

Estudio de citoquinas y metabolitos plasmáticos como posibles marcadores de la enfermedad de Parkinson

Sergi Casabella Sin

Máster Universitario en Bioinformática y Bioestadística UOC-UB
Sistema nervioso y respuesta inflamatoria

Consultora

Beatriz de la Puente Robles

Profesor responsable de la asignatura

Antoni Pérez Navarro

Junio 2021



Esta obra está sujeta a una licencia de
Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada
[3.0 España de Creative Common](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	<i>Estudio de citoquinas y metabolitos plasmáticos como posibles marcadores de la enfermedad de Parkinson</i>
Nombre del autor:	<i>Sergi Casabella Sin</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Beatriz de la Puente Robles</i>
Nombre del PRA:	<i>Antoni Pérez Navarro</i>
Fecha de entrega :	06/2021
Titulación:	<i>Máster Universitario en Bioinformática y Bioestadística UOC-UB</i>
Área del Trabajo Final:	<i>Sistema nervioso y respuesta inflamatoria</i>
Idioma del trabajo:	Español
Número de créditos:	15
Palabras clave	<i>Enfermedad de Parkinson, citoquina, neuroinflamación, neurodegeneración.</i>
Resumen del Trabajo	
<p>La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurológico progresivo que no tiene cura. Tras el diagnóstico clínico, no hay tratamiento farmacológico que pueda detener el avance de la enfermedad. Además, no hay en la actualidad un marcador biológico que pueda ayudar al diagnóstico precoz de la enfermedad. Este trabajo intenta contribuir a la búsqueda de biomarcadores eficaces para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson.</p> <p>En este trabajo analizamos estadísticamente los niveles de citoquinas en plasma y líquido cefalorraquídeo a partir de los datos recabados en el estudio clínico BioFIND. IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α e IFNγ fueron analizadas usando estadística inferencial para determinar posibles asociaciones entre ellas. A continuación, se llevaron a cabo estudios de correlación entre citoquinas y α-sinucleína o diferentes modificaciones post-traduccionales de la tubulina. También se realizaron estudios de correlación entre citoquinas y síntomas clínicos evaluados en la cohorte de estudio, mediante el test de evaluación cognitiva de Montreal (MoCA) o el cuestionario de detección de trastornos en la fase REM del sueño (RBDSQ). Además, se estudiaron los niveles plasmáticos de ciertos metabolitos entre sujetos control y pacientes con EP. Finalmente, se creó un modelo de regresión logística basado en las poliaminas ornitina, putrescina y N-acetilputrescina, además de los síntomas clínicos, para predecir la probabilidad de desarrollar EP.</p> <p>Con todo, este estudio intenta aportar luz al proceso de neuroinflamación asociado a la EP y proporciona nuevos conocimientos sobre la fisiopatología de la enfermedad.</p>	

Abstract:

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurological disorder and there is no cure for it. After clinical diagnosis, none of the existing pharmacologic treatments can stop the disease's advance. Moreover, there is not currently biomarker that can help early diagnose of PD. This work aspires to contribution in the seeking effective biomarkers for the diagnosis of Parkinson's disease.

In this study, we statistically analyzed plasma and cerebrospinal liquid cytokines levels using clinical data from the BioFIND study. IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α and IFN γ were analyzed using inferential statistics to determine associations between variables. Then, correlation studies between these cytokines and α -synuclein or post-translational modifications of tubulin were carried out. Correlation studies between cytokines and clinical symptoms assessed by the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) test or The Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder Screening Questionnaire (RBDSQ) were analyzed in the cohort of study. Levels of plasmatic metabolites between control subjects and PD patients were also studied. Finally, a logistic regression model was built based on the polyamines ornithine, putrescine, and N-acetylputrescine besides clinical symptoms to predict the probability of developing PD.

Taken together, the current study sheds light on the neuroinflammation process associated with PD and adds new insights on the physiopathology of the disease.

Índice

1.	RESUMEN	10
2.	INTRODUCCIÓN	12
2.1	CONTEXTO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	12
2.2	OBJETIVOS DEL TRABAJO	17
2.3	ENFOQUE Y MÉTODO SEGUIDO	17
2.4	PLANIFICACIÓN DEL TRABAJO	18
2.5	BREVE SUMARIO DE CONTRIBUCIONES Y PRODUCTOS OBTENIDOS.....	21
2.6	BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OTROS CAPÍTULOS DE LA MEMORIA	22
3.	ESTADO DEL ARTE	23
4.	METODOLOGÍA	26
4.1	ESTUDIO CLÍNICO BIOFIND	26
4.2	SOFTWARE R Y LIBRERÍAS UTILIZADAS.....	26
4.3	PRUEBAS DE NORMALIDAD Y TEST ESTADÍSTICOS	26
5.	RESULTADOS.....	28
5.1	INDIVIDUOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	28
5.2	ESTUDIO DE LAS CITOQUINAS EVALUADAS EN EL ESTUDIO	29
5.3	RELACIÓN DE CITOQUINAS CON SÍNTOMAS CLÍNICOS	36
5.4	CITOQUINAS Y SU RELACIÓN CON α -SINUCLÉINA.....	38
5.5	CITOQUINAS Y SU RELACIÓN CON ELEMENTOS DEL CITOESQUELETO	39
5.6	METABOLITOS PLASMÁTICOS	40
5.7	MODELO DE PREDICCIÓN	44
6.	DISCUSIÓN	46
7.	CONCLUSIONES	52
7.1	CONCLUSIONES	52
7.2	LÍNEAS DE FUTURO	53
7.3	SEGUIMIENTO DE LA PLANIFICACIÓN	53
8.	GLOSARIO	54
9.	BIBLIOGRAFÍA	56

10.	ANEXOS	64
10.1	RELACIÓN DE CITOQUINAS EN LCR EVALUADAS EN EL ESTUDIO	64
10.2	ESTUDIOS DE NORMALIDAD: MUESTRAS DE CITOQUINAS EN PLASMA.....	65
10.3	ESTUDIOS DE NORMALIDAD: MUESTRAS DE CITOQUINAS EN LCR	67
10.4	NIVELES PLASMÁTICOS DE DIFERENTES METABOLITOS	69
10.5	ESTUDIOS DE CORRELACIÓN EN CITOQUINAS.....	71
10.6	ESTUDIOS DE CORRELACIÓN CITOQUINAS VS. A-SINUCLEÍNA.....	76
10.7	ESTUDIOS DE CORRELACIÓN CITOQUINAS VS. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE LA TUBULINA	78
10.8	REGRESIÓN LOGÍSTICA.....	85

Lista de Figuras

Fig. 2.1. Diagrama de Gantt.....	20
Fig. 3.1. Número total de publicaciones anuales sobre la EP.....	23
Fig. 3.2. Estudio bibliométrico sobre la neuroinflamación en EP.....	24
Fig. 5.1. Distribución de individuos por género y diagnóstico incluidos en el estudio.....	28
Fig. 5.2. Niveles plasmáticos de las citoquinas evaluadas.	33
Fig. 5.3. Niveles en líquido cefalorraquídeo de las citoquinas evaluadas.....	34
Fig. 5.4. Correlación entre síntomas clínicos y la edad.	36
Fig. 5.5. Correlación entre niveles plasmáticos de citoquinas y síntomas clínicos.	37
Fig. 5.6. Correlación entre niveles plasmáticos de citoquinas y alteraciones del sueño.....	38
Fig. 5.7. Niveles de diferentes metabolitos plasmáticos en individuos control y pacientes con EP	42

Lista de Tablas

Tabla 2.1. Hitos a realizar y fecha de finalización correspondiente.....	21
Tabla 5.2 Test estadísticos aplicados y valores p para las muestras de citoquinas.....	31
Tabla 5.3. Coeficientes de correlación y valores p obtenidos en el análisis de correlación entre citoquinas.....	35
Tabla 5.4. Coeficientes de correlación y valores p obtenidos en el análisis de correlación entre citoquinas, y α -sinucleína, en plasma para individuos control y pacientes con EP.	39
Tabla 5.5. Coeficientes de correlación y valores p obtenidos en el análisis de correlación entre citoquinas y las diferentes modificaciones post-traduccionales de la tubulina.	40
Tabla 5.6. Valores p obtenidos al comparar grupo control y pacientes EP en la prueba t de Student para diferentes metabolitos plasmáticos.	41
Tabla 5.7. Resultados del modelo de regresión logística para las poliaminas.....	45

1. Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es una patología neurodegenerativa con una incidencia muy elevada en la población general, y se desconoce una cura para ella. En la actualidad, únicamente existen terapias que pretenden limitar los efectos de la enfermedad cuando estos se manifiestan. La falta de cura junto con la problemática del diagnóstico tardío de la enfermedad hace que la calidad de vida de los individuos afectados se vea gravemente afectada, de modo que se hace evidente la necesidad de hallar marcadores biológicos que permitan detectar la EP de manera precoz para actuar cuanto antes.

El presente trabajo analiza estadísticamente los datos existentes en la base de datos del estudio clínico BioFIND, que contiene muestras de individuos sanos y pacientes diagnosticados con EP, con tal de intentar hallar marcadores moleculares relacionados con la enfermedad. Concretamente, el análisis se ha centrado en el estudio de citoquinas y otras moléculas relacionados con diversos metabolismos, procedentes tanto del plasma sanguíneo como de líquido cefalorraquídeo (LCR).

Los resultados relacionan las diferentes concentraciones de las interleuquinas y moléculas de estudio con algunos procesos clínicos característicos de la EP. Se aprecia un papel relevante de las interleuquinas IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-10, sugiriendo una respuesta del sistema inmunitario en los procesos desencadenantes de la EP. Niveles de IL-2 y IL-6 se relacionan con la disminución de la capacidad cognitiva de los individuos afectados por la EP. En individuos sanos, pero no en pacientes EP, la IL-2 correlaciona significativamente con la proteína alfa-sinucleína, uno de los factores clave en el desarrollo de la EP. Niveles plasmáticos de IL-1 β muestran relación con las alteraciones del sueño que sufren los pacientes con EP, y junto con IL-8, muestran relación con afectaciones en la maquinaria relacionada íntimamente con la estructura celular, sugiriendo un papel relevante en la neurodegeneración característica de la enfermedad. Los efectos sobre el sistema dopaminérgico se hacen evidentes puesto que se observan mayores concentraciones plasmáticas de DOPAC y ácido homovalínico en pacientes con EP. Por último, se observa también un aumento en plasma de aminoácidos como la glutamina y β -alanina, en individuos

con EP, y se ha demostrado la implicación de moléculas relacionadas con el metabolismo de las poliaminas, concretamente ornitina, putrescina y N-acetilputrescina que muestran un aumento de sus niveles en plasma en los pacientes con EP en comparación con los sujetos control.

El presente trabajo permite distinguir moléculas relacionadas con la EP, de manera que sus niveles puedan ser monitorizados e interpretados como biomarcadores de la enfermedad. La principal aportación es destacar las interleuquinas y metabolitos citados anteriormente como posibles indicadores de la enfermedad y su estudio podría contribuir a un diagnóstico precoz para así evitar una mayor degeneración en los individuos afectados, puesto que la aparición de los primeros síntomas clínicos de la EP se produce cuando ésta se encuentra en una fase de desarrollo muy avanzado.

2. Introducción

2.1 Contexto y justificación del Trabajo

La enfermedad del Parkinson (EP) es una neuropatología progresiva que afecta al sistema nervioso (1). Se producen daños en las neuronas, principalmente en las productoras de la dopamina, volviéndose éstas disfuncionales, llegando hasta la muerte celular (2). Los síntomas aparecen gradualmente, siendo más evidentes conforme se desarrolla la enfermedad (1,3).

Las manifestaciones clínicas de la EP a nivel motor incluyen bradicinesia, rigidez, temblores e inestabilidad postural. Las manifestaciones no motoras son muy variadas e incluyen depresión, falta de autonomía o deterioro cognitivo (4–7). Otros síntomas no motores como la pérdida de olfato, trastornos del sueño o disfunción urinaria o sexual se están considerando en la actualidad como factores precursores a los síntomas motores.

La enfermedad de Parkinson es la segunda neuropatología más común después de la Enfermedad de Alzheimer (8), con una incidencia de 1 a 2 por 1000 en la población general. La edad es un factor de riesgo, ya que se observa una prevalencia de 1 por cada 100 en individuos mayores de 60 años; se estima que hay entre 7 y 10 millones de pacientes afectados por Parkinson en todo el mundo (7,9,10). Los factores ambientales, tales como la exposición a pesticidas, así como las lesiones cerebrales aumentan la probabilidad de desarrollo de la EP; por el contrario, se observan menos casos en fumadores o consumidores habituales de cafeína (1,11).

En la actualidad, el diagnóstico de la EP se basa únicamente en criterios clínicos, es decir, síntomas visibles, y la aparición de éstos implica que la enfermedad se encuentra en una fase de desarrollo muy avanzado. El diagnóstico definitivo se debe hacer post-mortem, ya que requiere confirmación de pérdida neuronal a nivel de la sustancia negra (*nigra*) del cerebro junto con la presencia de cuerpos de Lewy. La imposibilidad de realizar un diagnóstico precoz viene marcada por la falta de conocimiento sobre un marcador molecular definitivo que permita detectar la EP antes de la aparición de los síntomas clínicos; este hecho remarca la necesidad de hallar

marcadores moleculares que permitan el diagnóstico precoz de la EP. De este modo, se podría ralentizar y controlar la enfermedad en lugar de llevar a cabo tratamientos que únicamente actúan sobre los síntomas, tal como se está haciendo en la actualidad.

Se han determinado diversos factores que aumentan el riesgo de padecer EP. El primero y más determinante es la edad, puesto que se ha demostrado que la enfermedad de Parkinson tiene una incidencia mucho más elevada en población de edad avanzada, a partir de los 55 años (9,10). Sin embargo, hay otros factores de riesgo como pueden ser ambientales (exposición a pesticidas) o factores genéticos que predisponen al organismo a desarrollar mutaciones en genes que se relacionan de manera directa con la EP (11,12). En las últimas décadas, se ha empezado a tener en cuenta el papel que juega la neuroinflamación en el desarrollo de la enfermedad, que es uno de los muchos procesos que desencadenan y producen la muerte celular (4).

2.1.1 *Neuroinflamación y enfermedad de Parkinson*

La inflamación del sistema nervioso, denominada neuroinflamación, es un proceso complejo que involucra tanto al Sistema Nervioso Central como al Sistema Nervioso Periférico (12).

El sistema inmune, ante un estímulo dañino, genera un proceso inflamatorio controlado, con principio y fin, cuyo objetivo es destruir las células dañadas y restaurar la integridad tisular (13). El proceso inflamatorio es, por tanto, un mecanismo de defensa complejo, que debe ser regulado correctamente por el sistema inmune para restablecer el equilibrio (homeostasis) del organismo. Cuando este proceso inflamatorio se descontrola y es excesivo en duración o intensidad, es cuando se convierte en dañino (14,15).

Las citoquinas son moléculas fundamentales en el control de la inflamación. Son proteínas producidas por una gran variedad de células y ejercen su papel interaccionando con receptores específicos que solo se expresan en ciertos tipos celulares. Son muy potentes y actúan a bajas concentraciones y tienen una vida media muy corta que asegura que su acción se lleva a cabo en un estrecho margen de tiempo y generalmente en las cercanías de la zona donde se produjeron (acción

local), aunque en algunos casos son producidas en grandes cantidades y pasan a la circulación. Las citoquinas pueden ejercer una actividad funcional sobre varios tipos celulares. Algunas tienen funciones similares y otras antagónicas. Una misma citoquina puede tener una función concreta sobre un tipo de célula y una función completamente distinta sobre otro. Podemos decir que las citoquinas son, por tanto, la base de la respuesta inmune. Existen distintas clases de citoquinas, con múltiples funciones biológicas. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citoquina importante durante las primeras etapas de la respuesta inflamatoria. Son producidas por una gran variedad de células y tienen un papel central en infecciones virales, así como en la proliferación y muerte celular (apoptosis). El interferón gamma (INF γ) es secretado como señal de peligro, promueve la actividad antiviral y estimula la actividad citotóxica de las células *natural killer* (14). Dentro de las citoquinas también destacan las interleuquinas (IL) que se encargan principalmente de regular la activación de las células del sistema inmune. Algunas tienen funciones pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12) y otras anti-inflamatorias (IL-4, IL-10 e IL-13) regulando entre todas ellas el proceso inflamatorio desde el inicio hasta el fin.

En este aspecto, se han identificado diversas citoquinas cuya expresión se ve alterada en pacientes con EP. Entre ellas encontramos las interleuquinas IL-2, IL-6, IL-8 e IL-10, así como el INF γ o TNF- α (16).

2.1.2 Neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson

El citoesqueleto celular es la estructura proteica que confiere soporte interno y regula las actividades vitales de la célula. Los microtúbulos son proteínas que forman parte del citoesqueleto, y, por tanto, juegan un papel crítico en funciones vitales de la célula como el mantenimiento de su forma celular, el transporte intracelular o la mitosis, por ejemplo. Los microtúbulos son largos y huecos y están formados por subunidades de α -tubulina y β -tubulina. Estas moléculas de tubulina están sujetas a un gran número de modificaciones post-traduccionales que contemplan, entre otras, la tirosinación/detirosinación (adición o eliminación de un grupo funcional tirosina), generación de $\Delta 2$ -tubulina (una modificación irreversible) o la acetilación (tiene lugar en la α -tubulina). Estas modificaciones postraduccionales de la tubulina están involucradas en la regulación de la mayoría de las funciones de los microtúbulos. Responden a lo que se ha determinado llamar el *código de tubulina* cuya hipótesis

afirma que estas modificaciones atienden a un código específico que dictamina las funciones celulares (17).

Durante el proceso de degeneración celular se producen cambios en las modificaciones post-traduccionales que pueden llevar a la despolimerización de los microtúbulos (18), siendo este hecho la fase inicial de la muerte celular. En lo concerniente a la EP, el daño o disfunción de los microtúbulos puede representar un punto crítico en la pérdida de funcionalidad de las neuronas dopaminérgicas y podría ser la causa subyacente de su muerte (19). Por tanto, las aberraciones en el patrón normal de estas modificaciones post-traduccionales podrían conducir directa o indirectamente a enfermedades neurodegenerativas (20,21).

Muchos factores pueden afectar a la estabilización de los microtúbulos. Pueden ser factores químicos (toxinas como MTPP o plaguicidas como rotenona) o moleculares (proteínas como la α -sinucleína o la proteína tau). La α -sinucleína es una proteína que actúa directamente sobre los microtúbulos causando su desestabilización (22). Por otro lado, esta proteína es ampliamente conocida por su papel relevante en la patogénesis de la EP, puesto que los agregados de α -sinucleína han sido identificados como los componentes principales de los cuerpos de Lewy. Estos agregados se encuentran en las neuronas y causan su muerte. Mayoritariamente se encuentran en las neuronas del cerebro de los pacientes con EP, provocando la sintomatología motora y cognitiva propia de la enfermedad. Pero estos agregados no solo están confinados al sistema nervioso central, también se encuentran en el sistema nervioso autónomo (23) pudiendo ser los responsables también de los síntomas no motores característicos de la enfermedad (estreñimiento, descontrol de esfínteres, disfunción sexual, etc.).

2.1.3 *Síntomas no motores en la enfermedad de Parkinson*

Hay una variedad de tratamientos farmacológicos que proporcionan un alivio significativo de los síntomas motores basados en el aumento de la disponibilidad de dopamina en el cerebro. Otros tipos de tratamiento contemplan procedimientos quirúrgicos para realizar estimulación cerebral profunda (DBS, del inglés *Deep Brain Stimulation*) que consiste en la implantación de electrodos en el cerebro y éstos,

conectados a un pequeño generador de impulsos, inducen estímulos que bloquean las señales responsables de los síntomas motores del Parkinson (1,4).

En los últimos años se ha dado especial importancia a la presencia de los síntomas no motores como los trastornos del sueño o los déficits cognitivos (24–27). La pérdida de capacidad cognitiva se caracteriza por una incapacidad de regular el propio comportamiento, así como la incapacidad de clasificar y planear tareas. Además, tanto las representaciones visuoespaciales como la memoria se ven alteradas (28,29). La evaluación del estado mental se considera el primer paso en el proceso de detección temprana de deterioro cognitivo. Uno de los instrumentos utilizados es el test de evaluación cognitiva de Montreal –Montreal Cognitive Assessment (MoCA)– (30). Es un instrumento de fácil aplicación: constituye una batería de pruebas breves, con una duración aproximada de 10-12 minutos, cuyo propósito es detectar la presencia de deterioro cognitivo leve y diferenciarlo de alteraciones cognitivas consecuentes al envejecimiento normal. Evalúa las funciones ejecutivas, la capacidad visuoespacial, la memoria, la atención, la concentración y la memoria de trabajo, el lenguaje y la orientación. Las puntuaciones oscilan de 0 a 30 y se considera normal una puntuación de 26 o superior (31).

El trastorno de conducta durante el sueño REM –*REM Sleep Behavior Disorder* (RBD)– se caracteriza por conductas motoras vigorosas, pesadillas y la ausencia de atonía muscular durante el sueño REM (32,33). Generalmente ocurre en personas de más de 55 años. Es una parasomnia, es decir una alteración de la conducta durante el sueño. Los avances conseguidos durante los últimos años han demostrado que no es una simple alteración del sueño, sino que en muchos casos es la primera manifestación de una enfermedad neurodegenerativa como la EP.

Para evaluar posibles trastornos de sueño también hay diversas pruebas. Una de ellas, el cuestionario RBDSQ –*The REM Sleep Behavior Disorder Screening Questionnaire*– evalúa diferentes aspectos relacionados con la fase REM del sueño. Es una prueba que consta de 13 preguntas y cada pregunta afirmativa tiene el valor de un punto. El score final es la suma de la puntuación obtenida. Un score con valor mayor o igual a 5 determina que el individuo sufre algún tipo de alteración del sueño.

Teniendo en cuenta la sintomatología de la enfermedad y que en la actualidad no se conoce ninguna cura para la EP, se hace evidente la necesidad de encontrar marcadores moleculares que permitan llevar a cabo un diagnóstico precoz de la enfermedad y evitar o ralentizar su desarrollo.

2.2 Objetivos del Trabajo

El objetivo general del presente trabajo es el estudio de ciertas moléculas implicadas en la neuroinflamación y su posible relación con la EP. Para ello, se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Recopilación y lectura de la literatura científica publicada
- Estudio comparativo de los niveles de citoquinas en individuos sanos y pacientes con EP, a partir de muestras clínicas de ambos grupos, tanto en plasma como en LCR.
- Análisis estadístico inferencial de los niveles de las citoquinas comparadas.
- Análisis de correlación entre citoquinas y otras moléculas implicadas en neuroinflamación
- Estudio comparativo de los niveles plasmáticos de neurotransmisores y metabolitos relacionados en individuos sanos y pacientes con EP.
- Creación de un modelo de predicción de EP.

2.3 Enfoque y método seguido

Con la finalidad de recopilar información acerca de la EP se accede a la base de datos del estudio clínico BioFIND en el que colaboraron múltiples organizaciones académicas de EE.UU. Se recopilaron, entre otras, muestras de LCR y plasma en más de 200 individuos que incluyen pacientes con EP e individuos sanos.

Una vez definidos los datos de interés para el estudio, se emplearon métodos estadísticos para analizar los diferentes tipos de moléculas que participan en los procesos de neuroinflamación. De este modo, se pretende detectar los posibles cambios de dichas moléculas en pacientes que sufren EP respecto a los individuos sanos.

2.4 Planificación del Trabajo

El primer paso que ha sido necesario llevar a cabo para realizar el trabajo ha sido la solicitud de acceso a la base de datos BioFIND– el estudio clínico que será explicado posteriormente– para poder acceder a los resultados de los estudios que son utilizados para el posterior análisis. A partir de ese momento, se decidió organizar el TFM siguiendo unos objetivos definidos, con tal de gestionar de la mejor manera posible el tiempo dedicado a cada uno de ellos.

2.4.1 Planificación de los objetivos

Los objetivos que se persiguen con este TFM son múltiples, por lo que la organización de las tareas es vital. Es por ello que se decidió organizarlo de la siguiente manera:

- **PEC0: Definición de los contenidos del trabajo**
 - Fecha de inicio: 17/02/21
 - Fecha límite: 01/03/21
 - **Objetivos y tareas:**
 - Solicitud de acceso a la base de datos BioFIND.
 - Búsqueda de bibliografía específica sobre la EP.
 - Iniciación en el uso del software VOSviewer, que permite analizar redes bibliométricas.

- **PEC1: Plan de trabajo**
 - Fecha de inicio: 02/03/21
 - Fecha límite: 16/03/21
 - **Objetivos y tareas:**
 - Análisis bibliométrico con VOSviewer enfocado en neuroinflamación y enfermedad de Parkinson.
 - Selección de los proyectos de BioFIND para el análisis estadístico.

- **PEC2: Desarrollo del trabajo - fase 1**
 - Fecha de inicio: 17/03/21
 - Fecha límite: 19/04/21
 - **Objetivos y tareas:**

- Depuración de datos, detección de valores nulos, definición de las muestras a evaluar.
 - Estadística descriptiva de cada marcador por sexo y paciente.
 - Estudio de normalidad de cada conjunto de muestras a evaluar.
 - Análisis estadístico inferencial de los distintos elementos moleculares seleccionados y representación gráfica con ggplot2 (RStudio).
- PEC3: *Desarrollo del trabajo - fase 2*
 - Fecha de inicio: 20/04/21
 - Fecha límite: 17/05/21
 - Objetivos y tareas:
 - Análisis de correlación entre citoquinas y otras moléculas de interés.
 - Análisis comparativo de metabolitos plasmáticos relacionados con neurodegeneración.
 - Análisis estadístico descriptivo de las diferentes variables y representación gráfica con ggplot2.
 - Creación de un modelo de regresión logística a partir de posibles diferencias detectadas en el análisis anterior.
 - PEC4: Cierre de la memoria
 - Fecha de inicio: 18/05/21
 - Fecha límite: 08/06/21
 - Objetivos y tareas:
 - Redacción de la memoria
 - PEC5: Elaboración de la presentación y defensa pública
 - Fecha de inicio: 10/06/21
 - Fecha límite: 23/06/21
 - Objetivos y tareas:
 - Elaboración de la presentación
 - Defensa pública

2.4.2 Calendario

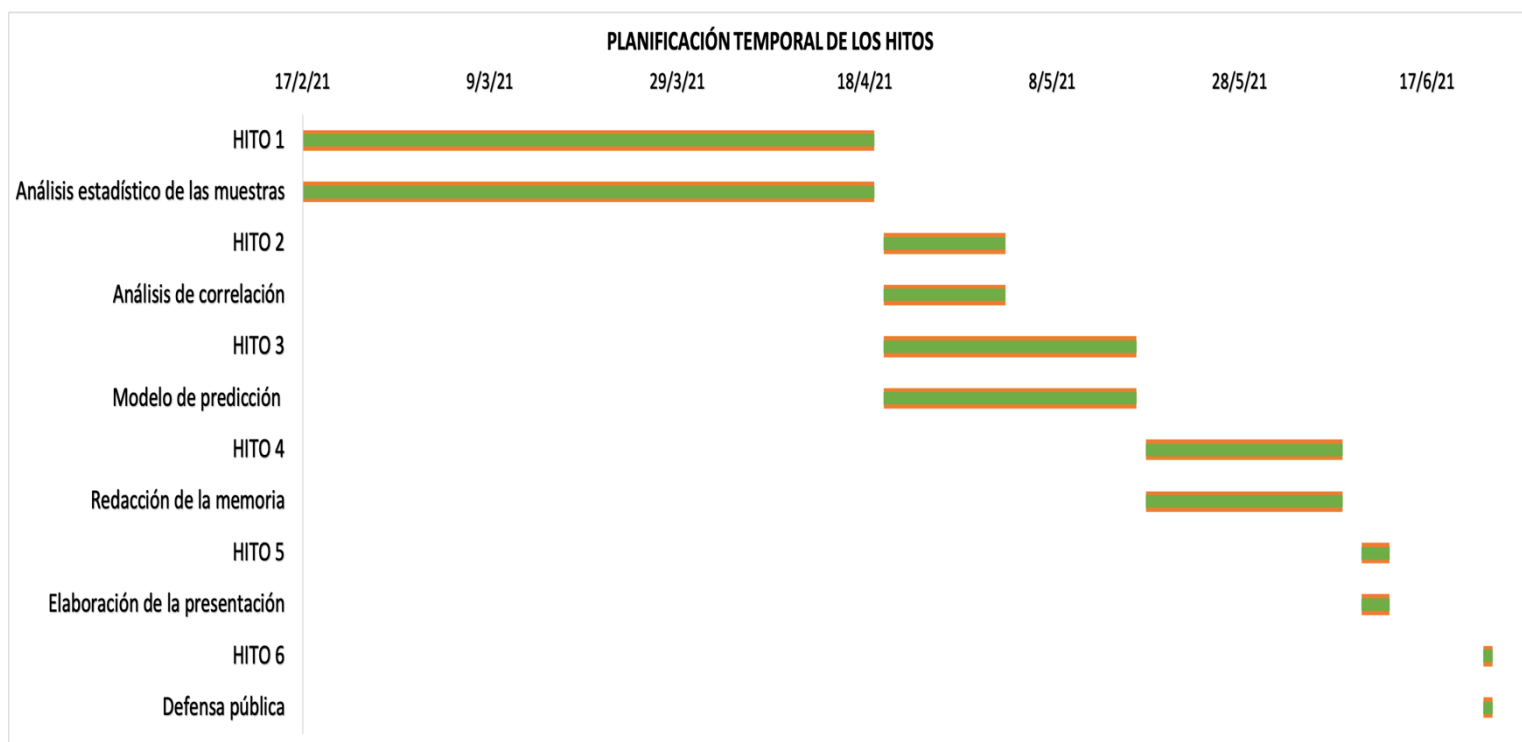


Fig. 2.1. Diagrama de Gantt. Representa de los hitos realizados, con sus fechas de inicio y finalización.

