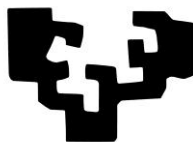


eman ta zabal zazu



Universidad Euskal Herriko
del País Vasco Unibertsitatea

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Neurociencias

Autonomic Disorders in Parkinson's Disease: Estudio del sistema nervioso vegetativo como marcador de sinucleinopatías

2016

Autora: Beatriz Tijero Merino

Directores: Juan Carlos Gómez Esteban

Juan José Zarranz Imirizaldu

A mis padres y a mi hermano,
a Óscar,
a mis pacientes, por y para ellos.

Agradecimientos

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias al trabajo, apoyo y cariño de muchas personas. Por ello quisiera agradecer en especial:

A mis directores de tesis. Al Doctor Juan José Zarranz, neurólogo y profesor con mayúsculas, por transmitirme su gran pasión por la neurología y motivarme al desarrollo de este proyecto. Me siento privilegiada de haberme formado con él. Al Doctor Juan Carlos Gómez Esteban, compañero y amigo, por haberme enseñado, animado, motivado y obligado a esforzarme. No se puede resumir con palabras todo mi agradecimiento.

A la Doctora Elena Lezcano por abrirme el camino y haber confiado en mí. A todo el equipo de Neurología del Hospital de Cruces: neurólogos, residentes y enfermeras, por compartir tantos buenos y malos momentos. A Koldo, Fernando y Marian, por su ayuda en la revisión de este trabajo. Al Servicio de Genética, a la Doctora Verónica Llorens del Servicio de Medicina Nuclear y a Ana Martínez del Servicio de Neurofisiología del Hospital de Cruces, por su colaboración en la realización de los estudios de esta tesis.

A mis pacientes, por su paciencia y confianza al ponerse en mis manos. En especial, a los pacientes de la sociedad de Parkinson de Bizkaia, por su valentía, su entusiasmo, su generosidad, su afán de superación, por sus palabras y ánimos. Por creer en mí, sin vosotros nada hubiese sido posible. A Begoña Díez, ejemplo de tesón y esfuerzo. A Unai, Eneritz, María, Omar, Nancy, Marisa, Alberto, Dani... En fin, a ASPARBI, GRACIAS.

Mi agradecimiento muy especial a la familia sobre la que se han realizado los Estudios 1 y 2, por su gran generosidad y entera disposición para ayudarnos a avanzar en el conocimiento de la enfermedad de Parkinson.

A la Fundación Gangoiti, por financiar la realización de esta tesis.

A la New York University y al Mount Sinai School of Medicine, por acogerme y dejar que formara parte de su equipo. Allí empezó todo.

A Maribel Forcadas y Javier Ruiz Ojeda, allá donde estéis, por su gran ejemplo.

A todos mis amigos, por los ánimos, las risas y por estar pendientes de mí.

Por último, quisiera dar las gracias a mi familia. A mi hermano Roberto, por cuidar de mí. A Óscar, por su paciencia, ayuda y su apoyo incondicional. A mis abuelos, por enseñarme el valor del trabajo y del esfuerzo. A mi padre, por enseñarme a disfrutar de las pequeñas cosas.

Y fundamentalmente, a mi madre, por enseñarme a ser lo que soy, por ser mi referencia, estar a mi lado y no dejarme caer.

Gracias a todos.

PREFACIO

El concepto sobre la etiopatogenia de la Enfermedad de Parkinson (EP) ha cambiado en los últimos años. Este cambio se ha producido, en gran medida, por los avances en el conocimiento de la genética. Estos avances han permitido identificar mutaciones infrecuentes con alta penetrancia que producen fenotipos agresivos de la enfermedad (gen de la alfa-sinucleína o SNCA, PARK1), mutaciones más prevalentes con baja penetrancia que presentan un cuadro clínico menos agresivo (gen de la parkina o PARK2) y variantes génicas que confieren un riesgo moderado de desarrollar la enfermedad, con fenotipos clínicos menos uniformes y estudios neuropatológicos más variados (gen *leucin rich repeat kinasa 2*, LRRK2, o PARK 8). Además, el mapeo de múltiples *loci* ha permitido definir haplotipos de riesgo para desarrollar EP.

El descubrimiento de estas mutaciones permite estudiar grupos homogéneos de pacientes en cuanto a hallazgos neuropatológicos, manifestaciones clínicas y exámenes complementarios y además, ayuda a comprender el proceso neurodegenerativo desde un punto de vista molecular.

Analizar y comparar determinados aspectos clínicos en estos subgrupos de pacientes permite por un lado mejorar en el conocimiento del fenotipo y avanzar en la clasificación de los subtipos clínicos, y por otro, podría ayudar a detectar biomarcadores precoces de la enfermedad que permitan predecir el proceso

neuropatológico subyacente.

El objetivo de esta tesis es estudiar la afectación del sistema nervioso autónomo y sus manifestaciones clínicas en cada subgrupo de pacientes en función del genotipo. Esto nos permitirá analizar la utilidad del estudio del SNV como biomarcador clínico de pacientes con EP, en particular con aquellos que manifiestan depósitos de AS en las neuronas supervivientes.

Índice general

1. Abreviaturas
2. Introducción
3. Estado actual del conocimiento
 - EP y genética
 - Hallazgos neuropatológicos en la enfermedad de Parkinson
 - Afectación del sistema nervioso vegetativo en la enfermedad de Parkinson
 - Afectación del sistema nervioso vegetativo en la enfermedad de Parkinson:
Neuropatología
 - La disfunción del sistema nervioso vegetativo como biomarcador de EP y/o
sinucleinopatía
4. Derivados de la función hemodinámica
5. Derivados de la afectación del SN entérico
6. Biopsia cutánea
7. Hipótesis
8. Objetivos
9. Material y métodos
10. Estudios
 - Trabajos 1 y 2
 - *Cardiac Sympathetic denervation precedes nigrostriatal loss in the E46K mutation of the α -synuclein gene (SNCA).*

- *Cardiac Sympathetic denervation in symptomatic and asymptomatic carriers of the E46K mutation in the α -synuclein gene.*
- Trabajo 3
 - *Autonomic dysfunction in parkinsonian LRRK2 mutation carriers.*
- Trabajo 4
 - *Autonomic involvement in Parkinsonian carriers of PARK2 mutations*
- Trabajos 5 y 6
 - *Relationship between sleep and dysautonomic symptoms assessed by self-report scales.*
 - *Trastorno de conducta del sueño REM y fallo autonómico “puro”.*
Presentación de dos casos.

11. Discusión

12. Conclusiones

Índice de figuras

Figura 1: Estadios de Braak-Braak.

Figura 2: Esquema arco barorreflejo

Figura 3: Síntomas no motores en enfermedad de Parkinson

Figura 4: Maniobra de Valsalva

Figura 5: Test de inclinación pasiva a 60°

Figura 6: Gammagrafía cardíaca con MIBG

Figura 7: MAPA normal (patrón dipper)

Figura 8: MAPA con aumento de la tensión arterial nocturna (patrón riser)

Figura 9: Imagen del resultado de Sudoscan®

Figura 10: Árbol genealógico de la familia con Parkinson causado por la mutación E46K de la α -sinucleína

Figura 11: Diagrama de cajas. Ratio captación tardío corazón/mediastino con MIBG

Abreviaturas

- AMS: Atrofia multisistémica
- AS: Alfasinucleína
- ATXN2:Ataxin 2
- ATXN3: Ataxina3
- BCVL: Grupo de neuronas noradrenérgicas situadas en la región ventro-lateral caudal del bulbo
- BRVL: Grupo de neuronas noradrenérgicas situadas en la región ventro-lateral rostral del bulbo
- CL: Cuerpo de *Lewy*
- CSF1R: Colony-stimulating factor 1 receptor
- C9ORF72: Chromosome 9 open reading frame 72
- DCL: Demencia con cuerpos de *Lewy*
- DYT: Locus genético de la distonía idiopática
- EP : Enfermedad de Parkinson
- ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
- F-DOPA: Fluordopa
- FAP : Fallo autonómico puro

- FC: Frecuencia cardíaca
- FMR1: *Fragile X mental retardation 1*
- GCH1: Mutación en el gen que codifica la enzima GTP ciclohidrolasa I
- GIGYF2: *Grb10-interacting gyf protein 2*
- GRN: Progranulina
- HF: *High frequency*
- HO: Hipotensión ortostática
- HTRA2: High Temperature Requirement Protein A2
- Hz: Hercios
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
- ILD : Cuerpos de *Lewy* incidental
- LRRK2: *Leucin reach repeat-kinasa 2*
- MAPT: Proteína asociada a microtúbulos
- MV: Maniobra de Valsalva
- MIBG: Metayodo-bencil-guanidina
- NA: Noradrenalina
- NAm: Núcleo ambiguo
- NF: Neurofilamento
- NSO: Núcleo supraóptico
- NPV: Núcleo paraventricular
- NL: Neuritas de *Lewy*

- PARK1: Parkinsonismo familiar con herencia autosómica dominante, debido a mutaciones en el gen de la alfasinucleína (SNCA) en el cromosoma 4q21
- PLA2G6: Fosfolipasa A2 del grupo 6
- POLG: Polimerasa gamma
- PRT : Tiempo de recuperación de la presión arterial en la maniobra de valsalva
- REM: Movimientos oculares rápidos
- RIA: Radioinmuno análisis
- RVP: Resistencias vasculares periféricas.
- SN : Sustancia negra
- SNC: sistema nervioso central
- SNc: Pars compacta de la sustancia negra
- SNCA: Alfasinucleína
- SNE: Sistema nervioso entérico
- SNV: Sistema nervioso vegetativo
- SPG11: Espatacsina 11
- TAD: Tensión arterial diastólica
- TAS: Tensión arterial sistólica.
- TARDBP: *Transactive response DNA binding protein*
- TCSR: Trastorno conducta de sueño REM
- TH : Tirosina hidroxilasa
- TST: *Thermoregulatory sweat test*
- UCHL1: *Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1*

- UPDRS: *Unified Parkinson Disease Rating Scale*

Introducción

La EP idiopática (iPD) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente por detrás de la enfermedad de Alzheimer (EA)¹. La enfermedad fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817 en su artículo “Essay of the shaking palsy”² de gran reconocimiento actual. Jean-Martin Charcot definió la enfermedad con mayor detalle y consagró el epónimo de “enfermedad de Parkinson”. Ha sido considerada clásicamente como una enfermedad del movimiento caracterizada por la combinación de rigidez, bradicinesia, temblor y trastornos de la marcha. En 1912, Fritz Heinrich Lewy identificó en los estudios histopatológicos postmortem de los pacientes con EP, inclusiones citoplasmáticas eosinofílicas en las neuronas de diversas estructuras del sistema nervioso central. En 1919, Konstantin Nikolaevich Tretiakoff describió en su tesis doctoral el hallazgo de estas inclusiones en las neuronas supervivientes de la sustancia negra (SN) de los pacientes con EP. Las denominó Cuerpos de Lewy (CL), y sigue siendo a día de hoy hallazgo neuropatológico distintivo de la enfermedad³. En 1997, María Grazia Spillantini identificó la proteína alfa-sinucleína (AS) como el componente mayoritario de los CL⁴. Esta misma proteína es la que se encuentra en oligodendrocitos de pacientes con atrofia multisistémica (AMS)⁵. En ese mismo año, Polymeropoulos descubrió la primera mutación puntual en el gen de la SNCA (A53A) en una familia greco-italiana que padecía un parkinsonismo con patrón de herencia autosómico dominante⁶. En 2001, H. Kaufmann y colaboradores detectaron AS en los terminales nerviosos vegetativos y en los ganglios simpáticos de pacientes con fallo autonómico

puro (FAP)⁷, ampliando así, el espectro clínico de las alfa-sinucleinopatías. En 2003 Braak y colaboradores, de acuerdo con los hallazgos neuropatológicos de diversos pacientes afectados con EP, propusieron un modelo de 6 estadios de la EP. Este modelo está basado en el depósito estratificado de los CL. Los estadios comprenden desde el estadio 1 en el que los CL se localizan únicamente en el núcleo dorsal motor del vago, pasan por la afectación de la sustancia negra en el estadio 3 que se correspondería con la aparición de los primeros síntomas motores de la enfermedad, hasta llegar a la afectación de áreas cerebrales corticales en el estadio 6⁸.

La etiopatogenia de EP permanece aún desconocida. La hipótesis de Braak sirvió de base para establecer una teoría denominada “*dual-hit*” según la cual un patógeno desconocido con un comportamiento similar a los denominados “virus lentos” podría penetrar en el sistema nervioso a través de la mucosa nasal y enteral, pasando a los terminales del nervio vago para desde allí ascender hasta el tronco encéfalo resultando en una cascada de neurodegeneración en el cerebro⁹. Mientras que diferentes estudios apoyan el “modelo de estadios de Braak”, aún persiste la controversia sobre su aplicabilidad a todos los enfermos de Parkinson^{10,11}. La reciente descripción de una menor prevalencia de EP en un grupo de pacientes que fueron sometidos a una vagotomía troncular por una enfermedad del tubo digestivo, apoyaría parcialmente dicha hipótesis¹².

Según este modelo existiría una afectación temprana del sistema nervioso entérico (SNE) y del epitelio olfatorio previa a la afectación de áreas con significación clínica motora. Por lo tanto la enfermedad comienza con una fase en la que no se

manifiestan los síntomas motores característicos de la enfermedad, pero en la que si pueden detectarse otros. Estos síntomas precoces se engloban dentro de los síntomas no motores como son las alteraciones del ánimo (depresión), los trastornos del sueño o los síntomas derivados de la afectación del SNV. Esta fase se correspondería con los primeros estadios de la enfermedad (1 y 2). La fase sintomática se inicia en la etapa 3. Diferentes estudios epidemiológicos, neuropatológicos y de neuroimagen concluyen que el inicio de la neurodegeneración de la SN pars compacta (SNC) precede, incluso en 4 o 5 años, al desarrollo de los primeros síntomas motores de la enfermedad. Los síntomas motores se presentan cuando se ha reducido al menos el 60% de las neuronas dopaminérgicas de la SNC, lo que deja un margen muy reducido a las terapias neuroprotectoras¹³. Por este motivo, es necesaria la identificación de biomarcadores precoces, específicos y medibles que proporcionen una herramienta diagnóstica durante etapas tempranas previa a la neurodegeneración de la SN.

Diversos estudios retrospectivos y prospectivos han postulado que alguno de los síntomas premotores como son la hiposmia, el estreñimiento, los trastornos del sueño y las alteraciones del sistema nervioso vegetativo (SNV)¹⁴⁻¹⁷ entre otros, podrían ser utilizados como biomarcadores clínicos aunque hasta la fecha ninguno de ellas ha adquirido la sensibilidad y especificidad suficientes para utilizarse en este sentido. El diagnóstico de EP se sigue basando en criterios clínicos. Es conocido que la sensibilidad de estos criterios diagnósticos no es del 100% y muchos pacientes con otros parkinsonismos y, por tanto, diferente etiopatogenia y hallazgos

neuropatológicos son incluidos en estudios o en ensayos clínicos condicionando los resultados^{18 19 20}.

Hay muchos datos a favor de que la afectación del SNV en los pacientes con EP comience de forma muy temprana, que lo hace desde la periferia y avanza de forma centripeta hacia el SNC. Tanto su afectación precoz como la accesibilidad de los tejidos periféricos hacen de la patología del SNV un objetivo muy atractivo como posible biomarcador de la enfermedad²¹⁻²⁴.

Estado actual del conocimiento

EP y genética.

A pesar de que desde las primeras descripciones de la “parálisis agitante” ya se apuntaba a que la herencia tiene un papel importante²⁵, ha existido una gran controversia sobre el papel de la genética en la EP. Los primeros estudios no aportaban evidencia de la existencia de mayor riesgo de desarrollar la enfermedad en gemelos univitelinos²⁶. Sin embargo, en los últimos 15 años los estudios sobre genética en EP han cambiado esta impresión. Los nuevos estudios en gemelos utilizando 18F-dopa PET muestran un nivel de concordancia de disfunción del sistema dopaminérgico nigroestriatal que alcanza el 45% en monocigotos y el 29% en dicigotos, lo que sugiere una concordancia entre gemelos mayor de la previamente establecida²⁷.

En 1996, la identificación de la primera mutación responsable de EP en el gen de la alfa-sinucleína (SNCA o AS), (A53T), puso de manifiesto indiscutiblemente el carácter genético de la EP⁶. Desde entonces los esfuerzos en investigación han establecido que entre un 5 y un 10 % de los pacientes con EP padecen una forma monogénica reconocida de la enfermedad²⁸. Al menos 13 loci y 9 genes han sido identificados, asociados tanto a formas autosómicas dominantes (SNCA, LRRK2, EIF4G1, VPS35) como recesivas (parkin/PARK2, PINK1, DJ1/PARK7). Se ha detectado una larga lista de genes responsables de producir EP o parkinsonismos atípicos. Se ha demostrado además, la existencia de genes relacionados con otras enfermedades en

los que se puede manifestar alguno de los síntomas de la EP como es el caso de las ataxias hereditarias (ATXN2, ATXN3, FMR1), la demencia fronto-temporal (C9ORF72, GRN, MAPT, TARDBP), la distonía sensible a levodopa (DYT5, GCH1, TH), y otros (ATP13A2, CSF1R, DNAJC6, FBXO, GIGYF2, HTRA2, PLA2G6, POLG, SPG11, UCHL1) ²⁸. Los estudios moleculares han permitido identificar los productos proteicos alterados de muchas de estas mutaciones y enmarcarlos en una vía/cascada de neurodegeneración de la EP. Esto presupone que las formas de EP idiopáticas y las genéticamente determinadas comparten una misma base molecular patogénica. En este sentido, los estudios neuropatológicos de estas formas monogénicas de EP han sido de importancia crítica.

La identificación de la proteína AS y la detección de la misma en los CL supusieron un hito en el estudio de la fisiopatología de la EP. Este hallazgo puso de manifiesto una conexión entre la genética, la proteína alterada y su depósito en agregados capaces de ser observados en los estudios neuropatológicos. Este “mecanismo fisiopatológico común” de todas las formas de EP ha sido cuestionado posteriormente. A raíz de los hallazgos neuropatológicos de otras formas monogénicas de EP, especialmente en formas autosómico recesivas. Por ejemplo, la mayoría de los estudios neuropatológicos postmortem publicados de pacientes con mutaciones en el gen PARK 2, cuyo producto proteico es una ubiquitin ligasa, no presentan CL²⁹. La lógica de que los hallazgos neuropatológicos definen el genotipo o la etiología de la EP se resquebraja cuando observamos la variedad clínica y neuropatológica que presentan los portadores de la mutación LRRK2. Los casos

neuropatológicos descritos identifican casos con y sin CL y algunos de ellos con otras inclusiones patológicas como es el caso de la proteína tau. Este “pleomorfismo” neuropatológico se ha detectado en ocasiones incluso dentro de la misma familia con la misma mutación^{30 29,31}. La variabilidad clínica y patológica en una mutación puntual es inusual en genética humana y tiene muchas similitudes con las enfermedades mitocondriales, que presentan un fenotipo diferente en función de la carga de la mutación o de enfermedades con un componente de variabilidad somática como es el caso de la neurofibromatosis. En el caso de mutaciones en el gen LRRK2 es más probable un escenario en el que además de la vulnerabilidad genética, influyen factores ambientales y epigenéticos modificando el fenotipo. Por ejemplo, hay datos desde el punto de vista epidemiológico que identifican al consumo del café y el tabaquismo con una disminución del riesgo de desarrollar EP, mientras que, algunas neurotoxinas se asocian con un aumento del riesgo de desarrollar la enfermedad³².

Hallazgos neuropatológicos en la EP

La imagen macroscópica del cerebro de un paciente con EP es normal a excepción de la despigmentación de la sustancia negra (SN). A nivel microscópico existe una pérdida importante de las neuronas que contienen neuromelanina situadas en la pars compacta de la sustancia negra (SNp). Estas neuronas producen dopamina, y su pérdida supone una denervación dopaminérgica de las proyecciones hacia el estriado. La población neuronal de la sustancia negra es sustituida parcialmente por una astrocitosis reactiva. Se han visto diferencias en el patrón de degeneración en función del fenotipo clínico, así la degeneración de neuronas de la

SN ventrolateral es especialmente intensa en pacientes con un fenotipo rígido acinético mientras que los pacientes con un fenotipo tremórico esa pérdida neuronal es de menor intensidad³³.

Además de esta pérdida neuronal, se aprecia la existencia de CL y NL en las neuronas supervivientes que son considerados el hallazgo histológico distintivo de la EP, de la DCL y del fallo autonómico puro (FAP). Los CL son pequeñas inclusiones citoplasmáticas eosinófilas de forma generalmente esférica rodeadas de un halo. Contienen diversas proteínas entre las que se encuentran la AS y la ubiquitina. Los CL se encuentran además de en la SN en el locus coeruleus, el núcleo basal de Meynert, el núcleo motor dorsal del vago, el hipotálamo, el bulbo olfatorio, el núcleo de Edinger Westphal y los núcleos del rafe^{34,35}. Otro de los hallazgos distintivos es la presencia de neuritas distróficas que son inmunoreactivas para AS, ubiquitina y neurofilamentos denominadas neuritas de *Lewy* (NL). Estas NL se encuentran también en pacientes con DCL. Se localizan típicamente en las neuronas CA2 del hipocampo, la amígdala, el núcleo reticular y en el complejo coeruleus–subcoeruleus³⁶.

Basándose en los resultados de estudios neuropatológicos de pacientes con EP, Braak y colaboradores propusieron una clasificación por estadios:

- **Estadio 1:** Se afectan preferentemente el bulbo olfatorio y el sistema nervioso vegetativo. Se encuentran CL inicialmente en el núcleo del glosofaríngeo, en el motor dorsal del vago y en el bulbo olfatorio. Esto podría explicar por qué

algunos pacientes presentan hiposmia en estadios iniciales, incluso, previamente a la aparición de los primeros síntomas motores. En este estadio existen también CL y NL en la zona reticular y en el sistema nervioso entérico (SNE) que explicarían los síntomas intestinales como el estreñimiento en estadios premotores.

- **Estadio 2:** Además de los hallazgos del estadio 1 se afectan estructuras del bulbo y tegmento pontino. Se incluye lesiones en el núcleo caudal del rafe, el núcleo reticular gigantocelular y el complejo coeruleus-subceruleus. La afectación de estas estructuras puede justificar la aparición de síntomas como la depresión y el trastorno de conducta del sueño REM.
- **Estadio 3:** En esta fase tiene lugar la afectación del mesencéfalo. Se encuentran los hallazgos del estadio 2 al que se le suma la afectación de la pars compacta de la sustancia negra. En esta fase debutan los síntomas motores clásicos de la EP: el temblor de reposo, la bradicinesia y la rigidez.
- **Estadio 4:** Se encuentran los hallazgos característicos de la fase 3 al que se le suman las alteraciones histopatológicas a nivel de prosencéfalo. Aparece afectación cortical en el mesocortex temporal (corteza entorrinal) y allocortex.
- **Estadio 5:** En esta fase se produce la afectación del neocortex: corteza prefrontal y áreas de asociación. Supone el inicio de la aparición de la clínica cognitiva y síntomas frontales como la apatía o el déficit de atención. Es característica la aparición de síntomas visuoespaciales.
- **Estadio 6:** En esta fase se produce la afectación del neocortex primario,

observándose lesiones de la corteza somatosensorial, premotora y motora primaria. El deterioro cognitivo es franco y se acompaña de síntomas neuropsiquiátricos como alucinaciones de predominio visual, apatía intensa o ideación delirante.

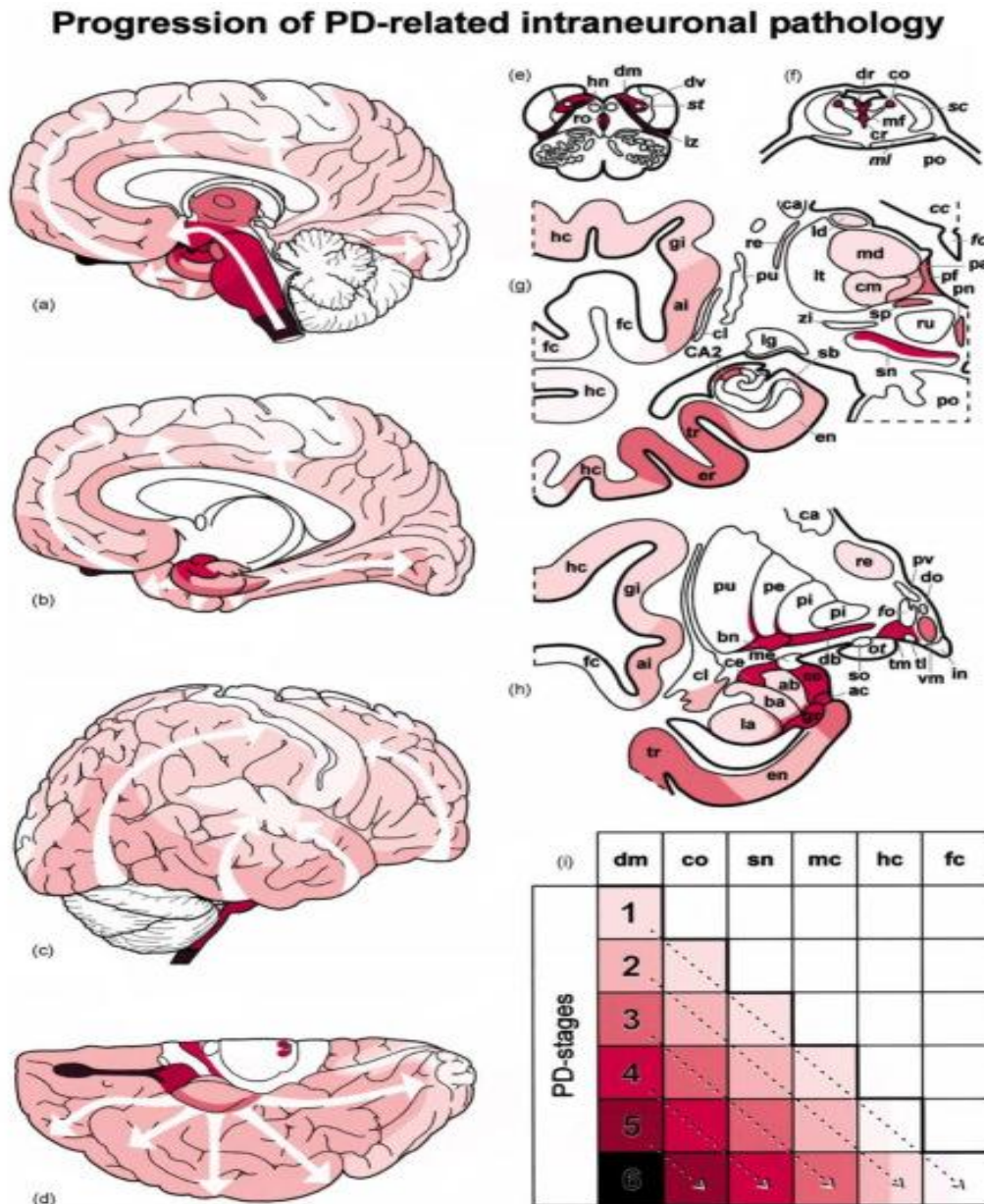


Figura 1. Estadios de Braak-Braak. Progresión caudo-rostral de la patología alfa-sinucleína. Se representan los 6 estadios de Braak, en los tres primeros se afectan estructuras del tronco cerebral fundamentalmente, mientras que en los tres últimos se van añadiendo alteraciones de la corteza cerebral. Modificado de *Neurobiology of Aging*, Volume 24, Issue 2, 2003, 197-211. *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*.

El modelo de Braak no está exento de críticas^{10 37}. Por un lado, este modelo únicamente representa una secuencia topográfica de depósito de CL., que no tiene por qué correlacionarse con una pérdida neuronal o de conexiones sinápticas. Varios estudios retrospectivos realizados recientemente, apoyan en gran medida el modelo de estadios de Braak, sobre todo en los casos de EP de inicio más joven y de más larga duración. Pero otros estudios neuropatológicos sin embargo, demuestran que entre el 6% y el 43 % de los casos estudiados, no sigue el patrón de progresión del depósito de AS caudo-rostral propuesto¹⁰. Otros autores describen que el 7-8% de los casos con depósitos de AS a nivel cortical y mesencefálico, no presentan CL a nivel de bulbo raquídeo. Además, en muchas ocasiones no existe una correlación entre los diferentes estadios de la clasificación de Braak con la sintomatología clínica³⁸. Así, por ejemplo, del 30 al 55 % de los pacientes ancianos con estudios neuropatológicos que corresponderían con un estadio 5 o incluso 6 no muestran síntomas neuropsiquiátricos definitivos. Por otro lado del 7 al 8,3 % de los pacientes con síntomas clínicos definitorios de EP y con CL y NL en allocortex y neocortex cerebral (estadio 4 y 5) tienen preservados los núcleos del tronco³⁹. Kalaitzakis y cols. apuntan a que la diseminación y distribución neuropatológica de los cerebros de enfermos con EP no se limita al depósito de AS¹¹. De esta manera se postula que la cuantificación en función de los CL, sin tener en cuenta la pérdida neuronal, puede no tener impacto clínico y su validez predictiva es cuestionable.

Otra de las críticas a dicho modelo de estadios se fundamentan en los criterios

de inclusión utilizados por Braak y Cols., para realizar los estudios. Uno de los criterios de inclusión pasaba por tener afectado el núcleo motor dorsal del vago. Existen trabajos que plantean que la afectación de dicho núcleo no es necesaria para desencadenar la EP, según lo cual, algún paciente con EP quedó excluido del estudio⁴⁰.

Afectación del sistema nervioso vegetativo en la EP.

En la EP es frecuente la aparición de síntomas y signos derivados de la afectación del SNV, especialmente a nivel cardiovascular, gastrointestinal y genitourinario⁴¹. No se conoce la frecuencia exacta de estos síntomas en enfermos de Parkinson. Las cifras de prevalencia e incidencia varían en función del tipo de estudio y de la población seleccionada. Se describen fundamentalmente:

1. **Manifestaciones hemodinámicas**, entre ellas la hipotensión ortostática (HO) definida como una caída de la tensión arterial sistólica (TAS) de 20 mm Hg y/o de la tensión arterial diastólica de 10 mm Hg a los 3 minutos de ponerse en pie de manera activa o mediante basculación pasiva ("head-up tilt"-HUT)⁴². La HO puede acompañarse o no de síntomas de hipoperfusión cerebral⁴³. La HO supone un mayor riesgo de caídas y con ello de la morbimortalidad de la EP. Su prevalencia aumenta con la edad y en estadios avanzados de la enfermedad por lo que fue considerada un efecto secundario de los tratamientos o derivada de enfermedades concomitantes. Sin embargo, es secundaria a la denervación noradrenérgica de las arterias sistémicas que condiciona un aumento deficiente de las resistencias vasculares periféricas por

una vasoconstricción insuficiente y puede verse agravada por fármacos. Los pacientes con EP e HO presentan niveles de noradrenalina más bajos que los pacientes con EP sin OH⁴⁴. La respuesta farmacológica de la noradrenalina en estos pacientes es propia de una afectación del SNV periférico y contrasta con los hallazgos en pacientes con AMS donde el fallo del SNV es de origen central⁴⁵. Los pacientes con EP y HO presentan además una alteración de la variabilidad de la frecuencia cardíaca mediada por la inervación cardiovagal que puede ser medida y cuantificada con los test apropiados.

2. Manifestaciones gastrointestinales (GI)^{46,47}: Se estima que entre 50 y el 70% de los pacientes con EP presentan al menos un síntoma GI entre los que se encuentran: la disfagia, considerada por un lado secundaria al fallo de regulación sobre la motilidad esofágica que realiza el núcleo pedúnculo-pontino y por otro a la alteración de la motilidad gastrointestinal superior. Esta alteración de la motilidad intestinal puede producir además: retraso del vaciamiento gástrico e incluso retención gástrica y estreñimiento. Se considera secundaria a la afectación del núcleo motor dorsal del vago. Otro mecanismo que puede condicionar estreñimiento en pacientes con EP es la disfunción ano-rectal que puede dar lugar a urgencia, tenesmo, diarrea e incontinencia fecal. Esta disfunción produce una contracción paradójica del músculo puborectalis durante la defecación que condiciona además del estreñimiento dolor con la defecación⁴⁸. Se plantea que la disfunción GI precede con mucha anterioridad al inicio de los primeros síntomas motores. En la cohorte de Honolulu se estimó que el riesgo futuro de EP en pacientes con estreñimiento era de 2.7 veces superior

respecto a los que tenían una frecuencia mayor de deposiciones^{49,50}. Los estudios neuropatológicos postmortem y de biopsias del tubo digestivo, han encontrado inclusiones de AS en forma de CL y NL en los plexos mientéricos, incluidas las formas asintomáticas que ulteriormente desarrollan síntomas motores, motivo por el cual se han considerado un posible biomarcador^{23,51}.

