la glucosilesfingosina, un análogo deacetilado de la glucosilceramida. Los altos niveles de este lípido en las formas neuronopáticas de la EG apoyan la hipótesis de que la glucosilesfingosina puede contribuir a la implicación del SNC en la EG (Nilsson and Svennerholm, 1982; Orvisky *et al.*, 2002).

El perfil lipídico de los pacientes con EG también se encuentra alterado. Así, las concentraciones plasmáticas de colesterol total (CT), colesterol en lipoproteínas de baja densidad (cLDL) y colesterol en lipoproteínas de alta densidad (cHDL) están disminuidas en relación con la población normal (Ginsberg *et al.*, 1984). A pesar de ello, presentan un índice aterogénico CT/HDL muy elevado. También se conoce que la gravedad clínica de la enfermedad se relaciona de forma inversa con la reducción de colesterol en plasma. La concentración de las apolipoproteínas apoAI y apoB está disminuida, mientras que la apoE en plasma se encuentra aumentada en la EG (Basu *et al.*, 1982; Giraldo *et al.*, 2003; Pocovi *et al.*, 1998).

Estos parámetros bioquímicos se pueden tener en cuenta tanto en la valoración de la respuesta al tratamiento como marcadores de la evolución de la enfermedad.

- Manifestaciones cutáneas: Existen manifestaciones cutáneas debidas a la deposición de material glucolipídico a nivel de la dermis, ocasionando hiperpigmentación cutánea y conjuntival o en la esclerótica dando lugar a la aparición de pinguécula (Cox and Schofield, 1997; Goldblatt and Beighton, 1984; Petroheos *et al.*, 1975). Otras manifestaciones cutáneas características de la EG no atribuibles al depósito de material glucolipídico son: dilataciones vasculares malares, abdominales, cianosis hepatógena, eritema palmar propias de la afectación hepática o cuadros purpúricos petequiales debidos a la trombocitopenia (Mistry and Abrahamov, 1997).

- Manifestaciones pulmonares: La aparición de afectación pulmonar en la EG es infrecuente; sin embargo debe valorarse minuciosamente en cada paciente. Se produce fibrosis intersticial que afecta a la luz alveolar debido a la propia infiltración perivascular, peribronquial y periseptal, lo que conduce a una afectación pulmonar progresiva. Debido a la repercusión de la enfermedad sobre la circulación, puede aparecer hipertensión pulmonar, siendo un trastorno más frecuente entre los pacientes afectados de EG que en población general (Banjar, 1998; Miller *et al.*, 2003; Mistry *et al.*, 2002; Theise and Ursell, 1990).
- Alteraciones cardíacas: La afectación cardíaca no es frecuente en la EG, aunque tampoco excepcional. La infiltración miocárdica puede cursar de modo asintomático, o producir una disminución de la distensibilidad ventricular y el gasto cardíaco. Los trastornos valvulares, mucho menos comunes y cuyo mecanismo de afectación se desconoce por el momento, tienen un curso fatal, incluso a pesar del tratamiento quirúrgico (Abrahamov *et al.*, 1995; Chabas *et al.*, 1995). En todos los sujetos se encontró la mutación designada como D409H en homocigosis, lo que constituye una de las correlaciones fenotipo-genotipo más notables en la EG.
- Otras manifestaciones: La afectación renal es excepcional, pero se han detectado CG en biopsias y autopsias de tejido renal en pacientes afectados de EG (Smith *et al.*, 1978).

#### 1.1.6. Manifestaciones neurológicas en la enfermedad de Gaucher

El depósito de células de Gaucher (CG) en el sistema nervioso central (SNC) se produce a nivel periadventicial. La enfermedad de Gaucher (EG) de tipo 1 se caracteriza por la ausencia de implicación del SNC, sin embargo algunos pacientes desarrollan síntomas neurológicos, como Enfermedad de Parkinson, enfermedad de cuerpos de Lewy, epilepsia mioclónica y polineuropatía periférica entre otros (Capablo *et al.*, 2008; Giraldo *et al.*, 2008; King, 1975; Leverenz *et al.*, 2009; Melamed *et al.*, 1975). La implicación del SNC es la constante en los pacientes con EG tipo 2 y 3.

Los estudios anatomopatológicos de cerebros de pacientes con enfermedad de Gaucher han demostrado la presencia de células similares a las de Gaucher en córtex, sustancia blanca, materia gris del tálamo, tejidos subependimarios de la médula espinal y parénquima cortical

cerebral fundamentalmente (Norman *et al.*, 1956). Se observa una pérdida local de neuronas, que frecuentemente ocurre en los ganglios basales, núcleo del cerebro medio, médula e hipotálamo, mientras que en el córtex cerebral de la vía piramidal y sus conexiones ganglionares se observa pérdida neuronal en menor grado (Espinosa and Faris, 1969; Kaye *et al.*, 1986; Norman *et al.*, 1956). La génesis del daño neuronal es desconocida. Sin embargo, en algunos estudios en los que se ha utilizado un análogo deacilado de la glucosilceramida de toxicidad neurológica reconocida, la glucosilesfingosina, hacen pensar que la glucosilceramida acumulada también juegue un papel en la muerte neuronal (Nilsson *et al.*, 1985).

La invasión celular de CG, el papel neurotóxico de los productos acumulados, la presencia de citoquinas y factores de necrosis celular, y agentes todavía desconocidos, dan lugar a un daño neurológico desigual lo que origina una expresión clínica variable, sin embargo son características las alteraciones oculomotoras y las contracciones mioclónicas.

El tratamiento enzimático sustitutivo (TES) en la EG ha supuesto una mejoría sustancial de la mayoría de las manifestaciones sistémicas de la enfermedad (reducción de las visceromegalias, normalización de los recuentos sanguíneos, aclaramiento de los depósitos intramedulares), sin embargo carece de eficacia sobre la sintomatología en el SNC y no existen muchos datos que confirmen el efecto beneficioso del TES sobre los síntomas extrapiramidales (Bembi *et al.*, 2003; Schiffmann *et al.*, 1997). Existen diversos trabajos que afirman que con la terapia de reducción de sustrato (TRS) mejoran los síntomas neurológicos de los pacientes con EG (Cox *et al.*, 2000; Platt *et al.*, 2001), ya que el menor tamaño molecular del principio activo permite atravesar con mayor facilidad la barrera hematoencefálica (BHE) (Yu *et al.*, 2007). También se ha postulado una estrategia de tratamiento con chaperonas farmacológicas, un subtipo especial de chaperonas químicas que están diseñadas para unirse a una proteína específica y conseguir su estabilización (Ringe and Petsko, 2009). Las chaperonas farmacológicas proporcionan un ambiente adecuado para conseguir el plegamiento correcto de la glucocerebrosidasa, evitando de este modo la degradación de la enzima mediada por el proteasoma (Grabowski, 2008b; Suzuki *et al.*, 2009).

#### 1.1.7. Enfermedad de Parkinson y enfermedad de Gaucher

La aparición de una variante atípica de enfermedad de Parkinson (EP) de comienzo temprano, gravedad en el curso clínico y que se controla con dificultad con los tratamientos convencionales de la EP, en pacientes con EG (Neudorfer *et al.*, 1996; Tayebi *et al.*, 2001; Tayebi

*et al.*, 2003; Varkonyi *et al.*, 2003), motivó la realización de estudios de prevalencia de EP en diversas poblaciones de pacientes con enfermedad de Gaucher, cuyo objetivo era analizar las alteraciones genéticas y las características clínicas asociadas.

La primera publicación que claramente analizó la coexistencia de estos dos fenotipos en seis casos de pacientes con EG y síntomas parkinsonianos fue descrita por Neudorfer *et al.*, en 1996. Aunque tras este primer trabajo, se publicaron otros, que ponen en evidencia la asociación entre ambas entidades (Bembi *et al.*, 2003; Giraldo *et al.*, 2008; Goker-Alpan *et al.*, 2008; Goker-Alpan *et al.*, 2004; Itokawa *et al.*, 2006; Sidransky, 2005; Tayebi *et al.*, 2001; Tayebi *et al.*, 2003; Varkonyi *et al.*, 2003). En estos estudios, se describe un elevado grado de variabilidad respecto a las manifestaciones parkinsonianas al inicio de la enfermedad y durante la progresión de la misma.

Se han realizado estudios en distintas poblaciones con objeto de conocer si existe asociación entre la ocurrencia de mutaciones en el gen *GBA* y el riesgo de desarrollar enfermedad de Parkinson. La mayoría de estos estudios relacionan la presencia de mutaciones en el gen *GBA* y el desarrollo de EP. Uno de los primeros estudios moleculares se realizó a partir de DNA extraído de tejido cerebral de individuos con EP idiopática, patológicamente confirmada. Se detectaron mutaciones en el gen *GBA* en estos pacientes con mayor frecuencia de la esperada respecto a la frecuencia de portadores de enfermedad de Gaucher. La secuenciación de todo el gen *GBA* en 57 muestras de tejido cerebral reveló alelos mutantes en doce de ellas (21%), que incluían las variantes K198T, T369M, N370S, L444P, E326K y R329C (Lwin *et al.*, 2004). Posteriormente, se realizó otro estudio en el que se analizaron 26 muestras de tejido cerebral recogidas en Gran Bretaña. Dos portaban mutaciones heterocigotas en el gen *GBA* (8%). Estos resultados sugirieron que las mutaciones en el gen *GBA*, incluso en individuos heterocigotos, podría ser un factor de riesgo heredado para el desarrollo de parkinsonismo (Eblan *et al.*, 2005).

Estas conclusiones fueron corroboradas por otros estudios en distintas poblaciones de pacientes con EP. En muchos de estos estudios, sin embargo, los resultados fueron obtenidos por medio del cribado de cohortes de pacientes diagnosticados con EP, en los que se estudiaron únicamente algunas mutaciones específicas del gen *GBA*. Aharon-Peretz *et al.*, en una serie de 99 pacientes de origen Ashkenazi diagnosticados de EP, analizaron 6 de las mutaciones más comunes en el gen *GBA* para esta población. Identificaron 31 pacientes con alteraciones en el gen *GBA* (31,3%), de manera que la frecuencia de mutaciones encontradas en el gen *GBA* fue

cinco veces superior a la frecuencia de mutaciones encontrada en los dos grupos control de población sana y de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Aharon-Peretz *et al.*, 2004).

Un segundo trabajo realizado en población de origen Ashkenazi incluyó 160 pacientes con EP y 92 controles sanos evaluados clínicamente. Se analizó exclusivamente la mutación N370S, obteniendo que 17 pacientes con EP (10,7%) portaban algún alelo mutado del gen *GBA*, en comparación con el 4,3% de los controles. Estos resultados no alcanzaron significación estadística. Si bien este estudio fue limitado, ya que sólo se analizó una mutación en el gen de la glucocerebrosidasa, la frecuencia de mutaciones fue considerablemente más baja que la que descrita en la cohorte estudiada por Aharon-Peretz *et al.* (Clark *et al.*, 2007).

En el trabajo presentado por el grupo de Sato *et al.*, se analizaron siete mutaciones del gen *GBA* en sujetos de origen canadiense, 88 pacientes con EP clínicamente diagnosticada y 122 controles sanos, examinados clínicamente. Se identificaron mutaciones en el gen *GBA* en el 5,6% de los pacientes con enfermedad de Parkinson, en comparación con el 0,8% de los controles (Sato *et al.*, 2005).

En otro estudio realizado en Venezuela, se analizó el gen *GBA* completo para 33 pacientes con EP de inicio precoz y 29 controles sanos, encontrando alteraciones en el gen *GBA* en cuatro (12%) de los pacientes con EP (Eblan *et al.*, 2006).

Recientemente, se ha realizado un estudio multicéntrico incluyendo a sujetos pertenecientes a 16 centros diferentes, 5.691 pacientes con EP (780 de los cuales fueron de origen Ashkenazi) y 4.898 controles (387 de ascendencia Ashkenazi). Entre los sujetos de origen Ashkenazi, se identificaron las mutaciones N370S y L444P en el 15% de los pacientes y el 3% de los controles, mientras que en pacientes con EP provenientes de otros grupos étnicos, la frecuencia conjunta de alguna de estas dos mutaciones fue del 3%. Cuando se realizó la secuenciación del gen *GBA* completo, se encontraron alteraciones en el 7% de los pacientes con EP de origen no Ashkenazi (Sidransky *et al.*, 2009).

De este modo, varios estudios independientes han detectado una frecuencia de mutaciones en el gen que codifica para la glucocerebrosidasa en pacientes con EP superior a la prevista. Sin embargo, no se asocia ninguna mutación específica en el gen *GBA* con un incremento del riesgo de desarrollar EP.

El mecanismo molecular responsable de la EP en portadores de mutaciones en el gen *GBA* no se conoce con exactitud. Los hallazgos neuropatológicos característicos en pacientes con EG que desarrollan EP muestran pérdida de neuronal, astrogliosis e inclusiones intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína en las regiones CA2-4 del hipocampo, que son áreas afectadas en la EG (Aharon-Peretz *et al.*, 2004; Trojanowski *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 2004).

Kono *et al.* demostraron la existencia de una disfunción dopaminérgica presináptica en los pacientes con EP asociada a mutaciones en el gen *GBA* (Kono *et al.*, 2007). Neumann *et al.* detectaron, además de la patología clásica de la EP, inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína en áreas corticales del cerebro correspondientes a los estados 5 y 6 de Braak y Braak (Braak and Braak, 1991) en pacientes portadores de mutaciones en el gen *GBA* (Neumann *et al.*, 2009), sugiriendo que los portadores de mutaciones en el gen *GBA* presentan una enfermedad neuropatológica más avanzada.

Existen varias hipótesis respecto a los mecanismos moleculares que intervienen en la patogénesis de la EP en portadores de mutaciones en el gen *GBA*. Entre ellos se incluyen alteraciones lipídicas, acumulación de proteínas aberrantes o mal plegadas, disfunción lisosomal, deterioro del sistema ubiquitina proteasoma, disfunción mitocondrial y de los mecanismos protectores del stress oxidativo y apoptosis (Gan-Or *et al.*, 2008).

Algunos autores proponen que el mecanismo patogénico conducente a la enfermedad de Parkinson en los pacientes con esta enfermedad y portadores de variantes en el gen *GBA* debe relacionarse con el procesamiento defectuoso de sustancias tóxicas no requeridas por la célula, agravado por el descenso relativo en la actividad enzimática de la glucocerebrosidasa y el consecuente aumento de glucosilceramida, que pueden conducir a un incremento focal de sustrato en regiones específicas del cerebro (Aharon-Peretz *et al.*, 2004; Lwin *et al.*, 2004) y que se ha relacionado con la inducción de apoptosis de células neuronales (Atsumi *et al.*, 1992; Brugg *et al.*, 1996; Pelled *et al.*, 2000).

Es conocido que la formación de agregados insolubles de  $\alpha$ -sinucleína provoca la muerte neuronal en la EP. El mecanismo que causa la estructura fibrilar, los efectos tóxicos de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína y las rutas celulares implicadas en el aclaramiento de estos agregados están siendo todavía estudiados, pero se hipotetiza que las interacciones con otras proteínas mutadas, como la GC, incrementen la formación de agregados insolubles conducentes a la muerte neuronal.

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína con una elevada propensión a la agregación. Los productos finales de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína son polímeros insolubles que intervienen en la formación de cuerpos de Lewy. Se ha demostrado que las mutaciones en  $\alpha$ -sinucleína pueden desembocar en la agregación aberrante de la proteína (Cuervo *et al.*, 2004). Una de las hipótesis planteadas es que interacción de  $\alpha$ -sinucleína con la glucocerebrosidasa mutada podría contribuir a la formación de agregados insolubles responsables de la muerte neuronal (Goker-Alpan *et al.*, 2004).

Las formas solubles de  $\alpha$ -sinucleína y, posiblemente, las protofibrillas, son degradados a través del lisosoma mediante autofagia mediada por chaperonas (Cuervo *et al.*, 2004). Cuervo *et al.*, observaron que la  $\alpha$ -sinucleína salvaje tiene un motivo compartido por otras proteínas que utilizan esta vía para la degradación. La  $\alpha$ -sinucleína se une a la chaperona hsc70 en el citosol, y luego se internaliza en la membrana lisosomal a través del receptor Lamp2a. La  $\alpha$ -sinucleína mutada mantiene la capacidad de formar complejos con la chaperona, pero se produce un fallo en la internalización, debido a que permanece unida al receptor. Esta ocupación del receptor Lamp2a podría interferir en la degradación posterior de otras proteínas que también utilicen esta vía, provocando un acumulo de proteínas no degradadas. Las mutaciones en la glucocerebrosidasa, por lo tanto, podrían causar disfunción lisosomal o interferir con la unión de los receptores  $\alpha$ -sinucleína en la membrana lisosomal, provocando toxicidad celular.

Otra hipótesis sugerida se basa en que la  $\alpha$ -sinucleína es degradada mediante autofagia en el proteasoma; la disfunción lisosomal debida a la deficiencia de glucocerebrosidasa podría conducir a la degradación inadecuada de  $\alpha$ -sinucleína y contribuir a la formación de agregados que constituyen inclusiones intraneuronales comunes en la enfermedad de Parkinson. El plegamiento incorrecto de glucocerebrosidasa aberrante podría interferir con la unión de  $\alpha$ -sinucleína a su receptor en la membrana lisosomal y a la función del proteasoma predisponiendo a sinucleinopatías (Goker-Alpan *et al.*, 2004; Manning-Bog *et al.*, 2009; Trojanowski *et al.*, 1998; Webb *et al.*, 2003).

Varios estudios señalan que el sistema ubiquitina-proteasoma puede verse comprometido en la EP (Petrucci *et al.*, 2002; Rideout *et al.*, 2004). La acumulación y agregación de proteínas potencialmente citotóxicos en cuerpos de Lewy sugieren una deficiencia en la degradación proteica. Por lo tanto, otra hipótesis es que las mutaciones en el gen *GBA* den lugar a moléculas de glucocerebrosidasa mal plegadas que podrían desbordar la capacidad del sistema

ubiquitina-proteasoma para degradar otras proteínas anormalmente acumuladas, incluyendo la  $\alpha$ -sinucleína.

Otro mecanismo propuesto para la asociación entre la EG y la EP implica el posible papel desempeñado por los lípidos. Algunos estudios proponen que los lípidos pueden promover la agregación de  $\alpha$ -sinucleína y la toxicidad a través de la formación de protofibrillas (Cole *et al.*, 2002). Por lo tanto, los posibles cambios en la estructura de la membrana lipídica debidos a la acumulación de glucocerebrósidos y/o glucosilesfingosina, podrían contribuir al aumento de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína y a la citotoxicidad de la misma, dando lugar a la patología asociada con las mutaciones en el gen que codifica para la glucocerebrosidasa (Hruska *et al.*, 2006).

La coincidencia de estos dos fenotipos sugiere una patogenia compartida o bien la existencia de factores modificadores o genéticos comunes. Aunque son necesarios más estudios para elucidar el mecanismo fisiopatológico implicado en ambas enfermedades que facilitará un consejo genético más seguro y conducirá al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

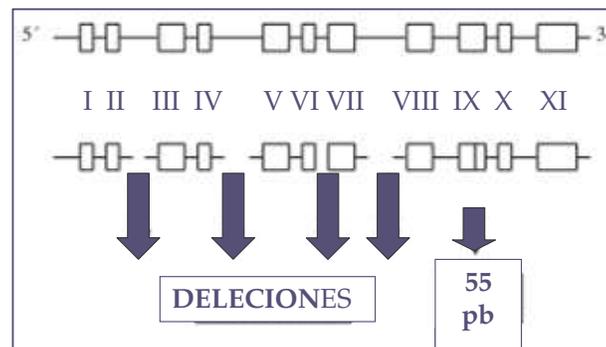
#### 1.1.8. Alteraciones genéticas. Correlación genotipo/fenotipo en la EG

El defecto molecular responsable de las principales formas de la enfermedad de Gaucher (EG) se debe, en la mayoría de los casos, a mutaciones en el gen *GBA*, que codifica la enzima lisosomal glucocerebrosidasa (GC) (Beutler, 2001). En casos extremadamente raros y poco frecuentes, la enfermedad se produce por un déficit del activador fisiológico de la GC, la saposina C (Sap C). Estos casos se manifiestan como formas graves de la EG, ya que la ausencia de Sap C elimina completamente la actividad de la GC (Christomanou *et al.*, 1986).

El gen *GBA*, situado en el cromosoma 1q21-1q31, comprende 11 exones y 10 intrones, que se distribuyen con una longitud de 7,6 Kb. A 16 Kb en dirección 3' existe una estructura de 5,7 Kb de longitud que se corresponde con el seudogén (*GBAP*) y tiene la misma organización en cuanto a exones e intrones que el gen funcional. A pesar de la diferencia en el tamaño, ambas estructuras presentan un 96% de homología. El seudogén difiere del gen estructural debido a que posee varias deleciones en los intrones 2 (313 pb), 4 (626 pb), 6 (320pb) y 7 (277 pb) que corresponden a secuencias de elementos Alu presentes en el gen estructural. El seudogén también posee dos deleciones más pequeñas situadas en los exones 9 (55 pb) y 4 (5 pb) (figura 1.5). Además, contiene múltiples mutaciones puntuales (sustituciones y deleciones), localizadas

tanto en los exones como en los intrones correspondientes al gen estructural (Horowitz *et al.*, 1989). Por otra parte, la presencia del seudogén favorece el intercambio de fragmentos de DNA entre el gen estructural y el seudogén durante el proceso de recombinación, dando lugar a alelos no funcionales denominados alelos de recombinación (*Rec*) (Cormand *et al.*, 2000). La presencia de este seudogén complica la identificación y caracterización de mutaciones en el gen estructural que condicionan la aparición de la EG.

**FIGURA 1.5. Representación esquemática y comparativa del gen *GBA* y el seudogén (*GBAP*).**



Las mutaciones identificadas en el gen *GBA* se han denominado en referencia al aminoácido mutado en la proteína, sin incluir los 39 residuos correspondientes al péptido señal; y además referidas al nucleótido mutado tomando como referencia el DNA complementario (Disponible en: [www.hgvs.org/mutnomen](http://www.hgvs.org/mutnomen) [consultado 16/09/07] (Antonarakis; den Dunnen and Antonarakis, 2000).

Beutler y Grabowsky (Beutler, 2001) propusieron un esquema de clasificación que define tres clases de mutaciones: mutaciones nulas, graves y leves. La combinación de estas mutaciones predice con bastante precisión el tipo de la EG (tabla 1.1).

**TABLA 1.1. Tipo de EG en función de las mutaciones presentes en el gen *GBA*.**

Alelos	Nulo	Grave	Leve
Nulo	No viable	Tipo 2/3	Tipo 1
Grave	Tipo 2/3	Tipo 2/3	Tipo 1
Leve	Tipo 1	Tipo 1	Tipo 1

Los alelos nulos corresponden a mutaciones que impiden sintetizar la proteína. Estos alelos son aquellos que tienen grandes deleciones y/o inserciones que afectan al gen de *GBA*: alelos mutados que producen un codón de parada prematuro o alelos que afectan al proceso de ajuste o “splicing”. El resto de mutaciones son las denominadas no nulas, definiéndose en estos casos la gravedad en función del fenotipo observado entre los pacientes portadores de la misma. En general, la presencia de mutaciones leves predice la no afección neurológica de los pacientes portadores.

Las mutaciones graves se han encontrado en sujetos con EG con fenotipo neuronopático. Las mutaciones graves más frecuentes en la población española son: L444P, D409H, R463C, G195W y P266L (Giraldo *et al.*, 2003).

Las mutaciones clasificadas como leves son aquellas que se han encontrado en pacientes con EG tipo 1 en homocigosidad, o bien aquellas que están en heterocigosidad con otra mutación que previamente se ha identificado como leve.

Hasta la fecha, han sido descritas más de 250 mutaciones en el gen *GBA* (Sidransky *et al.*, 2009). Esto incluye mutaciones de tipo “*missense*” (cambio de un nucleótido que condiciona una transformación en un aminoácido), “*nonsense*” (cambio de un nucleótido que da lugar a un codón de parada), pequeñas inserciones o deleciones que conducen a cualquiera de las mutaciones de tipo “*frameshifts*” (cambian la pauta de síntesis de los aminoácidos) o “*in-frame*” (deleciones o inserciones de tres o múltiplos de tres bases), mutaciones que afectan al ajuste o “splicing” del RNA, alelos complejos con dos o más mutaciones en cis y deleciones e inserciones que afectan a un fragmento largo del gen. Otro tipo de mutaciones descritas son aquellas que son consecuencia de un evento de recombinación entre el gen *GBA* y el seudogén bien sean por conversión, fusión o duplicación (Hruska *et al.*, 2008).

Además de estas mutaciones, existen otras alteraciones genéticas frecuentes en la población, denominadas polimorfismos, que se producen en intrones o zonas flanqueantes del gen *GBA* y que no afectan a su funcionalidad (Beutler *et al.*, 1992).

La distribución y frecuencia de las mutaciones encontradas en el gen *GBA* presentan grandes variaciones en función del origen étnico del grupo de pacientes de EG estudiado. Las mutaciones más frecuentemente detectadas son: c.115+1G>A (IVS2<sup>+1</sup>), c.84dupG (84GG), c.475C>T (R120W), c.680A>G (N188S), c.721G>A (G202R), c.754T>A (F213I), c.887G>A (R257Q),

c.1090G>A (G325R), c.1226A>G (N370S), c.1246G>A (G377S), c.1342G>C (D409H), c.1448T>C (L444P), c.1504C>T (R463C), c.1604G>A (R496H) y c.1263\_1317 (del55).

Cuatro de las mutaciones encontradas en el gen *GBA*, asociadas a la EG presentan una frecuencia elevada en todas las poblaciones de EG estudiadas: c.1226A>G (N370S), c.1448 T>C (L444P), c.84dupG (84GG) y c.115+1G>A (IVS2<sup>+1</sup>). Las mutaciones R463C, D409H y G377S también se han encontrado en varios grupos de pacientes con EG estudiados de manera independiente (Amaral *et al.*, 1999; Cormand *et al.*, 1995; Mistry *et al.*, 1992). En los pacientes de origen judío Ashkenazi las mutaciones más frecuentes son N370S y 84GG representando el 73% y el 11% respectivamente mientras que la IVS2+1 y V394L representan únicamente el 2% (Beutler *et al.*, 1991a; Zimran *et al.*, 1991). En población europea de origen no Ashkenazi, las mutaciones más frecuentes del gen *GBA* en orden decreciente son: L444P, N370S, R663C y recombinaciones genéticas entre el gen y el seudogén (Beutler, 2001; Cormand *et al.*, 1995; Sarria *et al.*, 1999). En los pacientes con EG tipo 3 de la región sueca de Norrbottnia se encuentra exclusivamente la mutación L444P.

Los estudios llevados a cabo en pacientes españoles demuestran que la mutación N370S es la más frecuente, con una prevalencia del 50%. La segunda mutación más frecuente es la L444P, que representa un 18%. Cuando se consideran ambas mutaciones juntas, suponen un 68% de los alelos mutados en España (Alfonso *et al.*, 2007). También se encuentran otras mutaciones en menor frecuencia: G377S, G202R, D409H, G195W, R47X, c.84-85insG y c.1263-1317del55, que constituyen conjuntamente con N370S y L444P, el 80% de las mutaciones en el gen de la glucocerebrosidasa en nuestra población (tabla 1.2) (Alfonso *et al.*, 2007; Alfonso *et al.*, 2001; Giraldo *et al.*, 2000; Torralba *et al.*, 2001).

**TABLA 1.2. Mutaciones del gen *GBA* descritas en pacientes españoles.**

Mutaciones	Referencia	Mutaciones	Referencia
<b>W(-4)X</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)	<b>E326K</b>	(Torralba <i>et al.</i> , 2001)
<b>Rec(int 2)</b>	(Cormand <i>et al.</i> , 2000)	<b>L336P</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)
<b>V15M</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)	<b>R359Q</b>	(Cormand <i>et al.</i> , 1996)

Mutaciones	Referencia	Mutaciones	Referencia
<b>R47X</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)	<b>S364R</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)
<b>IVS4<sup>2</sup>A&gt;G</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)	<b>S364N</b>	(Torralba <i>et al.</i> , 2001)
<b>G113E</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)	<b>1098insA</b>	(Cormand <i>et al.</i> , 1996)
<b>R120W</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)	<b>1214delGC</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)
<b>M123T</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)	<b>N370S</b>	(Cormand <i>et al.</i> , 1995)
<b>R131C</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)	<b>G377S</b>	(Sarria <i>et al.</i> , 1999)
<b>T134P</b>	(Sarria <i>et al.</i> , 1999)	<b>P391L</b>	(Torralba <i>et al.</i> , 2001)
<b>N188S</b>	(Torralba <i>et al.</i> , 2001)	<b>D409H</b>	(Cormand <i>et al.</i> , 1995)
<b>G195W</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)	<b>1263del55</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)
<b>G195E</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)	<b>L444P</b>	(Cormand <i>et al.</i> , 1995)
<b>G202R</b>	(Torralba <i>et al.</i> , 2001)	<b>1451delAC</b>	(Sarria <i>et al.</i> , 1999)
<b>R257X</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)	<b>R463C</b>	(Torralba <i>et al.</i> , 2001)
<b>R257Q</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)	<b>1510delTCT</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)
<b>P266L</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)	<b>1263del55 + RecTL</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)
<b>953delT</b>	(Alfonso <i>et al.</i> , 2001)	<b>Rec[1263del55,1342G&gt;C]</b>	(Sarria <i>et al.</i> , 1999)
<b>Y313H</b>	(Cormand <i>et al.</i> , 1996)	<b>RecNciI</b>	(Cormand <i>et al.</i> , 1995)
<b>G325W</b>	(Torralba <i>et al.</i> , 2001)		

Se pueden establecer relaciones entre el fenotipo y genotipo, teniendo en cuenta que existe una amplia variabilidad fenotípica entre los pacientes con idéntico genotipo, que está influenciada por otros factores no identificados de origen genético, epigenético y/o ambiental.

Los intentos de establecer correlaciones entre genotipos y manifestaciones clínicas han permitido llegar a algunas conclusiones:

- La homocigosidad para la mutación N370S en general excluye de la implicación neuronopática y da lugar a EG tipo 1 (Strasberg *et al.*, 1994).
- Los individuos heterocigotos compuestos portadores de un alelo N370S presentan una forma de la enfermedad más grave que los homocigotos N370S.

La mutación N370S tradicionalmente se ha considerado como protectora del daño neurológico, sin embargo, existen diversos estudios que demuestran que algunos pacientes que portan este alelo y han sido clasificados en el tipo 1, a lo largo del desarrollo de la enfermedad han manifestado alteraciones neuronopáticas y han tenido que ser reclasificados en el tipo 3 (Alfonso *et al.*, 2007; Capablo *et al.*, 2008). Aunque la mayoría de los pacientes con EG identificados como homocigotos para la mutación N370S presentarán una forma leve o incluso sin síntomas de la enfermedad, la mutación N370S en homocigosis no puede interpretarse sistemáticamente como enfermedad leve. Este genotipo es el que presenta mayores variaciones en la expresión clínica y cuando la enfermedad se comporta como una forma grave es aconsejable buscar una mutación compleja asociada a N370S.

- La mutación L444P, en homocigosis, generalmente predice el tipo 3 de la enfermedad con una gravedad variable. En la población sueca Norrbottnian es la variedad predominante, sin embargo, este mismo genotipo, no se ha asociado a expresión neuronopática en otras poblaciones estudiadas.
- En homocigotos para la mutación D409H se ha descrito un cuadro clínico que se engloba dentro de la EG tipo 3c y que se caracteriza por la asociación de manifestaciones neurológicas moderadas con presencia de calcificación valvular mitro-aórtica que produce insuficiencia aórtica moderada o estenosis aórtica grave susceptible de cirugía. Estas alteraciones se suelen detectar en edad adulta y en ocasiones se produce muerte súbita por fallo cardíaco.

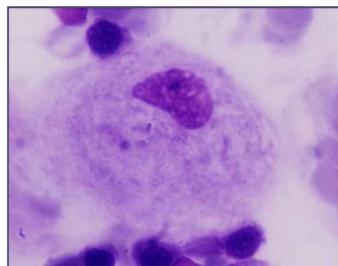
La correlación fenotipo-genotipo en otras mutaciones ha sido mas difícil de interpretar (Alfonso *et al.*, 2007).

También se ha observado que pacientes pertenecientes a la misma familia (incluso se ha descrito un caso en gemelos monocigotos) pueden presentar grandes variaciones intrafamiliares en cuanto a las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Mistry, 1995). Esto refuerza la teoría de que otros factores epigenéticos y/o ambientales, contribuyen a la expresión fenotípica.

### 1.1.9. Diagnóstico

La EG en nuestro medio se diagnostica con frecuencia por morfología, visualizando las células de Gaucher (figura 1.6) en aspirados de MO, hígado o bazo. Citológicamente, se observan unas células espumosas cuyo tamaño varía entre 20 y 100  $\mu\text{m}$ , con una relación núcleo-citoplasmática muy baja. El núcleo, generalmente único, se sitúa en posición excéntrica. La cromatina nuclear es la propia de un elemento maduro y a menudo presenta rasgos de degeneración picnótica. Aunque pueden observarse nucleolos, no son frecuentes. El citoplasma es amplio, de contornos poco definidos y presenta un patrón estriado o fibrilar que se ha descrito clásicamente como papel de pergamino arrugado en las células más maduras (Sloan, 1974). No existen técnicas citoquímicas capaces de teñir específicamente los lípidos de acúmulo en las CG. Estos elementos son fuertemente positivos con las técnicas del PAS (ácido peryódico-Shiff, resistente a la acción de la diastasa), fosfatasa ácida (tartrato resistente) y alfa-naftil-butirato-esterasa (inhibida parcialmente por fluoruro sódico). Además, se confirma la filiación de la CG al sistema mononuclear fagocítico, mediante marcadores de superficie (lisozima y CD68). Sin embargo, la identificación inequívoca de CG presenta dificultades debido tanto a la distribución no uniforme de CG en el tejido observado como a la posibilidad de confusión al identificar las CG ya que en otras entidades, como leucemias o infecciones, se han encontrado células muy similares (Dunn *et al.*, 2005; Shenjere *et al.*, 2008).

**FIGURA 1.6. Célula de Gaucher.**



La microscopía electrónica revela un citoplasma repleto de vesículas dilatadas, rodeadas de membrana, que contienen estructuras características de aspecto tubular, postuladas como la polimerización del glucocerebrósido. Estos aspectos morfológicos permiten diferenciarlas de los macrófagos gigantes que se observan en otros procesos patológicos (Giraldo *et al.*, 2003; Hibbs *et al.*, 1970; Lee, 1982).

Actualmente el diagnóstico de certeza se realiza demostrando la deficiencia en la actividad de la enzima glucocerebrosidasa. Se pueden determinar los niveles de GC en leucocitos de sangre periférica, fibroblastos dérmicos cultivados, células del líquido amniótico o vellosidades coriales (permitiendo la realización del diagnóstico prenatal de la EG). La determinación de la actividad enzimática de la GC se realiza mediante un protocolo similar al descrito en 1980 por Raghavan *et al.* El análisis se basa en la incubación del sustrato artificial 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucósido (4-Mu-Glu) con extractos sonicados de leucocitos. La enzima actúa sobre el sustrato artificial (4-Mu-Glu) liberando 4-metilumbeliferona (4-Mu), que es un compuesto fluorogénico. La fluorescencia generada es directamente proporcional a la actividad enzimática de la GC presente en los extractos celulares (Beutler and Kuhl, 1970a; Daniels *et al.*, 1981). Para un análisis correcto de la actividad de la GC, se debe tener en cuenta la naturaleza hidrofóbica de la enzima (siendo necesario el uso de detergentes en el ensayo) y que se trata de una glicoproteína estrechamente ligada a la membrana cuyas propiedades catalíticas fisiológicas dependen de la presencia de activadores (SapC) y del pH intralisosomal (Beutler and Kuhl, 1970b; Dale *et al.*, 1976; Qi and Grabowski, 1998; Raghavan *et al.*, 1980; Wenger *et al.*, 1983).

De este modo, se detecta tanto a los afectados de enfermedad de Gaucher, que poseen niveles residuales de actividad inferiores al 15% de la actividad presente en sujetos sanos, como a los heterocigotos portadores, que poseen una actividad enzimática reducida aproximadamente en un 50% (Beutler and Kuhl, 1970b; Mistry and Abrahamov, 1997). Sin embargo, este procedimiento no permite establecer de forma definitiva el diagnóstico de portador de enfermedad de Gaucher puesto que la actividad enzimática de la GC observada en un sujeto portador puede solaparse con la encontrada en sujetos sanos. Por ello, para el diagnóstico de portador se requiere la identificación de la mutación en el gen *GBA*.

La determinación de la GC lisosomal leucocitaria permite establecer el diagnóstico de forma rápida e independientemente de la mutación causante, pero no permite distinguir entre los distintas formas clínicas, la gravedad o los órganos implicados (Giraldo *et al.*, 2003).

### 1.1.10. Biomarcadores

Tras el diagnóstico de la enfermedad, existen biomarcadores que permiten definir su evolución y el grado de respuesta al tratamiento. Entre ellos se encuentran la quitotriosidasa (QT), CCL-18/PARC, fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), la enzima convertidora de angiotensina (ECA),  $\beta$ -hexosaminidasa y el cociente glucosil/lactosilceramida. Los más utilizados en la práctica clínica son los tres primeros.

La quitotriosidasa es una enzima con actividad quitinolítica que es secretada en grandes cantidades por los macrófagos activados. La actividad de la QT humana se encuentra elevada en varias enfermedades en las que está implicado el sistema monocito-macrófago, sin embargo este aumento de actividad no es tan acusado como en la EG, donde la actividad plasmática está aumentada entre 300 y 600 veces. Por lo tanto, esta enzima constituye un buen marcador para el diagnóstico y el seguimiento de la EG, y es útil en la monitorización del tratamiento. Existen un gran inconveniente en la utilidad de esta enzima como marcador. Aproximadamente el 6% de la población caucásica presenta un defecto autosómico recesivo en el gen que codifica esta enzima. En el exón 10 del gen que codifica la QT es frecuente que se produzca una duplicación de 24 pares de bases que produce un ajuste o "splicing" alternativo que se traduce en la producción de proteína que carece del centro activo, lo que origina la ausencia total de actividad enzimática. Se ha demostrado que esta duplicación en el gen de QT se encuentra presente en todas las poblaciones y que el 35% de la población es portadora de la misma, presentando una disminución del 50% en la actividad plasmática de QT frente a los individuos que no presentan este defecto (Giraldo *et al.*, 2001; Hollak *et al.*, 1994).

La citoquina CCL18/PARC también es útil en la monitorización de la eficacia del tratamiento de la enfermedad y ayuda en el diagnóstico de la EG. Se encuentra 30 veces más elevada en pacientes con EG con respecto a los sujetos sanos. El aumento de sus niveles plasmáticos es más elevado que el de otros biomarcadores como ECA, hexosaminidasa y TRAP. La QT presenta un aumento mucho más acusado que la citoquina CCL18/PARC en los pacientes sintomáticos, pero la monitorización de los niveles en plasma de CCL18/PARC constituye una alternativa para aquellos pacientes que presenten mutación en el gen de la QT. La concentración plasmática disminuye a lo largo del tratamiento al igual que lo hace la actividad QT. En la actualidad se estudia la evolución de ambos biomarcadores como parte del seguimiento del tratamiento de los pacientes. Como en el caso de la QT, la CCL18/PARC no

esta relacionada con la clínica que pueda presentar el paciente ni puede ser criterio de clasificación en uno de los tipos de la enfermedad (Boot *et al.*, 2004).

La actividad de la fosfatasa ácida está aumentada en el plasma de los pacientes con la EG, más concretamente la isoenzima 5B, fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP). Por lo tanto la determinación específica de los niveles plasmáticos de esta isoenzima puede ser útil para el diagnóstico aunque no es específica de la EG (Boot *et al.*, 2004; Giraldo *et al.*, 2003). En la monitorización de la respuesta al tratamiento es considerado como uno de los biomarcadores menos específico y de menor valor informativo (Alfonso *et al.*, 2007).

### 1.1.11. Tratamiento

Hasta 1991 el tratamiento clásico de la EG era exclusivamente sintomático. A partir de los trabajos de los investigadores del National Institute of Health (NIH), encabezados por el Dr. Brady, los pacientes han podido beneficiarse de una terapia realmente eficaz, que corrige buena parte de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y conlleva mejoría en los estándares de calidad de vida. El tratamiento sintomático de la enfermedad ósea y de las alteraciones hematológicas constituye un punto importante de actuación ya que son causantes de la sintomatología aguda más acusada.

Dentro del tratamiento médico en la enfermedad ósea hay que tener en cuenta que el paciente con EG puede presentar, aunque sea de forma esporádica, crisis de dolor óseo y dolor crónico o agudo secundario a una fractura o infarto óseo. La administración de bifosfonatos ha demostrado una buena eficacia terapéutica en estos enfermos, mejorando la densidad ósea por inhibición de la resorción ósea (Bembi *et al.*, 1994; Samuel *et al.*, 1994). La calidad de vida de los pacientes con EG con deterioro articular por osteonecrosis o artropatía inflamatoria puede mejorar considerablemente si se someten a una intervención de cirugía ortopédica específica a cada caso (Goldblatt *et al.*, 1988).

Existen cuatro líneas específicas para el tratamiento de las enfermedades de depósito lisosomal (Futerman *et al.*, 2004):

- Tratamiento enzimático sustitutivo (TES): El TES se basa en la administración de un análogo de la enzima deficiente, de manera que el sustrato continúa su proceso catalítico y se evita su acumulación. En la EG este constituye el tratamiento de elección modificando de

forma radical el perfil clínico de los pacientes, pasando de sintomáticos a oligo o asintomáticos (Barton *et al.*, 1991). Existen unas recomendaciones terapéuticas establecidas por el Grupo Europeo de Enfermedad de Gaucher (EWGGD) (Pastores *et al.*, 2004) que indican que el tratamiento debe comenzar en los pacientes sintomáticos que presenten visceromegalias con citopenias, afectación ósea o afectación pulmonar, es obligado en niños al diagnóstico antes de que desarrollen síntomas y debe ser considerado en pacientes asintomáticos que manifiesten signos de progresión de la enfermedad a nivel visceral u óseo (Carcelén, 1999).

- *Alglucerasa (Ceredase®)*: Fue el primer fármaco utilizado. Semisintético, obtenido a partir de la modificación de la GC de origen placentario. Tras un complejo proceso de extracción y purificación, se produce la modificación de las cadenas de oligosacáridos conduciendo a la exposición de residuos de manosa que posibilitan la incorporación del fármaco a los lisosomas, a través del reconocimiento específico por los receptores para manosa (“scavenger receptor”) de la membrana de los macrófagos. Debido a que su obtención a partir de placenta humana, presentaba cierto riesgo de contaminación vírica, por lo que ha retirado del mercado internacional siendo sustituido por el producto recombinante (Giraldo *et al.*, 2003).
  - *Imiglucerasa (Cerezyme®)*: Producido por ingeniería genética, en cultivo de células CHO (ovario de hamster chino). Es una glicoproteína monómerica de 497 aminoácidos que difiere de la *Alglucerasa* en el aminoácido localizado en la posición 495 donde la histidina es sustituida por arginina.
  - *Velaglucerasa*: Producido por ingeniería genética, en cultivo de fibroblastos humanos. Es una glicoproteína monomérica de aproximadamente 63 kD. Los estudios clínicos fase III han finalizado demostrando *Velaglucerasa* eficacia y seguridad.
  - *Taliglucerasa alfa*: Enzima recombinante producida por ingeniería genética en células vegetales. Los ensayos clínicos fase III ya han finalizado y el fármaco está pendiente de aprobación por la EMEA (Agencia Europea del Medicamento). A diferencia de otras enzimas, tiene una vida media mas prolongada en plasma y la producción en células vegetales evita la contaminación por gérmenes que afectan a las células de mamífero.
- Terapia de reducción de sustrato (TRS): Esta basada en reducción de la acumulación de sustrato mediante la inhibición enzimática de su síntesis. Desde 2002 se dispone en Europa de una pequeña molécula, activa por vía oral, un iminoazúcar análogo de la glucosa, N-butideoxinojirimicina (nomenclatura IUPAC: 1-butil-2-(hidroximetil) piperidina-3,4,5-triol), inhibidor de la glucosilceramida sintetasa o ceramida glucosiltransferasa, que disminuye la

síntesis y formación de glucocerebrósidos, ya que interviene en los primeros pasos de la ruta de biosíntesis de los glucoesfingolípidos (581 PA, (Connock *et al.*, 2006). En España se ha comercializado con el nombre de *Miglustat* (*Zavesca*®), y con la indicación de tratamiento para pacientes sintomáticos con enfermedad leve o moderada que no desean o no pueden recibir TES. Es un tratamiento eficaz con la ventaja de la administración oral y la posibilidad de acceder a lugares como el hueso donde la enzima recombinante llega con mayor dificultad. Como inconveniente tiene algunos efectos gastrointestinales adversos, derivados de la competencia con las disacaridasas intestinales e induce irritación de la pared intestinal produciendo como consecuencia flatulencia y diarrea controlables con dieta pobre en hidratos de carbono. También se encuentra en ensayo clínico fase III otra pequeña molécula inhibidora de sustrato que es un análogo de ceramida (*Eliglustat: GENZ-112638*), los resultados preliminares del estudio en fase II ya han sido publicados (Lukina *et al.*), todavía pendiente de conocer su eficacia y seguridad en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.