El diagrama de Gantt permite representar de manera visual la organización de las tareas a llevar a cabo, junto con sus fechas de inicio y finalización correspondientes. Las barras horizontales representan la duración de cada tarea, y el color de relleno el progreso de cada una. En este caso, todas las barras de progreso son de color verde, puesto que se han completado todos los hitos.

2.4.3 *Hitos*

HITO	FECHA DE FINALIZACIÓN
1. Finalización del análisis estadístico inferencial de las muestras de paciente	19/04/21
2. Finalización de los análisis de correlación	3/5/21
3. Finalización del modelo de predicción	17/05/21
4. Redacción de la memoria	08/06/21
5. Elaboración de la presentación	13/06/21
6. Defensa pública	23/06/21

Tabla 2.1. Hitos a realizar y fecha de finalización correspondiente.

2.5 Breve resumen de contribuciones y productos obtenidos

A partir de los análisis estadísticos realizados en el presente trabajo se van a obtener los siguientes productos:

- Aportación de nuevos resultados al estudio clínico BioFIND a partir de sus proyectos 132 y 106, con el fin de contribuir en su objetivo de descubrir nuevos marcadores moleculares de la EP.
- Destacar la importancia de ciertas citoquinas que podrían tener un papel relevante en la EP.
- Un listado de marcadores moleculares plasmáticos que podrían contribuir en el diagnóstico precoz de la EP.
- Un modelo de predicción de la EP a partir ciertos metabolitos plasmáticos.
- La memoria y la presentación final del trabajo realizado.

2.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria

La presente memoria está formada por 11 capítulos, donde cada uno de ellos trata un aspecto concreto del trabajo realizado.

El siguiente capítulo (número 3) consiste en el estado del arte, en el que se analiza y recopila la información de publicaciones científicas referentes al tema de estudio de los últimos años. Permite ver, por un lado, la evolución de los estudios sobre la EP a lo largo de los años, así como la aparición paulatina de métodos y enfoques distintos para hacerle frente.

El cuarto capítulo hace referencia a la metodología. En él se detallan las fuentes de las que se han obtenido los datos para el estudio, así como las diferentes técnicas estadísticas empleadas para analizar dichos datos y hacer representaciones gráficas, con tal de hacer más comprensibles los resultados.

A dichos resultados hace referencia el quinto capítulo, en el que se recopilan los datos que se derivan del conjunto de análisis llevados a cabo. Se presentan de manera detallada, destacando los resultados con mayor importancia, y se relacionan con la metodología seguida a lo largo del trabajo.

El capítulo número 6 comprende la discusión, en el que se intenta responder a las preguntas e hipótesis planteadas al inicio del TFM mediante la interpretación de los resultados obtenidos. En él se detalla si éstos permiten dar respuesta a los problemas planteados al inicio.

El capítulo siete se centra en las conclusiones. En él se valorará el conocimiento generado a lo largo del trabajo, así como el hecho de si se han logrado los objetivos planteados al inicio. Se muestran qué cuestiones y aspectos no han podido ser analizados en este TFM, con tal de plantearlos para próximos trabajos

Por último, los capítulos ocho, nueve y diez comprenden el glosario con los términos utilizados a lo largo del trabajo, la bibliografía y los anexos, respectivamente.

3. Estado del arte

Al inicio del presente trabajo, se llevó a cabo una revisión bibliográfica de la literatura científica publicada sobre la enfermedad de Parkinson hasta la fecha. Se utilizó la base de datos PubMed, que contiene más de 32 millones de citas de artículos científicos. Dicha revisión permitió comprobar que existen cerca de 96.000 publicaciones cuya palabra clave (*keyword*) es “Parkinson’s Disease” aparecidas entre 1923 y 2021; sin embargo, si se añade “cytokines” a la búsqueda, los resultados se reducen considerablemente, con poco más de 2200 artículos publicados entre 1993 y la actualidad. La Figura 3.1 muestra la evolución del número total de publicaciones al año en barras negras. Las barras naranjas representan los artículos en los que se citan las citoquinas.

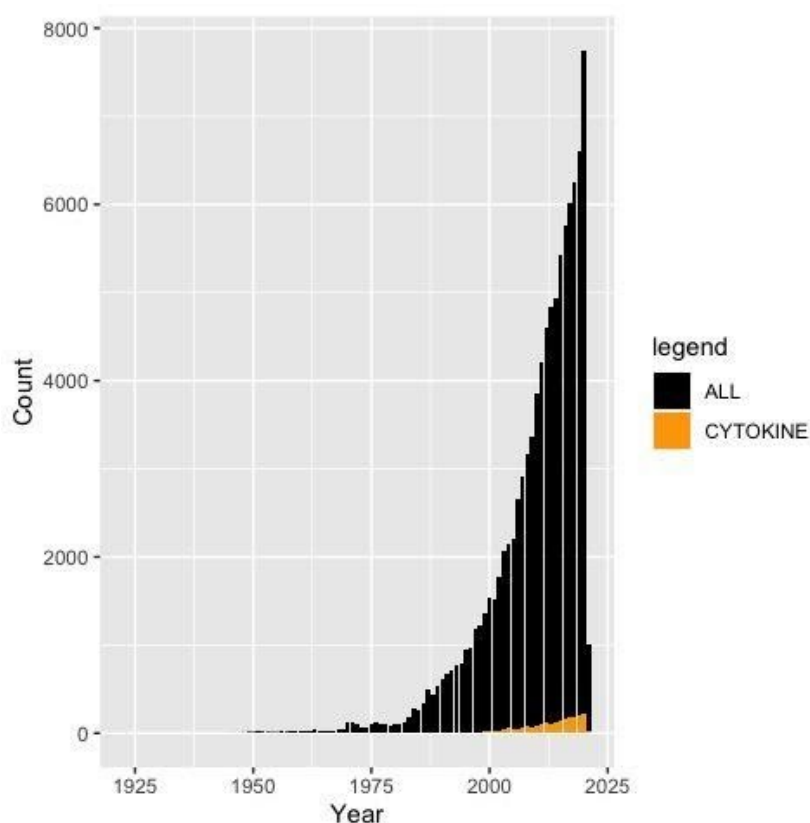


Fig. 3.1. Número total de publicaciones anuales sobre la EP. Se muestra, en barras negras, la evolución del número total de publicaciones (Count) por año (Year) relacionadas con la EP. Las barras naranjas representan los artículos en los que se cita, además, las citoquinas.

Es necesario remarcar que las barras naranjas, que hacen referencia a aquellos artículos que citan la palabra clave “citoquina”, empiezan a partir de 1993. Esto significa que, en los estudios llevados a cabo hasta la fecha, no se tenía en cuenta la neuroinflamación. Sin embargo, a partir de ese momento, se empieza a relacionar dicho factor como uno de los elementos clave (entre otros) del desarrollo de la EP. Así pues, los estudios orientados en la neuroinflamación empiezan a principios de la década de los noventa, por lo que el tema es relativamente novedoso dentro de la evolución del estudio de la enfermedad.

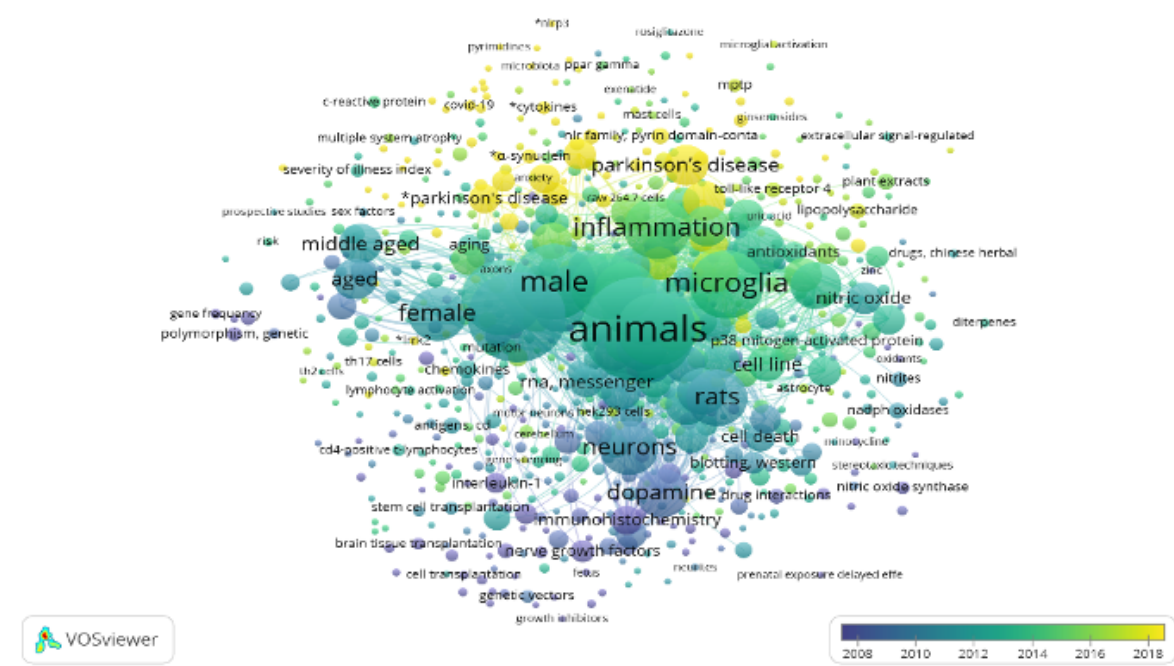


Fig. 3.2. Estudio bibliométrico sobre la neuroinflamación en EP. Se muestra el resultado por palabras clave (*keyword*). El tamaño de letra aumenta en función del mayor número de veces que se cita la palabra clave en la literatura. El color refleja el año de publicación de los artículos obtenidos desde 2008 hasta la actualidad.

Se buscó información acerca de las palabras clave que más se citan en los estudios relacionados con la EP utilizando el software libre VOSviewer (34). El programa permite hacer un estudio bibliométrico en el que se muestran las palabras más citadas teniendo en cuenta los parámetros fijados (en este caso, EP y neuroinflamación). La Figura 3.2 ilustra los resultados obtenidos y muestra las palabras clave que aparecen con más frecuencia en el centro y con mayor tamaño de letra, mientras que los colores de fondo representan los años de publicación de los artículos. La figura muestra que los artículos publicados relacionados con la EP citan con mayor frecuencia las

palabras “inflammation” o “microglia”, mientras que la palabra “cytokines” aparece en menor frecuencia (tamaño menor) y a partir de 2018 (color amarillo), con lo que la mayoría de estudios que incluyen esta palabra clave se publicaron a partir de esa fecha.

El objetivo del presente trabajo es aportar información que ayude a descifrar el papel de la neuroinflamación en la enfermedad del Parkinson, mediante el análisis de las principales moléculas implicadas en dicho proceso. El estudio de los niveles de citoquinas en plasma y LCR, así como de neurotransmisores y otros metabolitos plasmáticos, podría permitir determinar qué moléculas son marcadores de la EP. La importante prevalencia que tiene la EP en la sociedad, junto con el hecho de que se trata de una enfermedad sin cura, ponen de manifiesto la necesidad de hallar técnicas que permitan llevar a cabo un diagnóstico temprano en los pacientes de más riesgo. Así pues, la determinación de ciertas moléculas como marcadores de la EP ha de ser una herramienta que acelere su diagnóstico, permitiendo actuar en consecuencia sin esperar a que los síntomas sean evidentes e irreversibles, mejorando así la calidad de vida de los individuos afectados.

4. Metodología

4.1 Estudio clínico BioFIND

El estudio clínico BioFIND (Fox Investigation for New Discovery of Biomarkers in Parkinson's Disease) fue creado con la intención de descubrir y verificar marcadores moleculares de la enfermedad de Parkinson gracias a la Fundación Michael J Fox (MJFF, The Michael J Fox Foundation, <https://www.michaeljfox.org/>) y financiado a través de los fondos de esta fundación (MJFF Fox Trial Finder, <https://foxtrialfinder.michaeljfox.org>). La recolección de muestras se hizo entre 2012 y 2015 en Estados Unidos a partir de diversos fluidos orgánicos que fueron posteriormente analizados. Se generó una base de datos de acceso libre que requiere un registro previo junto con una exposición de los motivos que llevan a solicitar el acceso a los resultados del estudio.

4.2 Software R y librerías utilizadas

El análisis de datos ha sido llevado a cabo utilizando el lenguaje de programación R (35) que permite hacer análisis estadísticos y se ha llevado a cabo en el entorno de trabajo RStudio_(36). Se han instalado los siguientes paquetes procedentes del repositorio CRAN:

- *ggplot2* (37) y *ggpubr* (38): librerías específicas para la creación de gráficos más complejos que los que permite hacer el programario de origen.
- *dplyr* (39) y *tidyr* (40): permiten modificar y hacer operaciones con *data frames*, tales como el filtraje, selección o sumarios de datos.
- *car* (41): ofrece funciones para trabajar con modelos lineales o modelos logit.

4.3 Pruebas de normalidad y test estadísticos

Las primeras pruebas estadísticas aplicadas han sido tests de normalidad que permiten conocer la distribución de los datos. Se parte de la hipótesis nula que afirma que los datos proceden de una población distribuida normalmente en forma de campana de Gauss. Dichos tests son ejecutados mediante cálculos numéricos y representaciones gráficas. Se ha aplicado el test de Kolmogorov-Smirnov con la

modificación de Lilliefors para tamaños de muestra muy grande y el test de Shapiro-Wilk para tamaños de muestra pequeño.

Para testar la homocedasticidad se han empleado el test de Levene, un test paramétrico utilizado para verificar si la varianza es constante en muestras cuya distribución es normal, y el test de Fligner-Killeen, que es no paramétrico y se emplea con muestras que no siguen una normal.

Los test de comparación entre grupos parten de la hipótesis nula que afirma que las diferencias entre dichos grupos no son significativas, pero si el valor p obtenido es inferior al nivel de significación de 0.05, se descarta dicha hipótesis y se concluye que sí hay diferencias significativas. Cuando la muestra es paramétrica -cumple con las condiciones de normalidad en la distribución y homocedasticidad en las varianzas- se emplea la prueba t de Student. En el caso de muestras que no cumplan las condiciones de normalidad, se usa el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Posteriormente se ha estudiado la relación entre los marcadores de neuroinflamación y parámetros de neurodegeneración. Para ello se ha realizado análisis de correlación de Pearson del que se obtiene un coeficiente denominado ρ (rho) que mide el grado de relación que existe entre dos variables, describiendo tanto la dirección como la fuerza de dicha interacción. Cuánto más se acerca a -1 indica que la correlación es fuertemente negativa, con lo que un aumento en el valor de una variable provoca una disminución en la otra; en cambio, cuando el coeficiente es cercano a +1, la correlación es positiva y el aumento de una variable hace que la otra también aumente. Si el valor de ρ es 0, significa que la correlación es inexistente o muy poco marcada. Además, se ha calculado el valor p para saber si la correlación entre las moléculas es significativa.

Por último, se ha creado un modelo de regresión logística o modelo logit para estimar la probabilidad de que un individuo pueda desarrollar la EP. Se utiliza la variable binaria que sólo puede tomar dos valores: padecer o no la EP. Del modelo logit se desprende un valor que hace referencia a la probabilidad de que las variables independientes utilizadas puedan predecir el diagnóstico, es decir, la EP.

5. Resultados

5.1 Individuos incluidos en el estudio

La cohorte de este estudio clínico lo conforman individuos sanos (control) e individuos con EP, en número similar tanto de mujeres como de hombres. La Figura 5.1A muestra el número total de hombres y mujeres reclutados que forman parte de la cohorte de estudio, siendo ligeramente superior el número de hombres con EP ($n=78$), comparado con el grupo de hombres control ($n=49$). El número de las mujeres fue más homogéneo entre el grupo control ($n=52$) y las mujeres con EP ($n=44$).

Respecto a la edad de los individuos, la Figura 5.1B muestra la gráfica de cajas y bigotes que permite ver la mediana (línea horizontal central de cada caja) y los valores máximo y mínimo de edad para cada grupo del estudio clínico (los extremos de los bigotes). La edad mínima fue de 54 años (incluido en el grupo de mujeres control) y la edad máxima fue de 85 años (individuo incluido en el grupo de hombres con EP).

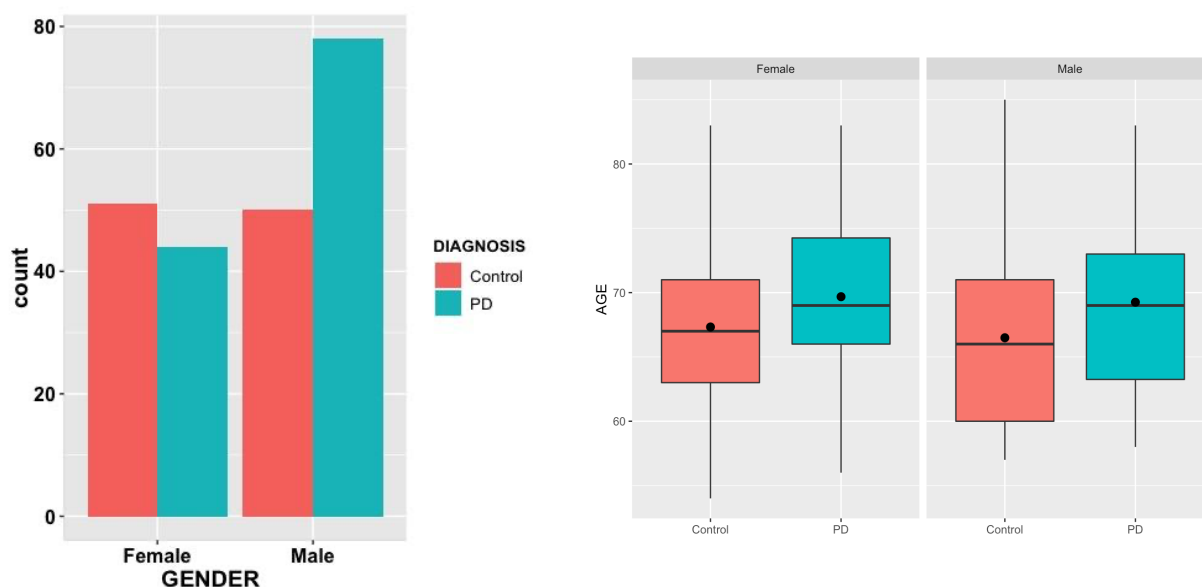


Fig. 5.1. Distribución de individuos por género y diagnóstico incluidos en el estudio. (A) Número de individuos incluidos en el estudio. (B) Edad de cada grupo estudiado por sexo y diagnóstico. El punto negro de cada caja representa la media y la línea horizontal central la mediana.

5.2 Estudio de las citoquinas evaluadas en el estudio

5.2.1 Muestras a evaluar

Se analizaron los datos correspondientes al proyecto número132 de BioFIND que incluye los datos de citoquinas detectadas con el kit V-PLEX Proinflammatory Panel 1 (human) de MSD (42) (<https://www.mesoscale.com>).

Estudios previos muestran que la prevalencia de la enfermedad es 1,5 a 2 veces mayor en hombres que en mujeres (43). Además, en general, las mujeres presentan un fenotipo más benigno, con una tasa de empeoramiento motor más lenta y menos vacilante (44).

La Tabla 5.1 muestra el número total de valores válidos, nulos y totales, así como el porcentaje de valores válidos por citoquina, género y diagnóstico en plasma. (Los valores obtenidos para el LCR se muestran en el Anexo 10.1). La falta de datos para muchas de las citoquinas analizadas y el escaso valor del resto, hizo imposible el estudio comparativo entre géneros.

Una vez conocido el tamaño muestral de cada grupo experimental, se realizó el estudio comparativo entre control y EP sin tener en cuenta el género del individuo. Además, se descartaron del estudio estadístico las citoquinas IL-4, IL-12p70 e IL-13 por presentar 90-100% de valores nulos.

5.2.2 Estudios de normalidad y comparación de muestras

Para estimar si nuestras variables tienen distribución normal o no, y puesto que incluyen menos de 50 valores, comprobamos la normalidad con el test de Shapiro-Wilk. Este test plantea la hipótesis nula que una muestra proviene de una distribución normal y una hipótesis alternativa que sostiene que la distribución no es normal. Si el valor-p del test es inferior a 0.05, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que no sigue una distribución normal. (En los Anexo 10.2 y 10.3 se incluyen los gráficos de histogramas y *qq-plot* para cada variable).

<i>Citoquina</i>	<i>Género</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>Valores totales</i>	<i>Valores nulos (NA)</i>	<i>Valores válidos</i>	<i>% valores NA</i>
IL-10	Female	Control	14	6	8	43%
IL-10	Male	Control	16	7	9	44%
IL-10	Female	PD	10	3	7	30%
IL-10	Male	PD	20	8	12	40%
IL-12p70	Female	Control	14	12	2	86%
IL-12p70	Male	Control	16	15	1	94%
IL-12p70	Female	PD	10	10	0	100%
IL-12p70	Male	PD	20	18	2	90%
IL-13	Female	Control	14	13	1	93%
IL-13	Male	Control	16	13	3	81%
IL-13	Female	PD	10	9	1	90%
IL-13	Male	PD	20	19	1	95%
IL-1 β	Female	Control	14	4	10	29%
IL-1 β	Male	Control	16	7	9	44%
IL-1 β	Female	PD	10	3	7	30%
IL-1 β	Male	PD	20	4	16	20%
IL-2	Female	Control	14	9	5	64%
IL-2	Male	Control	16	11	5	69%
IL-2	Female	PD	10	6	4	60%
IL-2	Male	PD	20	15	5	75%
IL-4	Female	Control	14	14	0	100%
IL-4	Male	Control	16	16	0	100%
IL-4	Female	PD	10	10	0	100%
IL-4	Male	PD	20	20	0	100%
IL-6	Mujer	Control	25	1	24	4%
IL-6	Mujer	EP	19	0	19	0%
IL-6	Hombre	Control	35	1	34	3%
IL-6	Hombre	EP	39	1	38	3%
IL-8	Mujer	Control	25	0	25	0%
IL-8	Mujer	EP	19	0	19	0%
IL-8	Hombre	Control	35	1	34	3%
IL-8	Hombre	EP	39	0	39	0%
INF-g	Mujer	Control	25	8	17	32%
INF-g	Mujer	EP	19	8	11	42%
INF-g	Hombre	Control	35	16	19	46%
INF-g	Hombre	EP	39	20	19	51%
TNF-alpha	Mujer	Control	25	10	15	40%
TNF-alpha	Mujer	EP	19	7	12	37%
TNF-alpha	Hombre	Control	35	13	22	37%
TNF-alpha	Hombre	EP	39	15	24	38%

Tabla 5.1. Relación de citoquinas plasmáticas evaluadas en el estudio. Se muestran los valores nulos, válidos y totales de la base de datos, obtenidos a partir de la técnica de análisis de MSD V-Plex Proinflammatory Panel 1 Human Kit.

<i>Plasma</i>	<i>Shapiro-Wilk</i>		<i>Fligner-Killeen</i>	<i>Mann-Whitney-Wilcoxon</i>	<i>T-test</i>
	<i>Control</i>	<i>EP</i>			
IL-1 β	0.00021	0.00068	0.6442	0.6346	
IL-2	0.139	0.4129	0.4133		0.2815
IL-6	$2.045 \cdot 10^{-7}$	0.05112	0.0066994	0.5371	
IL-8	0.004214	$9.878 \cdot 10^{-8}$	0.3938	0.1041	
IL-10	0.5008	$1.136 \cdot 10^{-7}$	0.2672	0.7306	
TNF- α	$1.384 \cdot 10^{-6}$	$1.757 \cdot 10^{-10}$	0.01892	0.9276	
INF- γ	$1.455 \cdot 10^{-5}$	$7.514 \cdot 10^{-9}$	0.1542	0.8698	

<i>LCR</i>	<i>Shapiro-Wilk</i>		<i>Fligner-Killeen</i>	<i>Mann-Whitney-Wilcoxon</i>	<i>T-test</i>
	<i>Control</i>	<i>EP</i>			
IL-1 β	0.08745	0.003066	0.3513	0.4776	
IL-2	0.01374	0.9643	0.5896	0.9322	
IL-6	$2.532 \cdot 10^{-5}$	0.1382	0.6115	0.4076	
IL-8	0.04433	0.146	0.0661	0.707	
IL-10	0.7642	0.5987	0.417		0.7975
TNF- α	0.8647	0.1955	0.6		0.5378
INF- γ	0.4869	0.3576	0.2026		0.3405

Tabla 5.1 Test estadísticos aplicados y valores p para las muestras de citoquinas. Se muestran los valores p obtenidos en el test de normalidad (Shapiro-Wilk), de homogeneidad de varianzas (Fligner-Killeen) y de comparación de dos muestras (Mann-Whitney-Wilcoxon o t-test) para cada citoquina analizada en plasma (panel superior) y LCR (panel inferior).

Como ambas muestras a comparar no cumplen la condición de normalidad, aplicamos el test de Fligner-Killeen para probar homogeneidad de varianzas. Se trata de un test que compara las varianzas basándose en la mediana y es muy robusto frente a desviaciones de la normalidad. Si el p-valor es inferior a 0.05 podemos concluir que las varianzas son diferentes.

Cuando se cumplen los dos requisitos, que haya normalidad y homocedasticidad, aplicamos el test paramétrico t-test. En caso contrario, aplicamos el test no paramétrico Mann–Whitney–Wilcoxon. Para ambos test, cuando el p-valor es < 0.05 , la diferencia entre los grupos es significativa.

Los resultados de la Tabla 5.2. nos indican que no hay diferencias entre los niveles de citoquinas plasmáticas de individuos control, comparados con los niveles encontrados en los pacientes con EP. Resultados similares se obtienen para los niveles de citoquinas detectados en LCR.

5.2.3 Niveles de citoquinas en plasma y en líquido cefalorraquídeo

Para visualizar los niveles de citoquinas en plasma y en LCR se graficó cada citoquina por separado. En la Figura 5.2 y Figura 5.3. se visualizan los datos con gráficas de cajas y bigotes que nos permiten observar cada muestra, ya que cada caja está limitada por los cuartiles Q1 y Q3, donde la línea central de la caja es la mediana y los bigotes de las cajas son los valores mínimos y máximo de la variable. También se representa cada valor individual con puntos negros.

Los gráficos presentados muestran que los niveles de citoquinas obtenidos en plasma no se replican en LCR, aunque las diferencias halladas no sean significativas. Es el caso de la IL-2, cuyos niveles en individuos EP son mucho más elevados que en los individuos sanos, pero únicamente en las muestras de plasma. Por el contrario, los niveles de IL-10 son superiores en LCR en los individuos EP, un hecho que no sucede en plasma. Por último, se observa también que los niveles de TNF- α son más elevados en las muestras LCR del grupo EP –siempre en comparación con el grupo control– y en las muestras plasmáticas los niveles son similares en ambos grupos.