3. Manifestaciones urológicas^{52,53}: La incidencia de los síntomas urinarios en la EP varía del 38% al 71% según diferentes estudios. Los síntomas más frecuentes son la nicturia, la polaquiuria y la urgencia miccional. La urgencia miccional con hiperreflexia del músculo detrusor afecta al 67% de los pacientes con EP, tanto hombres como mujeres. El 16% presenta hiporeflexia y el 3% disinergia vesical⁵². Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra tienen un efecto inhibitorio sobre la micción. En los pacientes con EP la pérdida neuronal de la sustancia negra produce una hiperreflexia del músculo detrusor vesical que provoca la urgencia miccional^{52,53}. La función vesical se altera con la evolución de la enfermedad produciendo incontinencia y vaciamiento incompleto de la vejiga característico de las fases más evolucionadas.

El 60% de los pacientes varones con EP padece disfunción eréctil⁵⁴. A diferencia de la que se observa en la AMS que suele ser precoz, en los pacientes con EP aparece con la evolución de la enfermedad. La causa se desconoce a día de hoy⁵⁵. Se postula que podría ser causada por la propia deficiencia dopaminérgica, ya que, la dopamina está involucrada en la vasodilatación de los cuerpos cavernosos que provocan la erección.

4. Alteración en la sudoración: La dishidrosis es frecuente en los pacientes con EP, llegando a ser del 65% en algunas series y contribuye a un empeoramiento importante en la calidad de vida ⁵⁶. Los episodios de hiperhidrosis pueden ocurrir tanto por las discinesias en fases ON como en fases OFF, durante la fase de bloqueo motor y responder a levodopa. Se ha propuesto el estudio de la sudoración mediante técnicas, como por ejemplo, el test del sudor termorregulatorio (TST) como diferenciador útil de pacientes con EP, en los que hay un daño distal de la producción de sudor y pacientes con AMS en los cuales la anhidrosis afecta a la totalidad de las regiones corporales⁵⁷. Otras técnicas para estudiar el sudor son el test axonal reflejo cuantitativo (QSART) mediante iontoforesis, o el novedoso Sudoscan® que mide la electroconductancia de la piel.

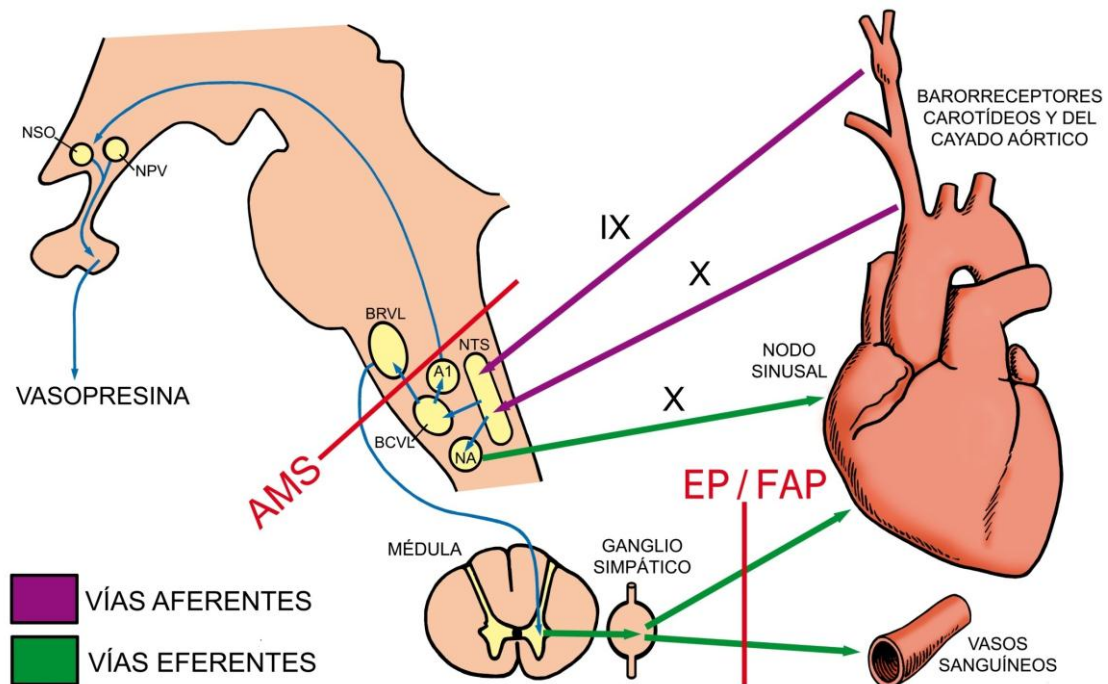


Figura 2. Esquema arco barorreflejo. Principales estructuras anatómicas involucradas en el arco barorreflejo. Se muestran los núcleos del tronco involucrados así como las aferencias desde los mecanorreceptores situados en el arco aórtico y bifurcación carotídea y las eferencias parasimpáticas y simpáticas hacia los órganos diana. Se muestran las estructuras dañadas en las diferentes enfermedades.

NTS: núcleo del tracto solitario, NA: núcleo ambiguo, NSO: núcleo supraóptico, NPV: núcleo paraventricular, BRVL: grupo neuronas noradrenérgicas situadas en la región ventro-lateral rostral del bulbo, BCVL: grupo neuronas noradrenérgicas situadas en la región ventro-lateral caudal del bulbo. AMS. Atrofia multisistémica, EP: enfermedad de Parkinson. FAP: fallo autonómico puro

Afectación de SNV en la EP: neuropatología.

Existe evidencia suficiente para afirmar que la afectación desde el punto de vista neuropatológico del SNV ocurre desde estadios precoces (Estadio 1 de Braak) de la EP e incluso se objetiva en individuos que presentan CL de manera incidental (ILBD) sin datos clínicos de EP^{58,59}. En las enfermedades caracterizadas por depósitos de AS con formación de cuerpos de *Lewy*, se produce una degeneración axonal distal con progresión centrípeta de las fibras amielínicas del sistema nervioso vegetativo periférico²¹. Además de la presencia de AS en terminales nerviosos amielínicos, se han encontrado CL y NL en los ganglios simpáticos, en las fibras finas amielínicas que inervan vasos y glándulas sudoríparas, en el plexo mientérico y en tejidos del tracto urinario. Recientemente MM Carmona y colaboradores han descrito la presencia de inclusiones de AS en terminales nerviosos simpáticos cardíacos en pacientes sin hallazgos distintivos a nivel del sistema nervioso central. Constituiría una enfermedad cardíaca incidental o una posible fase muy precoz de la EP⁶⁰. Esto implica una afectación pandisautonómica que afecta a todos los componentes periféricos del SNV. También se ha encontrado presencia de AS en estructuras del SNC relacionadas con las funciones vegetativas como el núcleo motor dorsal del vago, los núcleos salivares, el núcleo parasimpático de la médula en niveles sacros, en los núcleos noradrérgicos del tronco cerebral como el locus coeruleus y el grupo rostral ventro-lateral C1 del bulbo raquídeo. Existe una correlación entre el depósito de AS, el grado de afectación de SNV y el estadio de enfermedad, de tal forma que los

estadios más avanzados de EP tienen mayor depósito de AS en el SNV y mayor afectación vegetativa clínica.

SNV vegetativo como biomarcador de EP/ alfasinucleinopatía

Debido a su alta prevalencia, a su afectación en estadios tempranos y al empeoramiento con el transcurso de la enfermedad⁶¹, se han propuesto a los síntomas y signos derivados de la afectación del SNV como posibles biomarcadores clínicos que predigan el desarrollo de EP. Este mismo planteamiento se ha utilizado para definir como biomarcador clínico la presencia de otros síntomas no motores como la hiposmia o el trastorno de conducta del sueño REM.

Como se ha comentado con anterioridad diferentes estudios sugieren que la denervación simpática y parasimpática postganglionar ocurre, al menos en ciertos pacientes, antes del estadio 1 propuesto por Braak constituyendo así el estadio más temprano de enfermedad^{62 59 63}. Un estudio de pacientes control, sin síntomas de EP, demostró la presencia de agregados de AS en tejidos periféricos (vésico-prostático y tubo digestivo) en el 9% de pacientes a los que se les hacía algún tipo de cirugía abdominal. Estos pacientes presentaban, además, alteraciones vegetativas: tanto en pruebas funcionales como de medicina nuclear (gammagrafía MIBG cardíaca y SPECT [(123)I] ioflupane estriatal). Este hallazgo plantea la posibilidad de que estos individuos, al igual que los pacientes con depósito incidental de alfasinucleína a nivel cardíaco⁶⁰, se encuentren en una fase muy inicial de la EP. Es por tanto plausible

encontrar alteraciones clínicas, hemodinámicas, de imagen o bioquímicas que pudieran ser susceptibles de ser utilizadas para el diagnóstico precoz de la enfermedad.

¿Cuál o cuáles podrán ser los potenciales biomarcadores clínicos?

Se han propuesto varios posibles biomarcadores.

1. Derivados de disfunción hemodinámica

La búsqueda de biomarcadores derivados de la afectación hemodinámica se basa en que los estudios neuropatológicos de pacientes con cuerpos de *Lewy* incidentales (LBDi) en SNC muestran además inclusiones de AS en fascículos nerviosos epicardicos⁶⁴. Orimo y colaboradores pudieron demostrar en necropsias de pacientes con LBDi que los oligómeros de sinucleína se detectaban inicialmente en los terminales axonales de las fibras amielínicas miocárdicas. Esta denervación es al menos tan intensa como la de la sustancia nigra y afecta simultáneamente al corazón y al resto del sistema circulatorio. Es un hecho demostrado que existe una deficiencia de noradrenalina circulante derivada de la degeneración selectiva de neuronas de locus coeruleus, de los ganglios simpáticos y de los terminales nerviosos simpáticos noradrenérgicos. Se planteó en este contexto que la determinación de noradrenalina plasmática podría ser uno de estos biomarcadores. Sin embargo, la determinación sanguínea de dicho neurotransmisor tiene importantes inconvenientes: uno de ellos es que los niveles circulantes dependen no solo de la

exocitosis de NA por parte de las neuronas noradrenérgicas sino también de la cantidad de reabsorción de NA a través de la membrana presináptica. Por tanto la cantidad de hormona circulante no refleja únicamente el grado de afectación noradrenérgica presináptica. Para contrarrestar este efecto del grado de reabsorción de NA se plantea que la determinación de dihidroxifenilglicol (DHPG) en sangre podría ser útil. Los niveles de DHPG dependen únicamente de la exocitosis de NA y no del grado de reabsorción por lo que puede ser una buena herramienta que diferencia ambas fracciones.

Otro de los posibles biomarcadores propuestos es la gammagrafía cardíaca con MIBG: Desde que Hakusui⁶⁵ demostró por primera vez el daño de los terminales nerviosos cardíacos a través de una disminución de la recaptación de ¹²³I metayodobenzilguanidina (MIBG), numerosos estudios han documentado este fenómeno⁶⁶⁻⁷⁰. La MIBG constituye un trazador de la función e integridad de la neurona simpática postsináptica. Es un análogo estructural de la guanetidina y la noradrenalina, que es captada por la médula suprarrenal y los tejidos ricos en inervación simpática. La captación de MIBG tiene lugar a través de un mecanismo activo con gasto de ATP y dependiente del transporte de sodio, de baja capacidad y alta afinidad, saturable y sensible a la ouabaína. La MIBG no se une a los receptores postsinápticos, ni es degradado por las enzimas COMT y MAO, que metabolizan las catecolaminas endógenas. En áreas de denervación y de disminución de actividad simpática se ha podido demostrar que el aclaramiento miocárdico de la MIBG está más acelerado y presenta una distribución más heterogénea que en los tejidos

normales. La gammagrafía miocárdica con ^{123}I -MIBG durante los primeros 15 minutos se corresponde con la entrada del radiofármaco en los espacios extraneuronales del tejido miocárdico. La acumulación neuronal de MIBG alcanza su valor máximo a las 3-4 horas. Por lo tanto, la imagen cardíaca de MIBG a las 3-4 horas es más específica de la captación neuronal. Tras su administración endovenosa, la distribución normal de la ^{123}I -MIBG incluye captación en hígado y bazo, miocardio, glándulas salivares, intestino delgado y colon. La principal vía de eliminación es renal (60 % en 24 h), por lo que se detecta radioactividad en cálices renales y vejiga urinaria.

Distintos estudios neuropatológicos en EP ponen de manifiesto una reducción del número de fascículos nerviosos en el tejido epicárdico y su relación con los hallazgos gammagráficos ^{71,72}. De acuerdo con lo anteriormente expuesto en la EP la disminución de la captación miocárdica de MIBG, se produce en las primeras etapas de la enfermedad y podría servir como un biomarcador potencial de los pacientes en riesgo de desarrollar EP⁷³. Se ha identificado una reducción de la captación de MIBG en pacientes con trastorno de conducta del sueño REM (TCSR) idiopático, una parasomnia que predice un alto riesgo de desarrollar una sinucleinopatía, especialmente EP ⁷⁴. La gammagrafía cardíaca con este radiotrazador nos ayuda a diferenciar entre la afectación autonómica central más característica de la AMS o la periférica propia de la EP y el fallo autonómico puro ^{75,76}.

La detección de alteraciones neurohemodinámicas clínicas constituye otro posible biomarcador. Existen pocos estudios que analicen cuales son las manifestaciones clínicas derivadas de la pérdida de fibras nerviosas simpáticas y

parasimpáticas en el miocardio. El grado de denervación cardíaca se correlaciona con los años de duración de la EP y con la situación motora obtenida de la escala UPDRS III, pero no con la gravedad de la sintomatología del SNV medida mediante escalas clínicas como la escala SCOPA-AUT⁷⁷. En estudios realizados a pacientes trasplantados de corazón⁷⁸ se observa que la reinervación cardíaca espontánea que ocurre después del trasplante, se acompaña de un aumento de la frecuencia cardíaca durante el ejercicio y un aumento del inotropismo, por lo que se presupone que la denervación conlleva una disminución de la frecuencia cardíaca y del inotropismo durante el ejercicio.

Trabajos recientes sugieren que en fases premotoras de EP existe una insuficiencia cronotrópica⁷⁹. En concreto al analizar de manera retrospectiva las pruebas de esfuerzo realizadas a pacientes con EP antes de los primeros síntomas de la enfermedad se observó que desarrollaban frecuencias cardíacas máximas más bajas que los pacientes que no desarrollan EP^{79,78}. Se ha postulado incluso que los primeros trastornos se produzcan en la esfera cardiovagal^{80,81}. Todas estas manifestaciones iniciales son subclínicas y solo se ponen de manifiesto al realizar estudios específicos de la función del SNV.

El análisis espectral de la variabilidad tanto de la frecuencia cardíaca como de la tensión arterial, permite detectar disfunciones sutiles de la inervación parasimpática cardíaca o de la función cardiovagal y de la función simpática noradrenérgica. La variabilidad de la alta frecuencia del ritmo cardíaco (HF-RR) refleja la actividad parasimpática cardíaca (cardiovagal) y se puede anular con la

administración de atropina. La HF-RR está alterada de forma temprana en EP⁸⁰, incluso puede verse afectada en pacientes con TCSR. En el caso de la función simpática hay mayor controversia. Inicialmente se pensó que la variabilidad de baja frecuencia del ritmo cardíaco (LF-RR) podría reflejar bien esta función, sin embargo, ha habido revisiones críticas a dicha variable y se ha observado que es más exacta la variabilidad de baja frecuencia de la tensión arterial (LF-TAS)⁸². Otro biomarcador hemodinámico podría ser por tanto el análisis de ambas variables.

Por último dentro de las manifestaciones neurohemodinámicas como posible biomarcador nos encontramos con la HO. La HO es relativamente frecuente en la EP afectando al 30-40% de los pacientes según diferentes series. A pesar de que su presencia en estadios iniciales de la enfermedad suponía un signo de alarma de encontrarnos ante una AMS, hoy en día se sabe que, la HO precede en muchas ocasiones a la aparición de síntomas motores en la EP, especialmente si aparece en combinación con otro de los síntomas no motores. En un estudio reciente realizado por Postuma y colaboradores⁸³ en el que se valora de una forma prospectiva síntomas derivados de la afectación del SNV en pacientes con TCSR idiopático, se observó que, tras un periodo de seguimiento de 3.3 años, el 66% de los pacientes que desarrollaba una enfermedad neurodegenerativa (parkinsonismo o demencia) tenía HO mientras que ninguno de los pacientes que mantenía el diagnóstico de TCSR idiopático presentaba HO. Diferentes trabajos concluyen que la HO en pacientes con TCSR idiopático tiene un valor predictivo positivo del 60% para la conversión a una enfermedad neurodegenerativa en un periodo de seguimiento de hasta 6 años.

2. Derivado de la afectación del SN entérico (SNE)

El 80% de los pacientes con EP presentan estreñimiento en algún momento de la enfermedad⁴⁷. Se ha planteado incluso que este trastorno preceda con mucha anterioridad al inicio de los primeros síntomas motores⁵⁰. Estudios en modelos animales a los que se les induce EP mediante la administración de rotenona y lipopolisacáridos, provocan acumulación de inclusiones de AS en SNE, lo que indica el importante papel del SNE en la fisiopatología de la EP y refuerzan la teoría de la existencia de un agente que entra a través de mucosa intestinal y de manera retrograda, a través del nervio vago, llega a estructuras del sistema nervioso central⁸⁴. Esta teoría se ha visto reforzada por los estudios retrospectivos de pacientes sometidos a vagotomía troncular completa en pacientes sin síntomas de EP. En este trabajo se observó que el riesgo de desarrollar EP era menor en los sujetos sometidos a esta técnica quirúrgica que en la población general¹². Recientemente se ha realizado un estudio comparando los hallazgos neuropatológicos obtenidos de biopsias de mucosa gástrica de pacientes con EP evolucionado a los que se les iniciaba tratamiento con duodopa intestinal continua frente a biopsias de pacientes sin EP. En este estudio se observó acumulación de AS en el 60,7% de los pacientes con EP frente al 4.3% de los controles^{23,51}. Otros trabajos han remarcado que en función de las técnicas inmunohistoquímicas aumenta la especificidad a la hora de detectar AS en tubo digestivo⁸⁵.

Por lo tanto el estudio de la dinámica del tubo digestivo podría ser un biomarcador clínico. La principal desventaja es su baja especificidad, lo que le obliga a combinarse

bien con otros síntomas no motores como la hiposmia, la hipotensión ortostática o el TCSR, o bien mediante la detección de AS en mucosa gastrointestinal un biomarcador muy específico pero poco sensible para poder determinar bien los sujetos a riesgo.

3. Biopsia cutánea.

Según lo que se apunta de los estudios neuropatológicos parece que la afectación del SNV se produce en lugares distales y accesibles donde el uso de biopsia podría ser útil como biomarcador. Algunos estudios apuntan a que el depósito de AS se produce en fibras nerviosas amielínicas o poco mielinizadas como las fibras nerviosas simpáticas noradrenérgicas y simpáticas colinérgicas, pero también las fibras amielínicas sensitivas de tipo C y A-delta que registran dolor y temperatura. Estos datos sugieren que la medición de depósito de AS en nervios vegetativos podría ser un biomarcador útil en pacientes con EP²², especialmente las formas fosforiladas de la proteína. El hallazgo de AS fosforilada se podría servir para diferenciarla EP de otros parkinsonismos como la AMS^{86,87}. Un estudio reciente refleja que los pacientes con EP tienen una neuropatía autonómica y sensitiva distal caracterizada por la pérdida de fibras intraepidérmicas y pilomotoras y cambios en las fibras nerviosas sudomotoras. En el mismo estudio se observó que un mayor depósito de AS se correlaciona con una mayor puntuación en la escala de Hoehn y Yahr. Se puede concluir que la acumulación de AS se correlaciona con la situación motora y que el depósito de AS en los nervios cutáneos vegetativos podría ser un marcador de EP²². La cronopatología del depósito de AS hace pensar que en estadios muy precoces el depósito se produce en los axones a nivel distal de nervios largos, como los de

extremidades inferiores. Las biopsias realizadas en estas regiones cuando han aparecido los síntomas motores podría mostrar una ausencia de AS debido a la degeneración de las fibras finas, y por ende se podrían detectar en zonas corporales más proximales al encontrarse en estadios de la enfermedad menos avanzados^{22,88}.

Hipótesis

No todos los pacientes que cumplen los criterios clínicos actuales de EP comparten el mismo fenotipo clínico, el mismo perfil evolutivo y la misma respuesta farmacológica. Por otro lado, los estudios neuropatológicos indican que no hay un patrón uniforme de neurodegeneración. Por un lado existe un grupo de pacientes en los que nos encontramos abundantes cuerpos y neuritas de *Lewy* en las neuronas supervivientes y en otros, en cambio, el hallazgo de AS es mínimo e incluso nulo encontrándose en algún caso depósito de otras proteínas como son la proteína TAU, amiloide, etc.

Existe una correlación entre el fenotipo clínico y los hallazgos neuropatológicos. Los pacientes que muestran las formas “típicas” de enfermedad con un curso progresivo, que desarrollan complicaciones motoras y síntomas no motores como son el TCSR y el deterioro cognitivo con presencia de alucinaciones visuales, presentarían abundante degeneración neuronal y marcada presencia de AS cumpliendo criterios de estadios avanzados según Braak (estadios IV, V y VI). Por otro lado, en pacientes con cursos más “benignos” que evolucionan de forma más lenta, con buena respuesta a levodopa, con menor incidencia de trastornos cognitivos y menor presencia de síntomas no motores sería frecuente encontrar poca cantidad de inclusiones de AS.

Los modelos genéticos nos ayudan a tener grupos clínicos más homogéneos para su estudio. Clasificando los pacientes por los hallazgos genéticos nos

encontramos con dos formas de enfermedad contrapuesta: por un lado los pacientes portadores de mutaciones en el gen SNCA que presentan un fenotipo de EP típico pero rápidamente progresivo, que desarrollan deterioro cognitivo precoz, trastornos del sueño y del SNV. Los escasos estudios postmortem realizados a este grupo de pacientes aportados a la literatura describen abundante neurodegeneración y acúmulos de AS en estructuras del tronco, del sistema límbico y de áreas asociativas cumpliendo criterios de DCL. En el otro extremo se encontrarían los pacientes portadores de mutaciones en el gen PARK2, los cuales presentan una EP de inicio precoz, progresión lenta y que desarrollan de forma infrecuente deterioro cognitivo y trastornos del sueño. Los estudios neuropatológicos destacan por la ausencia de inclusiones patológicas en las neuronas supervivientes respetándose la corteza cerebral.

De acuerdo con esta gran variabilidad en cuanto a las manifestaciones clínicas, aspectos neuropatológicos y respuesta terapéutica podemos considerar que nos encontramos delante de diferentes enfermedades o subtipos de enfermedad. Esta consideración nos lleva a la siguiente cuestión: si las bases neuropatológicas son diferentes, las futuras terapias neuroprotectoras también deberían ser diferentes. Se ha buscado sin éxito biomarcadores universales, pero quizá existan diferentes biomarcadores para los diferentes subtipos de enfermedad. En el caso del SNV, nos planteamos si la afectación del SNV podría ser un biomarcador de EP idiopática, de manera más específica de aquellas formas en las que se deposita AS en cuerpos de *Lewy*.

La hipótesis que planteamos en esta tesis se puede resumir en:

- Existen distintos “subtipos” de EP en función del perfil clínico y los hallazgos neuropatológicos.
- Existen biomarcadores específicos de estos “subtipos” de EP.
- El estudio exhaustivo del sistema nervioso vegetativo podría servir como un biomarcador de EP asociado a CL y NL.
- Los patrones más agresivos de EP muestran un mayor depósito AS en forma de cuerpos y neuritas de *Lewy* en estructuras del tronco, diencéfalo y corteza cerebral. Un ejemplo único son los pacientes portadores de mutaciones en gen SNCA.
 - Estos pacientes sufren generalmente una importante afectación del SNV que puede demostrarse clínicamente, funcionalmente, desde un punto neuro-hormonal y a través de la imagen cardíaca funcional (gammagrafía con MIBG).
 - Se plantea que esta afectación del SNV se produce de forma muy temprana. A pesar de ello no se manifiesta clínicamente hasta fases evolucionadas de la enfermedad. Los estudios de la función del SNV en portadores asintomáticos pueden ser útiles en este sentido.

- Los fenotipos menos agresivos tienen menor depósito o incluso ninguna inclusión de AS. Un ejemplo de esto son las mutaciones en el gen PARK2.
 - La afectación del SNV en pacientes con mutaciones del PARK2 es más leve en comparación con la de los pacientes con PARK1.
 - De acuerdo con la gran variabilidad de la clínica y los hallazgos neuropatológicos de los pacientes con mutaciones de la LRRK2 pensamos que estos pacientes tienen un grado de afectación del SNV intermedio.
- Estudiando personas en riesgo (portadores asintomáticos de mutaciones genéticas conocidas) podemos predecir el riesgo de desarrollar EP en función de la afectación de estos biomarcadores precoces.
- El estudio de pacientes con TCSR idiopático o Fallo Autonómico Puro (FAP) podría ayudar a definir el riesgo futuro de desarrollar una EP o DCL.

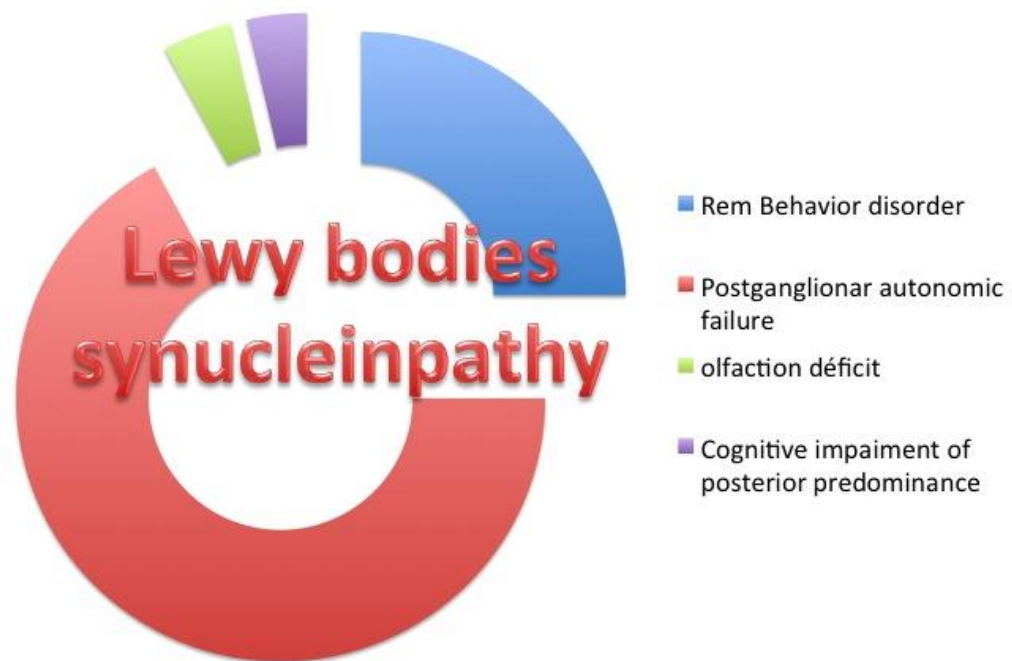


Figura 3. Síntomas no motores. Conjunto de datos que combinados adquieren una alta especificidad para predecir una sinucleinopatía con cuerpos de *Lewy*.

Objetivos

1. Definir el patrón de afectación clínica y funcional del SNV en pacientes con EP.
2. Determinar la disfunción del SNV en portadores de mutaciones genéticas conocidas con un fenotipo clínico establecido.
3. Establecer la utilidad del estudio de SNV como predictor de la variabilidad neuropatológica (con o sin cuerpos de *Lewy*).
4. Intentar establecer la historia natural de la afectación vegetativa en los portadores de mutaciones patogénicas desde el estadio presintomático hasta la enfermedad avanzada.

Material y métodos

Pacientes

Este estudio incluye pacientes diagnosticados de EP siguiendo los criterios clínicos diagnósticos del banco de cerebros de Londres (*UK Parkinson's Disease Society Brain Bank*)⁸⁹, llevado a cabo en la unidad de trastornos del movimiento del Hospital Universitario Cruces (Barakaldo-Bizkaia) por los neurólogos JCGE y BTM. A todos los pacientes se les realizó un estudio genético de las principales mutaciones conocidas que producen EP (LRRK2 y PARK2). También se incluye a un grupo de pacientes, todos de la misma familia, portadores de una mutación en el gen SNCA (E46K) que hasta la fecha solo ha sido descrita en otra paciente en Sudamérica⁹⁰. Los pacientes son clasificados en función de la presencia de mutaciones genéticas en varios grupos: portadores de la mutación E46K (7 pacientes), portadores de la mutación LRRK2 (12 pacientes) y portadores de la mutación PARK2 (8 pacientes). Los pacientes en los que no se detectaba ninguna mutación y sin antecedentes familiares conocidos eran clasificados como idiopáticos. Antes de la entrevista se proporcionó una explicación detallada de los objetivos del estudio y se garantizó la confidencialidad de los datos obtenidos.

El estudio ha sido aprobado por el comité de ética local. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado antes de realizar el estudio genético. Se proporcionó un segundo consentimiento informado para la realización del estudio de SNV, aprobado a su vez por el comité de ética local.

Fueron excluidos del estudio pacientes con sospecha de parkinsonismo atípico o aquellos que, por presencia de deterioro cognitivo no tenían una colaboración adecuada para realizar las diferentes exploraciones.

Estudio general

Se recogen los datos clínicos de todos los pacientes del estudio: la fecha de inicio de las primeras manifestaciones clínicas de la EP, el síntoma inicial, el tratamiento farmacológico y las puntuaciones en las siguientes escalas de valoración: *Unified Parkinson Disease Rating Scale* (UPDRS I-IV) y el test de olfacción (*Brief Identification Smell Test* 12-item).

Estudio del SNV

La exploración se realiza a primera hora de la mañana, después de 12 horas desde la última ingesta y de haber pasado la noche en reposo. Se informa de suspender cualquier medicación o alimento que pudiese modificar los niveles de catecolaminas sanguíneas durante las 24 horas previas.

Evaluación clínica de SNV

Los objetivos de la evaluación clínica son: identificar la presencia y patrón de afectación de la disfunción del SNV en pacientes portadores y no portadores de las mutaciones genéticas asociadas a la EP. Para este propósito se utilizaron:

1. Escala clínica de síntomas vegetativos. SCOPA-AUT: Es un cuestionario fiable y validado para valorar la afectación del SNV en pacientes con EP. Se compone de 25 ítems que testan los dominios: gastrointestinal (7 ítems), urinario (6 ítems), cardiovascular (3 ítems), termorregulatorio (4 ítems), pupilomotor (1 ítems), y disfunción sexual (2 ítems para hombre y 2 ítems para mujer)⁹¹

2. Evaluación funcional SNV:

Se evalúa de forma no invasiva la función simpática y parasimpática basada en una modificación de la escala de Ewing y Clarke^{92 93}. A tal efecto se procede a la monitorización continua no invasiva de la frecuencia cardíaca, la tensión arterial, las resistencias vasculares periféricas y la ganancia barorrefleja utilizando para ello el dispositivo *Task Force Monitor* (TFM, CNSystems ©). Una vez monitorizado el paciente este permanece al menos 20 minutos en reposo, en un ambiente tranquilo a 23 grados de temperatura. Los primeros estudios fueron realizados con el uso de otro dispositivo de monitorización hemodinámica no invasiva, el Finometer (Finapres©).

A través de este test se evalúa:

1. Función cardiovagal

- a) **Test respiración profunda “Deep breathing”:** Consiste en realizar un ciclo de 6 respiraciones por minuto (inspiración-espирación) de 5 segundos cada uno, mientras el paciente permanece en reposo. Se calcula la diferencia media entre la frecuencia cardíaca máxima y la mínima en cada ciclo respiratorio. Supone una medida indirecta pero sensible, específica y reproducible de la función nerviosa cardiovagal, que puede ser bloqueada por atropina⁹⁴. La desviación estándar de los intervalos R-R proporciona una medida de la variabilidad cardíaca que puede ser evaluada en el rango de frecuencias. La variabilidad cardíaca se correlaciona con la banda de alta frecuencia del análisis espectral ($>0.15\text{Hz}$).
- b) **Valsalva ratio:** Es el ratio obtenido entre la frecuencia cardíaca máxima y la frecuencia cardíaca más baja durante una espiración forzada contra una resistencia de 40 mm de Hg durante 15 segundos. Al realizar una maniobra de valsalva aumenta la presión intratorácica y secundariamente disminuye la PAS y PAD por disminución de llenado de cavidades cardíacas derechas. Este descenso de PA pone en marcha el arco barorreflejo que activa como respuesta el sistema nervioso simpático con el subsecuente aumento de las resistencias vasculares periféricas (RVP) y de la

frecuencia cardíaca. El aumento de la tensión arterial estimula el componente vagal del barorreceptor produciéndose una bradicardia refleja de rápida instauración.