- Aumento de actividad del enzima: El objetivo es aumentar la actividad residual enzimática con pequeñas moléculas (chaperonas farmacológicas) cuyo mecanismo de acción consiste en reconformar la molécula de enzima residual para que sea más activa. Estas moléculas consiguen el correcto plegamiento de la enzima en el retículo endoplasmático que permite el transporte al aparato de Golgi y, por último, la internalización de la glucocerebrosidasa en el lisosoma. La ventaja de esta aproximación terapéutica, además de ser activa por vía oral, es aplicable a cualquier enzima defectuosa y evita la posible contribución de las citoquinas proinflamatorias que parecen jugar un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad (Grabowski, 2008b; Lieberman *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2007). La propiedad restrictiva de la microcirculación cerebral que constituye la BHE impide que la enzima llegue al SNC por la vía circulatoria. Así, el curso de la enfermedad neurológica en los subtipos de EG asociados a afectación primaria del SNC en principio no se modifica con el TES. El TRS junto con las terapias con chaperonas farmacológicas, que permiten aumentar la actividad de la enzima, pueden ser una nueva opción terapéutica para los pacientes de EG con afectación del SNC. Existen estudios en modelos animales de enfermedades lisosomales que indican que una pequeña porción del fármaco inhibidor de la síntesis de sustrato atraviesa la BHE y previene la acumulación cerebral de esfingolípidos, con el beneficio potencial de mejorar los síntomas neurológicos de los pacientes con EG (Connock *et al.*, 2006; Giraldo *et al.*, 2003).

- Transplante de precursores hematopoyéticos: Los síntomas de la EG pueden ser mitigados mediante el reemplazamiento de células madre hematopoyéticas defectuosas del paciente por las de otro individuo, ya que el fenotipo de la EG es consecuencia, en gran medida, de las anomalías en la funcionalidad de los macrófagos. Aunque la respuesta es satisfactoria entre los pacientes que se han sometido a un transplante de MO, la eficacia viene condicionada por la disponibilidad de donante sano histocompatible y la dificultad para que se mantenga el injerto, además de la comorbilidad asociada al procedimiento (Hobbs, 1987; Rapoport and Ginns, 1984).
- Terapia génica: Esta aproximación terapéutica resultó muy atractiva hace unos años, ya que, teóricamente, supone la posibilidad de modificar el defecto genético para recuperar la funcionalidad del gen y por tanto normalizar la actividad enzimática. La terapia génica consiste en sustituir la fracción del gen que sufre la mutación mediante el transplante autólogo de células madre hematopoyéticas transformadas. Las células madre hematopoyéticas del paciente con EG son transducidas *ex vivo* mediante retrovirus; los clones que expresen la GC son seleccionados y autotransplantados al mismo sujeto. La transferencia de una GC funcional y estable a fibroblastos y linfoblastos transformados usando un vector retroviral ha sido realizada, aunque la transferencia en células madre hematopoyéticas es mucho más complicada (Choudary *et al.*, 1986a; Choudary *et al.*, 1986b; Sorge *et al.*, 1987). En la actualidad se encuentra en desarrollo (Connock *et al.*, 2006).

## 1.2. ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo crónico del sistema extrapiramidal, causado por una disfunción del sistema dopaminérgico nigroestriatal, cuyas manifestaciones clínicas cardinales son la acinesia-bradicinesia, el temblor de reposo, la rigidez y los trastornos de fijación postural, equilibrio y enderezamiento.

### 1.2.1. Antecedentes históricos

La enfermedad de Parkinson, aunque dada a conocer a principios del siglo XIX, tiene una larga historia. Existen referencias acerca de la EP que hacen suponer que esta dolencia existe desde tiempos remotos (García Ruiz, 2004; Stern, 1989), pero es a partir del tratado escrito por el

médico inglés James Parkinson en 1817 “An Essay on the shaking palsy” (Eyles, 1955) cuando realmente sale a la luz esta enfermedad. James Parkinson describió el trastorno neurológico, según sus propias palabras, como una condición consistente en “*movimientos involuntarios de carácter tembloroso, con disminución de la potencia muscular, que afectan a partes que están en reposo y que incluso provocan una tendencia a la inclinación del cuerpo hacia delante y a una forma de caminar a pasos cortos y rápidos. Los sentidos y el intelecto permanecen inalterados*” (Goetz, 1986).

A partir de 1880, Jean-Marie Charcot, pilar de la neurología moderna, y Edme Felix Alfred Vulpian describieron por primera vez la rigidez asociada a la Parálisis Agitante y rebautizaron la “enfermedad de la Parálisis Agitante” como “enfermedad de Parkinson”, haciendo así honor al nombre de su colega inglés. Fue uno de los discípulos de Charcot, Edouard Brissaud, el primero que aludió a la afectación del mesencéfalo (Goetz, 1986; Stern, 1989).

A principios del siglo XX, en 1913, casi un siglo después de las observaciones de Parkinson, un patólogo alemán llamado Friederich Lewy, descubrió la presencia de inclusiones de estructura redondeada que se teñían de rosado en el citoplasma de las neuronas de pacientes fallecidos con EP y supuso que podían ser un marcador para la patología. En 1920, Tretiakoff descubrió que la lesión básica se asentaba en la despigmentación de la sustancia *nigra*, asociación que se confirmó posteriormente (Holdorff, 2002).

El gran paso para la comprensión de la enfermedad comienza en 1960, cuando Ehringer y Hornykiewicz hallan, en estudios *postmortem*, una marcada disminución de dopamina en el cuerpo estriado de cerebros de pacientes con EP idiopática y parkinsonismos postencefálicos, describiendo el déficit dopaminérgico estriatal como una de las principales causas de la EP (Foley, 2003). Este hallazgo fue crucial en la búsqueda de tratamientos efectivos para la enfermedad. Así, a finales de los años 60, George C. Cotzias *et al.* iniciaron la era moderna de la terapia parkinsoniana al introducir la administración de levodopa (L-DOPA), un precursor de la dopamina, en el tratamiento de la enfermedad, mejorando espectacularmente la sintomatología de los pacientes (Alonso Navarro *et al.*, 2008a; Fahn, 2005).

La etiología de la enfermedad ha sido ampliamente discutida a lo largo de la historia, atribuyéndose el origen de la EP a una gran diversidad de agentes etiológicos. El papel desempeñado por los factores genéticos en la etiología de la EP se convirtió en objeto de debate desde la primera descripción de Gowers, según el cual un número considerable de sus pacientes con EP, tenía antecedentes familiares (Gowers, 1902).

### 1.2.2. Epidemiología

La realización de estudios epidemiológicos en la enfermedad de Parkinson conlleva una gran dificultad debido a que el diagnóstico se apoya fundamentalmente en los datos clínicos. Debido a esto, la variación observada en la incidencia y prevalencia de la enfermedad en función del origen, edad, género y/o etnia de la población analizada, ha sido una fuente de controversia durante muchas décadas.

Aunque las tasas de prevalencia de la EP oscilan entre 18 y 418 por 100.000 habitantes en todo el mundo, el ajuste respecto a la edad y la restricción a los estudios que utilizan una metodología parecida reducen la variación entre las tasas de prevalencia a 102 - 190 por 100.000 habitantes, al menos en los países occidentales (Schrag).

En España, la incidencia de la EP en población general se calcula en 4,5-16 por 100.000 habitantes y año, con una prevalencia entre 18-328 por 100.000 habitantes, aunque se han realizado numerosos estudios epidemiológicos que arrojan diferentes resultados en cuanto a la incidencia y prevalencia de la EP (Alonso Navarro *et al.*, 2008b). La gran disparidad de cifras, parece motivada tanto por la metodología de los estudios (estudios puerta a puerta, estimaciones según el consumo de fármacos y registros hospitalarios, entre otros), como por la inclusión de todos los síndromes parkinsonianos, no sólo los referidos a la enfermedad de Parkinson. Concretamente, en la comunidad autónoma de Aragón, se ha encontrado una prevalencia de 121,9 por 100.000 habitantes, que alcanza unos niveles similares a los descritos en otras poblaciones caucásicas (Errea *et al.*, 1999).

La incidencia y prevalencia de la EP son dependientes de la edad. En población general la incidencia es de 0,3%, mientras que ésta alcanza el 3% en los mayores de 65 años (Disponible en: [www.feeneurologia.com](http://www.feeneurologia.com), [consultado 03/06/07]).

Algunos estudios epidemiológicos realizados concluyen que el género no influye en el riesgo de desarrollar enfermedad de Parkinson (Alonso Navarro *et al.*, 2008b; de Rijk *et al.*, 1995). Sin embargo, en la mayoría de los estudios revisados existe una mayor incidencia de la enfermedad para los individuos de género masculino (Farrer, 2006; Tanner and Goldman, 1996; Van Den Eeden *et al.*, 2003; Vines *et al.*, 1999). La incidencia alcanza 19,0 por 100,000 varones (95% CI: 16,1 – 21,8), mientras que se estima en 9,9 por 100,000 mujeres (95% CI: 7,6 - 12,2) (Van Den Eeden *et al.*, 2003).

Existen numerosos estudios encaminados hacia la búsqueda de una relación etiológica entre posibles factores ambientales y la aparición de EP. Entre los distintos factores ambientales que se han barajado como posible causa de la EP se encuentra el contacto con agentes tóxicos como los pesticidas o tóxicos industriales. Cabe destacar entre todos ellos la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). La aparición de cuadros de parkinsonismo secundarios a la intoxicación con MPTP supuso el punto de partida de la hipótesis tóxico-ambiental en la génesis de la enfermedad. Los primeros casos de parkinsonismo en intoxicados por MPTP fueron descritos en 1983 (Langston *et al.*, 1983; Langston and Ballard, 1983). A excepción del rápido inicio de los síntomas, los pacientes presentaban un cuadro clínico similar al descrito en la enfermedad de Parkinson, con respuesta a L-DOPA y aparición de discinesias secundarias al tratamiento. El MPTP atraviesa la BHE fácilmente debido a su gran liposolubilidad y en las células gliales es oxidado y convertido, a través de la monoamino-oxidasa B, en 1-metil-4-fenil-piridinio (MPP+), que es la neurotoxina activa, siendo posteriormente recaptado por las neuronas nigroestriatales. El MPP+ se concentra en la mitocondria e inhibe al complejo I interfiriendo en la síntesis de ATP con el consiguiente fallo energético celular que conduce de forma inexorable a la muerte neuronal.

No se ha demostrado la existencia de un tóxico ambiental específico como factor de riesgo común a los estudios realizados, aunque se ha demostrado en la mayoría de los estudios la asociación entre la exposición a pesticidas y el incremento del riesgo de padecer la enfermedad (Firestone *et al.*, 2005; Priyadarshi *et al.*, 2001; Tanner and Goldman, 1996). Se han demostrados casos de parkinsonismo inducido por solventes (Uitti *et al.*, 1994) y por pesticidas organofosforados (Bhatt *et al.*, 1999). También existen comunicaciones en la literatura que apuntan hacia la asociación entre la utilización de empastes dentales de amalgama de mercurio y la aparición de patologías neurológicas, entre las que se encuentra la EP (Lauterbach *et al.*, 2008; Ratcliffe *et al.*, 1996).

Así pues, la enfermedad de Parkinson constituye el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente, después de la enfermedad de Alzheimer. La EP es un trastorno que puede aparecer en cualquier segmento de la edad adulta, presentando el pico de mayor incidencia en la sexta década de la vida (Lees *et al.*, 2009), poco frecuente entre los 30 y 40 años y de aparición excepcional por debajo de los 30 años. Se considera EP de inicio precoz la que comienza antes de los 50 años (Clark *et al.*, 2007; Nichols *et al.*, 2009).

### 1.2.3. Genética en la enfermedad de Parkinson

La existencia de antecedentes familiares de EP o de temblor constituye el factor de riesgo principal, además del envejecimiento, para el desarrollo de EP. En los últimos años, la posibilidad de que existan factores genéticos predisponentes, o más aún, la posibilidad de que la enfermedad esté genéticamente determinada, ha propiciado el desarrollo de una intensa labor investigadora.

Diversos estudios de casos y controles han permitido identificar una historia de EP entre el 13% y el 33% de los casos (Bonifati *et al.*, 1995; Payami *et al.*, 1994), lo que supone que los familiares de pacientes con EP tienen un riesgo entre 3,5 y 14,6 veces mayor que los familiares de los controles para desarrollar la enfermedad. El patrón de herencia de muchos de estos casos es compatible con una herencia autosómica dominante con penetrancia reducida, siendo el riesgo máximo de desarrollar la enfermedad de un 20% para los familiares de primer grado (Payami *et al.*, 1994).

Algunos estudios han demostrado además la existencia de una anticipación genética, es decir, que la enfermedad tiende a aparecer en una edad más temprana en los descendientes (Bonifati *et al.*, 1995; Plante-Bordeneuve *et al.*, 1995). Sin embargo, no se han podido identificar rasgos clínicos diferenciadores entre los casos familiares y los esporádicos en la mayoría de estudios.

En contraposición a los resultados de los estudios de casos-controles, los estudios clínicos en gemelos no han sido capaces de concluir si los factores genéticos juegan algún papel en la EP (Johnson *et al.*, 1990; Vieregge *et al.*, 1992).

Se ha demostrado, sin embargo, la existencia de un vínculo entre la EP de tipo familiar y varios genes que confieren propensión a padecer la enfermedad. En el anexo II se muestran algunos de los genes más importantes que se han asociado con la enfermedad de Parkinson. Estos genes presentan herencia autosómica dominante, herencia autosómica recesiva o bien se comportan como factores genéticos de susceptibilidad para el desarrollo de la EP.

- Herencia autosómica dominante

- PARK1/ $\alpha$ -sinucleína y PARK4/ $\alpha$ -sinucleína

Los genes *PARK1*/ $\alpha$ -sinucleína y *PARK4*/ $\alpha$ -sinucleína están localizados en las regiones cromosómicas 4q21-q23 y 4p15, respectivamente. La  $\alpha$ -sinucleína está constituida por 140 aminoácidos. La proteína silvestre es un potente inhibidor de la fosfolipasa D2, que contribuye a diferentes funciones en la transducción de señales, en el tráfico de vesículas de membrana y en la dinámica del citoesqueleto. También es un inhibidor competitivo de la tirosin-hidrolasa, paso limitante en la biosíntesis de la tirosina a la L-DOPA. El equilibrio entre la  $\alpha$ -sinucleína asociada a lípidos y la citoplasmática proporciona un nexo entre la dinámica vesicular y la producción del neurotransmisor dopamina (Hope *et al.*, 2004).

Esta proteína se expresa en la totalidad del cerebro y tiene papeles potenciales en el aprendizaje, plasticidad sináptica, dinámica de las vesículas y la síntesis de la dopamina. Histoquímicamente, la proteína  $\alpha$ -sinucleína es el componente mayor de los cuerpos de Lewy y de las neuritas de Lewy, en la enfermedad de Parkinson y en otras  $\alpha$ -sinucleinopatías.

Las mutaciones puntuales, duplicaciones y triplicaciones en el gen de  $\alpha$ -sinucleína (*SNCA*) causan una forma dominante rara de la enfermedad de Parkinson en casos familiares y esporádicos. Las tres mutaciones puntuales encontradas en el gen *SNCA* (A53T, A30P y E46K) son extremadamente raras (Berg *et al.*, 2005).

Cabe destacar una comparación realizada en familias con duplicaciones y triplicaciones en el gen *SNCA* mostró que la dosis de este gen está directamente relacionada con la edad de inicio, la duración y la gravedad de la enfermedad (Hope *et al.*, 2004).

Los estudios en modelos de animales han sido esenciales para la comprensión de las funciones de la  $\alpha$ -sinucleína, observando que la sobreexpresión transgénica causa neurotoxicidad con acumulación y agregación de  $\alpha$ -sinucleína, mientras que la depleción total revela un fenotipo que no está asociado a ninguna neuropatología (Perez and Hastings, 2004).

- PARK8/Leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*)

Se trata de un gen de 144 Kb, situado en el cromosoma 12q12, con 51 exones que codifican a una proteína, también denominada dardarina, que consta de 2527 aminoácidos con múltiples dominios y explica más del 10% de los casos de enfermedad de Parkinson de herencia autosómica dominante y el 3,6% de los casos enfermedad de Parkinson esporádica.

Las mutaciones en el gen *LRRK2* se han asociado a parkinsonismo de herencia autosómica dominante, aunque también han aparecido en casos esporádicos.

La proteína *LRRK2* es una proteína predominantemente citoplasmática que puede estar asociada a diferentes orgánulos. A nivel proteico, la expresión de *LRRK2* se ha detectado tanto en cerebro como en otros órganos periféricos (Giasson *et al.*, 2006). La proteína se encuentra altamente expresada en las regiones dopaminérgicas del cerebro de mamíferos (Biskup *et al.*, 2006). A diferencia de la  $\alpha$ -sinucleína que tiñe los cuerpos de Lewy y la proteína Tau que tiñe los ovillos neurofibrilares, inmunohistoquímicamente la *LRRK2* no señala ninguna lesión neurodegenerativa específica. Se especula que la proteína puede jugar un papel importante en la regulación del crecimiento de neuritas, ya que una expresión disminuida en células cultivadas resulta en un incremento de la longitud y ramificación de las neuritas (MacLeod *et al.*, 2006).

Se han identificado unas 40 variantes diferentes de la proteína, la mayoría de ellas resultantes de mutaciones de cambio de aminoácido. La patogenicidad de muchas de estas variantes no está clara, debido a la reducida penetrancia de las mismas o a la ausencia de análisis de segregación por el inicio tardío de la enfermedad y la no disposición o desconocimiento de los genotipos familiares. Existen 5 mutaciones en el gen *LRRK2* que se consideran definitivamente patogénicas (R1441C, R1441G, Y1699C, G2019S e I2020T).

La mutación p.G2019S (c.6099G>A) es la más frecuente en población caucasiana, entre el 2 y el 8% de los casos familiares y entre el 0,5 y el 2% de los casos aparentemente esporádicos (Farrer *et al.*, 2005). También se ha observado la presencia de esta mutación en enfermedad de Parkinson de inicio temprano (< 50 años) (Tan *et al.*, 2008), así como en controles sanos (Farrer *et al.*, 2005). La prevalencia de esta mutación varía en función del grupo étnico en el que se realice el estudio.

- Herencia autosómica recesiva

Se han identificado tres formas de parkinsonismo de herencia autosómica recesiva que incluyen mutaciones homocigotas y heterocigotas compuestas en los genes que codifican parkina, oncogen DJ1 y quinasa 1 inducida por PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) (PINK1), entre otros (Bonifati *et al.*, 2003; Kitada *et al.*, 1998; Valente *et al.*, 2004). Todas son mutaciones raras, de pérdida de función que resultan en enfermedad de Parkinson de inicio temprano (generalmente, a edades inferiores a los 40 años) y con buena respuesta a L-DOPA y lenta progresión de la enfermedad (Mata *et al.*, 2004).

---

- PARK2/Parkina

El gen *PARK2* está localizado en el cromosoma 6q25.2-q27 y comprende 12 exones con estructura intrónica superexpandida de 1,3 Mb de DNA genómico, que codifica a una proteína de 465 aminoácidos con un dominio *N*-terminal parecido a la ubiquitina. La parkina tiene una función de E3 ligasa, marcando a las proteínas con ubiquitina para su posterior degradación por el proteosoma (Shimura *et al.*, 2000). Se han descrito al menos 57 mutaciones puntuales, pero también existen reordenamientos exónicos, deleciones y duplicaciones. Los datos epidemiológicos disponibles son limitados, pero indican que aproximadamente el 50 % de los casos familiares con inicio temprano (< 45 años), así como una proporción significativa de casos aparentemente esporádicos, son debidos a mutaciones en *PARK2*.

Los pacientes con deleciones exónicas homocigotas que tienen una pérdida completa de expresión de parkina muestran una pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra (Pramstaller *et al.*, 2005).

En estudios en modelos animales *knock-out* se observa la existencia una disfunción mitocondrial y un estrés oxidativo en la patogenia de la enfermedad. Por el contrario, la sobreexpresión en estos modelos parece tener un factor neuroprotector que indica que la regulación al alza de este gen podría ser utilizada en la terapia de la enfermedad (Greene *et al.*, 2005).

- PARK6/Quinasa 1 inducida por PTEN (*PINK1*)

Las mutaciones en este gen suponen entre el 1 – 2 % de los casos de inicio precoz de enfermedad de Parkinson (Hatano *et al.*, 2004).

El gen *PINK1*, localizado en 1p35-36, contiene 8 exones que se expanden a lo largo de 1,8 Kb y codifican una proteína de 581 aminoácidos (Valente *et al.*, 2004). Las mutaciones en el gen *PINK1* tienen efectos diferenciales en la estabilidad, localización y actividad quinasa de la proteína (Beilina *et al.*, 2005). En estudios con cultivos celulares, la proteína silvestre *PINK1* parece proteger a las neuronas de la disfunción mitocondrial y de la apoptosis inducida por el estrés (Deng *et al.*, 2005).

La neuropatología causada por las mutaciones en *PINK1* es desconocida y no existen casos de autopsia de pacientes con mutaciones en este gen, ni modelos animales para estudiar.

- PARK7/Oncogen *DJ1*

El gen *DJ1*, localizado en la región cromosómica 1p36, contiene 8 exones que se expanden en 24 Kb y está ubicado a 25 cM del telómero del gen *PINK1* (Bonifati *et al.*, 2003). Se han identificado deleciones y mutaciones de cambio de aminoácido que causan < 1% del parkinsonismo de inicio precoz (Lockhart *et al.*, 2004).

La proteína *DJ1*, de 189 aminoácidos, es un miembro de la familia de las chaperonas moleculares ThiJ/PfpI, que son inducidas durante el estrés oxidativo. En ratones, *DJ1* parece tener un papel esencial en la transmisión neuronal dopaminérgica. El ratón *knock-out* para *DJ1* muestra una mayor sensibilidad al estrés oxidativo, mientras que la sobreexpresión proporciona un efecto protector (Goldberg *et al.*, 2005).

- Factores de susceptibilidad genética en enfermedad de Parkinson: Gen de la glucocerebrosidasa (*GBA*) y gen de la apolipoproteína E

Las formas monogénicas representan menos del 10% de enfermedad de Parkinson en la mayoría de las poblaciones, son el resultado de complejas interacciones entre genes y factores ambientales. Por lo tanto, las variaciones genéticas deben ser factores de susceptibilidad o modificadores de la enfermedad, afectando a la penetrancia, edad de inicio, gravedad y progresión.

Como se ha comentado anteriormente, investigaciones previas muestran una asociación entre entre las mutaciones en el gen *GBA*, responsable de la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Parkinson, sugiriendo que las mutaciones en el gen de la *GBA* pueden ser consideradas un factor de riesgo para el desarrollo de EP. Dado que la gran mayoría de pacientes con enfermedad de Gaucher y portadores heterocigotos de mutaciones en el gen *GBA* no desarrollan parkinsonismo, las mutaciones en el gen *GBA* podrían constituir un factor de riesgo en individuos que tienen otros factores de predisposición a la enfermedad de Parkinson (Goker-Alpan *et al.*, 2004) o un factor de susceptibilidad genética para la enfermedad de Parkinson familiar de inicio precoz.

En cuanto a la apolipoproteína E, es una proteína monomérica constituida por 299 residuos, codificados por 4 exones. Presenta dos dominios plegados de forma independiente: uno N-terminal que se une con firmeza al receptor de LDL pero sólo en forma débil a un lípido, y uno C-terminal que se une a la superficie de las lipoproteínas pero carece de afinidad para el LDLR. Se trata de una proteína de síntesis hepática, cuyo papel fundamental es encargarse de la unión, la internalización y el catabolismo de quilomicrones y lipoproteínas por el hígado.

El gen que codifica para apolipoproteína E (*apoE*) es un gen polimórfico que está localizado en el brazo largo del cromosoma 19 en la región q13.2-q13.3. Los alelos  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  constituyen los polimorfismos más frecuentes encontrados en la población, codificando para tres isoformas (Emi *et al.*, 1988). Las isoformas difieren entre sí en la estructura primaria,

implicando un intercambio cisteína-arginina en los aminoácidos situados en las posiciones 112 y 158 de la proteína (Weisgraber *et al.*, 1981).

El alelo  $\epsilon 4$  de *apoE* implica una mayor susceptibilidad para el desarrollo de enfermedad de Alzheimer, asociándose con una edad de comienzo inferior. Dado que la enfermedad de Parkinson comparte características biológicas, clínicas y patológicas con la enfermedad de Alzheimer, varios autores sugieren una posible asociación entre el gen *apoE* y la EP (Huang *et al.*, 2006; Koller *et al.*, 1995).

Respecto a la asociación entre un determinado genotipo *apoE* y un aumento en el riesgo de desarrollar EP, existen discrepancias entre los diferentes estudios realizados, que se contradicen con frecuencia (Huang *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004). Huang *et al.* (2004) sugieren que el alelo  $\epsilon 2$  puede constituir un factor de riesgo para la enfermedad de Parkinson, mientras que otros autores atribuyen un mayor riesgo de EP asociado al alelo  $\epsilon 4$  (Caselli *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2006; Parsian *et al.*, 2002), concretamente con el riesgo de demencia en la enfermedad de Parkinson (Koller *et al.*, 1995; Marder *et al.*, 1994; Parsian *et al.*, 2002).

#### 1.2.4. Anatomía funcional de los ganglios basales y fisiopatología de la enfermedad de Parkinson

Los ganglios basales comprenden un grupo de núcleos subcorticales, situados en la base del cerebro, relacionados directamente con el inicio y el control de los movimientos voluntarios, así como el aprendizaje procedimental y acciones cognitivas y emocionales. Dentro de los circuitos de los ganglios basales se pueden incluir los núcleos con una relación anatómica clásica (el neostriado: que comprende el núcleo caudado, el putamen y el núcleo *accumbens*; el paleostriado: que comprende el globo pálido interno y el globo pálido externo, y además añadir núcleos suplementarios con una relación funcional (el núcleo subtalámico; la sustancia negra *pars compacta*; la sustancia negra *pars reticulata*; el área tegmental ventral y el área peri y retrorrubral; los núcleos talámicos, el colículo superior, y el núcleo pedunculopontino y el área motora mesopontina).

Se establecen numerosas conexiones entre los distintos núcleos que componen los ganglios basales de manera que se forman grandes redes neuronales subcorticales.

Los dos núcleos efectores por excelencia de los ganglios basales son el globo pálido interno y la sustancia negra *pars reticulata*, mientras que el estriado es la principal estructura aferente junto con el núcleo subtalámico.

Las proyecciones más numerosas que recibe el estriado son las aferencias desde el manto cortical y desde la sustancia negra de la *pars compacta*, localizada en el mesencéfalo ventral. Las proyecciones corticoestriatales son excitatorias y mediadas por ácido glutámico (Parent *et al.*, 1995; Parent and Hazrati, 1995). Las conexiones aferentes desde la sustancia negra de la *pars compacta* utilizan como neurotransmisor la dopamina y proyectan de forma topográfica hacia el caudado y al putamen, pero no al núcleo *accumbens*. La proyección dopaminérgica al núcleo *accumbens* se origina en el área tegmental ventral. Otras proyecciones aferentes al estriado se originan en los núcleos talámicos intralaminares, centromediano y parafascicular, y en menor grado proceden de los núcleos ventral anterior, ventral lateral, mediodorsal y posteriores. Su neurotransmisor, al igual que el de las fibras talamocorticales, es el ácido glutámico excitador, aunque la actividad de las proyecciones está mediada por diferentes neuropéptidos. Otros núcleos que proyectan al estriado son: desde el tronco del encéfalo, además de la sustancia negra de la *pars compacta*, el núcleo dorsal del *raphe*, el núcleo pedunculopontino, y el locus *coeruleus*; el globo pálido y el núcleo subtalámico también proyectan al estriado, aunque en menor intensidad.

Tanto el globo pálido externo como el globo pálido interno reciben proyecciones del estriado, del núcleo subtalámico, de la sustancia negra de la *pars compacta* y del área tegmental ventral, del núcleo dorsal del *raphe* y del núcleo pedunculopontino (Parent and Hazrati, 1993). Las conexiones aferentes más numerosas se originan en el estriado. La transmisión eferente de las conexiones estriatales está mediada por el neurotransmisor ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), esta proyección inhibe la actividad de las neuronas palidales, mientras que las proyecciones que se reciben desde el núcleo subtalámico son glutamatérgicas excitatorias. Todas las proyecciones desde el globo pálido externo y globo pálido interno son de naturaleza fundamentalmente gabérgica e inhiben los núcleos diana donde proyectan (Parent and Hazrati, 1995).

La sustancia negra está situada en el mesencéfalo ventral y se divide en dos partes denominadas *pars compacta* y *pars reticulata*. Las neuronas de la *pars compacta* son dopaminérgicas, mientras que las neuronas de la *pars reticulata* son gabérgicas inhibitoras. Las proyecciones aferentes de la sustancia negra *pars compacta* más numerosas proceden desde la corteza prefrontal, del núcleo *accumbens*, del núcleo pedunculopontino, del núcleo subtalámico

y del globo pálido. La principal eferencia de la *pars compacta* origina el sistema de proyección dopaminérgico nigroestriado.

Sobre la base de proyecciones aferentes y eferentes de los diferentes núcleos de los ganglios basales y las características neuroquímicas de cada uno de ellos, pueden establecerse tres circuitos básicos diferentes e interrelacionados:

- Circuito hiperdirecto (corteza cerebral - núcleo subtalámico - globo pálido interno/sustancia negra *pars reticulata*). La activación de esta vía produce una activación del núcleo subtalámico y, en consecuencia, de las neuronas del globo pálido interno y de la sustancia negra *pars reticulata*.
- Circuito directo (estriado - globo pálido interno/sustancia negra *pars reticulata*). Esta vía se origina en las neuronas de proyección estriatales gabérgicas que colocalizan con sustancia P y dinorfina y expresan primordialmente el receptor de dopamina excitador D1. La activación de esta vía inhibe a las neuronas del globo pálido interno y a las de la sustancia negra *pars reticulata*.
- Circuito indirecto (estriado - globo pálido externo - núcleo subtalámico - globo pálido interno/sustancia negra *pars reticulata*). Esta vía tiene su origen en las neuronas de proyección estriatales gabérgicas colocalizadas con metencefalinas (o preproencefalina) y que expresan los receptores de dopamina inhibidores D2; éstas proyectan al globo pálido externo y lo inhiben, y éste, a su vez, proyecta al núcleo subtalámico y por medio de las vías subtalamopalidales hacia el globo pálido interno y la sustancia negra *pars reticulata*. Las neuronas del globo pálido externo son gabérgicas inhibitoras, mientras que las neuronas del núcleo subtalámico contienen glutamato, resultando en una conexión excitadora glutamatérgica.

Las eferencias de los núcleos de salida de los ganglios basales (globo pálido interno y sustancia negra *pars reticulata*) se dirigen fundamentalmente hacia los núcleos talámicos ventrales (ventral anterior y ventrolateral, respectivamente) y dorsomedial. Otras eferencias del globo pálido interno y de la sustancia negra *pars reticulata* se dirigen al núcleo pedunculopontino y hacia el colículo superior. Los núcleos del tálamo proyectan a su vez hacia la corteza prefrontal y a la corteza motora (promotora). La vía talamocortical es excitadora y utiliza como neurotransmisor el ácido glutámico. De esta forma se cierra el circuito que, iniciándose en la corteza cerebral, transmite información a través de los ganglios basales y termina nuevamente en la corteza cerebral (Herrero *et al.*, 2008).

En consecuencia, el efecto neto de la estimulación de la vía directa a nivel del cuerpo estriado consiste en el incremento de la emisión de impulsos excitadores del tálamo a la corteza, mientras que la estimulación de la vía indirecta a nivel del cuerpo estriado reduce el flujo excitador desde el tálamo hacia la corteza cerebral.

Al realizar un movimiento voluntario, la influencia excitatoria de la corteza activa los tres circuitos. La activación del circuito directo da lugar a una inhibición del globo pálido interno y de la sustancia negra *pars reticulata*, disminuye la actividad tónica inhibitoria que ambos núcleos ejercen sobre el tálamo, eliminando la inhibición de la acción deseada. Por el contrario, la activación de las vías indirecta e hiperdirecta actúa para inhibir los programas competitivos que entorpecen la realización de la acción deseada.

Por tanto, la dopamina se descarga en el cuerpo estriado, tendiendo a incrementar la actividad de la vía directa y reducir la de la vía indirecta.

Los ganglios basales se pueden considerar como un regulador del flujo de información desde la corteza cerebral hacia las neuronas motoras de la médula espinal. La vía dopaminérgica nigroestriatal ejerce un control modulador sobre la actividad estriatal, de hecho, la expresión de neuropéptidos en el estriado y sus áreas de proyección se encuentran reguladas por las aferencias dopaminérgicas.

La depleción dopaminérgica provocada por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de la *pars compacta*, induce importantes alteraciones en el funcionamiento de los ganglios basales, que se traducen en claras manifestaciones motoras y en cambios en la actividad de descarga de los diferentes núcleos de los ganglios basales. El aspecto clave de este modelo de función de los ganglios basales, que explica los síntomas observados en la EP, es un desequilibrio entre la vía estriopálida directa y la vía indirecta, con un predominio de la vía indirecta, secundario a la pérdida de la inervación dopaminérgica. El déficit de dopamina provoca, en definitiva, una hiperactividad de las neuronas de salida de los ganglios basales (globo pálido interno y sustancia negra de la *pars reticulata*), por estar reducida la actividad inhibitoria de las neuronas de proyección estriatales gabérgicas (que colocalizan con sustancia P y dinorfina). Además, en paralelo, el déficit de dopamina conduce a una excesiva inhibición de las neuronas del globo pálido externo inducida por una hiperactividad de las neuronas de proyección estriatales gabérgicas (que colocalizan metencefalina), provocando la inhibición de las neuronas del globo pálido externo y, por tanto, la hiperactividad del núcleo

subtalámico. La hiperactividad de las neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico activa las neuronas del globo pálido interno y de la sustancia negra *pars reticulata*, las cuales inhiben a las neuronas talamocorticales y evitan la liberación del movimiento deseado a nivel cortical (Albin *et al.*, 1989; Herrero *et al.*, 2008).

Como consecuencia de la degeneración del *locus niger* hay una reducción de la dopamina estriatal que fisiológicamente ejerce un efecto inhibitorio de las interneuronas estriatales que en parte son colinérgicas. Esta disfunción estriatal explica la mayoría de los síntomas de la enfermedad de Parkinson. La degeneración de otros sistemas ascendentes (noradrenérgicos, serotoninérgicos y colinérgicos) puede estar especialmente implicada en la aparición de estados depresivos y deterioro mental.

El sustrato anatomopatológico de la enfermedad viene condicionado por la despigmentación de sustancia negra en el mesencéfalo. Existe una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas pigmentadas de la *pars compacta* de la sustancia negra, con aparición de inclusiones eosinofílicas en el citoplasma de las neuronas que persisten, denominadas Cuerpos de Lewy (Gibb, 1992). Sin embargo, el proceso no se limita a la sustancia negra y la vía nigroestriatal; idénticas lesiones aparecen en otros núcleos pigmentados y no pigmentados del sistema nervioso, entre los que destacan los siguientes núcleos: núcleo dopaminérgico hipotalámico, sistema noradrenérgico, sistema serotoninérgico y sistema colinérgico (Forno, 1996). En la sustancia negra, las lesiones predominan en la porción ventral y lateral de la zona compacta (la que se proyecta preferentemente al putamen) y en menor grado en la porción dorsal.

Los cuerpos de Lewy contienen proteínas de neurofilamentos, ubiquitina y  $\alpha$ -sinucleína insoluble, que se encuentra habitualmente en forma soluble, por lo que su transformación y depósito puede constituir un factor patogénico importante en la EP (Spillantini *et al.*, 1997). Los cuerpos de Lewy se encuentran preferentemente en neuronas aminérgicas como las que se hallan en la sustancia negra y en el *locus coeruleus*, pero también pueden observarse en el córtex en neuronas que poseen terminaciones dopaminérgicas y que pertenecen al sistema mesocórtico-límbico. También se localizan en el núcleo basal de Meynert, que es colinérgico, y en los núcleos del *raphe*, que son serotoninérgicos, por lo que los cuerpos de Lewy no representan una anomalía del citoesqueleto específica de ningún sistema de neurotransmisión clásico. Finalmente se encuentran cuerpos de Lewy en el núcleo motor dorsal del vago, área tegmental, núcleo pedúnculo pontino, núcleo de Edinger-Westphal, hipotálamo, columna intermediolateral

de la médula, en los ganglios simpáticos y parasimpáticos, y en el plexo entérico. Dentro de un contexto clínico adecuado y en conjunción con el resto de hallazgos, los cuerpos de Lewy permiten realizar el diagnóstico de certeza de la EP (Fahn, 2003), sin embargo, los cuerpos de Lewy no deben considerarse patognomónicos de la EP, ya que se han descrito en otras enfermedades neurodegenerativas (Anexo III).

### 1.2.5. Clínica y diagnóstico

A pesar de los avances realizados en el conocimiento de la enfermedad no existen marcadores biológicos o técnicas de imagen de aplicación universal y con especificidad y sensibilidad suficientes para establecer un diagnóstico diferencial inequívoco, por lo que aún hoy en día el diagnóstico de la EP se realiza basándose en aspectos puramente clínicos.

Los síntomas que constituyen la base para el diagnóstico clínico de la patología son temblor de reposo, bradicinesia, rigidez y alteración de los reflejos posturales. La marcha a pequeños pasos, micrografía, pérdida de destreza manual, pérdida del braceo al andar, facies hipomímica, disartria y/o disfagia son algunas de las manifestaciones de la hipo/bradicinesia. La inestabilidad postural y los trastornos de la marcha tienen una etiología multifactorial y se relacionan con alteración de los reflejos de enderezamiento, rigidez y acinesia, entre otros. La marcha de los enfermos de EP es bastante típica: el enfermo tiene dificultad para iniciarla y finalmente consigue andar a pequeños pasos y con la típica postura parkinsoniana (postura en flexión del tronco) (Molina *et al.*, 2008).

Existen otra serie de manifestaciones no motoras en la EP entre las que se encuentran las alteraciones cognitivas, alteraciones psiquiátricas y del sueño (incluyendo la depresión, ansiedad, psicosis y alteraciones conductuales como trastornos habituales en la EP), alteraciones oculomotoras, alteraciones de la voz y el lenguaje, alteraciones del sistema nervioso autónomo que producen trastornos como el estreñimiento, la hiperhidrosis, la impotencia sexual y la urgencia miccional o incontinencia, alteraciones sensitivas y dolor, alteraciones dermatológicas y otros síntomas entre los que cabe destacar la alteración olfatoria padecida por estos pacientes (Biousse *et al.*, 2004; Goetz *et al.*, 1986; Hantz *et al.*, 1994; Hawkes and Shephard, 1993; Poewe, 2008).

El diagnóstico clínico de la enfermedad se refuerza con la existencia de una respuesta clínica significativa y mantenida al tratamiento con L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), precursor de la dopamina, deficitaria en esta enfermedad.

Diversos autores han formulado una serie de criterios diagnósticos de la EP (Calne *et al.*, 1992; Gelb *et al.*, 1999). En el anexo IV se muestran los criterios propuestos por la Parkinson's Disease Society Brain Bank de Londres (Hughes *et al.*, 1992).

Para facilitar el pronóstico, la progresión y la respuesta al tratamiento en la EP se han ideado varias escalas. La escala clásica de Hoehn y Yahr (Hoehn and Yahr, 1967) se desarrolló para proporcionar una idea global sobre el estado de gravedad del paciente con EP (Anexo V). Otra escala rápida para medir la capacidad funcional global y dependencia del paciente con EP es la de Schwab e England. Sin embargo, para una evaluación más detallada del paciente, se utilizan otras escalas como la Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) que permite seguir el curso longitudinal de la EP, o la Scales for Outcomes in Parkinson's Disease – Motor (SCOPA – Motor o SPES/SCOPA) cuyo objetivo es evaluar los signos motores, la capacidad funcional y las complicaciones motoras del Parkinson (Martínez Martín *et al.*, 2008).

La tomografía axial computerizada (TAC) y la resonancia magnética (RM) convencional contribuyen a la realización de un diagnóstico diferencial entre la enfermedad de Parkinson y otras patologías con las que comparte síntomas. Las pruebas de neuroimagen funcional: tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computerizada de emisión de fotones (SPECT) y ultrasonografía son herramientas de gran ayuda, pero dados su coste y disponibilidad, permanecen sólo como herramientas auxiliares que apoyan al diagnóstico (Molina *et al.*, 2008; Scherfler *et al.*, 2007; Seibyl *et al.*, 2004).

#### 1.2.6. Terapéutica farmacológica

El tratamiento actual de la EP es exclusivamente sintomático y destinado a mejorar la calidad de vida y la capacidad funcional de los pacientes. Desde el punto de visto terapéutico se busca un doble objetivo: frenar la evolución neuropatológica de la enfermedad y suplir el déficit bioquímico inducido por la pérdida neuronal. Hasta el momento actual, no existen evidencias suficientes que permitan afirmar que alguno de los tratamientos disponibles tiene un efecto neuroprotector en los pacientes parkinsonianos, de manera que el uso de fármacos se orienta a

terapias sustitutivas del déficit dopaminérgico. Se dispone de varias familias de fármacos, siendo variable el grado de mejoría alcanzado con los diversos fármacos empleados:

- Levodopa y fármacos dopaminérgicos: La L-DOPA constituye el tratamiento estándar de la enfermedad. Se trata de un precursor de la dopamina que se absorbe en el tracto gastrointestinal y atraviesa con facilidad la BHE. Este precursor es metabolizado a dopamina en los ganglios basales por la acción de la enzima DOPA-descarboxilasa y la catecol-orto-metil-transferasa (COMT), por lo que su administración a pacientes con EP corrige el déficit dopamínico que existe en el núcleo estriado. Los metabolitos resultantes son los causantes de los efectos secundarios sistémicos, por ello se administra asociada a un inhibidor específico de la DOPA-descarboxilasa (descarboxilasa periférica de los aminoácidos aromáticos) (*carbidopa* en Sinemet® y *benseracida* en Madopar®), que no atraviesa la BHE, permitiendo la biotransformación de L-DOPA en el cerebro pero evitando esta conversión en tejidos extracerebrales, reduciendo así los efectos secundarios cardiovasculares o gastrointestinales, frecuentes en el tratamiento con L-DOPA (Fahn *et al.*, 2004). El problema fundamental del tratamiento crónico con L-DOPA es el desarrollo de complicaciones motoras, fluctuaciones y discinesias. Durante los últimos años, se han desarrollado fármacos que aumentan la biodisponibilidad de dopamina a nivel central: la *selegilina* y la *rasagilina* (inhibidores de la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B) que bloquean la degradación metabólica de L-DOPA) (Parkison Study Group, 2002; Shoulson, 1998) y *tolcapona* y *entacapona* (inhibidores de la COMT) (Nutt and Fellman, 1984).
- Agonistas dopaminérgicos: Estos fármacos actúan estimulando directamente los receptores dopaminérgicos (*bromocriptina*, *lisuride*, *pergolida*, *cabergolina*, *ropirinol*, *pramiprexol* y *rotigotina*).
- Medicamentos anticolinérgicos: Corrigen la hiperfunción de las células colinérgicas del núcleo estriado y actúan bloqueando los receptores muscarínicos centrales. Se han utilizado en el tratamiento sintomático de la EP, sobre todo para controlar el temblor. Los anticolinérgicos más usados son *trihexifenidil*, *biperideno* y *prociclina*. Su utilización es cada vez más discutida (Vaamonde Gamo and Folores Barragán, 2008).
- Amantidina: El mecanismo de acción no está del todo claro. Bloquea los receptores del ácido N-metil-D-aspartato de glutamato y probablemente actúa a través de un mecanismo anticolinérgico; otros estudios sugieren que tiene un mecanismo de acción estimulador de liberación de dopamina (Horstink *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2004).
- Tratamiento quirúrgico: Las técnicas de cirugía funcional surgen debido a que una parte de los enfermos de EP no encuentra una respuesta adecuada a los tratamientos convencionales. Los procedimientos quirúrgicos para tratar la EP incluyen tres alternativas: ablación o

lesión, neuroestimulación y terapia regenerativa (celular y génica). Dado que la mayoría de las alteraciones presentes en la EP están ocasionadas por señales anormales emitidas desde los ganglios basales hacia la corteza motora, se han realizado numerosos intentos de tratar a estos pacientes mediante su bloqueo quirúrgico, provocando lesiones quirúrgicas en los núcleos ventrolateral y ventroanterior del tálamo. En cuanto a las técnicas de estimulación cerebral profunda, la neuroestimulación sobre el núcleo subtalámico ha terminado por imponerse en el tratamiento de la EP (Benabid *et al.*, 1991; Linazasoro *et al.*, 2002).



