



INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

Laboratorio de Trastornos Audiomotores

Alteración de la capacidad sensoriomotora en las enfermedades neurodegenerativas

Memoria presentada por Lymarie Millian Morell para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Directores:

Dr. Tomás López Alburquerque

Dra. M^a Dolores E. López García

Salamanca, 2015

Los abajo firmantes, Drs. Tomás López Alburquerque y Dolores E. López García, miembros del Instituto de Neurociencias de Castilla y León y del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Salamanca

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “Alteración de la capacidad sensoriomotora en las enfermedades neurodegenerativas”, ha sido realizado bajo su dirección por Dña. Lymarie Millian Morell, y consideran que reúne las condiciones necesarias de calidad y rigor científico para su exposición pública y defensa con el fin de optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, 30 de abril de 2015

Fdo:

Fdo:

Dr. Tomás López Alburquerque

Dra. M^a Dolores E. López García

Para la planificación, realización y redacción de este trabajo de investigación hemos obtenido financiación de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (EDU/289/2011), y del Proyecto financiado por el MICINN (BFU2010-17754), sin cuya ayuda no hubiera sido posible.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Tomás López-Alburquerque por darme la oportunidad de comenzar mi carrera investigadora bajo su tutela. Gracias a la confianza que depositó en mí, llegué al grupo de Trastornos Audiomotores (TAM). Sin menos mérito quiero agradecer a la Dra. Dolores López “Lita”, que no sólo me hizo parte de la familia de TAM, si no que me ha brindado su amistad y apoyo. Sin la ayuda de estos “maestros”, este trabajo no habría llegado a buen puerto.

A mis padres, y mis hermanos José y Daniel, sin los que hoy no estaría aquí. Hace siete años vine a Salamanca, y ellos apoyaron mi sueño, sin importar los obstáculos que ha habido en el camino.

Quiero agradecer a Consuelo sus ánimos y sus enseñanzas; ha sido un placer. Asimismo, agradezco a mis compañeros del Laboratorio 12 su disponibilidad y paciencia, Orlando, Richard, Luis. Especialmente quiero agradecer a “los niños” Sonia y David por las risas, el caos, las discusiones y las comidas, en definitiva por estar ahí. Tengo que agradecer especialmente a David por solucionarme esos “pequeños” problemas informáticos. Sin tu paciencia, la edición de los pequeños detalles de este manuscrito no hubiese sido posible. A los compañeros que ya se han ido: Bivi por todo lo que me enseñaste, pero también por todos los buenos momentos, los cafés y las palabras de consuelo; y a Nicole por su eterna alegría.

Durante mi paso por el INCYL, he conocido a mucha gente que se han convertido en grandes amigos y apoyo: Marisan por ser “mis manos”, pero sobre todo por el apoyo y el cariño recibido; Azu, Yan y Cheryl gracias por vuestra amistad, las risas, el apoyo. También, quiero agradecer a todos los compañeros de este Instituto, a los que aún están y a los que ya no están con los cuales a través de los años hemos vivido grandes momentos y experiencias.

También quiero agradecer al Dr. Rogelio González-Sarmiento y a su equipo especialmente a Elena, por su ayuda en los experimentos de análisis de SNPs. Sin su ayuda y colaboración, gran parte de este trabajo no se hubiese podido realizar.

A los doctores Juan Carro y Juan José Meilán; muchas gracias por sus enseñanzas, ayuda y colaboración.

Agradezco a todas las personas que han participado en este estudio. Sin su participación, este trabajo no hubiera sido posible.

Por último, quiero agradecer a mi otra familia Meli, Ama, Tashy, Francis, Johnson, Karen, Alberto, Antonio, Eva, María, José, Vri, Ester, Patri. Gracias a todos, por ser, gracias por estar, en fin, gracias totales.

*“Cuando el misterio es demasiado impresionante,
es imposible desobedecer”
Antoine de Saint-Exupéry*

A mi madre.

Índice

Abreviaturas	15
Resumen en Inglés	17
Listado de Figuras	49
Listado de Tablas	53
Justificación	55
1. Introducción	59
1.1. <i>Enfermedades neurodegenerativas</i>	61
<i>Enfermedad de Parkinson</i>	61
<i>Temblor esencial</i>	62
<i>Deterioro cognitivo leve</i>	64
<i>Enfermedad de Alzheimer</i>	65
1.2. <i>Alteraciones cognitivas en las enfermedades neurodegenerativas</i>	66
1.3. <i>Modificaciones del habla en pacientes con enfermedades neurodegenerativas</i>	67
1.4. <i>Polimorfismos genéticos asociados a enfermedades neurodegenerativas</i>	69
1.5. <i>Estado de alerta: Reflejo auditivo de sobresalto y sus modificaciones</i>	72
1.5.1 <i>Modulaciones del Reflejo de Sobresalto</i>	72
1.5.2. <i>Sustrato neuroanatómico</i>	74
1.5.3. <i>Evaluación del Reflejo auditivo de sobresalto como herramienta diagnóstica</i>	77
2. Hipótesis y Objetivos	81
4. Diseño experimental	83
5. Metodología	87
5.1. <i>Grupos Experimentales</i>	89

5.2. Técnicas a emplear	91
5.2.1. Evaluación cognitiva y motora	91
5.2.2. Análisis del habla	94
5.2.3. Determinación de los polimorfismos de ADN	95
5.2.4. Medición del Reflejo Auditivo de Sobresalto y sus modificaciones	98
5.2.5. Análisis Estadístico	100
6. Resultados	103
6.1. Análisis de la Evaluación Cognitiva	105
6.2. Análisis del habla	113
6.3. Polimorfismos de ADN	117
6.4. Análisis del RAS y sus modificaciones en enfermedades Neurodegenerativas	125
6.5. Correlaciones entre PPI/PPF y las distintas variables estudiadas	132
6.6. Resultados de las diferentes pruebas diagnósticas en relación a los controles.	138
6.7. Medidas longitudinales	146
7. Discusión	155
8. Conclusiones	177
9. Referencias bibliográficas	181
10. Anexos	197
<i>Anexo I. Variables analizadas en el DCL</i>	199
<i>Anexo II. Variables analizadas en la EA</i>	202
<i>Anexo III. Variables analizadas en la EP</i>	205
<i>Anexo IV. Variables analizadas en el TE</i>	209
<i>Anexo V. Ampliación de relaciones entre PPI/PPF y polimorfismos genéticos</i>	213

-
- Anexo VI. Artículo 1** **222**
Speech rate in Parkinson's disease: A controlled study. *Neurologia.* S0213-4853(14)00264-3.
- Anexo VII. Artículo 2** **229**
Origin and function of short-latency inputs to the neural substrates underlying the acoustic startle reflex. *Frontiers in Neuroscience Auditory Cognitive Neuroscience* 8.216.
- Anexo VIII. Artículo 3** **246**
Speech in Alzheimer's disease: can temporal and acoustic parameters discriminate dementia? *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders.* 37(5-6):327-334.
- Anexo IX. Artículo 4** **252**
Acoustic startle reflex modulations and voice analysis contribute to Parkinson disease diagnosis. *Journal of Communication Disorders*(JCD-D-14-00096 enviado).

Abreviaturas

	ESPAÑOL	INGLÉS
Ach	Acetilcolina	Acetylcholine
AVT	Área Ventral Tegmental	Ventral Tegmental Area
CE	Coefficientes Estadarizados	Standardized Coefficients
CI	Colículo Inferior	Inferior Colliculus
CL	Cuerpos de Lewy	Lewy's Bodies
COMT	Catecol-O-metiltransferasa	Cathecol-O-methyltransferase
CRNs	Neuronas de la raíz coclear	Choclear root neurons
DAT	Transportador de dopamina	Dopamine Transporter
DCL	Deterioro Cognitivo Leve	Mild Cognitive Impairment
DE	Desviación Estándar	Standard Deviation
Drd2	Receptor 2 de dopamina	Dopamine receptor 2
Drd3	Receptor 3 de dopamina	Dopamine receptor 3
EA	Enfermedad de Alzheimer	Alzheimer's Disease
EEM	Error estándar de la media	Standar mean error
EP	Enfermedad de Parkinson	Parkinson's Disease
GB	Ganglios Basales	Basal Ganglia
GDS	Escala de la Depresión Geriátrica	Geriatric Depression Scale
ISI	Intervalo Inter Estímulo	Inter stimulus Interval
IC	Intervalo de Confianza	Confidence Interval
LC	Locus Coerulus	Locus Coeruleus
MMSE	Mini prueba del estado mental	Mini-Mental State Examination
NPR	Núcleo Pontino reticular	Nucleus reticularis pontis

NRG-1	Neuroregulina-1	Neuroreguline-1
nt.	Número de nucleótidos	Nucleotide number
NTPP	Núcleo Tegmental pedúnculo pontino	Pedunculo Pontine nucleus
OR	Porcentaje de aparición	Odds Ratio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	Polimerase Chain Reaction
PET	Tomografía por emisión de Positrones	Positron Emission Tomography
PPI	Inhibición por estímulo previo	Prepulse inhibition
PPI₆₀	Inhibición por estímulo previo 60ms	Prepulse inhibition 60ms
PPI₁₂₀	Inhibición por estímulo previo 120ms	Prepulse inhibition 120ms
PPF	Facilitación por estímulo previo	Prepulse Facilitation
PnC	Núcleo reticular pontino caudal	Nucleus reticularis pontis caudalis
RS	Reflejo de sobresalto	Startle reflex
RAS	Reflejo Auditivo de sobresalto	Acoustic startle reflex
SN	Sustancia Negra	Substantia nigra
SPL	Nivel de presión sonora	Sound Pressure Level
<i>t</i>	Prueba <i>t</i> de student	Student's t-test
TE	Temblor Esencial	Essential Tremor
TETRAS	Escala de evaluación del Temblor Esencial	The Essential Tremor Rating Assessment Scale
UPDRS	Escala Unificada para la evaluación de la enfermedad de Parkinson	Unified Parkinsons Disease Raiting Scale
VNTB	Núcleo Ventral del cuerpo trapezoide	Ventral nucleus of the trapezoid body
X²	Prueba de Chi-cuadrado	Chi-squared test



Resumen en Inglés

I. Introduction

Neurodegenerative diseases are defined as those that result in slowly progressive neuronal loss due to various genetic and environmental factors, and become clinically manifest by cognitive, sensory or motor changes. In recent decades, due to the increased life expectancy and longevity, especially in developed countries, there is higher prevalence of various neurodegenerative diseases. The most frequent among these diseases with high social impact are Parkinson's disease (PD) and Essential Tremor (ET), that in some cases combine motor and cognitive disorders (Samuels et al., 2007), as well as Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer's disease (AD), in which predominate cognitive impairments (Valls-Pedret et al., 2010). The following paragraphs summarize the most relevant aspects of these neurodegenerative diseases and its relation with the techniques used in this thesis dissertation.

1. Parkinson's disease

PD belongs to a group of conditions called motor system disorders, which results from the damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (Braak et al., 2003). PD is difficult to diagnose accurately as early symptoms occur gradually and differ among patients that experience motor problems after 50% of dopaminergic cell death (Stoessl, 2011). Motor abnormalities lead to the diagnostic criteria that include bradykinesia, rigidity, resting tremor or postural instability. Also, these motor dysfunctions reflect a loss of dopaminergic neurons within the nigrostriatal system that might be traceable to extranigral impairment of the motor system (Braak et al., 2000, 2003; Albin et al., 1989; Braak and Braak, 2000).

In addition to the hallmark symptoms of PD (Blumin et al., 2004; Sewall y et al., 2006), a significant and progressive deficit in the phonatory system is often experienced by PD patients (Sewall et al., 2006). Phonetics involves speech motor activities, transmission through air and speech perception (Saxena et al., 2014). The speech and voice deterioration can be explained by a sensory processing deficit related to speech (Ho et al., 1999; Ramig et al., 2007). Patients are often described as having a high-pitched, monotone, and monoloud voice with a restricted range pitch when compared with normal subjects (Canter, 1963; Griffiths et al., 1989). Vocal impairment may be amongst the earliest PD symptoms, detectable up to five years prior clinical diagnosis (Harel et al., 2004; Tsanas et al., 2012). The loss of dopaminergic input to the striatum and subsequent deregulation of the basal ganglia produce motor deficits that adversely affect all the subsystems related to speech motor control. Any alteration in one of these systems affects the voice and the proper coordination of speech (Martínez-Sánchez, 2010). Neuroimaging studies have demonstrated the involvement of the striatum in speech initiation and production (Price, 2009).

It has been suggested that speech motor deficits in speakers with PD could contribute to hypokinetic dysarthria (Ramig et al., 2011; Walsh and Smith, 2012) that is an integral part of the motor changes in PD patients. Disturbances of prosody, articulation and mobility, correlate with the disease's severity and these disturbances are secondary to the degree of the patient's rigidity and hypokinesia. The decrease in expiratory volume with a consequent alteration of the velopalatal resonance and a decrease in vocal intensity cause the disturbances in the prosody. Abnormalities described in patients with PD, as disruptions in prosody, differences in the rate of speech, voice inflection, hesitations, pauses, monoloud voice and a decrease in the intensity variations of the voice, have been observed during the reading task (Rusz et al., 2011).

2. Essential Tremor

ET is characterized by the presence of postural and kinetic tremor in the upper limbs and head, which usually does not exist at rest (Cohen et al., 2003). It is a slowly progressive process that eventually produces motor and functional disabilities. It seems possible to identify different subtypes of ET according to the progression rate of the disease's coexistence with PD, and the degree of cognitive impairment. It is the most common movement disorder in clinical practice, especially after the age 40. Almost half of patients have a family history with autosomal dominant inheritance. Linkage studies identify alteration in dopamine receptors to alterations in ET (García-Martín et al., 2009). Currently, about 5% of Spanish elderly suffer from this disease (Benito-León et al., 2003; Labiano-Fontcubertaa et al., 2012), and its incidence increases with age (Benito-León et al., 2005; Labiano-Fontcubertaa et al., 2012).

ET has been considered as a disease characterized by monosymptomatic kinetic tremor in the upper limbs, however, in recent years, we have seen that its clinical spectrum is wider (Labiano-Fontcubertaa et al., 2012). That its clinical spectrum is wider, including symptoms usually identified as motor symptoms like gait disturbance, intention tremor and rest tremor, and non-motor symptoms like olfactory, cognitive and personality disorders (Benito-Leon and Louis, 2006; Labiano-Fontcubertaa et al., 2012). Cognitive changes are initiated with impaired executive function and memory. When the ET starts in the elderly, there is an increased risk of developing dementia (Bermejo-Pareja et al., 2007). Pathological location in most cases of ET sits in the cerebellum, while a third of the brains of patients suffering from this pathology showed neurodegenerative changes, including neuronal death (Axelrad et al., 2008; Louis et al., 2007; Louis, 2010), and abundant Lewys bodies (LB), especially in the Locus Coeruleus (LC) (Louis et al., 2005, 2007; Shill et al., 2008).

It has been postulated that PD and ET are close in their evolution. The tremor may precede the onset of other extrapyramidal symptoms, having come to regard the ET as a risk factor in the development of

PD. Considering these two entities as part of a neurodegenerative *continuum* is not new (Critchley and Greenfield, 1948), and have a common anatomical basis the LC (Frisina et al., 2009). The LC is the principal site for production of noradrenaline (Swanson and Hartman, 1975), as well as monitoring and alarm functions, presenting statements for the most active (Aston-Jones and Bloom, 1981).

3. Mild Cognitive Impairment

MCI is considered a transitional state between the cognitive impairment and the physiological aging and dementia (Petersen et al., 2001; Morris et al., 2001). MCI is clinically manifested as impaired memory maintaining cognitive and functional abilities (Petersen et al., 2001; Morris et al., 2001). Recently, the diagnostic criteria for MCI, dementia and AD have been updated by the National Institute of Aging and the Alzheimer's Association (Albert et al., 2011; McKhann et al., 2011). According to them, the MCI is characterized by deficits in higher cognitive functions, maintaining independence and accompanied by concern of the family or the patient himself. These deficits must occur in the absence of other disorders that cause similar signs and symptoms. The main difference concerns between MCI and dementia is the presence of impairment in activities of daily living (Albert et al., 2011; Mora-Simon et al., 2012).

Because some patients with MCI progress to AD, it is a medical priority to have sensitive techniques that allow us to identify the disorders, for further pharmacological interventions that can slow or stop the progression of the disease (Sherwin, 2000; Morris et al., 2001).

4. Alzheimer's Disease

AD is characterized, in its typical form, by progressive memory loss and other mental abilities, accompanied by disturbances in behavior such as aggression, depression and errant behavior (Costa et al., 1996; Francis et al., 1999; Williams et al., 2003).

The AD shows a decrease in weight and volume of the brain, with enlarged sulci and gyri. Also, the cerebral cortex is thinned and slightly enlarged ventricles (cerebral atrophy). The pathological hallmarks of AD are: loss of neurons in the cerebral cortex, senile or neuritic plaques and neurofibrillary tangles. The most vulnerable anatomical regions to suffer these neuropathological changes are: hippocampus, parahippocampal gyrus, basal nucleus of Meynert, SN, LC, periaqueductal substance and raphe nuclei (Braak and Braak, 1991). Furthermore, an overall loss of synaptic connections, particularly those of the cholinergic system, occurs in AD. These alterations have been extensively studied in animal models that have shown degeneration of cholinergic, noradrenergic, serotonergic, GABAergic and glutamatergic neurons in different brain areas involved in memory such as the hippocampus, the association cortex and the limbic system (Manzano et al., 2009).

In AD patients, alterations in lexical semantic and pragmatic domains of language (Hodges et al., 1992) are frequently observed, while the articulatory, phonological and syntactic aspects of language production remain well preserved until later stages of the disease (Caramelli et al., 1998). The most prominent characteristics of the voice in AD patients in early stages are related to prosody as well as acoustic and temporary measures, including alterations in rate (reduced or fluctuating language production rate, frequent pauses to find words), volume, phonological errors, and articulatory apraxia (Taler et al., 2008). In short, if speech impediments in people with AD differ qualitatively from the voice changes caused by normal aging or other conditions, such impairments may be isolated for early diagnosis of AD (Venneri et al., 2005).

The different mechanisms of action by which neuropathological features of AD arise may be the likely reason for the lack of effective treatment that could prevent the onset and progression of the disease. That's why we have to find biomarkers that reflect neurophysiological changes in pre-symptomatic stages, to find treatments that target these physiological mechanisms involved in disease.

5. DNA analysis

In humans, the most common form of genetic variation is the single base change in the sequence of a gene. This condition is known as single nucleotide polymorphism (SNP) (Cargill et al., 1999; Tindall et al., 2007; Schleinitz et al., 2011). One of these variations should affect at least 1% of the population to be considered a SNP. According to the International HapMap Consortium (catalog of common genetic variations that are present in the human species) (2003), SNPs occur with a frequency of 1% and can occur in either of the two copies of the genome. Although most of these SNPs have no effect on the genome, they can affect some function of genes/proteins and therefore lead to phenotypic differences between the carriers of different alleles. SNPs can be related with other diseases responsible for or associated with a higher risk for any health disorder, which can act as markers to locate the sequences responsible genes. For these reasons, SNPs are potentially valuable both to help biomedical research, and for the development of pharmaceutical products or medical diagnoses.

The etiology of many neurodegenerative diseases is not well defined, so many researchers advocate a multifactorial origin, a combination of genetic predisposition and environmental factors (Jenner et al., 1992). There is a wide range of described polymorphisms associated with PD (Ben-David and Tu, 2014), AD (Chouraki et al., 2014), and ET (García-Martín et al., 2009), but we will restrict ourselves to those who have been associated to changes in sensorimotor filtering.

Genetic mutations associated with deficits in sensorimotor gaiting in patients with schizophrenia and AD, among other pathologies has been reported (Zhang et al., 2011). Some of these mutations are

related to the gene encoding neuregulin-1 (*NRG-1*) (Hong et al., 2007), dopamine receptors (Wong et al., 2000) and the gene encoding the catechol-O-methyltransferase (*COMT*), among others (Giakoumaki et al., 2008).

Neuregulin-1 is one of four neuregulin family proteins identified in vertebrates (Diez et al., 2014), which target the EGFR family (Epidermal growth factor receptor) receptors. It is essential for normal development of the nervous and cardiovascular system and is encoded by the *NRG-1* gene. Normofunctionality of this gene is one of the factors in schizophrenia diagnoses (Stefansson et al., 2002; Diez et al., 2014.). Studies by Hong et al., 2007 considered this polymorphism as an important marker in sensory processing.

Dopamine is a major central nervous system neurotransmitter, an endogenous catecholamine that influences various cell activities (Cavallotti et al., 2004). The dopaminergic system is involved in motor control, endocrine function, reward system and cognition (Tome et al., 2004). Dopamine receptors are widely expressed in neurons and in certain populations of non-neuronal cells (Tome et al., 2004). There are five subtypes of dopamine receptors, and among these, the *Drd2* receptors (McGuire et al., 2011; Dai et al., 2014) and *Drd3* (Lee et al., 2009; Kiyohara et al., 2011; Dai and al., 2014), are the most studied, because alterations in genes that encode them are associated with neurodegenerative diseases.

The *COMT* gene, located on chromosome 22, encodes catechol-O-methyltransferase (*COMT*) enzyme linked to dopamine degradation, particularly in the prefrontal cortex of mammals (Gennatas et al., 2012), and its activity is associated with levels of cognition, behavior (Swerdlow et al., 2013), and mechanisms of learning and memory (Gennatas et al., 2012).