- c) **Dominio de frecuencias.** En el espectro de variabilidad de la frecuencia cardíaca existen dos picos predominantes, uno aproximadamente a 0,1 Hz (banda de baja frecuencia, LF) y otro a 0,25 Hz (banda de alta frecuencia, HF). La HF se considera relacionada con la arritmia respiratoria y puede ser bloqueada por atropina, por lo tanto, se considera modulado por el tono vagal. El análisis de la HF supone una medida del comportamiento de la función cardiovagal.

2. Test de función adrenérgica

a) **Variación de la tensión arterial en la maniobra de valsalva:**

La relación entre los cambios de PA y de la frecuencia cardíaca durante la MV es un reflejo complejo, en el que ejerce su acción mecanismos cardiovagales, mecanismos adrenérgicos sistémicos, mecanismos cardíacos adrenérgicos y mecanismos mixtos. Durante la maniobra se registra simultáneamente la PA y la frecuencia cardíaca latido a latido y se analizan su comportamiento durante las diferentes fases de la maniobra para evaluar por separado la función simpática y parasimpática. Hay cuatro fases principales: La fase I y III corresponden a los cambios de PA y FC secundarios a cambios

mecánicos. La fase II tardía y la fase IV proporcionan un indicador excelente de la función adrenérgica. El aumento de la tensión arterial y FC propio de la fase IV (*overshoot*) se atenúa de forma significativa con propanolol, no se afecta con atropina y se potencia con fentolamina. Todo esto sugiere que el mecanismo subyacente es adrenérgico cardíaco y está afectado en pacientes con EP con denervación simpática cardíaca evaluada mediante gammagrafía con MIBG. El componente noradrenérgico periférico del barorreceptor puede ser evaluado mediante la medición del tiempo de recuperación de la PA (PRT)⁹⁵. El PRT supone el intervalo de tiempo que transcurre desde el momento en el que la PAS alcanza su valor mínimo en la fase III y el momento en el que recupera los valores de PAS al finalizar la maniobra. Se consideran valores normales los inferiores a 4 segundos.



Figura 4. Maniobra de Valsalva. Monitorización de variables hemodinámicas con un equipo de monitorización continua (*Taskforce monitor*) durante la realización de la maniobra de valsalva en una persona sana. Se observa una caída del volumen latido del corazón (VEC) que provoca un aumento de la actividad simpática con aumento de las resistencias periféricas (RPT) y detención de la caída de la tensión arterial en la fase 2. Esta actividad simpática produce una taquicardia para limitar la caída en el gasto cardíaco. Al cesar la maniobra de valsalva (fase 3) se produce un aumento de la tensión arterial (fase 4) como consecuencia de producirse una recuperación del volumen latido en un sistema arterial en vasoconstricción. Se sigue de una bradicardia compensadora como refleja la normalidad en el funcionamiento del arco barorreflejo.

b) Respuesta de PA y FC durante el tilt test (HUT):

Tras permanecer en reposo 20 minutos a cada individuo se le somete a una inclinación pasiva a 60 grados y permanece al menos 20 minutos o hasta que se produce el síncope. La respuesta normal de la frecuencia cardíaca a la inclinación o basculación es un incremento de 10-30 latidos por minuto, hasta un máximo de 120 lpm. La respuesta normal de la TA tras la inclinación es una caída de la TAS menor de 30 mm Hg o de TAD menor de 20 mmHg. Hay varios índices que pueden ser medidos: la variación de la TA, la variación de la FC, el cambio en RVP y la ganancia barorrefleja.

En el caso de que el individuo no tolere el ortostatismo pasivo se realiza la maniobra con bipedestación activa, si bien, en este caso la prueba tiene una menor sensibilidad. La HO se define como una caída de la tensión arterial sistólica de 20 mmHg y/o 10 mmHg en la tensión arterial diastólica en los primeros tres minutos. Aproximadamente en la mitad de los pacientes (46%) con HO neurogénica, ésta se detecta en dicho período de tiempo, aunque en un 36% la HO puede aparecer más allá de los 10 minutos en la posición de "tilt up"⁹⁶. En pacientes con antecedentes de hipertensión arterial o con sospecha diagnóstica de atrofia multistémica se recomiendan elevar los criterios a caídas de la

tensión arterial sistólica de 30 mmHg en ortostatismo o 15 mmHg en la tensión arterial diastólica⁴².

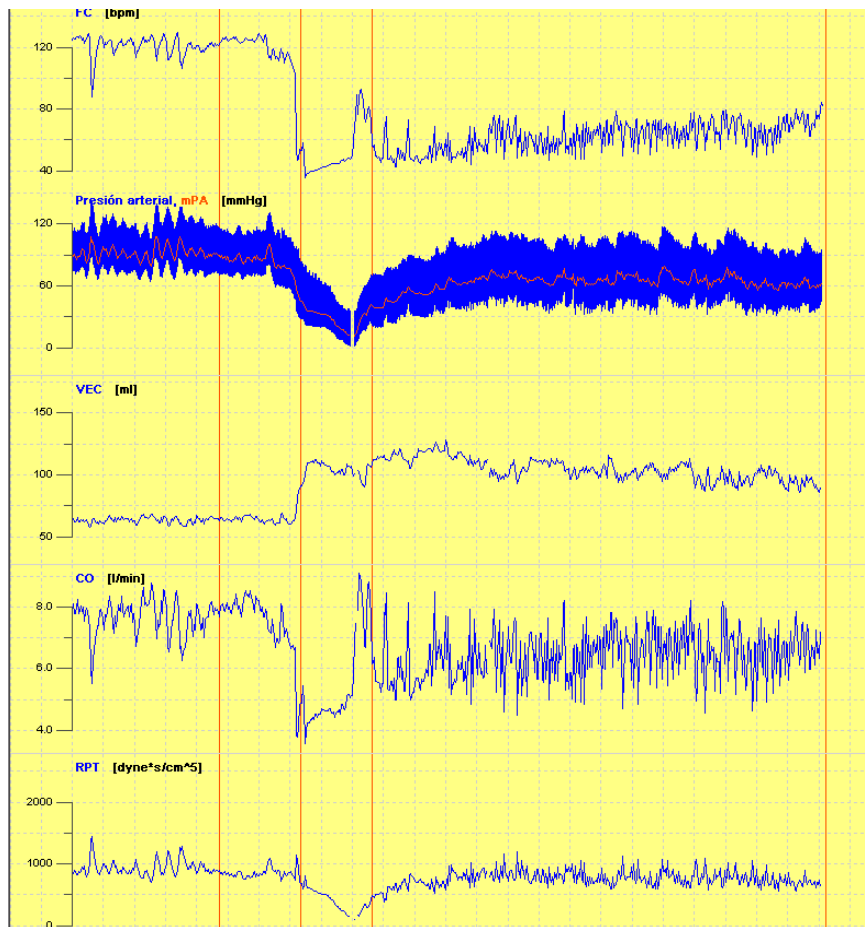
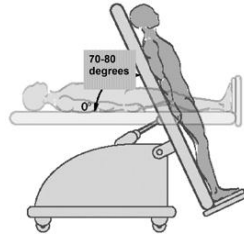


Figura 5. Test con inclinación pasiva de 60 grados. La prueba es positiva, a los 10 minutos se observa una caída brusca de la FC y de la tensión arterial que provocan el síncope. Corresponde a un síncope mixto: cardioinhibidor y vasodepresor con caídas de las resistencias periféricas (RPT).

c) **Contracción isométrica:**

Se utiliza un dinamómetro calibrado. Se solicita a cada individuo que realice una contracción isométrica utilizando su fuerza máxima. Posteriormente se instruye para que el individuo mantenga la contracción al 30% de la fuerza máxima durante 3 minutos o hasta el agotamiento. Se realiza una medición continua de la TAS y TAD en la extremidad contralateral. La contracción muscular provoca un estímulo que deriva tanto del ejercicio muscular como de la activación central que produce un aumento del gasto cardíaco, de la TA y de la FC. Se considera un test de función simpática periférica aunque carece de alta sensibilidad y especificidad y está expuesto a numerosos factores de confusión.

Inervación simpática cardíaca cuantificado por gammagrafía con ^{123}I -metayodobenzilguanidina (^{123}I -MIBG)

Se instruyó a los individuos y familiares para que el día de la realización del estudio gammagráfico se evitara la ingesta de alimentos hasta la finalización del mismo. La noche anterior y la mañana de la realización del estudio los pacientes fueron tratados con una pequeña cantidad de lugol. Ninguno de los pacientes había recibido sustancias que pudieran afectar a la captación, transporte y almacenamiento de ^{123}I -MIBG, entre los que se encuentran los antidepresivos tricíclicos (amitriptilina,

imipramina), antihipertensivos (reserpina, labetalol, otros bloqueantes alfa y beta adrenérgicos, calcioantagonistas), simpaticomiméticos (efedrina, fenilefrina, fenilpropanolamina, dopamina, dobutamina, anfetaminas y derivados anfetamínicos)

Con el paciente en reposo, se le administra de forma intravenosa una dosis de 111 MBq de ^{123}I -MIBG. El fotópico de energía está centrado en 159 KeV, con una ventana del 20 %. Se utiliza un colimador propósito general, equipado para baja energía. Se adquirieron imágenes planares en proyección anterior de tórax, tanto en tiempo precoz a los 15 minutos, como tardías a las 4 horas post-inyección. El equipo empleado fue en todos los casos una gammacámara con doble cabezal, marca General Electric, modelo Millennium. La adquisición se realizó durante 10 minutos en cada imagen, empleando una matriz de 256 x 256. El resultado obtenido se compara con la captación del mediastino de forma que se obtiene un ratio a los 15 minutos (*early H/M*) y a las 4 horas (*late H/M*) siendo este último más específico de la captación del radiotrazador por parte de los terminales noradrenérgicos. En nuestro centro, según diferentes estudios realizador por servicio de medicina nuclear, el punto de corte se sitúa en 1.6, considerando las ratios inferiores a este valor considerados como patológico. En raza caucasiana los valores patológicos son más bajos que los encontrados en otras poblaciones como la japonesa⁹⁷. Para comparar las imágenes de inervación con los defectos de perfusión se realiza una gammagrafía miocárdica con el radiotrazador tecnecio 99 MIBI (metoxi isobutil isonitrilo).

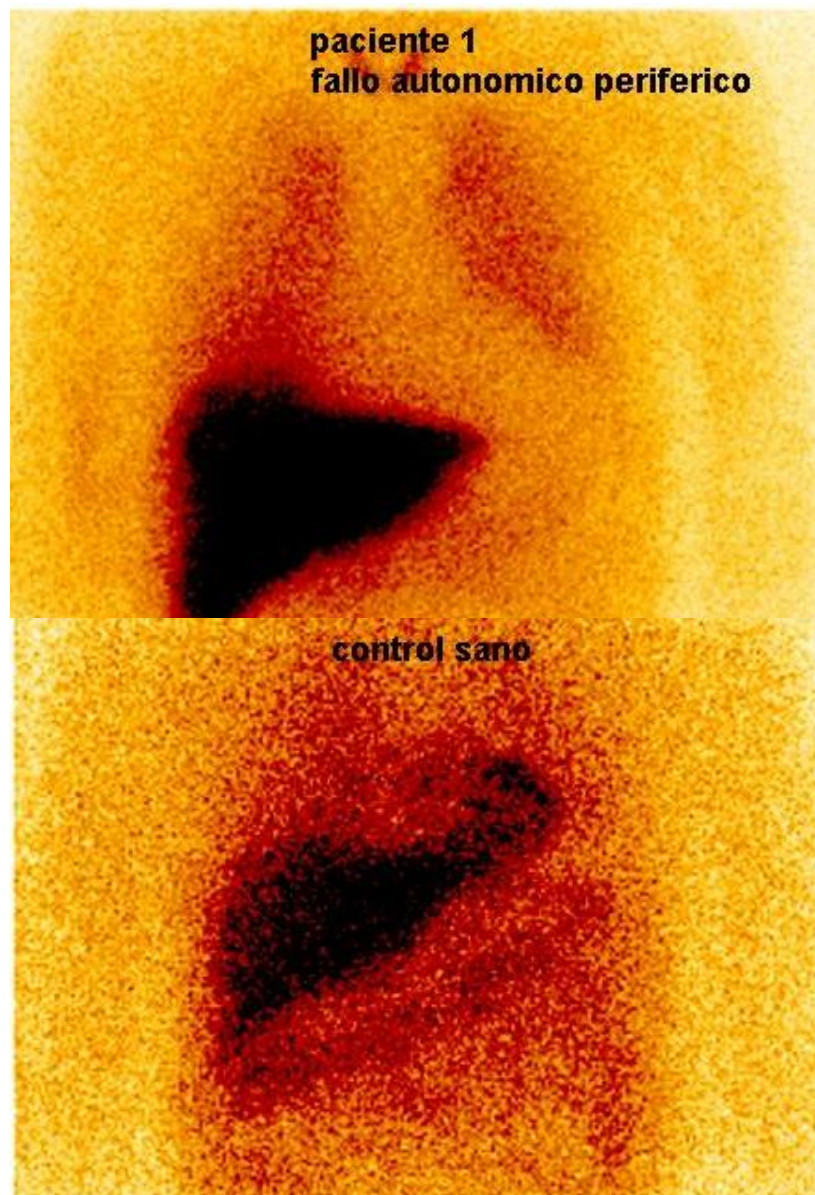


Figura 6. Gammagrafía miocárdica con MIBG. Se aprecian dos situaciones diferentes, en la parte de arriba una imagen gammagráfica cardíaca fría que corresponde a un paciente con fallo autonómico puro. En la figura de la porción inferior se observa una captación gammagráfica normal en un paciente sano.

Estudio neuro-hormonal: respuesta de catecolaminas y vasopresina al ortostatismo⁴⁴

Para realizar el análisis de los niveles de noradrenalina (NA) y de vasopresina se obtuvieron muestras de sangre periférica (30 ml de punción venosa en el brazo) después de que el paciente permaneciera 40 minutos en reposo en posición de supino y una segunda muestra obtenida del mismo modo pasados 3 minutos de ponerse en pie. Los niveles de NA se analizan mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica. La vasopresina plasmática se obtiene por radioinmunoensayo (RIA).

Se considera una respuesta normal el duplicar los niveles de NA en supino respecto a los niveles basales. Pacientes con lesiones preganglionares, típicas de la AMS, presentan en general niveles de NA normales (150-300 pg/ml) o cuasi normales en supino, pero una insuficiente elevación de los niveles NA plasmáticos al ponerse en pie. En pacientes con un fallo adrenérgico postganglionar generalizado como ocurre en el FAP o en la EP los niveles de NA en supino se sitúan por debajo de los niveles medios, mientras que se produce una elevación de los niveles en respuesta al cambio al supino. La vasopresina es casi indetectable en decúbito supino tras 40 minutos de reposo, pero se incrementa en casos de HO severa por fallo autonómico postganglionar. En casos de lesiones centrales como es el caso de la AMS no se observa este incremento de la vasopresina en respuesta al ortostatismo.

Monitorización ambulatoria de la TA las 24 horas (MAPA)

A los pacientes estudiados se les realizó una monitorización ambulatoria de la TA durante 24 horas siguiendo el protocolo MAPAPRES de la Sociedad Española de Hipertensión (SEH-LELHA). Utilizando el software Spacelabs Medical, Inc. se calcula la media de la TAS y de la TAD tanto de las mediciones diurnas como de las nocturnas. El porcentaje de la caída de la TA se calcula como la media de TAS diurna menos la TAS media nocturna dividida entre la media de la TAS diurna. De acuerdo con el resultado de la caída de TA, los pacientes se clasifican como: dipper (TA desciende entre 10-20%), dipper extremo (TA desciende >20%), no dipper (caída >0 pero <10%) o riser (incremento nocturno de la TA). El diagnóstico de hipertensión se realiza según los criterios de la SEH-LELHA (> 135/85 mmHg durante el periodo diurno o de actividad y > 110/70 mmHg durante la noche o el reposo). Se considera un MAPA válido el que consigue un porcentaje de lecturas válidas mayor del 70%. Los participantes en este estudio se incluyen en el registro Nacional Español de hipertensión (MAPAPRES).

Datos medios/h Día 1 :

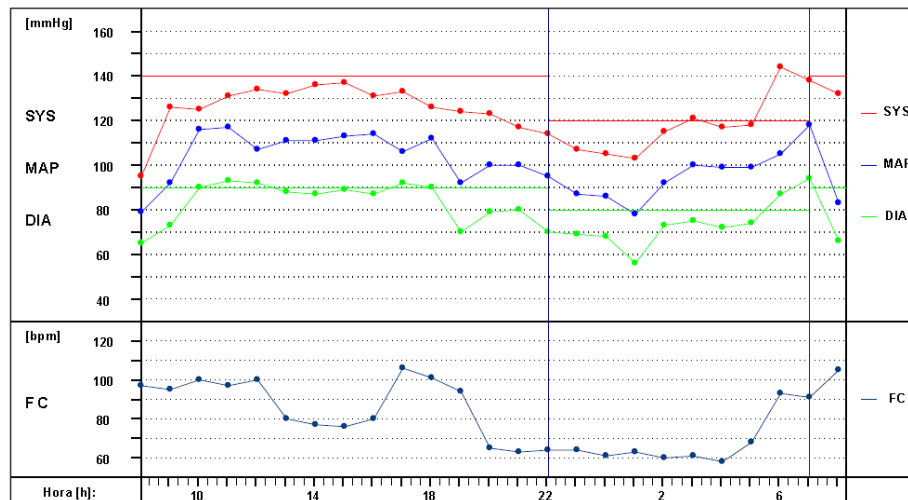


Figura 7. MAPA normal (patrón dipper). Refleja una bajada de la tensión arterial nocturna entre el 10 y 20% con respecto a la media diurna.

Datos medios/h Día 1 :

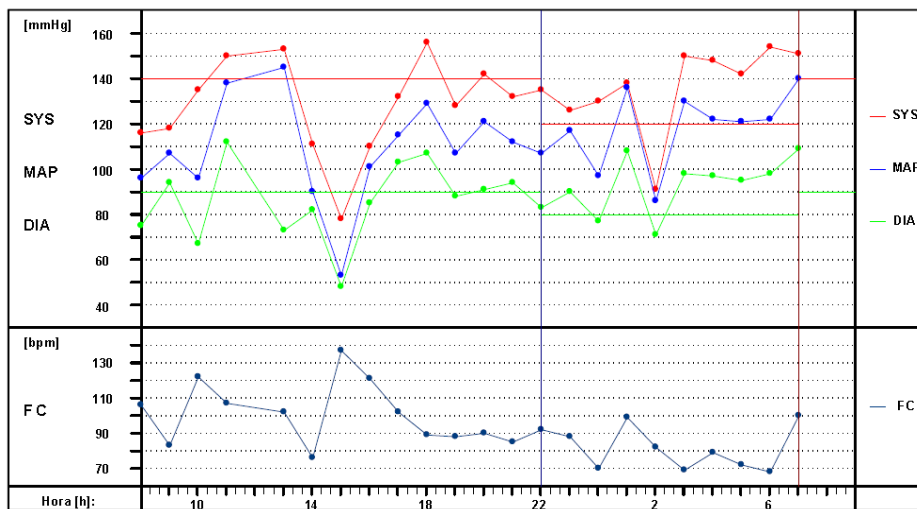


Figura 8. MAPA con aumento de la TA nocturna (patrón riser). La carga nocturna es alta, estando constantemente por encima de los límites de HTA. Por el día tras la ingesta el paciente presenta HO (14:30), por la noche sufre nuevo episodio de mareo con HO al levantarse a orinar al baño (2:00).

Test de función simpático colinérgica:

- a. **Respuesta simpática cutánea (RSC).** Es un test neurofisiológico que registra la actividad electrodérmica y obtiene una medida que valora la respuesta simpática colinérgica (función sudomotora). El estímulo suele ser eléctrico pero también puede ser sonoro, doloroso, magnético, etc. El sudor producido por estos estímulos induce un cambio en la resistencia galvánica en la superficie cutánea. La RSC mide un reflejo polisináptico con un componente espinal, bulbar y suprabulbar. La respuesta es registrada en unos electrodos de superficie y suele tener morfología trifásica o bifásica. El componente negativo corresponde a la actividad de la glándula y el positivo no ha sido todavía establecido. Los principales problemas de esta técnica son: la variabilidad inter e intraindividuales de amplitud y latencia, no es válido para localizar el nivel de la lesión y que existe un fenómeno de habituación y hay muchos factores que condicionan la respuesta (edad, estrés, género, etc.).

- b. **Respuesta sudomotora mediante SUDOSCAN** (*impeto medical ©*, Paris Francia). El Sudoscan® es un dispositivo aprobado por la FDA americana que provee una rápida y específica valoración de la función sudomotora a través de la respuesta galvánica. El test proporciona una medida cuantitativa (medida en microsiemens) de la capacidad que tienen las glándulas sudoríparas de liberar iones clorhidro (conductancia) en respuesta a una activación eléctrica en las palmas de las manos y las plantas de los pies. El test se realiza en ambiente tranquilo, con medidas de temperatura y calor estándar. Se evalúa la respuesta en manos y pies de forma simultánea. Estudios recientes valoran la función de Sudoscan® por encima del test axonal reflejo cuantitativo (QSART) y tiene una buena relación con la densidad de fibras nerviosas intra-epidérmicas en las biopsias cutáneas⁹⁸.

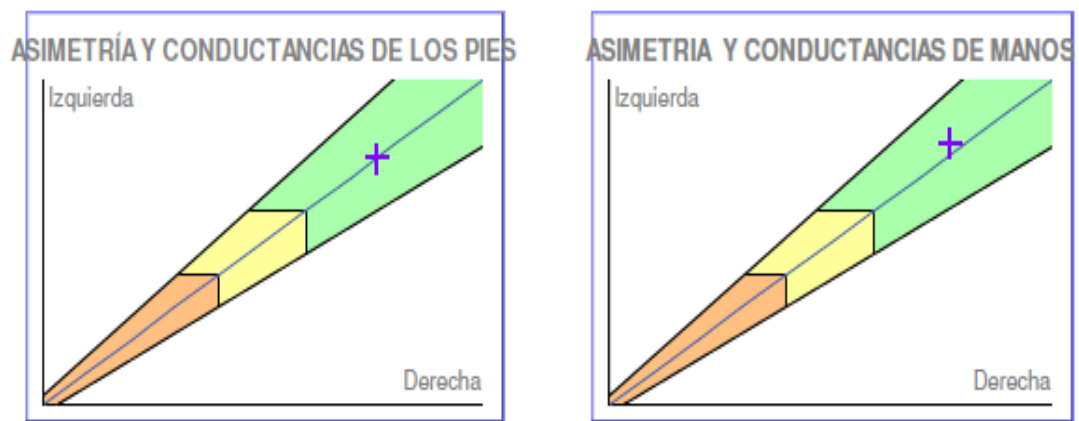


Figura 9. Imagen del Sudoscan®. Imagen en la que se aprecia la electroconductancia en pies y manos así como el grado de asimetría en ambas. Los valores están dentro de los valores normales (en verde).

Análisis genética molecular

1.- E46K

El estudio genético del gen SNCA se realizó inicialmente en el laboratorio de genética molecular de la fundación Jiménez Díaz, posteriormente se ha introducido la metodología de nuestro centro y se han realizado en este los últimos estudios. Además de las cinco mutaciones del gen SNCA conocidas hasta la fecha, se pueden detectar las duplicaciones del gen (duplicación y triplicación). El DNA se aísla tanto de leucocitos periféricos mediante los métodos de precipitación estándar fenol/cloroformo, como de cerebros incluidos en parafina añadiendo xileno para eliminar la parafina. Se utilizaron métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el análisis molecular. Los exones del PARK1 se amplifican utilizando pares de *oligonucleotidos primer* seleccionados según las recomendaciones publicadas previamente y mediante la información de la *National Center for Biotechnology Information database*. Las reacciones de amplificación se llevan a cabo principalmente mediante AmpliTaq Gold DNA polymerase (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA) en un volumen final de 25 µl para el estudio de 250 ng de DNA genómico. La amplificación se llevó a cabo a través de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C. Tras un periodo final de 10 minutos a 72 °C, los productos amplificados de los exones 2 y 3 del PARK 1 fueron sometidos a dirigir la secuenciación en el caso índice con los mismos cebadores usados para la

amplificación, utilizando técnicas de secuenciación automáticas basadas en fluorescencia (Applied Biosystem 373a DNA sequencer, Perkin-Elmer Model). Los exones 4 y 5 y la región codificante del exón 6 del PARK1 fueron analizadas mediante el análisis de polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCP) utilizando el sistema Genephor (Amersham, Pharmacia Biotech, Sweden) tanto a 5°C como a 15°C de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los productos de la PCR se digieren utilizando el *Styl Enzyme* (New England Biolabs, Beverly, MA) de acuerdo con instrucciones de fabricante. Tras la digestión, se procede a la electroforesis de los fragmentos en un gel de poliacrilamida al 12% a 150V durante 2 horas y fueron visualizados mediante tinción de plata con el kit de tinción *PlusOne DNA Silver Staining Kit* (Amersham Pharmacia Biotech).

2.-LRRK2

El DNA fue extraído de las células sanguíneas periféricas utilizando procedimientos de laboratorio estándar. En todos los pacientes se comprobaron las mutaciones: 4321C>G (R1441G) y 6055G>A (G2019S) del gen LRRK2, las dos mutaciones más prevalentes en el País Vasco. Los polimorfismos de nucleótidos únicos fueron genotipados utilizando TaqMan probes en el modelo ABI7300, según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.-Parkin

Las mutaciones en PARK2 fueron identificadas a través de DNA obtenido de linfocitos periféricos. Se realizó el análisis de polimorfismos de conformación de

cadena simple (SSCP) y en los casos en los que se observó un salto en la banda de SSP se realizó una secuenciación de nucleótidos. Para detectar alteraciones en las dosis del gen (duplicaciones y triplicaciones), se realizó un análisis cuantitativo RTPCR (Kitada T, Mamm Genome. 2000 Jun).

Los estudios de los genes LRRK2 y PARK2 se han realizado en los laboratorios de genética molecular del hospital de Cruces y en el laboratorio de genética de Biodonostia.

Análisis estadístico

Para variables cuantitativas se calcularon la media y la desviación estándar, mientras que se utilizaron proporciones para las variables cualitativas. La normalidad y la homogeneidad de las varianzas de las variables se confirmaron con los estadísticos de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene's respectivamente. Para comparar las medias se utilizaron test paramétricos (t de Student para variables independientes) y no paramétricas (Test de U de Mann-Whitney). En el caso de variables cualitativas se ha utilizado el test de la Chi cuadrado. Para comparar medias en más de dos grupos se ha utilizado el análisis de varianza (ANOVA one way) usando la corrección de Bonferroni para analizar variables dos a dos. Para analizar la correlación existente entre las diferentes variables numéricas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Cuando el tamaño muestral era pequeño o no cumplía los criterios de normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) se utilizaba la rho de

Spearman. Cuando ha sido necesario se han utilizado test de regresión lineal o logística en función de si la variable dependiente era continua o dicotómica.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico "*The Statistical Package for the Social Sciences 12 software for Windows*" (SPSS inc©-Chicago ILL).

Estudios

Trabajos 1 y 2.

El propósito de estos estudios es analizar la repercusión clínica y funcional de las alteraciones en el SNV en pacientes portadores de la mutación E46K de la AS (SNCA), tanto sintomáticos como asintomáticos. La importancia de estudiar el sistema nervioso vegetativo en esta mutación es crucial para definir el fenotipo de los síntomas no motores. Los pacientes portadores de la mutación desarrollan en su mayoría de forma homogénea un cuadro clínico agresivo de EP, caracterizado por la intensidad de los síntomas motores, el deterioro cognitivo y los trastornos del sueño. Los estudios neuropatológicos de dos portadores sintomáticos ponen de manifiesto un amplio depósito de CL y NL⁹⁹, cumpliendo criterios de demencia con cuerpos de *Lewy*. Hasta la fecha esta mutación ha presentado una penetrancia completa, desarrollando todos los portadores de dicha mutación la enfermedad. Una de las cuestiones interesantes es conocer el fenotipo clínico de pacientes portadores de mutación asintomáticos desde el punto de vista no motor.

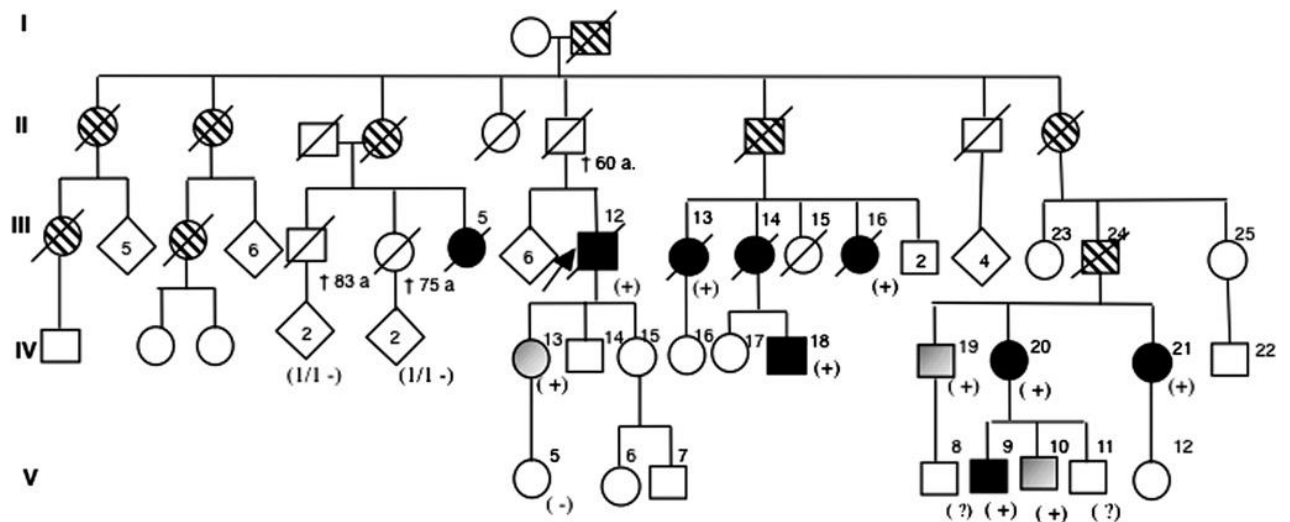


Figura 10. Árbol genealógico de la familia con Parkinson causado por la mutación E46K de la α -sinucleína. Los casos representados con rayas diagonales representan los individuos con historia de enfermedad. Los individuos representados en negro corresponden a aquellos en los que la afectación ha sido confirmada por exploración por personal médico. Los casos representados con barra quebrada son los individuos fallecidos. El caso índice (12) está indicado con una flecha. Los individuos representados en gris son pacientes portadores de la mutación que no han desarrollado síntomas motores que cumplan criterios de enfermedad de Parkinson.

1. Cardiac Sympathetic denervation precedes nigrostriatal loss in the E46K mutation of the α -synuclein gene (SNCA).

La paciente 13 de la cuarta generación (IV-13) de la familia original se ofreció voluntariamente a conocer su estado genético. El análisis cromosómico determinó que es portadora de la mutación E46K del gen de la SNCA. La paciente ha permanecido asintomática desde el punto de vista motor y cognitivo. Ha sido sometida a estudios seriados de la función vegetativa y pruebas de medicina nuclear (SPECT cerebral 123-I-FP-CIT y gammagrafía cardíaca con 123-I MIBG). A pesar de no mostrar síntomas motores, ni alteración olfato, ni alteración de sueño, padece importante alteración de la captación miocárdica MIBG. Se documenta en estos estudios una denervación simpática cardíaca que precede a la pérdida dopaminérgica nigroestriatal, puesto que, la SPECT cerebral 123-I-FP-CIT y la exploración son normales. Estos datos son compatibles con la hipótesis de que la afectación del SNV periférico acontece antes que la afectación del SNC. El seguimiento prospectivo de esta paciente y de otro portador asintomático desde el punto de vista motor, en edad de riesgo de desarrollar EP (caso no publicado) mostró una afectación clínica del sistema nervioso vegetativo (sincopes con hipotensión ortostática y sincopes tusígenos). Ambos casos cumplen en la actualidad criterios de fallo autonómico puro.