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

La enfermedad de Gaucher es una enfermedad de depósito lisosomal con un patrón de herencia autosómica recesiva, que es debida, en la mayoría de los casos, a variantes en el gen *GBA*, que codifica la enzima  $\beta$ -glucosidasa ácida o glucocerebrosidasa. La actividad deficiente de la glucocerebrosidasa resulta en la acumulación del material glucolipídico no degradado en el sistema retículoendotelial, principalmente en los macrófagos. Se trata de una enfermedad compleja, multisistémica y heterogénea en sus manifestaciones clínicas, que se caracteriza por la aparición de hepatomegalia y/o esplenomegalia, lesiones óseas, trastornos hematológicos, bioquímicos y afectación neurológica (Grabowski, 2008a; Mehta, 2006). Dentro del extenso espectro fenotípico observado en la enfermedad de Gaucher, se han descrito fenotipos inusuales como epilepsia mioclónica, ataxia cerebelar y polineuropatía periférica, entre otros (Capablo *et al.*, 2008; King, 1975; Machaczka *et al.*, 1999; Mehta, 2006; Miller *et al.*, 1973).

En los últimos años ha aparecido un número creciente de publicaciones que revelan la propensión de una minoría de pacientes de enfermedad de Gaucher a desarrollar enfermedad de Parkinson (Capablo *et al.*, 2008; Giraldo *et al.*, 2008; Neudorfer *et al.*, 1996; Sidransky, 2005; Tayebi *et al.*, 2001; Tayebi *et al.*, 2003; Varkonyi *et al.*, 2003). La aparición de esta variante de enfermedad de Parkinson de comienzo temprano en pacientes con enfermedad de Gaucher, motivó la realización de estudios de prevalencia de enfermedad de Parkinson en diversas poblaciones de pacientes con enfermedad de Gaucher, con el objetivo de analizar las alteraciones genéticas y las características clínicas asociadas, y detectar factores que permitan identificar los casos de forma precoz. Los estudios realizados en distintas poblaciones, han demostrado la existencia de un incremento en la frecuencia de aparición de variantes en el gen *GBA* en pacientes con enfermedad de Parkinson. También se ha asociado la ocurrencia de variantes en el gen *GBA* y el riesgo de desarrollar enfermedad de Parkinson de inicio precoz. Los resultados obtenidos por los distintos estudios han sido dispares, no existiendo datos de esta asociación en población española (Aharon-Peretz *et al.*, 2004; Bras *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2007; De Marco *et al.*, 2008; Eblan *et al.*, 2006; Gan-Or *et al.*, 2008; Kalinderi *et al.*, 2009; Lwin *et al.*, 2004; Mitsui *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2005; Sidransky *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2007; Toft *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2007).

Aunque la enfermedad de Parkinson ha sido considerada durante mucho tiempo como un trastorno no genético de origen esporádico, estudios recientes han demostrado la importancia de las contribuciones genéticas a la enfermedad de Parkinson, demostrando que los factores genéticos constituyen factores de susceptibilidad o modificadores de la enfermedad, afectando a la penetrancia, edad de inicio, gravedad y progresión de la enfermedad (Farrer, 2006; Lesage and Brice, 2009). Es conocido que la presencia del alelo  $\epsilon 4$  del gen de la apolipoproteína E (*apoE*) puede inducir una susceptibilidad genética para el desarrollo de varios procesos neurodegenerativos, entre los que se encuentra la enfermedad de Parkinson (Schneider *et al.*, 1995). Varios autores han discutido la posible asociación entre esta variante alélica del gen *apoE* y el riesgo de padecer enfermedad de Parkinson (Huang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta esto hechos, planteamos como hipótesis que:

- Las variantes en el gen que codifica glucocerebrosidasa, causales de enfermedad de Gaucher, constituyen un factor de riesgo que contribuye al desarrollo de la enfermedad de Parkinson, y condicionan la edad de inicio de la misma en población española.
- La presencia de determinados alelos del gen que codifica apolipoproteína E induce una susceptibilidad genética para el desarrollo de enfermedad de Parkinson en población española.

## 2.2. Objetivos

Para corroborar esta hipótesis, en este trabajo se abordaron los siguientes objetivos:

- 1.- Conocer si alguna de las isoformas de la apolipoproteína E produce susceptibilidad para el desarrollo de enfermedad de Parkinson en una población de pacientes de la comunidad autónoma de Aragón.
- 2.- Evaluar si la presencia de variantes en el gen *GBA* puede constituir un factor de susceptibilidad genética para el desarrollo de enfermedad de Parkinson y ésta presenta un inicio precoz, en pacientes de la comunidad autónoma de Aragón.

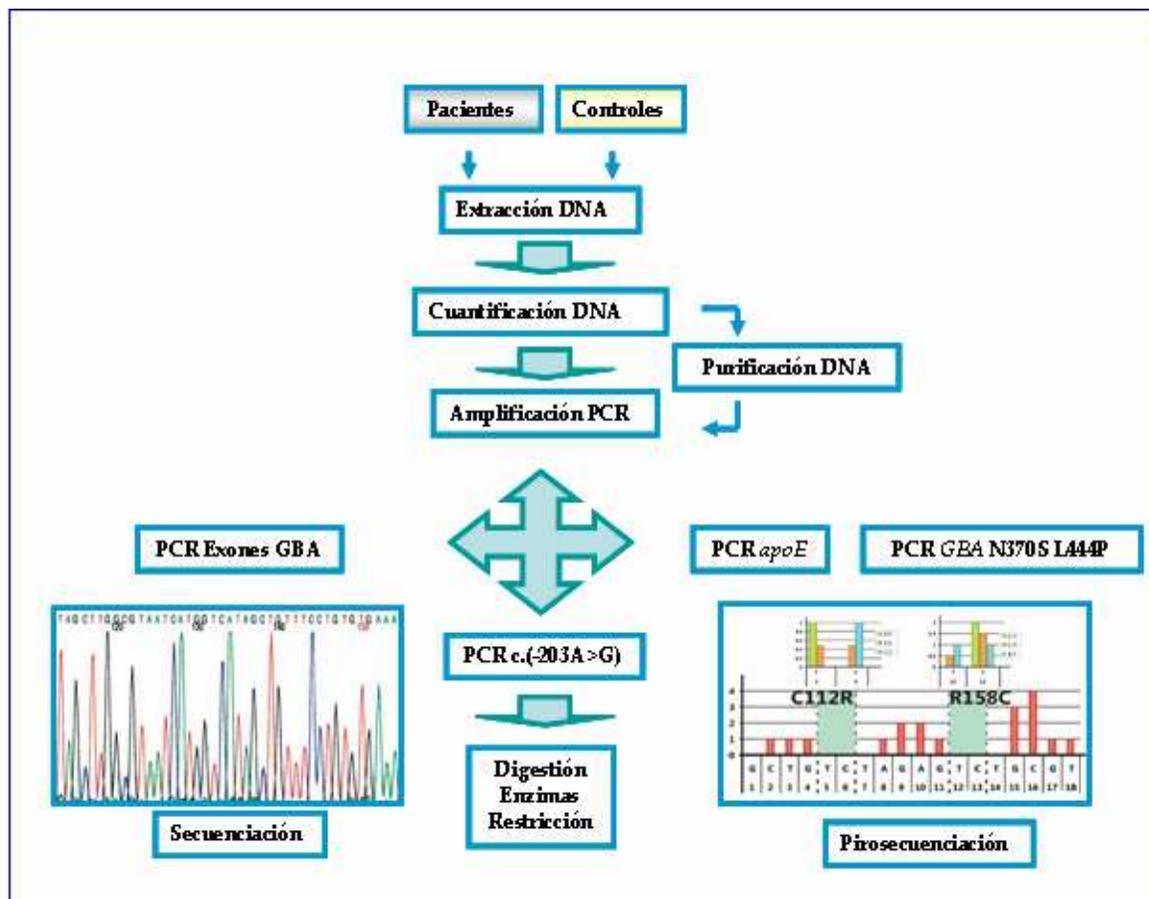
- 3.- Explorar si la presencia de variantes en los genes *GBA* y *apoE* influye en el comportamiento clínico de los pacientes con enfermedad de Parkinson.
  
- 4.- Identificar si existen factores ambientales que determinan mayor susceptibilidad al desarrollo de enfermedad de Parkinson.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se analizó el gen *GBA* completo y el genotipo para las isoformas de la apolipoproteína E en 221 sujetos según el esquema resumido en la figura 3.1. Se incluyeron un total de 112 pacientes diagnosticados de enfermedad de Parkinson, 109 sujetos como grupo control.

FIGURA 3.1. Esquema general de trabajo.



Asimismo, para conocer la incidencia, en población general aragonesa, de las mutaciones más frecuentes responsables de la enfermedad de Gaucher, se disponía de un Biobanco con un total de 647 muestras de sangre de cordón umbilical, en las que se determinó la incidencia de las mutaciones N370S y L444P.

El análisis del genotipo para las isoformas de la apolipoproteína E se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

- Amplificación, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de un fragmento del 4º exón del gen *apoE* que contenía los codones 112 y 158 de la proteína que determinan las tres isoformas de la proteína:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ .
- Análisis del genotipo de *apoE* mediante pirosecuenciación.

La estrategia llevada a cabo para el análisis del gen *GBA* incluyó los pasos que se indican a continuación:

- Análisis de las dos mutaciones más frecuentes asociadas a la enfermedad de Gaucher, N370S y L444P, mediante pirosecuenciación:
  - Amplificación, mediante reacción de PCR, de un fragmento del gen *GBA* que comprendía parte del exón 8, los exones 9 y 10 y parte del exón 11 (1954 pb), evitando la amplificación del seudogén de la glucocerebrosidasa (*GBAP*).
  - Amplificación, mediante reacción de PCR, de dos fragmentos adyacentes a las mutaciones N370S y L444P a partir del producto amplificado por PCR larga.
  - Análisis de las mutaciones N370S y L444P mediante pirosecuenciación.
- Análisis de la variante c.(–203)A>G:
  - Amplificación, mediante reacción de PCR, de la zona adyacente a la variante c.(–203)A>G del gen *GBA* a partir del producto amplificado por PCR larga, seguida de la digestión del producto de PCR con la enzima de restricción *BclI* y posterior electroforesis.
- Análisis del gen *GBA* completo:
  - Amplificación del gen *GBA* completo mediante PCR larga, para la búsqueda de grandes deleciones y eliminación de *GBAP*.
  - Amplificación, mediante reacción de PCR, de los 11 exones y los nexos exón-intrón del gen *GBA* a partir del producto amplificado por PCR larga, seguida de la secuenciación automática de estos amplicones.

### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Pacientes y controles

Los objetivos propuestos en este trabajo conllevaron la utilización de dos grupos de muestras. Por un lado, se diseñó un estudio del tipo casos-controles, constituido por un total de 221 participantes. Entre marzo de 2007 y junio de 2008 se realizó la selección de los participantes en el estudio y la recolección de muestras. Se incluyeron un total de 112 pacientes diagnosticados de EP en los distintos Servicios de Neurología de la Comunidad de Aragón (Hospital Universitario Miguel Servet, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa) y con la colaboración del Centro de Salud de Jaca y la Asociación de Parkinson de Aragón. El muestreo se realizó introduciendo restricciones para conseguir que los dos grupos fuesen homogéneos en cuanto a las variables de confusión más importantes. La selección de los sujetos que constituyeron el grupo control fue realizada junto con el grupo casos mediante un proceso de emparejamiento 1:1, de tal forma que a cada caso le correspondió un control no familiar, expuesto a las mismas condiciones ambientales que el paciente. En el grupo control se incluyeron 109 sujetos aparentemente sanos y no relacionados entre sí, de edad y sexo similar al de los pacientes y provenientes de la misma región geográfica de la cual fueron seleccionados los casos.

En el estudio de casos y controles se incluyeron aquellas personas que cumplían los siguientes criterios:

- Criterios de inclusión de los casos:
  - Individuos caucásicos de origen no Ashkenazi.
  - Edad mayor de 18 años.
  - Sujetos diagnosticados de EP por un especialista en Neurología, de acuerdo con los criterios de diagnóstico clínico publicados (Hughes *et al.*, 1992).
- Criterios de inclusión de los controles:
  - Individuos caucásicos de origen no Ashkenazi.
  - Sujetos sin relación de parentesco con los pacientes de Parkinson incluidos en el grupo casos.
  - No presencia de alteraciones de tipo neurológico.

Por otra parte, para conocer la incidencia, en población general aragonesa, de las mutaciones más frecuentes responsables de la enfermedad de Gaucher, se incluyeron muestras de sangre de cordón umbilical, procedentes de un Biobanco. Se recogieron 647 muestras de recién nacidos anónimos, de los cuales sólo se conocía el género y la procedencia. La recolección de muestras se realizó durante el año 1997, en distintos centros de la comunidad autónoma de Aragón, concretamente en los hospitales San Jorge (Huesca), Obispo Polanco (Teruel), Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza). Para la inclusión de las muestras de cordón umbilical en el estudio se establecieron los siguientes criterios:

- Todos los recién nacidos sanos en los hospitales citados anteriormente, representativos de la población aragonesa, recogidos de manera consecutiva durante un periodo de 6 meses.
- Se excluyeron los recién nacidos gemelos.

Los tres grupos seleccionados presentaban las siguientes características:

- Casos: formado por 112 pacientes con EP (66 varones y 46 mujeres). La mediana de edad fue de 70 años (amplitud intercuartil: 11,0).
- Controles: 109 sujetos (47 varones y 59 mujeres). La mediana de edad fue de 69 años (amplitud intercuartil: 20,5).
- Muestra de población general de la comunidad autónoma de Aragón: 647 recién nacidos anónimos (350 varones y 297 mujeres).

Las características antropométricas, datos demográficos, clínicos, antecedentes personales, antecedentes familiares de EP u otras enfermedades neurológicas, para cada uno de los participantes en el estudio de casos y controles, fueron obtenidos por especialistas en las áreas de Neurología, Hematología y Medicina de familia. Los datos se recogieron de manera uniforme a través del uso de cuestionarios estructurados elaborados por la Fundación Española para el Estudio y la Terapéutica de la Enfermedad de Gaucher (FEETEG) (Anexo VI).

Se informó a los controles y a los pacientes, o a sus tutores, verbalmente y por escrito de los objetivos y metodología a seguir en este estudio, aceptando de manera voluntaria su participación en el mismo. Fue requisito indispensable para el estudio el consentimiento

informado y por escrito de todos los participantes en el estudio, autorizando el uso en investigación de las muestras de sangre periférica que les fueron extraídas (Anexo VII).

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS) de Zaragoza (España) y la investigación fue llevada a cabo según los principios de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y sus posteriores revisiones.

### 3.1.2. Diseño del estudio

En primer lugar se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva de manera sistemática, haciendo uso de textos especializados y de las bases de datos ISI Web of Knowledge y Pubmed fundamentalmente. Se excluyeron aquellos artículos publicados en un idioma distinto al español o al inglés.

Inicialmente se llevó a cabo la determinación de la frecuencia alélica de las mutaciones más frecuentes del gen *GBA* (N370S y L444P) en población general aragonesa, en 647 muestras de sangre de cordón umbilical. Tras este estudio previo, se planteó un estudio de casos y controles en pacientes diagnosticados de enfermedad de Parkinson en la Comunidad Autónoma de Aragón para analizar las dos mutaciones más frecuentes en población española (N370S, L444P) responsables de la EG, posteriormente se amplió el diseño al análisis por secuenciación de todo el gen *GBA*.

Se diseñó un estudio observacional, que comenzó con la identificación de un grupo de casos y un grupo de controles (compuestos por individuos que cumplieran los criterios de inclusión expuestos anteriormente para cada uno de los grupos). La determinación del tamaño de muestra se llevó a cabo mediante el software EPIDAT 3.1 (Servicio de Información sobre Saúde Pública, Xunta de Galicia; Área de Análisis de Salud y Sistemas de Información de Salud de la Organización Panamericana de la Salud) y se realizó durante la fase de diseño del estudio para establecer el número de sujetos que debían seleccionarse para participar en el mismo. El abanico de criterios susceptibles de ser considerados para efectuar este cálculo fue amplio, y la elección concreta que se hizo dependió, entre otras cosas, de la información bibliográfica de la que se disponía inicialmente y de las características del procedimiento estadístico utilizado para analizar los datos. Debe enfatizarse, sin embargo, que la determinación del tamaño de muestra mediante recursos computacionales formales tiene un carácter orientador. Los resultados han

de ser combinados con otros elementos cruciales a la hora de decidir un tamaño muestral, tales como los recursos materiales disponibles.

Se estimó el tamaño de muestra conociendo los tamaños de muestra usados en trabajos similares (Eblan *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2005) y que, según el estudio realizado en población norteamericana por Lwin *et al.* (2004) (Lwin *et al.*, 2004), se encontraron alteraciones en el gen *GBA* en el 21% de los sujetos con enfermedad de Parkinson, mientras que estas alteraciones alcanzaron un 4,5% en sujetos control. Asumiendo estos datos y el tipo de diseño de este estudio (casos y controles, grupos independientes), el tamaño estimado de muestra a estudiar, para una prueba bilateral con un control por caso (con un nivel de confianza del 95% y una potencia del 90%), sería de  $N=84$ ; con corrección de Yates  $N=96$ . Por lo tanto planteamos la realización del estudio con: Casos: 100 pacientes afectados de EP; Controles: 100 sujetos sanos.

Todos los procedimientos de extracción y procesamiento de las muestras en el laboratorio tienen la acreditación de calidad según la norma ISO 9001:2000.

### 3.1.3. Obtención de la muestra

Se recogieron muestras de sangre periférica de 112 pacientes de EP y 109 controles y sangre de cordón umbilical de 647 recién nacidos para la realización de los estudios expuestos en esta memoria.

La extracción de sangre periférica se realizó mediante punción de la vena cubital de forma no traumática. Se extrajeron entre 15 y 20 mL de sangre venosa en tubos Vacutainer® (Becton Dickinson) que contenían sal dipotásica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a una concentración de 1 mg/dL, como anticoagulante. Las muestras de sangre de cordón umbilical se obtuvieron en el momento puntual de producirse el corte del cordón umbilical de los recién nacidos. Se extrajeron entre 5 y 10 mL de sangre en tubos Vacutainer® (Becton Dickinson) con EDTA a una concentración de 1 mg/dL, como anticoagulante.

Todas las muestras fueron codificadas durante la extracción, de modo que todos los estudios posteriores se realizaron de manera anónima.

Se separó el plasma de las células sanguíneas mediante centrifugación a 3500 r.p.m a 4°C durante 10 min en una centrífuga Allegra® X-15R (Beckman Coulter). Las células sanguíneas se resuspendieron en disolución salina NaCl 0,9% (p/v) hasta alcanzar el volumen inicial, evitando de esta forma la modificación de la concentración inicial de los elementos formes. Se congelaron a -20°C para aislar posteriormente el DNA, o bien se procesaron inmediatamente.

El plasma se alicuotó y se congeló a -80°C.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Obtención de DNA genómico

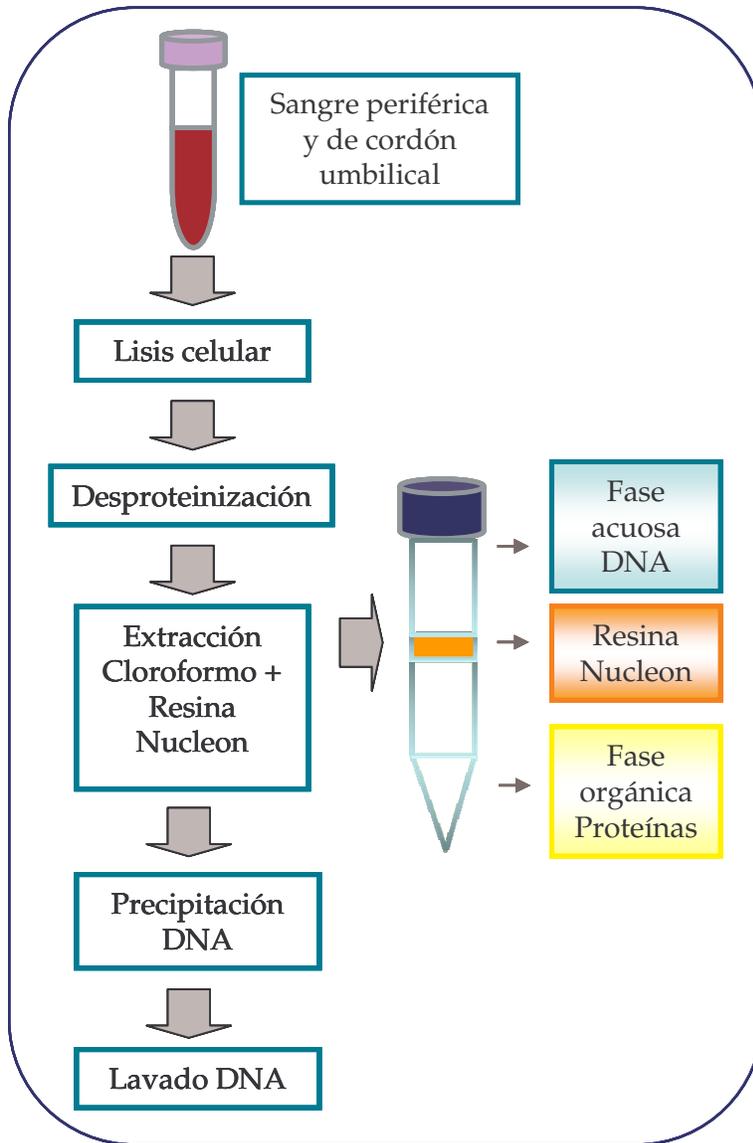
Para la extracción de DNA genómico se utilizó el producto comercial "Illustra™ Nucleon Blood and Cell Culture Genomic DNA Extraction Kit" (GE Healthcare). Este procedimiento permite el aislamiento de DNA genómico de doble cadena a partir de diferentes tipos de muestras biológicas. En este caso concreto, se obtuvo a partir de leucocitos en muestras de sangre periférica y de cordón umbilical. Este método de extracción aporta diversas ventajas frente a las técnicas clásicas, puesto que se realiza un aislamiento rápido y eficiente obteniendo al mismo tiempo un elevado rendimiento, evitando pasos de extracción laboriosos que implican el uso de disolventes orgánicos o digestión con proteasas (Miller *et al.*, 1988; Mullenbach *et al.*, 1989).

El proceso de extracción del DNA genómico comenzó con la lisis específica de los eritrocitos de la muestra. Un segundo paso consistió en una etapa de digestión, en la cual se lisaron los leucocitos. Posteriormente se desproteinizó la muestra mediante precipitación salina, usando perclorato sódico. Las proteínas presentes como consecuencia de la degradación previa de las estructuras celulares fueron separadas del DNA genómico, que permaneció en disolución. Se realizó una extracción del DNA mediante la adición de cloroformo. Para la separación eficaz de las fases acuosa y orgánica se añadió una resina, cuya función fue la unión covalente a las proteínas y la formación una interfase semisólida que facilitó la separación de la fase acuosa, asegurando una buena recuperación de DNA. Finalmente, se precipitó el DNA genómico y, tras la eliminación de sales con etanol al 70% (v/v), fue resuspendido en una solución tamponada (TE 1x) para su posterior uso o almacenamiento. La solución TE 1x actúa

como disolución amortiguadora y como agente de quelante de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  inactivando las posibles DNAsas y RNAsas presentes.

La figura 3.2 ilustra, de manera esquemática, el procedimiento para la extracción de DNA a partir de las muestras de sangre.

FIGURA 3.2. Esquema de la extracción de DNA.



**3.2.1.1. Reactivos necesarios:**

- TE 1x (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0): se disolvieron 1,211 g de Trizma Base (Sigma) y 0,336 g de EDTA(Na)<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O (Carlo Erba) en 900 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Se ajustó la disolución a pH = 8,0 y se enrasó a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada. Una vez preparado se autoclavó durante 15 min a 121°C, y posteriormente se almacenó a 4°C.
- Reactivo A (10 mM Tris-HCl, 320 mM sacarosa, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% (v/v) Triton X-100, pH 8,0): suministrado por la casa comercial concentrado 4x, por lo que se requirió la dilución del reactivo A (1x) con agua destilada estéril. Posteriormente se autoclavó durante 25 min a 121°C, 15 psi y se almacenó a 4°C.
- Reactivo B: suministrado por la casa comercial. Se introdujo en un baño termostático a 37°C para conseguir su disolución completa en los casos en los que no se encontraba completamente disuelto para su uso.
- Perclorato sódico 5M: suministrado por la casa comercial.
- Cloroformo (Panreac).
- Resina Nucleon: suministrada por la casa comercial. Se aseguró la completa disolución de la resina Nucleon antes de su uso.
- Etanol absoluto (Carlo Erba).
- Etanol al 70% (v/v).

**3.2.1.2. Procedimiento:**

1. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos con EDTA. La extracción de DNA genómico se realizó partir de sangre almacenada a una temperatura de 2 a 8°C durante un corto periodo de tiempo o, en los casos en los que no fue posible procesar las muestras inmediatamente, las muestras de sangre se congelaron a -20°C después de su extracción,

por lo que fueron descongeladas a temperatura ambiente previamente a la extracción de DNA.

2. Se añadieron 7,5 mL de sangre total a un tubo de polipropileno de fondo cónico (Brand) de 50 mL, marcado previamente con el número de identificación correspondiente a la muestra de sangre.
3. A continuación, se añadieron 4 volúmenes de reactivo A (1x) al tubo, en condiciones de esterilidad, y se mezcló en un agitador orbital (FALC F200) durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron en una centrífuga refrigerada modelo Allegra® X-15R (Beckman Coulter) a 1500 g durante 15 min.
4. Se eliminó el sobrenadante con una pipeta Pasteur, tomando la precaución de no perder el *pellet* formado en la parte inferior del tubo.
5. Se añadieron 2 mL de Reactivo B y se agitó mecánicamente (Biovortex V1, BioSan) durante 15 seg. En los casos en los que no se resuspendió el *pellet*, se introdujo el tubo en un baño termostatzado a 37°C hasta conseguir su resuspensión completa. Se transfirió el contenido a un tubo de polipropileno de fondo cónico (Brand) de 15 mL.
6. Se añadieron 500 µL de perclorato sódico 5M y se agitó por inversión al menos 7 veces.
7. Se añadieron 2 mL de cloroformo y se agitó por inversión entre 7 y 10 veces.
8. Se dejó reposar el tubo hasta que se observó, de manera clara, la formación de dos fases. A continuación, se añadieron 300 µL de resina Nucleon y posteriormente, se centrifugó el tubo a 1300 g durante 3 min.  
  
Nota: En este paso fue importante extremar la precaución para no producir agitación, minimizando la contaminación debida proteínas presentes en la interfase.
9. Se transfirió el sobrenadante (fase acuosa) a un tubo de pared transparente (Deltalab) y se añadió el mismo volumen de etanol absoluto frío invirtiendo suavemente el tubo hasta que se observó la precipitación de hebras de DNA. Las hebras de DNA formadas se recogieron con ayuda de una pipeta Pasteur.
10. El DNA se lavó en 500 µL de etanol al 70% (v/v) frío, para eliminar el exceso de sales.
11. Posteriormente, se redisolvió el DNA en 300 µL TE 1x y se mantuvo el DNA en un agitador orbital durante 24 horas hasta su completa hidratación.
12. El DNA aislado se almacenó congelado a -80°C.

### 3.2.2. Cuantificación e integridad del DNA genómico

Tras la hidratación y homogeneización de las muestras de DNA genómico extraído, se determinó su integridad, concentración y pureza.

#### 3.2.2.1. Análisis de la integridad del DNA en geles de agarosa:

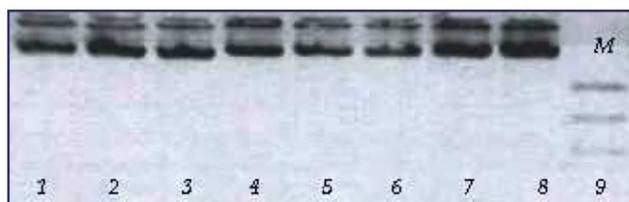
La integridad del DNA se estimó inicialmente por electroforesis horizontal, en geles de agarosa convencional (Ecogen) al 1% (Sambrook, 1989c). El tampón empleado tanto para la preparación de los geles como en las cubetas de electroforesis fue TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). Para visualizar el DNA, se añadió bromuro de etidio (Sigma) al gel, alcanzando una concentración final de 0,5 µg/mL.

Las muestras aplicadas al gel contenían 1 µL de cada una de las muestras de DNA y 2 µL tampón de carga (25% Ficoll 400 (Sigma), 0,25% Azul de bromofenol (Sigma) y dH<sub>2</sub>O; diluido 1:5 en TAE 1x). Además de las muestras, se cargó en uno de los pocillos 1 µL marcador de peso molecular y concentración conocidos “High Mass Ladder” (Invitrogen, rango 1000-10000 pb) mezclado con 2 µL tampón TAE 1x.

La electroforesis se llevó a cabo durante 30 min a 90V. Se visualizaron las bandas en un transiluminador Gel Doc 2000 (Bio-Rad) de luz ultravioleta ( $\lambda = 302$  nm) con la ayuda de la herramienta informática MultiAnalyst v.1.1 (Bio-Rad).

La integridad del DNA se estimó observando la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio intercalado entre las bases de DNA cuando fue irradiado con luz ultravioleta; esta emisión fue directamente proporcional a la cantidad total de DNA (figura 3.3).

**FIGURA 3.3. Análisis de la integridad del DNA mediante electroforesis.**



Los pocillos 1 a 8 contienen muestras de DNA. El marcador de peso molecular se cargó en el pocillo 9.

### 3.2.2.2. Cuantificación espectrofotométrica de la concentración de DNA:

Todos los ácidos nucleicos, por el hecho de estar constituidos por bases nitrogenadas, presentan un máximo de absorción a una  $\lambda=260$  nm. Las proteínas, sin embargo, presentan un máximo de absorción característico a 280 nm debido a la presencia de aminoácidos aromáticos en su estructura.

La cuantificación de DNA en las muestras se realizó mediante espectrofotometría con el espectrofotómetro NanoVue (GEHealthcare), midiendo la absorbancia a  $\lambda=260$ nm. La concentración se obtuvo teniendo en cuenta que la unidad de absorbancia a 260 nm para el DNA de doble cadena es de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Se calculó la pureza de las muestras de DNA mediante el cociente de absorbancias  $A_{260}/A_{280}$ , determinando la relación de ácidos nucleicos y proteínas en cada muestra. Una relación  $A_{260}/A_{280}$  de 1,8 indica una máxima pureza del DNA. Por el contrario, un ratio  $A_{260}/A_{280}$  inferior a 1,8 es indicativo de la existencia de un exceso de proteínas en disolución, mientras que un valor superior a 1,8 refleja la presencia de RNA en la muestra.

En los casos en que esta relación no estuvo comprendida entre 1,8 y 2,0 se procedió a su purificación mediante una extracción con fenol-cloroformo.

Por último, las muestras se llevaron a una concentración de trabajo de 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  con tampón TE 1x.

### 3.2.3. Purificación del DNA genómico con fenol-cloroformo

Las muestras de DNA en las que el cociente  $A_{260}/A_{280}$  no estaba comprendido entre 1,8 y 2,0 se purificaron con fenol:cloroformo.

Se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de fenol saturado con Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 sobre 250  $\mu\text{L}$  de DNA a purificar. Se mezcló por inversión y se centrifugó en una ultracentrífuga Spectrafuge 24D (Labnet) a 12.000 r.p.m durante 10 min.

Se transfirió la fase superior acuosa a otro tubo y se añadieron 125  $\mu\text{L}$  de SEVAC (cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1 (Carlo Erba) y 125  $\mu\text{L}$  de fenol saturado con Tris-HCl. Se agitó y se centrifugó en las mismas condiciones.

Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a otro tubo y se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de SEVAC. Se mezcló por inversión y se centrifugó de igual modo que en los pasos anteriores.

Finalmente, se recogió el sobrenadante y se añadió 1/3 del volumen de acetato amónico 10 M (Carlo Erba) con el objetivo de aumentar la concentración salina y se precipitó el DNA por adición de 2 volúmenes de etanol absoluto frío invirtiendo suavemente. El DNA obtenido se recogió con ayuda de una pipeta Pasteur y se lavó en etanol al 70% (v/v) frío. Se resuspendió en 250  $\mu\text{L}$  de solución tamponada TE 1x en un agitador orbital durante varias horas a temperatura ambiente.

#### **3.2.4. Amplificación de fragmentos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se procedió a la amplificación de las regiones específicas a estudiar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que permite la amplificación *in vitro* de un segmento específico de DNA situado entre dos oligonucleótidos que sirven como cebadores para una serie de reacciones de síntesis catalizadas por una DNA polimerasa (Mullis *et al.*, 1986; Mullis and Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985).

Los componentes de la reacción de PCR se optimizaron específicamente para cada fragmento de DNA amplificado y se indican más adelante.

##### **3.2.4.1 Diseño de cebadores para la amplificación del DNA:**

El correcto diseño de las parejas de cebadores utilizadas para la amplificación de un fragmento de DNA genómico por PCR constituyó un punto esencial para la obtención de un producto altamente específico.

Los cebadores (Invitrogen) empleados se diseñaron mediante el programa informático Oligo v.6.0 (MBI). Las secuencias genómicas de los genes se obtuvieron de la base de datos Ensembl (Disponible en: [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org), [consultado 16/03/07]).

Tras el diseño de los cebadores, se realizó una búsqueda en las bases de datos de secuencias disponibles en la web mediante el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>, [consultado 19/03/07]), comprobando que ninguna de las secuencias de los cebadores presenta homología importante con otra región del genoma humano, evitando de este modo, la amplificación de regiones no deseadas.

En las tablas 3.1 y 3.2 se especifican los cebadores utilizados para la amplificación.

**TABLA 3.1. Cebadores empleados para amplificar el gen *GBA* completo, un fragmento del gen *GBA* y un fragmento del 4º exón del gen *apoE*.**

ID	Código Ensembl	Secuencia cebadores	Tamaño (pb)
<b>Gen <i>GBA</i></b>	ENSG00000177628	D:5'CTGCATCTGATGATGAAACAAGGG ACGCTGCAGAG3' R:5'TCCCTGAGACAGATACTGGCCCTG GTGACAGTGG3'	7200
<b>Gen <i>GBA</i></b>	ENSG00000177628	D: 5'CCTGCTGTGCCCTCTTTAGTCAC 3' R:5'GGGGGTGGTGGTTCATGTAT3'	1954
<b>Gen <i>apoE</i></b>	ENSG00000130203	D: 5'GCGGGCACGGCTGTCCAA3' R: 5' Biot-GCACGCGGCCCTGTTCCAC3'	305

ID: Identificación de los fragmentos amplificados; códigos de acceso de la secuencia del gen *GBA* y *apoE* en la base de datos Ensembl; secuencia de los cebadores directo (D) y reverso (R); tamaño del producto amplificado (pb).

**TABLA 3.2. Características de los cebadores empleados para la amplificación de los exones del gen *GBA*.**

ID fragmento amplificado	Secuencia cebadores	Tamaño (pb)	T <sub>m</sub>
Exón 1A	D: 5'CTCCAGAGTTTTATAGGGCA3' R: 5'AGGATAGAGGATCCACTAAA3'	220	58°C
Exón 1B	D: 5'TTTTTGTTTAGTGGATCCTC3' R: 5'TCCAGTGCCAGGATTCCAGA3'	163	58°C
Exón 2	D: 5'AGGAGAGTAGTTGAGGGGTG3' R: 5'AGGGAGGCTCTGTGCTACCT3'	193	64°C
Exón 3	D: 5'TGTCATTCTCCATGTCTTCAT3' R: 5'CATTACCTCTAGGAGGACCC3'	305	58°C
Exón 4	D: 5'AGTTTCCCGCTGGGTAAGTATGAT3' R: 5'AAATGAAGAGTTTCAATGGCTCT3'	243	59°C
Exón 5	D: 5'GCAGAGTCCCATACTCTCCTA3' R: 5'TACCCTACAGTTTCTCAACC3'	257	58°C
Exón 6	D: 5'GTGTTCCAACCTCTGGGTGCT3' R: 5'TAAATGGGAGGCCAGTCCTG3'	266	58°C
Exón 7	D: 5'GGTCTGGTCCACTTTCTTGG3' R: 5'TTTGGATGCTGGATTTGAAGG3'	338	58°C
Exón 8	D: 5'AGAAGCCTGTGTGCAAGGTCC3' R: 5'AGTAAGAGGTCTGAGGTCTGC3'	323	60°C
Exón 9	D: 5'CCAGTGTTGAGCCTTTGTCT3' R: 5'GAGATGATAGGCCTGGTATG3'	250	58°C
Exón 10	D: 5'AGATGAGGGTTTCATGGGAGG3' R: 5'CCCACCGCTGTCTTCAGCCA3'	223	62°C
Exón 11	D: 5'TGCCAGTCAGAAGAACGACC3' R: 5'GCTGTGCCCTCTTTAGTCAC3'	260	58°C

ID: Identificación de los fragmentos amplificados del gen *GBA*; secuencia de cebadores directo (D) y reverso (R); tamaño del producto amplificado (pb) y temperatura de hibridación (T<sub>m</sub>) de los cebadores.

#### 3.2.4.2 Amplificación del gen completo de la glucocerebrosidasa (*GBA*):

Se diseñó la amplificación para el gen *GBA* completo (7,2 Kb) mediante reacción de PCR larga, con la enzima Expand Long Template PCR System (Roche) con actividad a prueba de errores, de manera que se realizó la búsqueda de grandes deleciones eliminando a su vez la presencia de un pseudogén de alta homología con el gen estructural.

La enzima Expand Long Template PCR System contiene Taq DNA Polimerasa termoestable y Tgo DNA Polimerasa termoestable con actividad 3'-5' exonucleásica y está almacenada en un tampón constituido por 20 mM Tris-HCl (pH=7,5), 100 mM KCl, 1mM ditioneitol (DTT), 0,1mM EDTA, 0,5% Nonidet P40 (v/v), 0,5% Tween 20 (v/v), 50% glicerol (v/v). El tampón 10x contiene 17,5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Para la amplificación del gen *GBA* completo se siguió una estrategia basada en una reacción de PCR "Hot Start" que evitó el comienzo de la amplificación antes la separación completa de las hebras que constituyen la doble cadena de DNA. De esta manera, se aseguró la máxima especificidad en la reacción. Para ello, se añadió la polimerasa una vez que el bloque térmico alcanzó la temperatura de desnaturalización evitando la amplificación del DNA al paso por la temperatura de extensión óptima de la enzima.

Los cebadores empleados para la reacción de PCR han sido descritos anteriormente, y están detallados en la tabla 3.1.

Las condiciones térmicas utilizadas para la amplificación del gen *GBA* mediante reacción de PCR se indican en la tabla 3.3.

**TABLA 3. 3. Condiciones térmicas utilizadas para la amplificación del gen *GBA*.**

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min	1
Desnaturalización	94°C	20 seg	10
Hibridación y elongación	68°C	6 min	
Desnaturalización	94°C	20 seg	20
Hibridación y elongación	68°C	7 min + 20 seg en cada ciclo sucesivo	
Elongación final	68°C	10 min	1
Enfriamiento	4°C	∞	

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador 2720 (Applied Biosystems).

Cada una de las amplificaciones se preparó en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . Las cantidades y concentraciones finales de los reactivos utilizados para cada amplificación se muestran en la tabla 3.4.

**TABLA 3.4. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados para la amplificación del gen *GBA*.**

REACTIVO	CANTIDAD ( $\mu\text{L}$ )	CONCENTRACIÓN FINAL
dH <sub>2</sub> O estéril	33,25 $\mu\text{L}$	
Tampón 10x	5 $\mu\text{L}$	1x
dNTPs (2 mM)	4 $\mu\text{L}$	160 $\mu\text{M}$
Cebador directo (10 $\mu\text{M}$ )	1,5 $\mu\text{L}$	300 nM
Cebador reverso (10 $\mu\text{M}$ )	1,5 $\mu\text{L}$	300 nM
Expand Long Template PCR System (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,75 $\mu\text{L}$	0,075 U/ $\mu\text{L}$
DNA genómico (50 ng/ $\mu\text{L}$ )	4 $\mu\text{L}$	4 ng/ $\mu\text{L}$

### 3.2.4.3 Amplificación de un fragmento del gen de la glucocerebrosidasa (*GBA*):

Se diseñó la amplificación de un fragmento del gen *GBA* que comprendía parte del exón 8, los exones 9 y 10 y parte del exón 11 del gen *GBA* (1954 pb), necesario para realizar posteriormente el barrido de las mutaciones N370S y L444P mediante pirosecuenciación. Los cebadores empleados para la reacción de amplificación por PCR fueron descritos anteriormente, y se recogieron en la tabla 3.1. Estos cebadores se diseñaron para evitar la amplificación del seudogén, de alta homología con el gen estructural.

La reacción de amplificación por PCR se llevó a cabo con la enzima Ecotaq DNA Polimerasa (Ecogen), cuyas características principales son la termoestabilidad y la actividad exonucleásica 5'-3'. El tampón 10x y MgCl<sub>2</sub> 50mM para esta enzima fueron proporcionados por el fabricante. La reacción de PCR se preparó en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  en las condiciones indicadas en la tabla 3.5.

**TABLA 3.5. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados para la amplificación de un fragmento de 1954 pb del gen *GBA*.**

REACTIVO	CANTIDAD ( $\mu\text{L}$ )	CONCENTRACIÓN FINAL
dH <sub>2</sub> O estéril	6,775 $\mu\text{L}$	
Tampón 10x	1 $\mu\text{L}$	1x
dNTPs (2 mM)	1 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{M}$
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,3 $\mu\text{L}$	1,5 mM
Cebador directo (10 $\mu\text{M}$ )	0,2 $\mu\text{L}$	200 nM
Cebador reverso (10 $\mu\text{M}$ )	0,2 $\mu\text{L}$	200 nM
Ecotaq DNA Polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,025 $\mu\text{L}$	0,013 U/ $\mu\text{L}$
DNA genómico (50 ng/ $\mu\text{L}$ )	0,5 $\mu\text{L}$	2,5 ng/ $\mu\text{L}$

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en los termocicladores 2720 y Veriti (Applied Biosystems).

El programa térmico utilizado se muestra a continuación:

94°C 2 min → 94°C 20 seg → 60°C 30 seg → 72°C 2 min → 72°C 5 min → 4°C ∞

  
 35 ciclos

#### 3.2.4.4 Amplificación de las regiones adyacentes a las mutaciones N370S y L444P del gen *GBA*:

Se diseñaron amplificaciones para los fragmentos del gen *GBA* que contenían las mutaciones N370S y L444P, situadas en los exones 9 y 10 del gen *GBA* respectivamente, a partir del producto de 1954 pb previamente amplificado. La amplificación de los fragmentos adyacentes a las mutaciones N370S y L444P del gen *GBA* se realizó mediante “Nested PCR” o PCR anidada, que consistió en la realización de dos amplificaciones consecutivas. En primer lugar se amplificó un fragmento del gen *GBA*, tal y como se indica en el apartado 3.2.4.3, y posteriormente se realizó una segunda amplificación empleando como molde una alícuota del producto de PCR obtenido en la primera. En la segunda ronda de PCR se utilizaron dos nuevos

cebadores para cada fragmento a amplificar (tabla 3.6), que hibridan en una región interna del producto obtenido en la primera ronda de PCR, consiguiendo la amplificación específica de estos fragmentos. Los cebadores reversos utilizados para conseguir la amplificación contenían biotina, condición necesaria para realizar posteriormente la pirosecuenciación.

**TABLA 3.6. Cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos adyacentes a las mutaciones N370S y L444P del gen GBA.**

MUTACIÓN	CEBADORES	Tamaño del producto
N370S	D : 5'TCTTTGCCTTTGTCCTTACCC 3' R_Biot:5'AAGTGGCCAAGGTGGTAGAA 3'	185
L444P	D : 5' GTTCCCACATTCAGCAAGTTCA 3' R_Biot : 5'CACCGGTTTAGCACGAC3'	134

Cada amplificación fue optimizada con el fin de obtener la mayor cantidad y especificidad de producto posible. Para ello, se calcularon las temperaturas de reconocimiento de secuencias complementarias para cada par de cebadores.

Se obtuvieron productos con tamaños de 185 y 134 pb, donde las mutaciones a identificar tenían una localización céntrica en el fragmento amplificado. La reacción de amplificación por PCR se llevó a cabo con la enzima Ecotaq DNA Polimerasa (Ecogen). El tampón 10x y MgCl<sub>2</sub> 50mM para esta enzima fueron proporcionados por el fabricante.