Polymorphism rs4680 in which G is exchanged for A at position 158 of the coding region of the *COMT* polymorphism or Val158Met, causes an amino acid substitution in the protein, producing a decrease in the enzyme activity (Martínez et al., 2009), which can induce the formation of radicals that contribute to cytosolic neurodegeneration (Torkaman-Boutorabi et al., 2012). Also, it has been reported that this change in the enzyme causes an increase in the concentration of dopamine in the prefrontal cortex (Valllunga et al., 2012), linking this with the decline in cognitive function in patients with MCI and AD (Harrison et al., 2008; Talledo et al., 2009; Quednow et al., 2009).

6. Startle Reflex

Sensorimotor filtering is also affected by anatomical and physiological changes observed in many neurodegenerative diseases. Studies that evidence the involvement of the sensorimotor system in the pathophysiology of certain movement disorders, this makes it essential to consider the potential

contribution of changes in sensorimotor integration in motor execution (Abbruzzese and Berardelli, 2003). Disturbances in motor control can be measured through the analysis of muscle electromyographic activity (Valls-Sole and Valldeoriola, 2002). The acoustic startle reflex (ASR) is a rapid muscle contraction evoked by a sudden and intense acoustic stimulus. It is a simple test that serves as a tool for assessment of behavioral plasticity mechanisms of sensorimotor response (Koch, 1999). ASR reflects a protective behavior against the injury and the magnitude of this reflex can be modulated by external and internal conditions (Walker and Davis, 1997). Prepulse inhibition (PPI) is the reduction of the magnitude of ASR when the startle-eliciting stimulus (pulse) is preceded 30-500 ms by a weak non-startling stimulus (prepulse) (Hoffman and Ison, 1980). PPI is an operational measure of sensorimotor gating and reflects a protector mechanism where the information carried by the prepulse is analyzed early avoiding the interference of other stimuli, which limits the ingress of trivial stimuli to cognitive centers or motor output pathways (Swerdlow et al., 2001). When the prepulse-to-pulse intervals are longer than 500 ms, the phenomenon is known as prepulse facilitation (PPF) (Graham and Murray, 1977), and reflects sensory enhancement and selective attention (Anthony and Graham, 1985).

II. Hypothesis and Objectives

II.a. Hypothesis

The neurophysiologic tests (ASR, PPI and PPF) provide quantifiable data, are affordable and safe for patients without any adverse effects. These tests are commonly used for the evaluation of the alterations in brainstem circuits and their neurotransmitters. Based on the anatomical connections between structures belonging to sensory filtering circuit, substantia nigra (SN) and basal ganglia, we hypothesized that the dysfunction between these circuits affect the sensorimotor gating in neurodegenerative disease. Thus, it is possible to assess the alteration in this sensorimotor filtering using the ASR and its modulation through the PPI and PPF.

The use of potential biomarkers such as ASR and PPI, or polymorphisms associated could contribute to early detection and improved classification of diseases with similar clinical manifestations.

The modifications of the acoustic and perceptual parameters of voice and speech also could be used as a complement to assess initial symptoms in different neurodegenerative diseases.

Thus, this dissertation is motivated by the following research question: Could the neurophysiologic tests (ASR, PPI and PPF), single nucleotide polymorphism and speech analysis be used as diagnostic tools in neurodegenerative diseases?

II.b. Objectives

The main objective is to demonstrate the existence of an alteration of the ASR/PPI in the early stages of

certain neurodegenerative diseases and validate this test as an auxiliary tool for early diagnosis.

- 1- Determine if the ASR/PPI is altered in patients with MCI, AD, PD and ET compared to a control group.
- 2- Determine the degree of cognitive impairment in patients with neurodegenerative diseases.
- 3- Analyze the changes of speech in PD patients with AD.
- 4- Determine the prevalence of different genetic polymorphisms in neurodegenerative diseases.
- 5- Establish correlations between markers studied.

III. Materials and Methods

1. Subjects:

Patients diagnosed with Parkinson's Disease, Essential Tremor, Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment and healthy Controls.

1a. Parkinson's Disease patients

PD patients were clinically diagnosed according to the criteria of the Brain Bank of London (Hughes et al., 1992). They were outpatients from the Neurology Service of the University Hospital of Salamanca, who were seen by at least two senior neurologists experienced in movement disorders. PD patients include 52 patients (mean age, 68.44 ± 9.89), who were clinically evaluated using Unified Parkinson's Disease Rating Scale (Goetz et al., 2008) and Hoehn and Yahr scale (Hoehn and Yahr, 1967). The study was conducted at the time of their medication's minimal effect.

1b. Essential Tremor patients

ET patients were clinically diagnosed according to the criteria of the Consensus statement of the Movement Disorder Society on Tremor (Movement Disorders, Deuschl et al., 1998). ET patients include 34 patients (mean age, 63.46 ± 12.56), who were clinically evaluated using TETRAS. Patients included in this group showed a visible and persistent postural tremor in the upper extremities, for more than 5 years. The study was conducted at the time of their medication's minimal effect.

1c. Mild Cognitive Impairment patients

Thirty-three Patients diagnosed with MCI were part of the study (mean age 72.21 ± 8.39). Patients were diagnosed according to the criteria established by Petersen et al., 2001 and Grundman et al., 2004 and the Spanish Society of Neurology (GENCD-SEN, 2003).

1d. Alzheimer's Disease patients

Twenty-one patients with a mean age of 72.64 ± 7.51 , diagnosed with AD according to the criteria developed by the NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 1984, 2011) and the criteria for SEN took part in the study. Only patients in stage 1 with a Minimental State Examination (MMSE) (Folstein et al., 1975) between 20 and 24 points and maintained their autonomy in activities of daily living. The control group was formed by 37 healthy controls, recruited from the general community in recreational centers for elderly people (mean age, 73.74 ± 13.84).

1e. Control subjects

Exclusion criteria included: neurological disorders other than the selected neurological disease, head injury, hearing disorders with significant reduction of the auditory threshold, diagnosis of psychiatric disorder other than depression, frequent use of illicit substances or alcohol consumption. All patients received written informed consent according to the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki before the test.

2. Cognitive assessment

We acquired cognitive assessment using the direct scores from the following subscales of **MMSE** (Folstein et al., 1975), verbal fluency **Isaac Test categories** (Isaacs and Akhtar, 1972), **Geriatric depression Scale (GDS)** (Yesavage et al., 1983) and **Daily living Activities** (Pfeffer, 1982). For the assessment of attention, working and spatial memory we used the Spanish version of the **Wechsler III scale**.

3. Voice Analysis

The speech task consisted of asking subjects to read on a screen (48-point font size and multiple lines to facilitate reading), the first paragraph of the novel "Don Quixote" by Miguel de Cervantes (405 syllables): "In a village of La Mancha, the name of which I have no desire to call to mind, there lived not long since one of those gentlemen that keep a lance in the lance-rack..." (English translation of Don Quixote by John Ormsby, 1885). This paragraph is well known by all Spanish speakers, like the famous passage "to be or not to be" of Shakespeare used in English equivalent tests. The recordings were made in a room quietly placing the microphone to 8 cm and an angle of 45° from the mouth to prevent aerodynamic noise. The recordings were obtained with a portable professional voice recorder (Sony PCM-M10), and the analyses were done according to the methodology described in previous studies (Meilán et al., 2014). Analysis focused on common acoustic measures of speech, including temporal aspects of the speech sample, pitch or fundamental frequency (F0), volume (intensity), and voice quality. To characterize the fluctuations in the amplitude of sound, we computed the intensity in dB of voice and unvoiced signals, and measured phonatory stability shimmer period perturbation stability

(shot term, cycle to cycle, perturbation in the amplitude of the voice): local shimmer (shimmer loc) and shimmer amplitude perturbation quotient 3 (shimmer apq3). Prosodic patterns were quantified by automatic prosodic transcription of a recording, using the algorithms implemented by Mertens (Mertens, 2004) on the Praat program (Boersma and Weenink, 2013). To characterize the temporal aspects of the speech sample, we computed the duration of the voice sample used (total duration of the paragraph from Don Quixote, the phonation time, and the reading and articulation speed), the interruption of sound (proportion and number of pauses of voice, percentage of the recording without voice, and number and percentage of voice breaks), and the periods of voice (number of pulses analyzed as voice, and mean number of periods of voice). To characterize the F0, we analyzed the mean F0, maximum and minimum values of F0, high and low global pitch and autocorrelation measures. Detection range of 65-650 Hz for F0, on windows of 0.005 s duration; for automatic segmentation threshold intensity was used in the styling of the algorithm that determines the presence of a vowel ($G_{\text{Glissando}} = 0.32/T2$ semitones / s., $DG = 30$, $d_{\text{min}} = 0.05$). While the standard psychoacoustic threshold for isolated voice is $G = 0.16/T2$, during natural speech voice flow is rarely linear, so that the value assigned is the better-modeled prosodic voice variables. Finally, we computed measures of the speaker's voice quality, and one spectral noise measure, the noise-to harmonics ratio (NHR).

4. DNA Analysis

Genomic DNA was extracted from saliva of patients and control subjects by Saliva Gene kit Intervect. Genotyping of the Neuroreguline-1, catechol-O methyltransferase and dopamine receptors D2 and D3 polymorphisms (Table 1), was performed using TaqMan 5'-exonuclease allelic discrimination assays (Applied Biosystems) that contain sequence-specific forward and reverse primers to amplify the polymorphic sequences and two probes labeled with VIC and FAM dyes to detect both alleles of each polymorphism (Schleinitz et al., 2011) (Figure 1). PCR reactions were carried out using TaqMan universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) following manufacturer's instructions in a Step-One Plus Real-time PCR system (Applied Biosystems). To assess reproducibility, a randomly selected 5% of the samples were re-genotyped, and all of these genotypes matched with genotypes initially designated.

Gene	Abreviation	Polymorphism	Probe used	Brand
Catechol-O-methyltransferase	COMT	rs4680	C_25746809_50	Applied Biosystems
Dopamine D2 receptor	Drd2	rs6277	C_11339240_10	Applied Biosystems
Dopamine D2 receptor	Drd2	rs1800497	C_7486676_10	Applied Biosystems
Dopamine D3 receptor	Drd3	rs6280	C_949770_10	Applied Biosystems
Neuregulin-1	NRG-1	rs3924999	C_359159_10	Applied Biosystems
Neuregulin-1	NRG-1	rs6994992	C_22019_10	Applied Biosystems

Table 1. Summary of polymorphisms of the genes studied.

5. Startle reflex and Prepulse Inhibition Measurement

Subjects remained comfortably seated in a chair with armrests, during the 15 minutes that lasted the test. The binaural auditory stimulation is provided through headphones (Sony MDR-V6) connected to the reflection measurement device (SRH-LAB trending system), and electromyographic registration of the right orbicularis oculi (Figure 2) was done using two small silver electrodes filled with conductive paste placed beneath the right eye and the ground electrode placed in the right mastoid. The test starts after acclimation period of 4 minutes with background noise (70 dB white noise), which is maintained during the entire test. ASR trigger pulses are bursts of 40 ms of white noise with an intensity of 115 dB. The prepulse, a non-startling stimulus, have duration of 20 ms and intensity of 85 dB white noise. Intertrial intervals (ITIs) were assigned with durations of 9 to 23 ms to avoid habituation. The session had four blocks of pulse and prepulse with interstimulus intervals (ISIs) of 60, 120, and 1000 ms. The initial and final blocks were composed of single pulses (5 in each block). The second and third block, each one contained 6 pulses alone and 9 prepulse-pulse with ISI of 60 ms, 9 prepulse-pulse with ISI of 120 ms and 9 prepulse-pulse with ISI of 1000 ms.

The onset measurement was in ms, using the beginning of the maximum amplitude response (in microvolts) that occurs within 18-120 ms after acoustic stimulus (Figure 3). PPI is calculated using the mathematic formula $PPI = \frac{\text{amplitude ASR without prepulse} - \text{Amplitude ASR after prepulse}}{\text{amplitude ASR without prepulse}} \times 100$.

6. Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using SPSS (version 15.0 for Windows; SPSS Inc., Chicago,

Illinois, USA). The description of the data was performed using the mean \pm standard error of the mean (SEM) for both continuous variables as absolute and relative frequencies for categorical variables.

The results were compared between groups using ANOVA and MANOVAs module (contrasts between and within subjects) and in appropriate cases, post-hoc multiple comparisons (Pearson correlations and corresponding regression model and Spearman) were performed and Student t test or Mann Whitney test to compare differences in quantitative and qualitative variables between groups.

In longitudinal studies, the results were compared between groups using ANOVA test mixed split-plot, with Shceffe comparisons (inter-subject analysis) and Bonferroni (intra-subject analysis) pairs. The level of statistical significance was $p < 0.05$ accepted.

The voice analysis were performed with version 15.0 for Windows statistical package; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA. Initially, compliance with the assumption of normality of the distribution of scores on the variable speed of elocution was evaluated; the results show that this variable is normally distributed through the goodness of fit test Kolmogorov-Smirnov ($z = .046$; $p = .20$). Test for comparison of means of independent samples Student t was used to compare both groups and thereby define the differential profile in the prosodic aspects between the two experimental groups.

The analyses of polymorphisms were performed using the chi-square or Fisher's exact when appropriate. Multiple comparison tests were performed using logistic regression tests and Bonferroni test. To determine whether the presence of a variable is a risk factor for a particular, the percentage of appearance was calculated using odds ratios (OR) of each genotype. To estimate the accuracy of the OR a 95% confidence interval (IC) is used.

V. Results:

1. Cognitive Assessment

We conducted a cognitive evaluation of patients using various test measuring patient independence (*Functional Scale Pfeffer*), cognitive impairment (*MMSE*), depression (*GDS*), semantic verbal fluency (*tests of Isaac*), and assessment of attention and auditory and spatial memory (*Wechsler test III*) work.

1.a. Functional Assessment

In *Pfeffer functional scale*, measuring the functional activities of the subjects in reverse, with 0 being autonomous and 33 the most dependent people we found that there was a significant

difference between controls and AD patients ($p=0.001$). We also found significant differences between AD patients and MCI patients ($p=0.006$) among patients with AD and PD ($p=0.00$) and between patients ET and AD patients ($p=0.000$). Table 2 shows the scores obtained by patients in detail.

1.b. Cognitive Impairment

As shown in Table 2, AD patients showed a further deterioration in cognitive function, obtaining a low score on the *MMSE*, with a significant difference from controls ($p=0.000$). In the between-subjects analysis, patients with AD were significantly different from other groups ($p=0.015$), patients with MCI ($p=0.000$) PD ($p=0.000$) and the ET.

Also, patients with MCI had higher significantly cognitive decline than patients with ET ($p=0.019$).

1.c. Geriatric Depression Scale

We analyzed the degree of depression in patients using the *GDS*. A score of 0 to 10 should be considered as normal; 11 or more, as a possible indicator of depression; 11-14 points (moderately depressed) and 15-39 points (severely depressed). The results do not indicate differences between the groups (Table 2).

1.d. Verbal Fluency

Verbal fluency, as measured by the Test of Isaac, only displayed significant alterations in AD patients compared to controls ($p=0.000$), and with other groups of patients with neurodegenerative diseases ($p=0,00$) (Table 2). Also, patients with MCI showed significant differences with patients with ET ($p=0.013$) in this parameter.

In the case of the *Letter P item*, MCI patients differed from controls ($p=0.010$). Upon intra-group analysis, we found that AD patients have a lower number of responses compared to patients with ET, with a significant difference ($p=0.031$). MCI patients also differed significantly compared to patients with ET ($p=0.00$) and patients with PD ($p=0.005$).

1.e. Wechsler test

This test is a general tool for assessing memory in different coding processes, retention and

retrieval. We found in the analysis of variance, logically, AD patients showed lower scores on all tests used to respective controls and other patients (Table 2). This occurred both in measurements of memory as *text recognition I and II* ($p = 0.01$), *Numbers and Letters* ($p=0.001$); *Verbal pairs* ($p=0.05$) and *recognition of Verbal pairs* ($p=0.001$). The analysis of pairwise comparisons showed a significant worse performance in the subscale texts I recall, in AD patients compared to patients with PD and ET ($p=0.01$ respectively). Also, we found significant differences between the group of patients with MCI compared to patients with ET ($p=0.001$) and between the ET and PD group ($p=0.01$). Finally, the *slope of auditory learning* variable, the difference between recovery in the first and second time that the story is heard, we found differences between the AD group versus PD group ($p=0.05$) and ET ($p=0.001$). MCI patients also differed in this variable from the AD patients ($p=0.05$). In memory of *texts II*, ET patients scored higher than patients with AD ($p=0.001$), MCI ($p=0.001$) and PD ($p=0.001$). AD patients had significantly lower than patients with PD ($p=0.01$) scores. A similar result was obtained with the test for recognition of ideas in the texts. ET patients scored significantly higher than AD patients ($p=0.001$) MCI ($p=0.001$) and PD ($p=0.05$). The score for AD patients was significantly lower than that obtained by PD patients ($p=0.05$). We conclude that the encoding and retention of auditory information is severely impaired in AD patients compared to patients with PD and ET, and that this process also shows a severe impairment in PD patients versus patients with ET.

As for the subscale *Letters and Numbers*, AD patients obtained lower scores than patients with PD ($p=0.01$) and patients with ET ($p=0.01$). MCI patients also had lower scores than patients with ET ($p=0.05$). Thus, we can conclude that patients with AD and MCI showed significant deficits in executive processes of short-term memory compared to PD patients and ET.

As for *Verbal pairs* subscale, patients with ET obtained the highest score, significant differences compared to AD patients ($p=0.01$), with MCI ($p=0.01$) and patients with PD ($p=0.05$). MCI patients had lower scores than patients with PD ($p=0.006$). As for the *learning slope* difference between the first and the fourth test, patients with ET scored higher compared to patients with AD ($p=0.001$), MCI ($p=0.01$), and PD ($p=0.05$). The *learning slope* results appear to show clear deterioration in patients with AD, MCI and PD regarding the ability to encode and retrieve associations, in addition to retaining through repetition. In the recognition test of *Verbal pairs*, again ET patients scored higher compared to patients with AD ($p=0.001$),

MCI ($p=0.001$) and PD ($p=0.05$). Therefore, it is not so much a problem of recovery, but deterioration in encoding processes of new associations. The same results were obtained in the analysis of the percentage of retention of *Verbal pairs*. ET patients scored significantly higher compared to patients with AD ($p=0.001$), MCI ($p=0.001$) and PD ($p=0.05$). AD patients were lower than the other groups ($p=0.001$) scores. Thus, the deficit is confirmed in the processes of encoding and retention of patients with AD, MCI and PD versus patients with ET.

	Control (n=35)	AD (n=22)	MCI (N=34)	PD (N=52)	ET (N=34)	^a F	^b p	
Daily Living Activities	1,4±1,4	7,92±0,8	9,3±1,2	10,7±1,0*	7,5±0,9	7,4	0,000**	
Geriatric Depression Scale	6,6±1,5	3,5±0,7*	9,0±1,9*	3,1± 0,9	0,9± 0,4	2,4	0,05*	
MMSE	27,2±0,9	24,5±0,9	20,7±1,0*	26,5± 0,4	27,6±0,5	14,9	0,00**	
Isaac Test	36,7±1,2	34,8± 0,9	27,3±1,7*	37,1± 0,5	38,9±0,4*	18,6	0,00**	
Isaac Test (P)	8,5±0,6	6,6± 0,5*	7,1± 0,6	8,1±0,3	9,1±0,3	4,4	0,002**	
Wechsler	Text	22,0±2,8	13,6±2,2*	8,3± 2,1*	20,1±1,7	29,0±2,1	12,7	0,00**
	Learning Slope	3,1±0,6	2,1± 0,5	0,8± 0,5*	2,9±0,4	4,2±0,5	5,7	0,00**
	Text recall	12,2±2,2	5,9± 1,6*	1,6± 1,5*	10,5±1,4	17,8±1,8	12,1	0,00**
	Text Recognition	19,4±1,0	18,1± 0,8	16,1± 0,8*	19,8± 0,7	22,6±0,7*	8,8	0,00**
	Text Recognition Percentage	65,7±8,2	36,2±7,6*	10,7±7,5*	60,6±5,5	73,4±5,5	14,7	0,00**
	Letters Number sequencing	4,6± 0,7	3,0± 0,5	1,57±0,6*	4,1±0,4	5,1± 0,5	6,8	0,00**
	Verbal Pairs	9,2±1,5	3,1±1,2*	4,0±1,3*	8,3±1,0	12,5±1,2	12,0	0,00**
	Learning Slope	1,2±0,4	1,0±0,3	1,5±0,4	2,2±0,3	3,5±0,3*	9,2	0,00**
	Verbal Pairs Recall	2,5±0,5	1,1± 0,4*	1,1±0,5	2,6±0,3	4,1±0,4*	9,2	0,00**
	Verbal Pairs Retention Percentage	66,3±10,9	31,2±8,6*	33,9±11,5	55,2±6,7	84,6±6,3	7,7	0,00**
	Verbal Pairs Recognition	22,9±0,7	21,5±0,7	17,8± 0,9*	22,8 ±0,4	23,8±0,2*	15,4	0,00**

Table 2. Average scores on cognitive tests (\pm SEM) in patients and controls (n = number of subjects). a value of F lower limit to the level of significance. b p value of statistical significance, significant differences between groups (*) for $p < 0.05$ was observed and (**) $p < 0.001$.