ISSN 0959-9851, Volume 20, Number 4

August 2010 • Volume 20 • Number 4

Clinical Autonomic Research
 Official Journal of the American Autonomic Society,
 Clinical Autonomic Research Society and
 European Federation of Autonomic Societies

Indexed in Current Contents, Medline, SCI and SCOPUS

car

EDITORIAL
Pheochromocytoma or Münchausen syndrome: the masquerade is up
 G. Eisenhofer 211

RESEARCH ARTICLES
Resting autonomic modulations and the heart rate response to exercise
 D. Numan · D.G. Jakovljevic · G. Donovan · L.D. Singleton · G.R.H. Sandercock · D.A. Brodie 213
Comorbid health conditions in women with syncope
 U.H. Ulas · T.C. Chelmsky · G. Chelmsky · A. Manstewar · K. McNeelley · A. Alshekhlee 223
Does an acute inflammatory response temporarily attenuate parasympathetic reactivation?
 S.Y. Jae · K.S. Heffernan · S.H. Park · S.H. Jung · E.S. Yoon · E.J. Kim · E.S. Ahn · B. Fernhall 229
Arterial baroreflex dysfunction in major depressive disorder
 M. Johansson · A. Einvall · P. Friberg · A. Myrvedal 235
Effects of autonomic blockade on nonlinear heart rate dynamics
 P.J. Mallar · L.M. Cose · T. St. Anand · N. McCartney · D.S. Ditor 241
Evaluation of the finger wrinkling test: a pilot study
 S. van Barneveld · J. van der Palen · M.J.A.M. van Putten 249

RESEARCH LETTER
Asymmetrical properties of heart rate variability in type 1 diabetes
 P. Guzik · J. Piskorski · P. Contreras · E.R. Migliaro 255

CASE REPORTS
Tachyarrhythmias with elevated cardiac enzymes in Münchausen syndrome
 L. Norcliffe-Kaufmann · A. Gonzalez-Duarte · J. Martinez · H. Kaufmann 259
Autonomic failure in a HIV-infected patient
 J. Tank · K. Heusser · C. Schroeder · F.C. Luft · J. Jordan 263

SHORT COMMUNICATIONS
Cardiac sympathetic denervation precedes nigrostriatal loss in the E46K mutation of the α -synuclein gene (SNCA)
 B. Tijero · J.C. Gomez-Esteban · V. Llorens · E. Lezcano · M.C. Gonzalez-Fernandez · M.M. de Pancorbo · J. Ruiz-Martinez · J.C. Cembellin · J.J. Zarranz 267
Sex differences in α -adrenergic support of blood pressure
 J.A.M. Schmitt · M.J. Joyner · N. Charkoudian · B.G. Wallin · E.C. Hart 271

 Springer Medizin www.car.springer.de

**This article was published in the above mentioned Springer issue.
 The material, including all portions thereof, is protected by copyright;
 all rights are held exclusively by Springer Science + Business Media.**

**The material is for personal use only;
 commercial use is not permitted.**

**Unauthorized reproduction, transfer and/or use
 may be a violation of criminal as well as civil law.**

Cardiac sympathetic denervation precedes nigrostriatal loss in the E46K mutation of the α -synuclein gene (*SNCA*)

B. Tijero · J. C. Gomez-Esteban · V. Llorens · E. Lezcano · M. C. Gonzalez-Fernández · M. Martínez de Pancorbo · J. Ruiz-Martinez · J. C. Cembellin · J. J. Zarranz

Received: 21 October 2009 / Accepted: 13 April 2010 / Published online: 5 May 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract

Introduction Here we report the case of an asymptomatic carrier of the E46K substitution in α -synuclein gene where we have documented that cardiac sympathetic denervation precedes nigrostriatal dopaminergic loss.

Material and methods She has been followed up regularly with standard neurological examination, UPDRS, neuropsychological formal testing, parkinson disease sleep scale-PDSS, Epworth scale, Hamilton-D scale, SCOPA Aut, orthostatic hypotension test, brief smell identification test, polysomnography, cerebral 123-I-FP-CIT SPECT, and, 123I-MIBG cardiac scintigraphy.

Results She shows no presence of orthostatic hypotension. Olfactory test results demonstrate normal limits. In the PSG the nocturnal sleep shows mild abnormalities although the sleep efficiency and stage proportion remain under normal limits. The 123-I-FP-CIT SPECT is normal; in contrast, the 123I-MIBG cardiac scintigraphy shows a complete lack of isotopic uptake compatible with a severe sympathetic myocardial denervation.

Conclusion This example of monogenic autosomal dominant parkinsonism due to an α -synuclein mutation favours the hypothesis that peripheral autonomous nervous system involvement occurs earlier than the CNS degeneration.

Keywords Parkinson disease · Autonomic failure · 123I-MIBG cardiac scintigraphy

B. Tijero · J. C. Gomez-Esteban (✉) · E. Lezcano · J. J. Zarranz
Service of Neurology, Hospital of Cruces, Baracaldo, Spain
e-mail: jgomeze@meditex.es

B. Tijero · J. C. Gomez-Esteban · E. Lezcano · J. J. Zarranz
Department of Neurosciences, University of the Basque Country, Vitoria, Spain

V. Llorens
Department of Nuclear Medicine, Hospital of Cruces, Baracaldo, Spain

M. C. Gonzalez-Fernández · M. M. de Pancorbo
BIOMICs Research Group, Genomics Unit, DNA Bank and Genotyping, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country, Vitoria, Spain

J. Ruiz-Martinez
Neurogenetics Laboratory, Hospital Donostia, Donostia-San Sebastián, Gipuzkoa, Spain

J. C. Cembellin
Service of Cardiology, Hospital of Cruces, Baracaldo, Spain

Introduction

In 2004, we reported the third known point mutation in the *SNCA* gene (E46K substitution in α -synuclein) in a family with autosomal dominant Parkinson disease (PD) and Lewy body dementia (LBD) [9]. Thereafter, we reported that the carriers of the mutation have an abnormal sleep architecture that precedes in some of them the beginning of motor symptoms [10].

Several lines of evidence support the notion that in sporadic PD, abnormalities in sleep, hyposmia and dysautonomia may antedate the classic parkinsonian motor symptoms and signs [5]. These data are in agreement with the Braak et al. [2] hypothesis of an orderly spreading of neuropathologic lesions in the brains of patients with PD from the olfactory bulb and lower medulla to the upper brainstem and cerebral cortex. However, other evidence

suggests that in a significant proportion of PD brains [4], the Lewy body neuropathologic burden does not follow the course suggested by Braak et al.

The involvement of peripheral autonomic neurons in PD was demonstrated by reduced MIBG uptake in >80% of parkinsonian patients with and without neurocirculatory failure [7, 8]. In a series of non-selected abdominal surgical specimens [6], α -synuclein was detected in the autonomic abdominal plexuses in 9% of the patients. In all of them, the MIBG scintigraphy was reduced suggesting that these structures may be the earliest to be involved in PD. As a matter of fact, Kaufmann et al. [5] reported the neuropathological findings of two patients, in whom dysautonomia antedated the parkinsonian clinical features.

Here, we add further evidence in favour of early involvement of the autonomic nervous system in patients with PD by showing that in an asymptomatic carrier of the E46K substitution in the α -synuclein gene; the 123I-MIBG cardiac scintigraphy was abnormally low while the brain 123I-FP-CIT SPECT and olfaction test were still within normal limits.

Patient and methods

We refer the reader to the original paper [9] for details about the pedigree. Two out of the three offspring from the index patient volunteered to be genetically tested, one of them turn out to be a carrier of the mutation. She has been monitored regularly with standard neurological examination, Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS), neuropsychological testing, validated sleep scales (Parkinson Disease Sleep Scale-PDSS, Epworth), depression (Hamilton-D) and dysautonomia scales (SCOPA-AUT), orthostatic blood pressure tests, Olfactory test (Brief Smell Identification Test- BSIT Sensonic[®]), polysomnography, cerebral 123I-FP-CIT SPECT, and, recently, 123I-MIBG cardiac scintigraphy. All procedures were approved by the Hospital Ethics committee.

The patient was a 49-year-old woman with no medical history. She was married, had two children and was a manual worker in a paper factory. She was taking no drugs and had no risk factors for cardiovascular disease. She did not refer motor symptom or complained of memory or sleep difficulties. Her neurological examination was normal. She scored 5 in the UPDRS III, 6 in the SCOPA-AUT scale, 0 in depression (Hamilton-D scale), 120 in PDSS and 6 in Epworth scale. In the supine position, her blood pressure was 140/71 mmHg and heart rate was 80 beats/min, while standing blood pressure was 146/99 mmHg and heart rate 84 beats/min. Olfactory test was within normal limits (10 out of 12 odours). In the

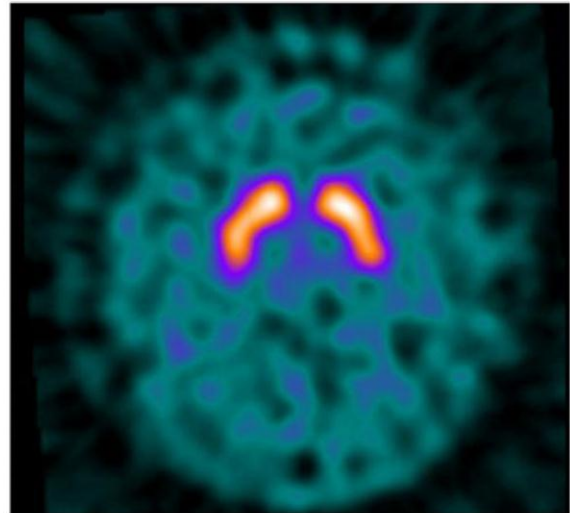


Fig. 1 Axial brain CT scan done 3 h after administration of 123I-FP-CIT. Normal uptake is seen in the basal ganglia without any appreciable changes in morphology

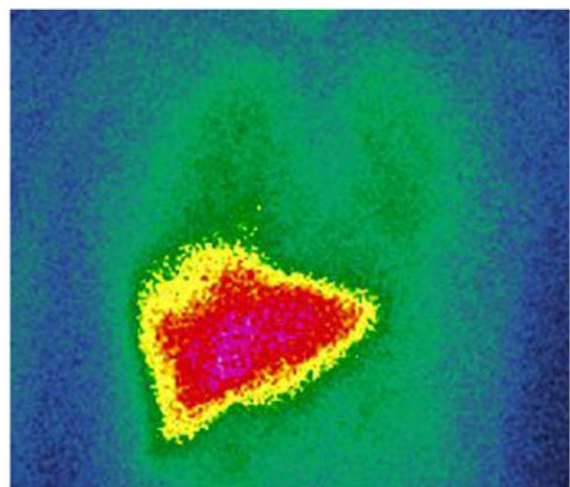


Fig. 2 The 123I-MIBG cardiac scintigraphy show a complete lack of isotopic uptake compatible with severe sympathetic myocardial denervation

PSG, the nocturnal sleep showed mild abnormalities (long latency to sleep, sleep fragmentation, increased number of stage transitions) although the sleep efficiency and stage proportion were within normal limits. REM abnormalities were not observed.

The 123I-FP-CIT SPECT was normal and showed no difference to the one performed on 2005 (Fig. 1).

In contrast, the 123I-MIBG cardiac scintigraphy showed a complete lack of uptake indicating severe sympathetic myocardial denervation (Fig. 2).

Comments

Studying the rare autosomal dominant varieties of PD may contribute to a better understanding of the much more frequent sporadic cases of the disease. The E46K substitution in the alpha-synuclein gene is relevant in several ways. It is a highly pathogenic mutation as proved by its complete clinical penetrance and by the studies *in vitro* [3] showing a remarkable tendency to form α -synuclein fibrillary structures.

This mutation supports the concept that PD and LBD are the result of the same pathogenetic basic process [1], because all affected patients eventually develop dementia and in some of them cognitive decline was the first symptom.

In addition, this family provide evidence that sleep disorganization [10] and cardiac sympathetic denervation precede the parkinsonian motor syndrome and the dopaminergic loss in the brain. It is interesting to note that in agreement with others studies [8], in the present case, the 123I-MIBG cardiac scintigraphy detected sympathetic denervation in the absence of symptoms or signs of neurocirculatory failure. However, the olfactory test was normal suggesting that the peripheral sympathetic ganglia are affected earlier than the olfactory bulb, although a sub-clinical pathologic involvement of the olfactory system cannot be ruled out.

In summary, our case emphasize the importance of investigating the autonomic nervous system in patients at risk of suffering PD so that abnormalities could be detected as early as possible and neuroprotective therapy when available be instituted.

References

1. Aarsland D, Ballard CG, Halliday G (2004) Are Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies the same entity? *J Geriatr Psychiatry Neurol* 17:137–145
2. Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rub U (2002) Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol* 249(Suppl 3):III/1–III/5
3. Fredenburg RA, Rospigliosi C, Meray RK, Kessler JC, Lashuel HA, Eliezer D, Lansbury PT Jr (2007) The impact of the E46K mutation on the properties of alpha-synuclein in its monomeric and oligomeric states. *Biochemistry* 46:7107–7118
4. Jellinger KA (2008) A critical reappraisal of current staging of Lewy-related pathology in human brain. *Acta Neuropathol* 116:1–16
5. Kaufmann H, Nahm K, Purohit D, Wolfe D (2004) Autonomic failure as the initial presentation of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Neurology* 63:1093–1095
6. Minguez-Castellanos A, Chamorro CE, Escamilla-Sevilla F, Ortega-Moreno A, Rebollo AC, Gomez-Rio M, Concha A, Munoz DG (2007) Do alpha-synuclein aggregates in autonomic plexuses predate Lewy body disorders? A cohort study. *Neurology* 68:2012–2018
7. Sawada H, Oeda T, Yamamoto K, Kitagawa N, Mizuta E, Hosokawa R, Ohba M, Nishio R, Yamakawa K, Takeuchi H, Shimohama S, Takahashi R, Kawamura T (2009) Diagnostic accuracy of cardiac metaiodobenzylguanidine scintigraphy in Parkinson disease. *Eur J Neurol* 16:174–182
8. Takatsu H, Nishida H, Matsuo H, Watanabe S, Nagashima K, Wada H, Noda T, Nishigaki K, Fujiwara H (2000) Cardiac sympathetic denervation from the early stage of Parkinson's disease: clinical and experimental studies with radiolabeled MIBG. *J Nucl Med* 41:71–77
9. Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yebenes JG (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55:164–173
10. Zarranz JJ, Fernandez-Bedoya A, Lambarri I, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Zamacona J, Madoz P (2005) Abnormal sleep architecture is an early feature in the E46 K familial synucleinopathy. *Mov Disord* 20:1310–1315

2. Cardiac Sympathetic denervation in symptomatic and asymptomatic carriers of the E46K mutation in the α -synuclein gene.

El propósito de este estudio transversal es analizar el funcionamiento del SNV en la totalidad de pacientes portadores de la mutación E46K del gen de la SNCA. Para ello se estudian 4 pacientes sintomáticos y 2 asintomáticos. Se realiza el estudio del sistema nervioso vegetativo utilizando las pruebas descritas en la metodología. El estudio se completa con gammagrafía cardíaca con MIBG y el estudio postmortem del miocardio y epicardio de dos pacientes fallecidos portadores de la mutación. A estos dos últimos, dado el grado de deterioro cognitivo, no se les pudo realizar pruebas funcionales del SNV. Tanto los cuatro pacientes sintomáticos como el mayor de los asintomáticos, mostraban alteraciones en el cuestionario de síntomas disautonómicos (SCOPA-AUT), así como, una importante reducción de la captación en la gammagrafía MIBG cardíaca. La respuesta de catecolaminas, así como, la respuesta de la TA y frecuencia cardíaca en respuesta a HUT es normal en todos los pacientes, a excepción de un paciente sintomático desde el punto de vista motor que padece una HO. El estudio de miocardio de los dos pacientes autopsiados pone de manifiesto la ausencia completa de fibras simpáticas noradrenérgicas, mediante tinción inmunohistoquímica con tiroxin hidroxilasa. Encontramos por tanto evidencia histológica y de imagen de denervación cardíaca simpática en portadores de la mutación E46K, sintomáticos y asintomáticos. La denervación simpática parece ser

órgano específico, afectando selectivamente al corazón dado que los niveles de noradrenalina y los valores de TA son normales.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Parkinsonism and Related Disorders

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parkreldis

Cardiac sympathetic denervation in symptomatic and asymptomatic carriers of the E46K mutation in the α synuclein gene

Beatriz Tijero^{a,*}, Juan Carlos Gómez-Esteban^{a,*}, Elena Lezcano^a, Carmen Fernández-González^b, Johanne Somme^a, Verónica Llorens^c, Ana Martínez^d, Javier Ruiz-Martínez^e, Nerea Foncea^f, Inés Escalza^f, Koldo Berganzo^a, M.A. Aniel-Quiroga^g, Verónica Ruiz^a, Nuria Teránⁱ, Horacio Kaufmann^h, Juan Jose Zarranz^a

^a Movement Disorders and Autonomic Unit, Neurology Service, Cruces University Hospital, Basque Health Service, Department of Neurosciences, University of the Basque Country, Spain

^b BIOMICS Research Group, Genomics Unit, DNA Bank and Genotyping, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country, Vitoria, Spain

^c Nuclear Medicine Service, Cruces Hospital, Baracaldo, Spain

^d Clinical Neurophysiology Service, Cruces Hospital, Baracaldo, Spain

^e Neurogenetics Laboratory, Donostia Hospital, Donostia-San Sebastián, Gipuzkoa, Spain

^f Neurology Service, Galdakano Hospital, Galdakano, Spain

^g Endocrinology Laboratory, Cruces Hospital, Baracaldo, Spain

^h Dysautonomia Center, Langone Medical Center, New York University (NYU), New York, USA

ⁱ Neuropathology Service, Txagorritxu Hospital, Vitoria, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 May 2012

Received in revised form

30 July 2012

Accepted 1 August 2012

Keywords:

Parkinson disease
Autonomic disorders
Synuclein gene
E46K mutation

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to analyze autonomic function and cardiac sympathetic innervation in symptomatic and asymptomatic carriers of the E46K alpha-synuclein gene (*SNCA*) mutation.

Patients and methods: Autonomic function tests were performed in six patients, four of whom were symptomatic carriers (ages: 46, 59, 52 and 28-years) and two who were asymptomatic carriers (ages: 52 and 29 years). Autopsy studies were performed on an additional two symptomatic carriers not eligible for autonomic testing.

Patients completed the SCOPA autonomic questionnaire, and underwent the head-up tilt test accompanied by measurements of plasma norepinephrine. Valsalva maneuver and deep breathing tests, along with recording of sympathetic skin response (SSR) and cardiac MIBG scintigraphy were carried out. Myocardial tissue sections removed from the two autopsied cases were subjected to routine histological staining and immunohistochemical processing with monoclonal antibodies against tyrosine hydroxylase and alpha-synuclein.

Results: Both the four symptomatic and the older asymptomatic carriers reported abnormalities in the SCOPA questionnaire and had markedly diminished cardiac MIBG uptake. Plasma norepinephrine in the supine and tilted positions was normal in all subjects. Only one patient had significant orthostatic hypotension. There was a complete absence of tyrosine hydroxylase immunostaining in the myocardium of the two autopsied cases.

Interpretation: We have found imaging and histological evidence of cardiac sympathetic denervation in symptomatic and asymptomatic carriers of the E46K alpha-synuclein gene mutation. The sympathetic denervation appears to be organ-specific, with selective affection of the heart given that plasma norepinephrine levels and blood pressure were normal.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Symptoms of dysautonomia are common in Parkinson's disease (PD) and can precede the appearance of motor symptoms [1,2]. Such subclinical dysautonomic disorders can be identified, for example, by myocardial MIBG scintigraphy [1].

* Corresponding authors. Servicio de Neurología, Hospital de Cruces, Plaza de Cruces s/n, Baracaldo, CP 48903 Vizcaya, Spain.

E-mail addresses: beatriz_tijero@hotmail.com (B. Tijero), juancarlos.gomezesteban@gmail.com (J.C. Gómez-Esteban).

¹ These authors contributed equally to this work.

In 2004, we described the third known point mutation in the alpha-synuclein (SNCA) gene (G188A), which results in glutamic acid substitution by lysine in position 46 of the alpha-synuclein gene (E46K) [3]. The clinical phenotype is characterized by severe parkinsonism with dementia and sleep disturbances [4]. Neuropathological examination of the index case revealed extensive Lewy bodies and Lewy neurites in cortical and subcortical structures that met the pathological criteria for Lewy body dementia [3]. Experimental studies of this mutation have shown its strong tendency towards fibril formation and significant pathogenicity [5,6].

Since 2004 we have followed nine individuals of the original family in whom this mutation was identified, six of whom are symptomatic, while three are carriers of the mutation without motor or mental symptoms. This follow-up included studies of the autonomic nervous system in six of the nine carriers of the mutation (4 symptomatic and 2 asymptomatic) not performed prior to publication of the first article [3]. Our group has previously described how one of the asymptomatic carriers of the mutation presented with severe sympathetic denervation as evidenced by cardiac MIBG scintigraphy [7], predating the degeneration of nigrostriatal or other central nervous system nuclei. We believe that defining the clinical phenotype and the development of pathological changes of this genetic variant may help to improve our understanding of these aspects in sporadic synucleinopathies.

1.1. Patients and methods

The present article includes detailed studies of the autonomic nervous system of six carriers of the E46K mutation (4 symptomatic and 2 asymptomatic) not performed prior to publication of the first article (Fig. 1) [3]. Three of the nine patients followed by our group were not available for autonomic testing. The index case (III-12) died before autonomic studies were initiated. Patient III/16 was institutionalized due to advanced dementia and parkinsonism at the time of this study, and was therefore excluded from the autonomic function studies. However the relevant findings of her neuropathological study are reported briefly. Individual IV/19 is a 62 year-old, asymptomatic carrier of the mutation, that refused to participate in the study. The pedigree is shown in Fig. 1. Eleven PD patients without genetic mutations participated as positive controls (age: 56.2 ± 7.3 years (mean \pm SD); disease duration: 2.36 ± 1.94 years; 8 males). PD was diagnosed according to the criteria established by the UK Parkinson's Disease Society Brain Bank.

The study has been approved by the local ethics committee. All subjects signed informed consent before genetic testing, and the consenting process and testing was performed according to the guidelines of the local ethics committee. A second informed consent approved by the local ethics committee and covering all other diagnostic tests was provided and signed before initiating the study of the autonomic nervous system.

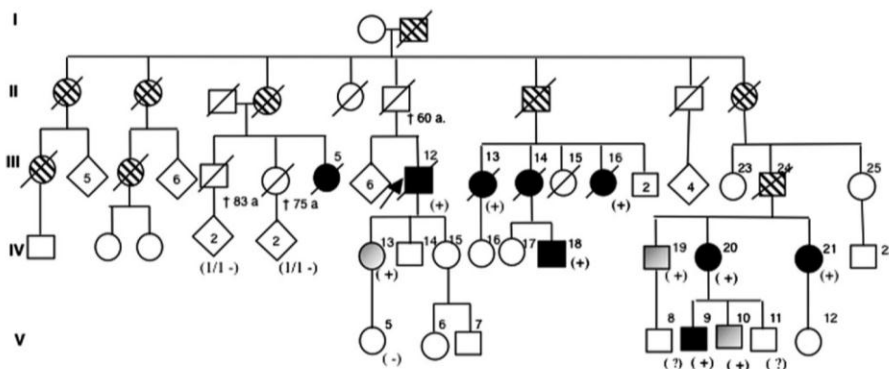


Fig. 1. Schematic diagram of the pedigree of the family with Parkinson disease caused by the E46K mutation of α -synuclein (hashed symbol: history of affectation; filled symbol: involvement confirmed by personal medical examination; slashed symbol: deceased; the index case III-12 is indicated by an arrow; gray symbols are asymptomatic carriers of the mutation).

1.2. General study

The following general clinical data was recorded for all symptomatic subjects included in the study; the date of initial clinical manifestation of PD, the initial or starting symptom, drug treatment and scores corresponding to the Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS I–IV) [8] at autonomic nervous system testing, and the 12-item Brief Identification Smell Test (Sensonic[®]).

1.3. Study of the autonomic nervous system

All patients were assessed early in the morning under fasting conditions, and had been instructed to avoid the intake of any medication or food capable of modifying blood catecholamine levels in the previous 24 h. For the analysis of noradrenalin (NA), adrenalin and vasopressin levels, blood was collected (30 ml from arm venipuncture) after a rest period of at least 40 min with the patient in the supine position. The same procedure was subsequently carried out after 3 min in the standing position. NA determination was performed using high-performance liquid chromatography (HPLC)/electrochemical detection. We then analyzed heart rate and blood pressure variability in relation to different physical maneuvers using the Taskforce continuous monitoring device (CNS[®] and Merce electromicina[®]). These maneuvers consisted of the 20-min Tilt Table test (TTT) at an inclination of 60°, the Valsalva maneuver (40 mmHg for at least 15 s), isometric contraction (handgrip isometer), and deep breathing (6 inspiration (I)/expiration (E) cycles). The E/I ratio was calculated by dividing the longest mean RR interval during expiration by the shortest RR interval during inspiration.

24-h ambulatory BP monitoring (MT-300 BPR Schiller[®]) was performed in all subjects. Myocardial MIBG (metaiodobenzylguanidine) scintigraphy was performed with a gamma camera, and the early (15 min) and late (4 h) myocardial/mediastinal uptake ratios analyzed. Patients also underwent ^{99m}Tc-MIBI (6-methoxy isobutyl isonitrile) SPECT to rule out myocardial perfusion defects. The sympathetic skin response (SSR) was assessed using a Keypoint device (Medtronic[®]).

Finally, we administered the SCOPA-AUT scale [9], a brief questionnaire concerning autonomic symptoms classified into 6 dimensions: Digestive, Urinary, Hemodynamic, Pupillary, Thermoregulatory and Sexual symptoms.

1.4. Histopathological study

Myocardial specimens of cases III/12 and case III/16 were fixed in formalin and embedded in paraffin. Five- μ m-thick sections were deparaffinized and subjected to routine histological staining

(hematoxylin-eosin) and standard immunohistochemical processing with monoclonal antibodies against tyrosine hydroxylase (TH) (TH16; Sigma, St. Louis, MO, USA)(1:3000) and alpha-synuclein (Zimed[®]). Myocardial samples from two patients without neurological disease were included as positive controls.

2. Statistical analysis

The mean and standard deviation were used for the quantitative variables, while proportions were used for the qualitative variables. U-Mann Whitney non-parametric test was used to compare means. The statistical software package SPSS 13 for Windows (SPSS Inc. Chicago, Illinois) was used.

3. Results

3.1. Patient III/12

This is the index case described in detail in our original article [3]. The patient was male, initially presenting nocturnal sleep disturbances with fragmented and disorganized sleep as evidenced by several serial polysomnography (PSG) studies, without the identification of REM Sleep Behavior Disorder (RBD), and followed by PD and dementia. Autopsy revealed extensive synucleinopathy which met the neuropathological diagnostic criteria of Lewy body dementia (LBD). No study of the functional integrity of the autonomic nervous system was made. However the postmortem myocardial tissue showed sympathetic denervation as evidenced by the total absence of TH immunostaining (Fig. 2).

3.2. Patient III/16

This woman was diagnosed with PD at 50 years of age. Language disturbances were noted when she was 70 years old and were followed by a rapid cognitive decline. Two years later she was institutionalized. We examined her for the first time in 2005, when she was 85. She was severely akinetic, mute, wheelchair bound, and totally dependent on nursing help for basic daily living activities. No ancillary tests were performed. She died in early 2012 at 91 years of age. Histology of the brain showed severe nigral degeneration with Lewy body inclusions and extensive alpha-synuclein deposition fulfilling the criteria for LBD. Very little tau (Braak 1) and insignificant levels of (1-42) A β 4 were detected in the immune assay. Myocardial nerve terminals were totally negative for TH and alpha-synuclein (Fig. 2).

3.3. Patient IV/18

A 59-year-old male diagnosed with PD in 2004 presented with rigidity, akinesia and mild tremor of the right extremities. At the time of this report his motor impairment was moderate, with motor fluctuations and mild akinesia (Table 1). The patient had experienced visual hallucinations which disappeared after lowering the dose of dopamine agonists. His cognitive status and mood were normal. In the early stages of the disease the patient presented with asymptomatic nocturnal sleep disturbances [4]. Cardiac MIBG scintigraphy was abnormal initially, with a myocardial/mediastinal uptake ratio after 4 h of 1.17 (normal value > 1.75). He showed well-tolerated orthostatic hypotension on the TTT, and

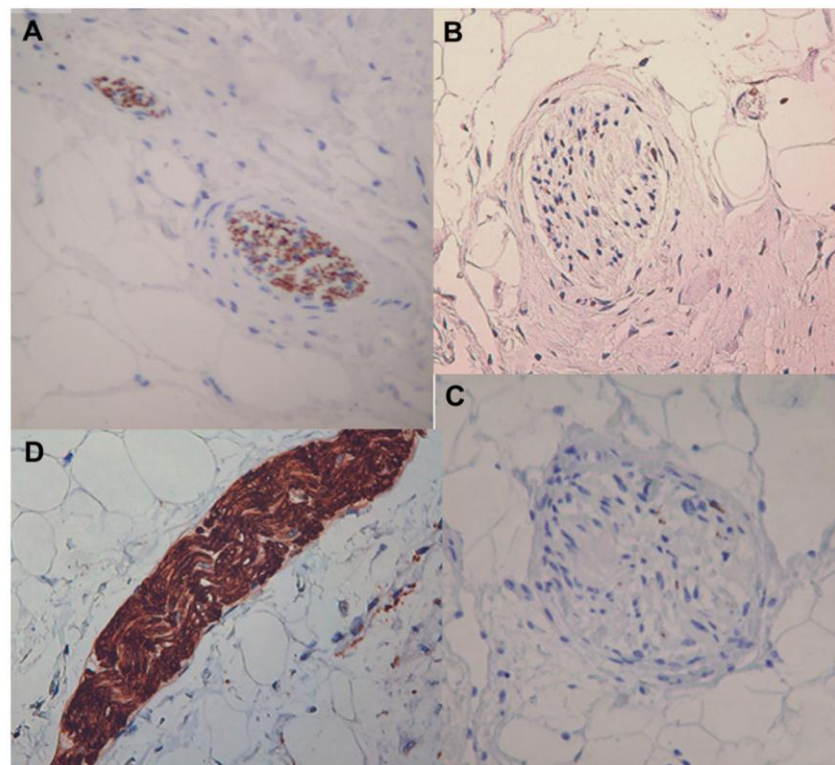


Fig. 2. Immunohistochemical findings in postmortem myocardial tissue from a control subject (A,D), from the patient III-39 (B) and in the index case (patient III/34) (C). In the control (A,D), TH immunoreactive nerve fibers of a fascicle in the epicardium are well preserved. In patient III-34 (C) and III-39 (B) severe degeneration of nerve fibers in the fascicles is evident.

Table 1

Scale scores, ages and treatment, where relevant, of the symptomatic and asymptomatic carriers of the E46K mutation. UPDRS: Unified Parkinson Disease Rating Scale. The table shows the findings in the smell test, where all symptomatic patients carrying the mutation had altered the test (12-item Brief Identification Smell Test (Sensonic®)).

	Patient 1 (IV-18)	Patient 2 (IV-20)	Patient 3 (IV-21)	Patient 4 (V-9)	Asymptomatic (IV-13)	Asymptomatic (V-10)
Age	59	52	46	28	53	29
Years from onset	7	6	2	0,5	0	0
UPDRS I	3	3	2	0	NA	NA
UPDRS II	16	9	11	5	NA	NA
UPDRS III	26	28	25	12	NA	NA
UPDRS IV	9	7	2	0	NA	NA
Treatment	Rasagiline 1 mg Prampipexol 2.1 mg Levodopa 700 mg	Rasagiline 1 mg Levodopa 700 mg (retard)	Rasagiline 1 mg Prampipexol 2.1 mg Levodopa 50 mg	Rasagiline 1 mg	NA	NA
Brief Identification Smell Test	6/12 (relatively abnormal)	8/12 (relatively abnormal)	4/12 (abnormal)	3/12 (abnormal)	10/12 (normal)	11/12 (normal)

a riser pattern in the 24-h holter blood pressure recording. NA liberation in response to postural change and SSR were normal. Heart rate variability was affected both in the respiratory cycle and in the Valsalva maneuver (E:I ratio 1.030; Valsalva ratio 1.13. Normal value >1.2). The patient showed major urinary symptoms and less severe digestive impairment, with no neurocirculatory symptoms on the SCOPA-AUT scale (Table 2).