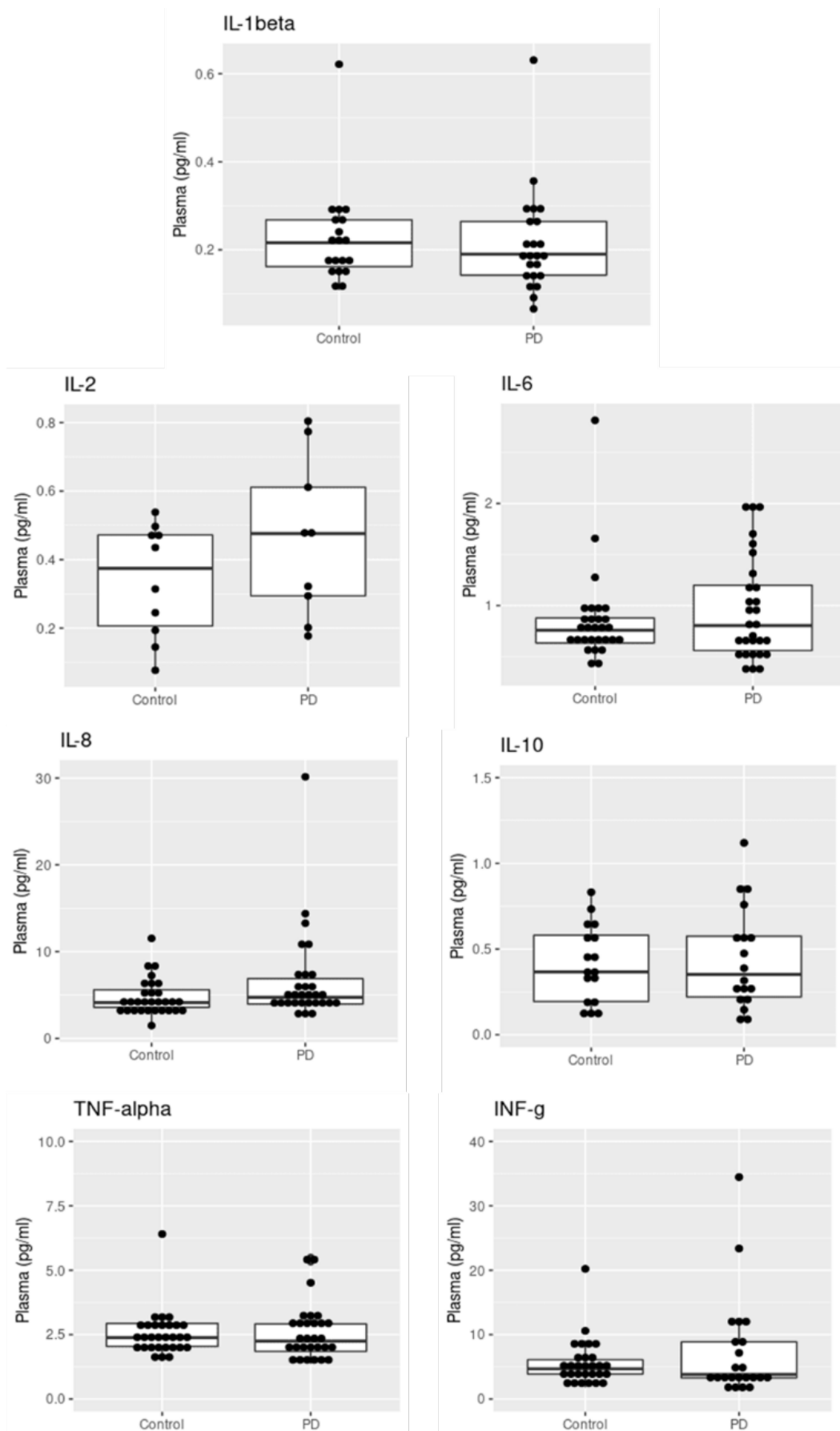


Fig. 5.2. Niveles plasmáticos de las citoquinas evaluadas.

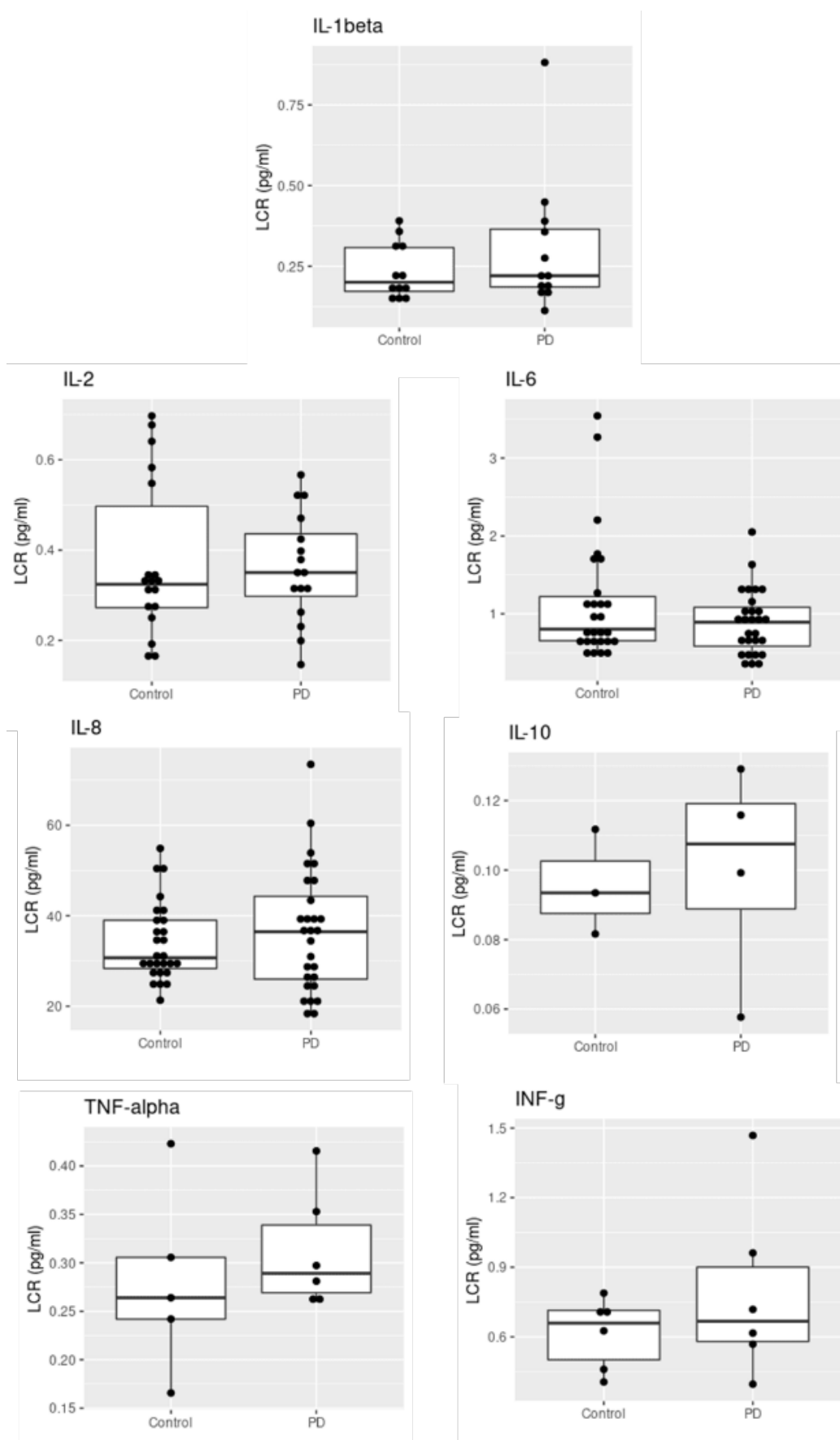


Fig. 5.3. Niveles en LCR de las citoquinas evaluadas.

		<i>Individuos control</i>			<i>Pacientes con EP</i>		
		<i>R</i>	<i>valor p</i>		<i>R</i>	<i>valor p</i>	
IL-1 β	IL-2	0.44	0.33	ns	-0.35	0.56	ns
	IL-6	0.044	0.86	ns	0	1	ns
	IL-8	0.52	0.022	*	0.63	0.0012	**
	IL-10	0.47	0.17	ns	0.25	0.41	ns
	TNF- α	0.17	0.49	ns	-0.038	0.86	ns
	INF- γ	0.076	0.76	ns	-0.054	0.83	ns
IL-2	IL-6	0.031	0.93	ns	-0.49	0.18	ns
	IL-8	0.53	0.11	ns	0.55	0.12	ns
	IL-10	0.5	0.32	ns	0.82	0.043	*
	TNF- α	0.33	0.35	ns	-0.038	0.92	ns
	INF- γ	0.043	0.91	ns	0.54	0.21	ns
IL-6	IL-8	0.11	0.56	ns	-0.2	0.3	ns
	IL-10	0.25	0.34	ns	-0.22	0.37	ns
	TNF- α	0.078	0.69	ns	-0.079	0.68	ns
	INF- γ	0.17	0.4	ns	0.27	0.22	ns
IL-8	IL-10	0.39	0.13	ns	0.12	0.61	ns
	TNF- α	0.35	0.061	ns	0.16	0.4	ns
	INF- γ	0.054	0.78	ns	-0.13	0.56	ns
IL-10	TNF- α	0.37	0.14	ns	0.1	0.68	ns
	INF- γ	0.59	0.015	*	-0.0009	1	ns
TNF- α	INF- γ	-0.072	0.71	ns	0.05	0.82	ns

Tabla 5.2. Coeficientes de correlación y valores p obtenidos en el análisis de correlación entre citoquinas. La primera columna muestra la citoquina estudiada y la segunda columna muestra las citoquinas con las que se han hecho los análisis de correlación (ns: no significativo).

5.2.4 Análisis de correlación entre citoquinas plasmáticas

Para comprobar si existe alguna relación entre las citoquinas liberadas al plasma, realizamos análisis de correlación. Aplicamos la correlación de Pearson que evalúa la relación lineal entre dos variables continuas. La Tabla 5.3. muestra los resultados obtenidos. En el Anexo 10.5. se incluye la representación gráfica de cada correlación analizada.

Los resultados nos muestran que hay relación moderada entre la IL-1 β y la IL-8 en los individuos control ($R=0.5$, $p=0.02$) y que esta relación también existe en los pacientes con EP ($R=0.6$, $p=0.01$). Sin embargo, encontramos una moderada relación entre IL-10 e INF γ en los individuos control ($R = 0.6$, $p=0.02$) que se pierde totalmente en los pacientes con EP ($R=0.0009$, $p=ns$). Por otro lado, las interleuquinas IL-2 e IL-10 muestran una estrecha relación entre ambas solo en individuos con EP ($R= 0.8$, $p=0.043$) pero no en los individuos control ($R=0.5$, $p=ns$).

5.3 Relación de citoquinas con síntomas clínicos

Quisimos también comprobar si existía alguna relación entre los niveles plasmáticos de las citoquinas y los síntomas clínicos evaluados.

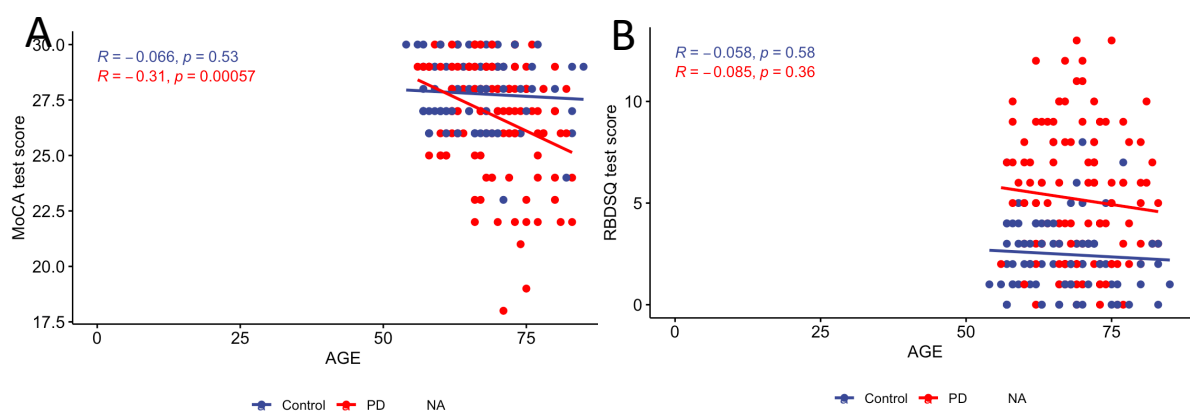


Fig. 5.4. Correlación entre síntomas clínicos y la edad. (A) Correlación entre la edad de cada individuo expresada en años (AGE) y la puntuación obtenida en el test MoCA para detectar posibles deficiencias cognitivas (MoCA test score). (B) Correlación entre la edad expresada en años (AGE) y la puntuación obtenida en el test RSDSQ para detectar alteraciones de la fase REM del sueño (RBDSQ test score).

En la Figura 5.4. se observa una correlación entre el avance de la edad y las alteraciones cognitivas, únicamente en los pacientes EP ($R = -0.31$, $p < 0.001$). También quisimos comprobar si existía alguna relación entre la edad y las alteraciones del sueño. En este caso, no se observa relación entre ambas variables para ninguno de los grupos evaluados.

Comprobamos también si había correlación entre los niveles de citoquinas y las alteraciones cognitivas. Se realizaron las correlaciones de los niveles en plasma de

cada citoquina para cada individuo y los valores que obtuvieron dichos individuos en el test de cognición MoCA.

Tal y como se puede observar en la Figura 5.5. se detectó que había una relación moderada y negativa entre los niveles de la IL-6 y las deficiencias cognitivas ($R = -0.42$, $p = 0.002$) en los pacientes EP que no se observaba en los pacientes sanos ($R = 0.31$, $p = 0.1$).

Además, se observó una correlación positiva casi perfecta entre los niveles de la IL-2 y las deficiencias cognitivas en los pacientes EP ($R = 0.9$, $p = 0.0008$) que no se detecta en los individuos sanos ($R = -0.3$, $p = 0.4$).

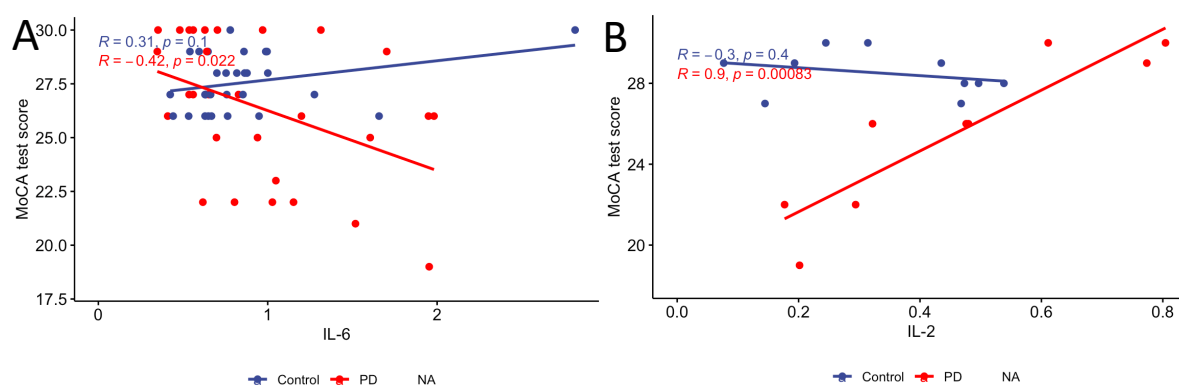


Fig. 5.5. Correlación entre niveles plasmáticos de citoquinas y síntomas clínicos. Correlación entre los niveles plasmáticos expresados en pg/ml, de la interleuquina IL-6 (A) o la interleuquina IL-2 (B) y la valoración obtenida en el test MoCA para detectar posibles deficiencias cognitivas (MoCA test score).

Por último, se detectó una relación moderada y negativa entre los niveles de IL-1 β plasmática y las alteraciones de la fase REM del sueño en los individuos con EP ($R = -0.42$, $p = 0.048$) que no se observa en los individuos sanos ($R = 0.05$, $p = 0.83$). Estos resultados se muestran en la Figura 5.6.

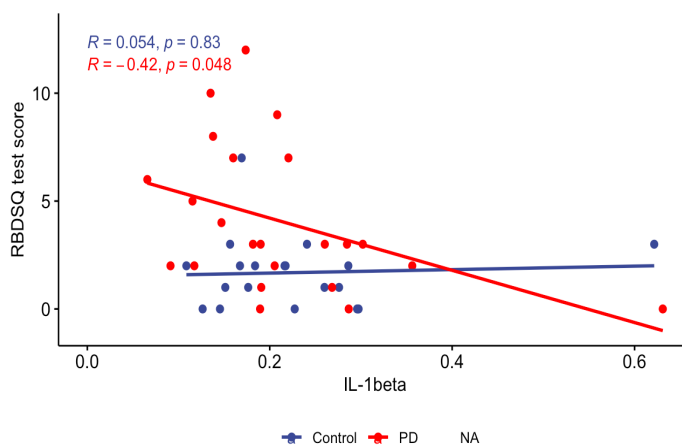


Fig. 5.6. Correlación entre niveles plasmáticos de citoquinas y alteraciones del sueño. Correlación entre los niveles plasmáticos de la IL-1 β , expresados en pg/ml, y los resultados obtenidos en el test de alteraciones en la fase REM del sueño (RBDSQ).

5.4 Citoquinas y su relación con α -sinucleína

La alfa-sinucleína (α -sinucleína) es una proteína clave en el desarrollo de la EP. Aunque no se ha establecido como marcador molecular por las discrepancias en los resultados obtenidos en diferentes estudios clínicos que se han ido realizando a lo largo de los últimos años, sí que se relaciona íntimamente con la EP. Quisimos también realizar estudios de correlación entre las citoquinas plasmáticas y los niveles en plasma de esta proteína. En el Anexo 10.6. se incluye la representación gráfica de cada correlación analizada.

La Tabla 5.4. muestra los resultados de este análisis de correlación entre las citoquinas y la α -sinucleína. Se observa correlación entre los niveles de IL-1 β y los niveles detectados de α -sinucleína tanto en pacientes con EP (0.43, P= 0.04) como en individuos control (R= 0.72, p= 0.0005). Resultados similares fueron observados para IL-8 que presenta correlación tanto en individuos sanos (R=0.7, p= 0.00001), como en individuos con EP (R= 0.39, p= 0.036).

Sin embargo, los niveles de IL-2 presenta correlación fuerte y negativa con los niveles de α -sinucleína en individuos sanos (R= -0.64, p= 0.045) que desaparece en los enfermos con EP (R= 0.36, p= 0.34).

	<i>Individuos control</i>			<i>Pacientes con EP</i>		
	<i>R</i>	<i>valor p</i>		<i>R</i>	<i>valor p</i>	
IL-1 β	0.72	0.00052	***	0.43	0.04	*
IL-2	-0.64	0.045	*	0.36	0.34	ns
IL-6	0.087	0.65	ns	-0.37	0.05	ns
IL-8	0.7	0.000014	****	0.39	0.036	*
IL-10	0.054	0.84	ns	-0.065	0.79	ns
TNF- α	-0.0062	0.97	ns	0.3	0.1	ns
INF- γ	0.055	0.78	ns	-0.13	0.54	ns

Tabla 5.4. Coeficientes de correlación y valores *p* obtenidos en el análisis de correlación entre citoquinas y α -sinucleína en plasma, para individuos control y pacientes con EP.

5.5 Citoquinas y su relación con elementos del citoesqueleto

Como parte de la estabilidad de la célula e indicativo de la actividad celular, están las modificaciones post-traduccionales de la tubulina, una proteína fundamental del citoesqueleto de las células. Quisimos saber si existía una posible relación entre la liberación de las citoquinas plasmáticas que podríamos interpretar como señales o “mensajes” entre las células y las modificaciones post-traduccionales de la tubulina como un indicativo tanto de la actividad celular como de posibles cambios conformacionales en su estructura. Los resultados se muestran en la Tabla 5.5. En el Anexo 10.7 se incluye la representación gráfica de cada correlación analizada.

Los resultados indican que IL-1 β está íntimamente relacionada con las modificaciones de la tubulina en condiciones de EP, en concreto con las modificaciones de tirosinación ($R= 0.81$, $p= 6.2 \cdot 10^{-6}$) y detirosinación ($R= 0.81$, $p= 4.1 \cdot 10^{-6}$) pero no en individuos sanos ($R=0.29$, $p= 0.23$ y $R=0.36$, $p= 0.13$, respectivamente). Del mismo modo, IL-8 destacó también por su fuerte correlación con las modificaciones de acetilación ($R= 0.86$, $p= 1.2 \cdot 10^{-9}$), tirosinación ($R=0.82$, $p= 4.6 \cdot 10^{-8}$) y la modificación $\Delta 2$ (delta-2) ($R=0.9$, $1.2 \cdot 10^{-11}$)

		<i>Individuos control</i>			<i>Pacientes con EP</i>		
		<i>R</i>	<i>valor p</i>		<i>R</i>	<i>valor p</i>	
IL-1 β	tubulina acetilada	-0.2	0.4	ns	0.25	0.25	ns
	tubulina tirosinada	0.29	0.23	ns	0.81	6.2·10 ⁻⁶	****
	tubulina detirosinada	0.36	0.13	ns	0.81	4.1·10 ⁻⁶	****
	tubulina delta-2	0.3	0.21	ns	0.42	0.048	*
IL-2	tubulina acetilada	-0.1	0.78	ns	0.57	0.11	ns
	tubulina tirosinada	0.09	0.8	ns	0.58	0.1	ns
	tubulina detirosinada	0.065	0.86	ns	0.53	0.14	ns
	tubulina delta-2	-0.16	0.67	ns	0.62	0.072	ns
IL-6	tubulina acetilada	-0.016	0.94	ns	-0.046	0.81	ns
	tubulina tirosinada	0.47	0.01	ns	-0.0031	0.99	ns
	tubulina detirosinada	0.43	0.02	ns	0.062	0.75	ns
	tubulina delta-2	0.019	0.92	ns	-0.24	0.21	ns
IL-8	tubulina acetilada	-0.13	0.48	ns	0.86	1.2·10 ⁻⁹	****
	tubulina tirosinada	0.2	0.28	ns	0.82	4.6·10 ⁻⁸	****
	tubulina detirosinada	0.23	0.23	ns	.35	0.063	ns
	tubulina delta-2	0.13	0.49	ns	0.9	1.2·10 ⁻¹¹	****
IL-10	tubulina acetilada	-0.36	0.15	ns	0.045	0.86	ns
	tubulina tirosinada	0.014	0.96	ns	0.24	0.34	ns
	tubulina detirosinada	0.14	0.6	ns	0.36	0.14	ns
	tubulina delta-2	-0.3	0.25	ns	-0.019	0.94	ns
TNF- α	tubulina acetilada	-0.27	0.14	ns	-0.04	0.83	ns
	tubulina tirosinada	-0.031	0.87	ns	0.19	0.33	ns
	tubulina detirosinada	0.09	0.64	ns	0.32	0.089	ns
	tubulina delta-2	-0.31	0.093	ns	0.0041	0.98	ns
INF- γ	tubulina acetilada	0.15	0.45	ns	-0.035	0.87	ns
	tubulina tirosinada	-0.19	0.32	ns	-0.037	0.87	ns
	tubulina detirosinada	-0.31	0.1	ns	-0.015	0.95	ns
	tubulina delta-2	0.13	0.5	ns	-0.16	0.46	ns

Tabla 5.3. Coeficientes de correlación y valores *p* obtenidos en el análisis de correlación entre citoquinas y las diferentes modificaciones post-traduccionales de la tubulina.

5.6 Metabolitos plasmáticos

Además del proyecto 132 de BioFIND, también estudiamos algunos de los metabolitos plasmáticos incluidos en el proyecto 106, correspondiente al análisis llevado a cabo en metabolitos plasmáticos por medio de cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS), una técnica muy potente capaz de detectar, identificar y cuantificar metabolitos a niveles ínfimos.

	<i>Test de Levene</i>		<i>t-Student</i>	
Tirosina	0.445	ns	0.2968	ns
DOPA	0.5761	ns	0.08278	ns
Dopamina	0.1364	ns	0.1364	ns
DOPAC	0.0116	*	0.0056	**
Ácido homovanílico	$3.433 \cdot 10^{-6}$	***	$9.785 \cdot 10^{-9}$	***
GABA	0.8116	ns	0.8116	ns
Glutamato	0.7242	ns	0.6649	ns
Glutamina	0.9019	ns	0.02682	*
Triptófano	0.9683	ns	0.2308	ns
Serotonina	0.4515	ns	0.9942	ns
Kinurenina	0.04343	*	0.999	ns
N-Acetilputrescina	0.01438	*	$5.71 \cdot 10^{-6}$	***
Putrescina	0.03724	*	$5.464 \cdot 10^{-6}$	***
Espermidina	0.03004	*	0.1153	ns
Espermina	0.8303	ns	0.8303	ns
Ácido homocistéico	0.00217	**	$7.42 \cdot 10^{-4}$	***
Glicina	0.3413	ns	0.04313	*
Beta alanina	0.00479	**	0.01423	*
Ornitina	0.3621	ns	$1.57 \cdot 10^{-4}$	***
Taurina	0.201	ns	0.8071	ns

Tabla 5.4. Valores *p* obtenidos al comparar grupo control y pacientes EP en la prueba t de Student para diferentes metabolitos plasmáticos. Se utiliza una modificación de Welch a la prueba t-Student en los casos en que las varianzas no son iguales.

Para llevar a cabo el estudio estadístico de estos metabolitos, en este caso el tamaño de muestra es elevado (>50) y, por tanto, atendiendo al teorema del límite central, asumimos que las muestras siguen una distribución normal. Para comprobar si hay diferencias entre los dos grupos, grupo control y pacientes con EP, se aplica el t-test o prueba t de Student. Previamente se realiza el test de Levene para comprobar la homogeneidad de varianzas. En el test de Levene, si $p > 0.05$, se asume la hipótesis nula de que las varianzas son iguales y se aplica el t-test o prueba t-Student. Pero si $p < 0.05$, se afirma la hipótesis alternativa de que las varianzas no son iguales (no existe homocedasticidad) y en este caso utilizamos una modificación de Welch a la t-Student. La Tabla 5.6. muestra los resultados obtenidos de este análisis.

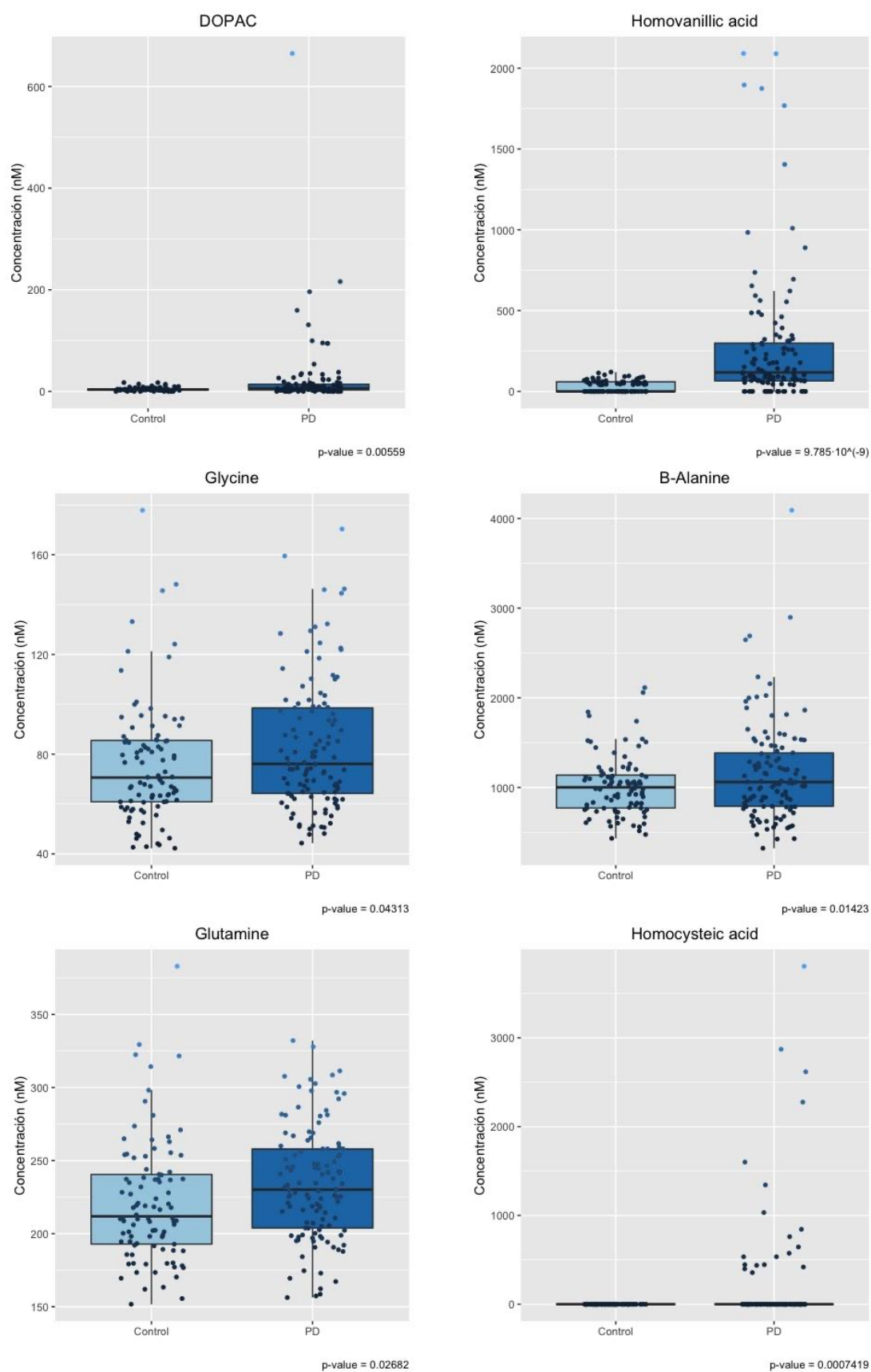


Fig. 5.7. Niveles de diferentes metabolitos plasmáticos en individuos control y pacientes con EP. (Continúa en la página siguiente).