2. Voice Analysis

2.a. Parkinson's Disease

For the analysis of the different variables of the parameters of the voice in PD patients and controls, different statistical tests were performed to verify that there were no significant differences between groups in clinical and sociodemographic variables. No differences between the two groups in the variable "age" were observed ($t_{82} = 1.07$), nor in the distribution of gender group ($\chi^2=3.11$). We also found no difference in cognitive abilities

measured by the MMSE ($t_{82} = 1.33$). Finally, we found there were no difference in verbal fluency in both groups, measured both by a semantic verbal fluency task (test Isaacs, $t_{82} = 0.71$) and phonological ("p", $t_{82} = 0.47$).

The existence of differences between groups in four variables related to verbal fluency was found. The results show that the PD group, shows lower rate of utterance ($t_{82} = 2.41$; $p = 0.05$) and articulation ($t_{82} = 2.68$; $p = 0.01$) than the control group; similarly, the average duration of the syllable is higher in the group with PD ($t_{82} = -2.81$; $p = 0.01$). In relation to the number of breaks, group patients with PD performed breaks under 100 ms, with a significantly higher average duration ($t_{82} = -2.05$; $p = 0.05$) than the control group, but no differences were found in those pauses longer than 300 ms duration. These results define a profile of PD patient, with a language slowed in the syllabic and prosodic articulation. By contrast, no differences were found in other variables such as the number of pauses ($t_{82} = -0.08$), the phonation time ($t_{82} = 1.08$), or the percentage of phonation ($t_{82} = -0.85$). In Table 3, we can observe the conversion results in scores for each of the prosodic variables used. Thus, the prosodic profile is highlighted in both experimental groups.

	Control (SD)	PD (SD)	t	p
Task Duration	46,05(22,94)	43,77(15,96)	0,52	0,604
Number of Breaks ≥ 300 ms	16,91(13,42)	17,13(13,93)	-0,08	0,936
Average Length of the Pause (≥ 300 ms)	0,61(0,18)	0,66(0,16)	-1,28	0,201
Number of Micropauses ≥ 10 ms	26,87(17,90)	23,82(13,36)	0,87	0,386
Average Length of Micro pause (≥ 10 ms)	0,46(0,16)	0,53(0,15)	-2,15	0,033
Phonation Time	34,02(12,40)	31,38(7,29)	1,19	0,237
Proportion of Phonation	78,70(12,63)	75,22(10,81)	1,34	0,181
Speed of Elocution	3,49(0,80)	3,10(0,68)	2,41	0,017
Speed of Articulation	4,40(0,47)	4,09(0,53)	2,80	0,009
Average Duration of the syllable	0,22(0,02)	0,24(0,03)	-2,91	0,005

Table 3. Descriptive statistics and mean of the variables studied in patients with PD and Control. SD = standard deviation.

The results of this study were published in the journal of Neurology.

Martínez-Sánchez F, Meilán JJ, Carro J, Gómez Íñiguez C, **Millian-Morell L**, Pujante Valverde IM, López-Alburquerque T, López DE. (2015) Speech rate in Parkinson's disease: A controlled

study. *Neurología*. pii: S0213-4853(14)00264-3. doi: 10.1016/j.nrl.2014.12.002.

2b. Alzheimer's Disease Speech analysis

Group	Parameters	Control Mean (SD)	AD Mean (SD)
Temporal aspects of the speech sample	Total duration (seconds)	44.39 (18.32)	82.19 (53.05)
	Phonation Time (seconds)	34.50 (13.16)	46.72 (19.86)
	Reading Speed	3.66 (.71)	2.55 (.63)
	Articulation Speed	4.39 (.45)	4.05 (.43)
Analysis of fundamental frequency (F0)	Mean F0 (Hz)	179.08 (29.06)	159.42 (25.12)
	Minimum value F0 (Hz)	68.16 (3.98)	67.66 (3.78)
	Maximum value F0 (Hz)	539.80 (127.75)	596.63 (68.76)
	Autocorrelation	.89 (.04)	.90 (.05)
	High Pitch Global	478.12	571.25
	Low Pitch Global	76.82	82.50
Space full of sound	N Pulses	4207 (1835)	6520 (2872)
	N Periods	4113 (1805)	6379 (2830)
	N Mean Periods	6.47 (1.10)	5.76 (.88)
Interruption of sound	Percentage without voice	35.40 (87.46)	47.83 (12.28)
	N voice breaks	84.08 (30.15)	118.93 (68.27)
	Percentage of voice breaks	39.29 (6.87)	51.27 (12.03)
	Proportion of pauses of voice	28.67 (12.887)	51.76 (13.55)
	N pauses of voice	14.33 (9.3)	34.5 (27.04)
Parameters of the fluctuation in frequency	Jitter (loc) (Hz)	2.83 (.65)	2.80 (.95)
	Jitter (loc, abs) (ms.)	184.92 (57.24)	165.22 (75.41)
	Jitter (rap) (Hz)	1.2 (.41)	1.34 (.54)
	Jitter (ppq5) (Hz)	1.51 (.48)	1.54 (.61)
Fluctuations in the amplitude of sound (Intensity of Sound)	Shimmer (loc)	10.40 (1.84)	11.67 (2.95)
	Shimmer (loc, db)	1.59 (.44)	1.60 (.51)
	Shimmer (apq3)	5.35 (2.17)	6.01 (2.74)
	Shimmer (apq5)	7.84 (3.04)	7.92 (3.43)
	Shimmer (apq11)	14.16 (4.52)	12.66 (4.58)
	Intensity of unvoiced dB	56.78 (4.42)	53.27 (5.15)
Harmonic/ Noise Ratio	Intensity of voiced dB	71.16 (4.10)	70.35 (2.74)
	Noise to Harmonic Ratio	.17 (.65)	.15 (.07)
	Harmonic to Noise ratio	12.38 (2.85)	12.72 (2.64)

Table 4. Speech Parameters were measured and descriptive data.

Linear discriminant analysis results made it possible to obtain a highly significant discriminant function (percentage of variance explained = 100%; eigenvalue = 1.095, canonical correlation = 0.723; Wilks' lambda = 0.477, Chi-squared = 45.488, df = 5, $p < 0.001$), containing five factors (see table 5). The discriminant function, in standardized coefficients, selected the following measures: Analysis of space full of sound as periods numbers of voice (SC= 0.874); analysis of breaks of voice as percentage of voice breaks (SC=0.787) and voice breaks numbers (SC= - 0.683); parameters of the fluctuation of amplitude of sound as Shimmer apq3 (SC= 1.381); and finally, noise to harmonic ratio (SC = -1.127). Table 2 shows the Wilks' lambda and Fisher coefficients of structure matrix for each variable. The non-standardized centroids are to Alzheimer's disease =1.129 and to Control group = -.941.

Parameters	Wilks' lambda	Structure Matrix: Function
Percentage of voice breaks	25.717**	.654
N Periods	17.940**	.471
N voice breaks	14.886**	.330
Shimmer (apq3)	13.162**	.131
Noise to Harmonic Ratio	13.142**	-.138

Table 5. The Wilks' lambda and Fisher coefficients structure matrix for each introduced variable.

Once the discriminant function was obtained, the participants in the sample were classified according to the scores obtained by each of them in the function. The results, show how the cases correctly classified by this procedure, total 56 of the 66 participants thus are providing 84.8% sensitivity in correct classification. Only 6 participants in AD group and four in control group were classified incorrectly. In the cross validation, the cases correctly classified by this procedure total 55 of the 66 participants, thus are providing 83.3% sensitivity in correct classification. Seven participants in AD group and four in control group were classified incorrectly. The results speak for themselves regarding the accuracy in the diagnosis of AD with the measures used.

Table 4 shows the speech parameters that were measured and descriptive data. The results of this study are published in the journal *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*

Meilán JJ, Martínez-Sánchez F, Carro J, López DE, **Millian-Morell L**, Arana JM. Speech in Alzheimer's disease: can temporal and acoustic parameters discriminate dementia? *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2014;37(5-6):327-34. doi: 10.1159/000356726. Epub 2014 Jan 30.

3. DNA Analysis

We analyzed SNPs in different genes, from DNA extracted from saliva samples from study subjects. An analysis of the frequency distribution, in which the different alleles of each gene polymorphisms studied, using the chi-square test to analyze their frequency of distribution in the (Table 6).

	NRG-1 rs3924999	NRG-1 rs6994992	COMT rs4680	Drd2 rs6277	Drd3 rs6280	Drd2 rs1800497
N	112	132	113	124	132	122
X ² , gl 8	4,176,62	4,74	13,30	5,72	11,63	3,17
p	P=0,847578	p=0,784	p=0,043*	p=0,706	p=0,168	p=0,923

Table 6. Values of chi-square analysis on the distribution of the different allelic genotypes in the study groups. N- Number of cases studied. The differences are significant at $p < 0.05$.

3.a. Polymorphism rs3924999

The genotype frequencies for rs3924999 polymorphism of *NRG-1* are reflected in Figure 1. The three genotypes did not differ in relation to the groups studied. This shows that the most frequent genotype is homozygous G/G, normal genotype in this gene. The homozygous A/A, which would be having more partnerships with different pathologies, has a lower frequency in all study groups.

3.b. Polymorphism rs6994992

The polymorphism rs6994992 of the *NRG-1* gene, the genotype distribution analyzed shows no difference between the different study groups.

3.c. *COMT* gene polymorphisms

In analyzing the distribution of the *COMT* gene polymorphism, we found that there are significant differences ($p=0.043$) in the frequency of the different genotypes in the study groups. The genotype A/A, which is associated with risk for different pathologies, has lower frequency of occurrence (Figure 1). The peer distribution analysis indicated that there are significant differences between patients with MCI and controls ($p = 0.017$), with an OR: 1.26.

3.e. Dopamine receptor polymorphisms

3.e.1a. Polymorphisms *Drd2* rs6277

Distribution analysis of the polymorphism of the gene encoding the dopamine *Drd2* rs6277, homozygous T/T (normal) had a higher genotype distribution in the study groups representing the erroneous coding (C/C). No differences between the frequencies of the different allelic forms between the study groups were found.

3.e.1b. *Drd2* polymorphisms rs1800497

The distribution of the different genotypes *Drd2* polymorphism, rs1800497, to appreciate that the T/T genotype, which represent the coding error appears in very low percentages or zero (control group and ET patients) in some cases in our group of subjects. The genotype C/C is the most frequent, so we did not obtain significant differences in the frequency distribution

analysis.

3.e.2. *Drd3* polymorphism rs6280

Analysis rs6280 polymorphism distribution (Figure 4) of the *Drd3* gene, showed that the presence of the altered genotype T/T, appears in a greater percentage with PD in our group of subjects, with a statistically significant frequency in relation to controls ($p=0.010$), with the risk factor in this disease OR: 11.08 with 95% CI 1.96 to 62.5. No significant differences were found between the frequencies of the different allelic forms among the other study groups.

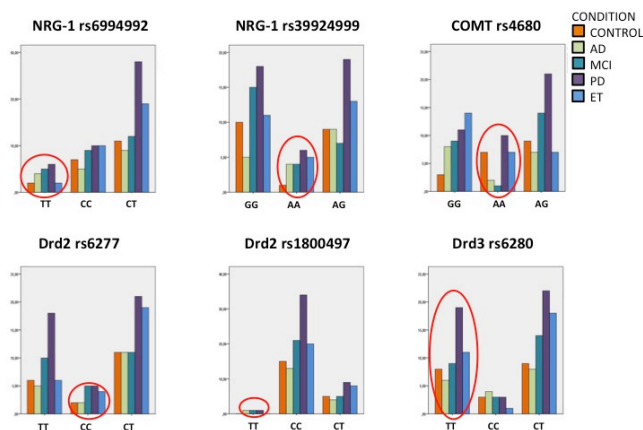


Figure 1. Distribution of genotype frequencies of the polymorphism *NRG-1* gene, *COMT*, *Drd2*, and *Drd3* in neurodegenerative diseases.

4. Startle reflex and Prepulse Inhibition

We studied the auditory startle reflex in controls (35), patients with AD (21), patients with MCI (33), patients with PD (52) and patients with TE (34).

The amplitude of the ASR was greater in patients with MCI than in all other neurodegenerative diseases studied, although the difference is not statistically significant (Figure 2). Regarding ASR latency, no significant differences between groups were found. In the analyses by group and gender, we found significant differences in the latency of the ASR in AD patients ($p=0.04$). Also, in this condition, the differences were greater in men than in women, but the differences did not reach statistical significance.

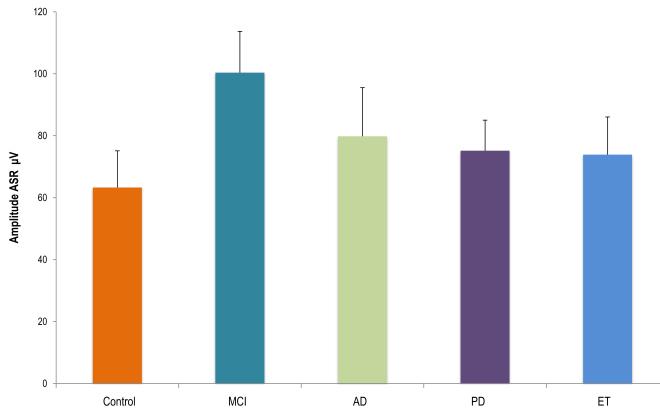


Figure 2. Startle reflex amplitude in neurodegenerative diseases. Significant differences (*) between groups ($p < 0.05$) were observed. Error bars show \pm SEM.

4.1. Prepulse Inhibition

We examined the PPI (within-subjects factors) using ANOVA with repeated measures. A significant main effect on PPI at 60 ms was found between MCI and PD patients ($p = 0.017$). There was a significant effect on the PPI in PD group relative to controls ($p=0.05$ $F_{1, 82} = 8.52$) (Figure 3), when the prepulse-to-pulse was 120ms. Also, a significant effect was found at the interval of 120 ms between PD patients ($p= 0.000$), EA ($p = 0.000$) and ET ($p = 0.000$), and MCI. (Figure 3).

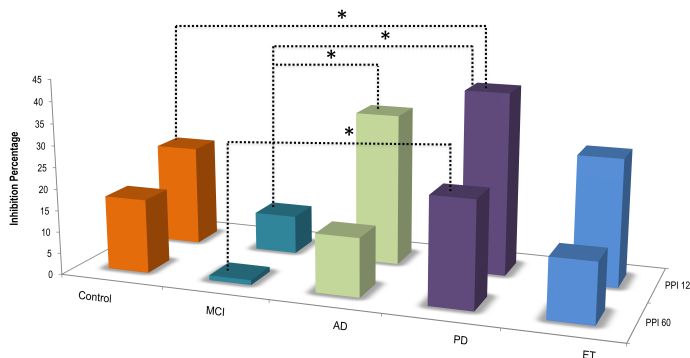


Figure 3. Startle reflex modifications in neurodegenerative diseases prepulses before the trigger pulse reflection. Abbreviations: PPI 60, percent inhibition of ASR when the interval between prepulse-pulse is 60 ms 120 PPI, percent inhibition of ASR when the interval between prepulse-pulse is 120 ms. (*) Significant differences were observed between groups ($p < 0.05$).

4.2 Prepulse Facilitation

Analyzing the facilitation of the auditory startle reflex (PPF), (Figure 4), we found differences between controls and PD patients ($p=0.045$) and between patients with PD and MCI ($p = 0.001$).

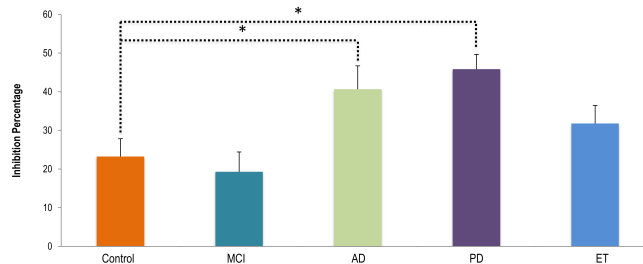


Figure 4. Startle reflex modifications in neurodegenerative diseases prepulses before the trigger pulse reflection. Abbreviations: PPF percent facilitation of ASR when the interval between prepulse-pulse is 1000 ms. (*) Significant differences was observed between groups ($p < 0.05$).

5. Correlations between PPI / PPF and DNA polymorphisms

We analyzed the different parameters of the PPI depending on the SNPs genotype of patients and controls. The different genotypes of polymorphisms of *NRG-1* gene had different values in different parameters of the PPI. In Figure 8, it can be seen significant differences between PD patients, between the distribution of carriers and non-carriers of the mutated allele, and different intervals of PPI and PPF in the rs6994992 polymorphism.

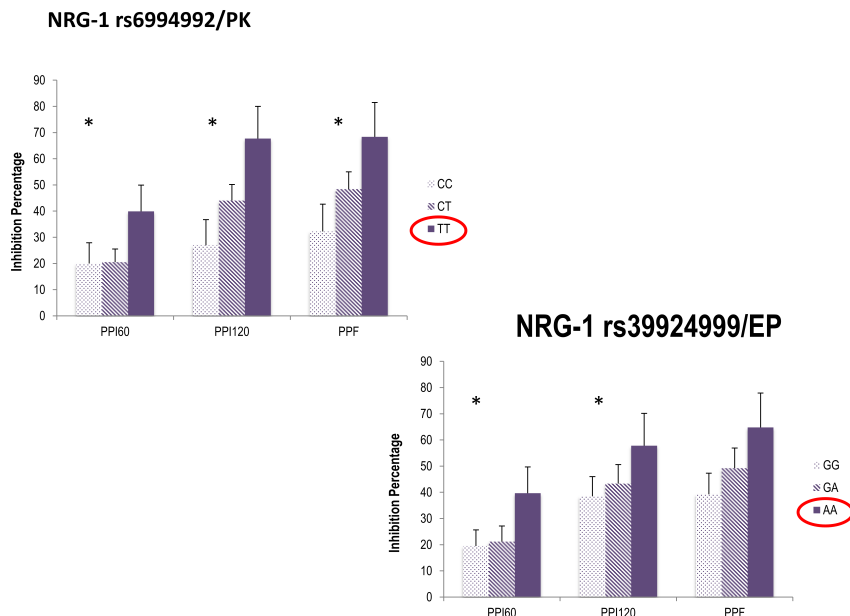


Figure 5. Values of the PPI and PPF grouped by genotype of rs6994992 and rs39924999 polymorphism of *NRG-1* gene. Error bars represent mean values \pm SEM.

In the polymorphism rs39924999 significant differences between genotypic distribution and PPI_{120ms} and PPF were among PD patients (Figure 5). In cluster analysis differences were found among carriers of the mutant allele and the PPI when we analyzed the *NRG-1* rs6994992 polymorphism in patients with MCI and AD, finding a higher percentage of inhibition in AD patients carrying the mutant allele (Figure 6).

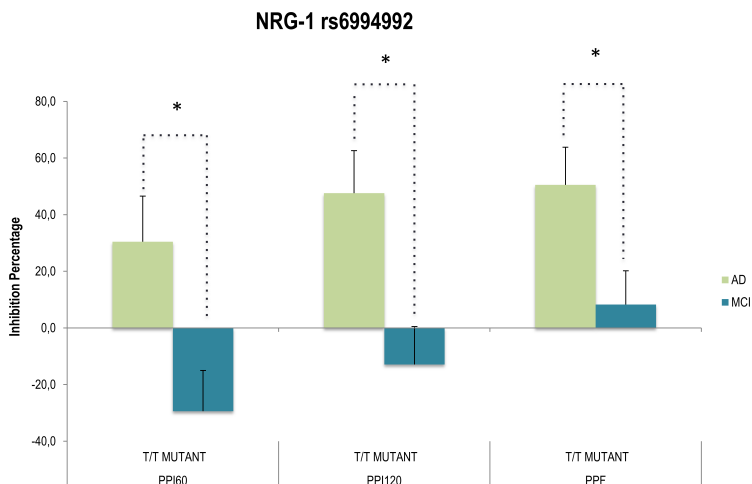


Figure 6. Values of the PPI and PPF grouped by genotype of rs6994992 polymorphism of *NRG-1* gene. Error bars represent mean values \pm SEM.

Regarding the *Drd3* receptor polymorphism and different parameters of PPI, we found significant differences between patients with PD who possess the allele carrier and controls when we analyzed the PPI₁₂₀ and PPF (Figure 6).