La reacción de PCR se preparó en un volumen final de 20 µL en las condiciones indicadas en la tabla 3.7.

**TABLA 3.7. Cantidad y concentración de los reactivos empleados para amplificar los fragmentos adyacentes a las mutaciones N370S y L444P.**

REACTIVO	CANTIDAD (µL)	CONCENTRACIÓN FINAL
dH <sub>2</sub> O estéril	13,5 µL	
Tampón 10x	2 µL	1x
dNTPs (2 mM)	2 µL	200 µM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,6 µL	1,5 mM

REACTIVO	CANTIDAD ( $\mu\text{L}$ )	CONCENTRACIÓN FINAL
Cebador directo N370S (10 $\mu\text{M}$ )	0,2 $\mu\text{L}$	100 nM
Cebador reverso Biot N370S (10 $\mu\text{M}$ )	0,2 $\mu\text{L}$	100 nM
Cebador directo L444P (10 $\mu\text{M}$ )	0,2 $\mu\text{L}$	100 nM
Cebador reverso Biot L444P (10 $\mu\text{M}$ )	0,2 $\mu\text{L}$	100 nM
Ecotaq DNA Polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,1 $\mu\text{L}$	0,025 U/ $\mu\text{L}$

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en los termocicladores 2720 y Veriti (Applied Biosystems).

El programa térmico que se utilizó fue el siguiente:



#### 3.2.4.5 Amplificación de exones del gen *GBA* para su posterior secuenciación:

Para el análisis del gen *GBA* completo mediante secuenciación automática se amplificaron los 11 exones y las uniones exón-intrón a partir del producto amplificado por PCR larga, previamente diluido 1:100, 1:200 ó 1:300 en función de su concentración. Se realizó una PCR anidada, reduciendo de este modo los problemas derivados de amplificaciones inespecíficas de material genómico.

Se diseñaron amplificaciones para los distintos exones del gen *GBA*. Los cebadores empleados para la reacción de PCR fueron los descritos en el apartado 3.2.4.1 de este capítulo.

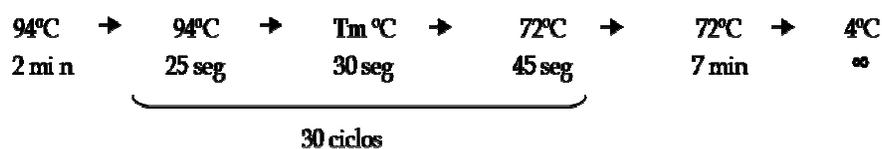
La reacción de amplificación por PCR se preparó en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  y se llevó a cabo con la enzima Ecotaq DNA Polimerasa (Ecogen), tampón 10x y  $\text{MgCl}_2$  50mM proporcionados por el fabricante, según las condiciones descritas en la tabla 3.8.

**TABLA 3.8. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados para la amplificación de los exones del gen *GBA*.**

REACTIVO	CANTIDAD (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL
dH <sub>2</sub> O estéril	11,8 μL	
Tampón 10x	2 μL	1x
dNTPs (2 mM)	2 μL	200 μM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1 μL	2,5 mM
Cebador directo (10 μM)	0,5 μL	250 nM
Cebador reverso (10 μM)	0,5 μL	250 nM
Ecotaq DNA Polimerasa (5 U/μL)	0,2 μL	0,05 U/μL

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en los termocicladores 2720 y Veriti (Applied Biosystems).

El programa térmico que se utilizó para la amplificación de los exones del gen *GBA* se muestra a continuación. Fue idéntico para cada uno de los exones a excepción de la temperatura de hibridación ( $T_m$ ), que se detalló en la tabla 3.2:



#### 3.2.4.6 Amplificación de la región adyacente a la variante c.(-203)A>G del gen *GBA*:

Se amplificó mediante PCR la región que comprendía esta variante. La secuencia genómica del gen se obtuvo de la base de datos Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Los cebadores utilizados (Invitrogen) se diseñaron mediante el programa informático Oligo v.6.0 (MBI). Las secuencias de los cebadores empleados para amplificar el fragmento de 278 pb son las que se describen a continuación:

D: 5'-GCACAGTGAAGTTTTTTTTTTTAA-3'

R: 5'-CACATGACACAGGAAGTGAGGTG\*A -3'

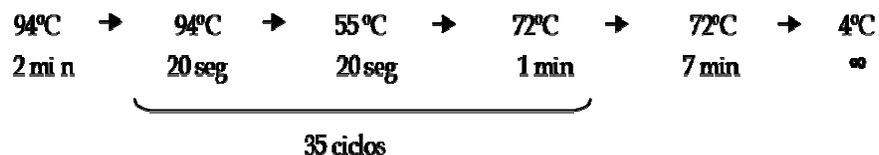
El análisis de la variante c.(-203)A>G se realizó mediante digestión con enzimas de restricción. La variante c.(-203)A>G, con respecto a la secuencia silvestre, no produce ninguna alteración que permita ser reconocida por las enzimas de restricción disponibles en el mercado. Por ello, se diseñó una amplificación por PCR en la que se empleó un cebador degenerado adyacente al nucleótido supuestamente mutado (\*la secuencia del cebador reverso que aparece subrayada se corresponde con el fragmento donde se ha introducido la degeneración). El cambio de nucleótido introducido por el cebador en el fragmento amplificado permitió la creación artificial de un sitio de digestión para la enzima de restricción *BclI* en presencia del alelo silvestre. De esta manera, la variante se puede analizar por digestión del fragmento del gen amplificado por PCR, en función de la longitud de los fragmentos de restricción generados.

La reacción de amplificación por PCR se preparó en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  y se llevó a cabo con la enzima Ecotaq DNA Polimerasa (Ecogen), tampón 10x y  $\text{MgCl}_2$  50mM proporcionados por el fabricante, según las condiciones mostradas en la tabla 3.9.

**TABLA 3.9. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados para la amplificación de la región adyacente a la variante c.(-203)A>G del gen *GBA*.**

REACTIVO	CANTIDAD ( $\mu\text{L}$ )	CONCENTRACIÓN FINAL
dH <sub>2</sub> O estéril	12,5 $\mu\text{L}$	
Tampón 10x	2 $\mu\text{L}$	1x
dNTPs (2 mM; dITP)	2 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{M}$
$\text{MgCl}_2$ (50 Mm)	0,5 $\mu\text{L}$	1,25 mM
Cebador directo (10 $\mu\text{M}$ )	0,4 $\mu\text{L}$	200 nM
Cebador reverso (10 $\mu\text{M}$ )	0,4 $\mu\text{L}$	200 nM
Ecotaq DNA Polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,3 $\mu\text{L}$	0,075 U/ $\mu\text{L}$
DNA genómico (50 ng/ $\mu\text{L}$ )	2 $\mu\text{L}$	5 ng/ $\mu\text{L}$

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en los termocicladores 2720 y Veriti (Applied Biosystems) usando el siguiente programa de temperatura:



#### 3.2.4.7 Amplificación de un fragmento del exón 4 del gen de la apolipoproteína E (*apoE*):

Se amplificó una región del gen *apoE* que comprendía los codones 112 y 158 de la apolipoproteína E, que determinan las tres isoformas de la proteína:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ . Los cebadores empleados para la reacción de PCR se describieron en el apartado 3.2.4.1. El cebador reverso utilizado para conseguir la amplificación contenía biotina, condición necesaria para realizar posteriormente la pirosecuenciación.

Para llevar a cabo la reacción de amplificación por PCR se utilizó Taq DNA Polimerasa (Ecogen), tampón 10x y  $MgCl_2$  50mM proporcionados por el fabricante. Además de los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) habituales, se añadió desoxiinosina trifosfato (dITP), análogo de desoxiguanina trifosfato, que aparea más débilmente con la citosina, de manera que se reducen compresiones generadas por la presencia de estructuras secundarias. Se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO) como agente coadyuvante, que favorece la amplificación de moldes ricos en GCs o con alto grado de estructura secundaria al disminuir la  $T_m$  del DNA molde.

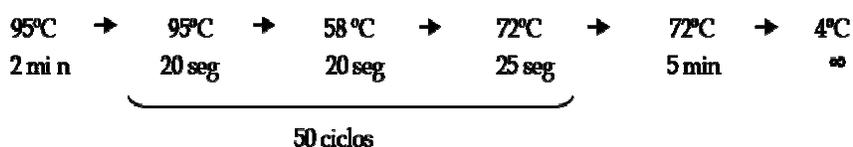
La reacción de amplificación por PCR del fragmento de 305 pb, que comprende los polimorfismos de interés, se realizó en un volumen final de 20  $\mu L$  y bajo las condiciones recogidas en la tabla 3.10.

**TABLA 3.10. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados para la amplificación de un fragmento del exón 4 del gen *apoE*.**

REACTIVO	CANTIDAD ( $\mu L$ )	CONCENTRACIÓN FINAL
dH <sub>2</sub> O estéril	12,5 $\mu L$	
Tampón 10x	2 $\mu L$	1x
dNTPs (2 mM; dITP)	2 $\mu L$	200 $\mu M$

REACTIVO	CANTIDAD (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,6 μL	1,5 mM
Cebador directo (10 μM)	0,4 μL	200 nM
Cebador reverso Biot (10 μM)	0,4 μL	200 nM
DMSO (5%)	1 μL	
DNA genómico (50 ng/μL)	1 μL	2,5 ng/μL
Ecotaq DNA Polimerasa (5 U/μL)	0,1 μL	0,025 U/μL

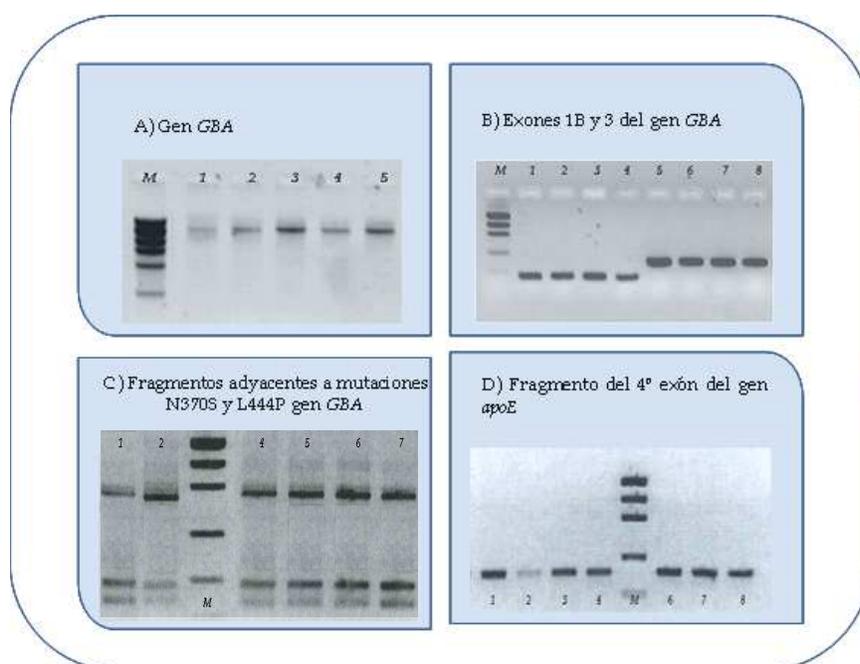
Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en los termocicladores 2720 y Veriti (Applied Biosystems) con el siguiente programa térmico mostrado a continuación:



### 3.2.5. Electroforesis de los productos amplificados mediante PCR

Los productos obtenidos por PCR fueron sometidos a electroforesis para comprobar la eficiencia y especificidad de la amplificación mediante la obtención por PCR de una única banda de tamaño adecuado. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de una alícuota de cada amplicón y una alícuota de marcador de tamaño molecular (figura 3.4).

FIGURA 3.4. Electroforesis de los amplicones obtenidos mediante PCR.



En cada panel se muestran los resultados de la electroforesis para las ampliaciones mediante PCR:

A) Gen *GBA*. El primer pocillo contiene el marcador de peso molecular "High Mass Ladder" (M). En los pocillos marcados de 1 a 5 se observan las ampliaciones del gen *GBA* completo (7,2 Kb) para distintas muestras.

B) Exones 1B y 3 del gen *GBA*. En los pocillos marcados de 1 a 4 se muestran ampliaciones del exón 1B del gen *GBA* (163 pb), mientras que en los pocillos marcados de 5 a 8 se observan ampliaciones del exón 3 del gen *GBA* (305 pb). El primer pocillo contiene el marcador de peso molecular "Low Mass Ladder" (M).

C) Fragmentos adyacentes a las mutaciones N370S y L444P. En los pocillos 1, 2, 4, 5, 6 y 7 se observan ampliaciones de los fragmentos adyacentes a las mutaciones N370S y L444P del gen *GBA* de 185 y 164 pb respectivamente. El pocillo 3 contiene el marcador de peso molecular "Low Mass Ladder" (M).

D) Fragmento del 4º exón del gen *apoE*. La calle 5 contiene el marcador de peso molecular "Low Mass Ladder" (M). En los pocillos 1, 2, 3, 4, 6 y 7 se observan las ampliaciones del fragmento de 305 pb del gen *apoE* para diferentes muestras.

Para llevar a cabo la electroforesis horizontal, se utilizaron geles de agarosa convencional (Ecogen) o agarosa Nusieve® GTG® (Lonza) a diversos porcentajes (1-3%) en TAE 1x, conteniendo bromuro de etidio a una concentración final de de 0,5 µg/mL. Para comprobar la eficiencia y especificidad de la amplificación de las zonas anexas a las mutaciones N370S y L444P del gen *GBA* se utilizaron geles de agarosa Nusieve® GTG® al 3%. Para comprobar la amplificación del gen *GBA*, se utilizaron geles de agarosa convencional al 1%, mientras que en el resto de los casos se usaron geles de agarosa convencional al 2%. Los porcentajes de agarosa utilizados en cada caso se adecuaron en función del tamaño de los fragmentos amplificados.

Las muestras aplicadas al gel contenían 2 µL de cada uno de los productos amplificados mezclados con 2 µL tampón de carga. Además de las muestras se cargó también una alícuota de 1 µL marcador de peso molecular "Low Mass Ladder" (Invitrogen, rango: 100-2000 pb) o "High

Mass Ladder” (Invitrogen, rango: 1000-10000 pb) en función del tamaño del fragmento amplificado.

Las electroforesis se realizaron en una cubeta SCIE-PLAS con tampón de electroforesis TAE 1x, aplicando un voltaje constante de 90 V durante 30 min. Se visualizaron los fragmentos amplificados en un transiluminador Gel Doc 2000 de luz ultravioleta ( $\lambda = 302$  nm), tal como se especifica en el apartado 3.2.2.1.

### 3.2.6. Análisis de la variante c.(-203)A>G mediante digestión con enzimas de restricción

Se empleó la digestión con enzimas de restricción para determinar el genotipo de los sujetos control en relación a la variante conocida c.(-203)A>G (g. 1256A>G). El mapa de restricción de los fragmentos de DNA se analizó haciendo uso del software FastPCR (Universidad de Helsinki).

El análisis de la variante c.(-203)A>G se llevó a cabo mediante la digestión del producto de PCR de 278 pb con la enzima de restricción *BclI* (New England Biolabs), tras la amplificación de la zona adyacente a la variante c.(-203)A>G, tal y como se describe en el apartado 3.2.4.6. La presencia del alelo silvestre (alelo A), el fragmento de 278 pb amplificado presenta una diana para la enzima *BclI* de manera que la digestión del producto amplificado con *BclI* genera 2 fragmentos de 252 y 26 pb. Este sitio de reconocimiento no existe cuando la secuencia contiene el alelo mutado (alelo G).

Dadas las propiedades de la enzima, se realizó la digestión por incubación de un volumen final de 40  $\mu$ L que contenía: 10  $\mu$ L de producto de PCR, 3  $\mu$ L de la enzima *BclI* 10 U/ $\mu$ L en las condiciones de concentración salina óptimas para la actividad de dicha enzima, según las recomendaciones del fabricante: 4  $\mu$ L tampón NE Buffer 3 (pH 7,9, 25°C; 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl y 1 mM DTT) y 23  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. La digestión se llevó a cabo incubando en baño seco a 50°C durante 3 horas.

Los productos de la digestión se analizaron mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (Sambrook, 1989a, b), que posteriormente se visualizaron en un transiluminador Gel Doc 2000 de luz ultravioleta ( $\lambda = 302$  nm).

Se utilizaron geles de poliacrilamida de 20x20 cm, utilizando separadores de 1,5 mm, cuya composición se especifica en la tabla 3.11.

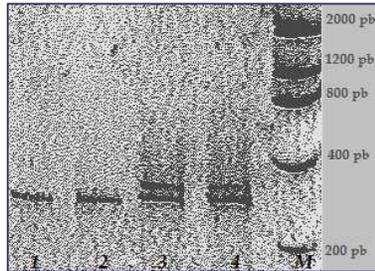
**TABLA 3.11. Composición de los geles de poliacrilamida para el análisis de la variante c.(-203)A>G.**

	8%
Acrilamida:bisacrilamida (Bio-Rad) al 30% (29:1)	14,6 mL
TBE 10x	5,5 mL
H <sub>2</sub> O desionizada	34,5 mL
Persulfato amónico 10%	400 µL
N-N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) (Sigma)	20 µL

Se mezclaron 10 µL del producto de la digestión con *BclI* a analizar con 10 µL de tampón de carga. En uno de los pocillos del gel se cargó una alícuota de marcador de peso molecular “Low Mass Ladder” (Invitrogen, rango: 100-2000 pb). La electroforesis se realizó mediante el sistema de electroforesis vertical Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad) con tampón de electroforesis TBE 1x (Trizma Base 0,089 M, ácido bórico 0,089 M, EDTA 20 mM pH 8,0), manteniendo una intensidad de corriente constante de 20 mA durante 1 hora. Finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron durante 20 min en TBE 1x con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/mL, y se destiñeron en TBE 1x durante 5 min.

Este procedimiento permitió diferenciar entre individuos homocigotos AA, heterocigotos y homocigotos GG según el patrón de bandas observado en la electroforesis (figura 3.5). Si el sujeto es homocigoto para el alelo mutado G, no se produce escisión en el fragmento amplificado y se observa una banda de 278 pb. En caso de que el individuo sea homocigoto para el alelo salvaje A, el producto amplificado se fragmenta en 2, 252 y 26 pb. Si se trata de un sujeto heterocigoto se observan 3 bandas de 278, 252 y 26 pb.

**FIGURA 3.5. Análisis de la variante c.(-203)A>G mediante digestión con la enzima de restricción *BclI*.**

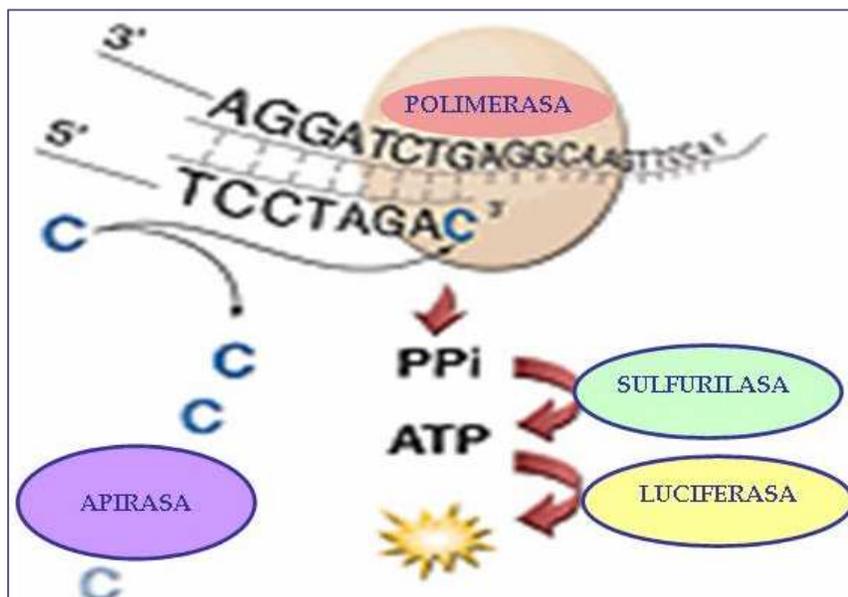


Los pocillos 1 y 2 contienen muestras de individuos homocigotos para el alelo A, cuyo patrón de bandas es de 252 + 26 pb (no visible en las condiciones de electroforesis utilizadas). Los pocillos 3 y 4 contienen muestras individuos con genotipo AG, cuyo patrón de bandas es de 278 + 252 + 26 pb (no visible en las condiciones de electroforesis utilizadas). No encontramos ningún individuo con genotipo GG. El pocillo 5 contiene el marcador de peso molecular "M; Low DNA Mass Ladder".

### 3.2.7. Análisis de las mutaciones N370S y L444P en el gen *GBA* y genotipo del gen *apoE* mediante pirosecuenciación

La pirosecuenciación es un método de secuenciación por síntesis, donde el pirofosfato liberado como resultado de la incorporación sucesiva de nucleótidos se detecta mediante una cascada de reacciones enzimáticas que conduce finalmente a la emisión de luz (figura 3.6) (Ahmadian *et al.*, 2000; Nyren, 2007; Ronaghi *et al.*, 1996; Ronaghi *et al.*, 1998).

**FIGURA 3.6. Esquema del análisis mediante pirosecuenciación.**



En un primer paso, se incubó el cebador de secuenciación con las enzimas DNA polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa. Este cebador de secuenciación hibridó con la cadena sencilla de DNA molde. A continuación, se produjo la dispensación secuencial de nucleótidos. En los casos donde existía complementariedad de secuencia, la enzima DNA polimerasa incorporó el nucleótido a la cadena nascente generando la liberación de un grupo pirofosfato (PPi), en cantidad equimolar a cantidad nucleótido incorporado. Este PPi liberado fue usado por la enzima sulfurilasa para producir una molécula de adenosín trifosfato (ATP) en presencia de adenosin-5-fosfosulfato (APS). El ATP, a su vez, fue utilizado por la luciferasa para emitir luz mediante la conversión de la luciferina en oxiluciferina. La intensidad de luz emitida fue proporcional al ATP presente. Por otra parte, la enzima apirasa degrada de forma continua el ATP formado y los dNTPs no incorporados apagando de esta forma la emisión de luz y regenerando las condiciones para que pueda ser añadido un nuevo nucleótido en la reacción. En la adición de nucleótidos se sustituyó el dATP por dATP $\alpha$ S porque este sustrato es reconocido eficientemente por la DNA polimerasa pero no por la luciferasa.

Con este método se obtuvo una única secuencia para cada variante alélica, que, posteriormente, fue comparada con un patrón en forma de pirograma.

En primer lugar, se diseñaron las amplificaciones de los fragmentos que contenían los cambios de nucleótidos de interés para los genes *GBA* y *apoE*, y posteriormente se comprobaron las amplificaciones de los productos biotinilados, tal como se describió en los apartados 3.2.4 y 3.2.5 de este mismo capítulo. El requisito previo a la reacción de pirosecuenciación fue obtener productos de PCR de cadena simple. Para ello, uno de cada par de cebadores usados para las distintas reacciones de PCR contenía biotina en su extremo 5'. La biotina permitió capturar el producto de PCR mediante esferas de estreptavidina-sepharosa, que tras un proceso de purificación y desnaturalización, condujo a la obtención de fragmentos de cadena simple.

Para cada una de las mutaciones se diseñó una sonda que hibridaba en el entorno del nucleótido supuestamente mutado, sin solapar con éste. Las secuencias de las sondas se muestran en la tabla 3.12.

TABLA 3.12. Secuencia de las sondas para la pirosecuenciación .

GEN	Variante	CEBADORES
<i>GBA</i>	N370S	5' - TTGTCCTTACCCTAG - 3'
<i>GBA</i>	L444P	5' - GGGCTGGTTGCCAGT - 3'
<i>apoE</i>	Posición 112	5' - CGGACATGGAGGACG - 3'
<i>apoE</i>	Posición 158	5' - GATGCCGATGACCTG - 3'

Se tomaron 15  $\mu$ L de cada producto de amplificación y se mezclaron con 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada estéril. A continuación, se añadió una mezcla de 3  $\mu$ L de estreptavidina-sepharosa con 37  $\mu$ L de tampón de unión y se dejó incubar a temperatura ambiente aproximadamente 15 min en constante agitación para conseguir la unión de la cadena marcada con biotina a las esferas de estreptavidina-sepharosa. Tras la incubación, las muestras se procesaron mediante un sistema de 96 capilares, donde se lavaron con etanol al 70% (v/v), se desnaturalizaron las hebras en una solución de NaOH, se lavaron y se resuspendieron en 40  $\mu$ L de una mezcla de cada cebador de secuenciación (0,4  $\mu$ M) y un tampón de hibridación. Finalmente, se introdujeron las muestras en el pirosecuenciador PSQ 96MA (Pyrosequencing™, Biotage) junto con un cartucho (Biotage) que contenía los nucleótidos, las enzimas y los sustratos. El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante el programa informático administrado por la casa comercial PSQ 96 Software (Pyrosequencing™, Biotage).

### 3.2.8. Purificación de los productos de PCR mediante ExoSAP-IT® (USB)

Previamente a la secuenciación, fue necesario purificar los fragmentos de PCR obtenidos con el fin de eliminar los componentes de la mezcla de PCR, cebadores residuales y los dNTPs en exceso, que podrían interferir de forma negativa en la subsiguiente reacción de secuenciación. Los fragmentos de PCR obtenidos se purificaron mediante el producto comercial EXOSAP-IT® (USB) consta de las enzimas exonucleasa I y fosfatasa alcalina de camarón (SAP) formuladas en un tampón específico. La enzima exonucleasa I degrada los cebadores residuales y el DNA de cadena única producidos durante la reacción de PCR, mientras que la SAP hidroliza los dNTPs remanentes de la mezcla usada para la preparación de la reacción de PCR.

Se mezclaron 5 mL del producto de PCR con 2 mL de ExoSAP-IT® (USB). Se realizaron dos incubaciones consecutivas en un termociclador Veriti (Applied Biosystems), la primera de

ellas a 37°C durante 15 min, seguida de otra a 80°C durante 15 min para conseguir la inactivación de las enzimas. Posteriormente, se conservaron las muestras a 4°C para su inmediata utilización y a -20°C para el almacenamiento hasta su uso.

### 3.2.9. Secuenciación del gen *GBA*

Se secuenciaron los 11 exones que componen el gen, así como los nexos exón-intrón con el fin de analizar la presencia de mutaciones en el gen *GBA*. En primer lugar, se realizó la amplificación, mediante reacción de PCR, de cada uno de los exones del gen *GBA* en las condiciones detalladas en el apartado 3.2.4.5. Tras comprobar mediante electroforesis que el producto de amplificación obtenido fue adecuado, se purificó con EXOSAP-IT® (USB) tal y como se especifica en el apartado 3.2.8. Posteriormente, se realizaron dos reacciones de secuenciación, una secuenciación directa y una reversa, para cada muestra usando los cebadores empleados en la reacción de PCR, descritos en la tabla 3.2.

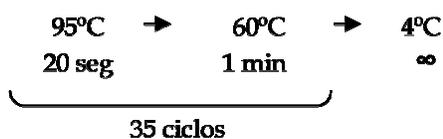
Para llevar a cabo la reacción de secuenciación se empleó el producto comercial “DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit” (GEHealthcare), que contiene una mezcla denominada “DYEnamic ET terminator reagent premix” que aporta DNA polimerasa termoestable Thermo Sequenase™, dNTPs y didesoxinucleótidos trifosfato terminadores (ddNTPs) marcados con fluoresceína, que actúa de donador, y un fluoróforo derivado de la rodamina, uno diferente para cada ddNTP, que actúa como aceptor y que permite la detección automática posterior.

Las reacciones se prepararon en un volumen final de 10 µL en las proporciones que se indican en la tabla 3.13.

**TABLA 3.13. Condiciones de la reacción de secuenciación.**

REACTIVO	VOLUMEN
DYEnamic ET terminator reagent premix	3 µL
Producto de PCR purificado	1 µL
Cebador de secuenciación (5 µM)	0,5 µL
dH <sub>2</sub> O	5,5 µL

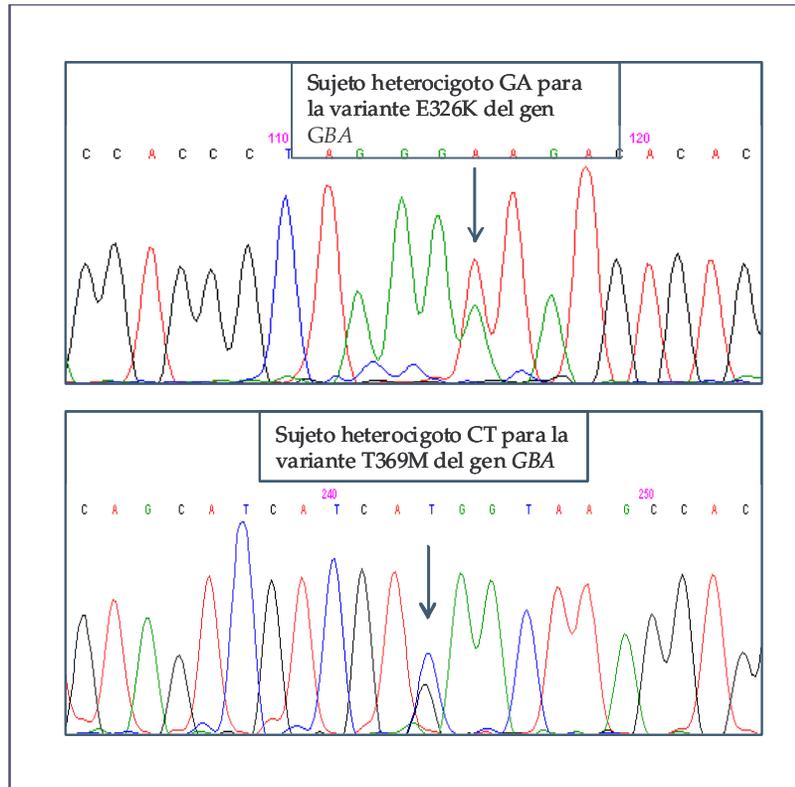
Las condiciones térmicas de la reacción de secuenciación fueron las siguientes:



Los fragmentos obtenidos mediante las reacciones de secuenciación contenían una mezcla heterogénea de fragmentos amplificados específicos, cebadores, nucleótidos no incorporados, enzima, sales, detergentes y, probablemente fragmentos amplificados inespecíficos que interfieren en la reacción de secuenciación. Se purificaron por precipitación alcohólica con el objetivo de eliminar la mayor parte de estos interferentes. Para ello, se añadió 1  $\mu\text{L}$  de acetato amónico 7,5 M y 28,5  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto frío y se centrifugaron las muestras en una centrífuga refrigerada Sigma 3-16K (Sartorius Stedim) a 3850 r.p.m durante 30 min y a 4°C. Después se invirtió la placa que contenía las muestras para la eliminación el sobrenadante mediante centrifugación a 300 r.p.m durante 1 minuto. A continuación se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% (v/v) y se centrifugaron las muestras a 3850 r.p.m durante 5 min y a 4°C. De nuevo se eliminó el sobrenadante centrifugando las muestras invertidas a 300 r.p.m durante 1 min. Tras este paso se dejaron las muestras a temperatura ambiente para que se produjese la evaporación de los restos de alcohol. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 10  $\mu\text{L}$  de una solución de carga proporcionada por el fabricante denominada "Loading Solution" (70% Formamida, 1 mM EDTA).

La electroforesis capilar y la detección de fluorescencia se realizó en el secuenciador automático MegaBACE™ 500 (GEHealthcare). El procesado y análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante el programa MegaBACE Sequence Analyzer V.3.2. (GEHealthcare) (figura 3.7).

**FIGURA 3.7. Electroferogramas obtenidos mediante secuenciación automática.**



Se observan dos fragmentos de la secuencia del gen *GBA* que contienen las variantes E326K y T369M del gen *GBA*. En la figura se indican los puntos de la secuencia que corresponden a individuos heterocigotos para cada una de estas variantes.

### 3.3. Análisis estadístico de los datos

Los datos se recogieron en formato Excel y el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc, versión 15.0). El nivel de confianza fijado para todos los análisis es del 95%, considerando significación estadística un valor de  $p \leq 0,05$ .

- Estadística descriptiva univariada:

Las variables cualitativas (sexo, contacto con tóxicos, empastes de amalgama de mercurio, antecedentes familiares de EP, antecedentes familiares de enfermedad neurológica, presencia de variantes en el gen *GBA*, presencia del alelo  $\epsilon 4$  en el gen *apoE*) se presentaron mediante la distribución de frecuencias absoluta y en porcentajes de cada categoría. Para las variables

cuantitativas (edad, edad al diagnóstico, peso, talla) se determinó la bondad de ajuste a la distribución normal mediante la prueba de Kolgomorov-Smirnov, con la corrección de Lilliefors, y se dieron indicadores de tendencia central (media o mediana) y de dispersión (desviación estándar o amplitud intercuartil) e intervalos de confianza del 95% para todas las variables cuantitativas de la muestra, en función de su distribución.

- Estadística analítica:

- Análisis bivariado: La asociación entre las distintas variables se investigó mediante pruebas de contraste de hipótesis. Se crearon tablas de contingencia que posteriormente fueron sometidas a la prueba de Chi cuadrado de Pearson o la prueba exacta de Fisher para la comparación de proporciones cuando las variables a estudio eran cualitativas. Para la comparación de medias, cuando una de las variables a estudio era cuantitativa, se utilizó: el test de la t de Student para variables con distribución normal, y pruebas no paramétricas (test de la U de Mann-Whitney) si las variables no seguían una distribución normal.
- Análisis multivariado: Adicionalmente se construyeron modelos multivariantes de regresión logística.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Características generales de los sujetos incluidos en el estudio: grupo Parkinson y grupo control

En este apartado se presentan a modo de tablas, las características de los sujetos incluidos en el estudio de casos y controles.

En el anexo VIII se muestran las tablas 1 y 2, que incluyen las características antropométricas de ambos grupos (número de identificación, edad en el momento de la toma de muestra, peso, talla y, en el grupo casos, edad al diagnóstico).

En las tablas incluidas en el anexo IX, se presentan los resultados de la encuesta sobre factores de riesgo estudiados para la enfermedad de Parkinson: exposición a agentes tóxicos, empastes dentales de amalgama de mercurio, antecedentes familiares de EP y antecedentes familiares de enfermedad neurológica.

### 4.2. Estudio descriptivo de la muestra

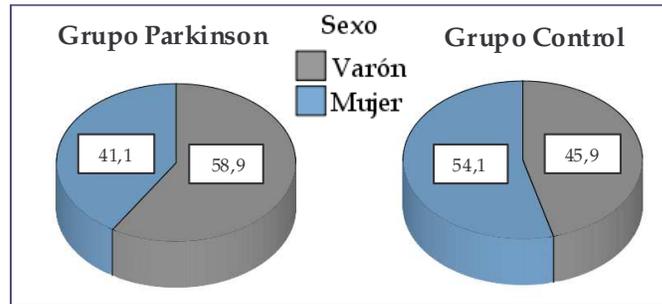
En este apartado se presentan los resultados del estudio descriptivo en el que se analizan las características antropométricas de los 221 sujetos que han participado en el estudio de casos y controles.

En primer lugar, se determinó la bondad de ajuste de todas las variables cuantitativas (edad, edad al diagnóstico, peso, talla) mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors, y posteriormente se determinaron indicadores de tendencia central (media aritmética, mediana), indicadores de dispersión (desviación estándar, amplitud intercuartil), e intervalos de confianza del 95% para todas las variables cuantitativas de la muestra. Las variables cualitativas (sexo, exposición a agentes tóxicos, empastes dentales de amalgama de mercurio, antecedentes familiares de EP, presencia de variantes en el gen *GBA*, presencia del alelo  $\epsilon 4$  en el gen *apoE*) se presentaron mediante las frecuencias absolutas y/o en porcentajes para cada categoría.

- Sexo:

La distribución de frecuencias según el sexo, en porcentaje, en ambos grupos se muestra en la figura 4.1.

**FIGURA 4.1. Distribución de la muestra según el sexo.**



La proporción de varones y mujeres en el grupo de pacientes con EP y en el grupo control fue similar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, según indica la prueba de Chi cuadrado de Pearson ( $p=0,052$ ).

- Edad, peso y talla:

En primer lugar, se determinó, para las variables edad, peso y talla, la bondad de ajuste a la distribución normal mediante la prueba de Kolgomorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors. Las distribuciones muestrales de la edad y el peso no siguieron una distribución normal en ninguno de los dos grupos a estudio ( $p<0,05$ ), mientras que la talla se ajustó a una distribución normal en ambos grupos ( $p>0,05$ ).

En la tabla 4.1 se detallan la media ( $\pm$  desviación estándar), el intervalo de confianza al 95% para la media, mediana y amplitud intercuartil de las variables edad, peso y talla para cada uno de los grupos a estudio.

**TABLA 4.1. Distribución de edad, peso y talla en los grupos Parkinson y control.**

		EDAD (años)			
Grupo	n	Media (DE)	IC 95 %	Mediana	Amplitud intercuartil
Parkinson	112	68,1 (±8,89)	66,5 – 69,8	70	11,0
Control	109	66,0 (15,04)	63,1 – 68,8	69	20,5
		PESO (Kg)			
Grupo	n	Media (DE)	IC 95 %	Mediana	Amplitud intercuartil
Parkinson	112	73,6 (13,13)	71,2 – 76,1	75	21,0
Control	109	70,9 (12,27)	68,3 – 73,5	70	21,5
		TALLA (cm)			
Grupo	n	Media (DE)	IC 95 %	Mediana	Amplitud intercuartil
Parkinson	112	165,1 (9,69)	163,3 – 166,9	165	15,0
Control	109	164,4 (8,78)	162,5 – 166,2	165	12,0

DE: Desviación estándar. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

Mediante la comparación de medias a través de las pruebas estadísticas adecuadas para cada variable, test de la t de Student para la talla y test de la U de Mann-Whitney para la edad y el peso, se observó que no existen diferencias significativas entre ambos grupos para las variables edad ( $p=0,198$ ), peso ( $p=0,170$ ) y talla ( $p=0,572$ ), es decir, la edad, el peso y la talla presentan valores homogéneos entre los pacientes con EP y los controles.

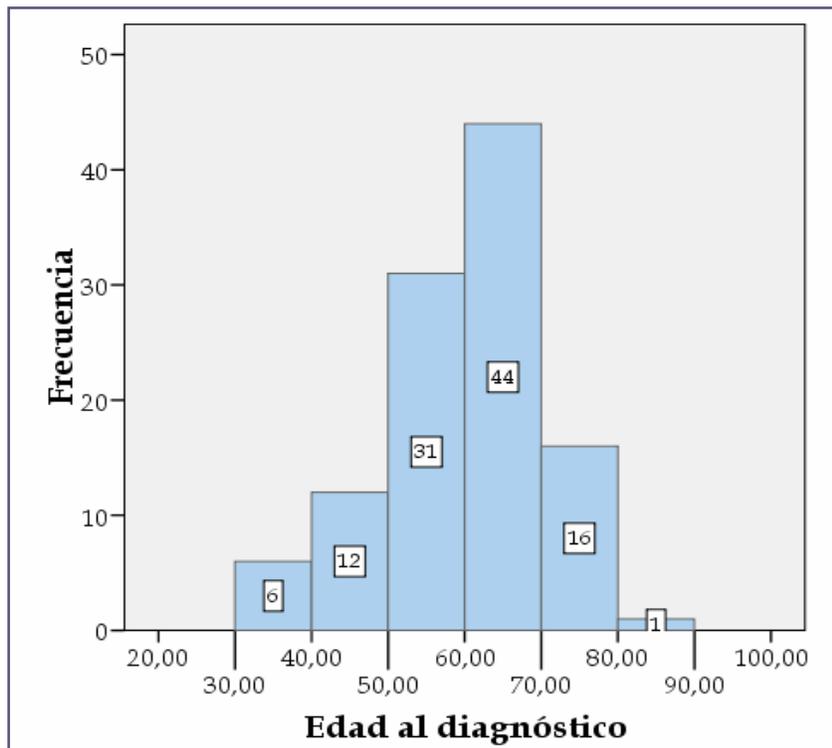
- Distribución de la edad de inicio de la enfermedad de Parkinson:

En primer lugar, se determinó la bondad de ajuste a la distribución normal mediante la prueba de Kolgomorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors. La edad de inicio de EP no siguió una distribución normal ( $p=0,048$ ).

La edad media de aparición de la enfermedad de Parkinson fue de 59,7 años, con una desviación estándar asociada de 10,48; el intervalo de confianza para la media al fue de 57,7 - 61,7; la mediana fue de 61, con una amplitud intercuartil de 14 años.

En la figura 4.2 se muestra la distribución de la edad de aparición de la EP, clasificada por intervalos. Se han expresado los resultados de frecuencia en porcentaje. El histograma muestra que la enfermedad se inicia entre los 60 y los 70 años en el 44% de los pacientes con EP.

**FIGURA 4.2. Histograma: Edad de inicio de la EP.**

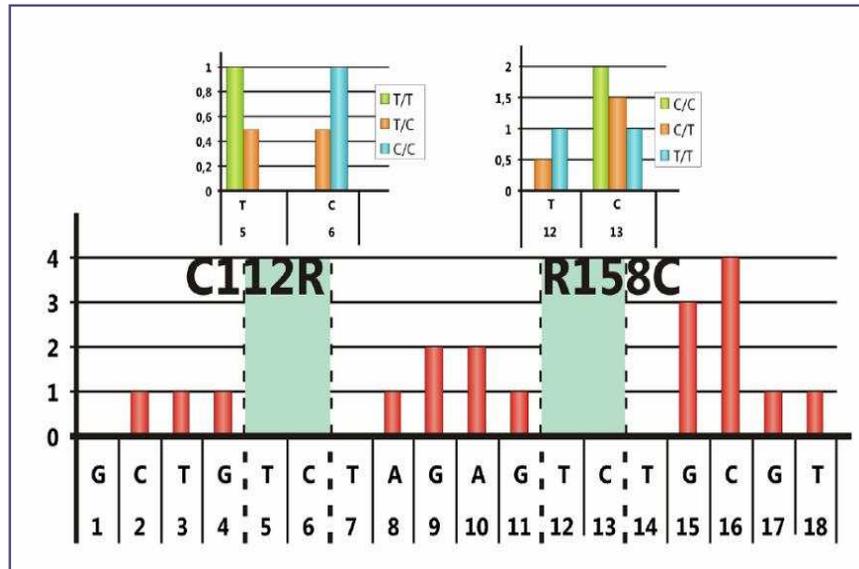


### 4.3. Gen *apoE*

#### 4.3.1. Determinación del genotipo del gen *apoE*

El análisis del genotipo del gen *apoE* en los grupos Parkinson y control se llevó a cabo mediante la técnica de pirosecuenciación, tal y como se describe en el apartado 3.2.7 del capítulo *Materiales y Métodos*. En la figura 4.3 se muestra el esquema que representa el orden de adición de los nucleótidos y los patrones esperados para el análisis del gen *apoE* mediante pirosecuenciación.

**FIGURA 4.3. Patrón esperado para el análisis del genotipo *apoE* mediante pirosecuenciación.**



Se muestra el orden de adición de los nucleótidos y en la parte superior se observan los patrones esperados para los pirogramas correspondientes a los diferentes genotipos de *apoE*.

En la figura 4.4 se muestran los pirogramas obtenidos para los distintos genotipos de *apoE* observados en las dos poblaciones a estudio.

**FIGURA 4.4. Pirogramas obtenidos para el análisis del genotipo *apoE*.**



El análisis del gen *apoE* mediante pirosecuenciación permitió calcular las frecuencias genotípicas y alélicas para las poblaciones Parkinson y control, recogidas en la tabla 4.2.