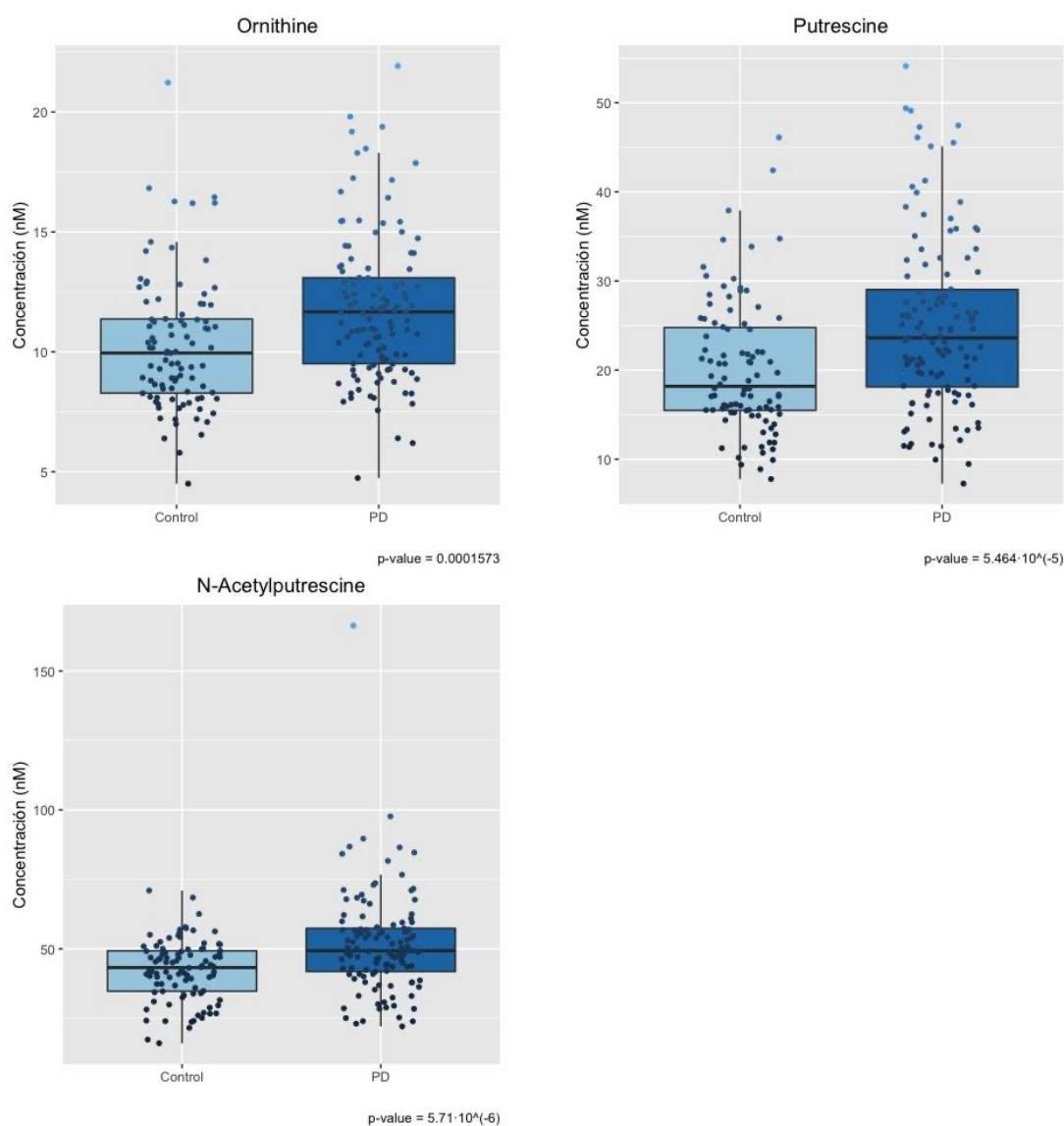


Fig. 5.7. Niveles de diferentes metabolitos plasmáticos en individuos control y pacientes EP. (Viene de la página anterior).

En la Figura 5.7. se muestran los gráficos de los metabolitos cuyos valores p resultaron significativos, para estudiar con más detalle las diferencias en los niveles plasmáticos. Los gráficos de los metabolitos cuyo valor p no es significativo se incluyen en el Anexo 10.4.

Los resultados analizados muestran que DOPAC y el ácido homovalínico tienen los niveles significativamente más elevados en pacientes EP que en individuos control ($p < 0.05$, $p < 0.001$ respectivamente).

Por otro lado, en pacientes EP hay niveles significativamente superiores en plasma de los aminoácidos glicina, β -alanina y glutamina ($p < 0.05$), comparados con los individuos control. Además, el ácido homocistéico mostró niveles muy elevados en pacientes con EP ($p < 0.001$) comparados con los individuos sanos. Finalmente, los niveles de las poliaminas ornitina, putrescina y N-acetilputrescina fueron significativamente más elevados en EP ($p < 0.001$) comparados con los niveles obtenidos en los sujetos control.

5.7 Modelo de predicción

Realizamos un modelo de regresión logística o modelo logit, para predecir la probabilidad de padecer EP. A partir del análisis realizado en los metabolitos plasmáticos, desarrollamos varios modelos logit para cada conjunto de moléculas con alguna relación metabólica entre sí. De entre todos los modelos realizados, el modelo para las poliaminas fue uno de los que obtuvimos mejores resultados, con lo que le añadimos más variables: las pertenecientes a la sintomatología clínica (variable deficiencia cognitivas y variable alteración del sueño). Además, tuvimos en cuenta la edad y el sexo para desarrollar con mayor exactitud el modelo. El conjunto de modelos previos al definitivo se muestra en el Anexo 10.8.

Tabla 5.7. muestra los resultados obtenidos. Los niveles en plasma de N-acetilputrescina, putrescina y ornitina son estadísticamente significativos ($p < 0.05$), mostrando una asociación muy fuerte en la probabilidad de padecer EP. Asimismo, valores altos en el test de las alteraciones de la fase REM del sueño también es estadísticamente significativo en el modelo ($p < 0.01$) y la puntuación del test de cognición muestra menor relevancia en el modelo, rozando la significancia estadística ($p = 0.058$).

DIAGNOSIS			
<i>Predictors</i>	<i>Odds Ratios</i>	<i>CI</i>	<i>p</i>
(Intercept)	0.04	0.00 – 50.40	0.384
NAcetylputrescine	1.04	1.02 – 1.08	0.003
Putrescine	1.05	1.01 – 1.10	0.016
Ornithine	1.15	1.01 – 1.31	0.037
AGE	1.03	0.98 – 1.09	0.199
GENDER [Male]	1.01	0.49 – 2.03	0.989
MCATOT	0.83	0.69 – 1.00	0.058
RBDSQ_score	1.45	1.27 – 1.68	<0.001
Observations	210		
R ² Tjur	0.348		

Tabla 5.7. Resultados del modelo de regresión logística para las poliaminas.

Los valores Odd Ratio (OD) nos muestran que el tamaño del efecto para putrescina y N-acetilputrescina es pequeño (OD = 1.05 y OD = 1.04 respectivamente) y ligeramente mayor en ornitina (OD = 1.15). La sintomatología muestra mayor efecto, mostrando valores OD = 1.45 para las alteraciones del sueño y OD = 0.83 para las deficiencias cognitivas. El modelo presenta un ajuste moderado con $R^2 = 0.3$ mostrado como coeficiente de discriminación de Tjur (45).

6. Discusión

El sistema inmunitario es el encargado de mantener la homeostasis en los organismos, protegiéndolo de amenazas internas (por ejemplo, las células cancerosas) o patógenos externos como pueden ser virus o agentes contaminantes (46). La principal respuesta del sistema inmune para hacer frente a posibles agresiones empieza por un proceso de inflamación inmediato, en el que se ven involucrados principalmente los leucocitos. Cuando el proceso inflamatorio sucede en el sistema nervioso hablamos de *neuroinflamación*, y afecta sobre todo a las células microgliales y astrocitos. Estudios recientes han demostrado que, contrariamente a lo que se había afirmado, la barrera hematoencefálica es permeable a las moléculas derivadas de los procesos inflamatorios, cuya exposición prolongada provoca la muerte de neuronas y el consecuente desarrollo de patologías cerebrales (47).

La neurodegeneración consiste en la disminución de la funcionalidad de las células del sistema nervioso y la posterior apoptosis, y es característica de enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson (34, 35).

La EP está caracterizada por la aparición gradual de síntomas temblores o problemas de equilibrio, así como alteraciones a nivel psicológico acompañados de un deterioro cognitivo (1, 2). La neuroinflamación ejerce un rol importante en el desarrollo de la EP, puesto que se trata de la respuesta primaria del sistema inmune. La acumulación de macrófagos en el cerebro provocada por la una sobreactivación de las células microgliales conlleva a una acumulación de residuos neurotóxicos, muy dañina para el tejido cerebral (50–52).

La literatura científica publicada hasta el momento sugiere una mayor prevalencia de la EP en hombres que en mujeres (de 1,5 a 2 veces mayor) (43), con un empeoramiento de las funciones motoras más lento. Es por ello que, en un principio, se había planteado el estudio de los niveles de citoquinas separando los individuos en función de su sexo. Sin embargo, tal y como se refleja en la Tabla 5.1. hay una gran cantidad de valores nulos para muchas de las citoquinas de estudio, y en las demás los valores son escasos, con lo que se hizo imposible hacer el estudio comparativo entre géneros.

El primer bloque de análisis llevado a cabo comprendió el estudio de normalidad, homocedasticidad y posterior comparación de los niveles de citoquinas en las poblaciones de estudio, el grupo control y el grupo de pacientes con EP. Los test aplicados eran, en función del cumplimiento de las condiciones de normalidad y varianza constante, el *t de Student* o, de lo contrario, la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los resultados reflejan que no existen diferencias significativas en los niveles de citoquinas entre los dos grupos, tanto en plasma como en LCR. Por tanto, podemos concluir que, en esta cohorte de sujetos, la EP no altera los niveles de citoquinas en plasma ni en LCR.

El estudio de correlación lineal mediante el método de Pearson permitió evaluar la relación entre dos variables continuas. Los resultados revelan la existencia de una relación entre IL-1 β e IL-8 tanto en individuos sanos como en pacientes con EP. En 2004, Li y colaboradores (53) hallaron una correlación en el incremento de ambas interleuquinas en pacientes afectados por la enfermedad de Crohn, una patología inflamatoria del tracto digestivo (54), con lo que se aprecia una posible relación entre estas citoquinas como respuesta a procesos inflamatorios como la neuroinflamación producida en la EP.

Por otro lado, las interleuquinas IL-2 y IL-10 muestran una estrecha relación entre ambas solo en pacientes con EP ($R= 0.8$, $p=0.043$) que no es significativa en los individuos control. La IL-2 se encarga de promover la diferenciación de las células T del sistema inmunitario (linfocitos) cuyo rol es la respuesta inflamatoria específica contra patógenos (55); en cambio, la función de IL-10 es antiinflamatoria, ejercida mediante la inhibición de la producción de citoquinas (56). Estos resultados nos indican que las citoquinas IL-2 e IL-10 pueden tener un papel relevante en la EP ya que aparece una sinergia en su liberación al plasma que no existe en condiciones sanas.

En la Figura 5.4 se observa una correlación entre el avance de la edad y las alteraciones cognitivas en los pacientes EP que no se observa en individuos sanos. Este resultado demuestra que los pacientes con EP van perdiendo capacidades cognitivas, a medida que pasa el tiempo, con una tasa de disminución del 14% al año en individuos mayores de 65 años (57). Sin embargo, no hallamos relación entre la edad y las alteraciones del sueño en ninguno de los grupos de estudio.

Se analizó también la relación entre los niveles de citoquinas en plasma y las alteraciones cognitivas, mediante los valores obtenidos para cada individuo en el test de cognición MoCA. La correlación entre los niveles de IL-6 y las deficiencias cognitivas es moderada y negativa en pacientes con EP, mostrando una relación entre un mayor nivel de la interleuquina y una menor capacidad cognitiva. La IL-6 es una citoquina encargada de la regulación primaria de la respuesta inflamatoria del sistema inmune (58). Ha sido demostrado por diferentes estudios que los niveles de IL-6 aumentan tanto en lesiones como en enfermedades cerebrales, provocando en ambos casos inflamación, y su acumulación en las zonas periféricas del cerebro provoca disfunción cognitiva (59). De este modo, podría explicarse la disminución de las capacidades cognitivas de los pacientes afectados por EP con mayores niveles de IL-6. Además, la correlación observada entre los niveles de IL-2 y las deficiencias cognitivas en los pacientes con EP es casi perfecta. Estos demuestran el papel relevante de la IL-6 y de la IL-2 en el desarrollo de alteraciones cognitivas en pacientes con EP.

La relación detectada entre los niveles de IL-1 β y las alteraciones del sueño en los individuos del grupo EP refleja que niveles bajos de la citoquina provocan mayores cambios en la fase REM del sueño. En este aspecto, hay estudios que demuestran que los niveles de IL-1 β se relacionan con el sueño: de hecho, después de una fase de privación de sueño, sus niveles se ven aumentados. Además, ha sido demostrado que la inyección de IL-1 β exógena reduce los síntomas de la falta de sueño como la fatiga o el adormecimiento (60,61).

La Tabla 5.4 muestra los resultados de la correlación entre la proteína α -sinucleína y las diferentes citoquinas de estudio. Se aprecia una fuerte correlación negativa entre IL-2 y α -sinucleína únicamente en el grupo control, ausente en los pacientes del grupo EP. Uno de los principales factores desencadenantes de la EP es la acumulación de proteínas α -sinucleína con un mal plegado (62), aunque su relación con la neurodegeneración no está del todo clara (63). Por otra parte, se ha demostrado que la IL-2 está íntimamente relacionada con la respuesta inmunitaria, mediando la producción de células T (55). Hay estudios que relacionan la acumulación de α -sinucleína con la activación inflamatoria por parte del sistema inmunitario (64). Se pone de manifiesto la respuesta del sistema inmune frente a la acumulación de

α -sinucleína mediante el aumento de concentración de la IL-2, puesto que la acumulación de esta proteína es uno de los factores clave relacionados con el desarrollo de la EP.

El estudio de la relación entre las citoquinas y elementos del citoesqueleto se representa en la Tabla 5.5, en la que se observa una fuerte correlación positiva entre IL-1 β y las modificaciones de tirosinación y detirosinación de la tubulina en pacientes con EP. También hay una fuerte correlación entre IL-8 y las modificaciones post-traduccionales de acetilación, tirosinación y $\Delta 2$ (delta-2), de nuevo en el grupo EP, que podrían ser indicativas de transformaciones morfológicas de la célula.

Las modificaciones de acetilación y detirosinación de la tubulina confieren estabilidad a la célula y mejoran la motilidad celular (65), es decir, su capacidad de moverse libremente. Por su parte, la tirosinación es indicativa de cambios en la morfología o actividad de la célula, afectando la dinámica de los microtúbulos o al proceso de renovación de los componentes celulares (66).

Estos resultados sugieren que tanto IL-1 β como IL-8 desempeñan funciones relevantes sobre la actividad celular en la EP, ya que estos resultados no se observan en individuos sanos. Esto puede sugerir una relación entre estas citoquinas y los cambios tanto de morfología como de comportamiento de los microtúbulos, cuyas alteraciones pueden interpretarse como un daño a la estructura celular. De este modo, podríamos decir que las citoquinas IL-1 β e IL-8 podrían estar relacionadas con un evento de neurodegeneración.

En cuanto al estudio de los metabolitos en plasma, se aprecia que los niveles de las moléculas relacionadas con el sistema de la dopamina (DOPAC y ácido homovalínico) tienen niveles significativamente superiores en los pacientes con EP. Estos resultados sugieren la presencia de una alteración en la señalización dopaminérgica, pero el conocimiento acerca de los efectos de la dopamina en la EP sigue siendo confuso. Por un lado, se había afirmado que la oxidación de dopamina conllevaba la síntesis de sustancias neurotóxicas (radicales de oxidopamina) en el citoplasma, considerándose un factor clave en el desarrollo de la EP (67). Sin embargo, otros estudios apoyan la idea de que la aparición de radicales oxidativos es común en varias enfermedades neurodegenerativas, por lo que no tiene por qué ser

un pilar en el desarrollo de la EP (68). Por este motivo, únicamente podemos afirmar que existen afectaciones en el sistema dopaminérgico de los individuos afectados por EP, pero no podemos determinar sus consecuencias completas.

También hemos hallado una mayor concentración de glutamina en plasma en los individuos con EP, y existen estudios previos que han determinado una relación entre altas concentraciones de glutamina en plasma y baja función cognitiva en individuos (69). Así pues, en estos pacientes con EP, podríamos relacionar la disminución de la capacidad cognitiva característica de la enfermedad con el aumento en los niveles plasmáticos de glutamina.

El metabolismo de las poliaminas está estrechamente relacionado con la función inmunitaria. El estudio estadístico ha mostrado que los niveles de ornitina y putrescina – así como su modificación N-acetilputrescina – son significativamente más elevados en los pacientes con EP. Se han llevado a cabo numerosos estudios que sugieren una activación del metabolismo de las poliaminas para hacer frente al estrés oxidativo (70), que como se ha visto, puede ser una de las causas de la EP. De este modo, el aumento en los niveles de las moléculas citadas anteriormente se podría interpretar como una respuesta del sistema inmune a la EP, ya que no se observa en individuos sanos.

Por último, se analizó la presencia de diversos aminoácidos y observó una mayor concentración de glicina y β -alanina en pacientes EP. Las sustancias llamadas antagonistas del glutamato consisten en una combinación de carbidopa y levodopa (duodopa), y se usan en estadios tempranos del desarrollo de la EP para controlar sus síntomas (71), y la glicina es una molécula con la capacidad de potenciar el sistema glutamatérgico (72). Estos resultados sugieren la presencia de una reacción de defensa intrínseco del cuerpo frente la enfermedad, potenciando los sistemas que más pueden contrarrestar los efectos degenerativos de la EP.

El modelo de predicción presentado en el Apartado 5.5 (y la Tabla 5.7) permitió predecir la probabilidad de padecer EP. El modelo final se elaboró a partir del modelo de las poliaminas (ver Anexos 10.8.6 y 10.8.7), ya que mostró varios resultados significativos, y se añadieron las variables pertenecientes a la sintomatología clínica, teniendo en cuenta la edad y sexo para una mayor precisión. Para determinar la

significancia de cada predictor se utilizó el valor p , siendo las moléculas relacionadas con el metabolismo de las poliaminas las que mostraron un valor significativo, junto con los valores altos del test de alteraciones de la fase REM del sueño. El test de cognición fue el que mostró una menor relevancia, sin llegar a la significación estadística ($p=0.058$).

Los *odds ratio* se utilizaron para interpretar el modelo, donde un valor mayor que 1 indica que a medida que aumenta el predictor, las probabilidades de los resultados aumentan. A la inversa, un valor menor que 1 indica que a medida que aumenta el predictor, las probabilidades de los resultados disminuyen. La variable con más fuerza es el test de alteraciones de la fase REM del sueño; la que tiene asociación negativa es el test de valoración de trastornos de cognición, por lo que se puede decir que las probabilidades de que un individuo padezca EP con valores en el test de trastornos de sueño elevados aumentan 1.4 veces más respecto a las de un individuo que no padezca trastornos de sueño. Asimismo, la probabilidad de que un individuo padezca EP con valores bajos en el test de cognición aumenta 1.25 veces respecto a las de un individuo que tenga valores más altos.

Comprobamos la eficacia del modelo, introduciendo valores imaginarios para un conjunto de parámetros como la edad, niveles de las moléculas incluidas y los resultados de los test, obteniendo la probabilidad de que el individuo en cuestión padezca o no la EP. Por ejemplo, para una mujer de 54 años (individuo más joven del estudio), con valores de las moléculas de estudio Putrescine = 22, N-Acetylputrescine = 47 y Ornithine = 10, y puntuaciones de 26 y 5 en los test MoCA (deterioro cognitivo) y RBDSQ (trastorno de la fase REM del sueño) respectivamente, el resultado obtenido fue que la probabilidad de padecer EP es de 59.4%.

7. Conclusiones

7.1 Conclusiones

A lo largo del presente trabajo se han llevado a cabo varios análisis que relacionan, por un lado, los niveles de citoquinas y metabolitos, y por otro, las afectaciones a nivel clínico (trastornos del sueño y déficit cognitivo) con los pacientes que padecen EP. A partir de dichos análisis, se han observado alteraciones en las concentraciones de las moléculas de estudio, comparando los individuos EP y los del grupo control.

Desde nuestro punto de vista, el análisis de las concentraciones plasmáticas de los metabolitos y citoquinas supone una herramienta de gran ayuda en el diagnóstico precoz de la EP. La toma de las muestras es sencilla (extracción de sangre), y podría llevarse a cabo como control rutinario a partir de los 60 años, puesto que se ha demostrado que es la edad en que los individuos presentan un mayor riesgo de desarrollar la EP. La detección de niveles elevados de IL-1 β , IL-2, IL-8 e IL-10, de los metabolitos DOPAC y ácido homovalínico y las moléculas ornitina, putrescina y N-acetilputrescina puede acelerar el diagnóstico de la EP y evitar la fuerte degradación que supone el desarrollo de los síntomas en los individuos afectados, incidiendo de manera directa y positiva en su calidad de vida.

Por un lado, en el plan de trabajo inicial se planteaba hacer un estudio comparativo de los niveles de citoquinas separando los individuos de la muestra en función de su sexo. Este objetivo no ha sido llevado a cabo debido a la poca cantidad de datos útiles para cada citoquina, que hacían imposible hacer la distinción entre hombres y mujeres. Además, también se planteó elaborar una base de datos a partir de la recopilación y lectura de la literatura científica publicada hasta el momento, para identificar los cambios en modelos animales respecto a los humanos. Por un lado, sí que nos hemos apoyado en las publicaciones científicas sobre las moléculas de estudio y la EP para interpretar los resultados, pero la búsqueda de diferencias entre modelos humanos y animales no se ha llevado a cabo. La razón es que el proceso de elaboración de la base de datos quedó en un segundo plano, ya que los análisis a realizar eran muchos y largos, y finalmente decidimos descartarla para podernos centrar en los objetivos principales del trabajo.

7.2 Líneas de futuro

En un principio, el objetivo del presente trabajo era llevar a cabo un estudio comparativo de los niveles de las distintas citoquinas, tanto a nivel plasmático como en LCR, separando los individuos por sexo. Sin embargo, la escasez de datos en algunas citoquinas y la gran cantidad de valores nulos en otras hizo imposible hacer esta separación, por lo que se decidió estudiar ambos grupos de manera conjunta. De este modo, queda pendiente el estudio comparativo separando hombres de mujeres, de manera que se pueda apreciar si existen o no diferencias en los niveles de citoquinas entre ambos sexos.

Otra posible ampliación del presente trabajo sería la comparación de modelos animales con los datos del estudio de BioFIND, llevado a cabo en humanos. Esto permitiría comparar los niveles de citoquinas, verificar si las diferencias son significativas, e incluso indagar acerca de la expresión de otras interleuquinas relacionadas con la EP en animales.

7.3 Seguimiento de la planificación

Los objetivos planteados para cada fase del trabajo eran realistas y factibles, por lo que el seguimiento de la planificación ha sido correcto. No ha habido ninguna desviación en la temporización planteada inicialmente, puesto que tanto las tareas como los hitos planteados se han cumplido en las fechas previstas. El cambio más significativo que se ha introducido fue el hecho de desistir de hacer el análisis separando por sexos, como se ha explicado anteriormente, ya que era inviable.

En cuanto al enfoque y método seguido, se empezó por recopilar los del proyecto BioFIND para depurarlos y definir cuáles eran los datos más relevantes que incluir en el trabajo. Se optó por utilizar el software gratuito R y la interfaz RStudio para analizar las tablas de datos, ya que se trata de una herramienta muy útil y completa para tratar con una cantidad de datos tan grande como la que se utilizó, que comprendía un total de 410132 entradas. Además, permitió hacer los estudios estadísticos, la parte vital del trabajo, que nos llevaron a sacar las conclusiones citadas anteriormente. Así pues, la metodología planteada en un inicio fue la correcta para cumplir con la mayor parte de los objetivos definidos para el TFM.

8. Glosario

Citoquinas: Proteínas pequeñas que regulan la función de las proteínas que las producen sobre otros tipos celulares.

Cuerpos de Lewy: Causa de la demencia en personas de edad avanzada por la acumulación de la proteína α -sinucleína, que posteriormente forma depósitos.

Enfermedad de Parkinson (EP): Enfermedad neurodegenerativa crónica caracterizada por la pérdida de fluidez en el movimiento, rigidez, temblor y pérdida del control postural. También desencadena alteraciones en la función cognitiva y en el sistema nervioso central, con la aparición de depresión y dolor.

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α): Citoquina producida principalmente por los macrófagos, encargada de mediar la acción pro-inflamatoria regulando otras citoquinas como IL-1 e IL-6.

Interferón gamma (INF- γ): Citoquina producida por los linfocitos T, cuya función es la activación de los macrófagos para aumentar su capacidad durante la respuesta inmunitaria.

Interleuquinas: Tipo de citoquinas con un rol fundamental en la comunicación intercelular, donde ejercen de mensajeras químicas.

Líquido cefalorraquídeo (LCR): Líquido que baña el encéfalo y la médula espinal, cuyas funciones son, entre otras, la protección y nutrición del encéfalo, así como la eliminación de metabolitos.

Neurodegeneración: proceso degenerativo del sistema nervioso caracterizado por la pérdida de la función y la muerte de las células nerviosas.

Neuroinflamación: Estado reactivo del sistema inmune en el sistema nervioso destinado a inactivar o eliminar un daño potencial.

Modificaciones post-traduccionales: Cambios químicos que sufre una proteína después de ser sintetizada por los ribosomas, que afecta a su función.

Sustancia *nigra*: Zona del cerebro cuyas funciones principales se relacionan con el movimiento y el aprendizaje.

Odds ratio (OR): Medida que permite cuantificar la probabilidad de ocurrencia de un evento. Se obtiene mediante el cociente (odds) entre la probabilidad de que ocurra el evento y la probabilidad de que no ocurra.

Plasma: Parte que no contiene células (acelular) de la sangre, compuesto en un 90% por agua. Representa el 55% del volumen sanguíneo total.