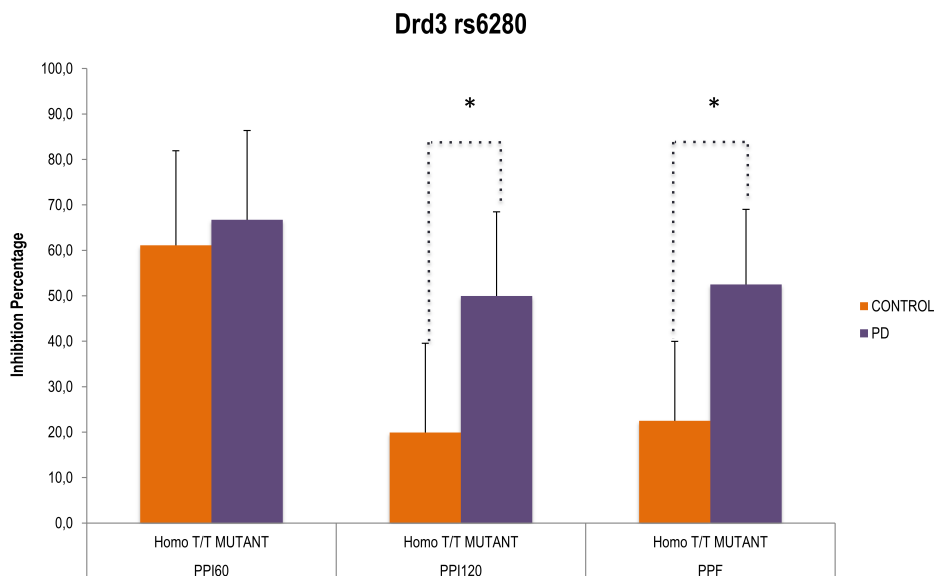


Figure 6. Values of the PPI and PPF grouped by genotype of rs6280 polymorphism of *Drd3*. Error bars represent mean values \pm SEM.

VI. Discussion

1. Acoustic startle reflex and its modulations

We analyzed the variations in the ASR, PPI and PPF behavioural paradigms in patients with neurodegenerative diseases. Furthermore, we studied the differences between groups with different neurodegenerative diseases and compared with a control group and each other. Our results show no significant differences in the amplitude of ASR between patients and controls. Latency of the ASR appears to increase with age, showing this trend in all groups analyzed. We have not found differences between controls and patients in latency; we only found differences in latencies between AD patients between men and women.

In the present study, it was found that patients with neurodegenerative diseases and control subjects had similar amplitudes in the ASR. PD patients show longer latencies in the ASR in comparison with other subjects. Our results are consistent with the literature (Kumari et al., 2004; Ellwanger et al., 2003; Ludewig et al., 2003; Kumari et al., 2008), which suggests that with age there is less startle reaction, a phenomenon affecting healthy subjects. The differences observed in the startle response between these diseases can be interpreted in the context of the degenerative neuronal loss, including structural changes that occur at different levels within the nervous system.

In the present study, we found that PD patients and control subjects had ASR with similar amplitudes and longer onset latencies. Several authors (Vidailhet et al., 1992; Kofler et al., 2001; Bowers et al., 2006) described longer latencies in *orbicularis oculi* muscle in PD, which was prolonged in ON states and in sitting positions. Our results are consistent with the literature (Kumari et al., 2004; Ellwanger et al., 2003; Ludewig et al., 2003; Kumari et al., 2008) that suggests that, with age there is less startle reaction and PPI, which would affect healthy subjects. The PPI demonstrates the control that the basal ganglia exert over the brainstem reflexes. In PD, there is an enhancement of the blink reflex, indicating an increased filtering of sensory information. PPI circuits are controlled through the pedunculo-pontine tegmental nucleus, which regulates the excitability of the startle related structures of the reticular formation (Kumari et al., 2008). When compared to controls, PD patients showed higher prepulse inhibition at 60 ms and 120 ms, confirming our hypothesis that PD have disturbances in sensorimotor gating. Periol and coworkers (Perriol et al., 2005) reported a significant difference in PPI120ms when compared to healthy controls. In their study, they also compare patients with AD and Dementia with Lewys bodies, and their results suggest an involvement of the dopaminergic subcortico-thalamo-cortical networks in PPI regulation, and more severe disruption of these networks in Dementia with Lewys bodies than in PD (Perriol et al., 2005). Also, Valls-Solé and coworkers (Valls-Solé et al., 2004) indicated an increased prepulse inhibition in PD patients. Excessive sensory gating in PD may reflect

impaired integration of sensory inputs, resulting in impaired goal-related movements (Bischoff-Grethe et al., 2003). Bradykinesia in PD affects the ability to initiate and coordinate a series of motor tasks (Schindler and Kelly, 2002). This impaired ability to inhibit motor movements justified both slowing the onset of motor responses, as well as disruption of movements once they have been initiated (Obeso et al., 2011). The impairment of the sensorimotor regions (basal ganglia, cerebral cortex, and other associated regions) to receive accurate afferents input may account for errors in the initiation, timing and range of movement (Bischoff-Grethe et al., 2003). The fact that individuals with PD often show an abnormal increase in muscle tone and rigidity can reflect a tendency of the central nervous system to remain in a state of alert and movement preparation, while awaiting the arrival of the afferent signal, resulting in a delayed or aberrant transition to movement execution (Bischoff-Grethe et al., 2003; Farrell et al., 2005).

We also found that PD patients showed less PPF than the control group. PPF is a less understood process associated with a later stage of generalized alerting or orienting (Dawson et al., 1982) as well as specific selective attention process (Graham, 1975). According to Graham (1975), the PPF reflects a generalized orienting or attention automatically elicited where there is no selective attention to specific stimuli. The study published by Wynn et al., 2004 about PPF in schizophrenic patients showed that these patients and their siblings had lower PPF than controls, imputing this finding to an orienting deficit. Bowen and Ison (2006), reported that PPF has a more peripheral motor consequence of a non-specific alerting reaction, suggesting that the pathways of the PPF may not depend on the sensory-motor processing. In order to explain our findings of less PPF in PD group, a cognitive evaluation of patients and their corresponding control subjects should be necessary to evaluate any type of cognitive impairment or attention disorders.

In patients with ET, we found they had larger amplitudes and less prolonged latencies in the ASR when compared to the control group. These findings could be due to a loss of the early LC compensatory mechanism over the SN, which in turn might cause dysfunction of NPP-NCPR circuit with subsequent manifestations in the ASR (Lavoie and Parent, 1994). In the current literature, we did not find studies of the ASR and PPI in patients with ET, so the results are not compared in this dissertation. Since PD and ET share a common pathological substrate and that we found different results, we hypothesized that there is a difference in the subcortical structures and reflex neuronal pathways that are affected in each of the pathologies.

The results obtained in the case of MCI and AD levels reflect a dysfunction circuit structures that are involved in attention processes. MCI patients had greater amplitude of the ASR that controls subjects and the other patient groups. We attribute this difference to the neuronal loss in the hippocampal

formation, that occurs in these patients because as the amygdala, hippocampus and anterior cingulate cortex play an important role in the modulation of reflex (Lee and Davis, 1997; Medford and Critchley, 2010).

The results of our study are consistent with a previously published study by Hejl and collaborators (2004), as there are no differences in PPI at different ISIs among MCI patients and AD patients when compared to control subjects. As the study published by Hejl et al., (2004), our results contradict the study published by Ueki et al. (2006), in which they found PPI facilitation in patients with AD. This rather contradictory results can be explained by differences in the methodology applied. Thus, an accelerometer was used to measure muscle contraction in the study of Ueki et al., 2006, whereas our study and Hejl et al. (2005) used an electromyographic recording. We hypothesized that these results might be due to the anticholinergic drugs that are use to treat these patients. Unpublished studies of our research group using experimental animals models, indicate that a modification of the PPI exists after treatment with anticholinergic. This effect found in experimental animals might be extrapolated to our patients.

2. Speech analysis

2.1 Parkinson's disease

Control of specific frequencies is learned in childhood and requires coordination of the vocal structures adjusting acoustic resonances of the vocal tract (Saxena et al., 2014; Bunton, 2008; Wolfe et al., 2009), which is a process of motor coordination affected in PD.

An estimated 70%–90% of patients with PD also develop speech or voice disorders (Darley et al., 1968) specifically hypokinetic dysarthria, characterized by monopitch, monoloudness, under articulation, and hoarseness in voice (Forrest et al., 1989). This is consistent with our results as we have observed significant differences between controls and patients with Parkinson's. As reflected in the usual language studies in PD (Canter, 1963; Griffiths and Bough, 1989; Cannizzaro et al., 2004), we found that there were disruptions in temporal aspects of the speech sample like a breakage in the prosody, poorly controlled phonation time and fewer pauses and voice breaks. Our results reflected a sharper voice, less control of low frequencies, which prevents on the other hand the noises characteristic of elderly people in the voice. Finally, the lack of control increases the intensity of sound, with a substantial increase in decibels, but at the same time, the lack of emission control causes high monotone, barely accentual variations. An inhibitory deficit means more voice breaks, percentage of periods without voice emission and emission ratio of syllables per time lowest phonation. The pathways that follow the vocalization process consist primarily of three components: laryngeal activity, respiratory movements

and supralaryngeal. The most important is the extrapyramidal pathway that connects the motor cortex – putamen - substantia nigra - parvocellular reticular formation - phonatory motoneurons (Jürgens, 2002). The loss of motor control that holds the function of the vocal folds could explain the fluctuations of voice frequency. The position of the reticular formation and ventral parabrachial regions suggests that this area plays a crucial role in vocal motor coordination. Among the hierarchically control of vocal behavior pathways, the phonatory motoneurons input are of two types. One for motor coordination, which comes from the motor cortex and basal ganglia via the pyramidal and extrapyramidal pathway, and the other for the learned vocal patterns, that has a gaiting function, becomes from the periaqueductal grey and cingulate cortex, structures that represent different levels of sensorimotor gaiting control.

The damage of neuronal pathways due to neuronal loss in PD might explain the deficits in startle modulation and speech.

2.2. Alzheimer's disease

The findings suggest that speech measures may indeed be valuable in detection of AD. The results showed that the two groups performed qualitatively differently in the language production task. The participants were classified into the disease and the control groups depending on only five factors: Percentage of voice breaks, N Periods of voice, N voice breaks, Shimmer (apq3) and Noise to Harmonic Ratio. Thus, the prosodic values analyzed are of enormous value given that they allow us to define the profile of individuals with AD (Meilán et al., 2012)

The variables were interpreted using the Fisher coefficients of matrix structure. In the analysis of space full of sound, it was found that in the speech of the participants with AD there was a higher number of periods sound. This implied that the frequencies used are lower, with fewer cycles per second, presenting the AD group a deeper voice, slower, with a slower rate of speed or rhythm of the glottal pulses and giving rise to a monotonous voice. In the interruptions of voice, it was found that in the speech of the participants with AD there was a higher proportion and numbers of voice breaks. Recently, Meilán et al. (2012) found that the increase in the percentage of voiceless segments in patients' speech is a sign that explains more than 34% of the variance in the scores obtained in a specific language and memory test. Roark et al. (2011) found that the frequency of pauses were useful in discriminating between healthy elderly subjects and subjects with MCI. The interruptions of voice show a series of phonetic features of speech such as narrowing of the phonational range, voice breaks and excessive reduction of the fundamental frequency of speech, as the result of difficulties of laryngeal muscle accommodation to rapid changes in frequency. The voice breaks is a voice disorder where the pitch of the voice changes suddenly and the number of distances between consecutive pulses are

longer than 1.25 divided by the pitch floor. With that, the AD speech turn to be contaminated, and characteristic noises like bubbles or tremor in the voice start showing. Moreover, in the Noise/ Harmonic Ratio (NHR), which provides an indication of the overall periodicity of the voice signal by quantifying the ratio between the aperiodic (noise) and periodic (harmonic part) components, the group with AD had a lower ratio than the control group, with the execution of greater noise frequencies in the AD patients than in the control group. In conclusion, the noise and voice break related parameters give information regarding the amount of noise component in the voice signal. In the analysis of fluctuations, the amplitude of sound, the speech of the participants with AD there was a higher amplitude perturbation quotient between the amplitude of a period and the average of the amplitudes of its neighbors, divided by the average amplitude. The group with AD showed greater variation in the intensity of the successive waves produced continuously, especially in the variation of the amplitudes of their two closest neighbors. Fluctuations in the amplitude of sound refer to period-to-period amplitude variation in the voice signal. The patients with AD showed a tremulous voice, with less intensity and less control of airflow than the control group. In conclusion, we have designed a direct test for measuring language production through an objective and ecological task that can be applied in a very short period of time. It is a method for automatically measuring the speech characteristics of spoken language samples and we have examined the usefulness of these measures for discriminating between patients with AD and control groups, helping in a more accurate diagnosis of AD. The speech measures may indeed be valuable in detection of AD. Spoken language examination is a relatively inexpensive and an easy technique, which involves minimum discomfort for the patient. The use of spectral analysis tools yields an objective description of voice output that will allow specialists to unify concepts.

3. SNPs analysis

We analyzed the SPSs of the *NRG-1* gene, the *COMT* gene and dopamine receptors *Drd2* and *Drd3*.

3.1. *NRG-1* SNPs

The analysis of genotype rs3924999 and rs6994992 for *NRG-1* gene polymorphisms showed no significant differences between the neurodegenerative disease patients studied, and the control group. Alterations of different polymorphisms of *NRG-1* have been identified as predictors of schizophrenia (Hong et al., 2008) and the mutant genotype of this gene has been linked to abnormalities in sensory gating in schizophrenia (Roussos et al., 2011). Although our results do not show that the mutant genotype is a marker of pathologies, we found an association between the mutant genotype and abnormal patterns of PPI in degenerative diseases. This can be further evidence of the association of the PPI as quantifiable neurophysiological measure to be associated with genetic alterations (Braff et al., 1990; Cadenhead et al., 2000; Geyer et al 2001; Anokhin et al., 2003; Kumari et al, 2005; Hong et

al., 2008).

3.2. *COMT* SNPs

In our analyses for rs4680 polymorphism of the *COMT* gene, we found no significant differences in the frequency of occurrence of different genotypes. Our results are consistent with studies previously published by Quednow et al. (2009), that *COMT* rs4680 influences the clinical and anatomical characteristics of patients with dementia. This is particularly observed in patients with MCI and AD when compared to controls. It is known that the A allele (Met) is related to cognitive functions (Harrison et al., 2008; Talledo et al., 2009; Quednow et al., 2009). Studies in healthy controls suggest that *COMT* genotype influences cognitive processing, the system of reward and emotion (Gennatas et al., 2012). Numerous studies have associated the rs4680 polymorphism with the presence of AD with psychosis (Sweet et al., 2005; Borroni et al., 2006, 2007; DeMichele-Sweet et al., 2010). In our study, we have not addressed the presence of psychosis in patients because in early stages there is no presence of psychosis. Our results show a lower prevalence of genotype A/A for patients with MCI, which could indicate that carriers of this genotype have a risk factor for developing the disease.

3.3. *Dopamine receptor* SNPs

Polymorphisms of genes encoding dopamine receptors *Drd2* (*Drd2*rs6277 and *Drd2* rs1800497) did not show significant results in the study sample. The SNP rs6277 the normal genotype (T/T) was the predominant frequency. For the SNP rs1800497, we did not find the mutant genotype in control subjects and in patients with ET and, for this genotype the frequency was low in the other pathologies. The results of our study are in agreement with the literature, in which no association between neurodegenerative diseases and polymorphisms of dopamine receptors *Drd2* (Singh et al., 2008; De Palma et al., 2010; Tan et al., 2003; Costa-Mallen et al., 2000; Comings et al., 1991; Kiyohara et al., 2011). This was an unexpected finding since *Drd2* receptors play an important role in dopaminergic control of the movement and behavior (Van Ham et al., 2007).

For the *Drd3* receptor, the rs6280 polymorphism was found as a risk factor in PD, showing higher levels of the mutant allele.

Correlating the mutated genotype distributions of *Drd3* with the PPI, we found significant differences between PD patients and control subjects with PPI120ms and with PPF, showing higher percentage in both parameters in the PD patients with the mutant allele. Our results show relationship between SNPs and the percentage of PPI as published by other studies (Völter et al., 2011; Roussos et al., 2008). Signaling D2 and D3 receptors in the striatal system may be responsible for the deficits of PPI (Völter et al., 2011). Although we did not find significant association with genotype of the D2 SNPs and

pathology, the fact that we found association with the values of PPI genotype and pathology can be used as in early diagnosis. The association with dopamine and PPI has been studied mostly in patients with schizophrenia and animal models for schizophrenia, and studies in healthy subjects confirm the association between PPI and D2 and D3 receptors, (Roussos et al., 2008; Völter et al., 2011).

Studies show the involvement of the sensory system in the pathophysiology of certain movement disorders, makes it essential to consider the potential contribution of changes in sensorimotor integration in motor execution (Abbruzzese and Berardelli, 2003).

VII. CONCLUSIONS:

1. Sensorimotor integration capacity measured by the PPI is impaired in most neurodegenerative diseases.
2. The prepulse-pulse interval of 120 ms is the best setup for discriminating patient groups with the PPI behavioural paradigm.
3. Patients with AD and MCI, show greater cognitive impairment than the rest of the groups.
4. Patients with PD have slowed language syllabic and prosodic joint.
5. AD patients show differences in language production tasks in the study of temporal and acoustic parameters of the voice, having these patients a discriminating voice profile.
6. The presence of the mutated rs4680 polymorphism of the *COMT* gene differentiates between patients with MCI and healthy individuals.
7. The rs6280 SNP of the dopamine D3 receptor gene, genotype and allelic variants could be related with the risk of PD.

Listado de Figuras

- Figura 1.** Base anatómica de enfermedades neurodegenerativas.
- Figura 2.** Cadena de ADN.
- Figura 3.** Ensayos de Medición del RAS y de PPI.
- Figura 4.** Circuito de reflejo sobre salto en la rata.
- Figura 5.** Bases neurales de la PPI en el hombre.
- Figura 6.** Espectro de muestra empleada en el estudio.
- Figura 7.** Principio de discriminación alélica.
- Figura 8.** Equipo de medición del RAS.
- Figura 9.** Registro electromiográfico.
- Figura 10.** Puntuación de la escala funcional en los grupos de estudio.
- Figura 11.** Puntuación del MMSE en los grupos de estudio.
- Figura 12.** Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo rs3924999 del gen *NRG-1*.
- Figura 13.** Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo rs6994992 del gen *NRG-1*.
- Figura 14.** Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo rs4680 del gen *COMT*.
- Figura 15.** Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo rs6277 del gen *Drd2*.

- Figura 16.** Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo rs1800497 del gen *Drd2*.
- Figura 17.** Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo rs6280 del gen *Drd3*.
- Figura 18.** Porcentaje de aparición de polimorfismos asociados a patologías neurológicas.
- Figura 19.** Amplitud del Reflejo de sobresalto en las enfermedades neurodegenerativas.
- Figura 20.** Análisis del porcentaje de Habitación del RAS en las enfermedades neurodegenerativas.
- Figura 21.** Porcentaje de modificación del Reflejo de sobresalto en las enfermedades neurodegenerativas por diferentes prepulsos sonoros.
- Figura 22.** Porcentaje de modificaciones del Reflejo de sobresalto en las enfermedades neurodegenerativas analizadas por género.
- Figura 23.** Porcentaje de facilitación del Reflejo de sobresalto en las enfermedades neurodegenerativas.
- Figura 24.** Valores de la PPI y PPF en relación con el polimorfismo rs6994992 y el polimorfismo rs3934999 del gen *NRG-1* en la EP.
- Figura 25.** Valores de la PPI y PPF agrupados por genotipo del polimorfismo rs6994992 del gen *NRG-1* en la EA y DCL.
- Figura 26.** Valores de la PPI y PPF en relación con el polimorfismo rs6280 del gen *Drd3* en la EP.
- Figura 27.** Puntuación de la escala funcional nueve meses después de la primera evaluación.
- Figura 28.** Puntuación del MMSE nueve meses después de la primera evaluación.

Figura 29. Amplitud del Reflejo de sobresalto en las enfermedades neurodegenerativas, en una primera medición y una segunda medición 9 meses después.

Figura 30. Evolución longitudinal de la PPI 9 meses después.

Listado de Tablas

- Tabla 1.** Resumen de Polimorfismos estudiados.
- Tabla 2.** Medida de las Puntuaciones de Test Cognitivos.
- Tabla 3.** Parámetros de voz estudiados en la EP.
- Tabla 4.** Parámetros de voz estudiados en la EA.
- Tabla 5.** Cociente de Wilkin's lambda.
- Tabla 6.** Valores de χ^2 para la distribución de los genotipos alélicos.
- Tabla 7.** Genotipo y variaciones alélicas del polimorfismo rs3924999 del *NRG-1*.
- Tabla 8.** Genotipo y variaciones alélicas del polimorfismo rs6994992 del *NRG-1*.
- Tabla 9.** Genotipo y variaciones alélicas del polimorfismo rs4680 del *COMT*.
- Tabla 10.** Genotipo y variaciones alélicas del polimorfismo rs6277 del *Drd2*.
- Tabla 11.** Genotipo y variaciones alélicas del polimorfismo rs1800497 del *Drd2*.
- Tabla 12.** Genotipo y variaciones alélicas del polimorfismo rs6280 del *Drd3*.
- Tabla 13.** Media de RAS y sus modificaciones en pacientes y controles.
- Tabla 14.** Correlaciones de los valores medios de PPI y PPF con los test Cognitivos.
- Tabla 15.** Variables significativas en el DCL con respecto a los controles.
- Tabla 16.** Variables significativas en la EA con respecto a los controles.
- Tabla 17.** Variables significativas en la EP con respecto a los controles.
- Tabla 18.** Variables significativas en el TE con respecto a los controles.
- Tabla 19.** Puntuación obtenida en los test cognitivos en pacientes, 9 meses después de la primera evaluación.