**TABLA 4.2. Frecuencias genotípicas y alélicas de *apoE* en los grupos Parkinson y control.**

Genotipos	Frecuencia genotípica CONTROL	n	Frecuencia genotípica PARKINSON	n
$\epsilon 2/\epsilon 2$	0	0	0	0
$\epsilon 2/\epsilon 3$	0,175	19	0,152	17
$\epsilon 3/\epsilon 3$	0,651	71	0,723	81
$\epsilon 4/\epsilon 4$	0,009	1	0	0
$\epsilon 2/\epsilon 4$	0	0	0	0
$\epsilon 3/\epsilon 4$	0,165	18	0,125	14
TOTAL	1	109	1	112
Alelos	Frecuencia alélica CONTROL	n	Frecuencia alélica PARKINSON	n
$\epsilon 2$	0,087	19	0,076	17
$\epsilon 3$	0,821	179	0,862	193
$\epsilon 4$	0,092	20	0,062	14
TOTAL	1	218	1	224

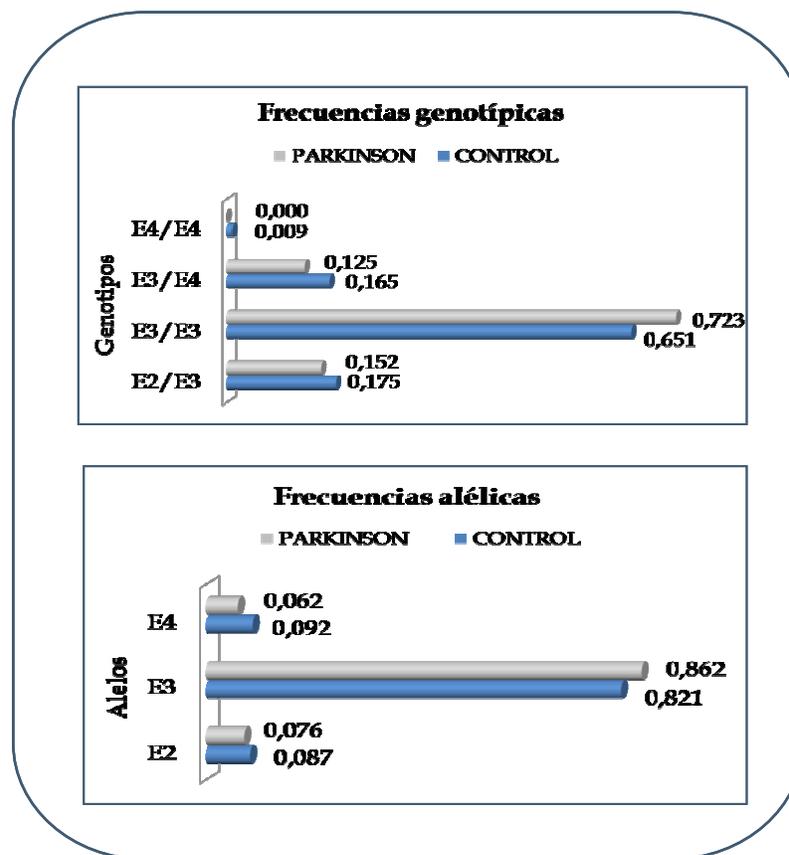
Como puede apreciarse en la tabla, entre todas las muestras analizadas, únicamente se encontró un sujeto perteneciente al grupo control con el genotipo  $\epsilon 4/\epsilon 4$ . Cabe destacar que no se encontró ningún individuo que presentase los genotipos  $\epsilon 2/\epsilon 2$  y  $\epsilon 2/\epsilon 4$  en ninguna de las dos poblaciones a estudio.

Los resultados revelaron que las frecuencias alélicas halladas en pacientes con EP y controles son muy similares, por lo que ninguna isoforma de la apolipoproteína E parece estar asociada con un mayor riesgo de desarrollar EP. El alelo  $\epsilon 3$  es el alelo que presenta mayor frecuencia alélica en ambos grupos (86,2% en el grupo de pacientes con EP frente al 82,1% en población control).

#### 4.3.2. Asociación entre la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen *apoE* y el riesgo de desarrollar EP

Se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas de los grupos Parkinson y control (figura 4.5) aplicando el test estadístico de Chi cuadrado de Pearson o la prueba exacta de Fisher en función de la distribución de los datos.

FIGURA 4.5. Frecuencias genotípicas y alélicas de *apoE* en los grupos Parkinson y control.



No se observaron diferencias significativas en cuanto a la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de *apoE* entre ambos grupos ( $p > 0,05$ ).

Además de comparar las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas en ambos grupos mediante la utilización de pruebas de significación estadística y los correspondientes valores  $p$ , se estimó como medida de asociación el odds-ratio (OR) y el intervalo de confianza al 95% (IC 95%). El OR permite cuantificar la asociación entre la aparición de alelo  $\epsilon 4$  y el riesgo de padecer enfermedad de Parkinson. Se encontró un OR de 0,68; 95% CI: 0.32 - 1.43 ( $p = 0,330$ ). El valor de OR, inferior a la unidad, implica que la presencia del alelo  $\epsilon 4$  en el grupo Parkinson es menos

frecuente que en el grupo control, por lo que parece no existir asociación positiva entre la presencia del alelo  $\epsilon 4$  y la aparición de EP.

Paralelamente, se realizó la comparación entre la edad de inicio de la EP entre los pacientes que portaban el alelo  $\epsilon 4$  y aquellos que no lo portaban mediante la prueba estadística de la U de Mann-Whitney, y se comprobó que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,438$ ) en la edad de inicio de la EP entre ambos grupos.

Puesto que no se encontró asociación entre las isoformas de la apolipoproteína E y el riesgo de desarrollar EP, no se evaluaron las manifestaciones clínicas asociadas.

#### 4.4. Gen *GBA*

##### 4.4.1. Incidencia de las mutaciones N370S y L444P en el gen *GBA* en población general aragonesa

Para conocer la incidencia de las mutaciones más frecuentes responsables de la enfermedad de Gaucher en población general aragonesa, se determinó la frecuencia alélica de las mutaciones N370S y L444P mediante la técnica de pirosecuenciación, tal y como se describe en el apartado 3.2.7 del capítulo *Materiales y Métodos*.

El análisis del gen *GBA* mediante pirosecuenciación permitió calcular las frecuencias genotípicas y alélicas en población general aragonesa, que se muestran en la tabla 4.3.

La frecuencia alélica encontrada en la población a estudio fue de 0,0023 para la mutación N370S y de 0,0008 para la mutación L444P.

**TABLA 4.3. Frecuencias genotípicas y alélicas de las mutaciones N370S y L444P en el gen *GBA* en población general aragonesa.**

		FRECUENCIA POBLACIÓN GENERAL	n
<b>N370S</b>			
<b>GENOTIPOS</b>	AA	0,9954	644
	AG	0,0046	3
	GG	0	0
<b>ALELOS</b>	A	0,9977	1291
	G	0,0023	3
<b>L444P</b>			
<b>GENOTIPOS</b>	TT	0,9985	646
	TC	0,0015	1
	CC	0	0
<b>ALELOS</b>	T	0,9992	1293
	C	0,0008	1

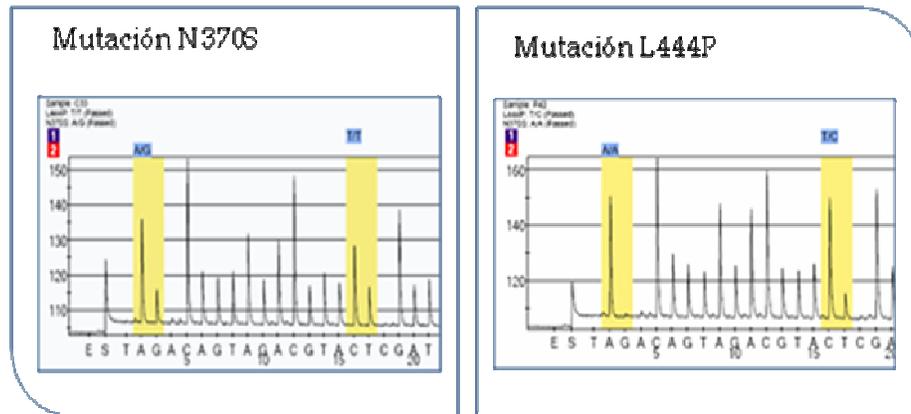
#### 4.4.2. Análisis molecular del gen *GBA*

Inicialmente, se realizó la amplificación del gen *GBA* completo con objeto de identificar la presencia de grandes deleciones y conseguir la amplificación exclusiva del gen estructural, evitando la amplificación del seudogén. La amplificación del gen completo no reveló la presencia de grandes deleciones en ninguno de los sujetos incluidos en el estudio.

Para llevar a cabo el análisis del gen *GBA* se siguió un protocolo que incluía el análisis las mutaciones N370S y L444P del gen *GBA* mediante pirosecuenciación, el análisis de la variante c.(-203)A>G en el gen *GBA* mediante digestión con enzimas de restricción y, por último, secuenciación de toda la región codificante y las uniones exón-intrón del gen que codifica la glucocerebrosidasa.

El análisis de las mutaciones N370S y L444P del gen *GBA* se llevó a cabo mediante la técnica de pirosecuenciación, tal y como se describe en el apartado 3.2.7 del capítulo *Materiales y Métodos*. En la figura 4.6 se muestran los pirogramas obtenidos para las mutaciones N370S (c.1226 A>G) y L444P (c.1448 T>C) del gen *GBA*. El análisis de estos pirogramas permitió el cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas para las estas mutaciones (tabla 4.4).

**FIGURA 4.6. Pirogramas obtenidos mediante pirosecuenciación para el análisis de las mutaciones N370S y L444P del gen GBA.**



**TABLA 4.4. Frecuencias genotípicas y alélicas de las mutaciones N370S y L444P en el gen GBA en los grupos Parkinson y control.**

N370S		FRECUENCIA CONTROL	n	FRECUENCIA PARKISON	n
GENOTIPOS	AA	0,982	107	1	112
	AG	0,018	2	0	0
	GG	0	0	0	0
ALELOS	A	0,991	216	1	224
	G	0,009	2	0	0
L444P		GRUPO CONTROL	n	GRUPO PARKISON	n
GENOTIPOS	TT	1	109	0,982	110
	TC	0	0	0,018	2
	CC	0	0	0	0
ALELOS	T	1	218	0,991	222
	C	0	0	0,009	2

No se encontró ningún paciente con EP portador de la mutación N370S, sin embargo esta mutación aparecía en dos individuos pertenecientes al grupo control. No obstante, el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas para la mutación N370S no reveló diferencias significativas entre los grupos Parkinson y control, según indica la prueba exacta de Fisher ( $p=0,242$ ).

En cuanto a la mutación L444P, a pesar de que la comparación entre las frecuencias genotípicas y alélicas en ambos grupos no mostró la existencia de diferencias significativas, según indica la prueba exacta de Fisher ( $p=0,498$ ), cabe destacar que esta mutación se identificó exclusivamente en los pacientes con EP.

Las frecuencias alélicas obtenidas para las mutaciones N370S y L444P en el grupo Parkinson se compararon con las frecuencias alélicas encontradas para estas mutaciones en población general aragonesa. Aplicando la prueba exacta de Fischer no se observaron diferencias significativas ( $p=1,000$ ) entre ambas frecuencias para la mutación N370S. Por el contrario, las diferencias entre las frecuencias alélicas encontradas para la mutación L444P prácticamente alcanzaron significación estadística según indica la prueba exacta de Fisher ( $p=0,0585$ ). La frecuencia del alelo menor para la mutación L444P en los pacientes con EP resultó ser 23 veces mayor que la encontrada en población general aragonesa.

En un trabajo realizado previamente por nuestro grupo, se encontró que la variante c.(-203)A>G, localizada en el exón 1 del gen *GBA*, estaba asociada a otra mutación localizada en el mismo alelo, en algunos de los pacientes diagnosticados de EG que mostraban un fenotipo más grave de la enfermedad y que, en algunos casos, incluía el desarrollo de EP (Alfonso *et al.*, 2007). Por ello, tras el barrido inicial de las mutaciones más frecuentes en el gen *GBA* en nuestra población (N370S, L444P), se analizó la variante c.(-203)A>G del gen *GBA* mediante análisis de restricción con la enzima de restricción *BclI*, como se detalla en el apartado 3.2.6 del capítulo *Materiales y Métodos*.

Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas para cada una de las poblaciones a estudio se detalla en la tabla 4.5.

**TABLA 4.5. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante c.(-203)A>G del gen *GBA* en los grupos Parkinson control.**

c. (-203)A>G		FRECUENCIA CONTROL		FRECUENCIA PARKISON	
			n		n
<b>GENOTIPOS</b>	AA	0,954	104	0,973	109
	AG	0,046	5	0,027	3
	GG	0	0	0	0
<b>ALELOS</b>	A	0,977	213	0,987	221
	G	0,023	5	0,013	3

La variante c.(-203)A>G del gen *GBA* se encontró, en heterocigosis, en el 2,7% pacientes con EP y en 4,6% de los controles. Se efectuó la comparación entre las frecuencias genotípicas y alélicas para esta variante haciendo uso de la prueba exacta de Fisher, cuyo resultado evidenció que no existen diferencias significativas entre los grupos Parkinson y control ( $p=0,495$ ).

Por último, se efectuó el análisis del gen *GBA* completo en las poblaciones estudiadas mediante secuenciación automática con objeto de encontrar nuevas variantes que permitiesen corroborar los resultados obtenidos. Se secuenciaron los 11 exones y los nexos exón-intrón del gen *GBA*, tal y como se especifica en el apartado 3.2.9 del capítulo *Materiales y Métodos*. Tras realizar la secuenciación de toda la región codificante del gen *GBA* así como las uniones exón-intrón, se identificaron dos variantes adicionales en el gen *GBA* (E326K y T369M), ya descritas previamente en la literatura. Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas para estas variantes en ambos grupos se recogen en la tabla 4.6.

**TABLA 4.6. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes E326K y T369M del gen *GBA* en los grupos Parkinson y control.**

E326K		FRECUENCIA CONTROL		FRECUENCIA PARKISON	
			n		n
GENOTIPOS	GG	1	109	0,991	111
	GA	0	0	0,009	1
	AA	0	0	0	0
ALELOS	G	1	218	0,996	223
	A	0	0	0,004	1
T369M		GRUPO CONTROL		GRUPO PARKISON	
			n		n
GENOTIPOS	CC	0,982	107	0,964	108
	CT	0,018	2	0,036	4
	TT	0	0	0	0
ALELOS	C	0,991	216	0,982	220
	T	0,009	2	0,018	4

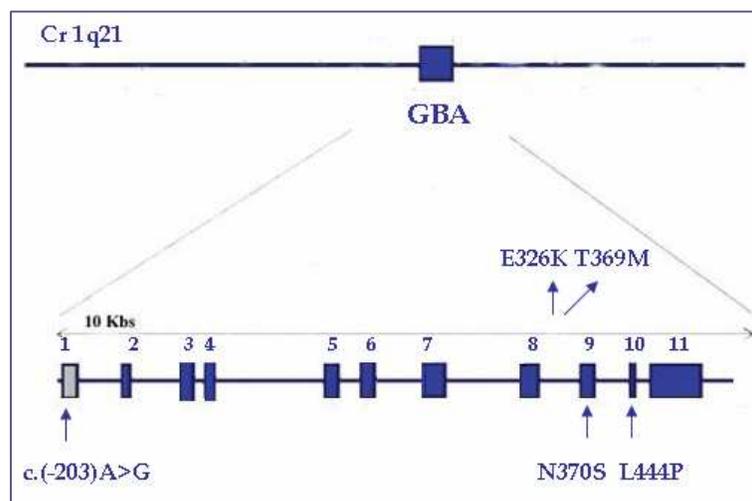
La variante E326K del gen *GBA*, que resulta de la sustitución de G por A en el nucleótido situado en la posición genómica 6195, se detectó en uno de los 224 alelos estudiados en los pacientes diagnosticados de EP (0,4%), mientras que no se encontró en ninguno de los sujetos control. Aplicando la prueba exacta de Fisher, no se observaron diferencias significativas en cuanto a las frecuencias genotípicas y alélicas de la variante E326K ( $p=1,000$ ) entre los grupos Parkinson y control estudiados.

La variante T369M (c.1223 C>T) presentó doble incidencia en el grupo Parkinson con respecto al grupo control, pese a ello no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, según indicó la prueba exacta de Fisher ( $p=0,683$ ).

#### 4.4.3. Asociación entre la presencia de variantes en el gen *GBA* y el riesgo de desarrollar enfermedad de Parkinson

Las variantes identificadas en el gen *GBA* para los 221 sujetos incluidos en el estudio fueron: c.(-203)A>G, E326K, T369M, N370S y L444P. La figura 4.7 muestra la distribución de las variantes a lo largo del gen *GBA*, en la que se evidencia una zona con mayor frecuencia de mutaciones comprendida entre los exones 8 y 10 del gen de la glucocerebrosidasa.

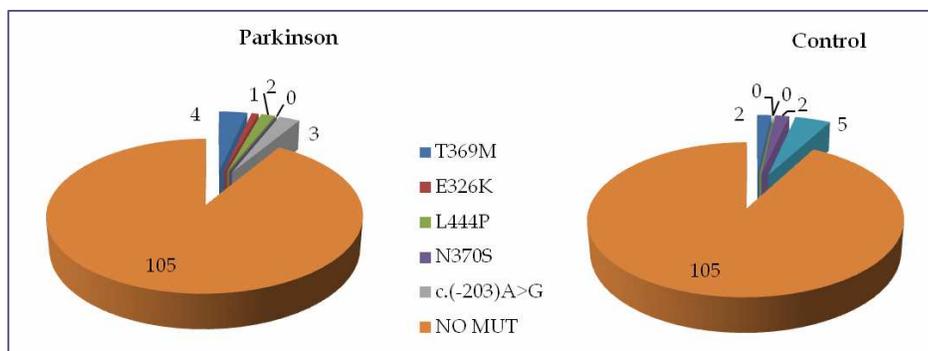
**FIGURA 4.7. Distribución de las variantes encontradas a lo largo del gen *GBA*.**



Los números 1-11 representan los diferentes exones. Las flechas indican la localización de cada una de las variantes.

La figura 4.8 refleja la distribución de las variantes encontradas en el gen *GBA* en los grupos estudiados: Parkinson y control.

**FIGURA 4.8. Distribución de las variantes encontradas en el gen *GBA* en los grupos Parkinson y control.**



Se confirmó la presencia de estas variantes resecuenciando de nuevo, mediante la realización de una reacción de PCR independiente. Todas las variantes detectadas habían sido descritas previamente en la literatura (Aharon-Peretz *et al.*, 2004; Alfonso *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2007; Eblan *et al.*, 2006; Lwin *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2005; Toft *et al.*, 2006; Ziegler *et al.*, 2007). En la tabla 4.7 se detallan todas las variantes identificadas en el gen *GBA* en las dos poblaciones de estudio.

**TABLA 4.7. Variantes identificadas en el gen *GBA* en los grupos Parkinson y control.**

Parkinson (n = 112) Nº ID	Cambio de nucleótido	Cambio de nucleótido	Efecto en la función de la proteína
PK42 PK107	c.1448 T > C	L444P	Cambio de aminoácido/ Grave
PK88	c.1093 G > A	E326K	Desconocido/ Posible variante modificadora
PK20 PK51 PK79 PK90	c. 1223 C > T	T369M	Desconocido/ Posible variante modificadora
PK12 PK14 PK103	c. (-203)A>G		Desconocido/ Posible variante modificadora
Controles (n = 109) Nº ID	Cambio de nucleótido	Cambio de nucleótido	Efecto en la función de la proteína
C33 C36	c.1226 A > G	N370S	Cambio de aminoácido/ Leve
C10 C86	c. 1223 C > T	T369M	Desconocido/ Posible variante modificadora
C32 C44 C46 C69 C84	c. (-203)A>G		Desconocido/ Posible variante modificadora

Nº ID: Número de identificación del sujeto.

Entre los hallazgos encontrados, cabe destacar que todas las variantes encontradas en el gen *GBA* fueron heterocigotas, en ambas poblaciones.

En la figura 4.9 se muestran las frecuencias alélicas para cada una de las variantes del gen *GBA* que se han identificado en los 109 sujetos que constituían el grupo control y los 112 pacientes con EP.

**FIGURA 4.9. Frecuencias alélicas para las variantes identificadas en el gen *GBA* en la población control y Parkinson.**



Se calculó la frecuencia para todas las variantes identificadas en el gen *GBA* en ambos grupos. No se incluyó la variante c.(-203)A>G para el cálculo de la frecuencia total de variantes en el gen *GBA*, en base a la frecuencia encontrada para esta variante en población control, así como a las hipótesis que sostienen otros autores, que consideran esta variante como un polimorfismo frecuente en población general (Alfonso *et al.*, datos no publicados). La frecuencia global de las variantes encontradas en el gen *GBA* se detalla en la tabla 4.8.

Se encontró que un 6,3% de los pacientes con EP eran portadores de alguna variante en el gen *GBA*, mientras que la frecuencia de portadores de variantes en el gen *GBA* fue de 3,7% para los sujetos pertenecientes al grupo control. Pese a que la proporción de portadores de variantes en el gen *GBA* es mayor en los pacientes con EP, la comparación entre las frecuencias obtenidas para ambos grupos no reveló diferencias significativas, según indica la prueba Chi cuadrado de Pearson ( $p=0,378$ ).

**TABLA 4.8. Frecuencia global de las variantes identificadas en el gen *GBA* en los grupos Parkinson y control.**

		NO VARIANTES GEN <i>GBA</i>	VARIANTES GEN <i>GBA</i>	TOTAL
CONTROL	Recuento	105	4	109
	%	96,3%	3,7%	100%
PARKINSON	Recuento	105	7	112
	%	93,7%	6,3%	100%
TOTAL	Recuento	210	11	221
	%	95%	5%	100%

Para determinar la asociación existente entre padecer la enfermedad de Parkinson y presentar alguna variante en el gen *GBA*, se calculó el odds-ratio y el intervalo de confianza al 95%. El OR para la presencia de variantes en el gen *GBA* en el grupo Parkinson con respecto al grupo control fue de 1,72; 95% CI, 0,51 - 5,77 ( $p=0,567$ ). El valor de OR refleja que la presencia de variantes en el gen *GBA* es más frecuente en el grupo Parkinson que en el grupo control y por lo tanto pone de manifiesto una asociación entre la presencia de variantes en el gen *GBA* y la ocurrencia de EP. No obstante, esta asociación no fue significativa.

Algunas de las comparaciones estadísticas realizadas están limitadas por el tamaño muestral utilizado para el estudio y por la baja frecuencia de la mutación en el gen *GBA* en población general. Es por ello que, *a posteriori*, tras la obtención de los resultados en nuestros grupos de estudio, se calculó tamaño muestral necesario que permitiría detectar diferencias entre ambos grupos. El tamaño de muestra se estimó conociendo que el 6,3% de los sujetos con enfermedad de Parkinson presentaban alteraciones en el gen *GBA*, mientras que estas alteraciones alcanzaron un 3,7% en los sujetos control. Asumiendo estos datos y el tipo de diseño de este estudio (casos y controles, grupos independientes), el tamaño estimado de muestra a estudiar, para una prueba bilateral con un control por caso (con un nivel de confianza del 95% y una potencia del 90%), sería de  $N=1475$ ; con corrección de Yates  $N=1551$ .

#### 4.4.4. Asociación entre la presencia de variantes en el gen *GBA* y el riesgo de desarrollar enfermedad de Parkinson de inicio precoz

Para evaluar si la presencia de variantes en el gen *GBA* puede constituir un factor de susceptibilidad genética para el comienzo precoz de la enfermedad de Parkinson, se calculó la edad de aparición de la enfermedad estratificada según la presencia de variantes en el gen *GBA*. En la tabla 4.9 se presenta la media ( $\pm$  desviación estándar), el intervalo de confianza para la media al 95%, mediana y la amplitud intercuartil de la edad de aparición de la EP.

**TABLA 4.9. Edad de aparición de EP estratificada según la presencia de variantes en el gen *GBA*.**

		EDAD DE APARICIÓN DE LA EP (años)			
PRESENCIA DE VARIANTES EN EL GEN <i>GBA</i>	n	Media (DE)	IC 95 %	Mediana	Amplitud intercuartil
No variante	105	60,2 (10,20)	58,24 – 62,23	61	14,0
Variante	7	52,6 (12,77)	38,54 – 60,61	57	29,0

DE: Desviación estándar. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

La enfermedad tuvo un comienzo más temprano en los pacientes que presentaban variantes en el gen *GBA*. Según los resultados que arrojó la aplicación del test de la U de Mann-Whitney al comparar la edad de aparición de EP entre ambos grupos ( $p=0,065$ ), la diferencia encontrada no alcanza la significación estadística.

Se calculó la edad de comienzo de la enfermedad en los pacientes con enfermedad de Parkinson y que eran portadores heterocigotos de la mutación L444P, considerada grave para la enfermedad de Gaucher. La edad media de aparición de la EP ( $\pm$  desviación estándar) encontrada fue de 40,5 ( $\pm$  4,95) años, la mediana fue de 40,5 años, con un rango de 7 años. La comparación entre la edad de comienzo de la enfermedad para estos pacientes con el resto de pacientes sin alteraciones en el gen *GBA*, evidenció diferencias estadísticamente significativas, según el test de la U de Mann-Whitney ( $p=0,031$ ).

#### 4.5. Manifestaciones clínicas en pacientes con enfermedad de Parkinson y variantes en el gen *GBA*

Paralelamente al estudio centrado en el análisis de las variantes del gen *GBA* en los pacientes con EP, se estudiaron las manifestaciones clínicas asociadas a los pacientes portadores de mutaciones en *GBA*.

Se revisaron los datos clínicos de los 10 pacientes con EP portadores de variantes en el gen *GBA*. Se evaluaron las manifestaciones clínicas que presentaban estos pacientes al diagnóstico y en el momento de realizar la entrevista previa a la inclusión dentro del estudio. Las variables clínicas relativas a la EP que se estudiaron fueron las siguientes:

- Edad al inicio
- Bradicinesia-hipocinesia
- Temblor
- Rigidez
- Inicio asimétrico
- Antecedentes familiares de enfermedad de Parkinson
- Respuesta al tratamiento con L-DOPA
- Demencia
- Estadío evolutivo Hoehn y Yahr (H&Y)

La edad al diagnóstico fue analizada previamente, tal como se expone en el apartado 4.4.4 de este capítulo, puesto que la asociación de la presencia de variantes en el gen *GBA* y el desarrollo de enfermedad de Parkinson precoz constituía por si misma un objetivo en este estudio. Adquiere especial relevancia el hallazgo de que los dos pacientes heterocigotos para la mutación L444P debutan antes de los 50 años y por lo tanto presentan EP de inicio precoz.

En cuanto a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, no se observaron diferencias entre los pacientes portadores de variantes en el gen *GBA* y los pacientes que portaban la variante c.(-203)A>G, que se ha considerado un polimorfismo.

En lo referente a los síntomas motores fundamentales de la enfermedad, sólo fue posible disponer de los datos clínicos de 9 de los 10 pacientes con EP portadores de variantes en el gen *GBA*. El síntoma más frecuente al comienzo de la enfermedad fue el temblor, presente en 4 de

los 9 pacientes (44%), seguido de rigidez (3/9: 33%) y únicamente 2 pacientes (22%) presentaron bradicinesia como hallazgo dominante en la exploración. Además, 6 de ellos presentaron un fenotipo clínico caracterizado por un inicio asimétrico de los síntomas motores, predominantemente en el lado izquierdo.

Solamente uno entre los 10 pacientes portadores de variantes *GBA* fue diagnosticado de enfermedad de Parkinson de tipo familiar, puesto que tenía un familiar de primer grado con EP. Los 9 restantes presentan EP de tipo esporádico.

Todos los pacientes mostraron una respuesta favorable al tratamiento convencional de la enfermedad con L-DOPA, a excepción de un paciente diagnosticado de enfermedad de Parkinson juvenil, rápidamente progresiva y refractario al tratamiento antiparkinsoniano.

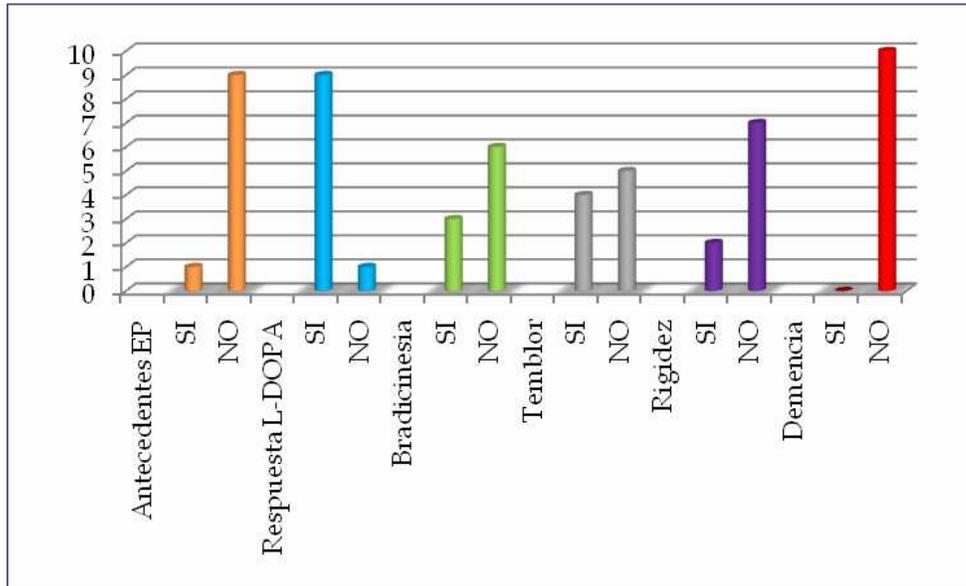
El resultado de la evaluación no reveló la presencia de demencia en ninguno de estos pacientes.

En lo referente a la distribución del estadio evolutivo de la enfermedad según la escala de H&Y, se observó gran heterogeneidad entre los pacientes en los cuáles se conocía este dato (1 paciente en estadio II, 2 pacientes en estadio III, 1 paciente en estadio V). Este resultado indica que no existe correlación entre un estadio más avanzado en la escala de H&Y y la presencia de variantes en el gen *GBA*; asimismo evidencia la elevada variabilidad clínica presente entre estos pacientes.

La figura 4.10 refleja esquemáticamente las manifestaciones clínicas presentes en los pacientes portadores de variantes en el gen *GBA*.

Nuestros resultados ponen de manifiesto la existencia de una gran variabilidad clínica puesto que no existe una relación clara entre el fenotipo observado y el genotipo del gen *GBA* entre los pacientes con EP.

**FIGURA 4.10. Manifestaciones clínicas en pacientes con EP y variantes en el gen GBA.**



#### 4.6. Factores de riesgo implicados en el desarrollo de enfermedad de Parkinson

En este apartado se presentan los resultados de nuestro estudio, donde se analizaron tres factores de riesgo para la enfermedad de Parkinson en los 221 sujetos incluidos en el estudio. La información relativa a cada uno de los sujetos control y pacientes diagnosticados de EP se obtuvo de los datos recogidos mediante la realización de cuestionarios estructurados (Anexo VI).

En la tabla 4.10 se recogen las frecuencias observadas para los factores de riesgo estudiados en los grupos Parkinson y control.

**TABLA 4.10. Frecuencia de factores de riesgo en los grupos Parkinson y control.**

Factor de riesgo	PARKINSON (n=112)	CONTROL (n=109)	P
Contacto con agentes tóxicos	16 (14,3 %)	5 (4,6 %)	0,014
Empastes dentales de amalgama de mercurio	24 (21,4%)	10 (9,2%)	0,012
Antecedentes familiares de enfermedad de Parkinson	12 (10,7%)	1 (1,1%)	0,002

p: Grado de significación estadística según la prueba de Chi cuadrado de Pearson.

Todos los factores de riesgo que se han incluido en el estudio presentan mayor frecuencia entre los pacientes con EP con respecto a los controles.

- Exposición a agentes tóxicos:

La variable exposición a agentes tóxicos se codificó como una variable dicotómica, en la que se incluyó el contacto con tóxicos agrícolas e industriales. La proporción de individuos expuestos a agentes tóxicos fue superior en el grupo Parkinson que en el grupo control. Esta diferencia fue estadísticamente significativa, según indicó la prueba estadística Chi cuadrado de Pearson ( $p=0,014$ ).

El odds-ratio calculado estima la asociación existente padecer EP y la exposición a agentes tóxicos. El OR para la presencia de variantes en el gen *GBA* en el grupo Parkinson con respecto al grupo control fue de 3,47; IC 95%: 1,22 - 9,83 ( $p=0,020$ ), lo que implica que la exposición a agentes tóxicos es más frecuente entre los pacientes con EP y por lo tanto pone de manifiesto una asociación entre la exposición a agentes tóxicos y el desarrollo de EP.

En la tabla 4.11 se presentan los datos estadísticos de la edad de aparición de la enfermedad de Parkinson estratificada en función de la exposición a agentes tóxicos de los individuos que conforman el grupo Parkinson.

**TABLA 4.11. Edad de aparición de EP estratificada en función de la exposición a agentes tóxicos.**

		EDAD (años)			
Grupo	n	Media (DE)	IC 95 %	Mediana	Amplitud intercuartil
No contacto con tóxicos	94	60,0 (10,31)	57,9 – 62,1	61	13,3
Contacto con tóxicos	16	58,3 (12,77)	51,5 – 65,1	62	24,0

DE: Desviación estándar. IC 95%:Intervalo de confianza al 95%.

La enfermedad comienza a una edad más temprana en los pacientes que han estado en contacto con agentes tóxicos en comparación con los que no lo han hecho. Sin embargo, comparando la edad de aparición de EP mediante la prueba estadística de la U de Mann-

Whitney, se observó que las diferencias entre ambos grupos para la edad de inicio de la EP no son estadísticamente significativas ( $p=0,609$ ).

- Empastes dentales de amalgama de mercurio:

La frecuencia de empastes dentales de amalgama de mercurio en los individuos que constituyen los grupos Parkinson y control se detalla en la tabla 4.10. Los resultados de nuestro estudio indican que existió una mayor proporción de sujetos con empastes dentales de amalgama de mercurio entre los pacientes con EP. Se realizó la comparación entre la proporción de sujetos con empastes dentales de amalgama de mercurio y la proporción de sujetos que no los presentaban, mediante la prueba estadística de Chi cuadrado de Pearson y se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p=0,012$ ).

Los resultados obtenidos apuntan a una mayor frecuencia de sujetos con empastes dentales de amalgama de mercurio entre los pacientes con EP cuando se compararon con el grupo control,  $OR=2,70$ ; 95% CI: 1,22 - 5,96 ( $p=0,015$ ), lo cual condujo a considerar los empastes dentales de amalgama de mercurio como un factor de riesgo para padecer EP, concretamente incrementó el riesgo de aparición de la enfermedad 2,7 veces con respecto a los individuos que no tenían empastes dentales de amalgama de mercurio.

En la tabla 4.12 se muestran los datos estadísticos para la edad media de aparición de la enfermedad en el grupo Parkinson estratificada en función de la presencia de empastes dentales de amalgama de mercurio.

**TABLA 4.12. Edad de aparición de EP estratificada en función de la presencia de empastes dentales de amalgama de mercurio.**

		EDAD (años)			
Grupo	n	Media (DE)	IC 95 %	Mediana	Amplitud intercuartil
No presencia empastes	86	59,9 (11,02)	57,5 – 62,3	62	13,3
Presencia empastes	24	59,3 (9,42)	55,3 – 63,2	59	16,3

DE: Desviación estándar. IC 95%:Intervalo de confianza al 95%.

Comparando la edad de comienzo de la enfermedad para ambos grupos mediante la prueba de la U de Mann-Whitney, se observó que la edad de comienzo de la enfermedad es muy similar entre ambos grupos, y por ello no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p=0,781$ ).

- Antecedentes familiares de enfermedad de Parkinson:

La frecuencia de antecedentes familiares de enfermedad de Parkinson para los pacientes con enfermedad de Parkinson y los controles se especifica en la tabla 4.10. Nuestros resultados revelan una mayor proporción de sujetos que presentaban antecedentes familiares de EP entre los pacientes con EP en comparación con el grupo control. La prueba estadística de Chi cuadrado de Pearson detectó diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p=0,006$ ).

El OR calculado fue de 13,09; IC 95%: 1,67 - 102,52 ( $p=0,003$ ), y mide el efecto ajustado de presentar antecedentes familiares de EP sobre el riesgo de padecer enfermedad de Parkinson, es decir, tener antecedentes familiares de EP aumenta el riesgo de padecer EP aproximadamente 13 veces, si las restantes variables permanecen constantes.

En la tabla 4.13 se presentan los datos estadísticos para la edad de aparición de la enfermedad en el grupo Parkinson estratificada en función de los antecedentes familiares de enfermedad de Parkinson.

**TABLA 4.13. Edad de aparición de EP estratificada en función de los antecedentes familiares de enfermedad de Parkinson.**

		EDAD (años)			
Grupo	n	Media (DE)	IC 95 %	Mediana	Amplitud intercuartil
No antecedentes Familiares EP	98	60,0 (10,67)	57,9 – 62,1	61	14,3
Antecedentes Familiares EP	12	57,7 (10,82)	50,8 – 64,5	61	14,5

DE: Desviación estándar. IC 95%:Intervalo de confianza al 95%.

Los pacientes con antecedentes familiares de EP debutaron con la enfermedad a una edad más temprana que los pacientes que presentaban una EP de tipo esporádico. No se observaron

diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,492$ ) en la edad de aparición de EP entre ambos grupos, según indica la prueba de la U de Mann-Whitney.

A la vista de los resultados mostrados, se utilizó la regresión logística para identificar qué variables podrían incluirse como posibles predictores de ocurrencia de enfermedad de Parkinson. Las variables candidatas a predecir la ocurrencia de EP son: exposición a agentes tóxicos (tóxicos agrícolas e industriales), empastes dentales de amalgama de mercurio y antecedentes familiares de EP. Se realizó un análisis multivariado para evaluar de forma simultánea el efecto del sexo, la edad, la exposición a agentes tóxicos, la presencia de empastes dentales de amalgama de mercurio y antecedentes familiares de EP, sobre la aparición de EP.

Como resultado del análisis multivariado se obtuvo que las variables sexo y edad no se incluyeron como factores de riesgo de EP en el modelo de regresión logística utilizado, mientras que el resto de variables estudiadas si se incluyeron como variables modificadoras para la aparición de EP. Los individuos expuestos a agentes tóxicos mostraron un riesgo aproximadamente 4 veces mayor de padecer EP ( $\exp(\beta)=3,62$ ), los sujetos que presentaban empastes dentales de amalgama de mercurio mostraron un riesgo de desarrollar EP aproximadamente el doble al riesgo de los sujetos sin empastes dentales de amalgama de mercurio ( $\exp(\beta)=2,17$ ), y, por último, aquellos sujetos con antecedentes familiares de EP tenían un riesgo aproximadamente 13 veces mayor de padecer la enfermedad ( $\exp(\beta)=12,88$ ).

Acerca de los factores de riesgo estudiados implicados en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, cabe destacar que el 30% de los pacientes portadores de variantes en el gen *GBA* tenían empastes de amalgama de mercurio y/o habían estado en contacto con agentes tóxicos. Esta observación sugiere que estos factores de riesgo para el desarrollo de EP no están asociados directamente con la presencia de variantes en el gen *GBA*.

## 5. **DISCUSIÓN**

El presente trabajo se basa en un estudio tipo caso-control retrospectivo con emparejamiento 1:1, que consiste en seleccionar grupos de sujetos con los mismos valores en las principales variables de confusión de modo que a cada caso le corresponde su control, que en la mayoría de los casos fue su cónyuge. Con este diseño se intentó minimizar el posible sesgo debido al sexo, edad y factores ambientales, ya que cada pareja caso-control habría estado expuesta a los mismos factores ambientales. Para ello se establecieron dos grupos: control y enfermedad de Parkinson, según los criterios de inclusión descritos en el apartado 3.1.1 del capítulo *Materiales y Métodos*.

### 5.1. **Análisis de las características generales de las poblaciones estudiadas**

En el estudio de casos y controles realizado, las distribuciones de edad, peso y talla, así como la proporción de varones y mujeres, no difieren de forma estadísticamente significativa entre los pacientes con enfermedad de Parkinson y los controles puesto que la selección de los sujetos incluidos en el estudio se ha diseñado de manera que exista homogeneidad entre las dos poblaciones a estudio.

En la literatura no se alcanza un consenso en cuanto a la consideración del sexo como un factor de riesgo para desarrollar enfermedad de Parkinson (Alonso Navarro *et al.*, 2008b; Baba *et al.*, 2005; Tanner, 1992; Tanner and Goldman, 1996; Vines *et al.*, 1999). Nuestros resultados muestran una mayor proporción de varones entre los pacientes con enfermedad de Parkinson. La mayor incidencia de la enfermedad de Parkinson en hombres que en mujeres sugiere que existen factores asociados al género, ya sean estos hormonales o de otro tipo, que podrían estar implicados en el desarrollo de la enfermedad y modular la progresión de la misma. Trabajos experimentales recientes llevados a cabo en modelos animales de enfermedad de Parkinson, demuestran que los estrógenos pueden tener un efecto neuroprotector (Disshon and Dluzen, 1997; Miller *et al.*, 1998) que podría contribuir a la menor incidencia de la enfermedad de Parkinson en mujeres encontrada en varios estudios (Diamond *et al.*, 1990; Parkinson Study Group, 1989).

Si bien, cabe destacar que en nuestro estudio, la incidencia de la enfermedad de Parkinson en función del género no es valorable puesto que en el diseño de este trabajo no se consideró como objetivo y carece de la metodología adecuada para esta determinación.

El histograma mostrado en la figura 4.2, que representa la distribución muestral de la edad de inicio de la enfermedad de Parkinson, pone de manifiesto que la enfermedad se inicia entre los 60 y los 70 años en casi la mitad de los casos. Este hallazgo coincide con lo descrito en estudios previos, donde se recoge que los síntomas típicos de la enfermedad de Parkinson comienzan habitualmente a partir de la sexta década de la vida (Alonso Navarro, 2008; Hoehn and Yahr, 1967; Lees *et al.*, 2009; Lyons *et al.*, 1998). Por esta razón se ha sugerido una relación entre la enfermedad de Parkinson y el envejecimiento. El envejecimiento provoca cambios en el sistema nigroestriado, aunque estos son más marcados en los pacientes con enfermedad de Parkinson. El aumento de prevalencia de la enfermedad de Parkinson en relación con la edad está suficientemente demostrado (Lang and Lozano, 1998), puesto que la prevalencia de la enfermedad sufre un incremento exponencial con la edad. Además, la influencia de la edad de comienzo en la expresión de algunos síntomas de la enfermedad de Parkinson apoya el posible papel que desempeña el envejecimiento como factor de riesgo en dicha enfermedad.

## **5.2. Estudio de polimorfismos genéticos en el gen *apoE* y presencia de variantes en el gen *GBA* asociados a enfermedad de Parkinson**

Numerosos estudios han demostrado la importancia de las contribuciones genéticas en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, demostrando que los factores genéticos producen una mayor susceptibilidad o modificaciones en la enfermedad, afectando a la penetrancia, edad de inicio, gravedad y progresión de la misma (Farrer, 2006; Lesage and Brice, 2009).

Pese a la gran cantidad de estudios realizados no se ha logrado identificar el locus mayor de la enfermedad de Parkinson, considerándose que su desarrollo es dependiente de múltiples factores ambientales y genéticos, dentro de los cuáles se podrían encontrar las variantes polimórficas de algunos genes como *GBA* y *apoE*. Por esta razón, en el presente estudio se ha analizado la posible implicación de la presencia de variantes en los genes *GBA* y *apoE* en el desarrollo de enfermedad de Parkinson. Aunque el trabajo realizado se ha dirigido principalmente al análisis del gen *GBA* en pacientes con enfermedad de Parkinson, el estudio se ha completado con el análisis del gen *apoE*. Dada la complejidad de la enfermedad de Parkinson

y la disparidad en los resultados sobre la posible relación entre la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Gaucher descritos en la literatura, el trabajo realizado ha pretendido contribuir a estudiar la relación entre ambas enfermedades.

### 5.2.1. Asociación entre enfermedad de Parkinson y polimorfismos genéticos en el gen *apoE*

Hasta la actualidad, existen discrepancias acerca de la asociación del genotipo *apoE* con el riesgo de padecer enfermedad de Parkinson entre los diferentes estudios descritos en la literatura. Por un lado, algunos de los estudios realizados apuntan hacia una posible asociación entre un determinado genotipo de *apoE* y el aumento en el riesgo de padecer enfermedad de Parkinson, aunque los resultados no alcanzan la significación estadística en la mayoría de los casos (Huang *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004). Huang *et al.* (2004) describen una mayor prevalencia del alelo  $\epsilon 2$  en los pacientes con enfermedad de Parkinson respecto a la población sana, sugiriendo de este modo, que el alelo  $\epsilon 2$  puede constituir un factor de riesgo para la enfermedad de Parkinson. En cuanto al alelo  $\epsilon 4$ , varios autores lo han relacionado con la enfermedad de Parkinson, tanto en presencia como en ausencia de deterioro cognitivo en los pacientes (Caselli *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2006; Parsian *et al.*, 2002). Aunque la relación existente entre la presencia de este alelo y la evolución de la enfermedad de Parkinson no se ha descrito, algunos autores han encontrado un comienzo más temprano de la enfermedad en los portadores del alelo  $\epsilon 4$  (Li *et al.*, 2004; Pankratz *et al.*, 2006; Troster *et al.*, 2006). Sin embargo, otros estudios no aprecian una relación consistente entre el genotipo de *apoE* y la enfermedad de Parkinson.

Como ya se adelanta en el capítulo *Resultados*, el alelo  $\epsilon 3$  en nuestra muestra es el más frecuente, lo que concuerda con los hallazgos encontrados en estudios previos (Huang *et al.*, 2004).