3.4. Patient IV/20

A 52-year-old female had complaints of sleep disturbance, dizziness, constipation and olfactory loss prior to being diagnosed with PD in 2005, when she showed stiffness and mild bradykinesia of the left extremities. At the time of this report she was experiencing predictable motor fluctuations (wearing-off) (Table 1). She developed visual hallucinations with dopamine agonists, which were discontinued for that reason. PSG showed nocturnal sleep to be fragmented and poorly organized, with diminished REM sleep prior to the onset of the motor symptoms [4].

The patient had orthostatic intolerance, with symptomatic hypotension as evidenced by the TTT. Cardiac MIBG scintigraphy showed a myocardial/mediastinal uptake ratio of 1.24 after 4 h, which is below the cutoff point for normal values (cutoff > 1.75). Holter blood pressure monitoring revealed a non-dipper pattern, while catecholamine baseline levels and concentrations in response to orthostatism were normal (Table 2). The SSR was normal. The patient showed abnormal heart rate variability during deep breathing (E:I ratio 1.27; Valsalva ratio 1.13. Normal values 1.2–1.8 age-dependent). Blood pressure and heart responses to the Valsalva maneuver and isometric handgrip test were normal. The patient scored high on the SCOPA-AUT scale, particularly in reference to the urinary, digestive and thermoregulatory dimensions.

3.5. Patient IV/21

A 46-year-old female had complaints of disturbed sleeping pattern for at least 4–5 years, characterized by frequent awakening, as confirmed by PSG, which showed her sleep to be fragmented and poorly organized, with episodes of REM sleep without atonia. At age 44 she presented with clumsiness, rigidity, and akinesia of the right upper extremity and was diagnosed with PD. She experienced rapid worsening of motor symptoms and motor fluctuations (Table 1). There were few dysautonomic manifestations as evidenced by an SCOPA-AUT score of just 7. However, the MIBG scintigraphy myocardial/mediastinal uptake ratio was clearly affected (1.30, cutoff > 1.75) and the patient showed subclinical orthostatic hypotension on the TTT test. SSR, catecholamine levels at baseline and in response to postural change, the 24-h Holter blood pressure recordings, and blood pressure and heart rate responses to the

handgrip test, deep breathing and the Valsalva maneuver were all normal (Table 2).

3.6. Patient IV/13

A 52-year-old female who volunteered to be genetically tested and is known to be a carrier of the E46K mutation. Her case has been described in detail elsewhere [7]. At the time of this report the patient did not show any motor symptoms of PD, and ¹²³I-FP-CIT SCAN findings were normal. She complained of occasional orthostatic dizziness and polyuria. Orthostatic hypotension without clinical manifestations was identified with the TTT, and cardiac MIBG scintigraphy was significantly abnormal, with a myocardial/mediastinal uptake ratio of 0.99 after 4 h. Blood pressure and heart rate responses to the Valsalva maneuver, deep breathing and isometric handgrip test were all normal (Table 2).

3.7. Patient V/9

A 28-year-old male who reported rigidity and clumsiness in the left arm over a period of several months. In the two years prior to this report he had almost completely lost his sense of smell (Brief Smell Identification Test 3/12). He showed orthostatic hypotension on the TTT with syncope and the myocardial MIBG scintigraphy was slightly pathological considering his age (delayed myocardial/mediastinal uptake ratio of 1.73). An arterial pressure overshoot was absent after the Valsalva maneuver. Blood pressure and heart rate responses to deep breathing and the isometric handgrip test were normal (Table 2).

3.8. Patient V/10

A 29-year-old male who volunteered to be genetically tested and was found to be a carrier of the E46K mutation. At the time of writing he is a young, active man showing no symptoms of PD. He did not show orthostatic hypotension on the TTT and the myocardial MIBG scintigraphy was normal (delayed myocardial/mediastinal uptake ratio of 1.9). Blood pressure and heart rate responses to the Valsalva maneuver were normal. However, blood pressure and heart rate responses to deep breathing were not normal for a person of his age (E:I ratio 1.22; Normal values 1.2–1.8 (Age-dependent)) (Table 2).

4. Discussion

The G188A point mutation in the SNCA gene gives rise to a significant structural change in the alpha-synuclein protein where the dicarboxylic amino acid glutamic acid is substituted by lysine, a basic amino acid (E46K) [3]. The mutant synuclein (E46K) forms

Table 2

Results of the Scales for Outcomes in Parkinson's disease-autonomic (SCOPA-AUT), MIBG scintigraphy, 24 h ambulatory blood pressure (BP) monitoring and non-invasive tests to assess autonomic nervous system function in symptomatic and asymptomatic patients/subjects with the E46K mutation, and Parkinson disease (PD) patients without the mutation.

	Patient IV/18	Patient IV/20	Patient IV/21	Patient V/9	Asymptomatic IV/13	Asymptomatic V/10	PD patients with no mutations (n = 11) mean ± SD
<i>SCOPA autonomic scores</i>							
Overall	12	19	7	2	5	0	8.5 ± 4.6
Digestive	3	4	0	1	1	0	2.7 ± 1.9
Urinary	7	5	0	0	1	0	2.3 ± 2.1
Hemodynamics	0	2	1	0	1	0	0.6 ± 0.8
Pupil	0	3	2	0	2	0	0.4 ± 0.7
Thermoregulation	2	5	3	1	0	0	1.8 ± 1.9
Sexual	0	0	1	0	0	0	0.7 ± 1.5
<i>Plasma norepinephrine (pg/ml)</i>							
Supine	346	344	557	202	132	191	404 ± 276
Standing	471	465	768	294	297	440	555 ± 307
<i>Plasma vasopressin (pg/ml)</i>							
Supine	18.4	7.4	4.4	1.2	1.2	–	5.7 ± 5.1
Standing	23.1	8.5	8.7	1.5	1.3	–	6.5 ± 4.7
<i>MIBG scintigraphy</i>							
Myocardium:mediastinum ratio at – 4 h	1.17	1.24	1.30	1.73	0.99	1.90	1.40 ± 0.29 *
<i>Hemodynamic responses to TILT – SBP (mmHg)/DBP (mmHg), HR (bpm)</i>							
Supine	150/100 (69)	120/70 (70)	110/80 (70)	112/72 (76)	130/80 (82)	121/66 (48)	127/74 (74)
1 min	130/100 (90)	115/70 (99)	80/60 (100)	120/83 (90)	140/80 (84)	133/78 (61)	126/79 (80)
5 min	120/100 (96)	110/80 (88)	90/60 (95)	70/52 (61)	110/80 (75)	125/69 (59)	124/78 (78)
10 min	130/105 (96)	105/80 (90)	95/60 (100)	Syncope	110/80 (85)	125/73 (71)	125/78 (82)
15 min	130/100 (95)	105/80 (90)	100/60 (130)		110/80 (79)	129/78 (64)	123/79 (83)
20 min	120/95 (94)	105/80 (90)	90/60 (100)		140/80 (80)	125/73 (65)	123/78 (83)
<i>Sympathetic skin response</i>							
Response	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	ND
<i>24-hour ambulatory blood pressure</i>							
Profile	Riser pattern	Non-dipper	Dipper	Dipper	Dipper	Non-dipper	ND
<i>Autonomic function tests</i>							
E:I ratio paced breathing	1.030	1.27	1.55	1.43	1.25	1.22	1.11(0.12)
Valsalva ratio	1.13	1.13	1.08	1.34	1.78	1.70	1.54 (0.37)
BP phase II late (mmHg)	–36	1	2.0	2	–10	26	–5.4 (25.13)
BP phase IV (mmHg)	21	24	35	–2	25	44	27.3 (19.3)
BP changes during Handgrip	3	14	10	18	12	0	13.4 (33.7)

Magnitude of BP changes was determined for late phase II and phase IV of the Valsalva maneuver. Values were calculated by subtracting the baseline systolic blood pressure from the systolic blood pressure during phase II or phase IV. BP changes during the handgrip test are shown as percent increment of diastolic BP at 3 min.

Normal values in our laboratory: Norepinephrine 300–650 pg/ml; Vasopressin 0–7.6 pg/ml. MIBG scintigraphy, myocardium/mediastinum ratio at 4 h: the cutoff is 1.75. Twenty-four ambulatory blood pressure studies: normal dipper pattern is 10% decrease in blood pressure during the night. SCOPA-AUT: control: 8.8 ± 5.4. Valsalva ratio and HRV during paced breathing, E/I ratio: normal range, 1.2–1.8 (Age-dependent). BP changes during handgrip test: 10% increment of diastolic BP at 3 min.

Statistical analysis: U-Mann Whitney non-parametric test was used to compare means. *p = 0.05.

insoluble fibrils more rapidly than the wild type protein [5]. Electron microscopy studies have shown the mutant alpha-synuclein fibrils have an ultrastructure similar to that of amyloid and increase the formation of amyloid fibrils [10]. The clinical phenotype of the affected patients is characterized by rapidly progressive PD with early and severe cognitive impairment and sleep disturbances that may precede the motor manifestations [3,4].

Recently, much importance has been placed on the non-motor symptoms of non-familial PD, since many of these symptoms – including dysautonomic disorders [2,7] and sleep disturbances [4,11] – may precede the first motor manifestations of the disease by several years. In addition to dysautonomic disorders and sleep disturbances, our patients manifested olfactory deficits which in some cases were severe.

The earliest findings in autonomic function testing is a loss of heart rate variability with deep breathing [12] and an alteration of the physiological patterns in 24-h blood pressure monitoring, with a tendency toward nocturnal elevation as the disease progresses [13]. Noradrenalin (NA) levels, as well as the reflex sympathetic response, were normal. This is in contrast to the myocardial sympathetic innervation ratios, which were found to be pathological from very early stages as evidenced by cardiac MIBG scintigraphy studies (7). This finding may be due to the fact that blood NA

levels are affected not only by sympathetic denervation but also by the plasma clearance of NA [14]. Even though orthostatic hypotension on TTT was a frequent finding this neither correlates with clinical symptoms during TTT nor cardiovascular symptoms on SCOPA-AUT.

To date, few series have systematically investigated autonomic nervous system involvement in carriers of SNCA gene mutations. Singleton et al. [15] found that patients with triplication of the gene develop cardiac denervation with normal blood catecholamine values. However, in contrast to our series, two carriers without PD motor symptoms had normal cardiac fluorodopamine-PET findings. Orimo et al. reproduced these findings in patients with duplication of the SNCA gene [16], in contrast to other patients with genetic parkinsonisms without Lewy body accumulation, such as mutations in the PARK 2 gene [17]. In relation to the first reported point mutation (A53T) of the SNCA gene, dysautonomic symptoms were described in carriers [18], though no specific study of the functional integrity of the autonomic nervous system has been published.

Investigation of the autonomic nervous system in patients with hereditary parkinsonism may offer further information on the pathological changes that may develop in this disease as it gives us the opportunity to study asymptomatic carriers. As shown here, the sympathetic denervation appears to be organ-specific, selectively

affecting the heart, given that plasma norepinephrine, blood pressure and SSR tests were normal. The E46K mutation causes major functional autonomic defects, as supported by the experimental findings, and may be one of the best examples of those currently available to study synucleinopathies in humans. The follow-up of asymptomatic carriers will help determine the precise sequence of synuclein-related neurodegeneration, this being an important step in the development of neuroprotective strategies.

Study funding

This study has been financed by the Health Department of the Basque Government (dossier 2009111093), the Spanish *Fondo de Investigación Sanitaria* (Health Research Fund, FIS, P509/01916), and the Department of Industry of the Basque Government (SAIOTEK, dossier: S-PC09BF02).

References

- [1] Minguéz-Castellanos A, Chamorro CE, Escamilla-Sevilla F, Ortega-Moreno A, Rebollo AC, Gomez-Rio M, et al. Do alpha-synuclein aggregates in autonomic plexuses predate Lewy body disorders?: a cohort study. *Neurology* 2007 Jun 5;68:2012–8.
- [2] Kaufmann H, Nahm K, Purohit D, Wolfe D. Autonomic failure as the initial presentation of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2004 Sep 28;63:1093–5.
- [3] Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004 Feb;55:164–73.
- [4] Zarranz JJ, Fernandez-Bedoya A, Lambarri I, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Zamacona J, et al. Abnormal sleep architecture is an early feature in the E46K familial synucleinopathy. *Mov Disord* 2005 Oct;20:1310–5.
- [5] Pandey N, Schmidt RE, Galvin JE. The alpha-synuclein mutation E46K promotes aggregation in cultured cells. *Exp Neurol* 2006 Feb;197:515–20.
- [6] Fredenburg RA, Rospigliosi C, Meray RK, Kessler JC, Lashuel HA, Eliezer D, et al. The impact of the E46K mutation on the properties of alpha-synuclein in its monomeric and oligomeric states. *Biochemistry* 2007 Jun;46:7107–18.
- [7] Tijero B, Gomez-Esteban JC, Llorens V, Lezcano E, Gonzalez-Fernandez MC, de Pancorbo MM, et al. Cardiac sympathetic denervation precedes nigrostriatal loss in the E46K mutation of the alpha-synuclein gene (SNCA). *Clin Auton Res* 2010 Aug;20:267–9.
- [8] Fahn S, Elton RL, Committee. MotUD. The unified Parkinson's disease rating scale. In: Fahn S, Marsden CD, Calne D, Goldstein M, editors. *Recent developments in Parkinson's disease*, vol. 2. Florham Park, NJ: Macmillan Health Care Information; 1987. p. 153–63. 293–304.
- [9] Visser M, Marinus J, Stiggelbout AM, Van Hilten JJ. Assessment of autonomic dysfunction in Parkinson's disease: the SCOPA-AUT. *Mov Disord* 2004 Nov;19:1306–12.
- [10] Greenbaum EA, Graves CL, Mishizen-Eberz AJ, Lupoli MA, Lynch DR, Englander SW, et al. The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation. *J Biol Chem* 2005 Mar 4;280:7800–7.
- [11] Schenck CH, Bundlie SR, Mahowald MW. Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Neurology* 1996 Feb;46:388–93.
- [12] Shields Jr RW. Heart rate variability with deep breathing as a clinical test of cardiovagal function. *Cleve Clin J Med* 2009 Apr;76(Suppl. 2):S37–40.
- [13] Schmidt C, Berg D, Prieur S, Junghanns S, Schweitzer K, Globas C, et al. Loss of nocturnal blood pressure fall in various extrapyramidal syndromes. *Mov Disord* 2009 Oct 30;24:2136–42.
- [14] Meredith IT, Eisenhofer G, Lambert GW, Jennings GL, Thompson J, Esler MD. Plasma norepinephrine responses to head-up tilt are misleading in autonomic failure. *Hypertension* 1992 Jun;19:628–33.
- [15] Singleton A, Gwinn-Hardy K, Sharabi Y, Li ST, Holmes C, Dendi R, et al. Association between cardiac denervation and parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication. *Brain* 2004 Apr;127:768–72.
- [16] Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, Mori F, Ikeuchi T, Onodera O, et al. Cardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease linked to SNCA duplication. *Acta Neuropathol* 2008 Nov;116:575–7.
- [17] Orimo S, Amino T, Yokochi M, Kojo T, Uchihara T, Takahashi A, et al. Preserved cardiac sympathetic nerve accounts for normal cardiac uptake of MIBG in PARK2. *Mov Disord* 2005 Oct;20:1350–3.
- [18] Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997 Jun 27;276:2045–7.

Trabajo 3

Autonomic dysfunction in parkinsonian LRRK2 mutation carriers.

Las mutaciones en el gen PARK8 son la causa más frecuente de EP familiar autosómico dominante. El genotipo G2019S es el más frecuente a nivel mundial, y la mutación R1441G la más frecuente en el País Vasco. Las descripciones clínicas de estos pacientes se corresponden con un fenotipo clásico, aunque con algunas peculiaridades como son: mayor frecuencia de temblor¹⁰⁰, una respuesta variable a la estimulación cerebral profunda (ECP)¹⁰¹ y menor deterioro cognitivo¹⁰². En cuanto a los síntomas no motores, se describe menor frecuencia de hiposmia. A pesar de que, el primer caso descrito portador de mutación LRRK2 mostraba un patrón de denervación simpática cardíaca¹⁰³ como grupo estos pacientes presentan menor afectación en el patrón de captación miocárdica utilizando el radiotrazador MIBG. Los estudios neuropatológicos cerebrales de pacientes con mutaciones en el gen LRRK2 revelan hallazgos muy variables¹⁰⁴.

El objetivo de este estudio es analizar la afectación clínica y funcional del SNV en pacientes con las dos mutaciones más frecuentes en el gen LRRK2 y comparar los hallazgos con los obtenidos en enfermedad de Parkinson idiopática. El objetivo secundario es comparar los hallazgos de cada mutación entre sí.

Métodos. Para conseguir los objetivos anteriores se estudian 12 pacientes con mutaciones de LRRK2 (6 G2019S y 6 R1441G) que se comparan con una población de 13 pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática, emparejados por edad, género y situación motora respecto a los portadores.

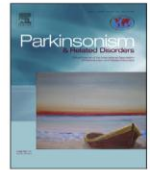
Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que, a pesar de que no existen diferencias en cuando al grado de afectación clínica del SNV medido por la escala clínica SCOPA-aut, los pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática presentan un mayor grado de denervación simpática cardíaca y una mayor afectación de la fase IV de la MV. Comparando las dos mutaciones entre sí, los pacientes con R1441G presentan una tendencia a presentar menor afectación de la captación gammagráfica miocárdica de MIGB.

Nuestra impresión es que el fenotipo de los pacientes con G2019S es similar a los pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática, mientras que los pacientes con R1441G presentan un fenotipo diferente, con menor afectación del SNV, lo que podría estar en relación con las diferencias encontradas en los escasos estudios neuropatológicos.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Parkinsonism and Related Disorders

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parkreldis

Short communication

Autonomic dysfunction in parkinsonian LRRK2 mutation carriers

Beatriz Tijero^{a,*,1}, Juan Carlos Gómez Esteban^{a,*,1}, Johanne Somme^b, Verónica Llorens^c, Elena Lezcano^a, Ana Martínez^d, Trinidad Rodríguez^c, Koldo Berganzo^a, Juan José Zarranz^a^a Movement Disorders and Autonomic Unit, Neurology Service, Cruces University Hospital, Basque Health Service (Osakidetza), Department of Neurosciences, University of the Basque Country, Spain^b Department of Neurology, Alava University Hospital, Vitoria-Gasteiz, Spain^c Nuclear Medicine Service Cruces University Hospital, Baracaldo, Spain^d Service of Neurophysiology, Cruces University Hospital, Basque Health Service, Osakidetza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 17 February 2013
 Received in revised form
 9 May 2013
 Accepted 11 May 2013

Keywords:
 Parkinson's disease
 Autonomic disorders
 LRRK2 gene

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to compare autonomic function in PD symptomatic carriers of the LRRK2 mutations and idiopathic Parkinson's disease (iPD) patients.

Material and methods: We studied 25 PD patients: 12 with the LRRK2 mutation (6 G2019S and 6 R1441G), and 13 with iPD. All patients underwent blood pressure and heart rate monitoring during head up tilt, Valsalva maneuver and deep breathing, along with recording of sympathetic skin response (SSR) and cardiac MIBG scintigraphy.

Results: Three of the patients with iPD and one of the LRRK2 carriers had orthostatic hypotension. Arterial pressure "overshoot" during phase IV of Valsalva maneuver was less pronounced in patients with iPD. During passive tilt, LRRK2 carriers had higher increase of blood pressure than iPD patients. MIBG late myocardial/mediastinal uptake ratios were higher in LRRK2 mutation carriers (1.51 ± 0.28 vs 1.32 ± 0.25 ; $p < 0.05$).

Discussion: Carriers of the LRRK2 mutation had less autonomic impairment than those with iPD as shown by higher cardiac MIBG uptake and a tendency to less impairment of autonomic non-invasive tests. It is important to carry out larger studies comparing the clinical, functional and pathological characteristics of these patients.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The PARK8 gene was mapped ten years ago [1] and two years later two different groups described the first mutations of this gene [2,3]. Currently, mutations in this gene are the most common cause of dominant autosomal inherited Parkinson's disease (PD). Worldwide, the most prevalent LRRK2 mutation is G2019S, although in the Basque Country R1441G is more common [4]. Parkinson's disease related to LRRK2 is characterized by typical clinical features; however some differences have been noted, in particular in carriers of the R1441G mutation. Among these differences are a lower prevalence of hyposmia [5], higher rate of tremor [6], and a variable response to deep brain stimulation

[7] when compared with iPD. In neuropathologic studies, pleomorphic findings have been reported in patients with LRRK2 mutations [3].

No previous studies have focused on the overall involvement of the autonomic nervous system in carriers of LRRK2 gene mutations. In the first case report of a LRRK2 mutation carrier, authors described a phenotype similar to that seen in sporadic PD, with cardiac sympathetic denervation as demonstrated by a 6-[18F] fluorodopa positron emission tomography and alterations in non-invasive autonomic function tests [8]. On the other hand, lower levels of involvement of the cardiac sympathetic terminals have recently been found in carriers of LRRK2 mutations using functional imaging (cardiac 123I-metaiodobenzylguanidine [MIBG] scintigraphy) [5].

The primary objective of this study was to assess the involvement of the autonomic nervous system in carriers of the two most common mutations in the LRRK2 gene and compare it with iPD patients. A secondary objective was to find differences between the two mutations (G2019S and R1441G).

* Corresponding authors. Servicio de Neurología, Hospital de Cruces, Plaza de Cruces s/n, CP 48903 Baracaldo, Vizcaya, Spain.

E-mail addresses: beatriz_tijero@hotmail.com (B. Tijero), juancarlos.gomezesteban@gmail.com (J.C. Gómez Esteban).

¹ These authors contributed equally to this work.

2. Patients and methods

We studied 25 patients with a diagnosis of iPD according to the UK Parkinson's disease Society Brain Bank clinical diagnostic criteria; 12 with the LRRK2 mutation (6 G2019S and 6 R1441G) (age: 56.41 ± 10.17 years, with a disease duration of 8.77 ± 4.69 years; 8 men), and 13 with iPD without genetic mutations (age: 59.22 ± 8.95 years, with a disease duration of 6.47 ± 5.07 years; 8 men). All patients with LRRK2 mutation were consecutively selected, and none of the 12 patients were related.

All procedures were carried out with the adequate understanding and written consent of the subjects involved and with approval from the local ethics committee.

2.1. General study

A database of the study patients was constructed to document the date of the signs and symptoms at onset, drug treatment, Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS I–IV) scores and the 12-item Brief Identification Smell Test (BSIT) (Sensonic®).

2.2. Autonomic nervous system investigations

Assessments were made early in the morning, after 12 h fasting and overnight bed-rest, with no ingestion of medication or food, capable of modifying blood catecholamine levels for the previous 24 h. To analyze noradrenaline (NA), adrenaline and vasopressin levels, blood was collected (30 ml from arm venipuncture) after the patient had rested for at least 40 min in the supine position, and again after standing for 3 min. NA levels were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection. Plasma vasopressin was measured by radioimmunoassay (RIA).

We then analyzed heart rate and blood pressure variability in relation to different physical maneuvers using the Taskforce continuous monitoring device (CNS®): 20-minute tilt table test (TTT) at a 60° incline, Valsalva maneuver (VM) (40 mmHg for at least 15 s), isometric contraction (handgrip isometer), and deep breathing (6 inspiration (I)/expiration (E) cycles). Finally, we administered the SCOPA-AUT, a brief questionnaire concerning autonomic symptoms classified into 6 dimensions.

2.3. Laboratory studies

Myocardial MIBG scintigraphy was performed with a gamma camera, and the early (15 min) and late (4 h) heart-to-mediastinum uptake ratios were evaluated. Patients also underwent ^{99m}Tc-MIBI (6-methoxy isobutyl isonitrile) SPECT to rule out myocardial perfusion defects. The sympathetic skin response (SSR) was assessed using a Keypoint device (Medtronic®).

2.4. Statistical analysis

The mean and standard deviation were calculated for the quantitative variables, while proportions were calculated for the qualitative variables. The Mann–Whitney *U* non-parametric test was used to compare mean ranks. All the analysis was carried out with the statistical software package SPSS 13 for Windows (SPSS, Chicago, IL).

3. Results

In our study, we did not find a higher prevalence of autonomic symptoms among patients with LRRK2 mutations, using the SCOPA-AUT questionnaire (LRRK2+: 11.50 ± 10.19 ; iPD–: 14.66 ± 7.23 ; ns). Neither did we observe any differences in any of the subdomains of SCOPA-AUT scale.

There were, however, statistically significant differences in the non-invasive monitoring of the autonomic nervous system (Table 2).

Orthostatic hypotension was detected in three patients with iPD, compared to only one of the LRRK2 carriers. Investigating systolic blood pressure variability in the tilt table test, we observed significant differences ($p < 0.05$) with a greater increase in LRRK2+ patients (-28.33 ± 26.24) than in iPD (-3.69 ± 25.38). In the VM, we found no differences between the mutation carrier groups in phases II and III, but there was a smaller overshoot (phase IV) in systolic blood pressure in the iPD group (LRRK2+: 39.00 ± 31.65 , iPD: 25.92 ± 15.12 ; $p < 0.05$) (Table 2). The olfactory system was less affected in the LRRK2 mutation carriers (BSIT: LRRK2+: 8.36 ± 2.54 ; iPD: 6.00 ± 2.58 ; $p < 0.05$) (Table 1). SSR was normal in all subjects (Table 2).

Focusing on the heart, we observed that LRRK2+ patients had less severe sympathetic denervation, as demonstrated by MIBG scintigraphy of the heart (late H/M uptake ratios, LRRK2+: 1.51 ± 0.28 ; iPD: 1.32 ± 0.25 ; $p < 0.05$). MIBG uptake was significantly related to blood pressure overshoot in phase IV of the VM in both patient groups. On the other hand, we found no significant differences between the two groups when comparing the levels of noradrenaline and vasopressin responses to head up tilt (Table 2).

When comparing the different mutations the only significant differences found were in the non-invasive monitoring of the VM. Patients with the R1441G mutation had a larger overshoot than those with the G2019S mutation (R1441G: 52.16 ± 37.29 , G2019S: 25.83 ± 19.93 ; $p < 0.05$). Furthermore in the late phase II of the maneuver, we observed a larger decrease among patients with the G2019S mutation (R1441G: 24.16 ± 30.39 , G2019S: -10.83 ± 46.67 ; $p < 0.05$).

4. Discussion

The data obtained indicate that autonomic nervous system impairment may be less prevalent when Parkinson's disease is associated with mutations in LRRK2. Specifically, the late H/M ratio of MIBG was less affected in the mutation carriers than the patients with iPD [5]. We also found that the olfactory system was less affected in the LRRK2 mutation carriers. These findings are notably different from observations in patients with mutations in the alpha-synuclein gene, in which the degree of sympathetic denervation is higher than expected [10,11]. The potential variability in pleomorphic histological features in patients with LRRK2 mutations [3] could explain the clinical findings to some extent. Neuropathological studies in people with the G2019S mutation found abundant Lewy bodies and deposits of alpha-synuclein, with no significant differences compared to idiopathic PD patients. The carriers of mutations at the R1441 residue, however, are associated with tau-related disorders, with similar clinical phenotypes to progressive supranuclear palsy (PSP) [3]. The only neuropathological findings of a patient with the R1441G published to date were characterized by mild neuronal loss in the substantia nigra pars compacta without alpha-synuclein, tau, LRRK2, or ubiquitin cytoplasmic inclusions [12].

Table 1

General characteristics of patients with LRRK2 mutations and patients with idiopathic Parkinson disease.

	LRRK2	R1441G	G2019S	iPD	<i>p</i> Value
Age	56.41 ± 10.17	53.21 ± 5.07	56.15 ± 14.14	59.22 ± 8.95	NS
Years since diagnosis	8.77 ± 4.69	8.80 ± 4.46	7.03 ± 3.66	6.47 ± 5.07	NS
UPDRS I	1.83 ± 1.03	1.67 ± 1.21	2.00 ± 0.89	2.08 ± 1.76	NS
UPDRS II	12.92 ± 6.56	13.33 ± 3.72	12.50 ± 8.80	9.58 ± 2.74	NS
UPDRS III	29.45 ± 13.01	28.17 ± 8.56	31.00 ± 18.07	26.54 ± 7.48	NS
UPDRS IV	2.33 ± 1.67	4.67 ± 2.66	3.17 ± 4.75	3.92 ± 3.75	NS
Smell test (BSIT)	8.36 ± 2.54	8.83 ± 3.06	7.80 ± 1.94	6.00 ± 2.58	0.04

UPDRS – Unified Parkinson's Disease Rating Scale (I – non-motor experiences of daily living, II – motor experiences of daily living, III – motor examination, IV – motor complications), BSIT – Brief Smell Identification Test, NS – non-significant.

Table 2

Results of SCOPA-AUT, MIBG scintigraphy, noradrenergic tests and non-invasive tests of autonomic nervous system function in PD patients with and without LRRK2 mutations.

	LRRK2 (N = 12)	R1441G (N = 6)	G2019S (N = 6)	PD patients with no mutations (N = 13)
SCOPA-AUT	11.50 (10.19)	14.15 (7.23)	8.33 (10.74)	14.66 (7.23)
• Digestive	4.50 (3.62)	4.16 (3.12)	5.00 (4.76)	3.63 (3.44)
• Urinary	5.10 (4.20)	5.66 (4.59)	4.25 (4.03)	4.18 (2.83)
• Hemodynamics	0.70 (0.95)	0.50 (0.84)	1.00 (1.15)	0.45 (0.69)
• Pupil	1.00 (1.15)	1.00 (1.26)	1.00 (1.16)	0.63 (0.81)
• Thermoregulation	2.10 (2.42)	2.66 (2.42)	1.25	1.81 (1.88)
• Sexual	0.41 (1.26)	0.66 (1.63)	0.00 (0.00)	1.81 (1.94)
Noradrenaline (pg/ml)				
Supine	286 (89.83)	304.40 (76.05)	263.00 (111.96)	305.66 (269.83)
Standing	420 (97.38)	387.40 (57.32)	461.00(129.98)	445.00 (311.03)
Vasopressin (pg/ml)				
Supine	7.93 (8.80)	–	–	3.51 (4.74)
Standing	17.87 (30.65)	–	–	4.62 (5.50)
MIBG (heart/mediastinum ratio – 4 h)	1.51(0.28)*	1.54 (0.26)	1.48 (0.32)	1.32 (0.25)*
Tilt table: blood pressure (heart rate)				
□ Δ Systolic 3 m	–28.33 (26.24)*	–32.16 (28.76)	–24.5 (25.54)	–3.69 (25.38)*
□ Δ Diastolic 3 m	–24.83 (20.07)	–28.16 (17.92)	–21.5 (23.20)	–11.92 (17.36)
Orthostatic hypotension (n)	1	1	0	3
Non-invasive autonomic function tests				
□ Heart rate variability during paced breathing (expiration/inspiration ratio)	1.15 (0.15)	1.13 (0.14)	1.16 (0.17)	1.06 (0.07)
□ Valsalva ratio	1.33 (0.40)	1.39 (0.44)	1.25 (0.32)	1.40 (0.32)
□ BP Valsalva: phase II (mmHg)	–13.08 (14.35)	–18.00 (12.11)	–8.16 (15.76)	–19.46 (21.95)
□ BP Valsalva: phase II late (mmHg)	6.67 (41.76)	24.16 (30.39)	–10.83 (46.67)	6.61 (41.93)
□ BP Valsalva: phase IV (mmHg)	39.00 (31.65)*	52.16 (37.29)*	25.83 (19.93)	25.92 (15.12)*
□ BP changes during Handgrip test	4.50 (15.47)	3.33 (19.44)	5.67 (12.07)	1.69 (11.55)

Magnitude of blood pressure (BP) changes was determined for late phase II and phase IV of the Valsalva maneuver. Values were calculated by subtracting the baseline systolic blood pressure from the systolic blood pressure during phase II or phase IV. BP changes during the handgrip test are shown as percent increment of diastolic BP at 3 min. Normal values: Norepinephrine 300–650 pg/ml; Vasopressin 0–7.6 pg/ml. MIBG scintigraphy, myocardium/mediastinum ratio at 4 h: the cutoff is 1.75. SCOPA AUT: control: 8.8 ± 5.4 . Valsalva ratio and HRV during paced breathing, E/I ratio: normal range, 1.2–1.8 (age-dependent). BP changes during handgrip test: 10% increment of diastolic BP at 3 min. * $p < 0.05$.

PD – Parkinson's disease, SCOPA-AUT – scales for outcomes in Parkinson's disease-autonomic, MIBG – metaiodobenzylguanidine.