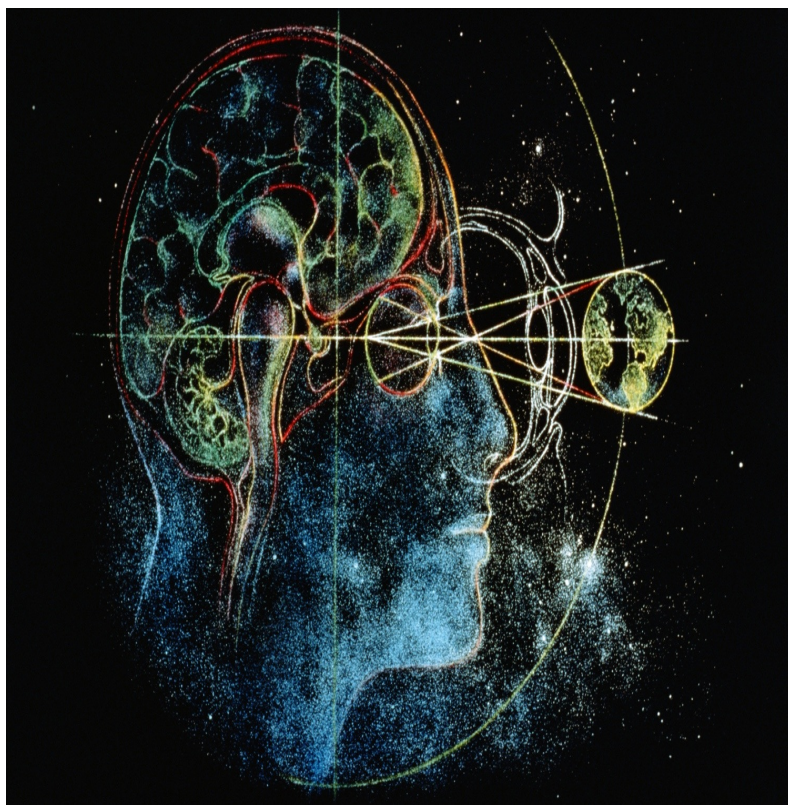
(Igor Morski)

Justificación

Justificación del trabajo:

En los últimos años, debido al aumento de la calidad de vida y a la mayor longevidad, se está produciendo un incremento exponencial en las enfermedades neurodegenerativas, con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, particularmente, alteraciones cognitivas, conductuales, emocionales y sensitivo-motoras. El examen neurofisiológico del sistema nervioso central (SNC) puede aportar información relevante sobre las anomalías funcionales. Si además, añadimos pruebas que evalúen el procesamiento de la información sensoriomotora, podremos establecer patrones que ayuden al diagnóstico, clasificación y diferenciación de enfermedades con presentación clínica similar en etapas iniciales, lo que permitiría una intervención farmacológica temprana para intentar retrasar o detener la evolución de la patología, así como establecer diferentes patrones de respuesta, y asociarla a un determinado grado evolutivo de la enfermedad. Además, la evaluación de la capacidad sensoriomotora puede emplearse como un parámetro objetivo para evaluar la eficacia de la terapia empleada.

Finalmente, el avance del conocimiento de las bases genéticas de las enfermedades, la asociación de determinados polimorfismos genéticos con patologías degenerativas concretas, junto con el abaratamiento de las técnicas de biología molecular, nos ha inducido a realizar un estudio de algunos de los polimorfismos genéticos asociados a las patologías estudiadas. Pretendemos que la detección de estas modificaciones genéticas pueda ser una herramienta para diseñar programas de vigilancia y prevención que retrase la aparición de los síntomas perniciosos asociados a estas patologías.



(Brain Universe, Anónimo)

Introducción

I. Introducción

1. Enfermedades neurodegenerativas

Se definen como enfermedades neurodegenerativas aquellas que cursan con pérdida neuronal progresiva lenta, debido a diversos factores genéticos y ambientales, manifestándose clínicamente por cambios cognitivos, motores o sensitivos. En las últimas décadas, debido al incremento en la tasa de supervivencia de la población general y a la mayor longevidad, sobre todo en países desarrollados, hay un aumento en la prevalencia de distintas enfermedades neurodegenerativas, entre las que destacan por su frecuencia la enfermedad de Parkinson (EP) y el Temblor Esencial (TE), trastornos de un mismo espectro, que en algunos casos, combinan alteraciones motoras y cognitivas (Samuels, 2007), y otras en las que predominan las alteraciones cognitivas como el Deterioro Cognitivo Leve (DCL) y la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Valls-Pedret y cols., 2010).

1.1. Enfermedad de Parkinson

La EP es un proceso neurodegenerativo multisistémico, caracterizado clínicamente por la presencia de la tríada acinesia, temblor de reposo y rigidez. Esta enfermedad pertenece a un grupo de entidades nosológicas denominadas como “*trastornos del movimiento*”. Es importante destacar que las disfunciones del sistema motor se deben a una pérdida progresiva de las neuronas pigmentadas de la sustancia negra *pars compacta* (SN) mesencefálica, lo que condiciona un déficit de dopamina en el núcleo estriado, con la consiguiente alteración en la fisiología normal de los ganglios basales (GB) (Braak y cols., 2000, 2003; Albin y cols., 1989; Braak y Braak, 2000). El sistema sensoriomotor también se ve afectado por los cambios anatómicos y fisiológicos observados en la EP (Abbruzzese y Berardelli, 2003).

De forma característica, en la EP se desarrollan cuerpos de Lewy (CL), que se asientan inicialmente en las vías olfatorias y estructuras del tronco cerebral (núcleo dorsal del vago), y luego se expanden a otras áreas según progresa la enfermedad. Se han propuesto diferentes estadios evolutivos de esta enfermedad (del 1 al 6), en función de la localización de los CL, siendo en el estadio 2 cuando se les detecta en el Locus coeruleus (LC) y el núcleo tegmental pedunculopontino (NTPP), entre otras áreas cerebrales (Braak y cols., 2003; Yoshihisa y Mizuno, 2003).

La EP es la segunda enfermedad degenerativa más frecuente, afectando al ~1-2 % de la población mayor de 65 años, y su diagnóstico es difícil de realizar en los estadios iniciales, ya que la sintomatología motora aparece cuando se ha perdido más de un 50% de las neuronas dopaminérgicas de la SN (Stoessl, 2011). Uno de los mayores retos a los que nos enfrentamos con esta patología es el diagnóstico precoz y preciso, ya que los primeros síntomas ocurren gradualmente y varían entre los pacientes. La despigmentación del LC (Hassler, 1938), y los síntomas motores clásicos debido al deterioro de la SN hacen que el diagnóstico de la EP avanzada sea fácil y seguro, a diferencia de los estadios iniciales.

Algunos pacientes parkinsonianos desarrollan con el tiempo trastornos cognitivos y demencia (Mindham, 1970). Su frecuencia aumenta con la edad, con la severidad de los síntomas motores, con la presencia de psicosis y alucinaciones, y con el deterioro cognitivo previo (Aarsland y cols., 2001; Hughes y cols., 2000). Su aparición es muy posterior al inicio de los síntomas motores, lo que sirve para diferenciarla de la demencia por cuerpos de Lewy, y se relaciona con una considerable reducción de eferencias colinérgicas desde el núcleo basal de Meynert (Tiraboschi y cols., 2000). Por otra parte, estudios realizados con tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) en pacientes con EP, demuestran que la alteración cognitiva está relacionada con la disfunción del sistema dopaminérgico (Rinne y cols., 2000; Hirano y cols., 2012; Cools, 2011; Narayanan y cols., 2013; Siepel y cols., 2014).

1.2. Temblor esencial

El TE caracteriza por la presencia de temblor postural y cinético en las extremidades superiores y cabeza, que generalmente no existe en reposo (Cohen y cols., 2003). Es un proceso lentamente progresivo, que acaba produciendo discapacidad motora y funcional. Es el trastorno del movimiento más común en la práctica clínica, especialmente después de los 40 años.

Se ha considerado al TE como una enfermedad monosintomática caracterizada por un temblor cinético de miembros superiores, sin embargo, en los últimos años, se ha visto que su espectro clínico es más amplio (Labiano-Fontcubertaa y cols., 2012). Entre los síntomas que le identifican, actualmente se incluyen síntomas motores (alteraciones de la marcha, temblor intencional y de reposo) y no motores (trastornos olfatorios, cognitivos y de la personalidad) (Benito-León y Louis, 2006, 2007; Labiano-Fontcubertaa y cols., 2012).

Las alteraciones cognitivas en el TE se inician con disfunción ejecutiva y de la memoria. Cuando el TE se inicia en ancianos, hay un mayor riesgo de desarrollar demencia (Bermejo-Pareja y cols., 2007). La localización patológica en la mayoría de los casos de TE se asienta en el cerebelo, aunque, un tercio de los cerebros de pacientes aquejados con esta patología presentan cambios neurodegenerativos con muerte neuronal (Axelrad y cols., 2008; Louis y cols., 2007; Louis, 2010), y abundantes CL especialmente en el LC (Louis y cols., 2005, 2007; Shill y cols., 2008).

En la actualidad, aproximadamente un 5% de los ancianos españoles padece esta enfermedad (Benito-León y cols., 2003; Labiano-Fontcubertaa y cols., 2012), y su incidencia aumenta con la edad (Benito-León y cols., 2005; Labiano-Fontcubertaa y cols., 2012). Casi la mitad de los pacientes tienen antecedentes familiares (herencia autosómica dominante con penetrancia variable).

Parece posible identificar diferentes subtipos de TE según la tasa de progresión de la enfermedad, la coexistencia con la EP, y el grado de deterioro cognitivo.

Se ha postulado que tanto la EP como el TE se relacionan estrechamente en su evolución, pudiendo preceder el temblor al inicio de otros síntomas extrapiramidales, habiéndose llegado a considerar el TE como un factor de riesgo en el desarrollo de la EP. La consideración de estas dos entidades como parte de un *continuum* neurodegenerativo no es nueva (Critchley y Greenfield, 1948), y poseen una base anatómica común, la neurodegeneración del LC (Frisina y cols., 2009), principal núcleo involucrado en la producción de noradrenalina (Swanson y Hartman, 1975), así como en funciones de vigilancia y alarma (Aston-Jones and Bloom, 1981).



Figura 1. Base anatómica de las enfermedades neurodegenerativas en estudio. Las dos patologías implican afectación de un núcleo pontino al inicio de la enfermedad, Locus Coeruleus (LC).

Hay que señalar que la degeneración del LC no se restringe a las enfermedades anteriores, ya que otras enfermedades neurológicas, como la parálisis supranuclear progresiva (Ferrer, 2008) o la demencia por cuerpos de Lewy (Forno, 1969) presentan afectación del LC.

Se desconoce cómo los cambios en el LC provocan el TE, aunque se especula que podría existir una disminución en la estimulación de las células de Purkinje cerebelosas que sinaptan con las neuronas del LC (Sievers y cols., 1981).

1.3. Deterioro cognitivo leve

El DCL, se considera un estado transicional entre las alteraciones cognitivas propias del envejecimiento fisiológico y la demencia (Petersen y cols., 2001; Morris y cols., 2001). Se manifiesta clínicamente como alteración de la memoria, manteniendo las habilidades cognitivas y funcionales (Petersen y cols., 2001; Morris y cols., 2001). Recientemente, se han actualizado los criterios diagnósticos del DCL, la demencia y la EA por el Instituto Nacional de envejecimiento y la Asociación de Alzheimer (Albert y cols., 2011; McKhann y cols., 2011). Según éstos, el DCL se caracteriza por la presencia de déficits en funciones cognitivas superiores, manteniendo los pacientes la independencia, y la preocupación por la familia o por el propio paciente. Estos déficits deben ocurrir en ausencia de otros desórdenes que causan signos y síntomas parecidos. La principal diferencia entre el DCL y la demencia es la disfunción en las actividades de la vida diaria en los enfermos con demencia (Albert y cols., 2011; Mora-Simón y cols., 2012). A día de hoy, no se puede diferenciar el deterioro cognitivo patológico de los cambios propios del envejecimiento cerebral. Los pacientes con DCL cumplen algunos de los criterios de demencia, y sería conveniente definir puntos de corte en las distintas escalas que miden ambos procesos, para delimitarlos en los casos en que se produce un *continuum* DCL a EA.

Debido a que algunos de estos pacientes, y no sabemos cuáles, evolucionan a EA, resultaría interesante disponer de técnicas sensibles que nos permitan identificar a estos pacientes para someterlos a intervenciones tempranas, farmacológicas o no, que puedan retrasar o detener esta evolución (Sherwin, 2000; Morris y cols., 2001). Los porcentajes de progresión a EA en estos sujetos, varían dependiendo de la definición del deterioro y del tiempo de seguimiento (Hogan y Ebly, 2000; Bowen y cols., 1997; Modrego y cols., 2004). Bozoki y cols., 2001 afirman que la asociación de otros déficits cognitivos al deterioro de la memoria en el DCL

aumenta el riesgo de evolución a demencia. Otros autores consideran que la asociación de distintos marcadores clínicos, como la edad avanzada, puntuaciones bajas en algunos test de memoria, o los déficits de orientación aumentan el riesgo de desarrollar demencia en pacientes con DCL (Wolf y cols., 1998; Marquis y cols., 2002).

Cada día los pacientes solicitan una valoración y un diagnóstico en fases más tempranas, que unido a la evidencia de que el tratamiento debe iniciarse lo más tempranamente posible, hace necesaria la búsqueda de marcadores diagnósticos precoces.

1.4. Enfermedad de Alzheimer

La EA se caracteriza, en su forma típica, por la pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales, acompañada de trastornos en el comportamiento como es la agresión, depresión y el comportamiento errante (Costa y cols., 1996; Francis y cols., 1999; Williams y cols., 2003).

La EA muestra una disminución del peso y volumen del cerebro, con surcos agrandados y circunvoluciones estrechas. La corteza cerebral está adelgazada y los ventrículos ligeramente agrandados (atrofia cerebral). Los hallazgos histopatológicos característicos de la EA son: pérdida de neuronas de la corteza cerebral, placas seniles o neuríticas, y ovillos neurofibrilares. Las regiones anatómicas más vulnerables a mostrar estos cambios neuropatológicos son: hipocampo circunvoluciones parahipocámpicas, núcleo basal de Meynert, SN, LC, sustancia gris periacueductal y núcleos del rafe (Braak y Braak, 1991). Secundariamente, se produce una pérdida global de las conexiones sinápticas, particularmente las de tipo colinérgico. Estas alteraciones han sido estudiadas ampliamente en modelos animales, donde se ha observado degeneración de neuronas colinérgicas, noradrenérgicas, serotoninérgicas, gabaérgicas y glutamatérgicas en distintas áreas cerebrales relacionadas con la memoria, como el hipocampo, el córtex de asociación y el sistema límbico (Manzano y cols., 2009).

La EA es la forma más común de demencia progresiva, que afecta al 5-10% de la población mayor de 65 años (Knopman y cols., 2001), con una prevalencia que se incrementa de forma exponencial con la edad. Además de la edad como factor de susceptibilidad, se considera un factor de riesgo definitivo en el desarrollo de la enfermedad una historia familiar de demencia (Jorm y Jolley, 1998). Su diagnóstico diferencial es importante para distinguirla de otras

enfermedades que cursan con deterioro cognitivo y con procesos neurodegenerativos con demencias sintomáticas. El diagnóstico de la EA *postmortem* se puede realizar utilizando un sistema denominado ABC, donde A es la presencia de placas amiloides (Thal y cols., 2002; De-Paula y cols., 2012), B es la presencia de placas neurofibrilares (Braak y Braak, 1991) y, por último. C es la presencia de placas neuríticas (Mirra y cols., 1991; De-Paula y cols., 2012).

La falta de definición de los mecanismos de acción por los que surgen las características neuropatológicas de la EA puede ser la razón probable para la no disponibilidad de un tratamiento eficaz que pueda evitar el inicio y la progresión de la enfermedad. Es por esto por lo que debemos buscar biomarcadores que reflejen cambios neurofisiológicos en etapas pre-sintomáticas, para poder tener tratamientos diana a estos mecanismos fisiológicos que causan la enfermedad.

2. Alteraciones cognitivas en las enfermedades neurodegenerativas

Las alteraciones cognitivas se inician con alteraciones en la función ejecutiva y la memoria, terminando muchas veces en demencias, por lo que es importante detectar el deterioro cognitivo en una etapa temprana para frenar su avance en lo posible (Aarsland y cols., 2010; Janvin y cols., 2006; Siepel y cols., 2014).

Las demencias se definen como un deterioro global y persistente de las funciones intelectuales, memoria, orientación, razonamiento, comprensión, que son adquiridas con preservación del estado de vigilancia (conciencia), a causa de una lesión orgánica cerebral. Éstas son dependientes de procesos de envejecimiento, cuentan con una prevalencia entre el 5 y el 15% en personas mayores de 65 años y aumentan exponencialmente con la edad, constituyendo el paradigma de enfermedades neurodegenerativas (Launer y cols., 1999). El DSM-IV (Asociación Americana de Psiquiatría 1994) ha establecido los siguientes criterios para diagnosticar una demencia: (1) deterioro de la memoria; (2) al menos uno de los siguientes: afasia, apraxia, agnosia o disfunción en las funciones ejecutivas; (3) deterioro social o en las funciones ocupacionales. Estos déficits deben ocurrir en ausencia de otros desórdenes que causen signos y síntomas parecidos. La demencia generalmente origina una evidente repercusión en las actividades de la vida diaria (personales, familiares, laborales).

El deterioro de la memoria, especialmente alteraciones de memoria episódica verbal, ha sido descrito como uno de los predictores de conversión a demencia más sensibles (Hornberger y

Piguet, 2012). En el TE, los déficits cognitivos se manifiestan como deterioro de la fluidez verbal, en la identificación de nombres, en el recuerdo de la historia reciente, en la memoria de trabajo y en las funciones ejecutivas (Lombardi y cols., 2001; Duane y Vermillion, 2002; Lacritz y col., 2002; Sinoff y Badarny, 2014).

Los déficits dopaminérgicos frontoestriatales parecen originar una disfunción ejecutiva, tal y como describen diferentes autores que relacionan el transportador de dopamina (DAT) y la cognición (Muller y cols., 2000; Duchesne y cols., 2002; Nobili y cols., 2010; Polito y cols., 2012; Ekman y cols., 2012).

La EP se asocia también con déficits de aprendizaje y memoria, que implican a los GB y a los niveles dopaminérgicos cerebrales (Saint-Cyr y cols., 1988; Owen y cols., 1993; Knowlton y cols., 1996; Shohamy y cols., 2005).

La memoria y la disfunción visuoespacial parecen estar más relacionadas con los déficits colinérgicos (Kehagia y cols., 2010; Siepel y cols., 2014). Esto viene avalado por el hecho observado en los pacientes con EA, con déficits colinérgicos constatados, quienes presentan una mayor incidencia de alteraciones en la memoria visuoespacial, memoria verbal y de la atención, en comparación con los individuos sanos de su misma edad (Benito-León y cols., 2006).

3. Modificaciones del habla en pacientes con enfermedades neurodegenerativas

Las medidas acústicas de la voz humana reflejan las tres dimensiones perceptibles del sonido: amplitud, tono y estructura temporal. La **amplitud** (intensidad) es una medida de la presión sonora al transmitirse la voz en el medio aéreo; expresada en decibelios (dB), que depende de la amplitud de la vibración de las cuerdas vocales y de la presión subglótica; el **tono** se expresa mediante la frecuencia fundamental (F0), de la señal vocal, medida en hertzios (Hz); y los parámetros temporales definidos por la **tasa y rapidez de la vocalización**. Las alteraciones del sistema fonatorio afectan el ritmo vibratorio de las cuerdas vocales, lo que origina cambios en la frecuencia fundamental (F0), que es el principal parámetro del análisis acústico.

Existen hallazgos claros de asociación entre anomalías de la voz en pacientes con enfermedades neurológicas, que se manifiestan por cambios en la fluidez verbal (Flowers y

cols., 1995), ritmo (Skodda y Schlegel, 2008), empobrecimiento de la articulación de los sonidos (Ackermann y Ziegler, 1991), repetición de sílabas, palabras o frases (Benke y cols., 2000). Estas alteraciones tienen similitud con las que se producen en los estados depresivos, no en vano estos pacientes los sufren frecuentemente (Cummings y Masterman, 1999), y se solapan con los cambios que, de forma natural, se producen en el anciano como consecuencia de los cambios fisiológicos producidos en su sistema fonatorio: modificaciones de la laringe, alteraciones en el sistema respiratorio, en las cavidades de resonancia y en los órganos articulatorios, consecuentes al deterioro en los músculos, cartílagos, articulaciones, ligamentos y mucosa laríngea (Fernández y cols., 2006; Linville, 2004).

Cuando las enfermedades neurodegenerativas cursan con alteraciones motoras (como EP y TE), éstas afectan igualmente a las estructuras fonatorias, lo que hace que varíen las características del habla del paciente, reflejando los cambios anatómo-fisiológicos subyacentes.

El desorden fonatorio más característico en los pacientes con EP es la *disartria hipoquinética*, encontrada en más del 60%, de los casos, provocada por la rigidez muscular de la laringe, y la alteración del ritmo vibratorio de las cuerdas vocales. Estas alteraciones se traducen en cambios en los parámetros perceptuales y acústicos de la voz. La voz de los pacientes de EP se describe como monótona, de baja intensidad y tono, nasal, ronca y de carácter áspero (Flowers y cols., 1995). La articulación de los sonidos está empobrecida (Luschei y cols., 1999), con repetición de sílabas, palabras o frases, que reducen significativamente su inteligibilidad (Metter y Hanson, 1986). Estas deficiencias en el habla, que afectan a la comunicación de estos pacientes, se evalúan mediante el empleo de tareas de producción diadococinéticas, orales valorando la rapidez con que se realizan los movimientos articulatorios (Penner y Miller, 2007).