Test de cognición MoCA: Batería de pruebas breves cuyo propósito es detectar la presencia de deterioro cognitivo leve y diferenciarlo de alteraciones cognitivas consecuentes al envejecimiento normal. Evalúa las funciones ejecutivas, la capacidad visuoespacial, entre otros. Las puntuaciones oscilan de 0 a 30 y se considera normal una puntuación de 26 o superior

Test de sueño RBDSQ: Cuestionario que evalúa diferentes aspectos relacionados con la fase REM del sueño. Consta de 13 preguntas y cada pregunta afirmativa tiene el valor de un punto; el score final es la suma de la puntuación obtenida. Un score con valor mayor o igual a 5 determina que el individuo sufre algún tipo de alteración del sueño

Tubulina: Proteína que forma dímeros (α -tubulina y β -tubulina) que constituye los microtúbulos, el elemento que confiere la estructura al citoesqueleto celular

9. Bibliografía

1. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 21 de diciembre de 2017;3(1):17013.
2. Parkinson's Disease Information Page | National Institute of Neurological Disorders and Stroke [Internet]. [citado 13 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Parkinsons-Disease-Information-Page>
3. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet*. 29 de agosto de 2015;386(9996):896-912.
4. Greenamyre JT. Parkinson's Divergent Causes, Convergent Mechanisms. *Science*. 21 de mayo de 2004;304(5674):1120-2.
5. Johnson SJ, Diener MD, Kaltenboeck A, Birnbaum HG, Siderowf AD. An economic model of Parkinson's disease: Implications for slowing progression in the United States: An Economic Model of Parkinson's Disease. *Mov Disord*. marzo de 2013;28(3):319-26.
6. Boland DF, Stacy M. The economic and quality of life burden associated with Parkinson's disease: a focus on symptoms. *Am J Manag Care*. septiembre de 2012;18(7 Suppl):S168-175.
7. Kustrimovic N, Comi C, Magistrelli L, Rasini E, Legnaro M, Bombelli R, et al. Parkinson's disease patients have a complex phenotypic and functional Th1 bias: cross-sectional studies of CD4+ Th1/Th2/T17 and Treg in drug-naïve and drug-treated patients. *J Neuroinflammation*. diciembre de 2018;15(1):205.
8. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*. junio de 2006;5(6):525-35.
9. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis: PD PREVALENCE. *Mov Disord*. noviembre de 2014;29(13):1583-90.

10. Tysnes O-B, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm.* agosto de 2017;124(8):901-5.
11. Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology.* noviembre de 2016;15(12):1257-72.
12. Stüve O, Zettl U. Neuroinflammation of the central and peripheral nervous system: an update: Neuroinflammation of the nervous system. *Clin Exp Immunol.* marzo de 2014;175(3):333-5.
13. Correale J, Villa A. The neuroprotective role of inflammation in nervous system Injuries. *J Neurol.* noviembre de 2004;251(11):1304-16.
14. Shastri A, Bonifati DM, Kishore U. Innate Immunity and Neuroinflammation. *Mediators of Inflammation.* 2013;2013:1-19.
15. García-Bueno B, Caso JR, Leza JC. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: Damaging and protective mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* agosto de 2008;32(6):1136-51.
16. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Cytokines in Parkinson's disease. En: Mizuno Y, Calne DB, Horowski R, Poewe W, Riederer P, Youdim MBH, editores. *Advances in Research on Neurodegeneration [Internet].* Vienna: Springer Vienna; 2000 [citado 9 de mayo de 2021]. p. 143-51. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-6284-2_12
17. Verhey KJ, Gaertig J. The Tubulin Code. *Cell Cycle.* septiembre de 2007;6(17):2152-60.
18. Maor-Nof M, Homma N, Raanan C, Nof A, Hirokawa N, Yaron A. Axonal Pruning Is Actively Regulated by the Microtubule-Destabilizing Protein Kinesin Superfamily Protein 2A. *Cell Reports.* abril de 2013;3(4):971-7.
19. Choi W-S, Palmiter RD, Xia Z. Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *Journal of Cell Biology.* 7 de marzo de 2011;192(5):873-82.

20. Brandt R. Cytoskeletal mechanisms of neuronal degeneration. *Cell Tissue Res.* agosto de 2001;305(2):255-65.
21. Saxena S, Caroni P. Mechanisms of axon degeneration: From development to disease. *Progress in Neurobiology.* octubre de 2007;83(3):174-91.
22. Carnwath T, Mohammed R, Tsiang D. The direct and indirect effects of alpha-synuclein on microtubule stability in the pathogenesis of Parkinson's disease. *NDT.* junio de 2018;Volume 14:1685-95.
23. Braak H, de Vos RAI, Bohl J, Del Tredici K. Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience Letters.* marzo de 2006;396(1):67-72.
24. Gómez-Esteban JC, Tijero B, Somme J, Ciordia R, Berganzo K, Rouco I, et al. Impact of psychiatric symptoms and sleep disorders on the quality of life of patients with Parkinson's disease. *J Neurol.* marzo de 2011;258(3):494-9.
25. Martinez-Martin P, Rodriguez-Blazquez C, Kurtis MM, Chaudhuri KR, on Behalf of the NMSS Validation Group. The impact of non-motor symptoms on health-related quality of life of patients with Parkinson's disease: Nms and HRQ in Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 15 de febrero de 2011;26(3):399-406.
26. Barone P, Antonini A, Colosimo C, Marconi R, Morgante L, Avarello TP, et al. The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 15 de agosto de 2009;24(11):1641-9.
27. Chaudhuri KR, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet Neurology.* mayo de 2009;8(5):464-74.
28. Dubois B, Pillon B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. *J Neurol.* 28 de noviembre de 1996;244(1):2-8.

29. Verbaan D, Marinus J, Visser M, van Rooden SM, Stiggelbout AM, Middelkoop HAM, et al. Cognitive impairment in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1 de noviembre de 2007;78(11):1182-7.
30. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bäckström V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: A Brief Screening Tool For Mild Cognitive Impairment: MOCA: A BRIEF SCREENING TOOL FOR MCI. *Journal of the American Geriatrics Society*. abril de 2005;53(4):695-9.
31. Vásquez KA, Valverde EM, Aguilar DV, Gabarain H-JH. Montreal Cognitive Assessment scale in patients with Parkinson Disease with normal scores in the Mini-Mental State Examination. *Dement neuropsychol*. marzo de 2019;13(1):78-81.
32. Schenck CH, Bundlie SR, Ettinger MG, Mahowald MW. Chronic Behavioral Disorders of Human REM Sleep: A New Category of Parasomnia. *Sleep*. junio de 1986;9(2):293-308.
33. Iranzo A, Santamaria J, Tolosa E. The clinical and pathophysiological relevance of REM sleep behavior disorder in neurodegenerative diseases. *Sleep Medicine Reviews*. diciembre de 2009;13(6):385-401.
34. Van Eck, Waltman. *Vos Viewer*. 2010.
35. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020. Disponible en: <https://www.R-project.org/>
36. RStudio Team. *RStudio: Integrated Development for R*. [Internet]. RStudio, PBC, Boston, MA; 2020. Disponible en: <http://www.rstudio.com/>.
37. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York; 2016.
38. Kassambara A. *ggpubr: «ggplot2» Based Publication Ready Plots* [Internet]. 2020. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>

39. Wickham H, François R, Henry L, Müller K. dplyr: A Grammar of Data Manipulation [Internet]. 2021. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>
40. Wickham H. tidyr: Tidy Messy Data [Internet]. 2021. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=tidyr>
41. Fox J, Weisberg S. An {R} Companion to Applied Regression, Third Edition [Internet]. Thousand Oaks CA: Sage; 2019. Disponible en: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>
42. Meso Scale Diagnostics. V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Human Kit [Internet]. 2021. Disponible en: <https://www.mesoscale.com/products/v-plex-proinflammatory-panel-1-human-kit-k15049d/>
43. Haaxma CA, Bloem BR, Borm GF, Oyen WJG, Leenders KL, Eshuis S, et al. Gender differences in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1 de agosto de 2007;78(8):819-24.
44. Lee A, Gilbert RM. Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurologic Clinics*. noviembre de 2016;34(4):955-65.
45. Tjur T. Coefficients of Determination in Logistic Regression Models—A New Proposal: The Coefficient of Discrimination. *The American Statistician*. noviembre de 2009;63(4):366-72.
46. Sistema inmunitario. En: Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. 2021 [citado 29 de mayo de 2021]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Sistema_inmunitario&oldid=135710128
47. Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D. Neuroinflammation: The role and consequences. *Neuroscience Research*. febrero de 2014;79:1-12.
48. Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*. febrero de 2010;129(2):154-69.
49. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 19 de agosto de 2016;353(6301):777-83.

50. Depboylu C, Stricker S, Ghobril J-P, Oertel WH, Priller J, Höglinger GU. Brain-resident microglia predominate over infiltrating myeloid cells in activation, phagocytosis and interaction with T-lymphocytes in the MPTP mouse model of Parkinson disease. *Experimental Neurology*. diciembre de 2012;238(2):183-91.
51. Dutta G, Barber DS, Zhang P, Doperalski NJ, Liu B. Involvement of dopaminergic neuronal cystatin C in neuronal injury-induced microglial activation and neurotoxicity: DA neuronal cystatin C and microglia. *Journal of Neurochemistry*. agosto de 2012;122(4):752-63.
52. Yan J, Fu Q, Cheng L, Zhai M, Wu W, Huang L, et al. Inflammatory response in Parkinson's disease (Review). *Molecular Medicine Reports*. noviembre de 2014;10(5):2223-33.
53. Li J. Regulation of IL-8 and IL-1 expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations. *Human Molecular Genetics*. 15 de junio de 2004;13(16):1715-25.
54. Torres J, Mehandru S, Colombel J-F, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *The Lancet*. abril de 2017;389(10080):1741-55.
55. Malek TR. The Biology of Interleukin-2. *Annu Rev Immunol*. abril de 2008;26(1):453-79.
56. Moore KW, O'Garra A, Malefyt RW, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. abril de 1993;11(1):165-90.
57. Galvin JE. Cognitive Change in Parkinson Disease. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*. octubre de 2006;20(4):302-10.
58. Hirano T, Kishimoto T. Interleukin-6. En: Sporn MB, Roberts AB, editores. *Peptide Growth Factors and Their Receptors I* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1990 [citado 30 de mayo de 2021]. p. 633-65. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 95 / 1). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-49295-2_14

59. Trapero I, Cauli O. Interleukin 6 and cognitive dysfunction. *Metab Brain Dis.* septiembre de 2014;29(3):593-608.
60. Krueger J. The Role of Cytokines in Sleep Regulation. *CPD.* 1 de noviembre de 2008;14(32):3408-16.
61. Krueger JM, Obál F, Fang J, Kubota T, Taishi P. The Role of Cytokines in Physiological Sleep Regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 25 de enero de 2006;933(1):211-21.
62. Fitzgerald E, Murphy S, Martinson HA. Alpha-Synuclein Pathology and the Role of the Microbiota in Parkinson's Disease. *Front Neurosci.* 24 de abril de 2019;13:369.
63. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* julio de 2001;2(7):492-501.
64. Alvarez-Erviti L, Couch Y, Richardson J, Cooper JM, Wood MJA. Alpha-synuclein release by neurons activates the inflammatory response in a microglial cell line. *Neuroscience Research.* abril de 2011;69(4):337-42.
65. Palazzo A, Ackerman B, Gundersen GG. Tubulin acetylation and cell motility. *Nature.* enero de 2003;421(6920):230-230.
66. Magiera MM, Janke C. Post-translational modifications of tubulin. *Current Biology.* mayo de 2014;24(9):R351-4.
67. Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's Disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nat Rev Neurosci.* diciembre de 2002;3(12):932-42.
68. Ahlskog JE. Beating a dead horse: Dopamine and Parkinson disease. *Neurology.* 23 de octubre de 2007;69(17):1701-11.
69. van der Lee SJ, Teunissen CE, Pool R, Shipley MJ, Teumer A, Chouraki V, et al. Circulating metabolites and general cognitive ability and dementia: Evidence from 11 cohort studies. *Alzheimer's & Dementia.* junio de 2018;14(6):707-22.
70. Yatin SM, Yatin M, Aulick T, Ain KB, Butterfield DA. Alzheimer's amyloid β -peptide associated free radicals increase rat embryonic neuronal polyamine uptake

and ornithine decarboxylase activity: protective effect of vitamin E. *Neuroscience Letters*. marzo de 1999;263(1):17-20.

71. Subramaniam V. Glutamate Antagonists - Parkinson's News Today [Internet]. [citado 31 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://parkinsonsnewstoday.com/glutamate-antagonists/>

72. Iwasaki Y, Ikeda K, Shiojima T, Kinoshita M. Increased plasma concentrations of aspartate, glutamate and glycine in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*. octubre de 1992;145(2):175-7.

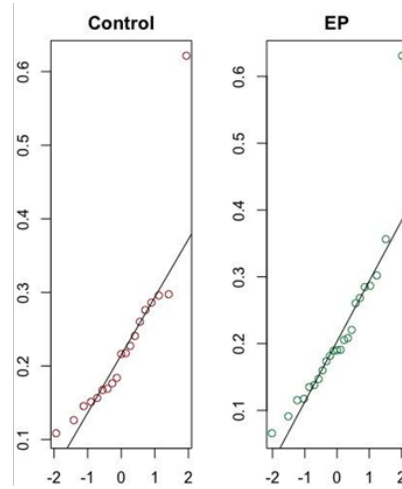
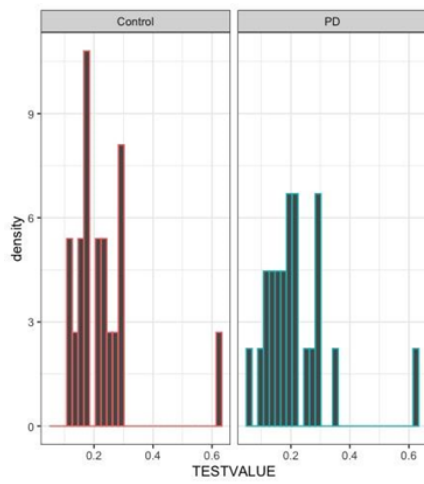
10. Anexos

10.1 Relación de citoquinas en LCR evaluadas en el estudio

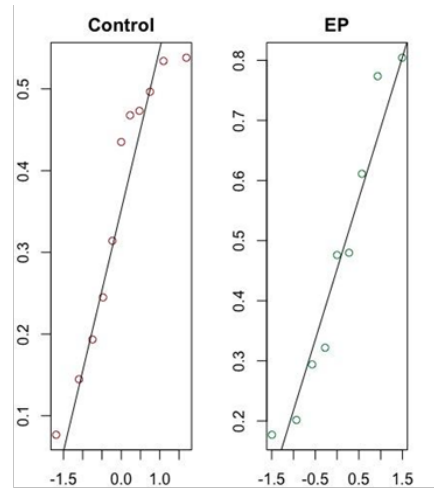
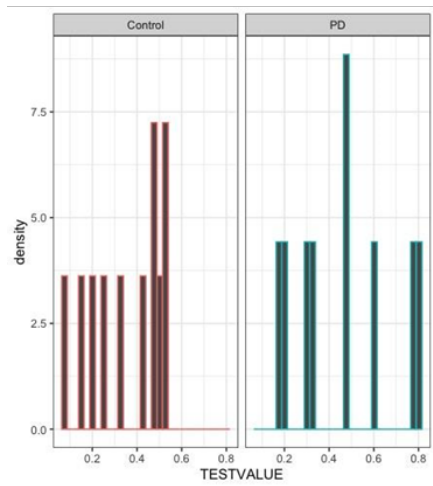
<i>Citoquina</i>	<i>Género</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>Valores totales</i>	<i>Valores nulos (NA)</i>	<i>Valores válidos</i>	<i>% valores NA</i>
IL-10	Female	Control	11	9	2	82%
IL-10	Male	Control	15	14	1	93%
IL-10	Female	PD	9	8	1	89%
IL-10	Male	PD	19	16	3	84%
IL-12p70	Female	Control	11	11	0	100%
IL-12p70	Male	Control	15	15	0	100%
IL-12p70	Female	PD	9	9	0	100%
IL-12p70	Male	PD	19	19	0	100%
IL-13	Female	Control	11	11	0	100%
IL-13	Male	Control	15	15	0	100%
IL-13	Female	PD	9	9	0	100%
IL-13	Male	PD	19	18	1	95%
IL-1b	Female	Control	11	5	6	45%
IL-1b	Male	Control	15	10	5	67%
IL-1b	Female	PD	9	8	1	89%
IL-1b	Male	PD	19	8	11	42%
IL-2	Female	Control	11	2	9	18%
IL-2	Male	Control	15	8	7	53%
IL-2	Female	PD	9	4	5	44%
IL-2	Male	PD	19	8	11	42%
IL-4	Female	Control	13	13	0	100%
IL-4	Male	Control	15	15	0	100%
IL-4	Female	PD	10	10	0	100%
IL-4	Male	PD	22	22	0	100%
IL-6	Female	Control	11	0	11	0%
IL-6	Male	Control	15	1	14	7%
IL-6	Female	PD	9	0	9	0%
IL-6	Male	PD	19	0	19	0%
IL-8	Female	Control	11	0	11	0%
IL-8	Male	Control	15	1	14	7%
IL-8	Female	PD	9	0	9	0%
IL-8	Male	PD	19	0	19	0%
INF-g	Female	Control	11	8	3	73%
INF-g	Male	Control	15	12	3	80%
INF-g	Female	PD	9	7	2	78%
INF-g	Male	PD	19	15	4	79%
TNF-alpha	Female	Control	11	10	1	91%
TNF-alpha	Male	Control	15	11	4	73%
TNF-alpha	Female	PD	9	7	2	78%
TNF-alpha	Male	PD	19	15	4	79%

10.2 Estudios de normalidad: muestras de citoquinas en plasma

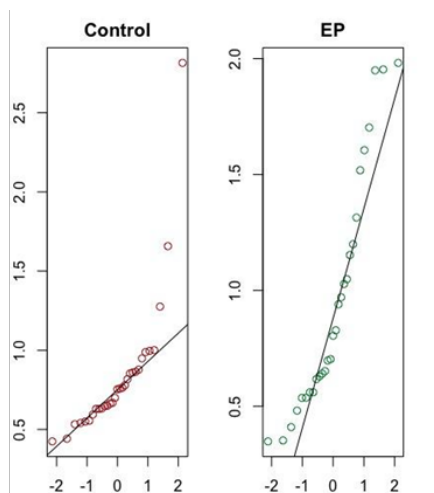
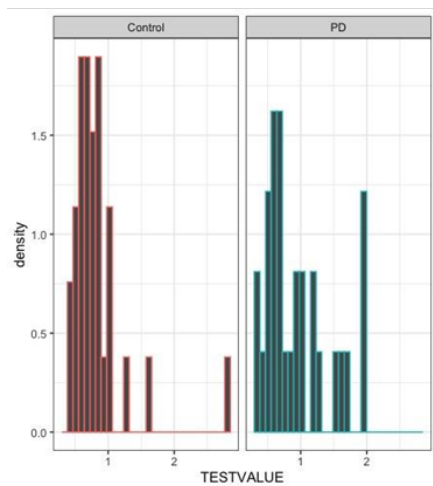
IL-1 β :



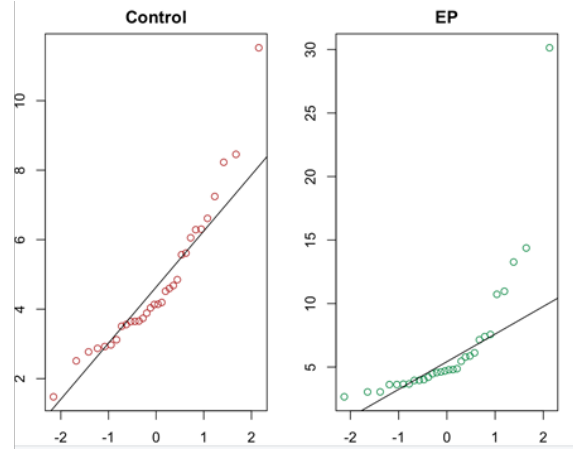
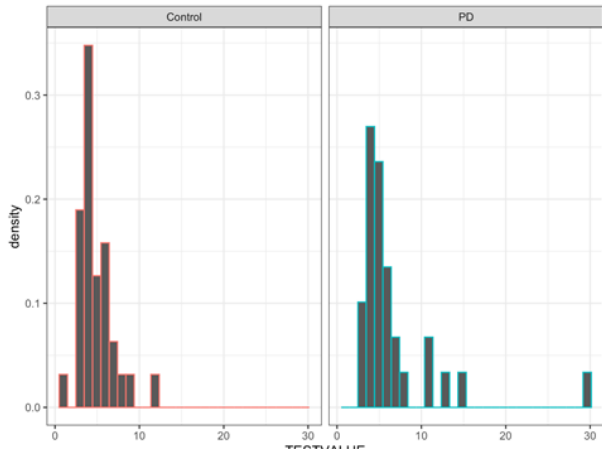
IL-2:



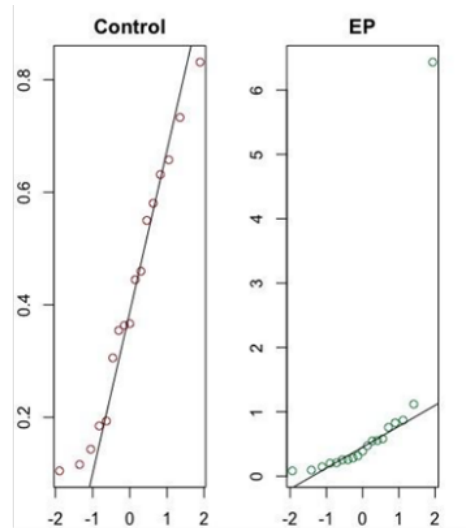
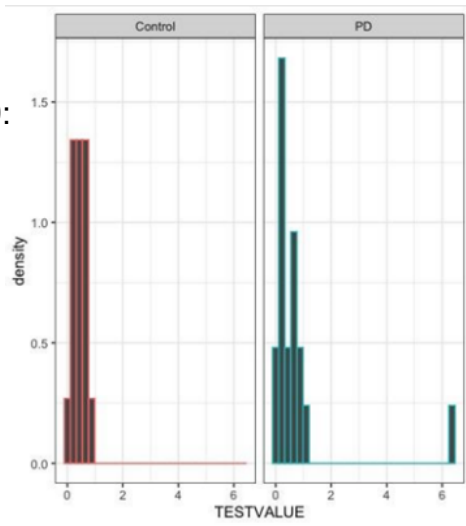
IL-6:



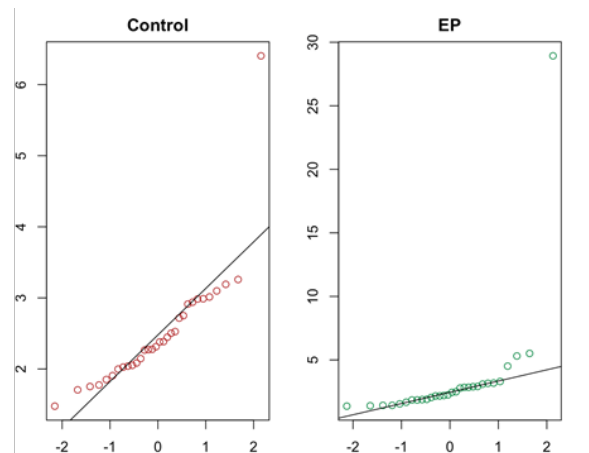
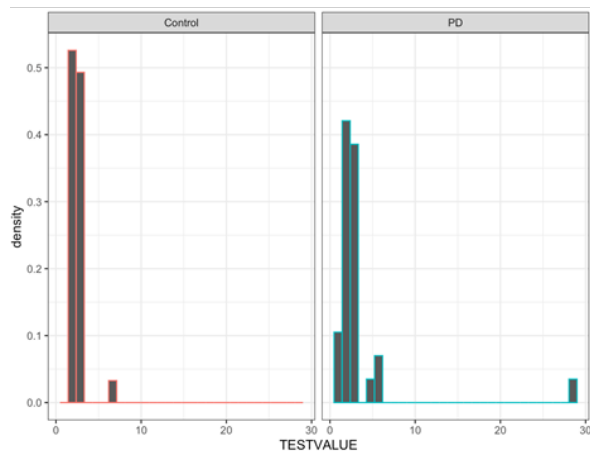
IL-8:



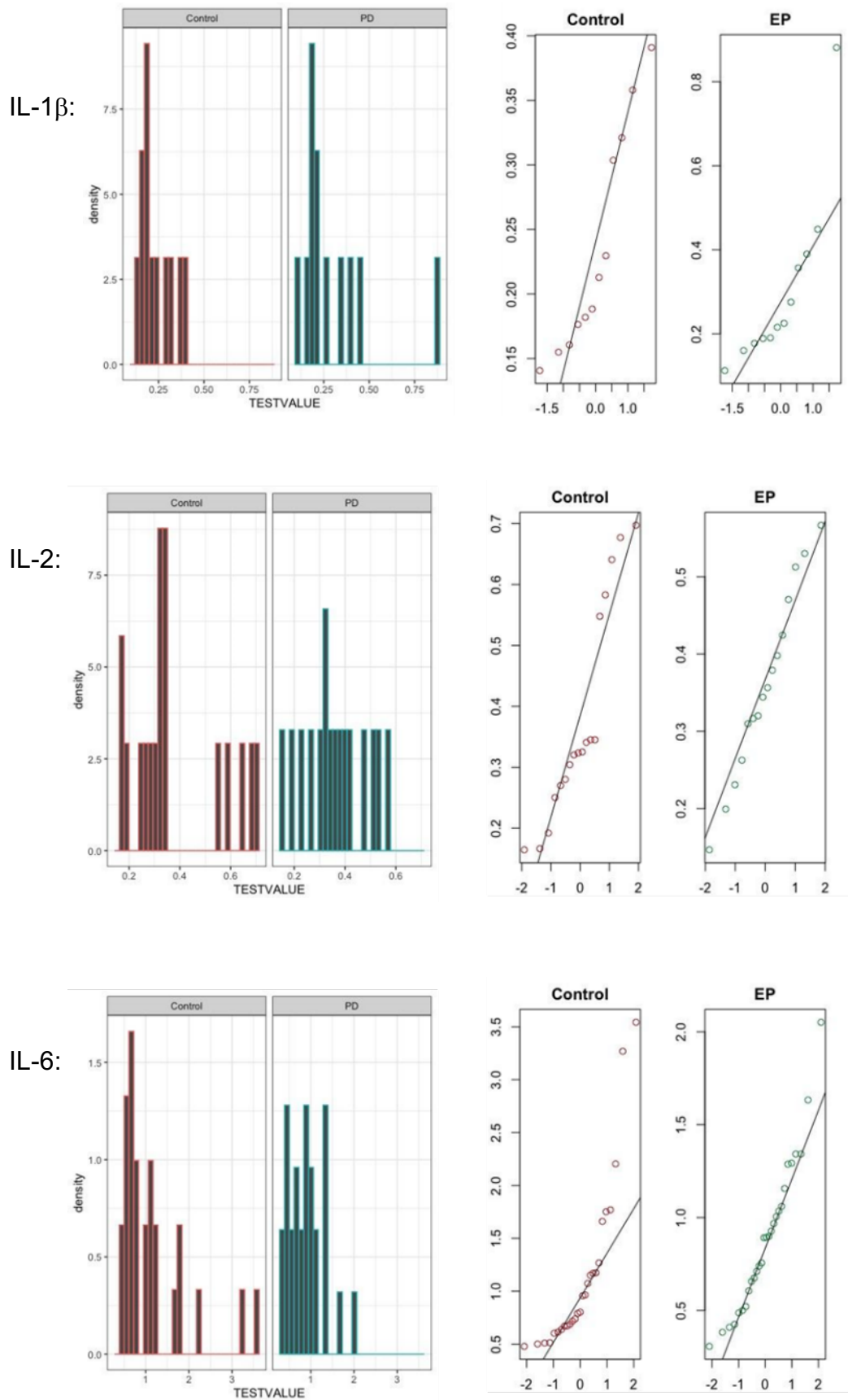
IL-10:



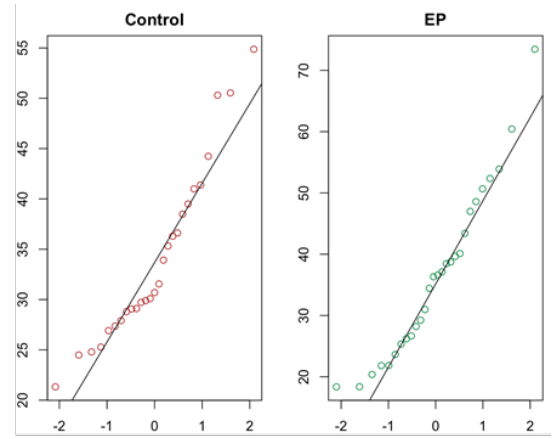
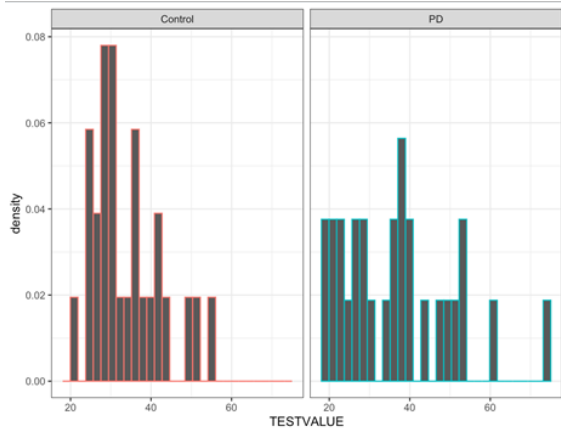
TNF- α :