En nuestro estudio, la relación entre el alelo  $\epsilon 4$  y la presencia de enfermedad de Parkinson no fue significativa. La estimación del odds-ratio apunta hacia una asociación negativa entre la presencia del alelo  $\epsilon 4$  y la aparición de enfermedad de Parkinson, corroborando lo descrito anteriormente en otros estudios (Blazquez *et al.*, 2006; Helisalmi *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2004). Además, dentro de nuestra población de pacientes con enfermedad de Parkinson, ninguna combinación de alelos tiene influencia sobre la edad de inicio de la enfermedad, conforme a la conclusión de Parsian *et al.* (Parsian *et al.*, 2002).

### 5.2.2. Asociación entre enfermedad de Parkinson y la presencia de variantes en el gen *GBA*

Dentro del extenso espectro fenotípico observado en la enfermedad de Gaucher, se observa que algunos de estos pacientes desarrollan enfermedad de Parkinson. El espectro de manifestaciones parkinsonianas asociado a la enfermedad de Gaucher, ha suscitado un creciente interés en el análisis de la asociación entre la enfermedad de Parkinson y las mutaciones en el gen *GBA*, sugiriendo que éstas deben constituir un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad de Parkinson.

La etnia judía de origen Askhenazi posee la mayor incidencia de enfermedad de Gaucher y en esta población se ha descrito asociación entre ambas entidades (Aharon-Peretz *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2007; Gan-Or *et al.*, 2008), lo cual podría ser casual o específico de esta población concreta. Por este motivo es de interés conocer si la asociación entre enfermedad de Parkinson y enfermedad de Gaucher se produce en poblaciones de origen no judío.

Aunque no se ha realizado un metanálisis, se observa discordancia en los resultados publicados por distintos colectivos. Varios autores han encontrado un incremento en la frecuencia de las mutaciones en el gen *GBA* en cohortes de pacientes con enfermedad de Parkinson (Bras *et al.*, 2009; De Marco *et al.*, 2008; Eblan *et al.*, 2006; Kalinderi *et al.*, 2009; Lwin *et al.*, 2004; Mitsui *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2005; Sidransky *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2007). La frecuencia de las mutaciones en el gen *GBA* comprende un rango que oscila entre 10,7% y 31,3% para las poblaciones de origen Ashkenazi y entre 2,3% y 9,4% en pacientes cuyo origen no es Ashkenazi. Entre los estudios publicados, uno de los más consistentes es el estudio multicéntrico realizado por Sidransky *et al.* (2009), en el que demuestran que las mutaciones en el gen *GBA* constituyen uno de los factores genéticos implicados en la aparición de enfermedad de Parkinson en los pacientes de enfermedad de Gaucher, y pueden constituir un factor modificador en la enfermedad de Parkinson (Sidransky *et al.*, 2009). Si bien, es importante destacar que la heterocigosidad para las mutaciones en el gen *GBA* constituye un factor de riesgo adicional para padecer enfermedad de Parkinson siempre que el individuo presente una predisposición previa a desarrollar la enfermedad (Hruska *et al.*, 2006; Sidransky, 2005).

En algunos de estos trabajos se ha planteado, además, la hipótesis acerca de la implicación de las mutaciones en el gen *GBA* en el desarrollo de un inicio precoz en la enfermedad de

Parkinson (Aharon-Peretz *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2007; Eblan *et al.*, 2006; Gan-Or *et al.*, 2008; Kalinderi *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007).

No obstante, existen estudios que informan acerca de una menor frecuencia de mutaciones en el gen *GBA* o que no encuentran una asociación concluyente entre el desarrollo de enfermedad de Parkinson y la presencia de mutaciones en el gen *GBA* (Socal *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2007; Toft *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007). Respecto a estos trabajos, hay que hacer mención a los métodos empleados para la detección de mutaciones en el gen *GBA*, puesto que en este punto existen discrepancias entre los resultados obtenidos por distintos estudios. Estas diferencias pueden atribuirse al análisis de algunas mutaciones específicas del gen *GBA* que se han analizado en los distintos estudios y cuya frecuencia difiere entre los distintos grupos étnicos (Gutti *et al.*, 2008). Por este motivo, el origen de la población a estudio es un factor a tener en cuenta a la hora de diseñar el estudio. Algunos trabajos analizan exclusivamente un número determinado de mutaciones conocidas en el gen *GBA* de manera que se produce un sesgo debido a la pérdida de información relativa al del resto del gen. Toft *et al.* (2006) y Tan *et al.* (2007) analizaron únicamente las mutaciones N370S y L444P del gen *GBA*; Wu *et al.* (2007) analizaron las mutaciones R120W, L444P y RecNcil y Socal *et al.* (2009) analizaron las mutaciones N370S, L444P, IVS2+1 y 84GG. Es por ello que, aunque se estudiaron grandes cohortes de pacientes en estos estudios, los resultados obtenidos no son concluyentes. Asimismo, en la realización de un estudio de casos y controles se requiere una especial atención respecto a la selección de la población control para que exista homogeneidad entre las poblaciones estudiadas. Socal *et al.* (2009) estudiaron las cuatro mutaciones más frecuentes en su población en una cohorte pequeña de pacientes con enfermedad de Parkinson, pero no se realizó el correspondiente estudio en una población control adecuada, lo que limita las conclusiones finales de su estudio.

El protocolo seguido en nuestro estudio para llevar a cabo el análisis del gen *GBA* incluía la amplificación del gen *GBA* completo con objeto de identificar la presencia de grandes deleciones, el barrido de las mutaciones más frecuentes en nuestra población, N370S y L444P, el análisis de una variante c.(-203)A>G encontrada por nuestro grupo en la zona promotora del gen *GBA* (Alfonso *et al.*, 2007), y, finalmente, la secuenciación de toda la región codificante y las uniones exón-intrón del gen *GBA*.

La amplificación del gen completo no reveló la presencia de grandes deleciones en ninguno de los sujetos incluidos en el estudio, este hecho constituye un hallazgo esperado,

puesto que la frecuencia de grandes deleciones en el gen *GBA* es baja (Alfonso *et al.*, 2007). Este método nos permitió eliminar, a su vez, la presencia del seudogén, de alta homología con el gen funcional, que difiere del gen estructural debido a que posee varias deleciones en los intrones 2, 4, 6 y 7 y en los exones 9 y 4 y múltiples mutaciones puntuales, localizadas tanto en los exones como en los intrones correspondientes del gen estructural (Horowitz *et al.*, 1989). La presencia de este seudogén complica la identificación y caracterización de mutaciones en el gen estructural. Algunos de los estudios previos en los cuales se analizó un número limitado de mutaciones del gen *GBA* pueden estar influenciados por la presencia del seudogén.

Optamos por realizar un proceso paso a paso para profundizar en el estudio de las mutaciones en el gen *GBA*. Inicialmente, se efectuó un barrido para las dos mutaciones del gen *GBA* más frecuentes en nuestra población (Alfonso *et al.*, 2007).

La estimación de la incidencia de las dos mutaciones más frecuentes responsables de la enfermedad de Gaucher en población general aragonesa nos permite conocer la verdadera frecuencia alélica de estas mutaciones en nuestra población. Esto resulta interesante puesto que es ampliamente conocido que las frecuencias alélicas de las mutaciones en el gen *GBA* difieren entre los diferentes grupos étnicos. Además, la estimación de la frecuencia alélica de la mutación N370S calculada en base a la prevalencia de esta mutación en los pacientes con enfermedad de Gaucher puede ser erróneamente infravalorada ya que algunos homocigotos para la mutación N370S son asintomáticos y escapan a la detección (Beutler and Gelbart, 1993). Esta circunstancia se ha puesto de manifiesto recientemente en un estudio llevado a cabo por Mistry *et al.*, en el que se llega a la conclusión de que los pacientes homocigotos para la mutación N370S son especialmente vulnerables a sufrir retrasos diagnósticos y, por tanto, a sufrir complicaciones posteriores, debido a la poca expresividad con que las manifestaciones clásicas de la enfermedad pueden aparecer en estos pacientes inicialmente (Mistry *et al.*, 2007).

La frecuencia alélica de la mutación N370S en población general en la comunidad autónoma de Aragón fue de 0,0023. Esta estimación es similar a la descrita en otras poblaciones europeas. La frecuencia alélica determinada por Lacerda *et al.* en población portuguesa (Lacerda *et al.*, 1994) fue de 0,0043 y en la población griega la frecuencia alélica encontrada fue de 0,0046 (Dimitrou, 2010). La frecuencia alélica para la mutación L444P es muy baja en población general aragonesa (0,0008). Este resultado no se puede comparar con estudios realizados en otras poblaciones, ya que no hemos encontrado bibliografía al respecto.

La frecuencia alélica encontrada para la mutación N370S en pacientes con enfermedad de Parkinson no difiere estadísticamente de la frecuencia alélica observada para esta mutación en la población control, ni tampoco de la frecuencia alélica de esta mutación en nuestra población en la Comunidad Autónoma de Aragón. La mutación N370S se detectó en el 1,83 % de los controles, sin embargo, no se identificó en ninguno de los pacientes con enfermedad de Parkinson. Esta observación parece descartar la relación entre esta mutación y la enfermedad de Parkinson, corroborando los resultados obtenidos por otros grupos, que han encontrado una incidencia muy baja de esta mutación entre pacientes con enfermedad de Parkinson (Jmoudiak and Futerman, 2005; Strasberg *et al.*, 1994). Este hecho sostiene la teoría tradicionalmente aceptada que asocia la mutación N370S con la ausencia de afectación neurológica en la enfermedad de Gaucher. En contraposición, varios estudios previos realizados en población Ashkenazi, han encontrado que la mutación más común entre los enfermos de Parkinson es la N370S. La asociación entre esta mutación en el gen *GBA* y la enfermedad de Parkinson únicamente ha sido significativa en estudios realizados en población judía Ashkenazi (Gan-Or *et al.*, 2008), en la cual la mutación N370S tiene una prevalencia muy elevada (Mitsui *et al.*, 2009; Velayati *et al.*). Por lo tanto, nuestro resultado concuerda con este hecho ya que nuestra población se limitó a individuos de ascendencia europea.

Respecto a la mutación L444P, cabe destacar que solamente se identificó en el grupo Parkinson. Dos pacientes con enfermedad de Parkinson (1,78%) son portadores heterocigotos para la mutación L444P, mientras que esta mutación no se encontró en ninguno de los controles sanos. La mutación L444P presenta mayor prevalencia entre los pacientes con enfermedad de Parkinson, existiendo una diferencia importante ( $p=0,0585$ ) con la frecuencia alélica observada para esta mutación en la población control, aunque ésta no logre alcanzar la significación estadística. Considerando que la frecuencia alélica para la mutación L444P es muy baja en población general aragonesa, este hallazgo constata la existencia de una posible asociación entre la enfermedad de Parkinson y la mutación L444P, tal como se había puesto de manifiesto en anteriores estudios publicados (Mitsui *et al.*, 2009). Por otra parte, este resultado confirma que los portadores de mutaciones graves en el gen *GBA* tienen un riesgo particularmente alto de desarrollar enfermedad de Parkinson (Gan-Or *et al.*, 2008) y que en la población control no es frecuente encontrar variantes del gen *GBA* asociadas con enfermedad de Gaucher grave, conforme a la conclusión de Bras *et al.* (2009) (Bras *et al.*, 2009).

La variante c.(-203)A>G, localizada en el exón 1 del gen *GBA*, que contiene gran cantidad de elementos implicados en la regulación del gen de la glucocerebrosidasa (Doll *et al.*, 1995;

Moran *et al.*, 1997), podría ser candidata a modificar la expresión del gen *GBA* y la funcionalidad de la proteína. El resultado del análisis de esta variante muestra que, paradójicamente, el alelo mutado G es más frecuente en los controles que en los pacientes con enfermedad de Parkinson. Por este motivo, esta variante se ha considerado como un polimorfismo frecuente en población general, como ya se ha demostrado en otros estudios realizados en nuestro grupo (Alfonso *et al.*, datos no publicados) y no se ha tenido en cuenta a la hora de hallar la frecuencia total de las variantes identificadas en el gen *GBA* en nuestro estudio. A pesar de ello, se ha encontrado que este polimorfismo constituye una alteración genética que afecta a la funcionalidad de la proteína, provocando una disminución en su actividad (Alfonso *et al.*, datos no publicados).

El hecho de que se haya propuesto que son las variantes raras del gen *GBA*, y no las más frecuentes, las que están implicadas en una mayor susceptibilidad a padecer enfermedad de Parkinson (Mitsui *et al.*, 2009), refuerza la importancia del estudio extensivo de todo el gen, ya que estas variantes no se detectan en los estudios de asociación llevados a cabo mediante el análisis de un número limitado de mutaciones en el gen *GBA* (Tan *et al.*, 2007; Toft *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007). La secuenciación de gen completo se realiza en pocas ocasiones (Farrer *et al.*, 2009; Hruska *et al.*, 2006), pero es necesaria para conseguir una imagen real del riesgo en la población. En nuestro estudio se realizó una búsqueda exhaustiva de mutaciones a lo largo de todo el gen y no sólo el barrido para las alteraciones más frecuentes, obteniendo que el 6,3% de los pacientes con enfermedad de Parkinson tienen alguna alteración en el gen *GBA*. Esta observación corrobora lo expuesto en el estudio multicéntrico publicado por Sidransky *et al.* (2009), donde se expone que el 7% de los pacientes con enfermedad de Parkinson presentan variantes en el gen *GBA* en poblaciones de origen no Ashkenazi.

El análisis exhaustivo del gen *GBA* concluyó con la identificación de cinco variantes: c.(-203)A>G, E326K, T369M, N370S y L444P, todas ellas descritas previamente en la literatura.

Las frecuencias alélicas y genotípicas encontradas para las variantes E326K y T369M no fueron diferentes entre los grupos control y Parkinson. No obstante, cabe destacar que la variante E326K se encuentra únicamente en el grupo Parkinson y que la variante T369M tiene doble incidencia en los pacientes con enfermedad de Parkinson. Aunque existen estudios previos sobre la posible consideración de las variantes E326K y T369M del gen *GBA* como polimorfismos presentes en la población general con una frecuencia mayor de 0,01. En nuestro estudio las frecuencias para el alelo menor de las variantes E326K y T369M no superan esta

frecuencia de 0,01, umbral a partir del cuál una variante se considera polimorfismo (Farrer *et al.*, 2009; Lwin *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2002; Sidransky *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2003).

Según lo publicado en la literatura, otro motivo por el cual algunos estudios sostienen que estas variantes son polimorfismos, es que estas variantes se han descrito asociadas a mutaciones compuestas en el gen que codifica la glucocerebrosidasa en pacientes afectados de enfermedad de Gaucher, considerando que la presencia de otra mutación patogénica en el mismo alelo es responsable última de la enfermedad (Lwin *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2002). Sin embargo, en nuestro trabajo se examinó cuidadosamente el resto del gen para los pacientes portadores de las variantes E326K y T369M y en ningún caso existe otra mutación que co-ocorra junto con estas variantes. Por todo ello, hemos considerado las variantes E326K y T369M como variantes que podrían estar implicadas en la funcionalidad de la glucocerebrosidasa, de acuerdo con lo manifestado en estudios previos (Clark *et al.*, 2007; Lwin *et al.*, 2004).

En nuestro estudio, la variante E326K no se detectó en la población control, sin embargo, fue identificada en uno de los pacientes con enfermedad de Parkinson, mientras que la variante T369M presenta una doble incidencia en el grupo Parkinson respecto al grupo control. Este hecho respaldó la decisión de incluirlas como variantes a pesar de la existencia de publicaciones que las consideran como polimorfismos neutrales.

Este resultado coincide con lo descrito por Rozenberg *et al.* (2006), que no encontraron la variante E326K en ninguno de los 100 alelos estudiados en población control (Rozenberg *et al.*, 2006), mientras que Farrer *et al.* (2009) identificaron la variante E326K en aproximadamente un 5% de los pacientes y en el 1% de los controles, por lo que sostienen que la aparición de la variante E326K refleja una tendencia hacia la asociación con la demencia con cuerpos de Lewy (Farrer *et al.*, 2009).

En un estudio realizado por nuestro grupo, se observó que todos los portadores de la variante E326K en uno de los alelos, presentaban algún tipo de alteración neurológica (Alfonso *et al.*, 2007). Ese hallazgo ratifica el posible incremento en el riesgo de padecer alteraciones neurológicas entre los heterocigotos compuestos para E326K.

El análisis funcional sugiere que la mutación E326K debe constituir una variante modificadora en lugar de un polimorfismo neutral, aunque la homocigosidad de esta variante no conduzca al desarrollo de enfermedad de Gaucher (Montfort *et al.*, 2004). Grace *et al.* (1999)

demonstraron, a través de estudios de expresión *in vitro* y de eficiencia catalítica, que la enzima mutada E326K tenía una actividad residual del 30% respecto a la proteína salvaje (Grace *et al.*, 1999). Estos datos fueron corroborados por nuestro grupo en un estudio posterior, mostrando una actividad residual específica similar (Torralba *et al.*, 2001). Chabas *et al.* (2005) también consideran la variante E326K como una variante modificadora debido a que el estudio de expresión de glucocerebrosidasa mutante E326K muestra una actividad del 42,7% respecto a la forma salvaje (Chabas *et al.*, 2005).

Todas las variantes del gen *GBA* identificadas en nuestro estudio fueron heterocigotas. Existen comunicaciones respecto al hecho de que las alteraciones en el gen que codifica la glucocerebrosidasa, incluso en heterocigotos, constituyen un factor de riesgo adicional para el desarrollo de enfermedad de Parkinson cuando existe una predisposición previa a padecer la enfermedad (Lesage and Brice, 2009; Sidransky, 2005). La observación de que las variantes en el gen *GBA* podrían constituir un factor común de susceptibilidad para el desarrollo de enfermedad de Parkinson de inicio precoz proporcionan un ejemplo de que la heterocigosidad de un gen en una enfermedad mendeliana puede actuar como factor de riesgo en otras enfermedades complejas (Wu *et al.*, 2007). Por tanto, es importante resaltar que, a pesar de que la significación patogénica de una mutación heterocigota simple en el gen *GBA* permanece sin clarificarse, no puede considerarse un estado absolutamente asintomático (Aharon-Peretz *et al.*, 2004).

La naturaleza de la asociación entre la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Parkinson permanece sin esclarecerse completamente. Se han formulado varias hipótesis que plantean la existencia de mecanismos convergentes que contribuyen a la neurodegeneración con objeto de desentrañar la relación entre ambas enfermedades. Los estudios experimentales respaldan la idea de que existe un nexo biológico entre la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Parkinson debido a la existencia de múltiples mecanismos que conducen al desarrollo de enfermedad de Parkinson entre los portadores de variantes en el gen *GBA*, entre los que se incluyen alteraciones lipídicas, acumulación de proteínas aberrantes o mal plegadas, disfunción lisosomal, deterioro del sistema ubiquitina proteasoma, disfunción mitocondrial y de los mecanismos protectores del stress oxidativo y apoptosis (Gan-Or *et al.*, 2008). Sin embargo, el mecanismo molecular responsable de la EP en portadores de mutaciones en el gen *GBA* no se conoce con exactitud y, por lo tanto, son necesarios más estudios para elucidar la el mecanismo fisiopatológico convergente implicado en ambas enfermedades

Aharon *et al.* (2004) proponen que la mayoría de los portadores de alelos mutados para el gen *GBA*, en los cuales no se desarrolla enfermedad de Parkinson, disponen de un mecanismo genético efectivo que les permite prevenir el depósito y la acumulación de glucocerebrósido en las neuronas dopaminérgicas o que degrada eficazmente el glucocerebrósido depositado en ellas (Aharon-Peretz *et al.*, 2004).

En nuestra población, en la comunidad autónoma de Aragón (1.345.473 habitantes), con una prevalencia para la enfermedad de Gaucher del 1,1 por 100.000 habitantes, hemos observado una frecuencia global de asociación de 6,3% portadores de variantes en el gen *GBA* entre los pacientes con enfermedad de Parkinson, frente a 3,7% portadores de variantes en el gen *GBA* en el grupo control. Este hallazgo se encuentra dentro de los valores descritos por otros estudios en población de origen no Ashkenazi, dónde la proporción de portadores de variantes en el gen *GBA* oscila entre 2,4% y 9,4% (Velayati *et al.*, 2010). Este resultado es muy diferente al encontrado por Aharon-Peretz *et al.*, donde se analizaron 6 de las mutaciones más comunes en el gen *GBA* en pacientes diagnosticados de enfermedad de Parkinson de origen Ashkenazi, identificando 31 pacientes con alteraciones en el gen *GBA* (31,3%), de manera que la frecuencia de mutaciones encontradas en el gen *GBA* fue más de cinco veces superior a la frecuencia de mutaciones *GBA* encontrada en los dos grupos control utilizados: población sana y pacientes con enfermedad de Alzheimer. Cabe destacar que la elección de los grupos control dista mucho de ser ideal debido a la posible superposición clínica existente entre la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Además, los sujetos incluidos en el grupo control de población de origen Ashkenazi tienen edades muy heterogéneas y no se determinó la ausencia de alteraciones neurológicas en este grupo (Aharon-Peretz *et al.*, 2004).

En nuestro estudio, la frecuencia de portadores de mutaciones patogénicas o variantes modificadoras entre los pacientes con enfermedad de Parkinson no llegó a diferir significativamente de la razón de portadores entre los sujetos control, aunque estos resultados representan una mayor frecuencia de variantes en el gen *GBA* en pacientes con enfermedad de Parkinson cuando se comparan con un grupo control (OR=1,72; 95% CI 0,51 - 5,77; p=0,567). El análisis de nuestros datos implica una asociación entre la presencia de mutaciones en el gen *GBA* y la aparición de enfermedad de Parkinson. Sin embargo, no proporciona una asociación significativa, y por lo tanto concluyente, entre la ocurrencia de enfermedad de Parkinson y las alteraciones en el gen *GBA*.

El conflicto observado entre los resultados obtenidos en este estudio y otros similares, es el reflejo del método utilizado para el análisis de mutaciones en el gen *GBA*, como ya se ha comentado anteriormente. Estas diferencias pueden deberse, además, al origen de las poblaciones analizadas y al tamaño de las poblaciones a estudio, que no es lo suficientemente grande para detectar diferencias entre ambas poblaciones y, por lo tanto, el estudio carece de la potencia suficiente para detectar la asociación.

En estudios cuya población es predominantemente de la etnia judía Ashkenazi, se observó una fuerte asociación entre la presencia de variantes en el gen *GBA* y el desarrollo de enfermedad de Parkinson (Aharon-Peretz *et al.*, 2004). Los estudios que se han realizado en poblaciones de ascendencia no Ashkenazi obtienen resultados en los que la asociación encontrada es menos concluyente o en los que no existe asociación. Esto puede deberse a que la frecuencia de variantes en el gen *GBA* en otras poblaciones, concretamente en población aragonesa y en España, es mucho menor que en población Ashkenazi (Eblan *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2005; Socal *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2007; Toft *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007).

La limitación más importante de nuestro estudio es el tamaño de muestra. Aunque a priori parecía suficiente para identificar la asociación, los resultados obtenidos evidencian que es necesario un mayor tamaño muestral para la identificación de variantes *GBA* en poblaciones de ascendencia no Ashkenazi (Bras *et al.*, 2009).

Por último, es importante destacar que los resultados de los distintos estudios realizados exponen que la mayoría de los portadores de un alelo mutado en el gen *GBA* nunca desarrollan signos clínicos de enfermedad de Parkinson, por lo que sin duda existen otros modificadores esenciales para el desarrollo de la enfermedad, incluyendo la interacción entre diversos factores genéticos y factores ambientales (Dipple and McCabe, 2000; Maraganore *et al.*, 2005). La presencia de variantes heterocigotas en el gen *GBA* debe considerarse como un factor de riesgo adicional para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson en individuos que tengan predisposición previa a padecer la enfermedad (Hruska *et al.*, 2006).

### **5.3. Asociación entre enfermedad de Parkinson de inicio precoz y variantes en el gen *GBA***

Los primeros estudios de pacientes con enfermedad de Gaucher y enfermedad de Parkinson describían el desarrollo síntomas parkinsonianos a partir de la cuarta o quinta década de la vida, presentando un comienzo más temprano que el de la mayoría de los pacientes con enfermedad de Parkinson esporádica (Goker-Alpan *et al.*, 2004; Tayebi *et al.*, 2003).

Para evaluar si la presencia de variantes en el gen *GBA* puede constituir un factor de susceptibilidad genética para el desarrollo de enfermedad de Parkinson de inicio precoz, se comparó la edad de comienzo de la enfermedad en los pacientes que presentaban alguna alteración en el gen *GBA* con la edad de inicio en los pacientes que no presentaban variantes en el gen *GBA*. El análisis demostró que la enfermedad tiene un comienzo más precoz en los pacientes que presentan variantes en el gen *GBA*, y por tanto implica que la presencia de alteraciones en el gen *GBA* incrementa el riesgo de padecer enfermedad de Parkinson de inicio precoz. Este hallazgo concuerda con lo publicado en anteriores trabajos, que ponen de manifiesto que la edad de inicio de los síntomas motores es entre 1,7 y 6 años más temprana en pacientes portadores de variantes en *GBA* que en pacientes sin variantes en el gen de la glucocerebrosidasa (Aharon-Peretz *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2007; Kalinderi *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007).

Varios estudios describen un comienzo más temprano en la enfermedad de Parkinson en los portadores de variantes en el gen *GBA*, especialmente en los pacientes portadores de variantes graves del gen *GBA* (Gan-Or *et al.*, 2008). Esta observación coincide con lo observado en nuestro estudio en que los pacientes diagnosticados de enfermedad de Parkinson y portadores heterocigotos de la mutación L444P presentaban enfermedad de Parkinson de inicio precoz.

#### **5.4. Análisis de las manifestaciones clínicas en pacientes con enfermedad de Parkinson y variantes en el gen *GBA***

El primer estudio que describe la existencia de una relación entre la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Parkinson refería un comienzo precoz de la enfermedad de Parkinson y una respuesta deficiente al tratamiento convencional de la enfermedad con L-DOPA (Neudorfer *et al.*, 1996). Estudios posteriores han sugerido la posibilidad de que exista asociación entre la enfermedad de Gaucher y una forma de enfermedad de Parkinson de

comienzo temprano (Machaczka *et al.*, 1999; Tayebi *et al.*, 2001; Tayebi *et al.*, 2003; Varkonyi *et al.*, 2003). Se trata de pacientes que presentan formas leves o moderadas de enfermedad de Gaucher, y desarrollan una forma agresiva de parkinsonismo, de comienzo temprano, gravedad en el curso clínico, a menudo deterioro cognitivo y refractariedad al tratamiento convencional de la enfermedad de Parkinson, sin que exista asociación con un genotipo concreto.

A pesar de estas publicaciones iniciales, existen publicaciones más recientes en las que se describe una elevada variabilidad en cuanto a la edad de inicio, progresión de la enfermedad, cambios cognitivos y respuesta a L-DOPA en pacientes con enfermedad de Parkinson asociada a mutaciones en el gen *GBA*. Los resultados obtenidos en nuestro estudio corroboran este hecho y ponen de manifiesto la existencia de una gran variabilidad clínica entre los pacientes con enfermedad de Parkinson y variantes en el gen *GBA*. La edad de inicio, síntomas motores al inicio, progresión de la enfermedad, respuesta al tratamiento con L-DOPA, demencia, estadio evolutivo según la escala de Hoehn y Yahr, así como los antecedentes familiares de enfermedad de Parkinson varían considerablemente entre estos pacientes.

En la mayoría de los pacientes de nuestro estudio existió un inicio asimétrico de los síntomas motores, lo que coincide con lo descrito por Bembi *et al.* (Bembi *et al.*, 2003).

A pesar de que existen aportaciones a la literatura que describen una mayor incidencia de demencia y alteraciones cognitivas entre los portadores de alteraciones en el gen *GBA* (Mitsui *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009; Sidransky *et al.*, 2009), en nuestro estudio, el resultado de la evaluación no reveló la presencia de demencia en ninguno de estos pacientes.

Estudios realizados anteriormente apuntan hacia el predominio de enfermedad de Parkinson esporádica entre los portadores de variantes en el gen *GBA* (Eblan *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007), tal como confirma nuestro trabajo, donde solamente un portador de variante *GBA* presentaba enfermedad de Parkinson de tipo familiar.

Respecto a la eficacia del tratamiento con L-DOPA en los pacientes portadores de variantes en el gen *GBA*, existen discrepancias entre los distintos estudios realizados. Mientras algunos describen pacientes con enfermedad de Gaucher con síntomas parkinsonianos refractarios al tratamiento con L-DOPA (Tayebi *et al.*, 2003), la mayoría de los estudios recientes apuntan hacia una buena, e incluso excelente, respuesta a la terapia antiparkinsoniana entre los portadores de variantes en el gen *GBA* (Bembi *et al.*, 2003; Farrer *et al.*, 2009; Goker-Alpan *et al.*,

2004; Mata *et al.*, 2008; Neumann *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2007), como se ha podido constatar en nuestro estudio.

Al igual que en la mayoría de los estudios realizados, no detectamos diferencias significativas en las manifestaciones clínicas y/o en la progresión de la enfermedad entre portadores de variantes en el gen *GBA* y controles aplicando la escala de evaluación clínica de Hoehn&Yahr (Velayati *et al.*, 2010). Por lo tanto, la enfermedad de Parkinson asociada a variantes en el gen *GBA*, parece ser fenotípicamente indistinguible de la enfermedad de Parkinson esporádica. Esta variabilidad en la presentación clínica puede atribuirse a los procesos tóxicos relativos a diferentes metabolitos, que pueden causar distinto grado de daño al sistema dopaminérgico.

No existen diferencias respecto a las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Parkinson entre los pacientes portadores de variantes en el gen *GBA*, los pacientes que portaban la variante c.(-203)A>G considerada como un polimorfismo presente en población general y los pacientes que no portaban variante en el gen *GBA*. Este hecho sugiere que el curso clínico de la enfermedad no se puede predecir a través del genotipo (Goker-Alpan *et al.*, 2008; Goker-Alpan *et al.*, 2004). Además, la heterogeneidad genotípica encontrada en pacientes con características clínicas similares también lo corrobora.

Por todo esto, podemos concluir que, para determinar los efectos exactos de las variantes heterocigotas en el gen *GBA* sobre los fenotipos parkinsonianos, serían necesarios análisis epidemiológicos y clínicos extensivos en grandes cohortes de pacientes.

## **5.5. Evaluación de la influencia de factores ambientales en la aparición de enfermedad de Parkinson**

A pesar de los avances producidos en las últimas décadas en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad de Parkinson, la etiología de la enfermedad es todavía desconocida en la inmensa mayoría de los casos, si bien se cree que la enfermedad de Parkinson resulta de complejas interacciones entre factores ambientales y genéticos.

La aparición de cuadros de parkinsonismo secundarios a la intoxicación con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en humanos y animales (Burns *et al.*, 1983; Langston and

Ballard, 1983) estimuló la búsqueda de posibles factores ambientales causales de la enfermedad de Parkinson, y existen numerosos estudios encaminados hacia la búsqueda de una relación etiológica entre posibles factores ambientales y la aparición de enfermedad de Parkinson.

En nuestro trabajo se estudió la influencia de tres factores que se han asociado con incremento del riesgo de padecer enfermedad de Parkinson como son: exposición a agentes tóxicos (tóxicos agrícolas e industriales), empastes dentales de amalgama de mercurio y antecedentes familiares de enfermedad de Parkinson. En el análisis univariante la proporción de individuos expuestos a estos factores de riesgo fue significativamente superior en el grupo Parkinson respecto al grupo control, lo que corrobora la asociación existente entre estos factores y la aparición de enfermedad de Parkinson. Este hallazgo es corroborado por los resultados obtenidos en el análisis multivariado, que indican que las variables sexo y edad no intervienen como factores de riesgo en el desarrollo de enfermedad de Parkinson en el modelo de regresión logística utilizado, mientras que el resto de variables estudiadas si se incluyeron como variables modificadoras para la aparición de la enfermedad y muestran significación como factores de riesgo para la aparición de la misma.

Existen multitud de estudios epidemiológicos en referencia a la exposición a agentes tóxicos y el desarrollo de enfermedad de Parkinson que arrojan conclusiones muy diversas (Koller *et al.*, 1990; Stern *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1999). Los resultados de nuestro estudio constatan la asociación entre el contacto con agentes tóxicos de origen agrícola e industrial y la aparición de enfermedad de Parkinson, coincidiendo con lo ya descrito en anteriores estudios epidemiológicos, que avalan, con suficiente evidencia, que la exposición crónica a pesticidas incrementa el riesgo de padecer enfermedad de Parkinson (Firestone *et al.*, 2005; Hubble *et al.*, 1993; Priyadarshi *et al.*, 2001; Priyadarshi *et al.*, 2000; Tanner *et al.*, 1989; Uitti *et al.*, 1994). Si bien, no se ha demostrado la existencia de un tóxico ambiental específico como factor de riesgo común a los estudios realizados. Pese a que la mayoría de los estudios concuerdan en la asociación entre la exposición a pesticidas y un mayor riesgo de padecer la enfermedad, no se ha relacionado un inicio más temprano de la enfermedad y el contacto con agentes tóxicos (Stern *et al.*, 1991; Tsai *et al.*, 2002).

A pesar de que la utilización de amalgamas de mercurio en los empastes dentales ha sido muy discutida a lo largo de las últimas décadas, se han realizado pocas investigaciones epidemiológicas al respecto (Bates *et al.*, 2004). Los resultados comunicados en la literatura respecto al papel desempeñado por los empastes dentales de amalgama de mercurio en la

aparición de patologías de origen neurológico son muy dispares (Lauterbach *et al.*, 2008; Pleva, 1994; Ratcliffe *et al.*, 1996). Nuestros resultados manifiestan que los empastes dentales de amalgama de mercurio pueden constituir un factor de riesgo para la aparición de enfermedad de Parkinson, aunque esta variable no está asociada con la aparición de enfermedad de Parkinson de inicio temprano.

El papel desempeñado por factores genéticos en la etiología de la enfermedad de Parkinson se ha discutido desde la primera descripción de Gowers, según el cual un número considerable de sus pacientes con enfermedad de Parkinson, tenía antecedentes familiares (Gowers, 1902). Mediante los datos de nuestro estudio se han podido constatar los hallazgos descritos en anteriores trabajos (Taylor *et al.*, 1999; Uitti *et al.*, 1994), que sostienen que la presencia de historia familiar supone un factor de riesgo positivo para padecer la enfermedad de Parkinson, cifrándose en un 10,7% el porcentaje de pacientes que poseen un familiar de primer grado afecto de la enfermedad en un porcentaje similar al descrito en otros estudios (Bonifati *et al.*, 1995; De Michele *et al.*, 1996; Payami *et al.*, 1994) y que refuerza la hipótesis de que la enfermedad, o al menos la susceptibilidad para desarrollarla, podría estar genéticamente determinada en algunos casos. Pese a que la mayoría de los estudios concuerdan en la asociación entre la presencia de antecedentes familiares de enfermedad de Parkinson y un mayor riesgo de padecer la enfermedad, no se produce el fenómeno de la anticipación como ocurre en otras entidades.



## 6. CONCLUSIONES

De los resultados presentados en esta memoria se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El análisis de las isoformas de la apolipoproteína E demuestra que éstas no constituyen un factor de susceptibilidad para el desarrollo de enfermedad de Parkinson.
2. La incidencia de la mutación N370S en el gen *GBA* en población aragonesa es 0,0023, mientras que la incidencia de la mutación L444P es 0,0008. Ambas representan las mutaciones más frecuentes responsables de la EG en España y su incidencia es similar a la observada en otras poblaciones de origen no Ashkenazi.
3. La incidencia global de portadores de variantes en el gen *GBA* es el doble en el grupo de pacientes con enfermedad de Parkinson respecto al grupo control de población general.
4. Entre las variantes encontradas en el grupo de pacientes con enfermedad de Parkinson, la variante T369M presentó doble incidencia respecto al grupo control, mientras que las variantes L444P y E326K se han detectado exclusivamente entre los pacientes con enfermedad de Parkinson. La incidencia de la mutación L444P en el grupo de pacientes con EP ha sido tres veces superior a la encontrada en población aragonesa.
5. En el grupo de pacientes con EP analizado no se ha encontrado la mutación N370S. Por el contrario, la incidencia de esta mutación en el grupo control es similar a la encontrada en población general aragonesa.
6. Se ha encontrado que la variante c.(-203)A>G del gen *GBA*, descrita previamente en pacientes con enfermedad de Gaucher, presentaba una incidencia de 4,6% en el grupo control de población general, lo que demuestra que es un polimorfismo. No se ha encontrado relación de este polimorfismo con la aparición de enfermedad de Parkinson.
7. Los resultados encontrados en población aragonesa con respecto a la incidencia de mutaciones en *GBA* en pacientes con enfermedad de Parkinson, son similares a los descritos en otras poblaciones europeas.

8. Nuestros resultados indican que la presencia de la mutación L444P en el gen *GBA* constituye un factor de susceptibilidad genética para inicio precoz de la enfermedad de Parkinson.
9. Nuestros resultados ponen de manifiesto la existencia de una gran heterogeneidad en las manifestaciones clínicas de los pacientes portadores de variantes en el gen *GBA*. No existe una relación clara entre el genotipo del gen *GBA* y el fenotipo observado en los pacientes con enfermedad de Parkinson.
10. En nuestro estudio, la exposición a agentes tóxicos, los empastes dentales de amalgama de mercurio y los antecedentes familiares de enfermedad de Parkinson constituyen factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, aunque ninguno de ellos se asocia significativamente con el inicio precoz de la misma.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Abrahamov A, Elstein D, Gross-Tsur V, Farber B, Glaser Y, Hadas-Halpern I, Ronen S, Tafakjdi M, Horowitz M, Zimran A. Gaucher's disease variant characterised by progressive calcification of heart valves and unique genotype. *Lancet*, 1995; 346: 1000-3.

Achord DT, Brot FE, Bell CE, Sly WS. Human beta-glucuronidase: in vivo clearance and in vitro uptake by a glycoprotein recognition system on reticuloendothelial cells. *Cell*, 1978; 15: 269-78.

Aerts JM, Hollak CE. Plasma and metabolic abnormalities in Gaucher's disease. *Baillieres Clin Haematol*, 1997; 10: 691-709.

Aghion H. La Maladie de Gaucher dans l'Enfance. Faculté de Médecine: París, 1934.

Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*, 2004; 351: 1972-7.

Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, Sterky F, Nyren P, Uhlen M, Lundeborg J. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem*, 2000; 280: 103-10.

Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 1989; 12: 366-75.

Alfonso P, Aznarez S, Giralto M, Pocovi M, Giraldo P. Mutation analysis and genotype/phenotype relationships of Gaucher disease patients in Spain. *J Hum Genet*, 2007; 52: 391-6.

Alfonso P, Cenarro A, Perez-Calvo JJ, Giralto M, Giraldo P, Pocovi M. Mutation prevalence among 51 unrelated Spanish patients with Gaucher disease: identification of 11 novel mutations. *Blood Cells Mol Dis*, 2001; 27: 882-91.

Alonso Navarro H, Jiménez-Jiménez FJ, García Ruíz-Espiga PJ, Ruíz Ezquerro JJ. Historia de los trastornos del movimiento. In Jiménez-Jiménez FJ, Luquin MR, Molina JA, Linazasoro G, editors. *Tratado de los Trastornos del Movimiento*. Viguera: Barcelona, 2008a: 19-40.

Alonso Navarro H, Ortí Pareja M, Jiménez-Jiménez FJ. Epidemiología y etiología no genética de la enfermedad de Parkinson. In Jiménez-Jiménez FJ, Luquin MR, Molina JA, Linazasoro G, editors. *Tratado de los Trastornos del Movimiento*. Viguera: Barcelona, 2008b: 395-402.

Alonso Navarro H, Ortí Pareja M, Jiménez-Jiménez FJ. Epidemiología y etiología no genética de la enfermedad de Parkinson. In Jiménez-Jiménez F, Luquin MR, Molina JA, Linazasoro G, editor. *Tratado de los Trastornos del Movimiento*. Viguera: Barcelona, 2008: 402.

Amaral O, Lacerda L, Marcao A, Pinto E, Tamagnini G, Sa Miranda MC. Homozygosity for two mild glucocerebrosidase mutations of probable Iberian origin. *Clin Genet*, 1999; 56: 100-2.

Antonarakis SE. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat*, 1998; 11: 1-3.

Atsumi S, Nosaka C, Iinuma H, Umezawa K. Inhibition of glucocerebrosidase and induction of neural abnormality by cyclophellitol in mice. *Arch Biochem Biophys*, 1992; 297: 362-7.

Baba Y, Putzke JD, Whaley NR, Wszolek ZK, Uitti RJ. Gender and the Parkinson's disease phenotype. *J Neurol*, 2005; 252: 1201-5.

Banjar H. Pulmonary involvement of Gaucher's disease in children: a common presentation in Saudi Arabia. *Ann Trop Paediatr*, 1998; 18: 55-9.

Barneveld RA, Keijzer W, Tegelaers FP, Ginns EI, Geurts van Kessel A, Brady RO, Barranger JA, Tager JM, Galjaard H, Westerveld A, Reuser AJ. Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. *Hum Genet*, 1983; 64: 227-31.

Barton DJ, Ludman MD, Benkov K, Grabowski GA, LeLeiko NS. Resting energy expenditure in Gaucher's disease type 1: effect of Gaucher's cell burden on energy requirements. *Metabolism*, 1989; 38: 1238-43.

Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, Mankin HJ, Murray GJ, Parker RI, Argoff CE, *et al.* Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med*, 1991; 324: 1464-70.

Basu S, Kaufman B, Roseman S. Enzymatic synthesis of ceramide-glucose and ceramide-lactose by glycosyltransferases from embryonic chicken brain. *J Biol Chem*, 1968; 243: 5802-4.

Basu S, Kaufman B, Roseman S. Enzymatic synthesis of glucocerebroside by a glycosyltransferase from embryonic chicken brain. *J Biol Chem*, 1973; 248: 1388-94.

Basu SK, Ho YK, Brown MS, Bilheimer DW, Anderson RG, Goldstein JL. Biochemical and genetic studies of the apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *J Biol Chem*, 1982; 257: 9788-95.

Bates MN, Fawcett J, Garrett N, Cutress T, Kjellstrom T. Health effects of dental amalgam exposure: a retrospective cohort study. *Int J Epidemiol*, 2004; 33: 894-902.

Beaudet *al.* Gaucher's disease. *N Engl J Med*, 1987; 316: 619-21.

Beilina A, Van Der Brug M, Ahmad R, Kesavapany S, Miller DW, Petsko GA, Cookson MR. Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005; 102: 5703-8.

Bembi B, Agosti E, Boehm P, Nassimbeni G, Zanatta M, Vidoni L. Aminohydroxypropylidene-biphosphonate in the treatment of bone lesions in a case of Gaucher's disease type 3. *Acta Paediatr*, 1994; 83: 122-4.

Bembi B, Zambito Marsala S, Sidransky E, Ciana G, Carrozzi M, Zorzon M, Martini C, Gioulis M, Pittis MG, Capus L. Gaucher's disease with Parkinson's disease: clinical and pathological aspects. *Neurology*, 2003; 61: 99-101.

Benabid AL, Pollak P, Gervason C, Hoffmann D, Gao DM, Hommel M, Perret JE, de Rougemont J. Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *Lancet*, 1991; 337: 403-6.

Berg D, Niwar M, Maass S, Zimprich A, Moller JC, Wuellner U, Schmitz-Hubsch T, Klein C, Tan EK, Schols L, Marsh L, Dawson TM, Janetzky B, Muller T, Woitalla D, Kostic V, Pramstaller PP, Oertel WH, Bauer P, Krueger R, Gasser T, Riess O. Alpha-synuclein and Parkinson's disease: implications from the screening of more than 1,900 patients. *Mov Disord*, 2005; 20: 1191-4.

Beutler E, Gelbart T. Gaucher disease mutations in non-Jewish patients. *Br J Haematol*, 1993; 85: 401-5.

Beutler E, Gelbart T, Kuhl W, Sorge J, West C. Identification of the second common Jewish Gaucher disease mutation makes possible population-based screening for the heterozygous state. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991a; 88: 10544-7.

Beutler E, Grabowski GA. Gaucher disease. In Scriver C, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editor. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*: New York, 1995: 2641-69.