En contraste, los pacientes que cursan con enfermedades neurodegenerativas de tipo cognitivo presentan trastornos en la elaboración de las frases. En pacientes con EA se observan con frecuencia alteraciones en los dominios léxico-semánticos y pragmáticos del lenguaje (Hodges y cols., 1992), mientras que los aspectos articulatorios, fonológicos y aspectos sintácticos de la producción del lenguaje se mantienen bien conservados hasta etapas más avanzadas de la enfermedad (Caramelli y cols., 1998). En estadios tempranos, las

características de la voz más prominentes en pacientes con EA son las relacionados con la prosodia y las medidas acústicas y temporales, que incluyen las alteraciones en ritmo (ritmo reducido o fluctuante en la producción del lenguaje, frecuentes pausas para encontrar palabras, la de iniciativa, y la lentitud), el volumen, los errores fonológicos, y apraxias articulatorias (Taler y cols., 2008). En resumen, si los impedimentos en el habla en personas con EA difieren cualitativamente de los cambios causados en la voz por el envejecimiento normal u otras patologías, tales deterioros pueden ser aislados para el diagnóstico precoz de la EA (Venneri y cols., 2005).

4. Polimorfismos genéticos asociados a enfermedades neurodegenerativas

Aunque más del 99% de la secuencia de ADN genómico es idéntica entre los humanos, ligeras variaciones, a menudo, pueden producir un efecto importante sobre el fenotipo. Variantes de la secuencia también pueden mediar en la susceptibilidad a padecer algunas enfermedades, a los factores ambientales, bacterias, virus, toxinas, productos químicos, fármacos, y a las intervenciones terapéuticas (Schleinitz y cols., 2011).

En el hombre, la forma más frecuente de variación genética es la variación de una sola base en la secuencia de un gen. Esta alteración se conoce como polimorfismo de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) (Cargill y cols., 1999; Tindall y cols., 2007; Schleinitz y cols., 2011). Según el Consorcio Internacional de HapMap (catálogo de variaciones genéticas comunes que están presentes en la especie humana) (2003), los SNPs ocurren con una frecuencia del 1% y pueden ocurrir en cualquiera de las dos copias del genoma. Aunque la mayoría de estos SNPs no causan ningún efecto en el genoma, algunos pueden afectar la función de los genes/proteínas y por lo tanto dar lugar a diferencias fenotípicas entre los portadores de alelos diferentes.

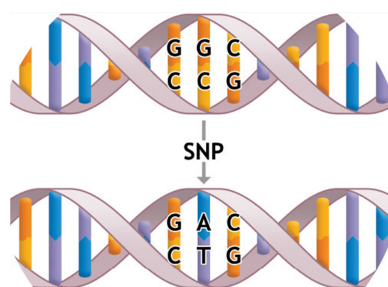


Figura 2. SNP. La cadena de ADN -1- difiere de la del ADN -2- en un sólo par de bases.

Su importancia se basa en que pueden estar asociados a otros SNPs responsables de enfermedades o asociados a un mayor riesgo de sufrir alguna anomalía en la salud. Por estas razones, los SNPs son potencialmente valiosos tanto para ayudar a la investigación biomédica, al desarrollo de productos farmacéuticos o contribuir a diagnósticos médicos.

Para la detección de los SNPs, se realizan diferentes técnicas de secuenciación del ADN, restringidas a un gen específico o de todo el genoma completo. La secuenciación masiva, aunque se ha abaratado últimamente, sigue siendo inasumible para la mayoría de los laboratorios, por lo que se han buscado otras estrategias para identificar los SNPs, como los ensayos TaqMan® basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que proporciona una manera más fácil y económica de estudiar miles de genotipos. Así, el genotipado de SNPs utilizando ensayos TaqMan® (Applied Biosystems; Foster City, CA) es una herramienta para discriminar entre dos alelos de un SNP específico en los estudios de genotipado.

La etiología de muchas de las enfermedades neurodegenerativas no está bien definida, por lo que muchos investigadores se inclinan por un origen multifactorial, combinación de predisposición genética y factores ambientales (Jenner y cols., 1992). Se han descrito polimorfismos asociados a la EP (Ben-David y Tu, 2014), EA (Chouraki y cols., 2014), y al TE (García-Martín y cols., 2009), pero vamos a restringirnos a los que han sido asociados a modificaciones del filtrado sensorial.

Se han descrito mutaciones genéticas asociadas a déficits en la filtrado sensorial en pacientes con esquizofrenia y con EA, entre otras patologías (Zhang y cols., 2011). Algunas de estas mutaciones descritas afectan al gen que codifica la Neuroregulina-1 (*NRG-1*) (Hong y cols., 2007), a genes relacionados con receptores de la dopamina (Wong y cols., 2000) y al gen que codifica la catecol-O-metiltransferasa (*COMT*) (Giakoumaki y cols., 2008), entre otros.

4.1. Neuregulina 1 (*NRG-1*)

Neuregulina-1 es una de las cuatro proteínas de la familia neuregulina identificadas en vertebrados (Diez y cols., 2014), que actúan sobre la familia de los receptores EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). Es esencial para el desarrollo normal del sistema nervioso y el corazón, y está codificada por el gen *NRG-1*. La normofuncionalidad de

este gen es uno de los criterios diagnósticos en la esquizofrenia (Stefansson y cols., 2002; Diez y cols., 2014), ya que en 2002, se descubrió un SNP de este gen que representa un factor de riesgo para la enfermedad. Estudios realizados por Hong y cols., 2007 encuentran que el polimorfismo rs3924999 modula el filtrado sensorial en sujetos sanos, y en pacientes con esquizofrenia. Se considera pues este polimorfismo como un marcador importante en la regulación sensorial.

4.2. Receptores de Dopamina

La dopamina, uno de los neurotransmisores principales del SNC, es una catecolamina endógena que influye sobre varias actividades celulares (Cavallotti y cols., 2004). El sistema dopaminérgico está implicado en el control motor, la función endocrina, el sistema de recompensa y la cognición (Tomé y cols., 2004). Los receptores de la dopamina están ampliamente expresados en neuronas y en ciertas poblaciones de células no neuronales (Tomé y cols., 2004). Hay cinco subtipos de receptores de dopamina, y entre éstos, los receptores D2 (McGuire y cols., 2011; Dai y cols., 2014) y los D3 (Lee y cols., 2009; Kiyohara y cols., 2011; Dai y cols., 2014), son los más estudiados, ya que alteraciones en los genes que los codifican se asocian con enfermedades neurodegenerativas.

Estudios psicofarmacológicos, llevados a cabo tanto en animales de experimentación como en humanos, han correlacionado el sistema dopaminérgico con la modulación de la PPI, describiendo la importancia de receptores D2 (Anokhin y cols., 2003) y D3r (Roussos y cols., 2008) en este proceso. Se ha demostrado el receptor D3 funcional está directamente relacionado con la modulación del filtrado sensorial en el hombre (Roussos y cols., 2008). De los diferentes SNPs conocidos del gen *Drd3*, el Ser9Gly(rs6280) presenta una mayor afinidad dopaminérgica (Quednow y cols., 2009) que el Ser-9Ser-9 (Roussos y cols., 2008). Aún así, no se puede decir categóricamente que el filtrado sensorial sea dependiente del receptor dopaminérgico, ya que los receptores constituyen sólo un componente del sistema del neurotransmisor, en el que influyen las conexiones, la señalización, y la plasticidad (Wong y cols., 2000).

4.3 (Catecol-O-metiltransferasa) (COMT)

El gen *COMT*, localizado en el cromosoma 22, codifica la enzima **Catecol-O-metiltransferasa** (COMT), enzima ligada a la degradación dopaminérgica, especialmente en

la corteza prefrontal de mamíferos (Gennatas y cols., 2012). Su actividad está asociada a los niveles de cognición, conducta (Swerdlow y cols., 2013), y a mecanismos de aprendizaje y memoria (Gennatas y cols., 2012).

El polimorfismo rs4680, en el que se intercambia la G por A en la posición 158 de la región codificante del *COMT*, o polimorfismo Val158Met, hace que la sustitución de un aminoácido en la proteína correspondiente produzca una disminución en la actividad de la enzima (Martínez y cols., 2009), lo que provoca que la dopamina se transforme en neuromelanina, que puede inducir la formación de radicales citosólicos que contribuyen a la neurodegeneración (Torkaman-Boutorabi y cols., 2012). También, se ha descrito que esta modificación en la enzima provoca un aumento de la concentración de dopamina en la corteza prefrontal (Vallelunga y cols., 2012), relacionando este hecho con la disminución en las funciones cognitivas en los pacientes con DCL y EA (Harrison y cols., 2008; Talledo y cols., 2009; Quednow y cols., 2009).

Autores como Roussos y cols. (2008), y Quednow y cols. (2009), han descrito la influencia de este polimorfismo en la PPI tanto en pacientes con esquizofrenia como en individuos sanos. Estos autores atribuyen el fenotipo Met de la enzima a déficits en la PPI.

5. Estado de alerta: Reflejo auditivo de sobresalto y sus modificaciones

La atención es un proceso heterogéneo que acompaña las funciones ejecutivas, la atención selectiva, la alerta y la vigilancia (Parasuraman, 1998). La alerta y la vigilancia son facetas del comportamiento y la cognición que, en sí mismas, no implican ninguna selección previa de priorización de los estímulos (Thiel y Fink, 2007), por lo que se denominan “atención no selectiva”, e integra conceptos como estado de alerta y vigilancia (Thiel y Fink, 2007).

El reflejo auditivo de sobresalto (RAS) es una reacción de alarma generalizada desencadenada por un estímulo auditivo intenso e inesperado (Brown, 1998). Este reflejo es un ejemplo de fenómeno atencional no-selectivo (Bakker y cols., 2006), que, como la mayoría de los reflejos del cerebro medio, se encuentra alterado en muchas enfermedades neurológicas.

5.1. Modulaciones del reflejo de sobresalto.

El RAS puede ser modificado cuantitativa o cualitativamente por diversas condiciones

naturales o experimentales, lo que refleja la capacidad del organismo para ajustar su respuesta a unas determinadas circunstancias internas (Castellano y López, 2004) o externas. En el contexto experimental, puede verse alterado por procesos básicos de aprendizaje o intervenciones farmacológicas, así como por diferentes patologías neurológicas o psiquiátricas. Las modulaciones del RAS representan un modelo no invasivo que sirve para evaluar el procesamiento de la información y déficits emocionales, tanto en humanos como en modelos experimentales (Kumari y Sharma, 2000; Kumari y cols., 2003).

Una modulación del RAS es la **potenciación**, la cual consiste en una respuesta aumentada del reflejo producida al asociar un estímulo no grato al estímulo desencadenante del reflejo, y puede ser considerada como una respuesta condicionada (McAllister y McAllister, 1971). Sun y cols., (2012) observaron potenciación en el RAS en ratas previamente expuestas a sonidos, mientras que Dehmel y cols., (2012) encontraron una potenciación crónica del RAS en cobayas expuestas a ruidos (Salloum y cols., 2014). Los resultados de estos experimentos demuestran cómo la sobreexposición a un estímulo sonoro produce una respuesta aversiva al estímulo, que incide en el circuito del RAS obteniendo una respuesta exagerada por la activación de otros núcleos .

La **sensibilización** es un tipo de modulación del RAS en el cual se asocian estímulos sensoriales a estímulos aversivos o “shock” (Brown, 1995), de forma que este último estimula otros sistemas sensoriomotores, lo cual facilita la respuesta refleja, traduciéndose en un aumento de la amplitud. La sensibilización ha sido considerada como una forma no asociativa de aprendizaje, ya que el organismo no asocia un evento particular con el fuerte estímulo aversivo o sensibilizante. Sin embargo, puede haber elementos asociativos en esta forma de aprendizaje, tales como un condicionamiento rápido a los estímulos aversivos (Pilz, 1996).

Una de las modificaciones más conocidas del RAS es su **inhibición por un estímulo previo**, (PPI de sus siglas en inglés pre-pulse-inhibition). La PPI se produce cuando el sonido intenso que nos sobresalta va precedido 30-500 ms por un ruido de una menor intensidad (Figura 3), haciendo que nuestra respuesta al ruido sea menos pronunciada (Hoffman y Ison, 1980). La PPI tiene una máxima inhibición cuando el intervalo prepulso-pulso es de 120ms aproximadamente (Braff y cols., 2001). La PPI refleja un mecanismo protector ya que analiza la información recibida por el prepulso evitando así la interferencia de otros estímulos, lo que

evita la sobrecarga de estímulos y la fragmentación cognitiva (Swerdlow y cols., 2001). Es uno de los métodos más usados para evaluar la capacidad del cerebro de filtrar información irrelevante, por lo que se considera la PPI como un parámetro de filtrado sensorial que se produce tanto en animales como en humanos (Graham, 1975; Braff y cols., 1978; Hoffman y Ison, 1980, Valls-Solé, 1998).

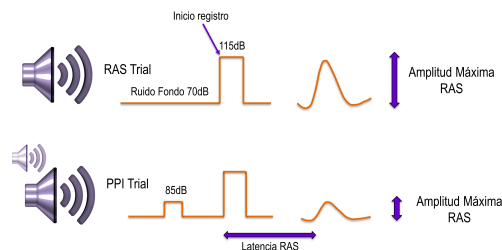


Figura 3. Ejemplo de ensayo de medición de RAS y PPI

La PPI no presenta habituación (Wu y cols., 1984), sin embargo ésta puede observarse si los pre-estímulos tienen una intensidad cercana al umbral de detección (Gewirtz y Davis, 1995). Por tanto, este proceso de inhibición no puede ser de ninguna forma un estímulo condicionado y tampoco presenta extinción. Al igual que se utilizan diferentes paradigmas para modular el RAS, en la PPI se utilizan cuatro paradigmas principales para su manipulación como el nivel de ruido de fondo, duración del prepulso, frecuencia del prepulso y tiempo entre prepulso y estímulo de sobresalto (Hsieh y cols., 2006).

Cuando los intervalos de prepulso-pulso son mayores de 500 ms, el fenómeno se conoce como **facilitación prepulso** (PPF de sus siglas en inglés pre-pulse-facilitation) (Graham y Murray, 1977) y refleja la mejora de la capacidad sensorial y la atención selectiva (Anthony y Graham, 1985; Kumari y cols., 2004).

5.2. Sustrato neuroanatómico

Circuito del Reflejo de Sobresalto

El RAS tiene una corta latencia de respuesta, por lo que se cree está mediado por un circuito sencillo. Únicamente se ha descrito en la rata (Lee y cols., 1996), y está formado por las neuronas de la raíz coclear (CRNs) (primeras neuronas troncoencefálicas en recibir

proyecciones de las neuronas del ganglio espiral), (Harrison y cols., 1962; Merchán y cols., 1988; Osen y cols., 1991; López y cols., 1993, 1999; Gómez-Nieto y cols., 2014), el núcleo reticular pontino caudal (Pnc) (López y cols., 1999; Nodal y López, 2003), motoneuronas espinales, nervios periféricos y músculos (Lee y cols., 1996). Las neuronas del PnC proyectan a las neuronas motoras faciales y espinales que activan rápidamente las contracciones musculares (Lingenhöhl y Friauf, 1994; Lee y cols., 1996; Yeomans y Frankland, 1996; Koch y Schnitzler, 1997; Nodal y López, 2003; Gómez-Nieto y cols., 2014).

En el humano, se han encontrado algunas neuronas en el PnC que proyectan a la medula espinal y a núcleos motores craneales (Martin y cols., 1990; Koch, 1999), aunque a diferencia de las ratas, el sustrato anatómico que corresponde a las estructuras cerebrales que median y modulan el RAS no está definido. En cualquier caso, el patrón de respuesta muscular es consistente con un origen troncoencefálico (Brown, 1998; Valls-Solé, 2004), ya que el reflejo persiste en niños anencefálicos (Edinger y Fisher, 1913).

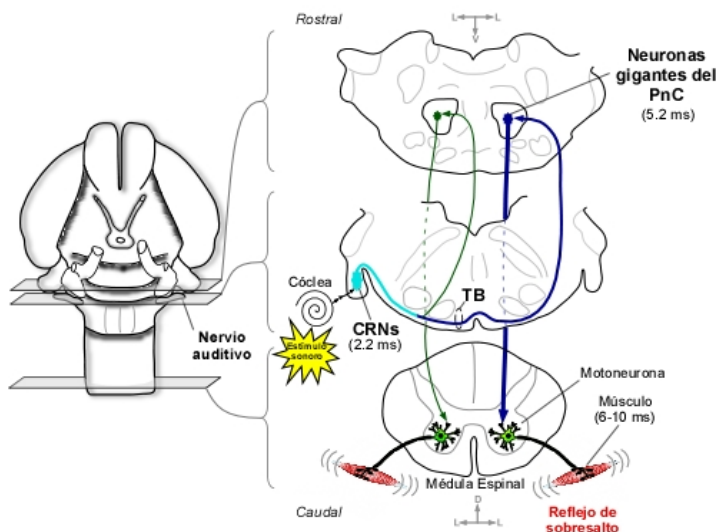


Figura 4. Representación del circuito de sobresalto en la rata. Figura modificada de Gómez-Nieto y cols., 2014.

El sustrato anatómico de las diferentes modulaciones del reflejo es más complejo, y desconocido en muchos casos. Se ha descrito que los procesos de facilitación del reflejo estarían mediados por las proyecciones de la corteza auditiva al colículo inferior (CI) (Andersen y cols., 1980a; Andersen y cols., 1980b; Liegeois-Chauvel y cols., en 1989; Brown, 1998). Otra área de influencia sería la corteza motora, que ejercería una modulación

inhibitoria sobre la RS, ya que pacientes hemipléjicos con lesiones vasculares que afectan a esta zona muestran una RS exagerada ipsilateral a la lesión (Voordecker y cols., 1997; Brown, 1998).

Por otro lado, el incremento de la RS asociada al miedo y la ansiedad (Butler y cols., 1990; Brown, 1998) podría tener su sustrato en las conexiones existentes entre el núcleo central de la amígdala con la formación reticular pontina (Koch and Ebert, 1993; Rosen y cols., 1991; Brown, 1998). Esta hipótesis viene avalada por la falta de regulación emocional de la RS observada en pacientes que presentan una lesión unilateral de la amígdala (Angrilli y cols., 1996; Brown, 1998). En la misma línea, la estimulación eléctrica de la amígdala en ratas provoca un incremento en la amplitud del RS (Koch y cols., 1993; Brown, 1998, Koch, 1999).

En relación a las estructuras nerviosas implicadas en la PPI, hay mucha controversia. Se acepta que esta inhibición se produce antes de la formación reticular troncoencefálica, o en el mismo PnC. Entre otros núcleos, hay evidencias que implican a la SN, ya que la lesión de este núcleo reduce la PPI en un 60% (Koch y cols., 2000). También formarían parte del circuito neural de la PPI diversos núcleos colinérgicos, que ejercerían una inhibición sobre el circuito del reflejo (Fendt y cols., 2001; Bosch and Schmid, 2008; Gómez-Nieto y cols., 2008), bien a través de la proyección del núcleo tegmental pedunculopontino (NTPP) sobre PnC (Koch y cols., 1993; Swerdlow y Greyer, 1993; Fendt y Koch, 1999) o a través de las neuronas colinérgicas del núcleo ventral del cuerpo trapezoide sobre el primer escalón del circuito de sobresalto (Gómez-Nieto y cols., 2008).

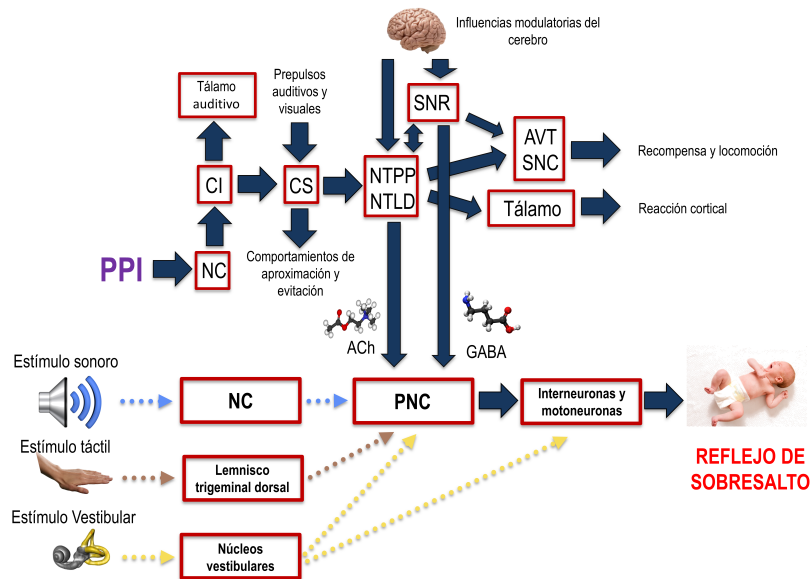


Figura 5. Bases neurales de la PPI. (modificado de Fend y cols., 2001). Abreviaturas: NC: núcleos cocleares; Núcleo reticular pontino caudal (PnC), Colículo Inferior (CI), Colículo Superior (CS), Núcleo Tegmental Pedúnculo Pontino (NTPP), Núcleo Tegmental Latero Dorsal (NTLD), Sistema Nervioso Reticular (SNR), Sistema Nervioso Central (SNC), Área Ventral Tegmental (AVT).