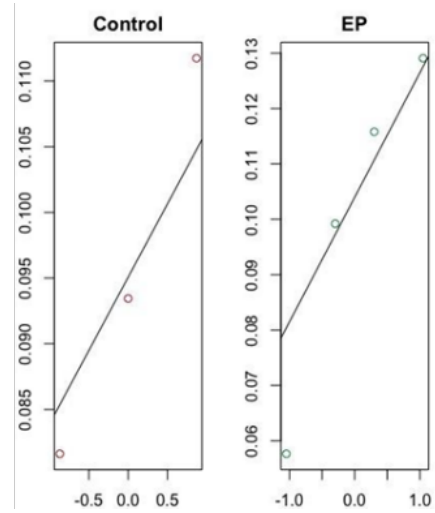
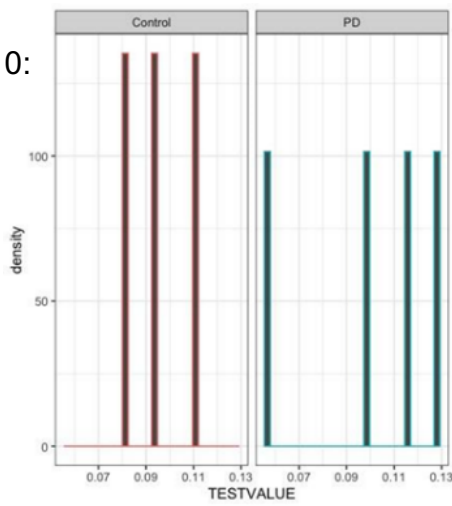
10.3 Estudios de normalidad: muestras de citoquinas en LCR



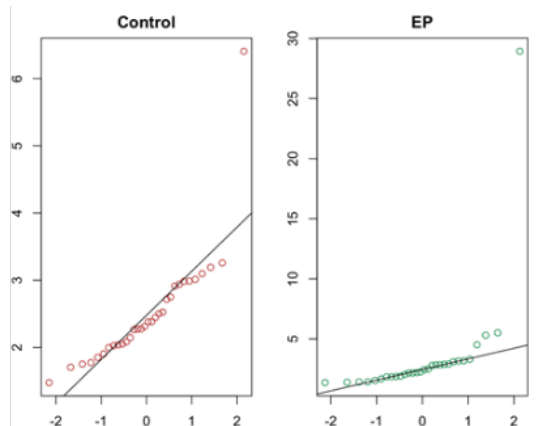
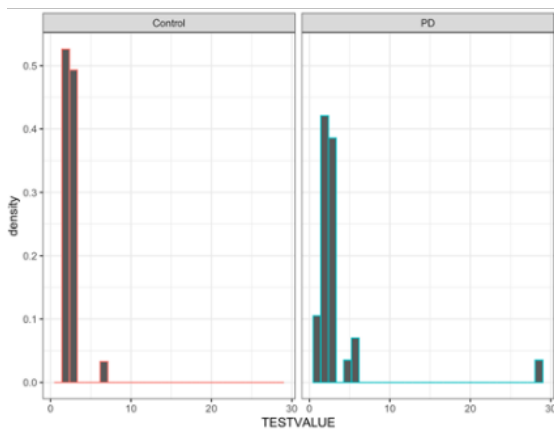
IL-8:



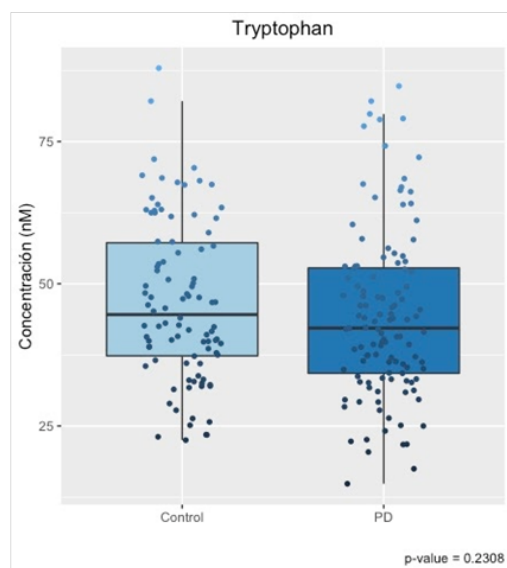
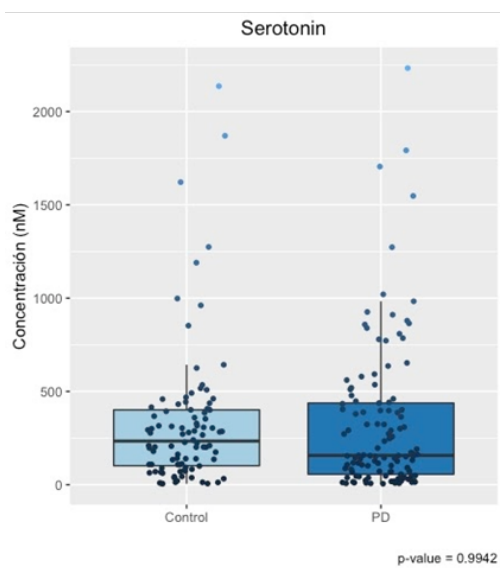
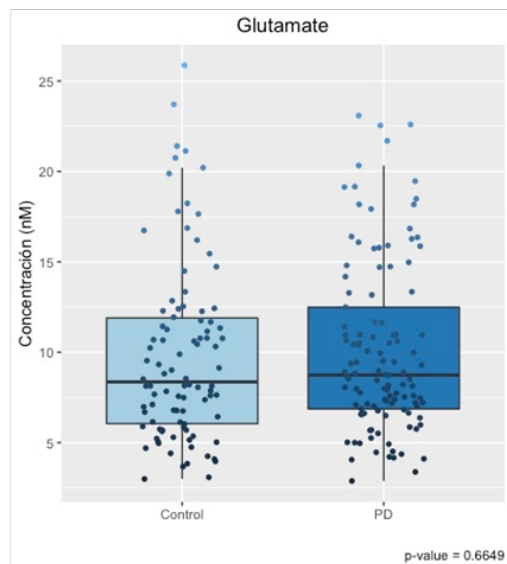
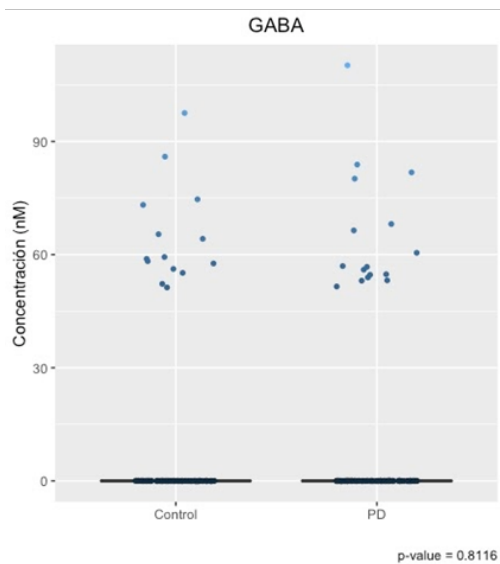
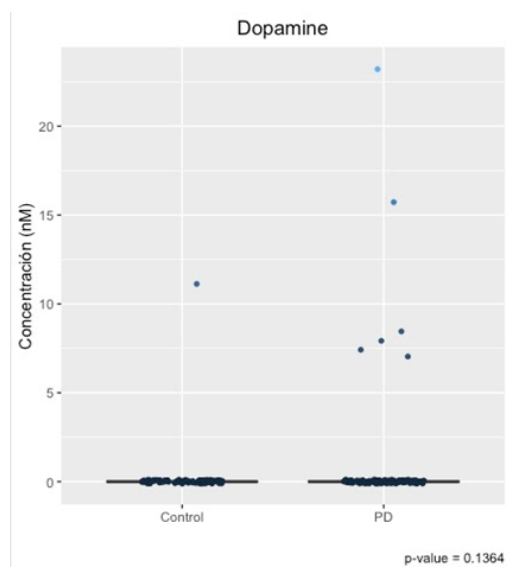
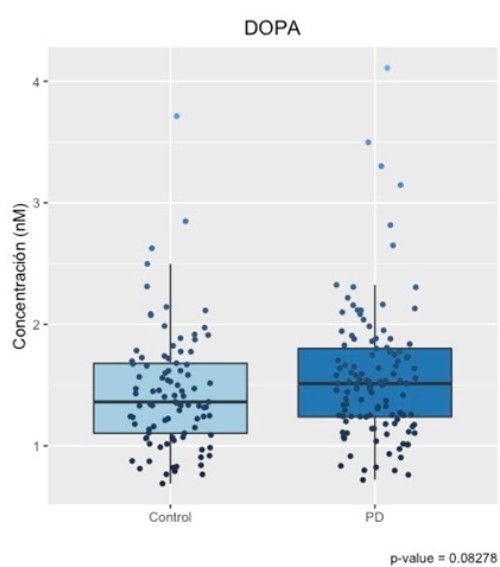
IL-10:

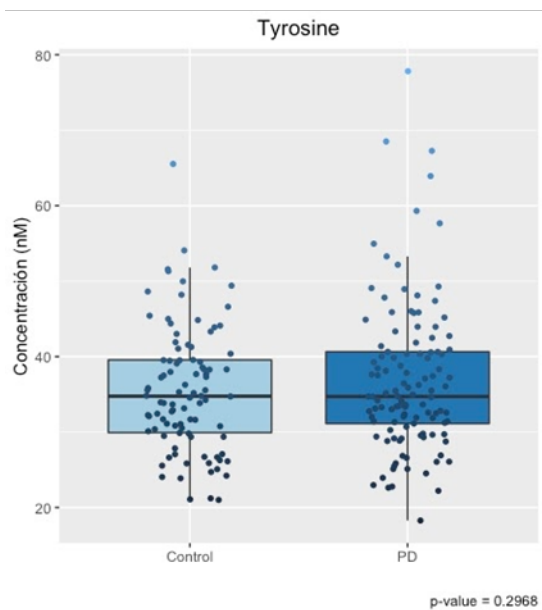
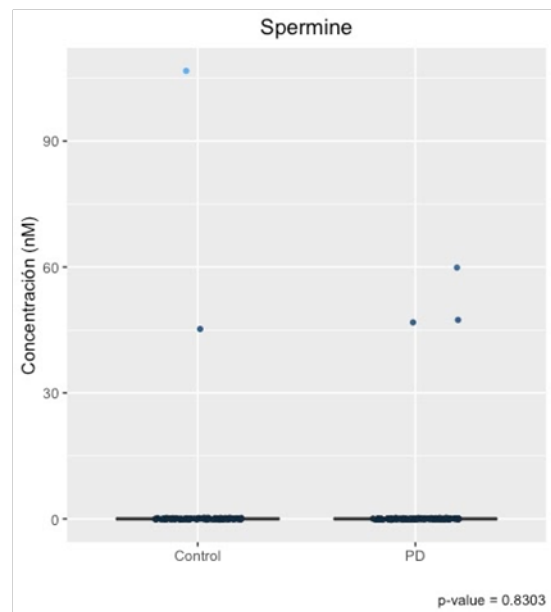
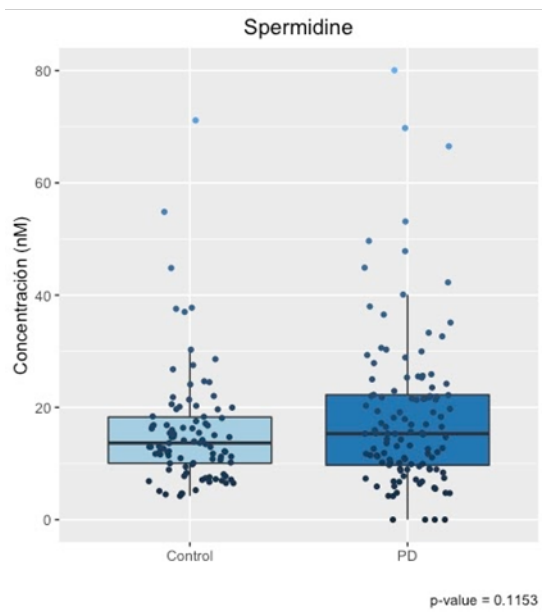
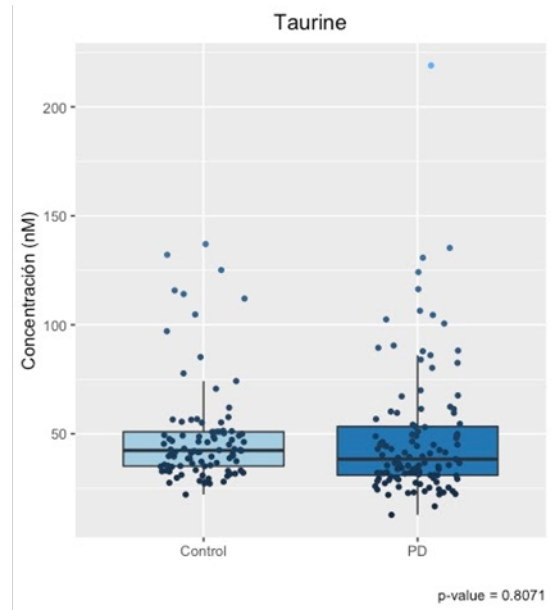
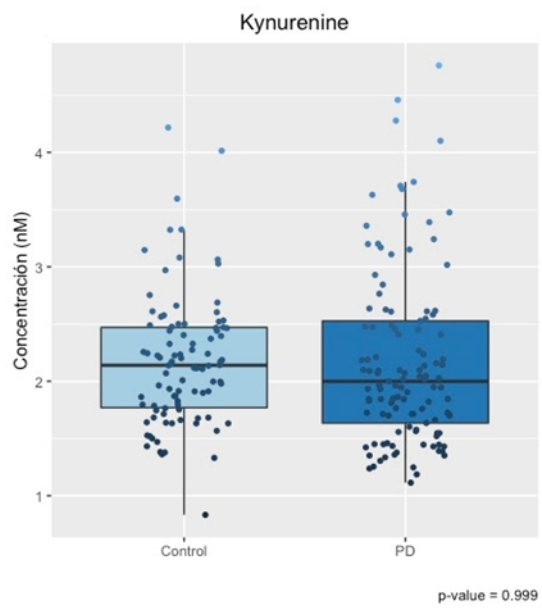


TNF- α :



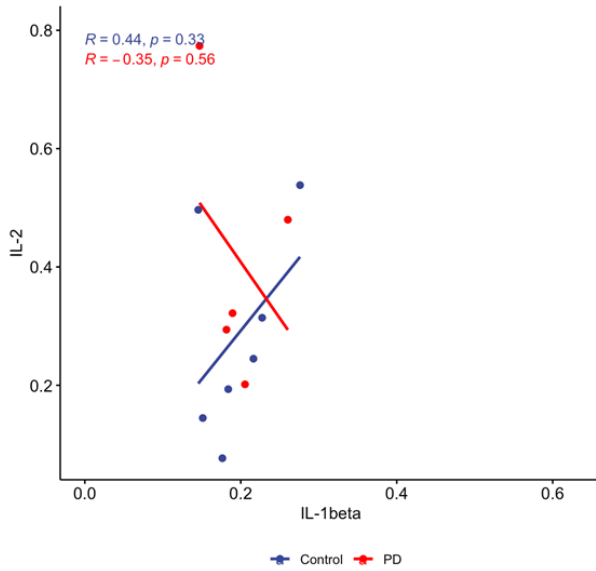
10.4 Niveles plasmáticos de diferentes metabolitos