- Beutler E, Grabowski GA. Gaucher disease. In Scriver C, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, *et al.*, editor. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Mc Graw-Hill New York, 2001: 3635-68.
- Beutler E, Kay A, Saven A, Garver P, Thurston D, Dawson A, Rosenbloom B. Enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Blood*, 1991b; 78: 1183-9.
- Beutler E, Kuhl W. Detection of the defect of Gaucher's disease and its carrier state in peripheral-blood leucocytes. *Lancet*, 1970a; 1: 612-3.
- Beutler E, Kuhl W. The diagnosis of the adult type of Gaucher's disease and its carrier state by demonstration of deficiency of beta-glucosidase activity in peripheral blood leukocytes. *J Lab Clin Med*, 1970b; 76: 747-55.
- Beutler E, Kuhl W, Trinidad F, Teplitz R, Nadler H. Beta-glucosidase activity in fibroblasts from homozygotes and heterozygotes for Gaucher's disease. *Am J Hum Genet*, 1971; 23: 62-6.
- Beutler E, Nguyen NJ, Henneberger MW, Smolec JM, McPherson RA, West C, Gelbart T. Gaucher disease: gene frequencies in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet*, 1993; 52: 85-8.
- Beutler E, West C, Gelbart T. Polymorphisms in the human glucocerebrosidase gene. *Genomics*, 1992; 12: 795-800.
- Bhatt MH, Elias MA, Mankodi AK. Acute and reversible parkinsonism due to organophosphate pesticide intoxication: five cases. *Neurology*, 1999; 52: 1467-71.
- Biousse V, Skibell BC, Watts RL, Loupe DN, Drews-Botsch C, Newman NJ. Ophthalmologic features of Parkinson's disease. *Neurology*, 2004; 62: 177-80.
- Biskup S, Moore DJ, Celsi F, Higashi S, West AB, Andrabi SA, Kurkinen K, Yu SW, Savitt JM, Waldvogel HJ, Faull RL, Emson PC, Torp R, Ottersen OP, Dawson TM, Dawson VL. Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Ann Neurol*, 2006; 60: 557-69.
- Blazquez L, Otaegui D, Saenz A, Paisan-Ruiz C, Emparanza JI, Ruiz-Martinez J, Moreno F, Marti-Masso JF, Lopez de Munain A. Apolipoprotein E epsilon4 allele in familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 2006; 406: 235-9.
- Boldin S, Futerman AH. Glucosylceramide synthesis is required for basic fibroblast growth factor and laminin to stimulate axonal growth. *J Neurochem*, 1997; 68: 882-5.
- Bonifati V, Fabrizio E, Vanacore N, De Mari M, Meco G. Familial Parkinson's disease: a clinical genetic analysis. *Can J Neurol Sci*, 1995; 22: 272-9.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 2003; 299: 256-9.
- Boot RG, Verhoek M, de Fost M, Hollak CE, Maas M, Bleijlevens B, van Breemen MJ, van Meurs M, Boven LA, Laman JD, Moran MT, Cox TM, Aerts JM. Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood*, 2004; 103: 33-9.
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 1991; 82: 239-59.

- Brady RO, Barton NW, Grabowski GA. The role of neurogenetics in Gaucher disease. *Arch Neurol*, 1993; 50: 1212-24.
- Brady RO, Pentchev PG, Gal AE, Hibbert SR, Dekaban AS. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *N Engl J Med*, 1974; 291: 989-93.
- Bras J, Paisan-Ruiz C, Guerreiro R, Ribeiro MH, Morgadinho A, Januario C, Sidransky E, Oliveira C, Singleton A. Complete screening for glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease patients from Portugal. *Neurobiol Aging*, 2009; 30: 1515-7.
- Brill EN. Case of "splenomegalie primitif" with involvement of haematopoietic organs. *Proc N Y Path Soc*, 1904; 4: 143.
- Brill EN, Mandelbaum FS, Libman E. Primary splenomegaly-Gaucher type. Report on one of few cases occurring in a single generation of one family. *Am J Med Sci*, 1905; 129: 491.
- Brill EN, Mandelbaum FS, Libman E. Primary splenomegaly with a report of three cases in one family. *Am J Med Sci*, 1901; 121: 377-92.
- Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M. Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons. *J Neurochem*, 1996; 66: 733-9.
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983; 80: 4546-50.
- Calne DB, Snow BJ, Lee C. Criteria for diagnosing Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 1992; 32 Suppl: S125-7.
- Capablo JL, Saenz de Cabezón A, Fraile J, Alfonso P, Pocovi M, Giraldo P. Neurological evaluation of patients with Gaucher disease diagnosed as type 1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2008; 79: 219-22.
- Carcelén J, Giraldo P, Abad B, Revuelta MP, Idoipe A, Mendaza M. Valoración a largo plazo del tratamiento con aglucerasa en tres pacientes afectados de enfermedad de Gaucher tipo I. *Aten Farm* 1999; 1: 313-25.
- Caselli RJ, Reiman EM, Locke DE, Hutton ML, Hentz JG, Hoffman-Snyder C, Woodruff BK, Alexander GE, Osborne D. Cognitive domain decline in healthy apolipoprotein E epsilon4 homozygotes before the diagnosis of mild cognitive impairment. *Arch Neurol*, 2007; 64: 1306-11.
- Clark LN, Ross BM, Wang Y, Mejia-Santana H, Harris J, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Fahn S, Waters C, Ford B, Frucht S, Ottman R, Marder K. Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology*, 2007; 69: 1270-7.
- Cole NB, Murphy DD, Grider T, Rueter S, Brasaemle D, Nussbaum RL. Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 2002; 277: 6344-52.
- Collier WA. A case of large spleen in a child aged six. *Transactions of the Pathological Society of London*, 1985; 46: 148-50.
- Connock M, Burls A, Frew E, Fry-Smith A, Juarez-Garcia A, McCabe C, Wailoo A, Abrams K, Cooper N, Sutton A, O'Hagan A, Moore D. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of enzyme replacement therapy for Gaucher's disease: a systematic review. *Health Technol Assess*, 2006b; 10: 1-136.

- Conradi NG, Sourander P, Nilsson O, Svennerholm L, Erikson A. Neuropathology of the Norrbottnian type of Gaucher disease. Morphological and biochemical studies. *Acta Neuropathol*, 1984; 65: 99-109.
- Cormand B, Diaz A, Grinberg D, Chabas A, Vilageliu L. A new gene-pseudogene fusion allele due to a recombination in intron 2 of the glucocerebrosidase gene causes Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*, 2000; 26: 409-16.
- Cormand B, Vilageliu L, Balcells S, Gonzalez-Duarte R, Chabas A, Grinberg D. Two novel (1098insA and Y313H) and one rare (R359Q) mutations detected in exon 8 of the beta-glucocerebrosidase gene in Gaucher's disease patients. *Hum Mutat*, 1996; 7: 272-4.
- Cormand B, Vilageliu L, Burguera JM, Balcells S, Gonzalez-Duarte R, Grinberg D, Chabas A. Gaucher disease in Spanish patients: analysis of eight mutations. *Hum Mutat*, 1995; 5: 303-9.
- Cox T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, van Weely S, Hrebicek M, Platt F, Butters T, Dwek R, Moyses C, Gow I, Elstein D, Zimran A. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxyojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet*, 2000; 355: 1481-5.
- Cox TM, Schofield JP. Gaucher's disease: clinical features and natural history. *Baillieres Clin Haematol*, 1997; 10: 657-89.
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*, 2004; 305: 1292-5.
- Chabas A, Cormand B, Grinberg D, Burguera JM, Balcells S, Merino JL, Mate I, Sobrino JA, Gonzalez-Duarte R, Vilageliu L. Unusual expression of Gaucher's disease: cardiovascular calcifications in three sibs homozygous for the D409H mutation. *J Med Genet*, 1995; 32: 740-2.
- Chabas A, Gort L, Diaz-Font A, Montfort M, Santamaria R, Cidras M, Grinberg D, Vilageliu L. Perinatal lethal phenotype with generalized ichthyosis in a type 2 Gaucher disease patient with the [L444P;E326K]/P182L genotype: effect of the E326K change in neonatal and classic forms of the disease. *Blood Cells Mol Dis*, 2005; 35: 253-8.
- Chabas A, Gort L, Montfort M, Castello F, Dominguez MC, Grinberg D, Vilageliu L. Recurrence of the D409H mutation in Spanish Gaucher disease patients: description of a new homozygous patient and haplotype analysis. *J Med Genet*, 1998; 35: 775-7.
- Chen M, Wang J. Gaucher disease: review of the literature. *Arch Pathol Lab Med*, 2008; 132: 851-3.
- Choudary PV, Barranger JA, Tsuji S, Mayor J, LaMarca ME, Cepko CL, Mulligan RC, Ginns EI. Retrovirus-mediated transfer of the human glucocerebrosidase gene to Gaucher fibroblasts. *Mol Biol Med*, 1986a; 3: 293-9.
- Choudary PV, Tsuji S, Martin BM, Guild BC, Mulligan RC, Murray GJ, Barranger JA, Ginns EI. The molecular biology of Gaucher disease and the potential for gene therapy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986b; 51: 1047-52.
- Christomanou H, Aignesberger A, Linke RP. Immunochemical characterization of two activator proteins stimulating enzymic sphingomyelin degradation in vitro. Absence of one of them in a human Gaucher disease variant. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1986; 367: 879-90.
- Dale GL, Villacorte DG, Beutler E. Solubilization of glucocerebrosidase from human placenta and demonstration of a phospholipid requirement for its catalytic activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976; 71: 1048-53.
- Daniels LB, Glew RH, Diven WF, Lee RE, Radin NS. An improved fluorometric leukocyte beta-glucosidase assay for Gaucher's disease. *Clin Chim Acta*, 1981; 115: 369-75.

De Marco EV, Annesi G, Tarantino P, Rocca FE, Provenzano G, Civitelli D, Ciro Candiano IC, Annesi F, Carrideo S, Condino F, Nicoletti G, Messina D, Novellino F, Morelli M, Quattrone A. Glucocerebrosidase gene mutations are associated with Parkinson's disease in southern Italy. *Mov Disord*, 2008; 23: 460-3.

De Michele G, Filla A, Volpe G, De Marco V, Gogliettino A, Ambrosio G, Marconi R, Castellano AE, Campanella G. Environmental and genetic risk factors in Parkinson's disease: a case-control study in southern Italy. *Mov Disord*, 1996; 11: 17-23.

de Rijk MC, Breteler MM, Graveland GA, Ott A, Grobbee DE, van der Meche FG, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study. *Neurology*, 1995; 45: 2143-6.

den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat*, 2000; 15: 7-12.

Deng H, Jankovic J, Guo Y, Xie W, Le W. Small interfering RNA targeting the PINK1 induces apoptosis in dopaminergic cells SH-SY5Y. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 337: 1133-8.

Diamond SG, Markham CH, Hoehn MM, McDowell FH, Muentner MD. An examination of male-female differences in progression and mortality of Parkinson's disease. *Neurology*, 1990; 40: 763-6.

Dimitrou E, Moraitou M, Troungos C, Schulpis K and Michelakakis H. The frequency of the N370S mutation in the Greek population. *Proceedings of First Workshop of European Working Group in Gaucher Disease: Cologne. Germany, 2010.*

Dinur T, Osiecki KM, Legler G, Gatt S, Desnick RJ, Grabowski GA. Human acid beta-glucosidase: isolation and amino acid sequence of a peptide containing the catalytic site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986; 83: 1660-4.

Dipple KM, McCabe ER. Phenotypes of patients with "simple" Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics. *Am J Hum Genet*, 2000; 66: 1729-35.

Disshon KA, Dluzen DE. Estrogen as a neuromodulator of MPTP-induced neurotoxicity: effects upon striatal dopamine release. *Brain Res*, 1997; 764: 9-16.

Doll RF, Bruce A, Smith FI. Regulation of the human acid beta-glucosidase promoter in multiple cell types. *Biochim Biophys Acta*, 1995; 1261: 57-67.

Dunn P, Kuo MC, Sun CF. Pseudo-Gaucher cells in mycobacterial infection: a report of two cases. *J Clin Pathol*, 2005; 58: 1113-4.

Dvir H, Harel M, McCarthy AA, Tokar L, Silman I, Futerman AH, Sussman JL. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep*, 2003; 4: 704-9.

Eblan MJ, Nguyen J, Ziegler SG, Lwin A, Hanson M, Gallardo M, Weiser R, De Lucca M, Singleton A, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations are also found in subjects with early-onset parkinsonism from Venezuela. *Mov Disord*, 2006; 21: 282-3.

Eblan MJ, Walker JM, Sidransky E. The glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*, 2005; 352: 728-31; author reply 31.

Elstein D, Abrahamov A, Hadas-Halpern I, Zimran A. Gaucher's disease. *Lancet*, 2001; 358: 324-7.

Elstein D, Itzchaki M, Mankin HJ. Skeletal involvement in Gaucher's disease. *Baillieres Clin Haematol*, 1997; 10: 793-816.

- Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, White R, Lalouel JM. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics*, 1988; 3: 373-9.
- Errea JM, Ara JR, Aibar C, de Pedro-Cuesta J. Prevalence of Parkinson's disease in lower Aragon, Spain. *Mov Disord*, 1999; 14: 596-604.
- Espinás OE, Faris AA. Acute infantile Gaucher's disease in identical twins. An account of clinical and neuropathologic observations. *Neurology*, 1969; 19: 133-40.
- Eyles JM. James Parkinson; 1755-1824. *Nature*, 1955; 176: 580-1.
- Fabrega S, Durand P, Mornon JP, Lehn P. The active site of human glucocerebrosidase: structural predictions and experimental validations. *J Soc Biol*, 2002; 196: 151-60.
- Fahn S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 991: 1-14.
- Fahn S. Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease? *J Neurol*, 2005; 252: IV37-IV42.
- Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C, Marek K. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 2004; 351: 2498-508.
- Farrer M, Stone J, Mata IF, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Strain KJ, Maraganore DM. LRRK2 mutations in Parkinson disease. *Neurology*, 2005; 65: 738-40.
- Farrer MJ. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet*, 2006; 7: 306-18.
- Farrer MJ, Williams LN, Algom AA, Kachergus J, Hulihan MM, Ross OA, Rajput A, Papapetropoulos S, Mash DC, Dickson DW. Glucosidase-beta variations and Lewy body disorders. *Parkinsonism Relat Disord*, 2009; 15: 414-6.
- Firestone JA, Smith-Weller T, Franklin G, Swanson P, Longstreth WT, Jr., Checkoway H. Pesticides and risk of Parkinson disease: a population-based case-control study. *Arch Neurol*, 2005; 62: 91-5.
- Foley P. Beans, roots and leaves: a brief history of the pharmacological therapy of parkinsonism. *Wurzburg Medizinhist Mitt*, 2003; 22: 215-34.
- Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1996; 55: 259-72.
- Fredrickson DS, Sloan HR. Glucosylceramide lipidoses: Gaucher's disease. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, editors. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill: New York, 1972: 730.
- Fujimoto A, Tayebi N, Sidransky E. Congenital ichthyosis preceding neurologic symptoms in two sibs with type 2 Gaucher disease. *Am J Med Genet*, 1995; 59: 356-8.
- Furbish FS, Steer CJ, Barranger JA, Jones EA, Brady RO. The uptake of native and desialylated glucocerebrosidase by rat hepatocytes and Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978; 81: 1047-53.
- Futerman AH, Sussman JL, Horowitz M, Silman I, Zimran A. New directions in the treatment of Gaucher disease. *Trends Pharmacol Sci*, 2004; 25: 147-51.
- Gan-Or Z, Giladi N, Rozovski U, Shifrin C, Rosner S, Gurevich T, Bar-Shira A, Orr-Urtreger A. Genotype-phenotype correlations between GBA mutations and Parkinson disease risk and onset. *Neurology*, 2008; 70: 2277-83.
- Garcia Ruiz PJ. Prehistory of Parkinson's disease. *Neurologia*, 2004; 19: 735-7.

- Gatt S. Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. I. Hydrolysis and synthesis of ceramides by an enzyme from rat brain. *J Biol Chem*, 1966; 241: 3724-30.
- Gaucher PCE. De l'epithelioma primitif de la rate, hypertrophie idiopathique de la rate sans leucemie. *Faculté de Médecine: París*, 1882.
- Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol*, 1999; 56: 33-9.
- Gery I, Ziegler JS, Brady RO, Barranger JA. Selective effects of glucocerebrosidase (Gaucher's storage material) on macrophage cultures. *J Clin Invest*, 1981; 68: 1182-9.
- Giasson BI, Covy JP, Bonini NM, Hurtig HI, Farrer MJ, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM. Biochemical and pathological characterization of Lrrk2. *Ann Neurol*, 2006; 59: 315-22.
- Gibb WR. Neuropathology of Parkinson's disease and related syndromes. *Neurol Clin*, 1992; 10: 361-76.
- Ginns EI, Choudary PV, Martin BM, Winfield S, Stubblefield B, Mayor J, Merkle-Lehman D, Murray GJ, Bowers LA, Barranger JA. Isolation of cDNA clones for human beta-glucocerebrosidase using the lambda gt11 expression system. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 123: 574-80.
- Ginns EI, Choudary PV, Tsuji S, Martin B, Stubblefield B, Sawyer J, Hozier J, Barranger JA. Gene mapping and leader polypeptide sequence of human glucocerebrosidase: implications for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985; 82: 7101-5.
- Ginsberg H, Grabowski GA, Gibson JC, Fagerstrom R, Goldblatt J, Gilbert HS, Desnick RJ. Reduced plasma concentrations of total, low density lipoprotein and high density lipoprotein cholesterol in patients with Gaucher type I disease. *Clin Genet*, 1984; 26: 109-16.
- Giraldo P, Capablo JL, Alfonso P, Latre P, Garcia B, Pocovi M. Neurological manifestations in patients with Gaucher disease and in their relatives. *Med Clin (Barc)*, 2008; 131: 175-9.
- Giraldo P, Cenarro A, Alfonso P, Perez-Calvo JI, Rubio-Felix D, Giralt M, Pocovi M. Chitotriosidase genotype and plasma activity in patients type 1 Gaucher's disease and their relatives (carriers and non carriers). *Haematologica*, 2001; 86: 977-84.
- Giraldo P, Giralt M, Pocoví M, Pérez Calvo JI. *Enfermedad de Gaucher: Zaragoza*, 2003.
- Giraldo P, Pocovi M, Perez-Calvo J, Rubio-Felix D, Giralt M. Report of the Spanish Gaucher's disease registry: clinical and genetic characteristics. *Haematologica*, 2000; 85: 792-9.
- Giraldo P, Pocoví M, Pérez-Calvo JI, Giralt M. Plasma protein alterations in Gaucher disease *Boletín da Sociedade Brasileira de Hematología y Hemoterapia*, 1998; 20.
- Goetz CG. Charcot on Parkinson's disease. *Mov Disord*, 1986; 1: 27-32.
- Goetz CG, Lutge W, Tanner CM. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurology*, 1986; 36: 73-5.
- Goker-Alpan O, Lopez G, Vithayathil J, Davis J, Hallett M, Sidransky E. The spectrum of parkinsonian manifestations associated with glucocerebrosidase mutations. *Arch Neurol*, 2008; 65: 1353-7.
- Goker-Alpan O, Schiffmann R, LaMarca ME, Nussbaum RL, McInerney-Leo A, Sidransky E. Parkinsonism among Gaucher disease carriers. *J Med Genet*, 2004; 41: 937-40.
- Goldberg MS, Pisani A, Haburcak M, Vortherms TA, Kitada T, Costa C, Tong Y, Martella G, Tschertter A, Martins A, Bernardi G, Roth BL, Pothos EN, Calabresi P, Shen J. Nigrostriatal

- dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron*, 2005; 45: 489-96.
- Goldblatt J, Beighton P. Cutaneous manifestations of Gaucher disease. *Br J Dermatol*, 1984; 111: 331-4.
- Goldblatt J, Sacks S, Dall D, Beighton P. Total hip arthroplasty in Gaucher's disease. Long-term prognosis. *Clin Orthop Relat Res*, 1988: 94-8.
- Gowers W. A manual of the diseases of the nervous system, 2th ed. Blakiston: Philadelphia, 1902.
- Grabowski G. Gaucher Disease: Enzymology, Genetics, and Treatment. In Harris H, Hirschhorn K, editor. *Advances in Human Genetics*, 21. Plenum Press Div Plenum Publishing Corp: 233 Spring St, New York, NY 10013, 1993a.
- Grabowski GA. Gaucher disease. *Enzymology, genetics, and treatment. Adv Hum Genet*, 1993b; 21: 377-441.
- Grabowski GA. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet*, 2008a; 372: 1263-71.
- Grabowski GA. Treatment perspectives for the lysosomal storage diseases. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2008b; 13: 197-211.
- Grabowski GA, Dinur T, Gatt S, Desnick RJ. Gaucher type I (Ashkenazi) disease: considerations for heterozygote detection and prenatal diagnosis. *Prog Clin Biol Res*, 1982; 95: 573-95.
- Grabowski GA, Gatt S, Horowitz M. Acid beta-glucosidase: enzymology and molecular biology of Gaucher disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1990; 25: 385-414.
- Grabowski GA, Gatt S, Kruse J, Desnick RJ. Human lysosomal beta-glucosidase: kinetic characterization of the catalytic, aglycon, and hydrophobic binding sites. *Arch Biochem Biophys*, 1984; 231: 144-57.
- Grace ME, Ashton-Prolla P, Pastores GM, Soni A, Desnick RJ. Non-pseudogene-derived complex acid beta-glucosidase mutations causing mild type 1 and severe type 2 gaucher disease. *J Clin Invest*, 1999; 103: 817-23.
- Grace ME, Desnick RJ, Pastores GM. Identification and expression of acid beta-glucosidase mutations causing severe type 1 and neurologic type 2 Gaucher disease in non-Jewish patients. *J Clin Invest*, 1997; 99: 2530-7.
- Grace ME, Graves PN, Smith FI, Grabowski GA. Analyses of catalytic activity and inhibitor binding of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis. Identification of residues critical to catalysis and evidence for causality of two Ashkenazi Jewish Gaucher disease type 1 mutations. *J Biol Chem*, 1990; 265: 6827-35.
- Greenberg P, Merrill AH, Liotta DC, Grabowski GA. Human acid beta-glucosidase: use of sphingosyl and N-alkyl-glucosylamine inhibitors to investigate the properties of the active site. *Biochim Biophys Acta*, 1990; 1039: 12-20.
- Greene JC, Whitworth AJ, Andrews LA, Parker TJ, Pallanck LJ. Genetic and genomic studies of *Drosophila parkin* mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis. *Hum Mol Genet*, 2005; 14: 799-811.
- Gutti U, Fung HC, Hruska KS, Lamarca ME, Chen CM, Wu YR, Sidransky E. The need for appropriate genotyping strategies for glucocerebrosidase mutations in cohorts with Parkinson disease. *Arch Neurol*, 2008; 65: 850-1; author reply 1.

- Hantz P, Caradoc-Davies G, Caradoc-Davies T, Weatherall M, Dixon G. Depression in Parkinson's disease. *Am J Psychiatry*, 1994; 151: 1010-4.
- Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, Tomiyama H, Yoshino H, Asahina M, Kobayashi S, Hassin-Baer S, Lu CS, Ng AR, Rosales RL, Shimizu N, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol*, 2004; 56: 424-7.
- Hawkes CH, Shephard BC. Selective anosmia in Parkinson's disease? *Lancet*, 1993; 341: 435-6.
- Helisalimi S, Linnaranta K, Lehtovirta M, Mannermaa A, Heinonen O, Ryyanen M, Riekkinen P, Sr., Soininen H. Apolipoprotein E polymorphism in patients with different neurodegenerative disorders. *Neurosci Lett*, 1996; 205: 61-4.
- Hermann G, Pastores GM, Abdelwahab IF, Lorberboym AM. Gaucher disease: assessment of skeletal involvement and therapeutic responses to enzyme replacement. *Skeletal Radiol*, 1997; 26: 687-96.
- Herrero MT, Luquin MR, Jiménez-Jiménez FJ. Anatomía funcional de los ganglios basales. In Jiménez-Jiménez FJ, Luquin MR, Molina JA, Linazasoro G, editors. *Tratado de los Trastornos del Movimiento*. Viguera: Barcelona, 2008: 47-63.
- Hibbs RG, Ferrans VJ, Cipriano PR, Tardiff KJ. A histochemical and electron microscopic study of Gaucher cells. *Arch Pathol*, 1970; 89: 137-53.
- Hill SC, Damaska BM, Tsokos M, Kreps C, Brady RO, Barton NW. Radiographic findings in type 3b Gaucher disease. *Pediatr Radiol*, 1996; 26: 852-60.
- Hobbs JR. Experience with bone marrow transplantation for inborn errors of metabolism. *Enzyme*, 1987; 38: 194-206.
- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, 1967; 17: 427-42.
- Hoffman R, Benz EJ, Schattil SJ, Furie B, Cohen HJ. *Hematology. Basic principles and practice*, 2th ed: New York: Churchill Livingstone, 1995.
- Holdorff B. Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) and his work. *J Hist Neurosci*, 2002; 11: 19-28.
- Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest*, 1994; 93: 1288-92.
- Hope AD, Myhre R, Kachergus J, Lincoln S, Bisceglia G, Hulihan M, Farrer MJ. Alpha-synuclein missense and multiplication mutations in autosomal dominant Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 2004; 367: 97-100.
- Horowitz M, Pasmanik-Chor M, Borochowitz Z, Falik-Zaccai T, Heldmann K, Carmi R, Parvari R, Beit-Or H, Goldman B, Peleg L, Levy-Lahad E, Renbaum P, Legum S, Shomrat R, Yeger H, Benbenisti D, Navon R, Dror V, Shohat M, Magal N, Navot N, Eyal N. Prevalence of glucocerebrosidase mutations in the Israeli Ashkenazi Jewish population. *Hum Mutat*, 1998; 12: 240-4.
- Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics*, 1989; 4: 87-96.
- Horowitz M, Zimran A. Mutations causing Gaucher disease. *Hum Mutat*, 1994; 3: 1-11.

- Horstink M, Tolosa E, Bonuccelli U, Deuschl G, Friedman A, Kanovsky P, Larsen JP, Lees A, Oertel W, Poewe W, Rascol O, Sampaio C. Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Movement Disorder Society-European Section. Part I: early (uncomplicated) Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, 2006; 13: 1170-85.
- Hruska KS, Goker-Alpan O, Sidransky E. Gaucher disease and the synucleinopathies. *J Biomed Biotechnol*, 2006b; 2006: 1-6.
- Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat*, 2008; 29: 567-83.
- Huang X, Chen P, Kaufer DI, Troster AI, Poole C. Apolipoprotein E and dementia in Parkinson disease: a meta-analysis. *Arch Neurol*, 2006; 63: 189-93.
- Huang X, Chen PC, Poole C. APOE-[epsilon]2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease. *Neurology*, 2004; 62: 2198-202.
- Hubble JP, Cao T, Hassanein RE, Neuberger JS, Koller WC. Risk factors for Parkinson's disease. *Neurology*, 1993; 43: 1693-7.
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1992; 55: 181-4.
- Itokawa K, Tamura N, Kawai N, Shimazu K, Ishii K. Parkinsonism in type I Gaucher's disease. *Intern Med*, 2006; 45: 1165-7.
- Jmoudiak M, Futerman AH. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. *Br J Haematol*, 2005; 129: 178-88.
- Johnson WG, Hodge SE, Duvoisin R. Twin studies and the genetics of Parkinson's disease--a reappraisal. *Mov Disord*, 1990; 5: 187-94.
- Kalinderi K, Bostantjopoulou S, Paisan-Ruiz C, Katsarou Z, Hardy J, Fidani L. Complete screening for glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease patients from Greece. *Neurosci Lett*, 2009; 452: 87-9.
- Kaye EM, Ullman MD, Wilson ER, Barranger JA. Type 2 and type 3 Gaucher disease: a morphological and biochemical study. *Ann Neurol*, 1986; 20: 223-30.
- King JO. Progressive myoclonic epilepsy due to Gaucher's disease in an adult. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1975; 38: 849-54.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 1998; 392: 605-8.
- Kolodny EH, Ullman MD, Mankin HJ, Raghavan SS, Topol J, Sullivan JL. Phenotypic manifestations of Gaucher disease: clinical features in 48 biochemically verified type 1 patients and comment on type 2 patients. *Prog Clin Biol Res*, 1982; 95: 33-65.
- Koller W, Vetere-Overfield B, Gray C, Alexander C, Chin T, Dolezal J, Hassanein R, Tanner C. Environmental risk factors in Parkinson's disease. *Neurology*, 1990; 40: 1218-21.
- Koller WC, Glatt SL, Hubble JP, Paolo A, Troster AI, Handler MS, Horvat RT, Martin C, Schmidt K, Karst A, *et al.* Apolipoprotein E genotypes in Parkinson's disease with and without dementia. *Ann Neurol*, 1995; 37: 242-5.

- Kono S, Shirakawa K, Ouchi Y, Sakamoto M, Ida H, Sugiura T, Tomiyama H, Suzuki H, Takahashi Y, Miyajima H, Hattori N, Mizuno Y. Dopaminergic neuronal dysfunction associated with parkinsonism in both a Gaucher disease patient and a carrier. *J Neurol Sci*, 2007; 252: 181-4.
- Lacerda L, Amaral O, Pinto R, Aerts J, Sa Miranda MC. The N370S mutation in the glucocerebrosidase gene of Portuguese type 1 Gaucher patients: linkage to the PvuII polymorphism. *J Inherit Metab Dis*, 1994; 17: 85-8.
- Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*, 1998; 339: 1044-53.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 1983; 219: 979-80.
- Langston JW, Ballard PA, Jr. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med*, 1983; 309: 310.
- Lauterbach M, Martins IP, Castro-Caldas A, Bernardo M, Luis H, Amaral H, Leitao J, Martin MD, Townes B, Rosenbaum G, Woods JS, Derouen T. Neurological outcomes in children with and without amalgam-related mercury exposure: seven years of longitudinal observations in a randomized trial. *J Am Dent Assoc*, 2008; 139: 138-45.
- Lee R. The natural history and pathology of Gaucher's disease. In *Technology Assessment Conference*, editor: Bethesda, (MD): National Institute of Health, 1995: 23-5.
- Lee RE. The pathology of Gaucher disease. *Prog Clin Biol Res*, 1982; 95: 177-217.
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet*, 2009; 373: 2055-66.
- Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet*, 2009; 18: R48-59.
- Leverenz JB, Lopez OL, Dekosky ST. The expanding role of genetics in the lewy body diseases: the glucocerebrosidase gene. *Arch Neurol*, 2009; 66: 555-6.
- Li YJ, Hauser MA, Scott WK, Martin ER, Booze MW, Qin XJ, Walter JW, Nance MA, Hubble JP, Koller WC, Pahwa R, Stern MB, Hiner BC, Jankovic J, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Haines JL, Pericak-Vance MA, Vance JM. Apolipoprotein E controls the risk and age at onset of Parkinson disease. *Neurology*, 2004; 62: 2005-9.
- Lieb H. Cerebrosidische Speicherung bei Splenomegalie (typus Gaucher). *Zeitschrift für Physiologie Chemie*, 1924; 140: 305-13.
- Lieberman RL, D'Aquino J A, Ringe D, Petsko GA. Effects of pH and iminosugar pharmacological chaperones on lysosomal glycosidase structure and stability. *Biochemistry*, 2009; 48: 4816-27.
- Linazasoro G, Van Blercom N, Ramos E. Surgical treatment of Parkinson disease: turning the tide?. *Neurologia*, 2002; 17: 1-6.
- Lockhart PJ, Lincoln S, Hulihan M, Kachergus J, Wilkes K, Bisceglia G, Mash DC, Farrer MJ. DJ-1 mutations are a rare cause of recessively inherited early onset parkinsonism mediated by loss of protein function. *J Med Genet*, 2004; 41: 22.
- Lui K, Commens C, Choong R, Jaworski R. Collodion babies with Gaucher's disease. *Arch Dis Child*, 1988; 63: 854-6.
- Lukina E, Watman N, Arreguin EA, Banikazemi M, Dragosky M, Iastrebner M, Rosenbaum H, Phillips M, Pastores GM, Rosenthal DI, Kaper M, Singh T, Puga AC, Bonate PL, Peterschmitt MJ. A Phase 2 study of eliglustat tartrate (Genz-112638), an oral substrate reduction therapy for Gaucher disease type 1. *Blood*, 2010; 116: 893-9.

- Lwin A, Orvisky E, Goker-Alpan O, LaMarca ME, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Mol Genet Metab*, 2004; 81: 70-3.
- Lyons KE, Hubble JP, Troster AI, Pahwa R, Koller WC. Gender differences in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*, 1998; 21: 118-21.
- MacLeod D, Dowman J, Hammond R, Leete T, Inoue K, Abeliovich A. The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron*, 2006; 52: 587-93.
- Machaczka M, Rucinska M, Skotnicki AB, Jurczak W. Parkinson's syndrome preceding clinical manifestation of Gaucher's disease. *Am J Hematol*, 1999; 61: 216-7.
- Manning-Bog AB, Schule B, Langston JW. Alpha-synuclein-glucocerebrosidase interactions in pharmacological Gaucher models: a biological link between Gaucher disease and parkinsonism. *Neurotoxicology*, 2009; 30: 1127-32.
- Maraganore DM, de Andrade M, Lesnick TG, Strain KJ, Farrer MJ, Rocca WA, Pant PV, Frazer KA, Cox DR, Ballinger DG. High-resolution whole-genome association study of Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 2005; 77: 685-93.
- Marchand F. Über sogenannte idiopatische Splenomegalie (typus Gaucher). *Münch Med Wochenschr*, 1907; 54: 1102.
- Marder K, Maestre G, Cote L, Mejia H, Alfaro B, Halim A, Tang M, Tycko B, Mayeux R. The apolipoprotein epsilon 4 allele in Parkinson's disease with and without dementia. *Neurology*, 1994; 44: 1330-1.
- Martínez Martín P, Rodríguez Blázquez C, Frades Payo B, de Pedro Cuesta J. Escalas de valoración de los trastornos del movimiento. In Jiménez-Jiménez FJ, Luquin MR, Molina JA, Linazasoro G, editors. *Tratado de los Trastornos del Movimiento*. Viguera: Barcelona, 2008: 291-309.
- Mata IF, Lockhart PJ, Farrer MJ. Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 2004; 13: R127-33.
- Mata IF, Samii A, Schneer SH, Roberts JW, Griffith A, Leis BC, Schellenberg GD, Sidransky E, Bird TD, Leverenz JB, Tsuang D, Zabetian CP. Glucocerebrosidase gene mutations: a risk factor for Lewy body disorders. *Arch Neurol*, 2008; 65: 379-82.
- Matoth Y, Chazan S, Cnaan A, Gelernter I, Klibansky C. Frequency of carriers of chronic (type I) Gaucher disease in Ashkenazi Jews. *Am J Med Genet*, 1987; 27: 561-5.
- Mehta A. Clinical experience with substrate reduction therapy. *Eur J Intern Med*, 2006; 17 Suppl: S13-5.
- Melamed E, Cohen C, Soffer D, Lavy S. Central nervous system complication in a patient with chronic gaucher's disease. *Eur Neurol*, 1975; 13: 167-75.
- Miller A, Brown LK, Pastores GM, Desnick RJ. Pulmonary involvement in type 1 Gaucher disease: functional and exercise findings in patients with and without clinical interstitial lung disease. *Clin Genet*, 2003; 63: 368-76.
- Miller DB, Ali SF, O'Callaghan JP, Laws SC. The impact of gender and estrogen on striatal dopaminergic neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci*, 1998; 844: 153-65.
- Miller JD, McCluer R, Kanfer JN. Gaucher's disease: neurologic disorder in adult siblings. *Ann Intern Med*, 1973; 78: 883-7.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16: 1215.

Mistry P, Cox TM. Phenotypic diversity of Gaucher disease in a pair of identical twins 1994. Proceedings of First Workshop of European Working Group in Gaucher Disease. Drukkerij University. Amsterdam, 1995.

Mistry PK, Abrahamov A. A practical approach to diagnosis and management of Gaucher's disease. *Baillieres Clin Haematol*, 1997; 10: 817-38.

Mistry PK, Sadan S, Yang R, Yee J, Yang M. Consequences of diagnostic delays in type 1 Gaucher disease: the need for greater awareness among hematologists-oncologists and an opportunity for early diagnosis and intervention. *Am J Hematol*, 2007; 82: 697-701.

Mistry PK, Sirrs S, Chan A, Pritzker MR, Duffy TP, Grace ME, Meeker DP, Goldman ME. Pulmonary hypertension in type 1 Gaucher's disease: genetic and epigenetic determinants of phenotype and response to therapy. *Mol Genet Metab*, 2002; 77: 91-8.

Mistry PK, Smith SJ, Ali M, Hatton CS, McIntyre N, Cox TM. Genetic diagnosis of Gaucher's disease. *Lancet*, 1992; 339: 889-92.

Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, Ashida R, Takahashi Y, Goto J, Fukuda Y, Date H, Iwata A, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T, Tsuji S. Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol*, 2009; 66: 571-6.

Miyatake T, Suzuki K. Additional deficiency of psychosine glucosidase in globoid cell leukodistrofy: An implication to enzyme replacement therapy In Desnick RJ, Bernlohr RW, Krivit W, editors. *Enzyme Therapy in Genetic Diseases*. Williams&Willkins: Baltimore, 1973.

Molina JA, Berbel García A, Villanueva Iza C. Enfermedad de Parkinson: clínica y diagnóstico. In Jiménez-Jiménez FJ, Luquin MR, Molina JA, Linazasoro G, editors. *Tratado de los Trastornos del Movimiento*. Viguera: Barcelona, 2008: 489-503.

Montfort M, Chabas A, Vilageliu L, Grinberg D. Functional analysis of 13 GBA mutant alleles identified in Gaucher disease patients: Pathogenic changes and "modifier" polymorphisms. *Hum Mutat*, 2004; 23: 567-75.

Moran D, Galperin E, Horowitz M. Identification of factors regulating the expression of the human glucocerebrosidase gene. *Gene*, 1997; 194: 201-13.

Mullenbach R, Lagoda PJ, Welter C. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trends Genet*, 1989; 5: 391.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986; 51: 263-73.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987; 155: 335-50.

Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E, Reches A, Bembi B, Zimran A. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *QJM*, 1996; 89: 691-4.

Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH, Li A, Holton J, Guerreiro R, Paudel R, Segarane B, Singleton A, Lees A, Hardy J, Houlden H, Revesz T, Wood NW. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain*, 2009; 132: 1783-94.

Nichols WC, Pankratz N, Marek DK, Pauciulo MW, Elsaesser VE, Halter CA, Rudolph A, Wojcieszek J, Pfeiffer RF, Foroud T. Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology*, 2009; 72: 310-6.

- Nilsson O, Grabowski GA, Ludman MD, Desnick RJ, Svennerholm L. Glycosphingolipid studies of visceral tissues and brain from type 1 Gaucher disease variants. *Clin Genet*, 1985; 27: 443-50.
- Nilsson O, Mansson JE, Hakansson G, Svennerholm L. The occurrence of psychosine and other glycolipids in spleen and liver from the three major types of Gaucher's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1982; 712: 453-63.
- Nilsson O, Svennerholm L. Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. *J Neurochem*, 1982; 39: 709-18.
- Norman RM, Urich H, Lloyd OC. The neuropathology of infantile Gaucher's disease. *J Pathol Bacteriol*, 1956; 71: 121.
- Nutt JG, Fellman JH. Pharmacokinetics of levodopa. *Clin Neuropharmacol*, 1984; 7: 35-49.
- Nyren P. The history of pyrosequencing. *Methods Mol Biol*, 2007; 373: 1-14.
- Oberling C, Woringer P. La maladie de Gaucher chez le nourrisson. *Rev Fr Pediatr*, 1927; 3: 475-532.
- Orvisky E, Park JK, LaMarca ME, Ginns EI, Martin BM, Tayebi N, Sidransky E. Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: correlation with phenotype and genotype. *Mol Genet Metab*, 2002; 76: 262-70.
- Pankratz N, Byder L, Halter C, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, Foroud T, Nichols WC. Presence of an APOE4 allele results in significantly earlier onset of Parkinson's disease and a higher risk with dementia. *Mov Disord*, 2006; 21: 45-9.
- Parent A, Cote PY, Lavoie B. Chemical anatomy of primate basal ganglia. *Prog Neurobiol*, 1995; 46: 131-97.
- Parent A, Hazrati LN. Anatomical aspects of information processing in primate basal ganglia. *Trends Neurosci*, 1993; 16: 111-6.
- Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev*, 1995; 20: 91-127.
- Park JK, Tayebi N, Stubblefield BK, LaMarca ME, MacKenzie JJ, Stone DL, Sidransky E. The E326K mutation and Gaucher disease: mutation or polymorphism? *Clin Genet*, 2002; 61: 32-4.
- Parkinson Study Group. DATATOP: a multicenter controlled clinical trial in early Parkinson's disease. *Parkinson Study Group. Arch Neurol*, 1989; 46: 1052-60.
- Parkinson Study Group. A controlled trial of rasagiline in early Parkinson disease: the TEMPO Study. *Arch Neurol*, 2002; 59: 1937-43.
- Parsian A, Racette B, Goldsmith LJ, Perlmutter JS. Parkinson's disease and apolipoprotein E: possible association with dementia but not age at onset. *Genomics*, 2002; 79: 458-61.
- Pastores G, Einhorn TA. Skeletal complications of Gaucher's disease: pathophysiology, evaluation and treatment. *Semin Hematol* 1995; 32: 20-7.
- Pastores GM, Weinreb NJ, Aerts H, Andria G, Cox TM, Giralt M, Grabowski GA, Mistry PK, Tylki-Szymanska A. Therapeutic goals in the treatment of Gaucher disease. *Semin Hematol*, 2004; 41: 4-14.

Patterson MC, Horowitz M, Abel RB, Currie JN, Yu KT, Kaneski C, Higgins JJ, O'Neill RR, Fedio P, Pikus A, *et al.* Isolated horizontal supranuclear gaze palsy as a marker of severe systemic involvement in Gaucher's disease. *Neurology*, 1993; 43: 1993-7.

Payami H, Larsen K, Bernard S, Nutt J. Increased risk of Parkinson's disease in parents and siblings of patients. *Ann Neurol*, 1994; 36: 659-61.

Pelled D, Shogomori H, Futerman AH. The increased sensitivity of neurons with elevated glucocerebroside to neurotoxic agents can be reversed by imiglucerase. *J Inherit Metab Dis*, 2000; 23: 175-84.

Pennelli N, Scaravilli F, Zacchello F. The morphogenesis of Gaucher cells investigated by electron microscopy. *Blood*, 1969; 34: 331-47.

Pentchev PG, Kusiak JW, Barranger JA, Furbish FS, Rapoport SI, Massey JM, Brady RO. Factors that influence the uptake and turnover of glucocerebroside and alpha-galactosidase in mammalian liver. *Adv Exp Med Biol*, 1978; 101: 745-52.

Perez RG, Hastings TG. Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *J Neurochem*, 2004; 89: 1318-24.

Petroheos M, Tricoulis D, Kotsiras I, Vouzoukos A. Ocular manifestations of Gaucher's disease. *Am J Ophthalmol*, 1975; 80: 1006-10.

Petrucelli L, O'Farrell C, Lockhart PJ, Baptista M, Kehoe K, Vink L, Choi P, Wolozin B, Farrer M, Hardy J, Cookson MR. Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron*, 2002; 36: 1007-19.

Plante-Bordeneuve V, Taussig D, Thomas F, Ziegler M, Said G. A clinical and genetic study of familial cases of Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 1995; 133: 164-72.

Platt FM, Jeyakumar M, Andersson U, Priestman DA, Dwek RA, Butters TD, Cox TM, Lachmann RH, Hollak C, Aerts JM, Van Weely S, Hrebicek M, Moyses C, Gow I, Elstein D, Zimran A. Inhibition of substrate synthesis as a strategy for glycolipid lysosomal storage disease therapy. *J Inherit Metab Dis*, 2001; 24: 275-90.

Pleva J. Dental mercury--a public health hazard. *Rev Environ Health*, 1994; 10: 1-27.

Pocovi M, Cenarro A, Civeira F, Torralba MA, Perez-Calvo JI, Mozas P, Giraldo P, Giralt M, Myers RH, Cupples LA, Ordovas JM. Beta-glucocerebroside gene locus as a link for Gaucher's disease and familial hypo-alpha-lipoproteinaemia. *Lancet*, 1998; 351: 1919-23.

Poewe W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, 2008; 15: 14-20.

Pramstaller PP, Schlossmacher MG, Jacques TS, Scaravilli F, Eskelson C, Pepivani I, Hedrich K, Adel S, Gonzales-McNeal M, Hilker R, Kramer PL, Klein C. Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Ann Neurol*, 2005; 58: 411-22.

Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res*, 2001; 86: 122-7.

Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Shrivastava S. A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology*, 2000; 21: 435-40.

Qi X, Grabowski GA. Acid beta-glucosidase: intrinsic fluorescence and conformational changes induced by phospholipids and saposin C. *Biochemistry*, 1998; 37: 11544-54.

Rafi MA, de Gala G, Zhang XL, Wenger DA. Mutational analysis in a patient with a variant form of Gaucher disease caused by SAP-2 deficiency. *Somat Cell Mol Genet*, 1993; 19: 1-7.