Entre los múltiples circuitos postulados como sustrato anatómico de la PPI, el más aceptado es el de Fendt y cols., 2001, sobre el que nuestro laboratorio, ha postulado algunas modificaciones (Gómez-Nieto y cols., 2014), al menos en lo que afecta al circuito descrito en animales de experimentación.

5.3. Evaluación del Reflejo auditivo de sobresalto como herramienta diagnóstica

El estudio del RAS, al igual que el de la PPI, ha sido exhaustivo en los últimos años ya que se puede emplear como una medida fisiológica cuantitativa, posee un fenotipo hereditario (Greenwood y cols., 2007, 2011, 2012; Swerdlow y cols., 2014), y está alterado en diversos trastornos neuropsiquiátricos, como la esquizofrenia (Braff y cols., 1978; Swerdlow y cols., 2008, 2014). Dentro de cada especie, las características de la PPI son muy similares en todos los individuos sanos, y por ello la medición de su latencia e intensidad se ha convertido en una prueba cada vez más usada para evaluar la capacidad del sistema nervioso para procesar la información (Graham, 1979; Hoffman y Ison, 1980; Valls-Solé, 1998; Swerdlow y cols., 2001).

Evidencias previas halladas en la literatura, sugieren que el estudio del RAS y la PPI puede ayudar a establecer un diagnóstico clínico diferencial de los pacientes con síndrome parkinsoniano (Vidailhet y cols., 1992; Valldeoriola y cols., 1998; Millian-Morell y cols., *en prensa*), o diferenciar el TE de la EP en estadios iniciales (Valls-Solé, 2000).

Algo parecido sucede con otras enfermedades neurodegenerativas no relacionadas con las anteriores, como la EA y el DCL. Aunque la PPI no es un proceso estrictamente cognitivo, sí hay una relación entre PPI y el procesamiento cognitivo, de forma que una alteración de la PPI, conlleva o predice alteraciones cognitivas (Geyer, 2006). Los estudios realizados para correlacionar la PPI y la cognición no han sido concluyentes, debido probablemente al uso de paradigmas “pasivos” de medición de la PPI. La PPI puede ser modulada por procesos atencionales que involucran activación frontal (Filion y Poje, 2003), y es durante las pruebas con instrucción sobre la atención, cuando se puede obtener una correlación entre PPI y pruebas cognitivas, posiblemente porque comparten un proceso atencional común (Scholes y Martin-Iverson, 2009). Además, la evaluación de la PPI puede emplearse como parámetro objetivo para evaluar la eficacia de la terapia empleada, así como para ver la acción de diversas manipulaciones experimentales, fisiológicas o conductuales (Geyer y cols., 2001).



(Igor Morski)

Hipótesis y Objetivos

2. Hipótesis:

Las lesiones anatomopatológicas de las enfermedades neurodegenerativas que directa o indirectamente afectan a los ganglios de la base y la corteza cerebral producen alteraciones funcionales de las sinapsis mediadas por diferentes neurotransmisores que de algún modo parecen estar implicadas en el RAS y sus modificaciones. Se pretende demostrar que las alteraciones del RAS y sus modificaciones pueden detectarse en estadios preclínicos de pacientes con procesos neurodegenerativos y mostrar particularidades en su registro que ayuden a diferenciar enfermedades que comparten similares trastornos motores (EP y TE) o cognitivos (DCL y EA). La evaluación del RAS y de su PPI, podría contribuir a la detección precoz y mejor clasificación de patologías con manifestaciones clínicas similares, lo que permitiría una intervención farmacológica temprana que pueda retrasar o detener la evolución de la patología, así como establecer diferentes patrones de respuesta y asociarlos a un determinado grado evolutivo de la enfermedad. Al realizar un seguimiento de los pacientes, comprobaremos si las pruebas utilizadas tienen algún valor predictivo de la evolución de estas enfermedades.

En la misma línea, el empleo de otros posibles biomarcadores, como polimorfismos de ADN asociados, podría colaborar en la identificación de los subgrupos, ayudando a mejorar el pronóstico por la individualización del tratamiento.

Finalmente, las modificaciones de los parámetros acústicos y perceptuales de la voz y el habla, podrían ser usados como complemento a las técnicas para valorar síntomas iniciales en distintas patologías neurodegenerativas.

3. Objetivos

Principal:

El objetivo principal es demostrar la existencia de una alteración del RAS/PPI en los estadios iniciales de ciertas enfermedades neurodegenerativas y validar esta prueba como una herramienta auxiliar para su diagnóstico precoz.

Específicos:

1. Determinar si el RAS y la PPI está alterado en pacientes con DCL, EA, EP y TE

respecto a un grupo control.

2. Valorar el grado de afectación motora y cognitiva en pacientes con enfermedades neurodegenerativas.
3. Analizar las modificaciones del habla en pacientes con EA y EP.
4. Determinar la prevalencia de diferentes polimorfismos genéticos en las enfermedades neurodegenerativas.
5. Establecer correlaciones entre los marcadores estudiados.



(Igor Morski)

Diseño Experimental

4. Diseño Experimental:

Hemos planteado el siguiente diseño experimental para lograr la consecución de los objetivos planteados.

Para determinar la integridad de los mecanismos involucrados en el control del estado de alerta, realizaremos el estudio del RAS y de sus modulaciones, determinando la respuesta en diferentes paradigmas experimentales.

Para evaluar la función cognitiva de los sujetos, al inicio del estudio, realizaremos una batería de pruebas neuropsicológicas a los participantes del estudio.

Realizaremos un análisis informático de las grabaciones de las lecturas de un texto popular realizadas por los diferentes sujetos participantes en la investigación para estudiar las modificaciones del habla.

Para determinar la prevalencia de diferentes polimorfismos de ADN en los procesos neurodegenerativos, analizaremos el ADN aislado de saliva de los pacientes, realizando posteriormente un genotipado para comparar pacientes y controles.

Para estudiar la evolución de los procesos neurodegenerativos, realizaremos la prueba del RAS/PPI a los 9 meses después de la primera evaluación, junto a pruebas que nos permitan medir la función motora (en su caso) y la función cognitiva de los pacientes, aplicando análisis estadísticos de medidas repetidas

Para correlacionar la prueba del reflejo auditivo de sobresalto con la evaluación cognitiva, motora y los polimorfismos de ADN, realizaremos correlaciones de Pearson bivariadas y un análisis estadístico multivariable, cuando sea aplicable.



(Igor Morski)

Material y Métodos

5. Material y Métodos:

5.1. Sujeto de Estudio

Los pacientes seleccionados para el estudio procedían de la consulta externa del Servicio de Neurología del Hospital Clínico de Salamanca. En todos los casos, se realizó la historia clínica y una exploración neurológica completa. Se excluyeron los pacientes con patología sistémica severa, con trastornos psiquiátricos, (excepto la depresión leve), hipoacusia y aquéllos que usaban drogas recreativas e ilícitas. Todos los experimentos realizados fueron aprobados por el Comité de Bioética del Hospital Universitario de Salamanca y se realizaron siguiendo las directrices de la Declaración de Helsinki del 1964, tras la firma del Consentimiento Informado por parte de los sujetos de estudio.

Los diferentes grupos estudiados fueron:

5.1a. Grupo de pacientes con Deterioro Cognitivo Leve (DCL)

Formado por 33 pacientes, con una media de edad $72,21 \pm 8,39$ (20 mujeres, con una media de edad $72,4 \pm 9,30$; 13 hombres, media de edad $71,92 \pm 7,1$), diagnosticados de DCL en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca según los criterios establecidos por Petersen y cols., 2001; y Grundman y cols., 2004; y la Sociedad Española de Neurología (GENCD-SEN, 2003).

5.1b. Grupo de pacientes con Enfermedad de Alzheimer (EA)

Formado por 21 pacientes, con una media de edad de $72,64 \pm 7,51$ (14 mujeres, de media de edad $71,33 \pm 7,41$; 7 hombres, de media de edad $75,43 \pm 7,45$), diagnosticados de EA según los criterios elaborados por el NINCDS-ADRDA (McKhann y cols., 1984; 2011) y los criterios de la sociedad española de Neurología (GENCD-SEN, 2003). Sólo se incluyeron pacientes en estadio inicial, con un test de Mini-Mental (MMSE) (Folstein y cols., 1975) menor de 23 puntos y que mantenían su autonomía en las actividades de la vida diaria.

5.1c. Grupo de pacientes con Enfermedad de Parkinson (EP)

Formado por 52 pacientes, con una media de edad de $68,58 \pm 9,54$ (24 mujeres, de media de edad de $69,08 \pm 10,03$; 28 hombres, de media de edad de $68,14 \pm 10,05$), diagnosticados de EP según los criterios del Banco de cerebros de Londres (Hughes y cols., 1992) y evaluados

clínicamente utilizando la escala de Hoehn y Yahr (Hoehn y Yahr, 1967), y la escala unificada para la evaluación de pacientes de EP (UPDRS por sus siglas en inglés) (Goetz y cols., 2008). Los pacientes incluidos en el síndrome parkinsoniano, presentaron bradicinesia y al menos uno de los siguientes signos: rigidez muscular, temblor de reposo de 4-6 Hz, o inestabilidad postural no causada por disfunción visual, vestibular, cerebelosa o propioceptiva.

5.1d. Grupo de pacientes con Temblor Esencial (TE)

Formado por 34 pacientes, con una media de edad de $63,46 \pm 12,56$ (17 mujeres, de media de edad de $63,59 \pm 8,25$; 17 hombres, de media de edad de $63,33 \pm 15,86$), diagnosticados con TE según los criterios establecidos en el Consenso sobre el temblor de la Sociedad de Trastornos del movimiento (Consensus statement of the Movement Disorder Society on Tremor. *Movement Disorders*, Deuschl y cols., 1998) y evaluados mediante la Escala de evaluación del temblor esencial (TETRAS, por sus siglas en inglés). Los pacientes incluidos en este Grupo mostraban un temblor postural bilateral visible y persistente en extremidades superiores, de más de 5 años de duración.

5.1e. Grupo de controles

Formado por 37 voluntarios sanos, con una edad media de $71,94 \pm 14,69$ (18 mujeres con una media de edad de $71,45 \pm 18,78$ y 17 hombres, con una media de edad de $72,56 \pm 10,12$).

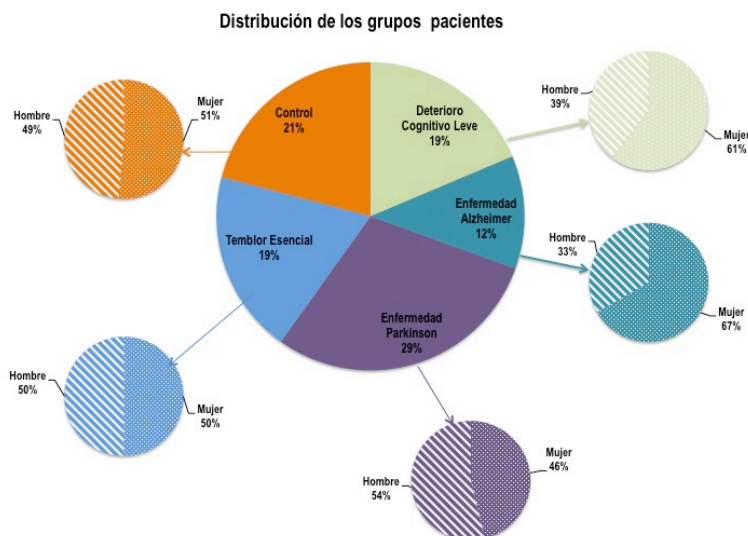


Figura 6. Espectro de la muestra empleada en el estudio, distribución de pacientes por patología y género.

5.2. Técnicas a emplear

5.2.1. Evaluación cognitiva y motora

5.2.1a. Evaluación cognitiva

La evaluación cognitiva se realizó mediante la aplicación de la batería de test neuropsicológicos siguientes:

-Mini-Mental State Examination [MMSE] de Folstein (Folstein y cols., 1975): Versión reducida del test, que consiste en una serie de preguntas que evalúan diferentes funciones cognitivas. El tiempo de realización es de 5 a 10 minutos. La puntuación máxima es de 30 puntos, indicando deterioro cognitivo una puntuación menor de 23. La prueba evalúa orientación temporo-espacial, memoria verbal inmediata, memoria de evocación, atención y cálculo, lenguaje y praxis constructiva.

- Wechsler Memory Scale (WMS III):

La “**prueba de memoria de Wechsler**” evalúa la atención y la memoria de trabajo auditiva y espacial, utilizando estímulos visuales y auditivos. Es un instrumento clínico, de aplicación individual, diseñado para medir aspectos importantes de la memoria y el aprendizaje en poblaciones adolescentes y adultas (Guinea-Hidalgo y cols., 2009). La prueba evalúa la orientación, memoria lógica, memoria verbal y visual (Brooks, 1976). El aprendizaje asociativo se evalúa mediante el aprendizaje de pares de palabras con distinto grado de dificultad. La memoria lógica se mide mediante la prueba de “**Números y Letras**”, en la cual el sujeto tiene que poner los distintos números y letras en orden cronológico. La memoria verbal se evalúa mediante el “**test de textos**” en el cual el examinado escucha dos historias diferentes que el examinador lee, e inmediatamente después de oír cada historia, se pregunta al examinado. El examinado es puntuado por la precisión de la retención que haya tenido de las historias y por su habilidad para recordar los temas de las historias.

-Test de Isaac

El test de Isaac (Isaacs y Akhtar, 1972) consiste en pedir al paciente que diga elementos de ítems específicos. Se le va indicando cada ítem y tiene que decir elementos adecuados para el ítem sin detenerse, hasta que se le indique. Se le da un minuto para cada ítem, pero si

consigue decir 10 elementos del mismo sin repetición, se pasa ya al siguiente ítem. Este test de fluencia verbal semántica, es útil en el caso de pacientes analfabetos, o con déficit sensoriales, y requiere muy poco tiempo para su realización. Se anotan todas las respuestas, y es útil conservar los resultados para el seguimiento evolutivo del paciente. Se considera que el resultado normal para adultos es de 29 ó más aciertos, y de 27 ó más si se trata de ancianos. Los errores se contabilizan (por su valor para el seguimiento evolutivo del paciente), pero no restan puntos al total. Este test tiene una sensibilidad del 79 %, y una especificidad del 82 %.

-Cuestionario de Actividades de la vida diaria de Pfeffer

El cuestionario Pfeffer (Pfeffer y cols., 1982) consiste en una escala que permite detectar casos leves de demencia a través de cuestiones que evalúan la capacidad para desarrollar actividades sociales complejas, las llamadas actividades instrumentales de la vida diaria. Cada ítem se puntúa del siguiente modo:

- 0:** Normal; o nunca lo hizo pero podría hacerlo solo/a.
- 1:** Con dificultad pero se maneja solo; o nunca lo hizo y si tuviera que hacerlo ahora tendría dificultad.
- 2:** Necesita ayuda (pero lo hace).
- 3:** Dependiente (no puede realizarlo).

Una puntuación total por debajo de 6 indica normalidad (no dependencia), una puntuación mayor de 6 indica alteración funcional.

-Escala de la Depresión Geriátrica (GDS por sus siglas en inglés, Yesavage et al., 1983)

Instrumento que permite detectar síntomas de depresión en ancianos y medir la evolución de esos síntomas. La prueba consta de 30 preguntas, en las que se pide al anciano que elija la contestación que más se aproxime a su estado de ánimo de las últimas semanas. La contestación es dicotómica (SI/NO), siendo la puntuación máxima 30 puntos. Dependiendo de la puntuación obtenida al aplicar esta prueba tenemos que:

- a.** Una puntuación de 0 a 10 debe ser considerada como normal.
- b.** 11 ó más, como un posible indicador de depresión.

Por tanto, se establece el punto de corte de 11 puntos, a partir de ahí, se definen dos

grados de depresión:

b1. 11 a 14 puntos (moderadamente deprimido).

b2. 15 a 39 puntos (severamente deprimido).

5.2.1b. Evaluación motora

Para los pacientes diagnosticados con EP y TE, se aplicaron test específicos para medir el grado de afectación motora. A los pacientes con alteraciones motoras como son los pacientes con EP se les aplicó el UPRDS para evaluar el grado de afección motora. A los pacientes con TE, quienes también presentan alteraciones motoras, se les evaluó utilizando el TETRAS para ver el grado de afección motora.

Evaluación motora a los Pacientes de Parkinson utilizando el UPRDS.

Se emplea la escala unificada para la evaluación de la Enfermedad de Parkinson UPRDS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale) (Goetz y cols., 2008) y para seguir el avance de la enfermedad. Consta de 4 subescalas, que evalúan estado mental, actividades de la vida diaria, examen motor y complicaciones del tratamiento, con puntuaciones de 16, 52, 68 y 23, respectivamente que suman un total de 159 puntos para la escala completa.

Evaluación motora a los pacientes de Temblor esencial

El TETRAS (The Essential Tremor Rating Assessment Scale) evalúa el impacto del temblor del paciente en las actividades de la vida diaria, mediante la realización de una serie de movimientos consecutivos (Deusch y cols., 1998).

La exploración comienza con la valoración del temblor en la cabeza, observando al paciente de frente y evidenciando la magnitud del mismo.

- El temblor de la mandíbula se valora observando al paciente de frente, con la boca cerrada, discretamente abierta, al sonreír y el temblor facial también se valora al cerrar los ojos. El temblor de la voz se analiza durante la emisión de sílaba sostenida (aaaaa o eeeee) y durante la lectura del protocolo establecido para el análisis de la voz.
- La valoración del temblor de miembros superiores se realiza con tres maniobras: brazos extendidos hacia el frente, brazos extendidos hacia los lados y la prueba dedo- nariz-dedo. – Esta última incluía 10 repeticiones con cada brazo, y el temblor de intención era calificado en

el período terminal de la prueba cuando el dedo del paciente toca el dedo del examinador; con una puntuación de 0 a 2: 0=no temblor de intención, 0,5=probable, 1=definitivo, 2=incapacitante.

- El temblor del miembro inferior se evalúa para cada extremidad inferior, con el paciente sentado en la silla y pidiéndole que extienda su rodilla y eleve la extremidad del suelo durante 5 segundos y luego se le pide que realice la maniobra de coordinación talón-cara anterior de la pierna, 5 veces con cada extremidad.
- La valoración del temblor durante la escritura se realiza con la ejecución de la copia de la espiral de Arquímedes, y la escritura de una frase determinada, las cuales se realizan con la mano dominante,
- Tarea de aproximación del punto. Se hace pidiéndole al paciente que sostenga con la mano dominante un lápiz y que lo acerque lo más posible a una hoja de papel como si quisiera hacer un punto, pero sin tocar la hoja.

5.3. Análisis del habla

El registro de los patrones temporales de voz se realizó utilizando la metodología de Meilán y cols., 2014 y Martínez-Sánchez y cols., 2015, para los pacientes con EA y EP respectivamente. La tarea de lectura, realizada bajo condiciones controladas, consistía en leer en un monitor con un tamaño de letra de 48 puntos para facilitar su lectura, la primera frase del libro «El Quijote» de Miguel de Cervantes. El párrafo está compuesto por 126 sílabas. Si bien no está equilibrado fonéticamente, se seleccionó por su familiaridad para todos los participantes. Las grabaciones las realizó el mismo examinador en una sala aislada del ruido, pero no aislada acústicamente, ubicando el micrófono a 8 cm y en un ángulo aproximado de 45° de la boca para evitar el ruido aerodinámico. La valoración de la velocidad de elocución implica la detección del núcleo silábico. La identificación de las sílabas y pausas se realizó automáticamente mediante el empleo del algoritmo desarrollado por De Jong y Wempe (De Jong y Wempe, 2009), que analiza los picos de intensidad precedidos y seguidos por caídas de intensidad de al menos 2 dB; este procedimiento se ha mostrado válido y fiable en estudios de fluidez verbal. Tras la identificación automática del núcleo silábico, se verificó cada uno de ellos empleando el sonograma y espectrograma de banda ancha y, en su caso, se procedió a su corrección. La identificación de pausas se realizó también de forma

automática, estableciendo como criterio de pausa los segmentos sin sonido ≥ 300 ms, así como también los segmentos ≥ 10 ms para identificar las micropausas, por ser este un criterio frecuentemente utilizado en estudios de fluidez verbal en la EP.

Los análisis se centraron en medidas acústicas comunes del habla, incluyendo aspectos temporales de la muestra de voz, el tono (F0), volumen (intensidad), y la calidad de voz. Para caracterizar los aspectos temporales de la muestra de voz, se calculó la duración de la muestra de voz utilizado (duración total del párrafo de Don Quijote, el tiempo de fonación, y la velocidad de lectura y la articulación), la interrupción del sonido (proporción y el número de pausas de la voz, el porcentaje de la grabación sin voz, y el número y el porcentaje de roturas de voz), y los períodos de voz (número de pulsos analizados como voz, y el número de períodos de voz). Para caracterizar el tono 0, frecuencia fundamental (F0), se analizó la frecuencia fundamental (media F0, los valores máximos y mínimos de F0, tono global y medidas de autocorrelación), y las fluctuaciones en la frecuencia del sonido [jitter (a corto plazo, ciclo a ciclo, la perturbación de la F0 de la voz): jitter locales, jitter local absoluta, promedio perturbación relativa al jitter, y el cociente 5 del jitter]. Para caracterizar las fluctuaciones en la amplitud del sonido, se calculó la intensidad (en dB) de las señales sonoras, y las medidas de estabilidad fonatoria [shimmer período de perturbación (a corto plazo, de ciclo a ciclo, perturbación en la amplitud de la voz) : shimmer locales, shimmer cociente perturbación de amplitud (apq por sus siglas en inglés amplitude perturbation quotient) 3, shimmer apq5 y shimmer apq11]. Por último, hemos calculado las medidas de calidad de la voz del hablante. Se calcularon dos medidas espectrales de ruido: la relación de ruidos armónicos y la relación ruido- el ruido de los armónicos.