In a study on genetic parkinsonism disorders, only one of six LRRK2+ patients had autonomic dysfunction [9], although none of the controls showed alterations in the non-invasive tests. In our study, no differences were found between LRRK2 mutation carriers and controls in any of the other variables studied (NA, vasopressin, handgrip maneuver, or R–R interval changes during deep breathing, among others) (Table 2). The controls' responses were more abnormal in phase IV of the VM. This type of abnormal response has been associated with cardiac adrenergic function being affected rather than the systemic vascular resistance.

On the other hand, though we found no great differences between the two genotypes (R1441G and G2019S), the sympathetic neural response to the VM was more affected in G2019S mutation carriers and these patients also showed a tendency to having a greater degree of myocardial denervation.

The main weakness of our study was the small size of the sample (12 patients with LRRK2 mutations and 13 controls with iPD). However we believe that the homogeneity of the sample in terms of age, years since diagnosis and motor status (Table 1), strengthens the validity of the study.

The main finding is that patients with iPD showed increased sympathetic nervous system involvement when compared with patients with mutations in the LRRK2 gene; more frequent orthostatic hypotension, increased myocardial sympathetic denervation and abnormal non-invasive tests showing sympathetic dysfunction (phase IV of the Valsalva maneuver (VM)). MIBG uptake was significantly related to the blood pressure overshoot in phase IV of the VM in both: patients with iPD and LRRK2 + PD. Our impression is that the findings of patients with the G2019S genotype are similar to those of patients with idiopathic PD; this would be consistent with histological findings. This study indicates a possible difference in autonomic function between different types of LRRK2

mutations, however, these results must be accepted with reservations given the small sample. We believe that autonomic functions in R1441G and G2019S carriers should be further investigated in larger numbers of patients through collaboration with other centers.

Study funding

This study was funded by the Health Department of the Basque Government (dossier 2009111093), the Spanish Health Research Fund (*Fondo de Investigación Sanitaria*, FIS, PS09/01916), and the Department of Industry of the Basque Government (SAIOTEK, ref: S-PC09BF02).

References

- [1] Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2–q13.1. *Ann Neurol* 2002;51:296–301.
- [2] Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004;44:595–600.
- [3] Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004;44:601–7.
- [4] Zarranz JJ, Gomez-Esteban JC. LRRK2 mutations in Basque patients with Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2008;7:866–7.
- [5] Ruiz-Martinez J, Gorostidi A, Goyenechea E, Alzualde A, Poza JJ, Rodriguez F, et al. Olfactory deficits and cardiac 123I-MIBG in Parkinson's disease related to the LRRK2 R1441G and G2019S mutations. *Mov Disord* 2011;26:2026–31.
- [6] Marras C, Schule B, Munhoz RP, Rogaeva E, Langston JW, Kasten M, et al. Phenotype in parkinsonian and nonparkinsonian LRRK2 G2019S mutation carriers. *Neurology* 77:325–33.
- [7] Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Zarranz JJ, Gonzalez C, Bilbao G, Lambarrri I, et al. Outcome of bilateral deep brain subthalamic stimulation in patients carrying the R1441G mutation in the LRRK2 dardarin gene. *Neurosurgery* 2008;62: 857–62.

- [8] Goldstein DS, Imrich R, Peckham E, Holmes C, Lopez G, Crews C, et al. Neurocirculatory and nigrostriatal abnormalities in Parkinson disease from LRRK2 mutation. *Neurology* 2007;69:1580–4.
- [9] Quattrone A, Bagnato A, Annesi G, Novellino F, Morgante L, Savettieri G, et al. Myocardial 123metaiodobenzylguanidine uptake in genetic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008;23:21–7.
- [10] Tijero B, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Fernandez-Gonzalez C, Somme J, Llorens V, et al. Cardiac sympathetic denervation in symptomatic and asymptomatic carriers of the E46K mutation in the alpha synuclein gene. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;19:95–100.
- [11] Singleton A, Gwinn-Hardy K, Sharabi Y, Li ST, Holmes C, Dendi R, et al. Association between cardiac denervation and parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication. *Brain* 2004;127:768–72.
- [12] Marti-Masso JF, Ruiz-Martinez J, Bolano MJ, Ruiz I, Gorostidi A, Moreno F, et al. Neuropathology of Parkinson's disease with the R1441G mutation in LRRK2. *Mov Disord* 2009;24:1998–2001.

Trabajo 4

Autonomic involvement in Parkinsonian carriers of PARK2 mutations

El objetivo de este estudio es analizar al patrón de afectación de SNV en pacientes portadores de mutaciones en el gen PARK2.

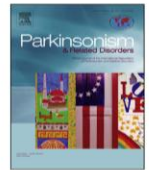
Se utiliza el protocolo descrito previamente en la metodología, además se describe el estudio histopatológico del SNC y del miocardio procedente de la autopsia de una paciente portadora de mutación en este gen.

La principal conclusión que se obtiene de este estudio es que en pacientes portadores de mutaciones en PARK2, a diferencia los portadores de mutaciones en el gen SNCA, no presentan afectación clínica, funcional o histológica del SNV. Estos hallazgos contrastan con la presencia de polineuropatías descritas en algunos portadores de mutaciones en este gen y enfatiza el hecho de que la AS está ligada al daño axonal con afectación de las fibras C y A delta amielínicas con severo trastorno vegetativo, mientras que la parkina se localiza en el axoplasma de células de Schwann y produciría una polineuropatía con componente desmielinizante y poco daño axonal, lo que justificaría la normalidad del estudio del SNV.



Contents lists available at ScienceDirect

Parkinsonism and Related Disorders

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parkreldisAutonomic involvement in Parkinsonian carriers of *PARK2* gene mutations

Beatriz Tijero ^{a,b}, Iñigo Gabilondo ^{a,b}, Elena Lezcano ^{a,b,c}, Nuria Teran-Villagrà ^d, Verónica Llorens ^e, Javier Ruiz-Martinez ^{f,g}, Jose Felix Marti-Masso ^{c,f,g}, M. Carmona ^h, María Rosario Luquin ^h, Koldo Berganzo ^{a,b}, Ivan Fernandez ⁱ, Manuel Fernandez ^{a,b,c}, Juan José Zarranz ^{a,b,c}, Juan Carlos Gómez-Esteban ^{a,b,c,*}

^a Neurodegenerative Unit, Biocruces Research Institute, Bilbao, Spain

^b Neurology Service, Cruces University Hospital, Baracaldo, Biscay, Spain

^c Department of Neurosciences, School of Medicine and Dentistry University of the Basque Country, Leioa, Biscay, Spain

^d Pathology Service, University Hospital Marques de Valdecilla, Santander, Cantabria, Spain

^e Nuclear Medicine Service Cruces University Hospital, Baracaldo, Spain

^f Neuroscience Unit, Biodonostia Research Institute, San Sebastian, Spain

^g Department of Neurology, University Hospital Donostia, San Sebastian, Spain

^h Laboratory of Regenerative Therapy, Department of Neurology and Neuroscience Division, Centre for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra, Pamplona, Spain

ⁱ Pathology Service, Hospital Universitario de Araba-Txagorritxu, Vitoria, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2014

Received in revised form

3 April 2015

Accepted 14 April 2015

Keywords:

Parkinson's disease

Autonomic function

PARK2 mutation

Autonomic tests

ABSTRACT

Background and objectives: The objective of this study was to assess the presence of autonomic nervous system dysfunction in *PARK2* mutation carriers.

Patients and methods: We performed a cross-sectional analysis of 8 *PARK2* carriers (age: 60.1 ± 12.8 years) and 13 individuals with idiopathic PD (iPD) (age: 59.2 ± 8.9 years). Autonomic dysfunction was measured using the SCOPA-AUT questionnaire, non-invasive autonomic tests and responses of noradrenaline and vasopressin levels to postural changes. Myocardial sympathetic denervation was assessed with metaiodobenzylguanidine (MIBG) scintigraphy. This damage was further investigated in postmortem epicardial tissue of one *PARK2* carrier and three control cases (two PD patients and one subject without PD).

Results: The prevalence of autonomic symptoms and orthostatic hypotension (OH) was lower in *PARK2* mutation carriers than in iPD patients (SCOPA OUT: 3.4 ± 4.8 vs. 14.7 ± 7.2, $p < 0.001$; OH: present in three iPD patients but none of the *PARK2* mutation carriers). Second, sympathetic myocardial denervation was less severe in *PARK2* mutation carriers compared to controls, both in MIBG scintigraphy (late H/M uptake ratio: 1.52 ± 0.35 vs. 1.32 ± 0.25 $p < 0.05$) and in postmortem tissue study. Interestingly, axonal alpha-synuclein deposits were absent in epicardial tissue of the *PARK2* mutation carrier while they were present in the two PD patients.

Interpretation: Our study supports the view that autonomic nervous system dysfunction and myocardial sympathetic denervation are less pronounced in *PARK2* mutation carriers than in individuals with iPD, suggesting that the involvement of small peripheral sympathetic nerve fibers is a minor pathological hallmark in *PARK2* carriers.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mutations in the *PARK2* gene explain up to half of the cases with recessively inherited Parkinson's disease (PD), and 15% of sporadic PD with onset before 45 years of age [1]. Compared to idiopathic PD (iPD), patients with *PARK2* gene mutations have significantly earlier

* Corresponding author. Servicio de Neurología, Hospital de Cruces, Plaza de Cruces s/n. Baracaldo, Vizcaya, CP 48903, Spain.

E-mail address: juancarlos.gomezesteban@osakidetza.net (J.C. Gómez-Esteban).

and more symmetrical onset, more frequent dystonia, slower progression, and a tendency toward a greater response to low doses of levodopa with early fluctuations and dyskinesia [2]. Heterozygous *PARK2* mutations are relatively frequent and it has been speculated that they are associated with PD [3]. The majority of PD patients with mutations in the *PARK2* gene do not exhibit the classical neuropathological markers of PD; however, in a few cases, pathological analysis of *PARK2* mutation carriers has revealed Lewy bodies in the substantia nigra and locus coeruleus, and alpha-synuclein immunopositive inclusion bodies in the brain [4–7].

Autonomic nervous system involvement in *PARK2* mutation is a matter of discussion. In early reports, it was observed that patients with *PARK2* mutations showed some autonomic symptoms resembling those observed in PD [8,9]. However, recent studies have shown that cardiovascular dysautonomia is not associated with the *PARK2* phenotype [10,11]. In addition, a number of case reports in *PARK2*-positive PD patients have noted normal 123I-MIBG scans [12,13,8] and preserved TH-immunoreactive fibers in the epicardium [12]. While these findings support the view that small myelinated and unmyelinated autonomic nerve fibers are preserved in *PARK2* mutation carriers, this hypothesis contrasts with the presence of parkin protein in the axoplasm of bovine myelinated nerve fibers and Schwann cells [14] and with the presence of peripheral neuropathy in *PARK2* mutation carriers [15].

The main objective of this study was to assess the overall level of autonomic nervous system dysfunction and the specific involvement of the neurocirculatory system, including myocardial sympathetic denervation, in 8 *PARK2* mutation carriers compared to 13 iPD patients. We performed a comprehensive assessment of autonomic symptoms, quantified hemodynamic dysfunction by non-invasive tests and plasma neurohormone levels, and carried out myocardial MIBG scintigraphy in all patients. In addition, we assessed epicardial denervation in the postmortem tissue from one *PARK2* mutation carrier, two patients with PD (one with iPD and one symptomatic alpha synuclein mutation carrier) and one subject without PD.

2. Patients and Methods

2.1. Study population

We included 8 *PARK2* gene mutation carriers (60.1 ± 12.8 years; with a disease duration of 27.1 ± 11.4 years; 4 men) and 13 control patients with iPD (age: 59.2 ± 8.9 years, with a disease duration of 6.5 ± 5.1 years; 8 men). Patients classified as idiopathic had no family history of PD. All participants fulfilled the UK Parkinson's disease Society Brain Bank criteria for the clinical diagnosis of PD (except for family history of PD in *PARK2* carriers). They were consecutively recruited in the Movement Disorders and Autonomic Unit at Cruces University Hospital. We excluded patients with diabetes or with myocardial perfusion defects observed in the 99mTc-MIBI SPECT, and any patients who were not able to complete the tests properly due to physical or cognitive disability. We also excluded one patient with one heterozygous *PARK2* mutation and another with a heterozygous compound *PARK2* mutation that developed parkinsonian symptoms when exposed to clobopride, which resolved when the drug was discontinued. All procedures were carried out with the adequate understanding and written consent of the patients involved, and with the approval of the local ethics committee.

2.2. Clinical assessment of PD

At study inclusion, we collected a set of clinical and demographic data including gender, age, disease duration, age at disease onset and scores on the Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS I–IV) and the 12-item Brief Identification Smell Test (BSIT; Sensonic®). We classified the BSIT result as normal or abnormal following the norms for age and gender provided by the manufacturer.

2.3. Molecular genetic analysis

PARK2 mutations were identified on DNA obtained from peripheral lymphocytes. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of the 12 exons was followed by nucleotide sequencing whenever an SSCP band shift was observed. To detect alterations in gene dosage (deletions and duplications), a quantitative RT-PCR assay was performed [10].

2.4. Study of the autonomic nervous system

Assessments were made early in the morning, after 12 h of fasting and overnight bed rest. Participants were not allowed to consume drugs or foods capable of modifying blood catecholamine levels within the previous 24 h. For the analysis of noradrenaline (NA) and vasopressin levels, peripheral blood samples were collected (30 ml from arm venipuncture) after the patient had rested for at least 40 min in the supine position, and again after standing for 3 min. NA levels were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection, while plasma vasopressin was measured by radioimmunoassay (RIA).

We then analyzed heart rate and blood pressure variability during various physical maneuvers using a continuous monitoring device, the Task Force® Monitor (CNSystems, Graz, Austria): a 20-min tilt table test (TTT) at an inclination of 60°; the Valsalva maneuver (VM) (40 mmHg for at least 15 s); isometric contraction (handgrip isometer); and deep breathing (6 inspiration/expiration cycles) (I/E). Finally, we administered the SCOPA-AUT, a brief questionnaire concerning autonomic symptoms classified into 6 dimensions [16].

2.5. Myocardial MIBG scintigraphy

All participants underwent myocardial MIBG scintigraphy with a gamma camera no more than 6 months before study inclusion. We analyzed the early (15 min) and late (4 h) heart-to-mediastinum uptake ratios. Participants also underwent 99mTc-MIBI (6-methoxy isobutyl isonitrile) SPECT to rule out myocardial perfusion defects.

2.6. Postmortem histopathological studies of epicardial and brain tissues

In order to further characterize epicardial sympathetic nerve involvement in *PARK2* carriers, we performed immunohistochemical analysis of postmortem myocardial and epicardial tissue from one *PARK2* mutation carrier. Brain tissue from this patient was also studied to evaluate the presence of Lewy Body pathology. As a reference, we studied post mortem epicardial and brain samples from one subject without PD and from two PD patients: one iPD patient (with no family history of PD) and another PD patient with a specific mutation (E46K) in the alpha synuclein gene (*SNCA*), a condition associated with an aggressively progressing Lewy Body disease, with marked autonomic dysfunction and cardiac denervation. Epicardial samples were sliced into 5- μ m-thick sections, which were then deparaffinized and subjected to routine histological staining (hematoxylin-eosin) and standard immunohistochemical processing with monoclonal antibodies against neurofilaments (NF), tyrosine hydroxylase (TH) (TH16; Sigma, St. Louis, MO, USA) (1:3000), phosphorylated alpha synuclein and alpha synuclein (Zymed®). Regarding brain samples, blocks were taken from representative cortical and subcortical regions in accordance with standardized protocols. The paraffin-embedded sections were stained with routine histological methods and processed for immunocytochemistry with antibodies against glial fibrillary acidic protein (1:5000; Dako, Carpinteria, CA), phosphorylated NF (1:40; Zymed, San Francisco, CA), tau (1:400; Sigma, St. Louis, MO), ubiquitin (Z0458, 1:400; Dako), and alpha synuclein (1:200, without formic acid pretreatment; Zymed).

2.7. Statistical analysis

Descriptive data were expressed using the mean and standard deviation for the quantitative variables, and percentages for the qualitative variables. The Mann-Whitney U non-parametric test was used to compare mean ranks. All the analyses were carried out with the statistical software package SPSS 13 for Windows (SPSS, Chicago, IL).

3. Results

Table 1 shows an individual description of the main characteristics of the 8 *PARK2* mutation carriers in terms of demographics, family history, genetics and duration of PD, as well as a summary of the main outcomes from autonomic nervous system and myocardial SPECT MIBG assessments. Of these patients, three carried homozygous and five compound heterozygous mutations; and, while two had no family history of PD, the remaining six mutations occurred in three sibling sets, one of which was the product of a consanguineous marriage.

There were no statistically significant differences between *PARK2* mutation carriers and iPD patients in terms of age or motor status (UPDRS III scale) at inclusion. Disease onset was before the age of 50 years in all *PARK2* mutation carriers and occurred significantly earlier than in individuals with iPD. Consequently, disease duration was longer in *PARK2* mutation carriers (27.1 ± 13.4 years in *PARK2* mutation carriers vs. 6.5 ± 5.1 years in iPD patients; $p < 0.001$) (Table 2).

Table 1
Individualized description of all patients with mutations in the *PARK2* gene.

	Case#1	Case#2	Case#3	Case#4	Case#5	Case#6	Case#7	Case#8
Age (years)	71	70	61	65	62	44	71	37
Gender	Female	Female	Male	Female	Female	Male	Male	Male
Type of <i>PARK2</i> mutation	202-203delAG del exon 4	202-203delAG del exon 4	c.255delA Homozygosis	c.255delA Homozygosis	del exon 3,4 Del exon4	c.255delA Homozygosis	del exon1 c.154delA	c.255delA C352Y exon 9
Disease duration (years)	45	30	35	33	22	14	28	10
Family History of PD	1 Sister	1 Sister	1 Sister	1 Brother	None	Grandfather	4 Brother/Sister	None
Late H/M MIBG ratio	1.00	1.56	1.54	1.27	1.75	1.82	1.27	2.00
Maneuver with abnormal HR & BP response	Deep breathing	None (all normal)	Deep breathing (all normal)	None (all normal)	None (all normal)	None (all normal)	None (all normal)	Tachycardia on TTT
Result on Brief Smell test	Abnormal	Normal	Abnormal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Scopa-Aut score	3	3	15	3	1	2	4	1
Ewing & Clarke test	1	0	1	0	0	0	0	0,5

HR: Heart Rate. BP: blood pressure.

Results for each autonomic test were classified as normal (0 point), borderline (0,5 point) and abnormal (1 point). Ewing's classification of autonomic failure was determined as shown below for each participant who had complied with sufficient tests: normal: all tests normal or one borderline (0-0,5 point); early: one of the HR tests abnormal or two borderlines (1 point); definite: two or more of the HR tests abnormal (2 point); severe: two or more of the HR tests abnormal plus one or both of the BP tests abnormal or both borderlines (3–5 point).

We found a lower prevalence of autonomic symptoms among patients with *PARK2* gene mutations based on the SCOPA-AUT score (3.4 ± 4.8 in *PARK2* mutation carriers vs. 14.7 ± 7.2 in iPD patients; $p < 0.001$). According to the Ewing and Clarke classification of autonomic failure [17], no *PARK2* mutation carriers had definite autonomic failure (6 normal, 2 early) (Table 1). *PARK2* mutation carriers had significantly lower scores than iPD patients for most regions and items, especially for digestive, urinary, thermoregulatory and sexual regions. The olfactory system was less affected in *PARK2* mutation carriers (BSIT: 7.8 ± 3.2 in *PARK2* mutation carriers vs. 6.0 ± 2.6 in iPD patients; $p < 0.05$) (Table 2). Orthostatic hypotension was detected in three patients with iPD, compared to none of *PARK2* mutation carriers. However, quantitative assessment of sympathetic function did not reveal differences between *PARK2* mutation carriers and individuals with iPD for blood pressure variations during head-up tilt test. No difference between the groups was found in blood pressure response during either late phase II or phase IV of the Valsalva maneuver or in the increase of diastolic blood pressure during isometric hand grip. Cardiovascular function assessment revealed no difference between *PARK2* mutation carriers and iPD patients in mean heart rate response during deep breathing (Table 3). On the other hand, we found no significant differences between these groups when comparing the levels of NA response to the head-up tilt test. However, basal and upright values for vasopressin in the *PARK2* mutation group were higher than those in iPD patients (Table 3). Lastly, regarding the results on heart imaging by MIBG scintigraphy, we observed that there was less sympathetic denervation in *PARK2* mutation carriers than in iPD patients (late H/M uptake ratio: 1.52 ± 0.35 in *PARK2* mutation carriers vs. 1.32 ± 0.25 in iPD patients; $p < 0.05$).

We performed a comparative postmortem histopathological study of the brain and heart of one patient carrying a *PARK2* gene mutation, one subject without PD who died at age of 60 years from liver disease and two PD patients (Fig. 1). The first PD patient was a 69-year-old man with disease duration of 8 years who was a *SNCA* mutation carrier (E46K) [18]. The second patient was a 70-year-old woman with PD and no family history of PD who died 9 years after the clinical onset of the disease. The *PARK2* mutation carrier was a woman who noted the onset of rest tremor at 43 years of age. She died at the age of 73 and the clinical evaluation months before death revealed advanced motor symptoms, dyskinesia, motor fluctuations and impaired activities of daily living (UPDRS I: 5, UPDRS II: 35, UPDRS III: 66, UPDRS IV: 7). Her brain MRI was unremarkable. A compound heterozygous mutation (C154delA in exon 2 and exon 1 del) in the *PARK2* gene was identified in that patient and in two of her relatives: one asymptomatic sister and one brother. Although the autonomic study was not performed in the carrier who underwent an autopsy, it was completed in her brother, who had early onset PD and the same genotype.

The immunohistological analysis of epicardial tissue in the iPD patient and in the *SNCA* mutation carrier showed a clear Lewy body pathology with an absence of TH-immunoreactive fibers. By contrast, in the *PARK2* mutation carrier and in the subject without PD there was only a moderate reduction of TH-immunoreactive fibers and that there were no alpha synuclein inclusions (Fig. 1).

Histology of the brain of the *PARK2* mutation carrier showed severe nigral cell degeneration without Lewy body inclusions. Examination of the locus coeruleus found neuron loss without alpha synuclein inclusions. Other brainstem structures such as the inferior olive and noradrenergic nuclei in the pons-medulla and dentate nucleus of the cerebellum showed no significant histological

Table 2
Characteristics of Parkinson's disease in *PARK2* gene mutation carriers and in patients with idiopathic PD (iPD) at study inclusion.

	<i>PARK2</i> gene mutation carriers (n = 8)	iPD patients (n = 13)	P value
Age (years)	60.1 ± 12.8	59.2 ± 8.9	ns
Time from diagnosis (years)	27.1 ± 11.4	6.5 ± 5.1	$P < 0.001$
UPDRS I	2.0 ± 1.8	2.1 ± 1.8	ns
UPDRS II	10.7 ± 8.7	9.6 ± 2.7	ns
UPDRS III	28.1 ± 15.4	26.5 ± 7.5	ns
UPDRS IV	4.4 ± 3.0	3.9 ± 3.7	ns
BSIT	7.7 ± 3.2	6.0 ± 2.6	0.04
Levodopa-equivalent doses	570.5 ± 208.2	680.8 ± 459.9	ns

Results are presented as means \pm standard deviations for every variable. UPDRS: Unified Parkinson's Disease Rating Scale. BSIT: Brief Smell Identification Test. ns: no significant difference.

Table 3

Results of SCOPA-AUT, MIBG scintigraphy, noradrenergic tests and non-invasive tests of autonomic nervous system function in PD patients with and without parkin gene mutations.

	<i>PARK2</i> gene mutations (N = 8)	PD patients with no mutations (N = 13)	Normal values in our centre
SCOPA-AUT**	3.4 (4.8)	14.7 (7.2)	8.9 (5.4)
• Digestive*	1.5 (2.1)	3.6 (3.4)	
• Urinary*	1.7 (2.7)	4.2 (2.8)	
• Haemodynamics	0.1 (0.3)	0.4 (0.7)	
• Pupil	0.1 (0.3)	0.6 (0.8)	
• Thermoregulation*	0.1 (0.1)	1.8 (1.9)	
• Sexual*	0.1 (0.1)	1.8 (1.9)	
Noradrenaline Supine (pg/ml)	258.7 (127.9)	305.7 (269.8)	300–650
Standing	395.8 (195.2)	445.0 (311.0)	450–850
Vasopressin Supine*(pg/ml)	7.1 (3.9)	3.5 (4.7)	0–7.6
Standing	9.5 (7.2)	4.6 (5.5)	0–7.6
MIBG* (heart/mediastinum ratio – 4 h)	1.5 (0.3)*	1.3 (0.2)*	1.75
TILT TABLE: Blood pressure (Heart rate)			
□ Δ systolic 3 m	–08.7 (16.7)	–3.7 (25.4)	Not available
□ Δ diastolic 3 m	–10.8 (12.2)	–11.9 (17.4)	
Orthostatic Hypotension (n)	0	3	0
Non-invasive autonomic function tests			
□ HR variability during paced breathing (expiration/inspiration ratio)	1.1 (0.1)	1.1 (0.1)	1.2–1.8 (Age-dependent)
□ BP Valsalva: Phase II (mmHg)	–13.4 (28.6)	–19.5 (21.9)	Not available
□ BP Valsalva: Phase II late (mmHg)	9.4 (20.3)	6.6 (41.9)	Not available
□ BP Valsalva: Phase IV (mmHg)	15.7 (31.2)	25.9 (15.1)	Not available
□ BP changes during Handgrip test	9.2 (9.8)	8.8 (26.0)	BP changes during handgrip test: 10% increment of diastolic BP at 3 min.

Characteristics of Parkinson's disease in *PARK2* gene mutation carriers and in patients with idiopathic PD (iPD) at study inclusion. Magnitude of blood pressure (BP) changes was determined for late phase II and phase IV of the Valsalva maneuver. Values were calculated by subtracting the baseline systolic blood pressure from the systolic blood pressure during phase II or phase IV. BP changes during the handgrip test are shown as percent increment of diastolic BP at 3 min. PD – Parkinson's Disease, SCOPA-AUT– Scales for Outcomes in Parkinson's disease-autonomic, MIBG – metaiodobenzylguanidine, HR–Heart Rate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

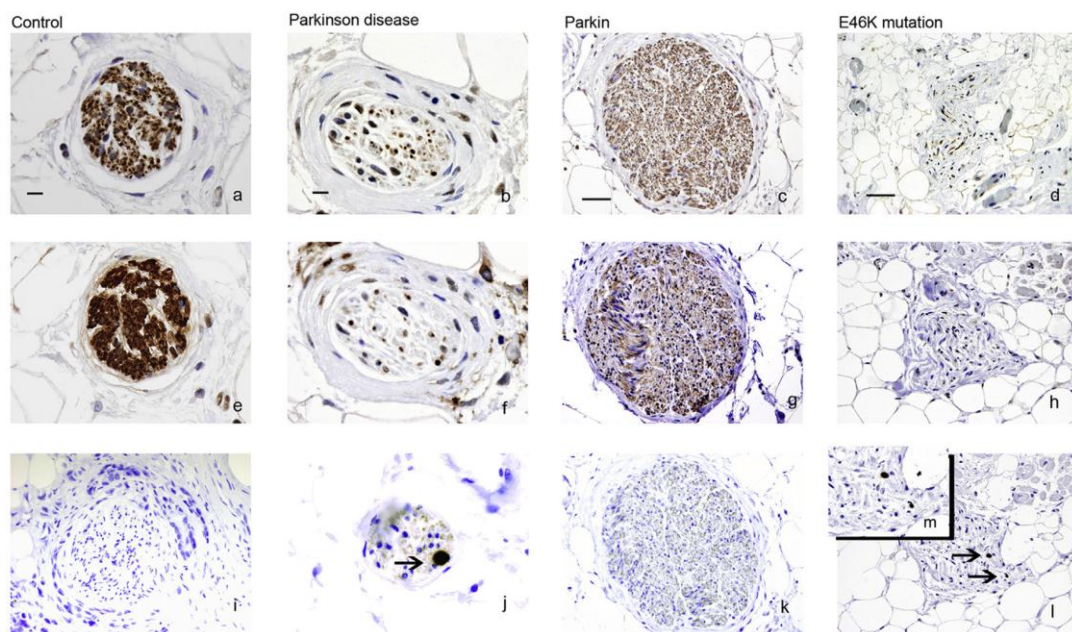


Fig. 1. Immunohistochemical findings of postmortem heart tissue with epicardial nerve fibers from a subject without PD (a, e, i), an iPD patient (b, f, j), a *PARK2* mutation carrier (c, g, k) and a *SNCA* (p.E46K) mutation carrier (d, h, l). Staining for neurofilament (NF) (a–d), tyrosine hydroxylase (TH) (e–h) and phosphorylated alpha-synuclein (i–m) in 20- μ m (a, b, e, f, i, j) and 100- μ m (c, d, g, h, k, l) post-fixed sections, cut from paraffin blocks of cardiac tissue. In the subject without PD, we observe slight NF+ and TH+ fibers loss (a, e) and no Lewy bodies or Lewy neurites (i). In the iPD patient, the number of TH-immunoreactive nerve fibers is markedly decreased (b, f) and Lewy bodies (arrow in j) are observed. In the *PARK2* mutation carrier slight degeneration of nerve fibers is observed (c, g), with no Lewy body pathology (k). In the *SNCA* mutation carrier, severe degeneration of nerve fibers (d, h) can be noted with Lewy body pathology (arrows in l, zoom in m).

abnormalities. No tau or alpha synuclein inclusions were found in other brain structures, and insignificant levels of (1–42) amyloid Beta A4 (A β 4) were detected in the immunoassay. In contrast, abundant Lewy bodies were observed in the substantia nigra, basal nucleus of Meynert, perifornical area, medullary and pontine tegmentum, periaqueductal gray matter, raphe nuclei, locus coeruleus, area postrema, dorsal motor nuclei of the tenth nerve and frontal cortex of the patient with a *SNCA* gene mutation. In the case of the iPD patient, numerous alpha synuclein inclusions (LB and Lewy neurites) were found in brainstem nuclei and the substantia nigra. Cortical involvement was confined to the temporal mesocortex and allocortex-CA2 (Braak III-IV). However, no such inclusions were found in the neocortex, despite the time interval of 9 years from disease onset to death. No Lewy bodies or other alpha synuclein deposits were found in the brain of the subject without PD.

4. Discussion

We report here the first comprehensive study of dysautonomia in patients with mutations in the *PARK2* gene and we also provide evidence supporting the idea that *PARK2* mutation carriers have less autonomic nervous system involvement than iPD patients. Specifically, in our study *PARK2* mutation carriers had fewer autonomic symptoms (SCOPA-AUT scale), less orthostatic hypotension (TTT) and a lower degree of myocardial sympathetic denervation (higher uptake ratios in MIBG scintigraphy). In fact, in *PARK2* mutation carriers, the delayed H/M ratios were within the range of patients without PD despite having disease durations of more than 20 years. This idea was further supported by the heart histopathology of one *PARK2* mutation carrier, which revealed a relative preservation of epicardial sympathetic fibers, compared with the marked epicardial denervation found in a *SNCA* mutation carrier and a subject with iPD.

To date, autonomic nervous system involvement has been systematically investigated only in few clinical cohorts of *PARK2* mutation carriers. Although initial reports did not mention the presence of autonomic dysfunction in *PARK2* mutation carriers with the exception of urinary urgency [2,19], later studies have suggested that several symptoms related to dysautonomia, particularly genitourinary dysfunction, may occur in as many as 60% of *PARK2* mutation carriers [8,11,20]. In our study, we found a lower rate of autonomic symptoms using SCOPA-AUT. Specifically, scores were lower in the group of patients with *PARK2* gene mutations than in those with iPD for four regions (gastrointestinal, seven items; urinary, six items; thermoregulatory, four items; and sexual, two items for men and two for women).

Orthostatic hypotension on TTT was more common in individuals with iPD than in *PARK2* mutation carriers. This finding did not correlate with either clinical symptoms during TTT or cardiovascular symptoms on SCOPA-AUT. The remaining quantitative tests for cardiovascular reflexes revealed no differences between *PARK2* mutation carriers and iPD patients, both in sympathetic and parasympathetic functions [21]. The late H/M ratio of MIBG was less affected in the *PARK2* mutation carriers than iPD patients. Similar findings have been previously reported by Orimo et al. [12,13], supporting the view that cardiac sympathetic innervation is well preserved in *PARK2* mutation carriers. Our results showing the preservation of TH staining in the epicardial nerve terminals of the *PARK2* mutation carrier also support this view.

In line with the present results in *PARK2* mutation carriers, our group found similar late H/M ratios of MIBG in symptomatic carriers of the *LRRK2* mutations with PD [22]. In contrast, for *SNCA* gene mutation carriers, myocardial sympathetic innervation ratios

have been found to be abnormal from very early stages [18,23]. All these data suggest that normal cardiac uptake of MIBG might be of potential diagnostic value to indicate the absence of Lewy body pathology [12,13] in Parkinsonism.