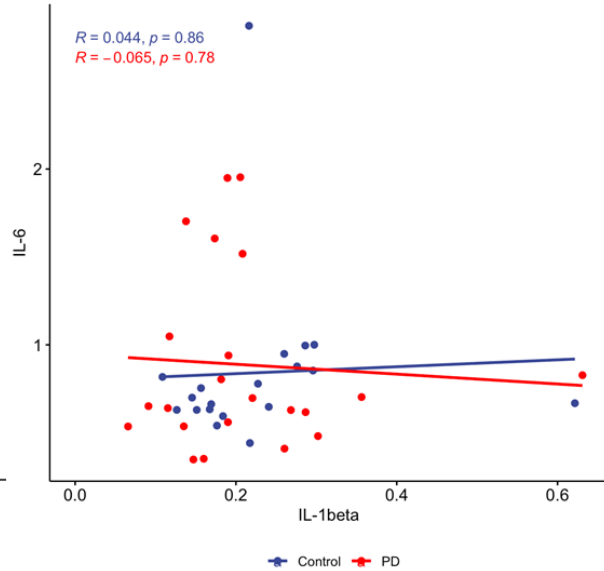


10.5 Estudios de correlación en citoquinas

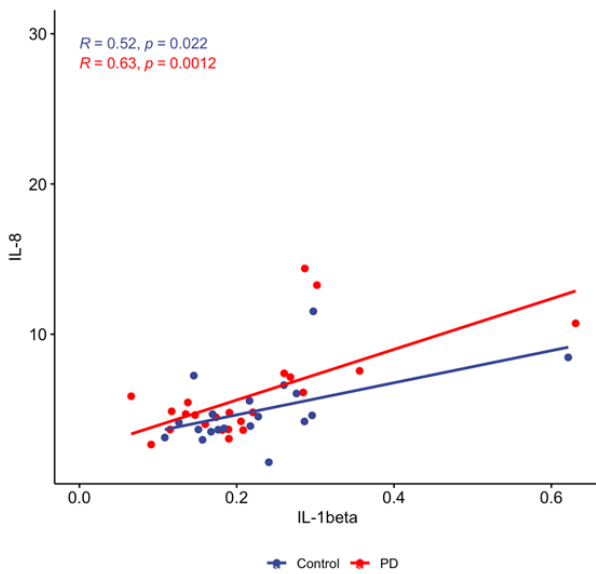
IL-1β vs. IL-2



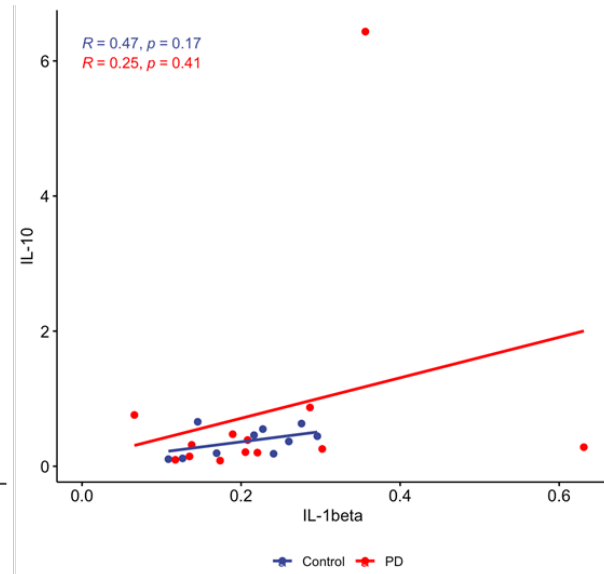
IL-1β vs IL-6



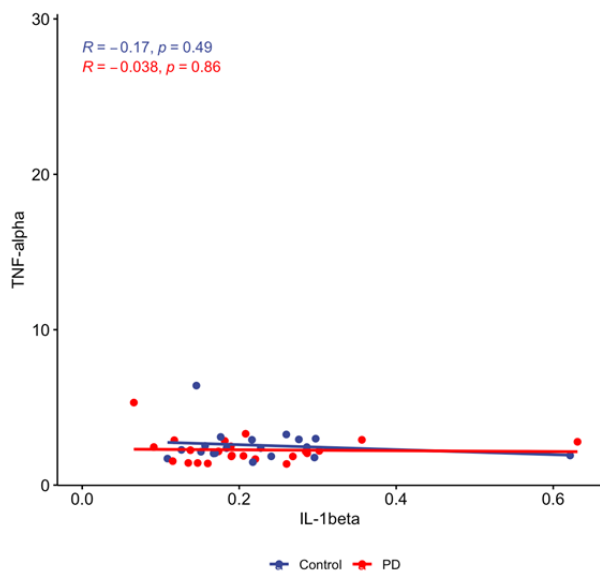
IL-1β vs. IL-8



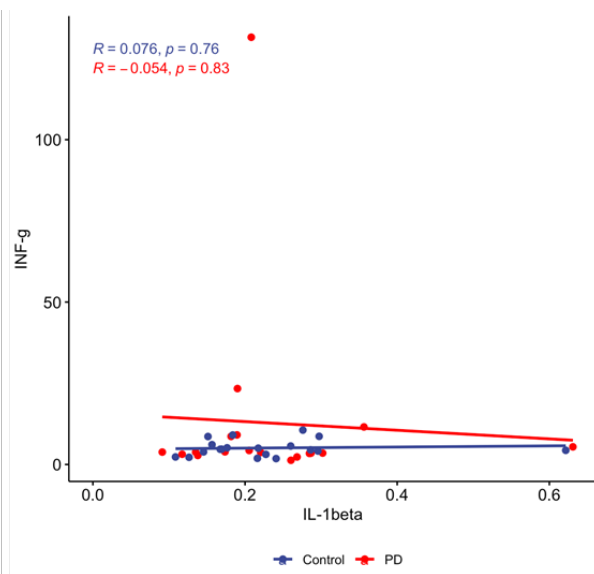
IL-1β vs IL-10



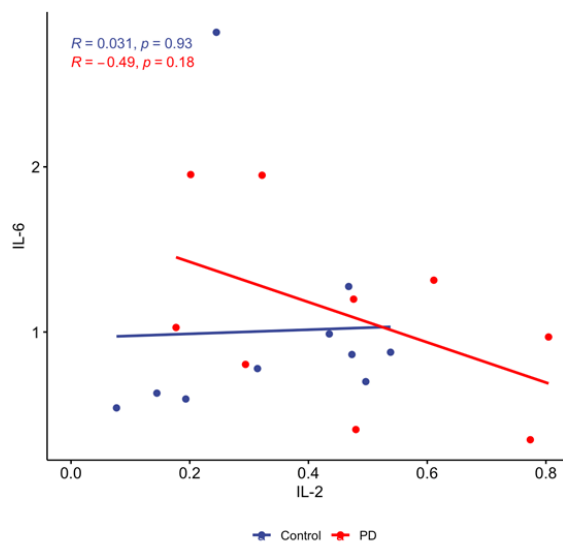
IL-1 β vs. TNF- α



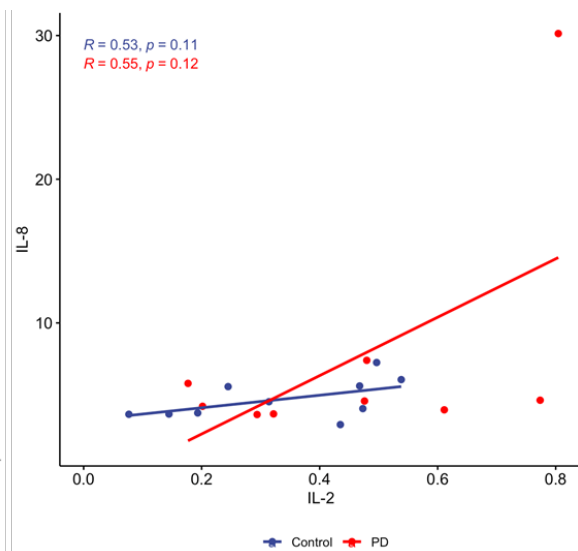
IL-1 β vs INF- γ



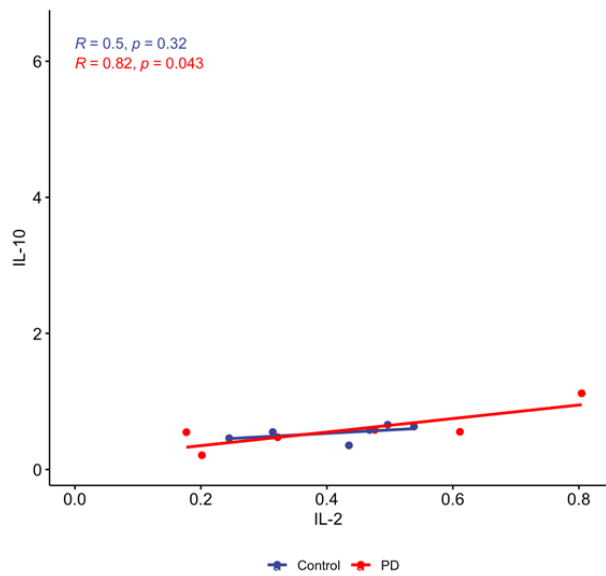
IL-2 vs. IL-6



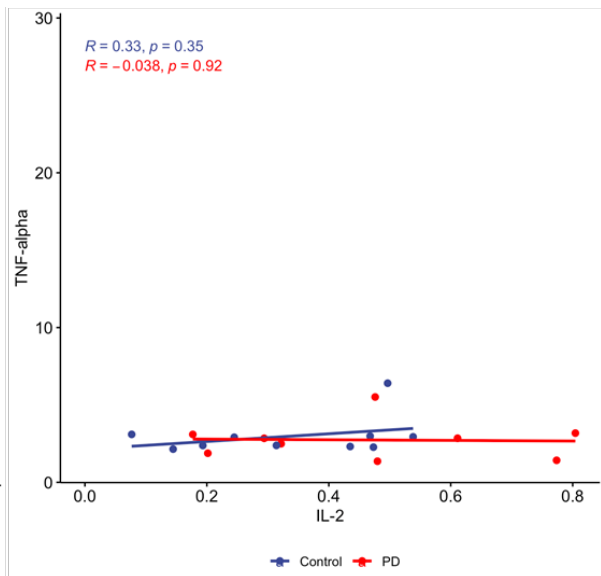
IL-2 vs IL-8



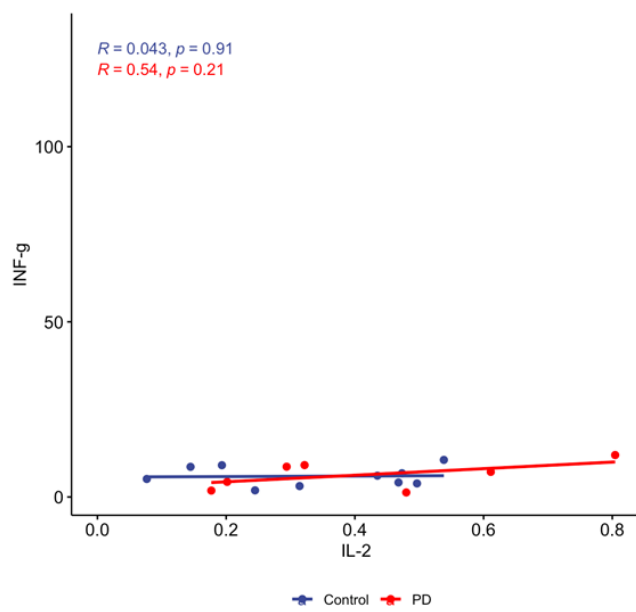
IL-2 vs. IL-10



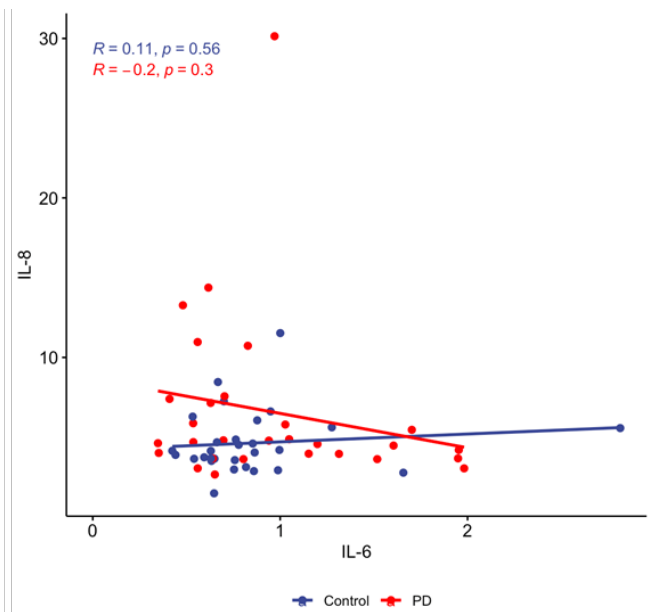
IL-2 vs TNF- α



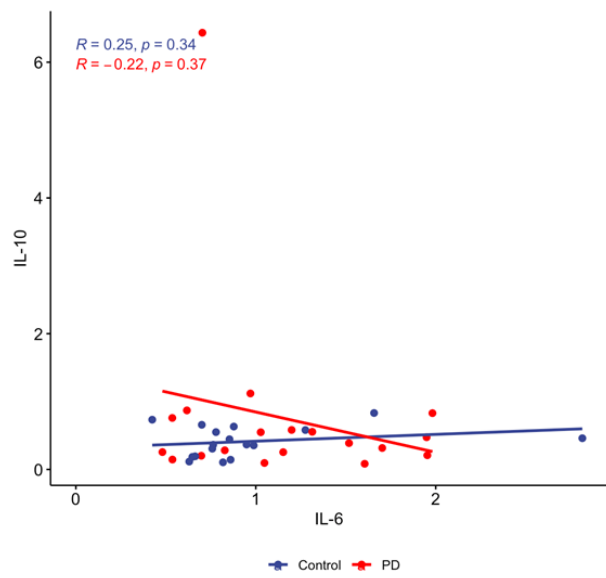
IL-2 vs. INF γ



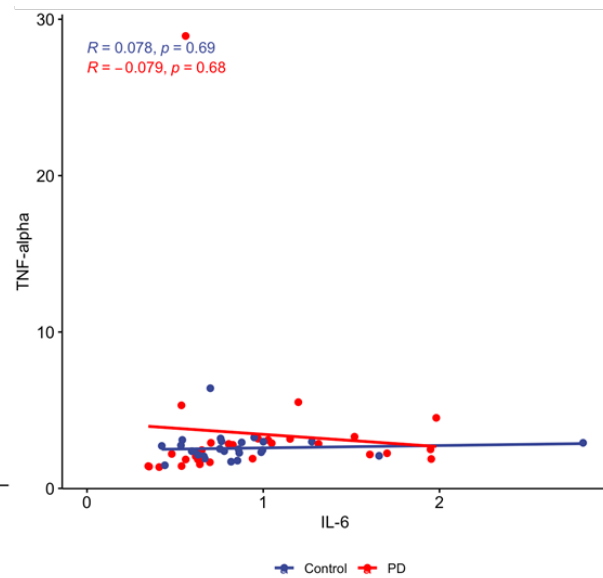
IL-6 vs IL-8



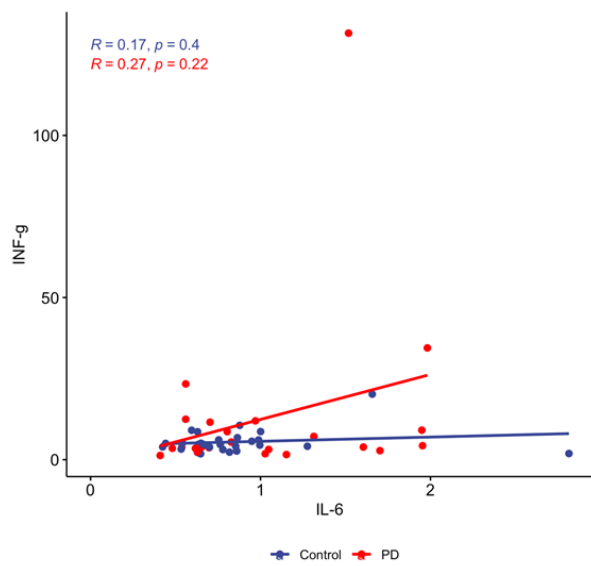
IL-6 vs. IL-10



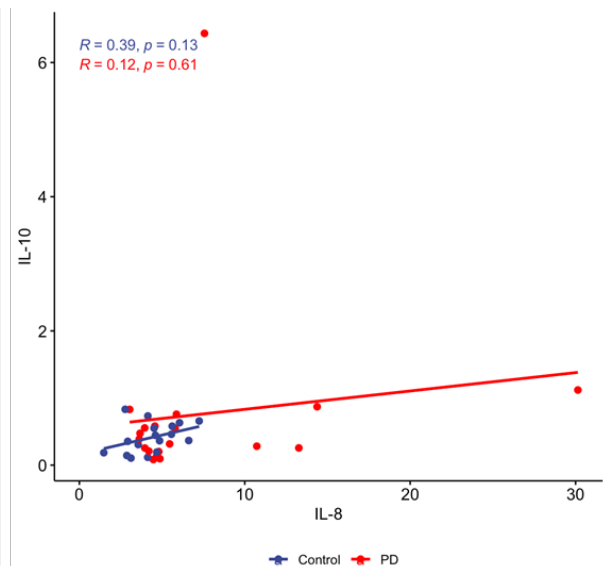
IL-6 vs TNF α



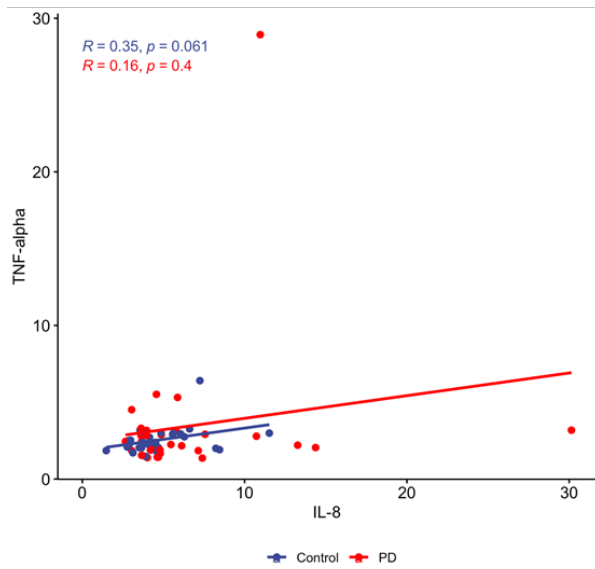
IL-6 vs. INF γ



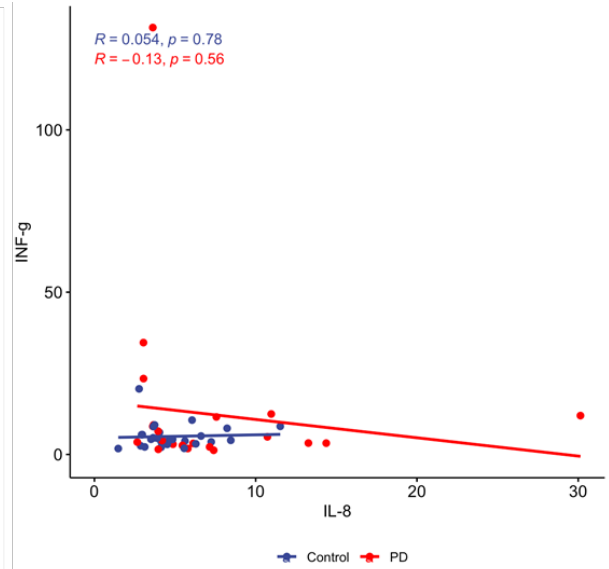
IL-8 vs IL-10



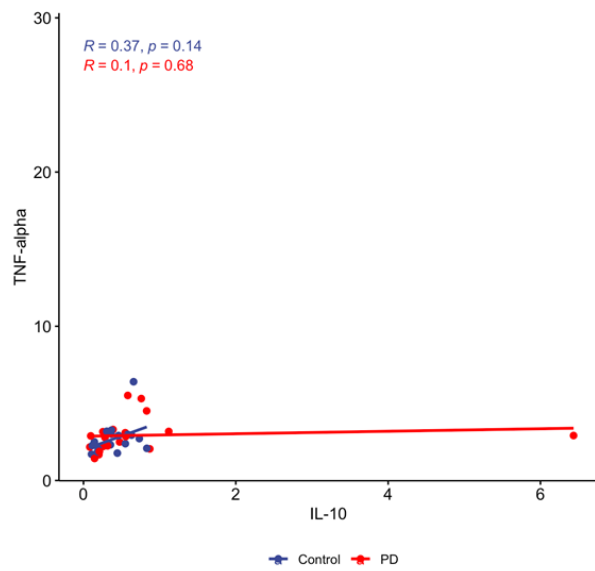
IL-8 vs. TNF α



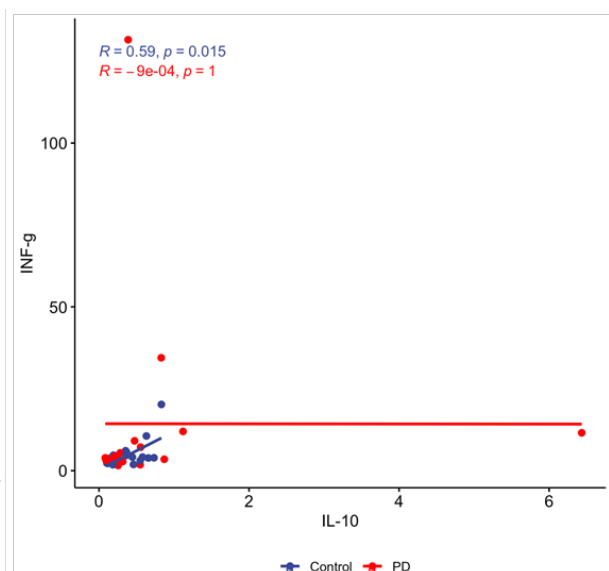
IL-8 vs INF γ

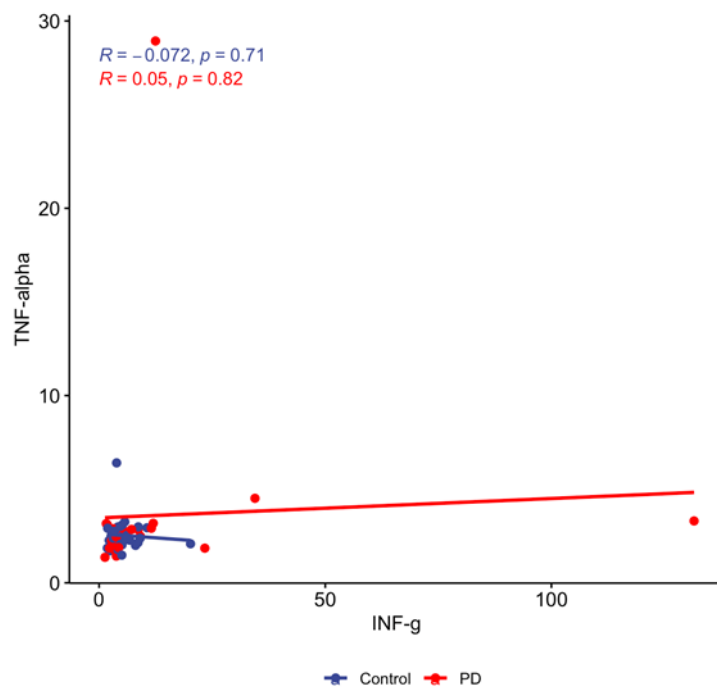
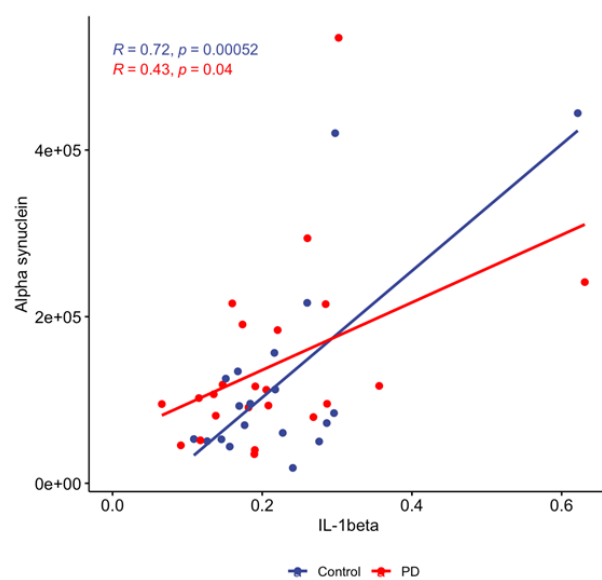
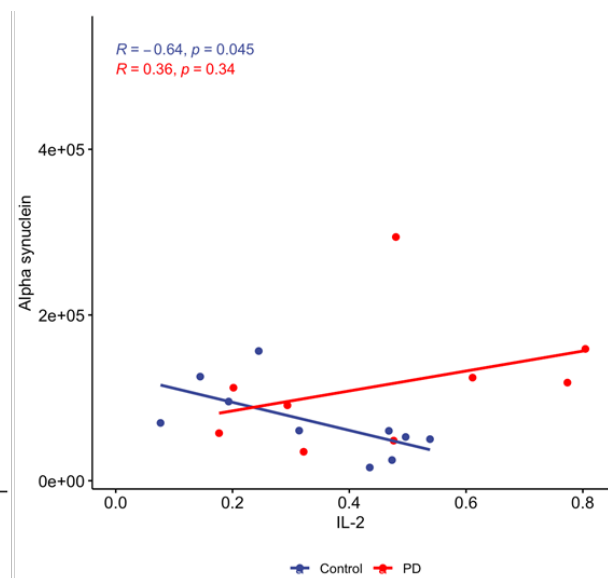


IL-10 vs. TNF α

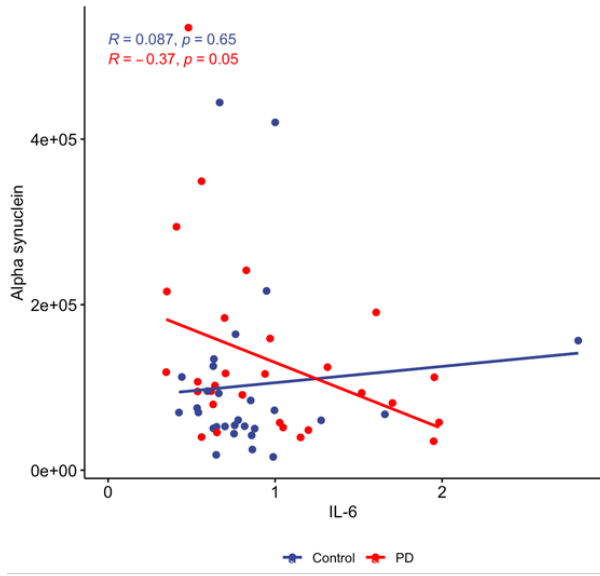


IL-10 vs INF γ

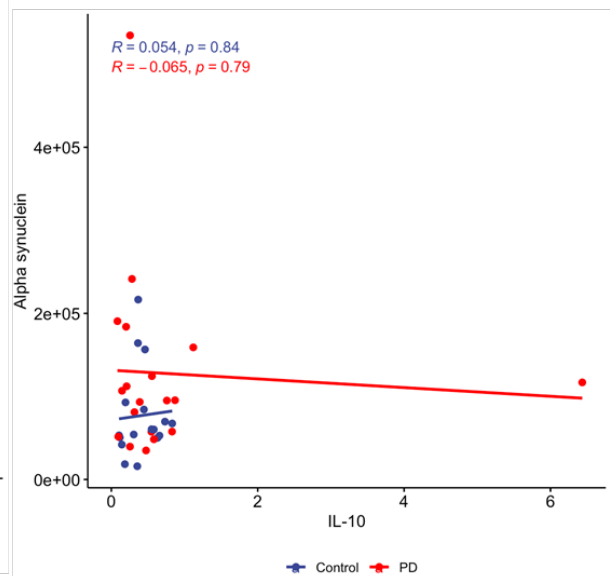


INF γ vs. TNF α 10.6 Estudios de correlación citoquinas vs. α -sinucleína*IL-1 β vs. α -sinucleína**IL-2 vs. α -sinucleína*