- Raghavan SS, Topol J, Kolodny EH. Leukocyte beta-glucosidase in homozygotes and heterozygotes for Gaucher disease. *Am J Hum Genet*, 1980; 32: 158-73.
- Rappeport JM, Ginns EI. Bone-marrow transplantation in severe Gaucher's disease. *N Engl J Med*, 1984; 311: 84-8.
- Ratcliffe HE, Swanson GM, Fischer LJ. Human exposure to mercury: a critical assessment of the evidence of adverse health effects. *J Toxicol Environ Health*, 1996; 49: 221-70.
- Rideout HJ, Dietrich P, Wang Q, Dauer WT, Stefanis L. alpha-synuclein is required for the fibrillar nature of ubiquitinated inclusions induced by proteasomal inhibition in primary neurons. *J Biol Chem*, 2004; 279: 46915-20.
- Ringe D, Petsko GA. What are pharmacological chaperones and why are they interesting? *J Biol*, 2009; 8: 80.
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem*, 1996; 242: 84-9.
- Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, 1998; 281: 363-5.
- Rosenthal DI, Doppelt SH, Mankin HJ, Dambrosia JM, Xavier RJ, McKusick KA, Rosen BR, Baker J, Niklason LT, Hill SC, *et al.* Enzyme replacement therapy for Gaucher disease: skeletal responses to macrophage-targeted glucocerebrosidase. *Pediatrics*, 1995; 96: 629-37.
- Rozenberg R, Fox DC, Sobreira E, Pereira LV. Detection of 12 new mutations in Gaucher disease Brazilian patients. *Blood Cells Mol Dis*, 2006; 37: 204-9.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985; 230: 1350-4.
- Sambrook J, Fitsch EF, Maniatis T. Enzymes used in molecular cloning. In Nolan C, editor. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989a: 5.3- 5.8.
- Sambrook J, Fitsch EF, Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. In Nolan C, editor. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989b: 6.36-6.44.
- Sambrook J, Fitsch EF, Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. In Nolan C, editor. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989c: 6.1- 6.19.
- Samuel R, Katz K, Papapoulos SE, Yosipovitch Z, Zaizov R, Liberman UA. Aminohydroxy propylidene bisphosphonate (APD) treatment improves the clinical skeletal manifestations of Gaucher's disease. *Pediatrics*, 1994; 94: 385-9.
- Sarria AJ, Giraldo P, Perez-Calvo JI, Pocovi M. Detection of three rare (G377S, T134P and 1451delAC), and two novel mutations (G195W and Rec[1263del55;1342G>C] in Spanish Gaucher disease patients. *Mutation in brief no. 251*. Online. *Hum Mutat*, 1999; 14: 88.
- Sato C, Morgan A, Lang AE, Salehi-Rad S, Kawarai T, Meng Y, Ray PN, Farrer LA, St George-Hyslop P, Rogaeva E. Analysis of the glucocerebrosidase gene in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2005; 20: 367-70.
- Scherfler C, Schwarz J, Antonini A, Grosset D, Valldeoriola F, Marek K, Oertel W, Tolosa E, Lees AJ, Poewe W. Role of DAT-SPECT in the diagnostic work up of parkinsonism. *Mov Disord*, 2007; 22: 1229-38.

Schiffmann R, Heyes MP, Aerts JM, Dambrosia JM, Patterson MC, DeGraba T, Parker CC, Zirzow GC, Oliver K, Tedeschi G, Brady RO, Barton NW. Prospective study of neurological responses to treatment with macrophage-targeted glucocerebrosidase in patients with type 3 Gaucher's disease. *Ann Neurol*, 1997; 42: 613-21.

Schnabel D, Schroder M, Sandhoff K. Mutation in the sphingolipid activator protein 2 in a patient with a variant of Gaucher disease. *FEBS Lett*, 1991; 284: 57-9.

Schneider JA, Gearing M, Robbins RS, de l'Aune W, Mirra SS. Apolipoprotein E genotype in diverse neurodegenerative disorders. *Ann Neurol*, 1995; 38: 131-5.

Schrag A. Epidemiología de los trastornos del movimiento. In Jankovick J, Tolosa E, editors. *Enfermedad de Parkinson y trastornos del movimiento*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia: 50-1.

Schwarz A, Futerman AH. Distinct roles for ceramide and glucosylceramide at different stages of neuronal growth. *J Neurosci*, 1997; 17: 2929-38.

Seibyl J, Jennings D, Tabamo R, Marek K. Neuroimaging trials of Parkinson's disease progression. *J Neurol*, 2004; 251: 9-13.

Shafit-Zagardo B, Devine EA, Smith M, Arrendodo-Vega F, Desnick RJ. Assignment of the gene for acid beta-glucosidase to human chromosome 1. *Am J Hum Genet*, 1981; 33: 564-75.

Shenjere P, Roy A, Eyden B, Banerjee SS. Pseudo-Gaucher cells in multiple myeloma. *Int J Surg Pathol*, 2008; 16: 176-9.

Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*, 2000; 25: 302-5.

Shoulson I. DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism. *Ann Neurol*, 1998; 44: S160-6.

Sidransky E. Gaucher disease and parkinsonism. *Mol Genet Metab*, 2005; 84: 302-4.

Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. *Mol Genet Metab*, 2004; 83: 6-15.

Sidransky E, Fartasch M, Lee RE, Metlay LA, Abella S, Zimran A, Gao W, Elias PM, Ginns EI, Holleran WM. Epidermal abnormalities may distinguish type 2 from type 1 and type 3 of Gaucher disease. *Pediatr Res*, 1996; 39: 134-41.

Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, Bar-Shira A, Berg D, Bras J, Brice A, Chen CM, Clark LN, Condroyer C, De Marco EV, Durr A, Eblan MJ, Fahn S, Farrer MJ, Fung HC, Gan-Or Z, Gasser T, Gershoni-Baruch R, Giladi N, Griffith A, Gurevich T, Januario C, Kropp P, Lang AE, Lee-Chen GJ, Lesage S, Marder K, Mata IF, Mirelman A, Mitsui J, Mizuta I, Nicoletti G, Oliveira C, Ottman R, Orr-Urtreger A, Pereira LV, Quattrone A, Rogaeva E, Rolfs A, Rosenbaum H, Rozenberg R, Samii A, Samaddar T, Schulte C, Sharma M, Singleton A, Spitz M, Tan EK, Tayebi N, Toda T, Troiano AR, Tsuji S, Wittstock M, Wolfsberg TG, Wu YR, Zabetian CP, Zhao Y, Ziegler SG. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 2009; 361: 1651-61.

Sloan H, Breslow, JL. Foam cells In Nathan D, Oski, FA, editor. *Hematology of Infancy and Childhood* Filadelfia Saunders 1974: 760-73.

Smith RL, Hutchins GM, Sack GH, Jr., Ridolfi RL. Unusual cardiac, renal and pulmonary involvement in Gaucher's disease. Intersitial glucocerebroside accumulation, pulmonary hypertension and fatal bone marrow embolization. *Am J Med*, 1978; 65: 352-60.

- Socal MP, Bock H, Michelin-Tirelli K, Hilbig A, Saraiva-Pereira ML, Rieder CR, Jardim LB. Parkinson's disease and the heterozygous state for glucocerebrosidase mutations among Brazilians. *Parkinsonism Relat Disord*, 2009; 15: 76-8.
- Sorge J, Kuhl W, West C, Beutler E. Complete correction of the enzymatic defect of type I Gaucher disease fibroblasts by retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987; 84: 906-9.
- Sorge J, West C, Westwood B, Beutler E. Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985; 82: 7289-93.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 1997; 388: 839-40.
- Stahl PD, Rodman JS, Miller MJ, Schlesinger PH. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978; 75: 1399-403.
- Stein P, Yu H, Jain D, Mistry PK. Hyperferritinemia and iron overload in type 1 Gaucher disease. *Am J Hematol*; 85: 472-6.
- Stern G. Did parkinsonism occur before 1817? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1989; Suppl: 11-2.
- Stern M, Dulaney E, Gruber SB, Golbe L, Bergen M, Hurtig H, Gollomp S, Stolley P. The epidemiology of Parkinson's disease. A case-control study of young-onset and old-onset patients. *Arch Neurol*, 1991; 48: 903-7.
- Stirnemann J, Caubel I, Kettaneh A, Fain O, Belmatoug N. Epidemiologic, clinical, biological and therapeutic aspects of Gaucher disease. *Presse Med*, 2003; 32: 503-11.
- Strasberg PM, Triggs-Raine BL, Warren IB, Skomorowski MA, McInnes B, Becker LE, Callahan JW, Clarke JT. Genotype-phenotype pitfalls in Gaucher disease. *J Clin Lab Anal*, 1994; 8: 228-36.
- Strasberg PM, Warren I, Skomorowski MA, Lowden JA. HPLC analysis of neutral glycolipids: an aid in the diagnosis of lysosomal storage disease. *Clin Chim Acta*, 1983; 132: 29-41.
- Suzuki Y, Ogawa S, Sakakibara Y. Chaperone therapy for neuronopathic lysosomal diseases: competitive inhibitors as chemical chaperones for enhancement of mutant enzyme activities. *Perspect Medicin Chem*, 2009; 3: 7-19.
- Tan EK, Tang M, Tan LC, Wu YR, Wu RM, Ross OA, Zhao Y. Lrrk2 R1628P in non-Chinese Asian races. *Ann Neurol*, 2008; 64: 472-3.
- Tan EK, Tong J, Fook-Chong S, Yih Y, Wong MC, Pavanni R, Zhao Y. Glucocerebrosidase mutations and risk of Parkinson disease in Chinese patients. *Arch Neurol*, 2007; 64: 1056-8.
- Tanner CM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin*, 1992; 10: 317-29.
- Tanner CM, Chen B, Wang W, Peng M, Liu Z, Liang X, Kao LC, Gilley DW, Goetz CG, Schoenberg BS. Environmental factors and Parkinson's disease: a case-control study in China. *Neurology*, 1989; 39: 660-4.
- Tanner CM, Goldman SM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin*, 1996; 14: 317-35.
- Tayebi N, Callahan M, Madike V, Stubblefield BK, Orvisky E, Krasnewich D, Fillano JJ, Sidransky E. Gaucher disease and parkinsonism: a phenotypic and genotypic characterization. *Mol Genet Metab*, 2001; 73: 313-21.
- Tayebi N, Walker J, Stubblefield B, Orvisky E, LaMarca ME, Wong K, Rosenbaum H, Schiffmann R, Bembi B, Sidransky E. Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does

- glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? *Mol Genet Metab*, 2003; 79: 104-9.
- Taylor CA, Saint-Hilaire MH, Cupples LA, Thomas CA, Burchard AE, Feldman RG, Myers RH. Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: a New England-based case control study. *Am J Med Genet*, 1999; 88: 742-9.
- Theise ND, Ursell PC. Pulmonary hypertension and Gaucher's disease: logical association or mere coincidence? *Am J Pediatr Hematol Oncol*, 1990; 12: 74-6.
- Thomas A, Iacono D, Luciano AL, Armellino K, Di Iorio A, Onofri M. Duration of amantadine benefit on dyskinesia of severe Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2004; 75: 141-3.
- Toft M, Pielsticker L, Ross OA, Aasly JO, Farrer MJ. Glucocerebrosidase gene mutations and Parkinson disease in the Norwegian population. *Neurology*, 2006; 66: 415-7.
- Torralba MA, Perez-Calvo JI, Pastores GM, Cénarro A, Giraldo P, Pocovi M. Identification and characterization of a novel mutation c.1090G>T (G325W) and nine common mutant alleles leading to Gaucher disease in Spanish patients. *Blood Cells Mol Dis*, 2001; 27: 489-95.
- Tran HA. Images in Endocrinology: Erlenmeyer Flask *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89: 4827-8.
- Trojanowski JQ, Goedert M, Iwatsubo T, Lee VM. Fatal attractions: abnormal protein aggregation and neuron death in Parkinson's disease and Lewy body dementia. *Cell Death Differ*, 1998; 5: 832-7.
- Troster AI, Fields JA, Paolo AM, Koller WC. Absence of the apolipoprotein E epsilon4 allele is associated with working memory impairment in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 2006; 248: 62-7.
- Tsai CH, Lo SK, See LC, Chen HZ, Chen RS, Weng YH, Chang FC, Lu CS. Environmental risk factors of young onset Parkinson's disease: a case-control study. *Clin Neurol Neurosurg*, 2002; 104: 328-33.
- Tsuji S, Choudhary PV, Martin BM, Winfield S, Barranger JA, Ginns EI. Nucleotide sequence of cDNA containing the complete coding sequence for human lysosomal glucocerebrosidase. *J Biol Chem*, 1986; 261: 50-3.
- Uitti RJ, Snow BJ, Shinotoh H, Vingerhoets FJ, Hayward M, Hashimoto S, Richmond J, Markey SP, Markey CJ, Calne DB. Parkinsonism induced by solvent abuse. *Ann Neurol*, 1994; 35: 616-9.
- Vaamonde Gamo J, Folores Barragán JM. Tratamiento farmacológico de la Enfermedad de Parkinson inicial. In Jiménez-Jiménez FJ, Luquin MR, Molina JA, Linazasoro G, ed. *Tratado de los Trastornos del Movimiento*. Viguera: Barcelona, 2008: 559-69.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 2004; 304: 1158-60.
- Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol*, 2003; 157: 1015-22.
- Varkonyi J, Rosenbaum H, Baumann N, MacKenzie JJ, Simon Z, Aharon-Peretz J, Walker JM, Tayebi N, Sidransky E. Gaucher disease associated with parkinsonism: four further case reports. *Am J Med Genet A*, 2003; 116: 348-51.

- Velayati A, Yu WH, Sidransky E. The role of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease and Lewy body disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2010; 10: 190-8.
- Vieregge P, Schiffke KA, Friedrich HJ, Muller B, Ludin HP. Parkinson's disease in twins. *Neurology*, 1992; 42: 1453-61.
- Vines JJ, Larumbe R, Gaminde I, Artazcoz MT. Incidence of idiopathic and secondary Parkinson disease in Navarre. Population-based case registry. *Neurologia*, 1999; 14: 16-22.
- Walker JM, Lwin A, Tayebi N, LaMarca ME, Orvisky E, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutation T369M appears to be another polymorphism. *Clin Genet*, 2003; 63: 237-8.
- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem*, 2003; 278: 25009-13.
- Weisgraber KH, Rall SC, Jr., Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem*, 1981; 256: 9077-83.
- Wenger DA, Roth S, Kudoh T, Grover WD, Tucker SH, Kaye EM, Ullman MD. Biochemical studies in a patient with subacute neuropathic Gaucher disease without visceral glucosylceramide storage. *Pediatr Res*, 1983; 17: 344-8.
- Wenstrup RJ, Roca-Espiau M, Weinreb NJ, Bembi B. Skeletal aspects of Gaucher disease: a review. *Br J Radiol*, 2002; 75 Suppl 1: A2-12.
- Wong K, Sidransky E, Verma A, Mixon T, Sandberg GD, Wakefield LK, Morrison A, Lwin A, Colegial C, Allman JM, Schiffmann R. Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Mol Genet Metab*, 2004; 82: 192-207.
- Wu YR, Chen CM, Chao CY, Ro LS, Lyu RK, Chang KH, Lee-Chen GJ. Glucocerebrosidase gene mutation is a risk factor for early onset of Parkinson disease among Taiwanese. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2007; 78: 977-9.
- Yu Z, Sawkar AR, Kelly JW. Pharmacologic chaperoning as a strategy to treat Gaucher disease. *FEBS J*, 2007; 274: 4944-50.
- Ziegler SG, Eblan MJ, Gutti U, Hruska KS, Stubblefield BK, Goker-Alpan O, LaMarca ME, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations in Chinese subjects from Taiwan with sporadic Parkinson disease. *Mol Genet Metab*, 2007; 91: 195-200.
- Zimran A, Gelbart T, Westwood B, Grabowski GA, Beutler E. High frequency of the Gaucher disease mutation at nucleotide 1226 among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet*, 1991; 49: 855-9.
- Zimran A, Hadas-Halpern I, Zevin S, Levy-Lahad E, Abrahamov A. Low-dose high-frequency enzyme replacement therapy for very young children with severe Gaucher disease. *Br J Haematol*, 1993; 85: 783-6.
- Zimran A, Kay A, Gelbart T, Garver P, Thurston D, Saven A, Beutler E. Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients. *Medicine (Baltimore)*, 1992; 71: 337-53.



## 8. ANEXOS

**ANEXO I: Clasificación clínica de la enfermedad de Gaucher (Cox and Schofield, 1997; Lee, 1995):**

Manifestación	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3A	Tipo 3B	Tipo 3C
<b>Edad de inicio</b>	Adultos/ adultos jóvenes	<1 año	>10 años	< 5 años	2-20 años
<b>Visceromegalias</b>	+ a +++	± a +	± a +	+++	+
<b>Enfermedad ósea</b>	+ a +++	-	-	+++	-
<b>Enfermedad valvular cardíaca</b>	-	-	-	-	+++
<b>Afectación SNC</b>	-	+++	+	-	±
<b>Apraxia oculomotora</b>	-	+	+	+	+
<b>Opacidad corneal</b>	-	NE	NE	NE	+
<b>Supervivencia</b>	60 años	< 3 años	2 <sup>a</sup> a 3 <sup>a</sup> década	2 <sup>a</sup> a 3 <sup>a</sup> década	2 <sup>a</sup> a 3 <sup>a</sup> década
<b>Raza étnica</b>	Judíos Ashkenazi	SP	Norte de Suecia	SP	SP

NE: no evaluado; SP: sin preferencia étnica.

**ANEXO II: Genes y loci más importantes implicados en la enfermedad de Parkinson de tipo familiar:**

Gen / Locus (posición cromosómica) / Tipo de herencia	Edad de comienzo	Mutaciones	Fenotipo clínico
<p><i>SNCA</i></p> <p>PARK1 (4q21-q23)</p> <p>PARK4 (4p15)</p> <p>AD</p>	<p>30 – 65 años (duplicaciones) / 24 – 48 años (triplicaciones)</p>	<p>Sustituciones A53T, A30P y E46K.</p> <p>Duplicaciones, triplicaciones genómicas</p>	<p>Parkinsonismo con respuesta progresiva a L-DOPA, asociado con deterioro cognitivo, disfunción autonómica y demencia</p>
<p><i>LRRK2/DARDARINA</i></p> <p>PARK8 (12q12-12p11q13)</p> <p>AD</p>	<p>50-70 años</p>	<p>Sustituciones dominantes: Arg1441Cys/ Gly/His; Tyr 1699Cys; Ile2012Thr; Gly2019Ser; Ile2020Thr</p>	<p>Parkinsonismo consistente con EP esporádica; distonía; desarrollando amiotrofia, parálisis de mirada y demencia ocasional</p>
<p><i>PARKINA</i></p> <p>PARK2 (6q25.2-q27)</p> <p>AR</p>	<p>30 años</p>	<p>Mutaciones <i>missense</i> (homocigotos, heterocigotos compuestos) y deleciones exónicas, duplicaciones, triplicaciones</p>	<p>Parkinsonismo, que cursa con distonía, con fluctuaciones diurnas; típicamente responde a dosis muy bajas de L-DOPA</p>
<p><i>PKIN1</i></p> <p>PARK6 (1p35-p36)</p> <p>AR</p>	<p>20-40 años</p>	<p>Mutaciones <i>missense</i> y deleciones exónicas</p>	<p>Parkinsonismo que progresa lentamente y responde a dosis bajas de L-DOPA</p>
<p><i>DJ1</i></p> <p>PARK7 (1p36)</p> <p>AR</p>	<p>20-40 años</p>	<p>Homocigotos <i>missense</i> (Leu166Pro) y deleciones (DelEx1-5) y heterocigotos compuestos</p>	<p>Parkinsonismo que progresa lentamente, ocasionalmente perturbaciones psiquiátricas o de comportamiento</p>

AD: Autosómica dominante; AR: autosómica recesiva.

---

**ANEXO III: Enfermedades con formación de cuerpos de Lewy:**

Enfermedad de Parkinson

Enfermedad difusa por cuerpos Lewy (Kosaka y cols., 1984)

Parálisis supranuclear progresiva (Gearing y cols, 1994)

Esclerosis lateral amiotrófica familiar y esporádica (Takahashi y cols, 1972, Maruyama y cols., 1989; Sasaki y Maruyama, 1991)

Síndrome de Hallervorden-Spatz (Arawaka y cols., 1998)

Panencefalitis crónica

Ataxia-telangectasia

Atrofia multisistémica.

**ANEXO IV: Criterios clínicos diagnósticos del Banco de Cerebros de la Sociedad de la enfermedad de Parkinson del Reino Unido (UK Parkinson's Disease Society Brain Bank):**

- a) Diagnóstico de parkinsonismo:
- Bradicinesia
  - Al menos uno de los siguientes:
    - Rigidez muscular
    - Temblor en reposo
    - Inestabilidad postural (no explicada por un trastorno visual, vestibular, cerebeloso o de la sensibilidad propioceptiva)
- b) Criterios de exclusión
- Accidentes cerebrales vasculares de repetición
  - Traumatismos craneales de repetición
  - Historia de encefalitis o crisis oculógiras
  - Tratamiento con neurolépticos al inicio de los síntomas
  - Más de un familiar afecto
  - Remisión sostenida o estrictamente unilateral después de 3 años
  - Oftalmoplejia supranuclear, signos cerebelosos o piramidales
  - Signos disautonómicos severos
  - Demencia precoz severa con alteración de la memoria, lenguaje y praxis
  - Signo de Babinski
  - Presencia de un tumor cerebral o una hidrocefalia en la tomografía axial computerizada (TAC)
  - Ausencia de respuesta a L-DOPA
  - Exposición 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)
- c) Criterios de apoyo para el diagnóstico de la EP (tres o más son requeridos para el diagnóstico definitivo de enfermedad de Parkinson):
- Inicio unilateral
  - Presencia de temblor de reposo
  - Trastorno progresivo
  - Asimetría persistente, afectando más al lado donde se inició la enfermedad
  - Excelente respuesta a L-DOPA (70-100%)
  - Corea inducida por L-DOPA.
  - Respuesta a L-DOPA durante más de 5 años.
  - Curso clínico de 10 años o más

---

## ANEXO V: Estadios de evolución de la Enfermedad de Parkinson según de Hoehn y Yahr:

- Estadio 1
  - Signos y síntomas en un solo lado
  - Síntomas leves
  - Síntomas molestos pero no incapacitantes
  - Presencia de síntomas con temblor en alguna extremidad
  - Amigos notan cambios en la postura, expresión facial y marcha
- Estadio 2
  - Síntomas bilaterales
  - Mínima discapacidad
  - La marcha y la postura están afectadas
- Estadio 3
  - Significante enlentecimiento de los movimientos corporales
  - Dificultad para mantener el equilibrio tanto de pie como al andar.
  - Disfunción generalizada moderadamente severa
- Estadio 4
  - Síntomas severos
  - Todavía puede andar cierto recorrido
  - Rigidez y bradicinesia
  - No puede vivir solo
  - El temblor puede ser menor que en los estadios anteriores
- Estadio 5
  - Estadio caquético
  - Invalidez total
  - No puede andar ni mantenerse de pie
  - Requiere cuidados de una enfermera

## ANEXO VI: Protocolo de recogida de datos de los sujetos incluidos en el estudio:

ESTUDIO PARKEG			
<b>RECOGIDA DE DATOS DE SCREENING</b>			
NOMBRE DEL PACIENTE			
FECHA DE NACIMIENTO			
FECHA DE DIAGNOSTICO DE E PARKINSON			
TRATAMIENTO			
NEUROLOGO QUE LO TRATA			
LUGAR DONDE LO VISITAN.	HUMS	HCU	HRV Privado (.....)
	CERyC	CESJ	CEGC
SEXO	VARON	MUJER	
PESO	kg	TALLA	cm
DATOS CLINICOS			
ESPLENECTOMIA		SI	NO
ESPLENOMEGALIA		cm (por debajo del reborde costal) (ecográfica)	
HEPATOMEGALIA		cm (por debajo del reborde costal) (ecográfica)	
DOLORES OSEOS		SI	NO
FRACTURA DE CADERA		SI	NO
OTROS			
DATOS ANALITICOS			
Hemoglobina		g/dL	
Leucocitos		$\times 10^9/L$	
Plaquetas		$\times 10^9/L$	
QUITOTRIOSIDASA		nMol/mL.h	
CCL18		mcg/L	
MUTACIONES			

**RIESGOS PERSONALIZADOS**

Derivados de la situación particular de cada paciente (cumplimentar si procede):

.....  
.....

**DECLARACIONES Y FIRMAS:**

**. Declaración del enfermo:**

- Que el médico después mencionado me ha informado sobre:
  - La finalidad de los estudios a realizar con las muestras de sangre, líquidos biológicos y tejido de mi obtenidos
  - las garantías que se me ofrecen para asegurar su correcta utilización.
  - que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento
- He comprendido la información recibida y podido formular todas las preguntas que he creído oportunas

•  
Nombre..... Firma: .....

**. Declaración del médico, de que ha informado debidamente al paciente.**

Nombre ..... Firma .....

**. Declaración del familiar, persona allegada o representante legal en su caso, de que han recibido la información por incompetencia del paciente**

Nombre ..... Firma .....

**. Declaración de testigo en su caso.**

Nombre ..... Firma .....

## ANEXO VII: Documento de consentimiento informado:



**i+cs**  
Instituto Aragonés  
de Ciencias de la Salud



**FEETEG**

Estudio epidemiológico y genético-molecular en pacientes con Enfermedad de Parkinson.

**“DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO”**

Apellidos : .....

Nombre : .....

Nº Historia clínica ..... Fecha: .....

**UTILIZACIÓN DE SANGRE, LÍQUIDOS BIOLÓGICOS, TEJIDOS Y DNA /RNA PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

- Cómo Vd bien conoce padece una enfermedad neurodegenerativa por la cuál precisa realizar tratamiento y seguimiento por un especialista en Neurología. En los últimos años se ha relacionado esta enfermedad con otras alteraciones asociadas y puede identificarse el defectos en los genes que los originan. Pretendemos conocer si Vd y otros pacientes con esta misma enfermedad tienen alguno de estos marcadores.
- Solicitamos su consentimiento para participar en un estudio de la enfermedad que padece realizado en la Comunidad Autónoma de Aragón. Se trata de un estudio epidemiológico y genético para conocer si en su sangre tiene marcadores genéticos característicos de otra enfermedad de origen genético con la cuál podría estar relacionada.
- Los datos demográficos quedaran almacenados en un archivo protegido y sometido a la confidencialidad establecida por la legislación vigente.
- Los datos genéticos se obtendrán a partir de muestras de sangre periférica y quedaran almacenados de forma segura en un Banco de muestras biológicas destinado a almacenar en él las muestras relacionadas con el estudio y ubicado en el Laboratorio de Investigación del HUMS de Zaragoza
- Las muestras de sangre serán obtenidas a la vez que son utilizadas para realizar las pruebas diagnósticas y de seguimiento relacionadas con su enfermedad
  
- Las muestras de sangre son necesarias para establecer el diagnóstico y seguimiento de su enfermedad y además valorar la respuesta al tratamiento.
  
- Para establecer dicho diagnóstico y valorar la respuesta no suele ser necesario emplear todo el material obtenido, y normalmente la parte de las muestras no utilizada es almacenada o destruida.
  
- Para avanzar en la Investigación Biomédica es fundamental el poder estudiar muestras de sangre, líquidos biológicos y tejidos de pacientes con diversas enfermedades. Por ello, sería de gran utilidad que nos permitiera emplear la parte sobrante de sus muestras una vez completado el proceso diagnóstico.
  
- En caso de autorizarnos podemos garantizarle que:
  1. Todo el material se tratará con la mayor confidencialidad posible.
  2. Nunca se le someterá a punciones o biopsias con la única finalidad de obtener material para a investigación; se empleará únicamente el material sobrante.
  3. En todo momento cumplimos con la legislación vigente sobre la materia.
  
- En el caso que de la investigación realizada obtuviéramos alguna información importante para su salud o la de sus familiares nos comprometemos a comunicárselo de forma inmediata.

## ANEXO VIII: Características antropométricas:

Tabla 1. Grupo control:

Nº ID	Edad (años)	Sexo (Mujer=M; Varón=V)	Peso (Kg)	Talla (cm)
C1	72	V	83	168
C2	70	V	80	170
C3	86	M	53	160
C4	69	V	73	172
C5	60	V	76	177
C6	75	M	52	162
C7	70	V	78	159
C8	70	V	71	157
C9	76	V	83	165
C10	69	V	74	160
C11	56	M	80	163
C12	58	M	63	162
C13	47	M	54	150
C14	57	M	70	158
C15	76	M	-	-
C16	58	V	89	174
C17	48	M	93	161
C18	42	M	57	163
C19	65	M	86	165
C20	25	M	59	165
C21	58	V	70	170
C22	55	M	79	152
C23	46	M	90	169
C24	70	V	92	180
C25	80	M	55	152
C26	65	V	85	170
C27	67	M	81	165
C28	81	V	70	170
C29	61	M	91	170
C30	74	M	69	165
C31	52	M	60	169
C32	70	M	70	155
C33	60	V	89	170
C34	58	M	60	150
C35	62	M	-	-
C36	72	M	55	160
C37	82	V	85	182
C38	67	M	57	157
C39	55	M	50	157
C40	55	M	82	165
C41	63	M	70	160

Nº ID	Edad (años)	Sexo (Mujer=M; Varón=V)	Peso (Kg)	Talla (cm)
C42	71	M	70	160
C43	44	M	60	160
C44	41	V	84	182
C45	87	V	68	172
C46	47	M	60	167
C47	75	V	69	169
C48	58	M	75	163
C49	77	V	73	172
C50	83	M	56	150
C51	65	M	76	168
C52	79	V	82	170
C53	44	M	-	-
C54	66	V	83	174
C55	75	V	-	-
C56	45	M	-	-
C57	79	M	-	-
C58	51	M	-	-
C59	77	M	70	158
C60	48	M	48	155
C61	67	M	60	150
C62	27	M	70	176
C63	51	M	62	162
C64	53	M	63	164
C65	29	M	65	160
C66	24	M	-	-
C67	67	M	52	150
C68	67	V	67	172
C69	53	M	84	165
C70	66	M	50	155
C71	47	M	69	154
C72	75	M	52	150
C73	88	V	70	170
C74	72	V	78	165
C75	26	M	64	155
C76	70	M	77	169
C77	76	M	80	152
C78	72	V	85	167
C79	66	M	68	150
C80	61	V	67	162
C81	72	M	83	158
C82	67	V	92	172
C83	76	M	57	157
C84	76	V	72	174
C85	51	M	51	150
C86	66	M	49	150
C87	63	M	80	159

Nº ID	Edad (años)	Sexo (Mujer=M; Varón=V)	Peso (Kg)	Talla (cm)
C88	63	V	78	170
C89	53	M	60	158
C90	82	V	59	182
C91	86	V	55	170
C92	83	V	89	180
C93	82	V	75	183
C94	81	V	87	175
C95	84	V	-	-
C96	82	V	82	173
C98	83	V	80	174
C99	80	V	71	172
C100	83	V	-	-
C101	69	V	-	-
C102	84	V	-	-
C103	87	V	-	-
C104	81	V	-	-
C105	86	V	-	-
C106	83	V	-	-
C107	85	V	-	-
C108	74	V	-	-
C109	73	V	-	-
C110	84	V	-	-

Nº ID: Número de identificación del sujeto.

**Tabla 2. Grupo Parkinson:**

Nº ID	Edad (años)	Edad al diagnóstico (años)	Sexo (Mujer=M; Varón=V)	Peso (Kg)	Talla (cm)
PK1	71	44	M	68	157
PK2	65	54	M	62	-
PK3	76	-	M	72	170
PK4	65	52	M	55	165
PK5	78	63	V	73	155
PK6	73	60	V	78	170
PK7	69	58	M	55	150
PK8	71	61	M	60	160
PK9	59	56	V	80	185
PK10	74	70	V	99	167
PK11	70	64	M	63	166
PK12	63	57	M	75	160
PK13	60	55	V	85	165
PK14	63	61	V	83	172
PK15	81	79	V	74	177
PK16	66	62	V	95	170

Nº ID	Edad (años)	Edad al diagnóstico (años)	Sexo (Mujer=M; Varón=V)	Peso (Kg)	Talla (cm)
PK17	77	54	M	60	162
PK18	50	40	V	53	160
PK19	58	49	M	57	149
PK20	67	64	V	78	164
PK21	71	69	V	74	165
PK22	50	47	V	72	170
PK23	74	73	M	88	160
PK24	81	63	V	66	170
PK25	67	52	M	47	148
PK26	68	66	V	81	171
PK27	80	72	M	59	153
PK28	72	63	V	94	176
PK29	70	70	M	60	156
PK30	72	54	V	84	180
PK31	72	66	M	60	150
PK32	70	58	M	52	151
PK33	55	53	V	107	170
PK34	45	39	V	85	180
PK35	74	64	V	81	168
PK36	60	52	M	86	163
PK37	55	49	V	75	180
PK38	56	47	M	95	160
PK39	63	49	V	105	178
PK40	44	30	V	95	195
PK41	67	58	V	-	-
PK42	58	44	M	75	156
PK43	63	58	V	84	174
PK44	62	48	V	83	162
PK45	71	64	V	72	170
PK46	73	61	V	60	163
PK47	76	72	V	85	175
PK48	58	55	V	80	175
PK49	68	63	V	70	178
PK50	70	40	V	84	170
PK51	66	57	V	78	173
PK52	62	52	M	70	150
PK53	63	58	M	76	157
PK54	73	65	M	69	166
PK55	73	69	M	58	156
PK56	77	68	M	58	162
PK57	64	40	V	90	168
PK58	74	64	M	60	162
PK59	62	54	V	67	161
PK60	74	59	M	79	165
PK61	81	78	V	81	170
PK62	81	71	V	94	182

Nº ID	Edad (años)	Edad al diagnóstico (años)	Sexo (Mujer=M; Varón=V)	Peso (Kg)	Talla (cm)
PK63	74	69	M	60	150
PK64	71	63	M	90	150
PK65	75	67	V	56	155
PK66	71	56	M	55	155
PK67	78	72	V	78	170
PK68	55	38	V	68	168
PK69	78	76	M	60	158
PK70	74	72	V	75	181
PK71	60	56	V	74	172
PK72	77	73	V	86	175
PK73	68	63	V	90	168
PK74	51	38	V	82	179
PK75	67	53	V	62	165
PK76	65	61	M	57	157
PK77	71	-	V	-	-
PK78	68	61	V	80	172
PK79	57	31	V	97	168
PK80	48	41	V	90	179
PK81	65	61	V	75	165
PK82	75	70	V	70	165
PK83	64	54	M	70	154
PK84	79	68	M	47	145
PK85	68	51	M	70	163
PK86	72	66	V	73	164
PK87	67	59	M	85	152
PK88	82	69	M	54	150
PK89	72	59	V	72	167
PK90	84	66	V	78	170
PK91	65	62	V	90	176
PK93	85	83	V	79	176
PK94	74	69	V	75	170
PK95	72	57	M	70	159
PK96	67	64	V	59	160
PK97	84	75	V	70	174
PK98	57	56	M	52	152
PK99	75	61	V	75	178
PK100	68	60	M	60	146
PK101	70	68	M	77	165
PK102	79	77	V	85	165
PK103	71	68	V	82	174
PK104	71	69	M	69	155
PK105	58	50	M	65	157
PK106	65	63	V	75	165
PK107	40	37	M	41	150
PK108	67	67	V	74	165
PK109	73	67	V	85	169

Nº ID	Edad (años)	Edad al diagnóstico (años)	Sexo (Mujer=M; Varón=V)	Peso (Kg)	Talla (cm)
PK110	67	67	V	78	175
PK111	73	69	M	75	162
PK112	63	58	M	77	165
PK113	78	75	M	68	157

Nº ID: Número de identificación del sujeto.

## Anexo IX: Factores de riesgo para el desarrollo de EP:

Tabla 1. Grupo control:

Nº ID	Contacto Tóxicos	Empastes dentales amalgama	Antecedentes Enfermedad Parkinson	Antecedentes enfermedad neurológica*
C1	NO	NO	NO	NO
C2	NO	NO	NO	NO
C3	NO	NO	NO	NO
C4	NO	NO	NO	NO
C5	NO	NO	NO	NO
C6	NO	NO	NO	NO
C7	NO	NO	NO	NO
C8	NO	NO	NO	NO
C9	NO	NO	NO	NO
C10	NO	NO	NO	NO
C11	NO	NO	NO	NO
C12	NO	NO	NO	NO
C13	NO	NO	NO	NO
C14	NO	NO	NO	NO
C15	NO	NO	NO	NO
C16	NO	NO	NO	NO
C17	NO	NO	NO	NO
C18	NO	NO	NO	NO
C19	NO	NO	NO	NO
C20	NO	NO	NO	NO
C21	NO	NO	SI	SI
C22	NO	NO	NO	NO
C23	NO	NO	NO	NO
C24	NO	NO	NO	NO
C25	NO	NO	NO	NO
C26	NO	NO	NO	NO
C27	NO	NO	NO	NO
C28	NO	NO	NO	NO
C29	NO	NO	NO	NO
C30	NO	NO	NO	NO
C31	NO	NO	NO	NO
C32	NO	NO	NO	NO
C33	NO	NO	NO	NO
C34	NO	NO	NO	NO
C35	-	-	-	-
C36	NO	NO	NO	SI
C37	NO	NO	NO	NO
C38	NO	NO	NO	NO
C39	NO	NO	NO	NO
C40	SI	SI	NO	NO
C41	NO	SI	NO	NO
C42	NO	NO	NO	NO

Nº ID	Contacto Tóxicos	Empastes dentales amalgama	Antecedentes Enfermedad Parkinson	Antecedentes enfermedad neurológica*
C43	NO	NO	NO	SI
C44	NO	SI	NO	NO
C45	NO	NO	NO	NO
C46	NO	NO	NO	NO
C47	NO	NO	NO	NO
C48	NO	NO	NO	NO
C49	NO	NO	NO	NO
C50	NO	NO	NO	NO
C51	NO	NO	NO	NO
C52	SI	NO	NO	NO
C53	NO	SI	NO	NO
C54	NO	NO	NO	NO
C55	NO	NO	NO	NO
C56	NO	NO	NO	NO
C57	NO	NO	NO	NO
C58	NO	NO	NO	NO
C59	NO	NO	NO	NO
C60	NO	NO	NO	NO
C61	NO	NO	NO	NO
C62	NO	NO	NO	NO
C63	NO	NO	NO	NO
C64	NO	SI	NO	NO
C65	NO	NO	NO	NO
C66	NO	NO	NO	NO
C67	NO	NO	NO	NO
C68	NO	NO	NO	NO
C69	NO	NO	NO	NO
C70	NO	NO	NO	NO
C71	NO	NO	NO	NO
C72	NO	NO	NO	NO
C73	NO	NO	NO	NO
C74	NO	NO	NO	NO
C75	NO	NO	NO	NO
C76	NO	SI	NO	NO
C77	NO	NO	NO	NO
C78	NO	NO	NO	SI
C79	NO	NO	NO	NO
C80	NO	NO	NO	NO
C81	NO	SI	NO	NO
C82	SI	NO	NO	NO
C83	NO	NO	NO	NO
C84	SI	NO	NO	NO
C85	-	-	-	-
C86	NO	NO	NO	NO
C87	NO	NO	NO	NO
C88	NO	SI	NO	NO

Nº ID	Contacto Tóxicos	Empastes dentales amalgama	Antecedentes Enfermedad Parkinson	Antecedentes enfermedad neurológica*
C89	NO	NO	NO	NO
C90	-	NO	NO	NO
C91	NO	NO	NO	NO
C92	NO	NO	NO	NO
C93	NO	NO	NO	NO
C94	NO	NO	NO	NO
C95	NO	NO	NO	NO
C96	NO	NO	NO	NO
C98	NO	NO	NO	NO
C99	NO	NO	NO	NO
C100	-	-	-	-
C101	-	-	-	-
C102	-	-	-	-
C103	-	-	-	-
C104	-	-	-	-
C105	-	-	-	-
C106	-	-	-	-
C107	-	-	-	-
C108	-	-	-	-
C109	-	-	-	-
C110	-	-	-	-

Nº ID: Número de identificación del sujeto.

\* Los antecedentes familiares de enfermedad neurológica incluyen la EP.

**Tabla 2. Grupo Parkinson:**

Nº ID	Contacto Tóxicos	Empastes dentales amalgama	Antecedentes Enfermedad Parkinson	Antecedentes enfermedad neurológica*
PK1	NO	NO	NO	NO
PK2	NO	NO	NO	NO
PK3	NO	NO	NO	NO
PK4	NO	NO	NO	NO
PK5	NO	NO	NO	NO
PK6	NO	NO	NO	NO
PK7	NO	NO	NO	NO
PK8	NO	NO	NO	NO
PK9	NO	NO	NO	NO
PK10	NO	NO	NO	NO
PK11	NO	NO	NO	NO
PK12	NO	NO	NO	NO
PK13	NO	NO	NO	NO
PK14	NO	NO	SI	SI
PK15	NO	NO	NO	NO
PK16	NO	NO	NO	NO

Nº ID	Contacto Tóxicos	Empastes dentales amalgama	Antecedentes Enfermedad Parkinson	Antecedentes enfermedad neurológica*
PK17	NO	NO	NO	NO
PK18	NO	NO	NO	NO
PK19	NO	NO	NO	NO
PK20	NO	NO	NO	NO
PK21	NO	NO	NO	NO
PK22	NO	NO	NO	NO
PK23	NO	NO	NO	NO
PK24	NO	NO	NO	NO
PK25	NO	NO	NO	NO
PK26	NO	NO	NO	NO
PK27	NO	NO	NO	NO
PK28	NO	NO	SI	SI
PK29	NO	NO	NO	NO
PK30	NO	NO	NO	NO
PK31	NO	NO	NO	NO
PK32	NO	NO	NO	NO
PK33	NO	NO	SI	SI
PK34	SI	NO	NO	NO
PK35	NO	NO	NO	NO
PK36	NO	NO	NO	NO
PK37	NO	NO	NO	NO
PK38	NO	SI	NO	NO
PK39	NO	SI	SI	SI
PK40	NO	NO	SI	SI
PK41	SI	SI	NO	NO
PK42	SI	SI	NO	NO
PK43	NO	NO	SI	SI
PK44	SI	NO	NO	NO
PK45	NO	NO	NO	NO
PK46	NO	NO	NO	NO
PK47	NO	NO	NO	NO
PK48	NO	SI	NO	NO
PK49	NO	SI	SI	SI
PK50	NO	NO	NO	NO
PK51	NO	NO	NO	NO
PK52	NO	NO	NO	NO
PK53	NO	NO	NO	NO
PK54	NO	SI	NO	NO
PK55	NO	SI	NO	NO
PK56	NO	SI	NO	NO
PK57	NO	NO	NO	NO
PK58	NO	NO	NO	NO
PK59	SI	NO	NO	NO
PK60	NO	SI	NO	NO
PK61	NO	NO	NO	NO
PK62	NO	NO	NO	NO

Nº ID	Contacto Tóxicos	Empastes dentales amalgama	Antecedentes Enfermedad Parkinson	Antecedentes enfermedad neurológica*
PK63	NO	NO	NO	NO
PK64	NO	NO	NO	NO
PK65	SI	NO	NO	NO
PK66	SI	SI	NO	NO
PK67	SI	NO	NO	NO
PK68	NO	NO	NO	NO
PK69	NO	SI	NO	NO
PK70	NO	NO	NO	NO
PK71	NO	NO	NO	NO
PK72	NO	NO	NO	NO
PK73	NO	NO	NO	NO
PK74	SI	NO	NO	NO
PK75	NO	NO	NO	NO
PK76	NO	NO	SI	SI
PK77				
PK78	NO	SI	NO	NO
PK79	NO	NO	NO	NO
PK80	SI	SI	NO	NO
PK81	NO	SI	NO	NO
PK82	SI	NO	NO	NO
PK83	NO	SI	NO	NO
PK84	NO	SI	SI	SI
PK85	NO	SI	SI	SI
PK86	SI	NO	NO	NO
PK87	NO	NO	NO	NO
PK88	NO	SI	NO	NO
PK89	NO	NO	NO	NO
PK90	SI	NO	NO	NO
PK91	NO	NO	NO	NO
PK93	NO	NO	NO	NO
PK94	SI	NO	NO	NO
PK95	NO	SI	NO	NO
PK96	NO	NO	NO	NO
PK97	SI	SI	NO	NO
PK98	NO	NO	NO	SI
PK99	NO	NO	NO	NO
PK100	NO	NO	NO	NO
PK101	NO	SI	SI	SI
PK102	NO	NO	NO	NO
PK103	NO	NO	NO	NO
PK104	SI	NO	NO	SI
PK105	NO	SI	NO	NO
PK106	NO	NO	NO	NO
PK107	NO	NO	NO	NO
PK108	NO	NO	NO	NO
PK109	NO	NO	NO	NO

Nº ID	Contacto Tóxicos	Empastes dentales amalgama	Antecedentes Enfermedad Parkinson	Antecedentes enfermedad neurológica*
PK110	NO	NO	SI	SI
PK111	NO	NO	NO	NO
PK112	NO	SI	NO	NO
PK113	NO	NO	NO	NO

Nº ID: Número de identificación del sujeto

\* Los antecedentes familiares de enfermedad neurológica incluyen la EP.