Histology of the brain in *PARK2* mutation carrier showed severe nigral cell loss without Lewy body inclusions. This is in agreement with most of the previously reported *PARK2* cases [11,24], with the exception of a few cases in which Lewy bodies were observed in the brain [4–7]. One of the latter cases showed normal uptake of 123I-MIBG scintigraphy and relatively preserved sympathetic nerve fibers in pathological examination of the epicardium, however Lewy body formation was found in the epicardial nerve fibers [5]. To date, there are no definitive explanations to justify the presence of Lewy body inclusions in the brain of some *PARK2* mutation carriers. While an older age of onset may well explain the presence of brain Lewy bodies in these subjects, the coexistence of sporadic PD process together with the *PARK2* mutation cannot be excluded. It is well known that about 15% of autopsied elderly subjects who had antemortem clinical evaluations ruling out PD or dementia have incidental Lewy bodies (iLBD) in the brain; therefore, the presence of Lewy bodies in the brain of some *PARK2* mutation carriers can be also be incidental. Other possible explanation would be that in some family pedigrees some other crucial PD susceptibility factors are present [25], like hemizygous deletion [7] or heterozygous *PARK2* mutations [4].

Our findings support that the pattern of involvement of peripheral nervous system in *PARK2* mutation carriers is different from that observed in iPD and in *SNCA*-mutation linked PD. First, our study points that autonomic small myelinated and unmyelinated fibers are relatively well preserved in *PARK2* mutation carriers compared to iPD and E46K mutation patients. Second, previous clinical studies in *PARK2* carriers have reported a specific damage of large diameter nerve fibers, including peripheral neuropathy in two siblings with *PARK2* mutation [15] and a diminished amplitude of sural sensory nerve action potential in nine *PARK2* carriers [26]. Moreover, a study by Hase et al. in bovine peripheral nerves demonstrated the presence of parkin protein in the axoplasm and in Schwann cells of large diameter myelinated nerve fibers [14], supporting that parkin plays different roles in the normal physiology of the nervous system, not only in CNS but also in peripheral nervous system. The reason why the sensory nerves are predominantly involved in *PARK2* mutation is unclear. A recent multicenter study showed that the duration of exposure to levodopa, along with age, is the main risk factor for the development of neuropathy in iPD [27].

Another relevant finding supporting the presence of sensory neuropathy in *PARK2* patients of our study is the significant increase of AVP both in supine and standing positions in *PARK2* mutation carriers compared to controls. Previous studies have suggested that the response of arginine-vasopressin (AVP) levels to baroreceptor activation (tilt testing) may be useful to study sensory afferent pathways [28]. In fact, some studies showed that hypotension induced by an upright position produced a slight increase in AVP levels in patients with sensory neuropathies in comparison with normal subjects [29].

The main weakness of our study is the small size of the sample (8 patients with *PARK2* gene mutations and 13 iPD patients). Another limitation is the difference in levodopa equivalent doses between the two groups. The *PARK2* mutation carriers were treated with a lower LD equivalent dose than the iPD patients, despite having a longer duration of treatment, a fact that may have favored a lower presence of autonomic symptoms in *PARK2* carriers. However, we believe that the homogeneity of the sample in terms of age and motor status (Table 2) strengthens the validity of the study.

In conclusion, our study supports the view that the autonomic nervous system is better preserved in patients with mutations in the *PARK2* gene than iPD patients, since in most *PARK2* mutation carriers there is no involvement of small peripheral sympathetic nerve fibers. In this genetic disorder, the damage of large somatic myelinated nerve fibers is more severe than in iPD [15,26]. We could speculate that dysautonomia and damage to unmyelinated axons in parkinsonism is related to alpha synuclein pathology, as could be seen in iPD patients [30] and in *SNCA* mutation carriers, whereas in *PARK2* mutation carriers the involvement of myelinated large diameter axons might be more prominent due to the presence of a different pathogenic mechanism to that causing alpha synucleinopathies, for example the loss of function of an abnormal parkin protein.

References

- [1] V. Bonifati, Genetics of Parkinson's disease—state of the art, 2013, *Park Relat Disord* 20 (Suppl. 1) (2014) S23–S28.
- [2] E. Lohmann, M. Periquet, V. Bonifati, N.W. Wood, G. De Michele, A.M. Bonnet, et al., How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Ann Neurol* 54 (2003) 176–185.
- [3] D.M. Kay, D. Moran, L. Moses, P. Poorkaj, C.P. Zabetian, J. Nutt, et al., Heterozygous parkin point mutations are as common in control subjects as in Parkinson's patients, *Ann Neurol* 61 (2007) 47–54.
- [4] P.P. Pramstaller, M.G. Schlossmacher, T.S. Jacques, F. Scaravilli, C. Eskelson, I. Pepivani, et al., Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers, *Ann Neurol* 58 (2005) 411–422.
- [5] S. Miyakawa, M. Ogino, S. Funabe, A. Uchino, Y. Shimo, N. Hattori, et al., Lewy body pathology in a patient with a homozygous parkin deletion, *Mov Disord* 28 (2013) 388–391.
- [6] H. Houlden, A.B. Singleton, The genetics and neuropathology of Parkinson's disease, *Acta Neuropathol* 124 (2012) 325–338.
- [7] M. Farrer, P. Chan, R. Chen, L. Tan, S. Lincoln, D. Hernandez, et al., Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations, *Ann Neurol* 50 (2001) 293–300.
- [8] N.L. Khan, E. Graham, P. Critchley, A.E. Schrag, N.W. Wood, A.J. Lees, et al., Parkin disease: a phenotypic study of a large case series, *Brain* 126 (2003) 1279–1292.
- [9] Y. Yamamura, N. Hattori, H. Matsumine, S. Kuzuhara, Y. Mizuno, Autosomal recessive early-onset parkinsonism with diurnal fluctuation: clinicopathologic characteristics and molecular genetic identification, *Brain Dev* 22 (Suppl. 1) (2000) S87–S91.
- [10] J.E. Ahlskog, Lessons for Parkinson disease from the parkin genotype, *JAMA Neurol* 70 (2013) 551–552.
- [11] K.M. Doherty, L. Silveira-Moriyama, L. Parkkinen, D.G. Healy, M. Farrell, N.E. Mencacci, et al., Parkin disease: a clinicopathologic entity? *JAMA Neurol* 70 (2013) 571–579.
- [12] S. Orimo, T. Amino, M. Yokochi, T. Kojo, T. Uchihara, A. Takahashi, et al., Preserved cardiac sympathetic nerve accounts for normal cardiac uptake of MIBG in *PARK2*, *Mov Disord* 20 (2005) 1350–1353.
- [13] M. Suzuki, N. Hattori, S. Orimo, N. Fukumitsu, M. Abo, Y. Kono, et al., Preserved myocardial [123I]metaiodobenzylguanidine uptake in autosomal recessive juvenile parkinsonism: first case report, *Mov Disord* 20 (2005) 634–636.
- [14] A. Hase, H. Yamada, K. Arai, Y. Sunada, T. Shimizu, K. Matsumura, Characterization of parkin in bovine peripheral nerve, *Brain Res* 930 (2002) 143–149.
- [15] G. Abbruzzese, S. Pigullo, A. Schenone, E. Bellone, R. Marchese, E. Di Maria, et al., Does parkin play a role in the peripheral nervous system? A family report, *Mov Disord* 19 (2004) 978–981.
- [16] M. Visser, J. Marinus, A.M. Stiggelbout, J.J. Van Hilten, Assessment of autonomic dysfunction in Parkinson's disease: the SCOPA-AUT, *Mov Disord* 19 (2004) 1306–1312.
- [17] D.J. Ewing, D.Q. Borse, F. Bellavere, B.F. Clarke, Cardiac autonomic neuropathy in diabetes: comparison of measures of R-R interval variation, *Diabetologia* 21 (1981) 18–24.
- [18] B. Tijero, J.C. Gomez-Esteban, E. Lezcano, C. Fernandez-Gonzalez, J. Somme, V. Llorens, et al., Cardiac sympathetic denervation in symptomatic and asymptomatic carriers of the E46K mutation in the alpha synuclein gene, *Park Relat Disord* 19 (2013) 95–100.
- [19] C.B. Lucking, A. Durr, V. Bonifati, J. Vaughan, G. De Michele, T. Gasser, et al., Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene, *N Engl J Med* 342 (2000) 1560–1567.
- [20] A. Puschmann, Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: clinical phenotypes and frequencies of known mutations, *Park Relat Disord* 19 (2013) 407–415.
- [21] F. Del Sorbo, A.E. Elia, G. De Joanna, L.M. Romito, B. Garavaglia, A. Albanese, Normal cardiovascular reflex testing in patients with parkin disease, *Mov Disord* 22 (4) (2007) 528–532.
- [22] B. Tijero, J.C. Gomez-Esteban, J. Somme, V. Llorens, E. Lezcano, A. Martinez, et al., Autonomic dysfunction in parkinsonian LRRK2 mutation carriers, *Park Relat Disord* 19 (2013) 906–909.
- [23] B. Tijero, J.C. Gomez-Esteban, V. Llorens, E. Lezcano, M.C. Gonzalez-Fernandez, M.M. de Pancorbo, et al., Cardiac sympathetic denervation precedes nigrostriatal loss in the E46K mutation of the alpha-synuclein gene (*SNCA*), *Clin Auton Res* 20 (2010) 267–269.
- [24] N. Gouider-Khouja, A. Larnaout, R. Amouri, S. Sfar, S. Belal, C. Ben Hamida, et al., Autosomal recessive parkinsonism linked to parkin gene in a Tunisian family. Clinical, genetic and pathological study, *Park Relat Disord* 9 (2003) 247–251.
- [25] J.E. Ahlskog, Parkin and PINK1 parkinsonism may represent nigral mitochondrial cytopathies distinct from Lewy body Parkinson's disease, *Park Relat Disord* 15 (2009) 721–727.
- [26] Y. Ohsawa, K. Kurokawa, M. Sonoo, H. Yamada, S. Hemmi, K. Iwatsuki, et al., Reduced amplitude of the sural nerve sensory action potential in *PARK2* patients, *Neurology* 65 (2005) 459–462.
- [27] R. Ceravolo, G. Cossu, M. Bandettini di Poggio, L. Santoro, P. Barone, M. Zibetti, et al., Neuropathy and levodopa in Parkinson's disease: evidence from a multicenter study, *Mov Disord* 28 (2013) 1391–1397.
- [28] H. Kaufmann, E. Oribe, J.A. Oliver, Plasma endothelin during upright tilt: relevance for orthostatic hypotension? *Lancet* 338 (1991) 1542–1545.
- [29] M. Cignarelli, G. De Pergola, A. Paternostro, M. Corso, M.R. Cospite, G.M. Centaro, et al., Arginine-vasopressin response to supine-erect posture change: an index for evaluation of the integrity of the afferent component of baroregulatory system in diabetic neuropathy, *Diabete Metab* 12 (1986) 28–33.
- [30] S. Orimo, T. Uchihara, T. Kanazawa, Y. Itoh, K. Wakabayashi, A. Kakita, et al., Unmyelinated axons are more vulnerable to degeneration than myelinated axons of the cardiac nerve in Parkinson's disease, *Neuropathol Appl Neurobiol* 37 (2011) 791–802.

Trabajos 5 y 6. Estos dos estudios adicionales exploran la relación entre los trastornos del sueño y los síntomas disautonómicos

Relationship between sleep and dysautonomic symptoms assessed by self-report scales.

El objetivo de este estudio es explorar la relación clínica entre la afectación del SNV y los trastornos del sueño. Según evidencias clínicas ambas alteraciones están presentes desde estadios precoces de la enfermedad. La presencia simultánea de ambas alteraciones puede tener una explicación no sólo topográfica (modelos de Braak) por el daño de núcleos del tronco, sino relacionada con alguna otra característica como puede ser su naturaleza bioquímica (sistema noradrenérgico). Por tanto, sería esperable un grado de afectación similar de ambos trastornos en los pacientes con EP.

Para ello estudiamos a 60 pacientes con EP mediante escalas clínicas: UPDRS I-IV, SCOPA-aut y dos escalas de sueño, la *Parkinson's Disease Sleep Scale* (PDSS) y la escala de hipersomnia diurna (Epworth).

Los resultados de este estudio demuestran la alta frecuencia de síntomas vegetativos y del sueño en pacientes con EP, y la fuerte relación entre estos dos tipos de trastornos. Encontramos que son los dominios gastrointestinal, urinario, pupilomotor y termorregulatorio los que tienen una relación significativamente

mayor. Como se ha comentado anteriormente bien la proximidad dentro del tronco del encéfalo de sus centros regulatorios podría explicar una afectación paralela, como de una posible relación más compleja como una vulnerabilidad mayor de sus centros al proceso neuropatológico.

LETTER TO THE EDITOR

Relationship Between Sleep and Dysautonomic Symptoms Assessed by Self-Report Scales

Sleep disturbances and autonomic dysfunction have been implicated in Parkinson's disease (PD) since the first descriptions of this condition.¹ A possible relationship between dysautonomia and sleep disorders is suggested by the anatomical proximity of their regulatory centers in the brain stem.²

The objective of this study was to explore the clinical relationship between self-reported autonomic and sleep dysfunction.

Patients and Methods

This was a cross-sectional study including a total of 60 patients, all diagnosed with PD³ and recruited consecutively on attendance at a movement disorders clinic. Informed consent was required before enrollment. All patients underwent a complete neurological examination including completion of the Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS). Autonomic dysfunction was assessed with the SCOPA-AUT scale,⁴ and sleep dysfunction was assessed using the Parkinson's Disease Sleep Scale (PDSS) and Epworth Daytime Sleepiness Scale (Epworth).

Statistical Analysis

Means and standard deviations were determined for the quantitative variables. Stepwise regression analyses were performed to identify variables predictive of sleep disorders in PD patients.

The SPSS-12 package for Windows (SPSS Inc., Chicago IL) was used for the statistical analysis.

Results

The mean SCOPA-AUT total score was 20.9 ± 12.1 , and urinary was the most affected domain (28.4 ± 21.6). The mean PDSS total score was 113 ± 16.3 . The total score on the SCOPA-AUT was found to be weakly correlated with age and disease duration (0.29 , $P = .025$; and 0.29 , $P = .028$, respectively) and to be moderately correlated with UPDRS III score (0.44 , $P < .001$).

We also detected some correlation between scores on the different scales, namely, between the SCOPA-AUT and PDSS (-0.60 , $P < .001$) and between SCOPA-AUT and Epworth (0.36 , $P = .007$). The domains of SCOPA-AUT that showed the highest correlation with the PDSS total score were the gastrointestinal and urinary domains (Table 1). On the other hand, when grouping the PDSS items,⁵ "nocturnal motor symptoms" (items 10–13) and "nocturia" (items 8 and 9) both showed a moderate correlation with total SCOPA-AUT score (Table 1).

After introducing the variables into a stepwise linear regression model using PDSS as the dependent variable, we found that SCOPA-AUT alone accounted for 27.3% of the variance in the PDSS ($F = 21046$; $P < .001$).

Discussion

This study demonstrates that autonomic symptoms assessed by the SCOPA-AUT scale are strongly related to nocturnal sleep problems in PD patients. A previous study also showed a similar relationship.⁶ Four domains were found to be significantly correlated with the PDSS total score: the gastrointestinal, urinary, pupillomotor, and thermoregulatory domains. The result for the urinary domain comes as no surprise, as nocturnal urinary symptoms directly influence the quality of sleep.

This is the first study exploring the relationship between sleep and autonomic nervous system disorders using self-reported scales. It illustrates high rates of autonomic symptoms and sleep disturbance in PD and confirms a strong correlation between the 2 types of problems. The anatomical proximity and concomitant degeneration of sleep and autonomic regulatory centers in the brain stem could explain this correlation. However, this may well be a simplification of a much more complex relationship, and further research is required.

Beatriz Tijero, MD,¹ Johanne Somme, MD,¹
 Juan Carlos Gómez-Esteban, MD, PhD,^{1*}
 Koldo Berganzo, MD,¹ Ishan Adhikari, MD,²
 Elena Lezcano, MD, PhD,¹ Iker Bilbao, MD,¹
 Iñigo Garamendi, MD,¹ and Juan José Zarranz, MD, PhD¹
¹Movement Disorders Unit, Neurology
 Department, Hospital de Cruces, Baracaldo,
 Vizcaya, Spain; and ²Dysautonomia Center,
 Langone Medical Center, New York University,
 New York, New York, USA

*Correspondence to: Juan Carlos Gómez-Esteban, Movement Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de Cruces, Baracaldo, Vizcaya, Spain; juancarlos.gomezesteban@gmail.com

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

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/mds.23761

References

1. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2002;14:223–236; discussion 222.
2. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003;24:197–211.

LETTERS TO THE EDITOR

Table 1. Correlation coefficients (Spearman's rho) between scores on the PDSS scale and its dimensions and scores on the SCOPA AUT scale and dimensions

	SCOPA AUT	Gastrointestinal	Urinary	Cardiovascular	Thermoregulatory	Pupil	Sexual
PDSS	-0.60 ^a	-0.49 ^a	-0.49 ^a	-0.21	-0.38 ^a	-0.30 ^b	-0.23
• Quality	-0.12	-0.01	-0.01	-0.13	-0.13	-0.07	-0.20
• Insomnia	-0.23	-0.18	-0.18	-0.16	-0.07	-0.02	-0.13
• Restlessness	-0.27 ^b	-0.11	-0.21	-0.09	-0.30 ^b	-0.16	-0.11
• Psychosis	-0.37 ^a	-0.39 ^a	-0.23	-0.11	-0.30	-0.23	-0.01
• Nocturia	-0.53 ^a	-0.29 ^b	-0.63 ^a	-0.13	-0.24	-0.26 ^b	-0.25
• Motor	-0.53 ^a	-0.47 ^a	-0.29 ^b	-0.36 ^a	-0.30 ^b	-0.34 ^a	-0.21
• Refreshment	-0.35 ^a	-0.30 ^b	-0.30 ^b	-0.12	-0.19	-0.16	-0.08
• Dozing	-0.47 ^a	-0.48 ^a	-0.29 ^b	-0.11	-0.34 ^b	-0.10	-0.16

PDSS, Parkinson's Disease Sleep Scale (PDSS items were grouped according Chaudhuri's recommendations).⁴

^a $P < .001$; ^b $P < .01$.

- Hughes AJ, Daniel SE, Lees AJ. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. *Neurology*. 2001;57:1497-1499.
- Visser M, Marinus J, Stiggelbout AM, Van Hilten JJ. Assessment of autonomic dysfunction in Parkinson's disease: the SCOPA-AUT. *Mov Disord*. 2004;19:1306-1312.
- Chaudhuri KR, Pal S, DiMarco A, et al. The Parkinson's disease sleep scale: a new instrument for assessing sleep and nocturnal disability in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002;73:629-635.
- Verbaan D, Marinus J, Visser M, van Rooden SM, Stiggelbout AM, van Hilten JJ. Patient-reported autonomic symptoms in Parkinson disease. *Neurology*. 2007;69:333-341.

Trastorno de conducta del sueño REM y fallo autonómico “puro”. Presentación de dos casos.

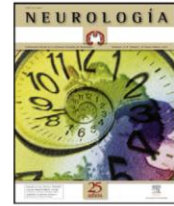
La necesidad de un diagnóstico en fases precoces de la EP hace que cada vez sean más los estudios sobre los signos y síntomas en estadios iniciales. Se ha indicado una progresión estereotipada y ordenada de los cuerpos de *Lewy* en los cerebros de los pacientes con EP, pero este depósito de alfasinucleína no se relaciona necesariamente con la disfunción o la muerte neuronal y por tanto con la sintomatología. Esto hace posible que los primeros síntomas de una EP puedan ser muy variados: Estudios longitudinales demuestran que el trastorno de conducta del sueño REM (TCSR) puede preceder hasta en un 45% al diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa (alfasinucleinopatías), preferentemente una EP¹⁰⁵. Es conocido que el fallo autonómico es una complicación tardía de la EP y la demencia de cuerpos de *Lewy* (DCL), aunque, en ocasiones, puede ser el cuadro de presentación⁴. Incluso se ha escrito anteriormente el caso de una paciente portadora de una mutación en el gen de la alfasinucleína que ha presentado afectación del SNV como signo de su enfermedad¹⁰⁶.

En este trabajo se presentan 2 pacientes con TCSR idiopático y fallo autonómico periférico sin signos ni síntomas de enfermedad neurodegenerativa. Se discute el riesgo de desarrollar una sinucleinopatía y las implicaciones de su diagnóstico precoz.



NEUROLOGÍA

www.elsevier.es/neurologia



CARTA AL EDITOR

Trastorno de conducta del sueño REM y fallo autonómico ¿puro? A propósito de 2 casos

REM sleep behaviour disorder and "pure" autonomic failure. Presentation of two cases

Sr. Editor:

La necesidad de un diagnóstico en fases precoces de la enfermedad de Parkinson (EP) hace que cada vez sean más los estudios sobre los signos y síntomas en estadios iniciales. Se ha indicado una progresión estereotipada y ordenada de los cuerpos de Lewy en los cerebros de los pacientes con EP¹ pero este depósito de α -sinucleína no se relaciona necesariamente con la disfunción o defunción neuronal y por tanto con la sintomatología. Esto hace posible que los primeros síntomas de una EP puedan ser muy variados². Estudios longitudinales demuestran que el trastorno de conducta del sueño REM (TCSR) puede preceder hasta en un 45% al diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa (α -sinucleinopatías) preferentemente EP³. Es conocido que el fallo autonómico es una complicación tardía de la EP y la demencia de cuerpos de Lewy (DCL) aunque en ocasiones puede ser el cuadro de presentación^{4,5}. Recientemente hemos descrito como una portadora de una mutación en el gen de la α -sinucleína (SNCA) ha presentado disautonomía como signo de inicio de su enfermedad⁶.

Presentamos 2 pacientes con TCSR idiopático y fallo autonómico periférico sin signos ni síntomas de enfermedad neurodegenerativa. Se discute el riesgo de desarrollar una sinucleinopatía y las implicaciones de su diagnóstico precoz.

Caso 1. Varón de 66 años sin antecedentes familiares de enfermedades neurodegenerativas. En el año 2004 acudió por un trastorno del sueño que consistía en pesadillas, sueño agitado y caídas de la cama que el paciente describía desde hacía años. La polisomnografía registró durante el sueño REM un aumento de los fenómenos fásicos y una pérdida de la atonía fisiológica de esta fase. Se realizó un diagnóstico de TCSR que mejoró con clonazepam (0,5 mg). Seis meses más tarde sufrió un síncope tusígeno. El estudio del sistema nervioso vegetativo mostró: una frecuencia cardíaca fija no modificada por la maniobra de Valsalva, la administración de efedrina o la bipedestación. Presentó hipotensión ortostática (decúbito 148/80 FC 53; bipedestación 120/65 FC 53). Presentaba cifras de noradrenalina en decúbito de 26 pg/ml (VN: 100-750) que se elevaban en bipedestación hasta

124 pg/ml (VN: 200-1.700). No se detectó déficit olfatorio (11/12 identificados correctamente en el *Brief Smell Identification Test*, BSIT). Se observó una marcada hipocaptación en la SPECT I-MIBG miocárdica (fig. 1). La TC cerebral (no pudo realizarse RM por la presencia de partículas metálicas) fue normal. La SPECT 123-I-FP-CIT no mostraba defectos de captación estriatal (fig. 1); 2 años después se repitió dicha exploración mostrando valores normales aunque los ratios de captación estriado/lóbulo occipital habían disminuido discretamente

Caso 2. Mujer de 60 años que acude por síncope de repetición e intolerancia al ortostatismo desde hacía 10 años. Describía otros síntomas disautonómicos como estreñimiento y problemas miccionales: tenesmo y nicturia. Presentaba una disminución de la olfacción (7/12 en el BSIT). Refería ensoñaciones vívidas y movimientos durante el sueño, la polisomnografía objetivó una pérdida de la atonía en la fase REM. En el estudio disautonómico se detectó hipotensión ortostática en la mesa basculante (bipedestación: 103/54 mmHg FC 66; decúbito 66/34 mmHg FC 55) e hipertensión arterial nocturna en el Holter de presión arterial. El estudio de catecolaminas puso de manifiesto una importante depleción de noradrenalina (decúbito 17 pg/ml; bipedestación 31 pg/ml) con un incremento de la vasopresina con el cambio postural (decúbito 3,9 pg/ml, bipedestación 5,1 pg/ml). Tanto el Valsalva ratio (1,8) como la variabilidad de la FC con la respiración se situaron en el límite bajo de la normalidad. La prueba cutánea simpático-refleja fue patológica en extremidades inferiores. En la RM craneal no se detectaron anomalías que indicaran la presencia de una atrofia multisistémica (AMS). Se realizó una SPECT-MIBG cardíaca con un ratio miocardio/mediastino a las 4 h de 1,8 (VN > 1,7), el SPECT 123-I-FP-CIT fue normal.

Los 2 pacientes descritos cumplen criterios para el diagnóstico de TCSR. Los resultados del estudio de ambos pacientes orientan hacia un fallo autonómico primario con afectación posganglionar simpática y parasimpática⁷. Esta entidad engloba 3 enfermedades neurodegenerativas: el fallo autonómico puro (PAF), la enfermedad de Parkinson (EP) y la atrofia multisistémica (AMS)⁸. La disfunción autonómica en la AMS se debe a la degeneración de las neuronas preganglionares encontrándose inclusiones citoplasmáticas de α -sinucleína en neuronas y células gliales del tronco del encéfalo y médula espinal⁹. Los ganglios simpáticos y los terminales postganglionares no están afectados. En cambio, la afectación del sistema nervioso vegetativo en la EP y el PAF es de predominio postganglionares. Se encuentran cuerpos y neuritas de Lewy en los ganglios simpáticos y plexos

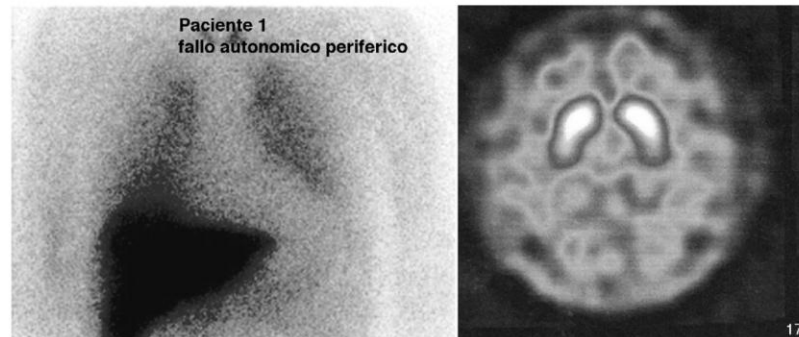


Figura 1 Pruebas de medicina nuclear en el primer caso, a la izquierda en la SPECT-MIBG cardíaca se observa una importante hipocaptación cardíaca. En la derecha figura el SPECT 123-I-FP-CIT (DAT-SCAN) que es normal.

mientéricos¹⁰ y en menor medida en las astas intermedio-laterales¹¹.

Se han descrito casos de reducción de la captación de MIBG cardíaco en pacientes con TCSR¹² sin otros síntomas adicionales, a diferencia de los casos que hemos descrito, no presentaban síntomas clínicos de disautonomía. Esto viene a demostrar que la hipoperfusión en la SPECT-MIBG cardíaca puede ser un hallazgo precoz y preceder al inicio de las manifestaciones motoras. En este grupo de pacientes también se ha descrito déficit de olfacción con las mismas características que el de pacientes con EP¹³.

La hipótesis de que la neurodegeneración en EP y DCL puede comenzar en las neuronas autonómicas postganglionares¹⁰ tiene importantes consecuencias, terapéuticas y diagnósticas, ya que el estudio del sistema nervioso vegetativo, puede ser una herramienta útil en la identificación de pacientes en estadios premotores, previo a la degeneración neuronal de la sustancia negra. Recientemente se han detectado inclusiones de sinucleína en fibras nerviosas de glándulas sudoríparas cutáneas en pacientes con fallo autonómico puro¹⁴. La administración de fármacos con efectos neuroprotectores como la rasagilina pudiera indicarse en este grupo de pacientes, no obstante creemos que sería necesario primero definir en estudios prospectivos el valor de diferentes biomarcadores en estos trastornos¹⁵ y segundo la realización de ensayos clínicos a largo plazo con estas indicaciones (TCSR y fallo autonómico puro).

Bibliografía

- Braak H, del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24:197–211.
- Tolosa E, Gaig C, Santamaria J, Compta Y. Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease. *Neurology*. 2009;72:512–20.
- Iranzo A, Molinuevo JL, Santamaria J, Serradell M, Martí MJ, Valldeoriola F, et al. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study. *Lancet Neurol*. 2006;5:572–7.
- Kaufmann H, Nahm K, Purohit D, Wolfe D. Autonomic failure as the initial presentation of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Neurology*. 2004;63:1093–5.
- Goldstein DS, Holmes C, Li ST, Bruce S, Metman LV, Cannon 3rd RO. Cardiac sympathetic denervation in Parkinson disease. *Ann Intern Med*. 2000;133:338–47.
- Tijero B, Gomez-Esteban JC, Llorens V, Lezcano E, Gonzalez-Fernandez MC, de Pancorbo MM, et al. Cardiac sympathetic denervation precedes nigrostriatal loss in the E46K mutation of the alpha-synuclein gene (SNCA). *Clin Auton Res*. 2010;20:267–9.
- Bannister R, Mathias C. Clinical features and evaluation of the primary chronic autonomic failure syndromes. En: Mathias C, Bannister R, editores. *Autonomic failure. A textbook of clinical disorders of the autonomic nervous system*. fourth ed New York: Oxford University Press; 1999. p. 307–17.
- Kaufmann H. Primary autonomic failure: three clinical presentations of one disease? *Ann Intern Med*. 2000;133:382–4.
- Benarroch EE, Smithson IL, Low PA, Parisi JE. Depletion of catecholaminergic neurons of the rostral ventrolateral medulla in multiple systems atrophy with autonomic failure. *Ann Neurol*. 1998;43:156–63.
- Minguez-Castellanos A, Chamorro CE, Escamilla-Sevilla F, Ortega-Moreno A, Rebollo AC, Gomez-Rio M, et al. Do alpha-synuclein aggregates in autonomic plexuses predate Lewy body disorders?: a cohort study. *Neurology*. 2007;68:2012–8.
- Benarroch EE, Schmeichel AM, Parisi JE. Involvement of the ventrolateral medulla in parkinsonism with autonomic failure. *Neurology*. 2000;54:963–8.
- Miyamoto T, Miyamoto M, Inoue Y, Usui Y, Suzuki K, Hirata K. Reduced cardiac I-MIBG scintigraphy in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology*. 2006;67:2236–8.
- Fantini ML, Postuma RB, Montplaisir J, Ferini-Strambi L. Olfactory deficit in idiopathic rapid eye movements sleep behavior disorder. *Brain Res Bull*. 2006;70:386–90.
- Shishido T, Ikemura M, Obi T, Yamazaki K, Terada T, Sugiura A, et al. alpha-synuclein accumulation in skin nerve fibers revealed by skin biopsy in pure autonomic failure. *Neurology*. 2010;74:608–10.
- Iranzo A, Lomena F, Stockner H, Valldeoriola F, Vilaseca I, Salameo M, et al. Decreased striatal dopamine transporter uptake and substantia nigra hyperchogenicity as risk markers of synucleinopathy in patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a prospective study [corrected]. *Lancet Neurol*. 2010;9:1070–7.

B. Tijero*, J.C. Gómez-Esteban, K. Berganzo y J.J. Zarranz
Servicio de Neurología, Hospital de Cruces, Baracaldo, Bilbao, España
 * Autor para correspondencia.
 Correo electrónico: beatriz_tijero@hotmail.com
 (B. Tijero)

Cómo citar este artículo: Tijero B, et al. Trastorno de conducta del sueño REM y fallo autonómico ¿puro? A propósito de 2 casos. *Neurología*. 2011. doi:10.1016/j.nrl.2011.03.015

Discusión

De acuerdo con los resultados de esta tesis doctoral existen diferentes grados de afectación del SNV en la EP. Esta afectación varía en los diferentes genotipos, siendo más importante y temprana en pacientes portadores de las mutaciones del gen de la SNCA (E46K), y menor en los portadores de mutaciones en los genes LRRK2 y sobre todo de PARK2. La afectación del SNV está por tanto ligada a la presencia de AS en cuerpos de *Lewy*, de tal forma que, en aquellos genotipos con menor expresión o acúmulos de AS los síntomas y signos de disfunción vegetativos son menos intensos.