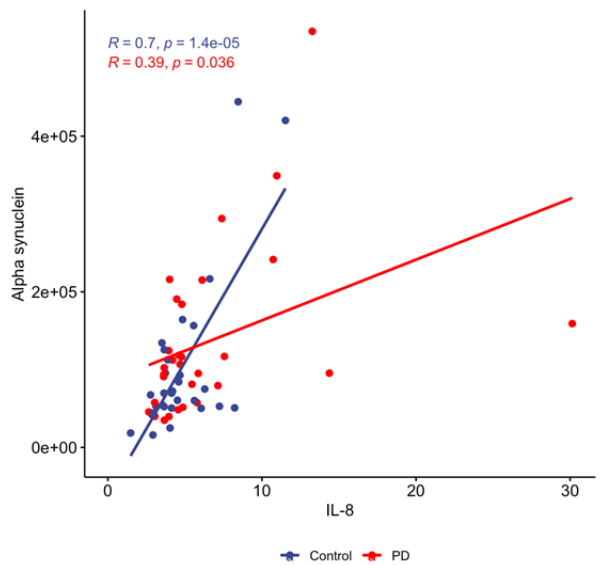
IL-6 vs. α -sinucleína



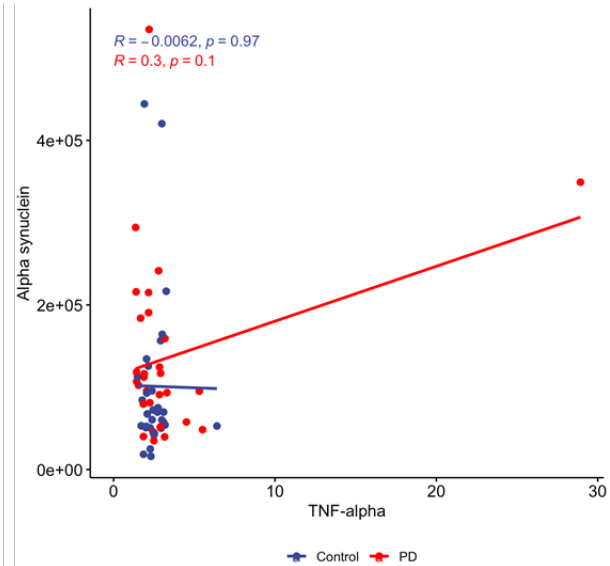
IL-10 vs. α -sinucleína



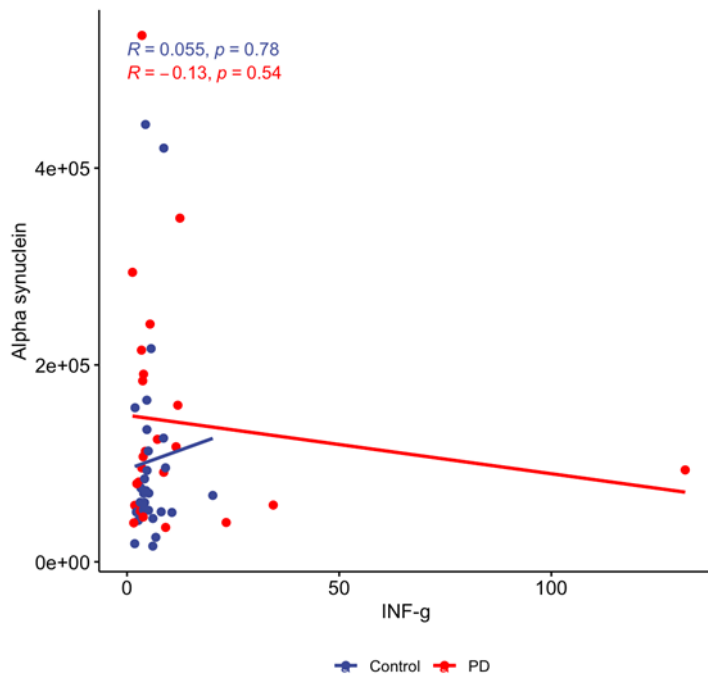
IL-8 vs. α -sinucleína



TNF α vs. α -sinucleína

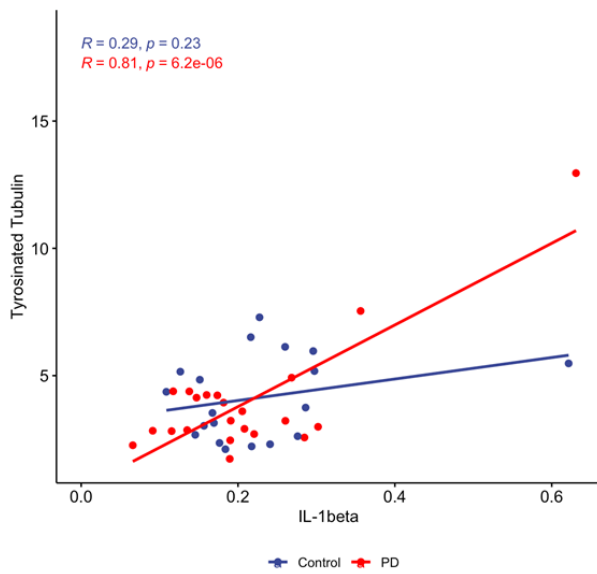


INF γ vs. α -sinucleína

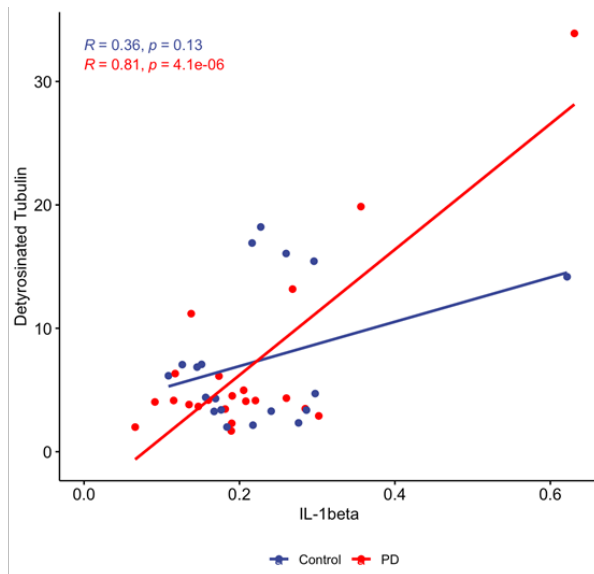


10.7 Estudios de correlación citoquinas vs. modificaciones post-traduccionales de la tubulina

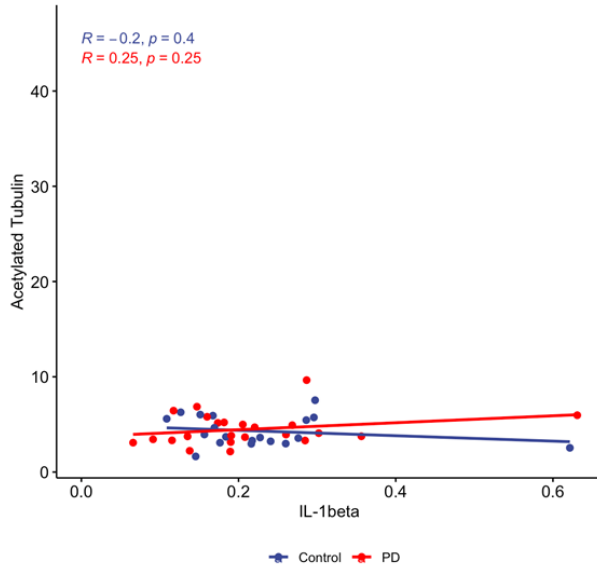
IL-1 β vs. tubulina tirosinada



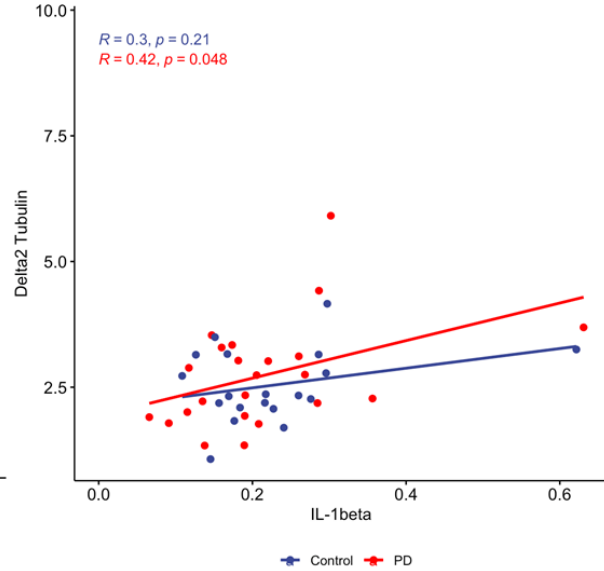
IL-1 β vs. tubulina detirosinada



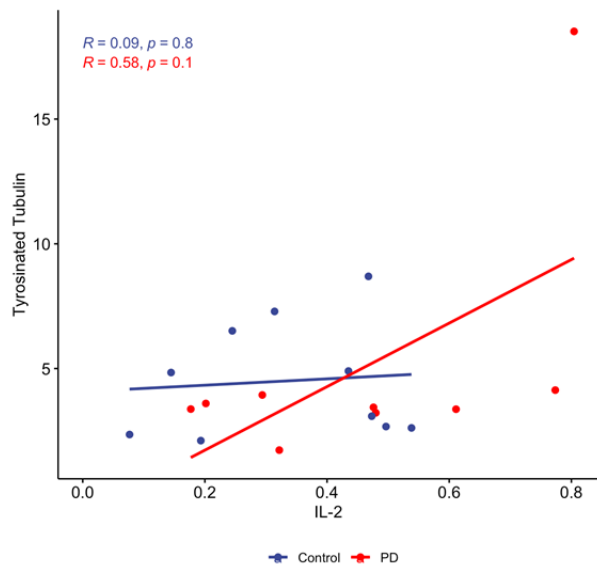
IL-1 β vs. tubulina acetilada



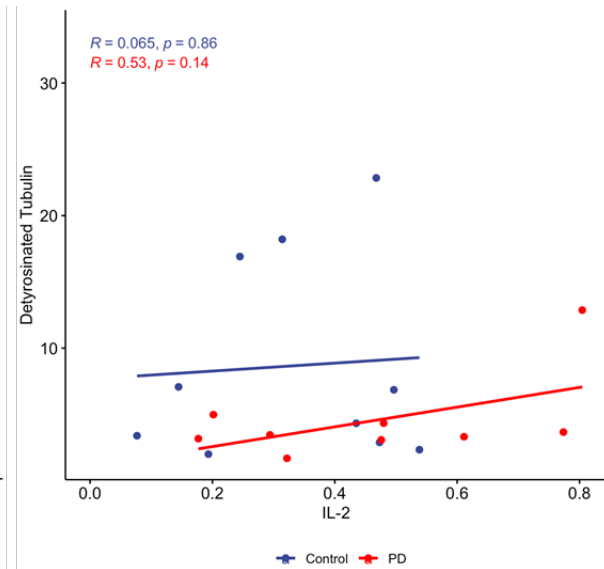
IL-1 β vs. Δ 2-tubulina



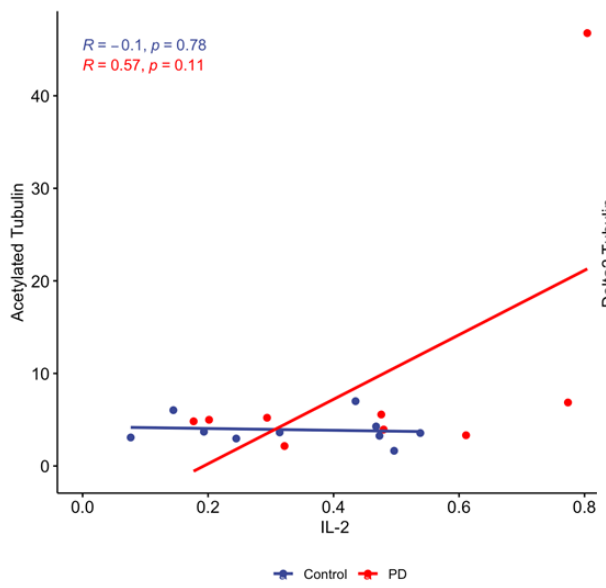
IL-2 vs. tubulina tirosinada



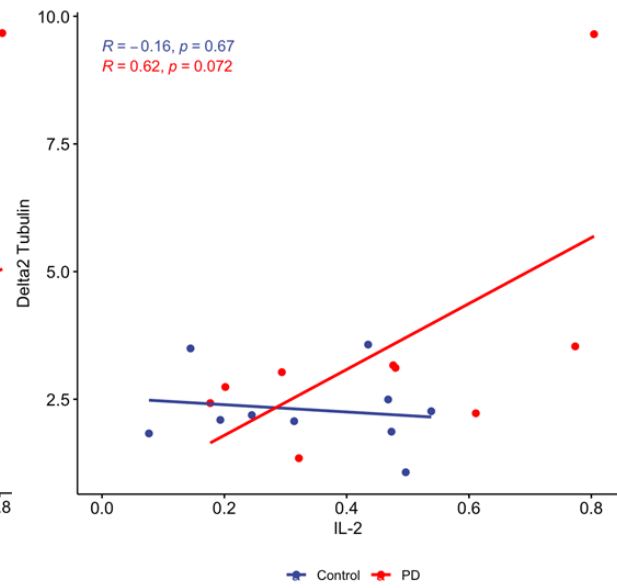
IL-2 vs. tubulina detirosinada



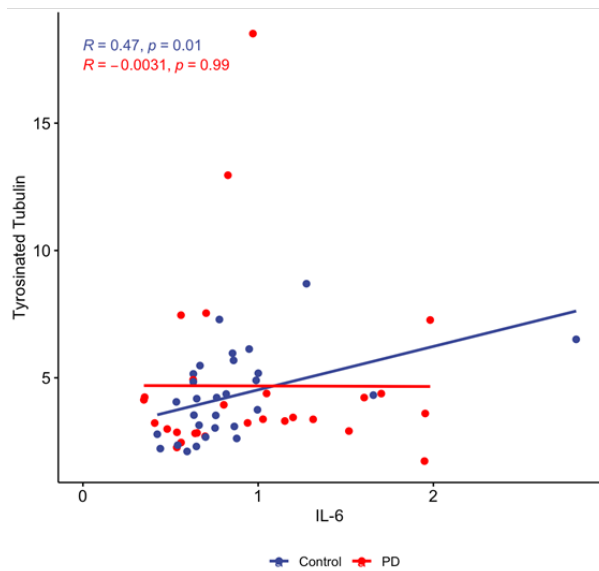
IL-2 vs. tubulina acetilada



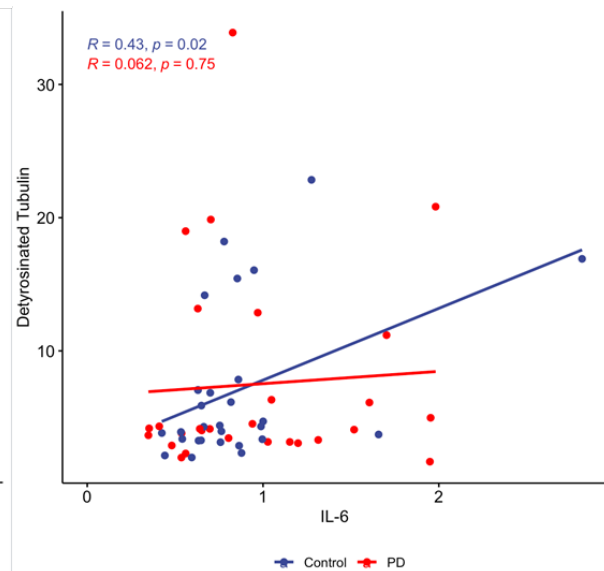
IL-2 vs. Δ 2-tubulina



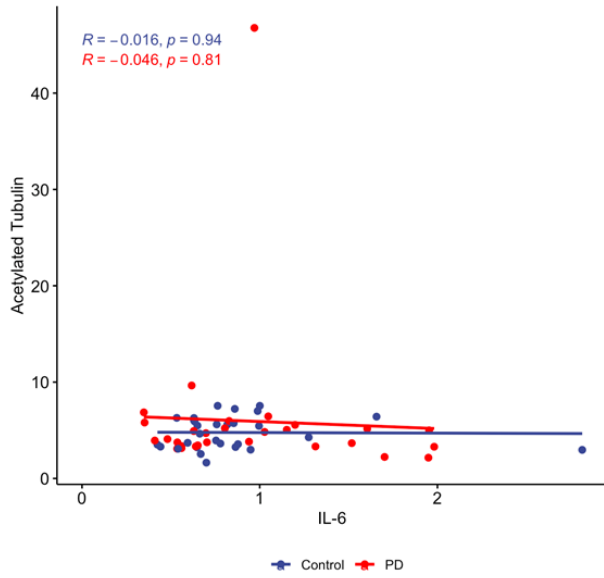
IL-6 vs. tubulina tirosinada



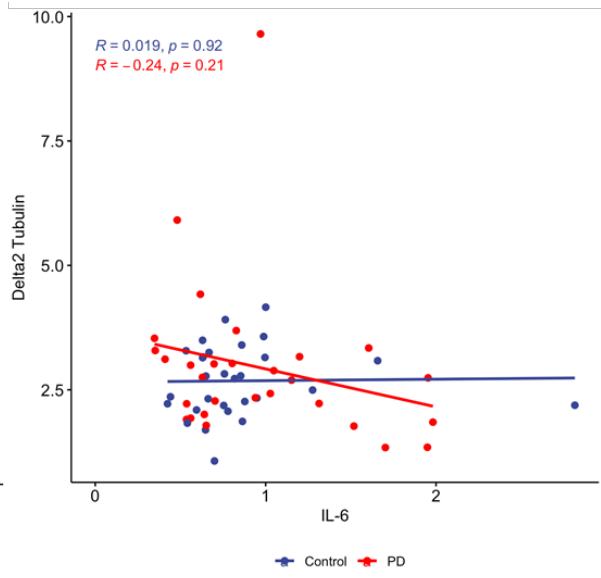
IL-6 vs. tubulina detirosinada



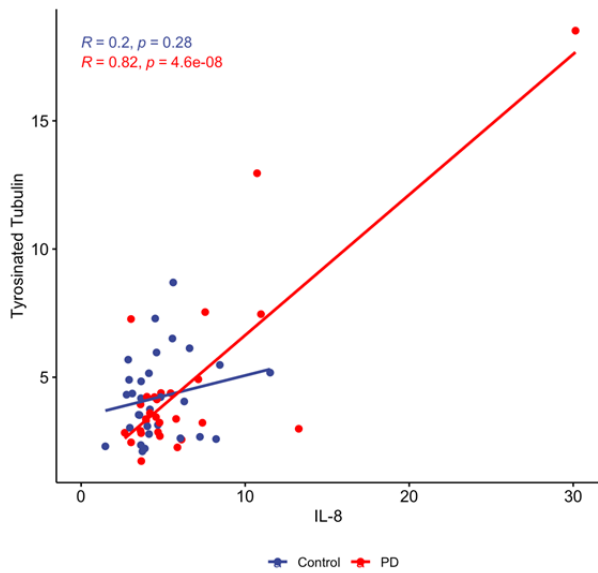
IL-6 vs. tubulina acetilada



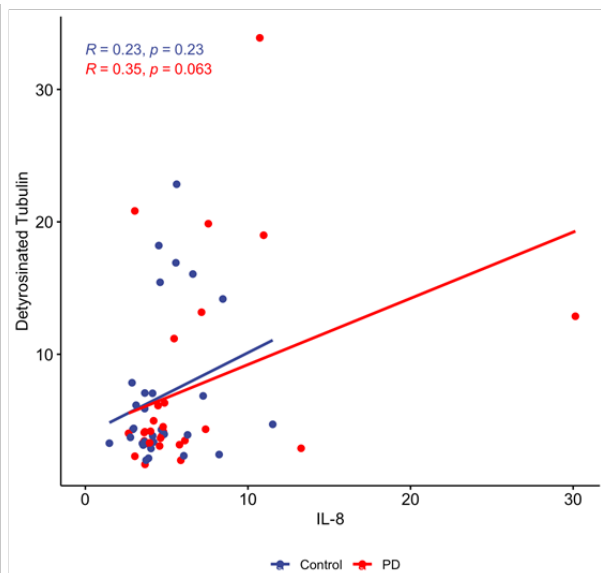
IL-6 vs. $\Delta 2$ -tubulina



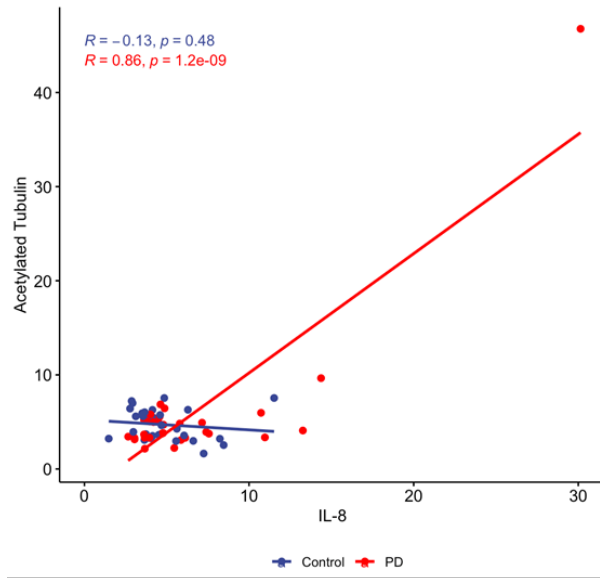
IL-8 vs. tubulina tirosinada



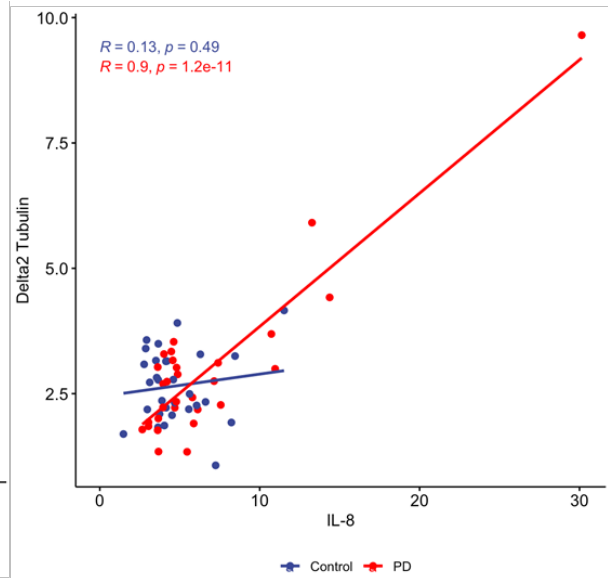
IL-8 vs. tubulina detirosinada



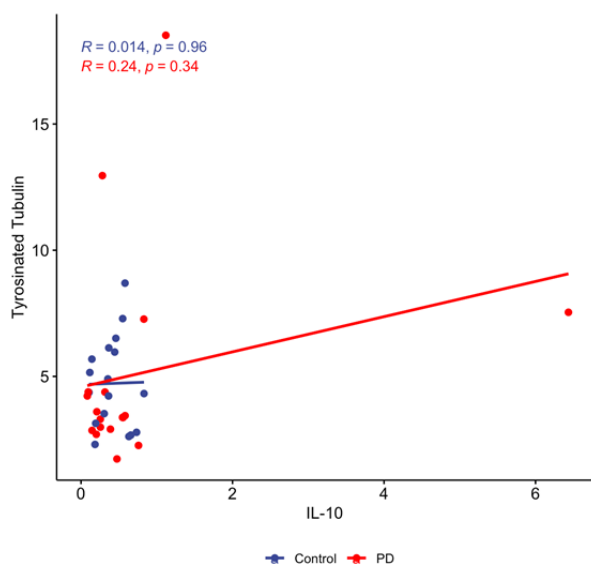
IL-8 vs. tubulina acetilada



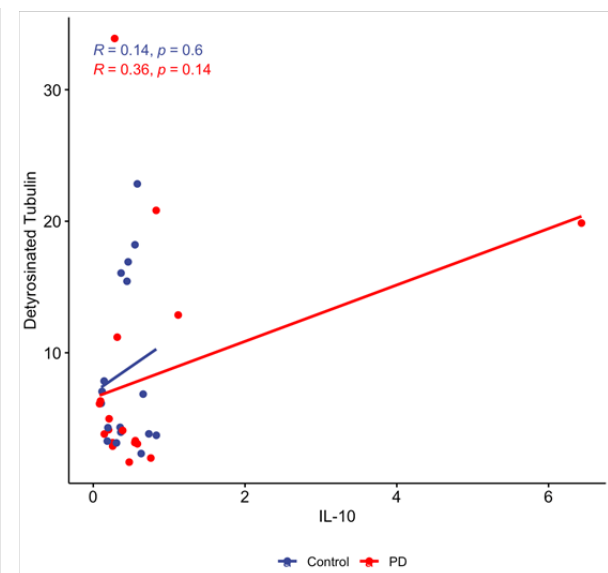
IL-8 vs. Δ 2-tubulina



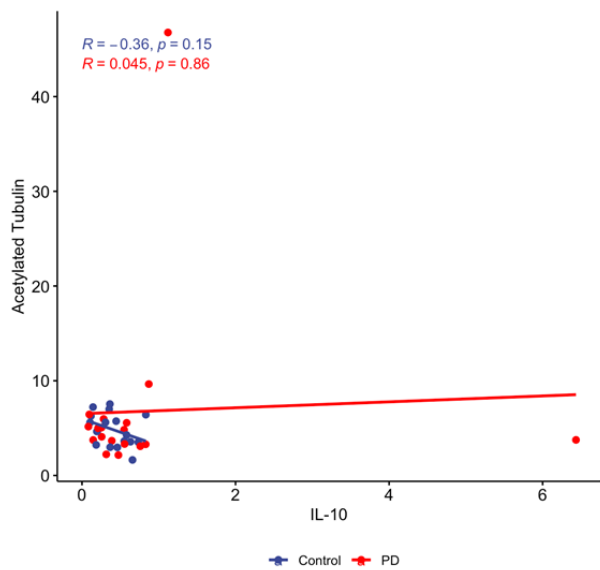
IL-10 vs. tubulina tirosinada



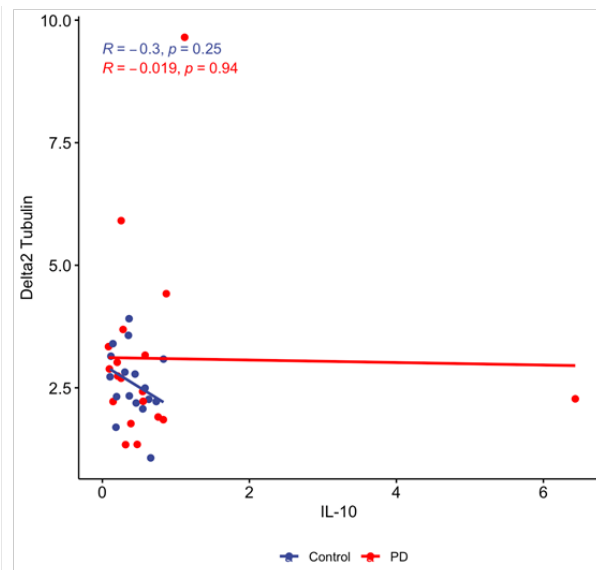
IL-10 vs. tubulina detirosinada



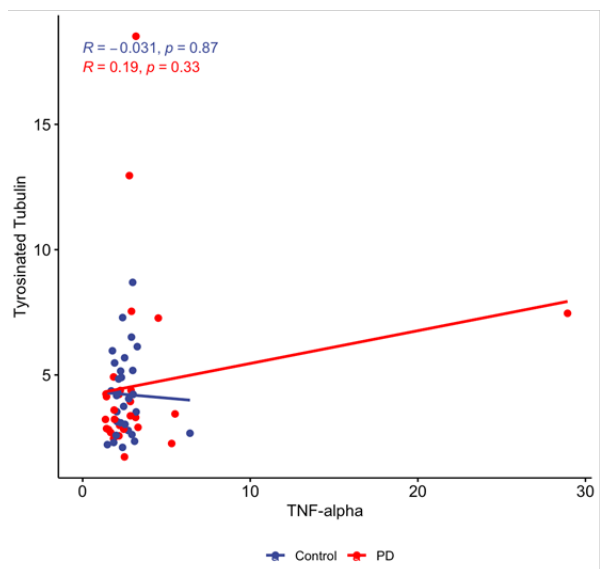
IL-10 vs. tubulina acetilada



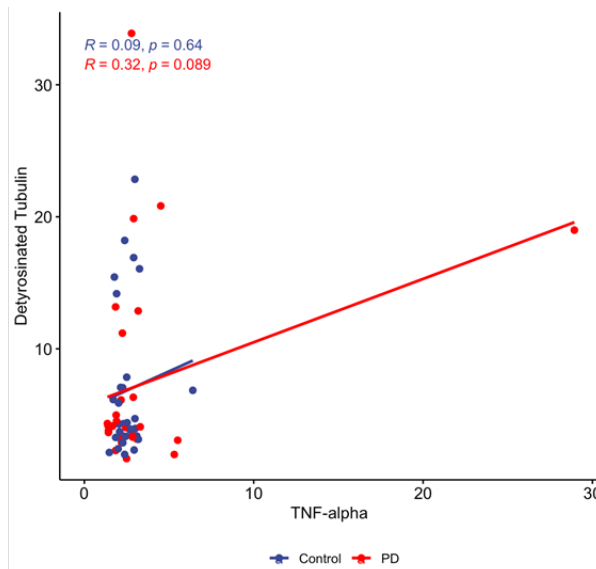
IL-10 vs. Δ 2-tubulina



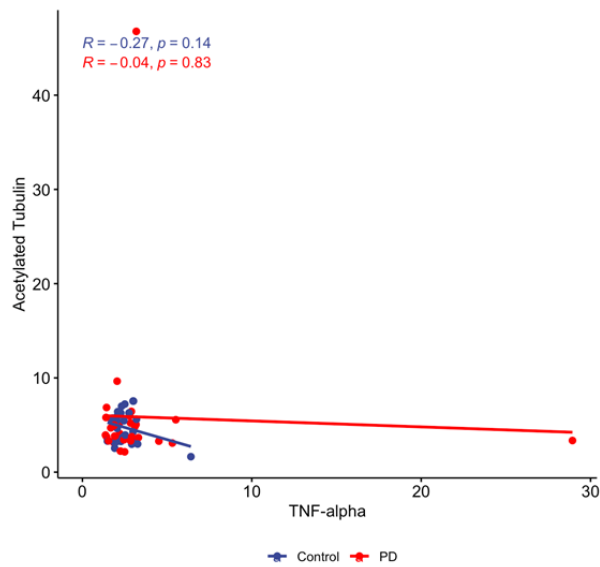
TNF α vs. tubulina tirosinada



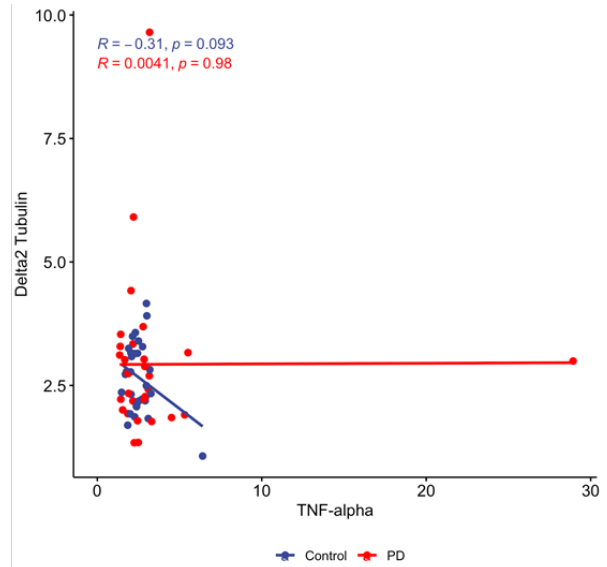
TNF α vs. tubulina detirosinada



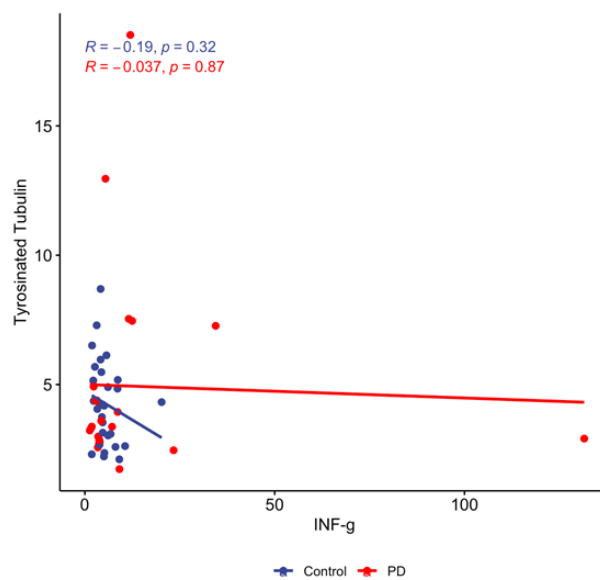
TNF α vs. tubulina acetilada



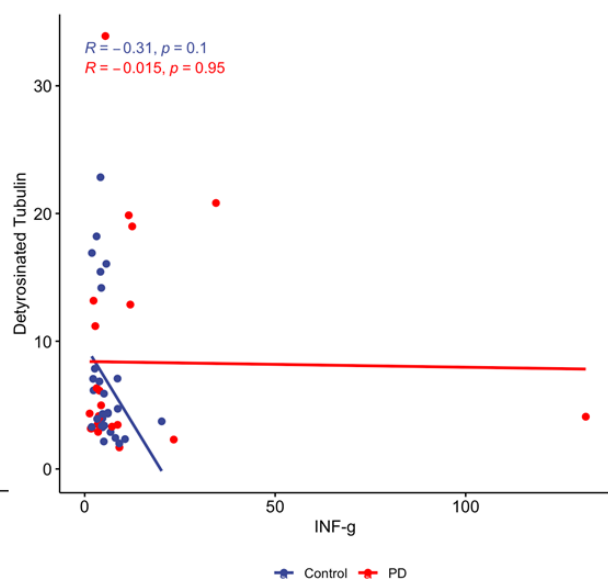
TNF α vs. Δ 2-tubulina

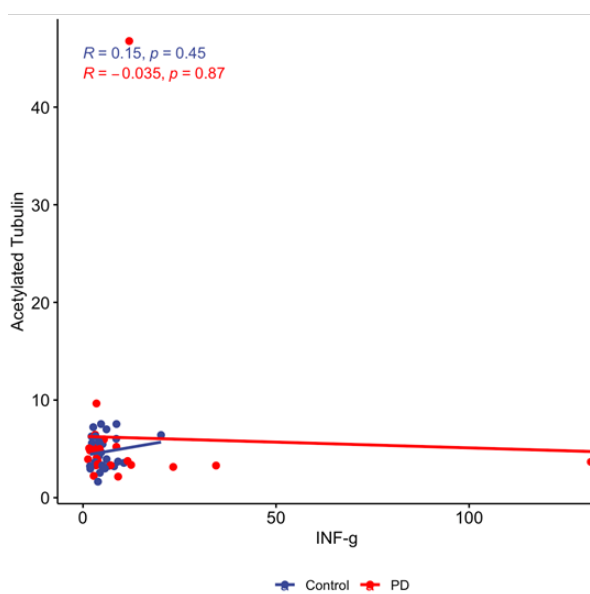
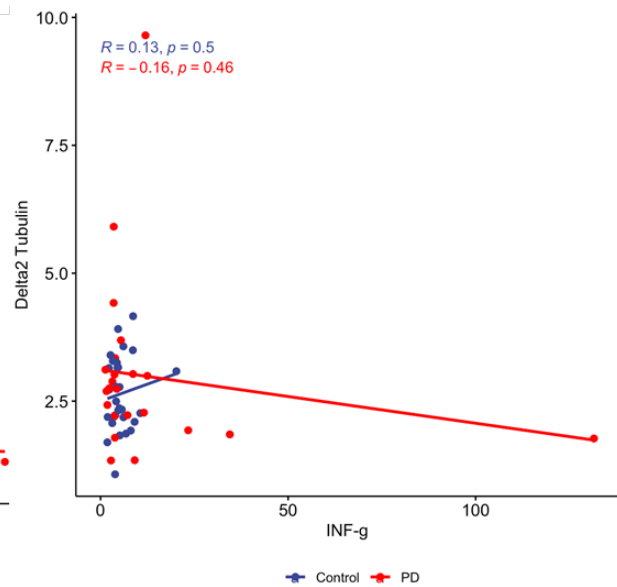


INF γ vs. tubulina tirosinada



INF γ vs. tubulina detirosinada



INF γ vs. tubulina acetilada*NF γ vs. Δ 2-tubulina***10.8 Regresión logística**10.8.1 *Metabolismo de la dopamina*

```

Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  -0.782493  0.595947  -1.313  0.18918
DOPA         -0.278778  0.395645  -0.705  0.48105
DOPAC        -0.042414  0.014344  -2.957  0.00311 **
`Homovanillic acid`  0.023259  0.004107   5.663  1.49e-08 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 290.00 on 210 degrees of freedom
Residual deviance: 197.86 on 207 degrees of freedom
(2 observations deleted due to missingness)
AIC: 205.86

Number of Fisher Scoring iterations: 7

```

```

exp(coefficients(logit_dopamina))
(Intercept)      DOPA      DOPAC `Homovanillic acid`
  0.4572647    0.7567076    0.9584731    1.0235312

```

10.8.2 Metabolismo del GABA

```

Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -1.577304   0.829686  -1.901   0.0573 .
Glutamine    0.007891   0.003609   2.187   0.0288 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 290.00 on 210 degrees of freedom
Residual deviance: 284.99 on 209 degrees of freedom
(2 observations deleted due to missingness)
AIC: 288.99

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```

```

> exp(coefficients(logit_gaba))
(Intercept)  Glutamine
  0.2065312   1.0079219

```

10.8.3 Metabolismo de la serotonina

El análisis estadístico efectuado revela que, de las moléculas relacionadas con el metabolismo de la serotonina *Tryphophan*, *serotonin* y *kynurenine* no muestran diferencias significativas entre grupos, por lo que no las estudiamos más en profundidad.

10.8.4 Aminoácidos – modelo completo

```

Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -1.9683935   0.6876789  -2.862   0.0042 **
Glycine      0.0143605   0.0060163   2.387   0.0170 *
`Homocysteic acid` 0.0400022  2.2077209   0.018   0.9855
`B-Alanine`   0.0008055   0.0003679   2.189   0.0286 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 290.00 on 210 degrees of freedom
Residual deviance: 256.16 on 207 degrees of freedom
(2 observations deleted due to missingness)
AIC: 264.16

Number of Fisher Scoring iterations: 18

```

```

exp(coefficients(logit_otros))
(Intercept)      Glycine `Homocysteic acid`      `B-Alanine`
  0.1396811      1.0144641      1.0408131      1.0008058

```

10.8.5 Aminoácidos – modelo reducido

```

Coefficients:
      Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -1.8176342  0.6583238  -2.761  0.00576 **
Glycine      0.0135676  0.0059211   2.291  0.02194 *
`B-Alanine`  0.0008850  0.0003544   2.497  0.01253 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 290.0 on 210 degrees of freedom
Residual deviance: 278.6 on 208 degrees of freedom
(2 observations deleted due to missingness)
AIC: 284.6

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```

```

> exp(coefficients(logit_otros))
(Intercept)  Glycine `B-Alanine`
  0.1624095  1.0136601  1.0008853

```

10.8.6 Metabolismo de las poliaminas – modelo completo

```

Coefficients:
      Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)   -5.02403    0.96016  -5.232 1.67e-07 ***
`N-Acetylputrescine` 0.04757    0.01303   3.649 0.000263 ***
Ornithine      0.20194    0.05978   3.378 0.000730 ***
Putrescine     0.03702    0.01907   1.941 0.052203 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 290.00 on 210 degrees of freedom
Residual deviance: 247.34 on 207 degrees of freedom
(2 observations deleted due to missingness)
AIC: 255.34

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```

```

exp(coefficients(logit_polyamines))
(Intercept) `N-Acetylputrescine` Ornithine Putrescine
  0.006577948  1.048716308  1.223774489  1.037715124

```

10.8.7 *Metabolismo de las poliaminas – modelo reducido*

```

Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  -2.84741    0.64743  -4.398 1.09e-05 ***
`N-Acetylputrescine`  0.04254    0.01241   3.427 0.000609 ***
Putrescine     0.04904    0.01865   2.629 0.008562 **
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 290.00 on 210 degrees of freedom
Residual deviance: 260.48 on 208 degrees of freedom
(2 observations deleted due to missingness)
AIC: 266.48

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```

```

exp(coefficients(logit_polyamines))
      (Intercept) `N-Acetylputrescine` Putrescine
      0.05799413      1.04346145      1.05025745

```