La mutación G188A en el gen SNCA⁹⁹ nos da una oportunidad única de estudiar una sinucleinopatía caracterizada por el acúmulo masivo de la proteína AS en forma de CL y NL en estructuras nerviosas del SNC y SNP. La AS mutada oligomeriza y forma más rápidamente fibrillas insolubles que las formas "*wild type*" de la proteína¹⁰⁷. El fenotipo clínico descrito hasta la fecha en portadores de esta mutación se correlaciona con los hallazgos histopatológicos y conforma una EP rápidamente progresiva con asociación de deterioro cognitivo y trastornos del sueño^{99,108}. En este trabajo aportamos además dos casos, paciente 13 del árbol genealógico, publicación 1 y el paciente 18 del árbol (no publicado), que se comportan de la misma manera. Ambos son portadores de la mutación, sin clínica motora ni datos de afectación nigroestriatal (SPECT-DAT Scan normal) pero que padecen síntomas vegetativos y denervación simpática noradrenérgica en las pruebas de gammagrafía cardíaca (MIBG).

Estos hallazgos avalan dos hipótesis. La primera es, que el fallo simpático acontece de forma precoz y puede ser previo a la aparición de los síntomas motores, y la segunda, que el fallo autonómico puro, la EP y la demencia por cuerpos de Lewy podrían formar parte del mismo espectro clínico al darse todas ellas en pacientes con esta mutación.

Dentro de la afectación vegetativa, el hallazgo más precoz parece ser la reducción de la captación miocárdica de MIBG en estudios gammagráficos. Esta denervación simpática cardíaca medida mediante gammagrafía con MIBG esta especialmente reducida en pacientes con EP y DCL y es considerada una herramienta útil que puede ayudar a diferenciar con gran sensibilidad estas dos enfermedades de otros trastornos del movimiento que cursan con parkinsonismo y de la enfermedad de Alzheimer ¹⁰⁹. En las pruebas funcionales remarcar que los primeros hallazgos detectados son la pérdida de la arritmia respiratoria que traduce una disfunción cardiovagal en paralelo a la denervación simpática¹¹⁰. Probablemente existen mecanismos de compensación o un grado elevado de reserva noradrenérgica que evitan los síntomas vegetativos en la esfera hemodinámica hasta fases evolucionadas de la enfermedad. El aumento de sensibilidad de los receptores adrenérgicos postsinápticos o la disminución de la recaptación noradrenérgica presináptica podrían ser dos de los mecanismos implicados. Esto justifica la ausencia de correlación entre el grado de denervación del miocardio y los síntomas vegetativos. También se ha detectado HO en los pacientes más evolucionados. Esta HO transcurre de manera asintomática en los primeros momentos de su instauración gracias a los fenómenos

de autorregulación cerebral que aseguran un buen flujo sanguíneo cerebral en pacientes con hipotensión mantenida. Es por ello que, en estas primeras fases hay escasa correlación entre la HO y la puntuación en escalas clínicas como la SCOPA-AUT. Este hecho confirma que si bien hay una disfunción grave del sistema nervioso simpático periférico en estos pacientes, no lo hay de la autorregulación cerebral que responde a otros estímulos (quimiorreceptores). Hasta la fecha, los estudios clínicos han mostrado que los portadores tanto de mutaciones como de duplicaciones del gen SNCA presentan universalmente síntomas derivados de la afectación del SNV^{6,111,112}. El estudio de los portadores sintomáticos y asintomáticos de esta mutación ha podido demostrar que el fallo autonómico es precoz y severo con el avance de la enfermedad.

El gen PARK8 fue analizado y secuenciado hace más de 10 años y hasta la fecha se han descrito numerosas mutaciones patógenas dentro del gen. En nuestro entorno la mutación más frecuente es la R1441G, una mutación con penetrancia variable^{113,114}. En el caso de los portadores de mutaciones en el gen LRRK2, el grado de afectación del SNV es menos uniforme y se relaciona con los hallazgos neuropatológicos en los que el depósito de AS a nivel cerebral es más heterogéneo¹⁰⁴. De manera específica hemos encontrado un menor grado de denervación cardíaca al compararlo con EP idiopática¹¹⁵. En el caso particular de los test funcionales del SNV hemos podido observar una menor afectación de la fase IV de la maniobra de valsalva. Esta última fase suele afectarse en casos de denervación cardíaca lo que corrobora los hallazgos encontrados en las gammagrafías cardíacas con MIBG. Otro

de los objetivos de la tesis ha sido diferenciar entre los genotipos G2019S y el R1441G. Los escasos estudios neuropatológicos de pacientes R1441G no han mostrado los hallazgos clásicos típicos de la EP, y si la presencia de inclusiones atípicas (proteína TAU) o, en algunos casos sin inclusiones ^{116,117}. En nuestro estudio observamos una tendencia no significativa hacia una menor captación gammagráfica (MIBG) cardíaca en portadores de la G2019S y mayor alteración en la respuesta de la tensión arterial en la maniobra de valsalva, aunque el tamaño muestral no alcanza un poder estadístico suficiente para encontrar significación estadística. Podríamos concluir que al comparar con la EP idiopática hay una menor afectación vegetativa con mayores ratios de captación en la gammagrafía cardíaca pero que estas diferencias sutiles entre ambos genotipos no alcanzan aún significación estadística. Estudios recientes sobre otros síntomas no motores en portadores de esta mutación demuestran una menor incidencia de deterioro cognitivo¹⁰² o trastornos del sueño ¹¹⁸ al compararlos con formas idiopáticas de la enfermedad, lo que en conjunto viene a describir un fenotipo menos agresivo.

Las mutaciones en el gen PARK 2 están presentes en la mitad de los pacientes con herencia autosómica recesiva y en el 15% de los casos esporádicos cuando aparecen antes de los 45 años ¹¹⁹. El fenotipo clínico es claramente diferenciado del de la EP clásica o idiopática. Los pacientes tienen un inicio de los síntomas más simétrico, responden a bajas dosis de medicación, la progresión es lenta y tienen complicaciones motoras de manera frecuente, particularmente distonía¹²⁰. Se han descrito alteraciones de los nervios periféricos, particularmente polineuropatías

sensitivas, en diferentes trabajos¹²¹⁻¹²³ mostrando alteraciones en los potenciales evocados sensitivos en las exploraciones neurofisiológicas. En estudios con animales se ha localizado la parkina en el axoplasma de los nervios periféricos mielinizados¹²³. En estos pacientes, la captación cardíaca en la gammagrafía con MIBG es normal, así como los otros test autonómicos y la afectación clínica medida con la escala SCOPA-AUT es menor que en la EP idiopática⁹¹. Estudios previos mencionaban, sin embargo, un aumento de la incidencia de síntomas vegetativos, particularmente genito-urinarios, que aparecían hasta en el 60% de los pacientes^{29,122,124}. Podemos concluir que nuestro trabajo contradice estas primeras impresiones y aporta, además, hallazgos histopatológicos postmortem de una paciente con una EP de larga evolución en la que se observa una discreta pérdida de fibras nerviosas simpáticas a nivel miocardio sin inclusiones patológicas. El estudio histológico cerebral mostró una pérdida importante de neuronas en la sustancia negra sin CL o NL, hallazgos que también se observan en la mayoría de los casos publicados^{29,125}.

Se puede concluir que la demostración de un fallo simpático postganglionar o periférico en un paciente con EP predice la presencia de depósitos de AS no solo a nivel cerebral, sino también a nivel periférico. Hemos podido demostrar esta hipótesis estudiando grupos homogéneos con genotipos y fenotipos clínicos bien caracterizados. La asociación de otros síntomas como los trastornos del sueño o el déficit de olfacción con los síntomas vegetativos permiten, además, definir endofenotipos con un cuadro clínico de peor pronóstico, en tanto en cuanto están ligados a la mayor presencia de deterioro cognitivo.

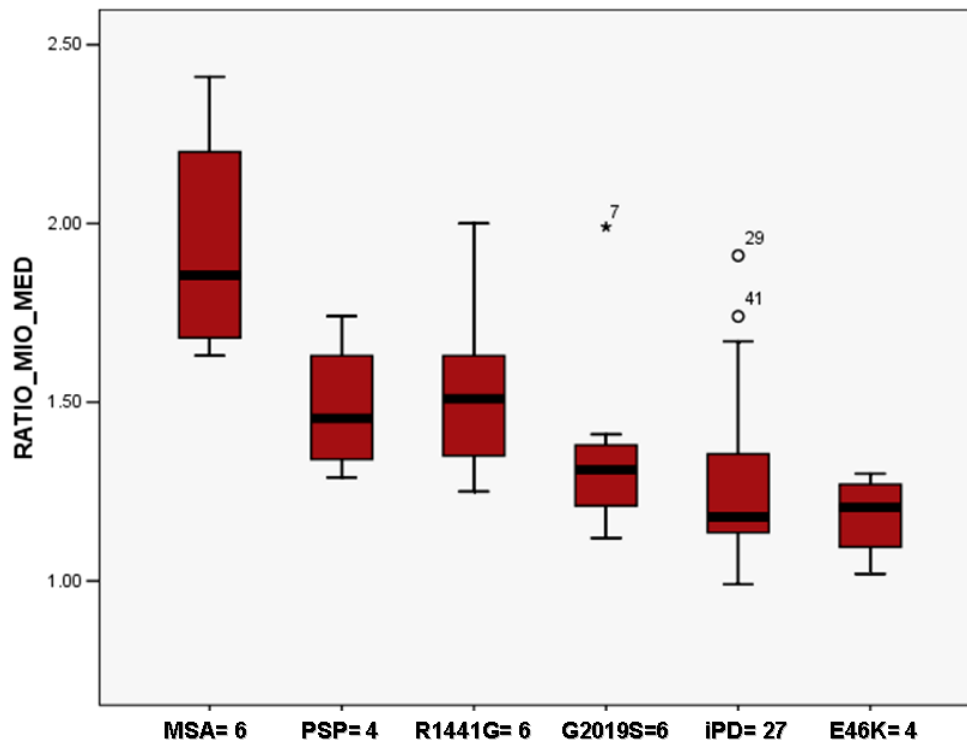


Figura 11. Diagrama de cajas. Se representa el ratio corazón/mediastino de captación tardío (4 horas) del radiofármaco MIBG en los estudios gammagráficos cardíacos de pacientes con parkinsonismos atípicos y enfermos de Parkinson con diferentes mutaciones genéticas. En el gráfico se puede apreciar que los índices de captación más bajos corresponden a los portadores de mutaciones en el gen SNCA y los más altos a parkinsonismos atípicos.

Conclusiones

Trabajo 1:

- a) La denervación simpática cardíaca en pacientes portadores de mutaciones del gen de la SNCA acontece previamente a la afectación de la vía nigroestriada y la aparición de los síntomas motores de la enfermedad.
- b) La afectación simpática precoz parece ser órgano-específica, afectando a los terminales simpáticos cardíacos y en fases más evolucionadas al resto del árbol vascular.

Trabajo 2:

- a) La afectación simpática cardíaca es homogénea en todos los pacientes portadores de la mutación E46K del gen SNCA tal y como se evidencia en estudios histológicos, en imagen funcional (gammagrafía cardíaca con MIBG) y en estudios funcionales (test hemodinámicos no invasivos).
- b) La ausencia de inmuno-tinción para TH en las fibras nerviosas epicárdicas de pacientes fallecidos portadores sintomáticos de la mutación E46K, confirma una completa denervación simpática cardíaca.
- c) Existe una ausencia de correlación entre el grado de denervación del miocardio y los síntomas vegetativos.
- d) Los hallazgos descritos nos permiten inferir que el estudio de los trastornos del sistema nervioso vegetativo puede ser un buen biomarcador de las sinucleinopatías.

Trabajo 3

- a) No existen diferencias clínicas medidas mediante la escala SCOPA-aut entre pacientes con EP portadores de mutaciones en el gen LRRK2 y pacientes con EP idiopática.
- b) Existe una menor afectación funcional del SNV y de captación MIBG en los portadores de mutaciones en LRRK2, tanto G2019S como R1441G, frente a los pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática.
- c) Los pacientes portadores de la mutación G2019S presentan mayor afectación de los test hemodinámicos no invasivos (maniobra de valsalva y tilt test) y mayor grado de denervación cardíaca que los pacientes con el genotipo R1441G.

Trabajo 4

- a) Los pacientes con mutaciones en el gen PARK2 presentan menor grado de afectación del sistema nervioso vegetativo en comparación con pacientes con EP idiopática.
- b) La ausencia de afectación SN vegetativo se relaciona con un fenotipo menos severo de la enfermedad. Los pacientes con estas mutaciones tras largos años de enfermedad tampoco muestran deterioro cognitivo o parasomnias como el TCSR.
- c) Se confirma que los parkinsonismos con ausencia de depósitos de AS presentan

una menor alteración del sistema nervioso vegetativo.

Trabajos 5 y 6

- a) Los trastornos del sistema nervioso vegetativo se asocian frecuentemente a otros síntomas no motores asociados a fenotipos más agresivos de la enfermedad como son los trastornos del sueño.
- b) Los pacientes que padecen trastornos de conducta del sueño REM y fallo autonómico de características postganglionar constituyen probablemente una fase premotora de EP.
- c) La presencia de fallo autonómico postganglionar o periférico en un paciente con TCSR orienta a desarrollo futuro de EP.

Bibliografía

1. Rajput AH, Birdi S. Epidemiology of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 1997;3:175-86.
2. Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H. 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol* 2013;9:13-24.
3. Lanska DJ. Chapter 33: the history of movement disorders. *Handb Clin Neurol* 2010;95:501-46.
4. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;388:839-40.
5. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett* 1998;251:205-8.
6. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276:2045-7.
7. Kaufmann H, Hague K, Perl D. Accumulation of alpha-synuclein in autonomic nerves in pure autonomic failure. *Neurology* 2001;56:980-1.
8. Braak H, Braak E, Yilmazer D, de Vos RA, Jansen EN, Bohl J. Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm* 1996;103:455-90.

9. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1170:615-22.
10. Jellinger KA. A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:730-40.
11. Kalaitzakis ME, Graeber MB, Gentleman SM, Pearce RK. Evidence against a reliable staging system of alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009;35:125-6.
12. Gray MT, Munoz DG, Schlossmacher MG, Gray DA, Woulfe JM. Protective effect of vagotomy suggests source organ for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2015.
13. Fearnley JM. Ageing and Parkinson's disease: SN regional selectivity. *Brain* 1991;114:2283-301.
14. Cersosimo MG, Raina GB, Pecci C, et al. Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. *J Neurol* 2013;260:1332-8.
15. Iranzo A. Parkinson disease and sleep: sleep-wake changes in the premotor stage of Parkinson disease; impaired olfaction and other prodromal features. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2013;13:373.
16. Sierra M, Sanchez-Juan P, Martinez-Rodriguez MI, et al. Olfaction and imaging biomarkers in premotor LRRK2 G2019S-associated Parkinson disease. *Neurology* 2013;80:621-6.

17. Pont-Sunyer C, Hotter A, Gaig C, et al. The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD study). *Mov Disord* 2015;30:229-37.
18. Litvan I, MacIntyre A, Goetz CG, et al. Accuracy of the clinical diagnoses of Lewy body disease, Parkinson disease, and dementia with Lewy bodies: a clinicopathologic study. *Arch Neurol* 1998;55:969-78.
19. Adler CH, Beach TG, Hentz JG, et al. Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: clinicopathologic study. *Neurology* 2014;83:406-12.
20. Rajput AH, Rajput A. Accuracy of Parkinson disease diagnosis unchanged in 2 decades. *Neurology* 2014;83:386-7.
21. Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, et al. Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain* 2008;131:642-50.
22. Wang N, Gibbons CH, Lafo J, Freeman R. alpha-Synuclein in cutaneous autonomic nerves. *Neurology* 2013;81:1604-10.
23. Hilton D, Stephens M, Kirk L, et al. Accumulation of alpha-synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2013.
24. Cersosimo MG, Benarroch EE. Autonomic involvement in Parkinson's disease: pathology, pathophysiology, clinical features and possible peripheral biomarkers. *J Neurol Sci* 2012;313:57-63.

25. Gowers W. Heredity in Diseases of the nervous system.: Introduction to a Discussion on Heredity at the Royal Society of Medicine. *Br Med J* 1908;2:1541-3.
26. Nussbaum RL, Polymeropoulos MH. Genetics of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 1997;6:1687-91.
27. Burn DJ, Mark MH, Playford ED, et al. Parkinson's disease in twins studied with 18F-dopa and positron emission tomography. *Neurology* 1992;42:1894-900.
28. Singleton AB, Farrer MJ, Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov Disord* 2013;28:14-23.
29. Doherty KM, Silveira-Moriyama L, Parkkinen L, et al. Parkin disease: a clinicopathologic entity? *JAMA Neurol* 2013;70:571-9.
30. Yamamura Y, Hattori N, Matsumine H, Kuzuhara S, Mizuno Y. Autosomal recessive early-onset parkinsonism with diurnal fluctuation: clinicopathologic characteristics and molecular genetic identification. *Brain Dev* 2000;22 Suppl 1:S87-91.
31. Wakabayashi K, Takahashi H. [Pathology of familial Parkinson's disease]. *Brain Nerve* 2007;59:851-64.
32. Tsuboi Y. Environmental-genetic interactions in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurobiol* 2012;21:123-8.

33. van de Berg WD, Hepp DH, Dijkstra AA, Rozemuller JA, Berendse HW, Foncke E. Patterns of alpha-synuclein pathology in incidental cases and clinical subtypes of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18 Suppl 1:S28-30.
34. Jellinger KA. Neuropathological spectrum of synucleinopathies. *Mov Disord* 2003;18 Suppl 6:S2-12.
35. Braak H, Del Tredici K. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2008;70:1916-25.
36. Jellinger KA. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Mov Disord* 2012;27:8-30.
37. Jellinger KA. Formation and development of Lewy pathology: a critical update. *J Neurol* 2009;256 Suppl 3:270-9.
38. Burke RE, Dauer WT, Vonsattel JP. A critical evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2008;64:485-91.
39. Braak H, Muller CM, Rub U, et al. Pathology associated with sporadic Parkinson's disease--where does it end? *J Neural Transm Suppl* 2006:89-97.
40. Attems J, Jellinger KA. The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2008;34:466-7.
41. Kaufmann H, Goldstein DS. Autonomic dysfunction in Parkinson disease. *Handb Clin Neurol* 2013;117:259-78.

42. Freeman R, Wieling W, Axelrod FB, et al. Consensus statement on the definition of orthostatic hypotension, neurally mediated syncope and the postural tachycardia syndrome. *Clin Auton Res* 2011;21:69-72.
43. Palma JA, Gomez-Esteban JC, Norcliffe-Kaufmann L, et al. Orthostatic Hypotension in Parkinson Disease: How Much You Fall or How Low You Go? *Mov Disord* 2015.
44. Rouco I, Gomez JC, Lezcano E, et al. [Utility of the study of the vegetative nervous system in the differential diagnosis between Parkinson's disease and multiple system atrophy]. *Neurologia* 2006;21:119-23.
45. Goldstein DS. Dysautonomia in Parkinson's disease: neurocardiological abnormalities. *Lancet Neurol* 2003;2:669-76.
46. Kim JS, Sung HY. Gastrointestinal Autonomic Dysfunction in Patients with Parkinson's Disease. *J Mov Disord* 2015;8:76-82.
47. Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2011;17:10-5.
48. Cadeddu F, Bentivoglio AR, Brandara F, Marniga G, Brisinda G, Maria G. Outlet type constipation in Parkinson's disease: results of botulinum toxin treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:997-1003.
49. Petrovitch H, Abbott RD, Ross GW, et al. Bowel movement frequency in late-life and substantia nigra neuron density at death. *Mov Disord* 2009;24:371-6.

50. Abbott RD, Petrovitch H, White LR, et al. Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology* 2001;57:456-62.
51. Sanchez-Ferro A, Rabano A, Catalan MJ, et al. In vivo gastric detection of alpha-synuclein inclusions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2015;30:517-24.
52. Araki I, Kitahara M, Oida T, Kuno S. Voiding dysfunction and Parkinson's disease: urodynamic abnormalities and urinary symptoms. *J Urol* 2000;164:1640-3.
53. Fitzmaurice H, Fowler CJ, Rickards D, et al. Micturition disturbance in Parkinson's disease. *Br J Urol* 1985;57:652-6.
54. Singer C, Weiner WJ, Sanchez-Ramos JR. Autonomic dysfunction in men with Parkinson's disease. *Eur Neurol* 1992;32:134-40.
55. Papatsoris AG, Deliveliotis C, Singer C, Papapetropoulos S. Erectile dysfunction in Parkinson's disease. *Urology* 2006;67:447-51.
56. Hirayama M. Sweating dysfunctions in Parkinson's disease. *J Neurol* 2006;253 Suppl 7:VII42-7.
57. Lipp A, Sandroni P, Ahlskog JE, et al. Prospective differentiation of multiple system atrophy from Parkinson disease, with and without autonomic failure. *Arch Neurol* 2009;66:742-50.

58. Tysnes OB, Muller B, Larsen JP. Are dysautonomic and sensory symptoms present in early Parkinson's disease? *Acta Neurol Scand Suppl* 2010;72-7.
59. Braak H, Sastre M, Bohl JR, de Vos RA, Del Tredici K. Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol* 2007;113:421-9.
60. Carmona-Abellan MM (Tesis doctoral). Incidencia de depósitos de α -sinucleína en el tejido cardíaco de sujetos neurológicamente asintomáticos y en macacos parkinsonianos y su correlación con la denervación simpática cardíaca. Pamplona: Universidad de Navarra; 2016.
61. Kim JB, Kim BJ, Koh SB, Park KW. Autonomic dysfunction according to disease progression in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20:303-7.
62. Minguéz-Castellanos A, Chamorro CE, Escamilla-Sevilla F, et al. Do alpha-synuclein aggregates in autonomic plexuses predate Lewy body disorders?: a cohort study. *Neurology* 2007;68:2012-8.
63. Kaufmann H, Nahm K, Purohit D, Wolfe D. Autonomic failure as the initial presentation of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2004;63:1093-5.
64. Dickson DW, Fujishiro H, Orr C, et al. Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15 Suppl 3:S1-5.

65. Hakusui S, Yasuda T, Yanagi T, et al. A radiological analysis of heart sympathetic functions with meta-[123I]iodobenzylguanidine in neurological patients with autonomic failure. *J Auton Nerv Syst* 1994;49:81-4.
66. Navarro-Otano J, Gaig C, Muxi A, et al. 123I-MIBG cardiac uptake, smell identification and 123I-FP-CIT SPECT in the differential diagnosis between vascular parkinsonism and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20:192-7.
67. Hamada K, Hirayama M, Watanabe H, et al. Onset age and severity of motor impairment are associated with reduction of myocardial 123I-MIBG uptake in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:423-6.
68. Yoshita M. Differentiation of idiopathic Parkinson's disease from striatonigral degeneration and progressive supranuclear palsy using iodine-123 meta-iodobenzylguanidine myocardial scintigraphy. *J Neurol Sci* 1998;155:60-7.
69. Yoshita M, Hayashi M, Hirai S. Decreased myocardial accumulation of 123I-meta-iodobenzyl guanidine in Parkinson's disease. *Nucl Med Commun* 1998;19:137-42.
70. Satoh A, Serita T, Seto M, et al. Loss of 123I-MIBG uptake by the heart in Parkinson's disease: assessment of cardiac sympathetic denervation and diagnostic value. *J Nucl Med* 1999;40:371-5.
71. Shibata M, Morita Y, Shimizu T, Takahashi K, Suzuki N. Cardiac parasympathetic dysfunction concurrent with cardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2009;276:79-83.

72. Okada Y, Ito Y, Aida J, Yasuhara M, Ohkawa S, Hirokawa K. Lewy bodies in the sinoatrial nodal ganglion: clinicopathological studies. *Pathol Int* 2004;54:682-7.
73. Orimo S. [The clinical significance of MIBG myocardial scintigraphy in Parkinson disease]. *Brain Nerve* 2012;64:403-12.
74. Miyamoto T, Miyamoto M, Inoue Y, Usui Y, Suzuki K, Hirata K. Reduced cardiac 123I-MIBG scintigraphy in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology* 2006;67:2236-8.
75. Orimo S, Oka T, Miura H, et al. Sympathetic cardiac denervation in Parkinson's disease and pure autonomic failure but not in multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:776-7.
76. Orimo S, Ozawa E, Oka T, et al. Different histopathology accounting for a decrease in myocardial MIBG uptake in PD and MSA. *Neurology* 2001;57:1140-1.
77. Berganzo K, Tijero B, Somme JH, et al. SCOPA-AUT scale in different parkinsonisms and its correlation with (123) I-MIBG cardiac scintigraphy. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18:45-8.
78. Bengel FM, Ueberfuhr P, Schiepel N, Nekolla SG, Reichart B, Schwaiger M. Effect of sympathetic reinnervation on cardiac performance after heart transplantation. *N Engl J Med* 2001;345:731-8.

79. Palma JA, Carmona-Abellan MM, Barriobero N, et al. Is cardiac function impaired in premotor Parkinson's disease? A retrospective cohort study. *Mov Disord* 2013;28:591-6.
80. Kallio M, Haapaniemi T, Turkka J, et al. Heart rate variability in patients with untreated Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2000;7:667-72.
81. Awerbuch GI, Sandyk R. Autonomic functions in the early stages of Parkinson's disease. *Int J Neurosci* 1992;64:7-14.
82. Rahman F, Pechnik S, Gross D, Sewell L, Goldstein DS. Low frequency power of heart rate variability reflects baroreflex function, not cardiac sympathetic innervation. *Clin Auton Res* 2011;21:133-41.
83. Postuma RB, Gagnon JF, Vendette M, Charland K, Montplaisir J. Manifestations of Parkinson disease differ in association with REM sleep behavior disorder. *Mov Disord* 2008;23:1665-72.
84. Drolet RE, Cannon JR, Montero L, Greenamyre JT. Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. *Neurobiol Dis* 2009;36:96-102.
85. Aldecoa I, Navarro-Otano J, Stefanova N, et al. Alpha-synuclein immunoreactivity patterns in the enteric nervous system. *Neurosci Lett* 2015;602:145-9.
86. Tolosa E, Vilas D. Peripheral synuclein tissue markers: a step closer to Parkinson's disease diagnosis. *Brain* 2015;138:2120-2.

87. Zange L, Noack C, Hahn K, Stenzel W, Lipp A. Phosphorylated alpha-synuclein in skin nerve fibres differentiates Parkinson's disease from multiple system atrophy. *Brain* 2015;138:2310-21.
88. Navarro-Otano J, Casanova-Molla J, Morales M, Valls-Sole J, Tolosa E. Cutaneous autonomic denervation in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 2015;122:1149-55.
89. 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.
90. Pimentel MM, Rodrigues FC, Leite MA, et al. Parkinson disease: alpha-synuclein mutational screening and new clinical insight into the p.E46K mutation. *Parkinsonism Relat Disord* 2015;21:586-9.
91. Visser M, Marinus J, Stiggelbout AM, Van Hilten JJ. Assessment of autonomic dysfunction in Parkinson's disease: the SCOPA-AUT. *Mov Disord* 2004;19:1306-12.
92. Ewing DJ, Clarke BF. Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982;285:916-8.
93. Low PA, Tomalia VA, Park KJ. Autonomic function tests: some clinical applications. *J Clin Neurol* 2013;9:1-8.
94. Fouad FM, Tarazi RC, Ferrario CM, Fighaly S, Alicandri C. Assessment of parasympathetic control of heart rate by a noninvasive method. *Am J Physiol* 1984;246:H838-42.

95. Vogel ER, Sandroni P, Low PA. Blood pressure recovery from Valsalva maneuver in patients with autonomic failure. *Neurology* 2005;65:1533-7.
96. Gibbons CH, Freeman R. Delayed orthostatic hypotension: a frequent cause of orthostatic intolerance. *Neurology* 2006;67:28-32.
97. Muxi A, Paredes P, Navales I, et al. Diagnostic cutoff points for (1)(2)(3)I-MIBG myocardial scintigraphy in a Caucasian population with Parkinson's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:1139-46.
98. Smith AG, Lessard M, Reyna S, Doudova M, Singleton JR. The diagnostic utility of Sudoscan for distal symmetric peripheral neuropathy. *J Diabetes Complications* 2014;28:511-6.
99. Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004;55:164-73.
100. Marras C, Schule B, Munhoz RP, et al. Phenotype in parkinsonian and nonparkinsonian LRRK2 G2019S mutation carriers. *Neurology* 2011;77:325-33.
101. Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Zarranz JJ, et al. Outcome of bilateral deep brain subthalamic stimulation in patients carrying the R1441G mutation in the LRRK2 dardarin gene. *Neurosurgery* 2008;62:857-62; discussion 62-3.
102. Somme JH, Molano Salazar A, Gonzalez A, et al. Cognitive and behavioral symptoms in Parkinson's disease patients with the G2019S and R1441G mutations of the LRRK2 gene. *Parkinsonism Relat Disord* 2015;21:494-9.

103. Goldstein DS, Imrich R, Peckham E, et al. Neurocirculatory and nigrostriatal abnormalities in Parkinson disease from LRRK2 mutation. *Neurology* 2007;69:1580-4.
104. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004;44:601-7.
105. Iranzo A, Molinuevo JL, Santamaria J, et al. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study. *Lancet Neurol* 2006;5:572-7.
106. Tijero B, Gomez-Esteban JC, Llorens V, et al. Cardiac sympathetic denervation precedes nigrostriatal loss in the E46K mutation of the alpha-synuclein gene (SNCA). *Clin Auton Res* 2010;20:267-9.
107. Pandey N, Schmidt RE, Galvin JE. The alpha-synuclein mutation E46K promotes aggregation in cultured cells. *Exp Neurol* 2006;197:515-20.
108. Zarranz JJ, Fernandez-Bedoya A, Lambarri I, et al. Abnormal sleep architecture is an early feature in the E46K familial synucleinopathy. *Mov Disord* 2005;20:1310-5.
109. Taki J, Yoshita M, Yamada M, Tonami N. Significance of 123I-MIBG scintigraphy as a pathophysiological indicator in the assessment of Parkinson's disease and related disorders: it can be a specific marker for Lewy body disease. *Ann Nucl Med* 2004;18:453-61.

110. Shields RW, Jr. Heart rate variability with deep breathing as a clinical test of cardiovagal function. *Cleve Clin J Med* 2009;76 Suppl 2:S37-40.
111. Singleton A, Gwinn-Hardy K, Sharabi Y, et al. Association between cardiac denervation and parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication. *Brain* 2004;127:768-72.
112. Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, et al. Cardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease linked to SNCA duplication. *Acta Neuropathol* 2008;116:575-7.
113. Gonzalez-Fernandez MC, Lezcano E, Ross OA, et al. Lrrk2-associated parkinsonism is a major cause of disease in Northern Spain. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13:509-15.
114. Ruiz-Martinez J, Gorostidi A, Ibanez B, et al. Penetrance in Parkinson's disease related to the LRRK2 R1441G mutation in the Basque country (Spain). *Mov Disord* 2010;25:2340-5.
115. Ruiz-Martinez J, Gorostidi A, Goyenechea E, et al. Olfactory deficits and cardiac 123I-MIBG in Parkinson's disease related to the LRRK2 R1441G and G2019S mutations. *Mov Disord* 2011;26:2026-31.
116. Ross OA, Whittle AJ, Cobb SA, et al. Lrrk2 R1441 substitution and progressive supranuclear palsy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006;32:23-5.
117. Marti-Masso JF, Ruiz-Martinez J, Bolano MJ, et al. Neuropathology of Parkinson's disease with the R1441G mutation in LRRK2. *Mov Disord* 2009;24:1998-2001.

118. Fernandez-Santiago R, Iranzo A, Gaig C, et al. Absence of LRRK2 mutations in a cohort of patients with idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology* 2016.
119. Bonifati V. Genetics of Parkinson's disease--state of the art, 2013. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20 Suppl 1:S23-8.
120. Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, et al. How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Ann Neurol* 2003;54:176-85.
121. Ohsawa Y, Kurokawa K, Sonoo M, et al. Reduced amplitude of the sural nerve sensory action potential in PARK2 patients. *Neurology* 2005;65:459-62.
122. Khan NL, Graham E, Critchley P, et al. Parkin disease: a phenotypic study of a large case series. *Brain* 2003;126:1279-92.
123. Hase A, Yamada H, Arai K, Sunada Y, Shimizu T, Matsumura K. Characterization of parkin in bovine peripheral nerve. *Brain Res* 2002;930:143-9.
124. Puschmann A. Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;19:407-15.
125. Gouider-Khouja N, Larnaout A, Amouri R, et al. Autosomal recessive parkinsonism linked to parkin gene in a Tunisian family. Clinical, genetic and pathological study. *Parkinsonism Relat Disord* 2003;9:247-51.