5.4. Determinación de los polimorfismos genéticos

Para llevar a cabo este objetivo, empleamos ADN obtenido de los pacientes mediante la obtención de una muestra de saliva, sobre la que posteriormente determinamos los polimorfismos de ADN utilizando la técnica de PCRs. Realizamos los siguientes experimentos para cumplir este objetivo.

5.4.1. Recogida de la muestra de saliva y aislamiento del ADN

El análisis de ADN de los individuos se realizó a partir de muestras de saliva recogidas en el recipiente estéril del kit Nucliber, #1035210700. Posteriormente, se aísla el ADN, según la

metodología descrita en por el fabricante (Nucliber, #1035200200).

5.4.2. Genotipado del ADN

El genotipado de **polimorfismos de un único nucleótido (SNPs, single nucleotide polymorphism)**, utilizando ensayos TaqMan® (Applied Biosystems; Foster City, CA) es una herramienta empleada para discriminar entre dos alelos de un SNP específico en los estudios de análisis del contenido genómico. El método implica el uso de cebadores directo e inverso para amplificar la secuencia específica del polimorfismo de interés. Se utilizan dos sondas marcadas con diferentes colorantes en su extremo 5' para detectar el alelo de interés; una de las sondas está marcada con el cromógeno VIC®, y detecta la secuencia "Alelo 1", mientras que la otra está marcada con el colorante 6FAM™ (6'carboxifluoresceína), que detecta la secuencia "Alelo 2" (figura 7).

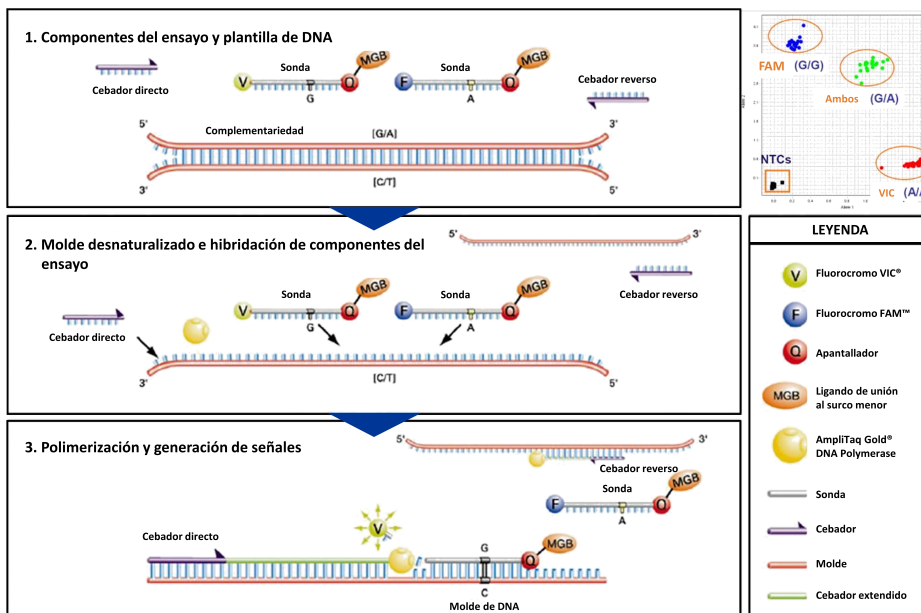


Figura 7. Principio de discriminación alélica utilizando TaqMan® SNP Genotyping Assays. (1) componentes del ensayo y la plantilla de ADN: Primers de forward y reverse para amplificar la secuencia polimórfica de interés. (2) Paso de desnaturalizado y los componentes del ensayo. (3) Generación de polimerización y señal: Taq polimerasa comienza a sintetizar una nueva cadena y se encuentra con la sonda de recodo. El 5' - colorante fluorescente unido de la sonda apropiada se separa (5' → 3' actividad exonucleasa de la Taq polimerasa). Señal de fluorescencia ya no se apaga y ahora se puede detectar con excitación por láser.

Hemos analizado los SNPs del gen que codifica la neuregulina 1 (*NRG1*), del gen que codifica la Catecol-O-metiltransferasa (*COMT*) y de genes que codifican receptores dopaminérgicos, D2 (*Drd2*) y D3 (*Drd3*).

Para el estudio de los polimorfismos, se realiza la obtención y secuenciación del ADN de los exones y regiones intrónicas adyacentes (50 nt. antes del inicio y después de la terminación del exón) de los genes seleccionados.

Después de extraer el ADN genómico a pacientes y sujetos controles, se realizó el genotipado de los polimorfismos a estudiar, utilizando sondas comerciales (Tabla 1).

Gen	Abreviatura	Polimorfismo	Sonda utilizada	Casa comercial
Catecol-O-metiltransferasa	<i>COMT</i>	rs4680	C_25746809_50	Applied Biosystems
Receptor D2 dopamina	<i>Drd2</i>	rs6277	C_11339240_10	Applied Biosystems
Receptor D2 dopamina	<i>Drd2</i>	rs1800497	C_7486676_10	Applied Biosystems
Receptor D3 dopamina	<i>Drd3</i>	rs6280	C_949770_10	Applied Biosystems
neuregulina 1	<i>NRG1</i>	rs3924999	C_359159_10	Applied Biosystems
neuregulina 1	<i>NRG1</i>	rs6994992	C_22019_10	Applied Biosystems

Tabla 1. Resumen de los polimorfismos de los genes estudiados.

El análisis de los polimorfismos fue realizado utilizando ensayos de discriminación alélica TaqMan 5' exonucleasa - (Applied Biosystems) que contienen la secuencia específica de cebadores de avance y retroceso para amplificar las secuencias polimórficas, y dos sondas marcadas con colorantes VIC® y FAM™ respectivamente, que detectan ambos alelos de cada polimorfismo (Schleinitz y cols., 2011). Las reacciones de polimeración en cadena (PCR) se llevaron a cabo utilizando sondas TaqMan (PCR Universal Master Mix; Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante en un Step-One Plus Real-time PCR system (Applied Biosystems). Para evaluar la reproductibilidad, se seleccionaron al azar un 5% de las muestras y se repitió el genotipado.

5.5. Medición del Reflejo Auditivo de Sobresalto y sus modificaciones

Equipo de medición del RAS y sus modificaciones

La medición de la respuesta de contracción muscular se realizó mediante un electromiógrafo especial SRLAB (SR-HLAB™, SanDiego Instruments, CA, USA), que permite registrar la respuesta de sobresalto en múltiples paradigmas experimentales. Éste va conectado a un ordenador, en el cual se archivan los datos para su posterior análisis.

El estímulo acústico se administra biauralmente a través de unos auriculares (SONY MRV-6) conectados al sistema comercial, y se registra la actividad del *orbicularis oculi* mediante electrodos de superficie, colocando el electrodo activo sobre el músculo y el referencial sobre la apófisis mastoides ipsilateral (figura 8). La actividad electromiográfica (EMG) se registró usando un filtro de paso alto de 30 Hz y un filtro de paso bajo a 1000 Hz y un filtro de red de 50 Hz.



Figura 8. Equipo de medición del RAS y colocación de los electrodos.

Procedimiento

La prueba se realiza con el individuo sentado cómodo, lo más relajado posible en una silla con los brazos apoyados. La sesión dura aproximadamente 30 minutos, y se inicia después de un período de aclimatación de 5 minutos, escuchando únicamente el ruido de fondo (ruido blanco de 70dB), que se mantiene a lo largo de la prueba. Los pulsos desencadenantes de RAS están formados por ráfagas de 40 ms de ruido blanco, con una intensidad de 115 dB. Cuando

se realiza la medición de la inhibición del reflejo de sobresalto por un prepulso auditivo, estos están formado por prepulsos de ruido blanco, de 20 ms de duración, con una intensidad de 85dB, que no desencadenan ninguna respuesta refleja por sí mismos. La sesión consta de 4 bloques con pulsos de 115 dB de presión sonora (SPL por sus siglas en inglés) únicamente y una mezcla de pulsos y prepulsos-pulsos. Los intervalos entre pulso y prepulso (ISI) fueron de 60, 120 y 1000 ms. Los trials con ISI de 1000 ms desencadenarán la facilitación del reflejo de sobresalto. Los bloques inicial y final están compuestos sólo de pulsos, para evaluar el reflejo de sobresalto y la habituación, respectivamente. Cada uno de los 2 bloques centrales contiene 9 pulsos solos, 9 prepulsos-pulsos con cada uno de los distintos ISI, y tres trials nulos sin estímulo auditivo, presentados en orden aleatorio, y separados por distintos intervalos intertrial (13–23s).

Análisis de datos

El análisis de datos se realizó *off-line*, revisando cada una de las respuestas de la sesión para eliminar aquéllas en las que el sujeto no responde, o en las que se registra una respuesta anormal que no es desencadenada por los estímulos, sino que es debida a un movimiento voluntario o ruido muscular (figura 9). Para este análisis, se utilizó el programa de análisis del sistema. Se analizó la respuesta en los primeros 200ms, determinando el punto donde se produce la amplitud máxima, calculándose el tiempo en milisegundos (ms) que tarda en alcanzarse esa respuesta para ver la latencia de respuesta.

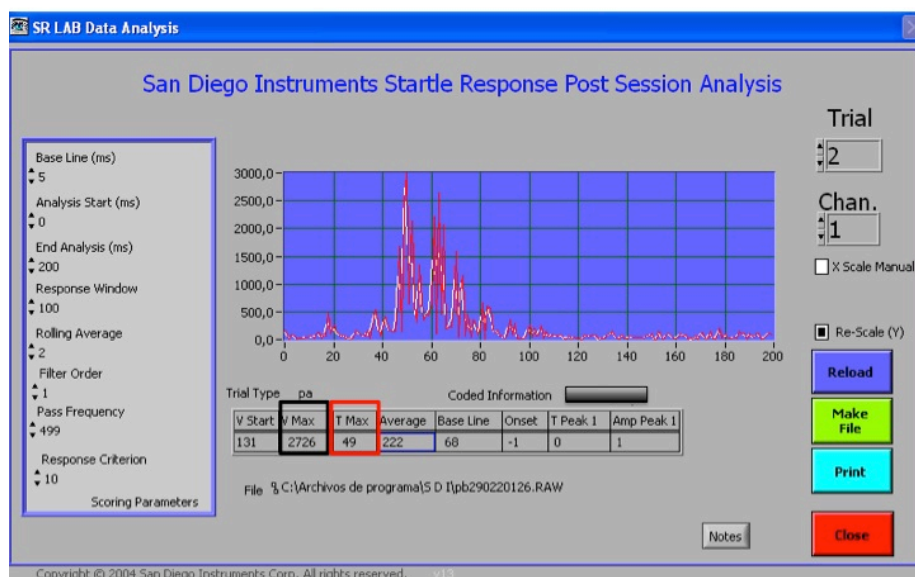


Figura 9. Registro electromiográfico de la respuesta muscular obtenida con el Programa SR-HLab

Tras el análisis de la sesión, se calcula la magnitud porcentual de la PPI y la PPF para cada intervalo de prepulso según la siguiente fórmula :

$$\%PPI = \frac{(\text{amplitud del RAS}) - (\text{amplitud del RAS en ensayos con estímulo previo})}{(\text{amplitud del RAS en ensayos sin estímulo previo})} \times 100$$

La habituación se calcula como la diferencia entre la media de la amplitud de respuesta cuando hay únicamente un pulso del primer bloque y la media de la amplitud respuesta en las mismas condiciones del bloque final.

5.6. Análisis Estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS (versión IBM 20.0 para Windows; SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). La descripción de los datos se efectuó mediante media \pm error estándar de la media (EEM), para variables continuas.

Los resultados fueron analizados por medio de la correlación de Pearson (y su correspondiente de modelo de regresión lineal) para conocer la relación o covarianza entre diferentes variables cuantitativas. Para las comparaciones entre dos grupos, se empleó la *t* de Student o la *U* de Mann Witney con el objeto de contrastar los valores medios en variables cuantitativas en los diferentes pares de grupos.

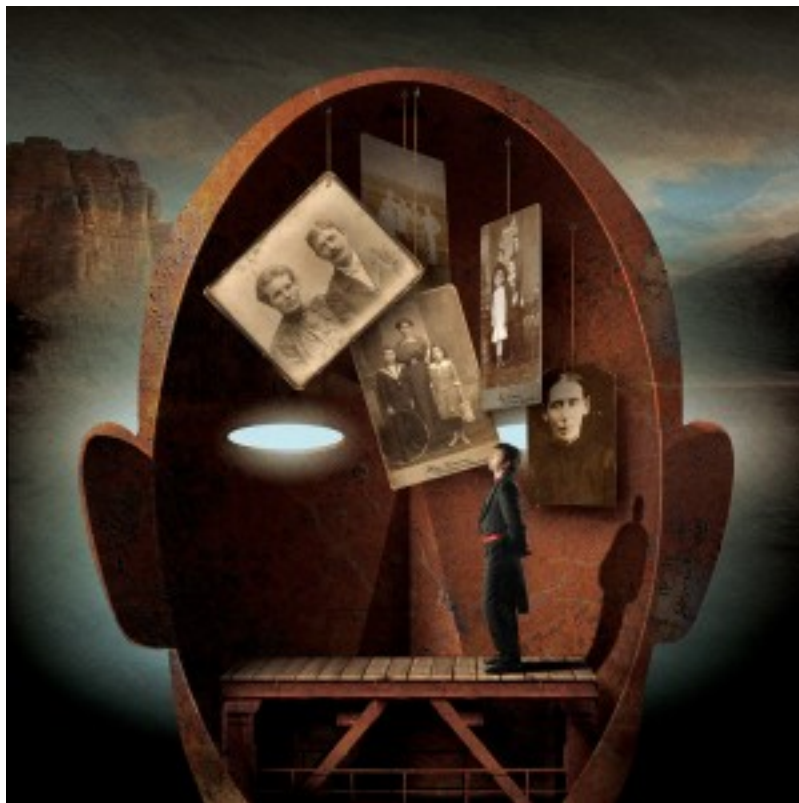
Cuando las comparaciones se realizaban entre más de dos grupos independientes como un solo factor, se empleó el Análisis de la Varianza (ANOVA) con los correspondientes contrastes a posteriori de Sheffe.

En los estudios longitudinales se empleó el ANOVA de medidas repetidas (Con comparaciones de Bonferroni) y, habiendo un factor intersujetos, se empleó en ANOVA mixto o Split-Plot (en este caso también con contrastes de Sheffe)

El nivel de significación estadística, en todos los casos, fue $p \leq 0,05$.

Los análisis de voz fueron realizados con el mismo paquete estadístico. Se empleó la prueba de comparación de medias de *t* de Student de muestras independientes para comparar ambos grupos y definir de esta manera el perfil diferencial en los aspectos prosódicos entre ambos grupos experimentales.

Los análisis de los polimorfismos se realizaron mediante la prueba de chi-cuadrado (X^2) o la exacta de Fisher cuando era apropiado. Los análisis de comparación múltiple se realizaron con pruebas de regresión logística. Para determinar si la presencia de una variable es factor de riesgo para un particular, y comparar la magnitud del riesgo que conlleva el presentar esa variable en una población, se calcula el porcentaje de aparición de (OR, de sus siglas en inglés odds ratio (OR) de cada genotipo. Las comparaciones de la magnitud del OR se define como $OR=1$ no presenta ningún riesgo, $OR>1$ presenta un una magnitud de asociación de riesgo mayor, $OR<1$ la magnitud de asociación con un riesgo es menor. Para estimar la precisión de la OR se utiliza el intervalo de confianza al 95% (IC). Un IC grande indica un bajo nivel de precisión de la OR, mientras que un IC pequeño indica una mayor precisión de la OR (Szumilas, 2010).



(Igor Morski)

Resultados

6.Resultados

6.1. Análisis de la Evaluación Cognitiva y motora

6.1.1. Evaluación Cognitiva

Hemos realizado una evaluación cognitiva de los pacientes utilizando diversos test que miden la independencia del paciente (**Escala funcional de Pfeffer**), el deterioro cognitivo (**cuestionario MMSE**), la depresión (**GDS**), la fluencia verbal semántica (**test de Isaac**), y la evaluación de la atención y la memoria de trabajo auditiva y espacial (**test de Wechsler III**).

6.1.1a. Evaluación funcional

En la **escala funcional de Pfeffer**, mide las actividades funcionales de los sujetos de manera inversa, siendo 0 las personas autónomas y 33 las más dependientes, encontramos que hay una diferencia significativa entre controles y EA ($p=0,001$) (figura 10A). También encontramos diferencias significativas entre los pacientes de EA y los de DCL ($p=0,006$), entre los pacientes de EA y los de EP ($p=0,00$) y entre los pacientes de TE y los pacientes de EA ($p=0,000$). En la tabla 2 se detallan las puntuaciones obtenidas por los integrantes del estudio. Los análisis por género muestran diferencias entre las mujeres con EA y las mujeres con TE ($p=0,016$). En los hombres, encontramos diferencias entre los pacientes con EA y los controles ($p=0,009$). Los hombres con EA se diferencian del resto de grupos (con pacientes con DCL ($p=0,044$), pacientes con EP ($p=0,003$), y por último pacientes con TE ($p=0,00$)). Como se resumen en la figura 10B, los hombres presentaron peores puntuaciones en las actividades de la vida diaria, particularmente los pacientes con EA.

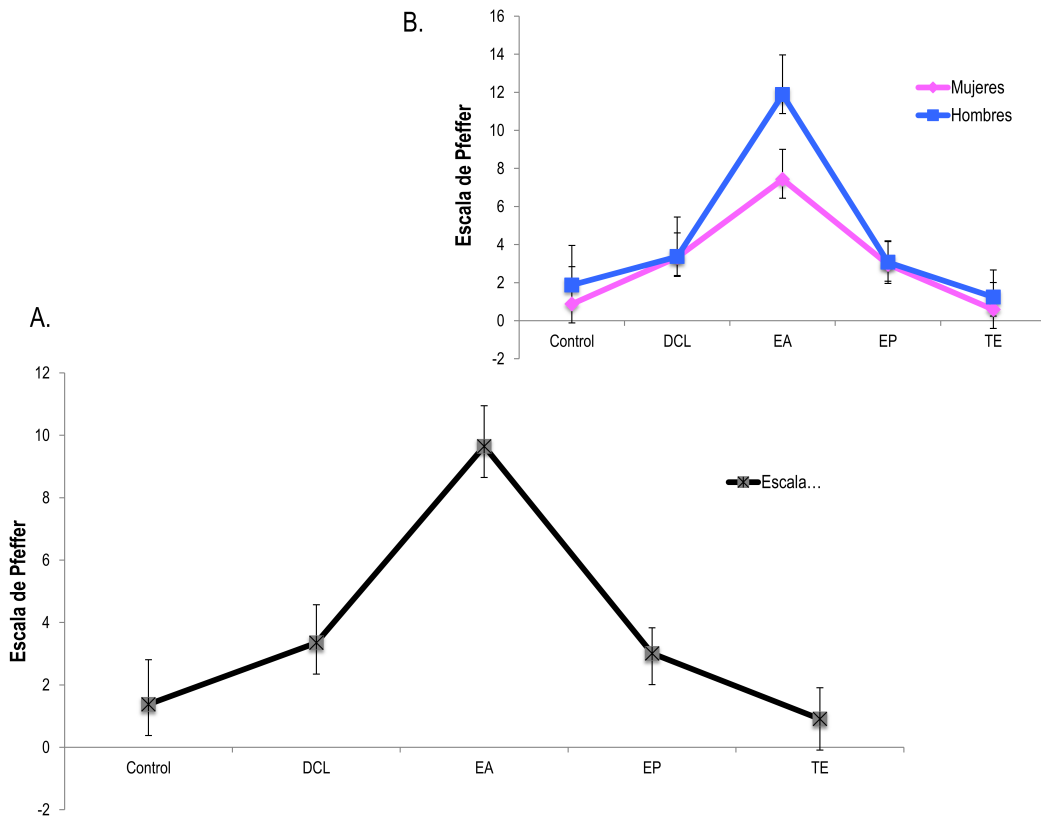


Figura 10. A. Puntuación escala funcional en las enfermedades neurodegenerativas. B. Puntuación escala funcional analizado por género en las enfermedades neurodegenerativas. Los puntos representan valores medios \pm EEM.

6.1.1b. Deterioro cognitivo

Los pacientes con EA muestran un mayor deterioro en sus funciones cognitivas, obteniendo una puntuación muy baja en el **test MMSE**, con una diferencia significativa en relación a los controles ($p=0,000$). En los análisis inter-sujetos, los pacientes con EA se diferencian significativamente del resto de grupos ($p=0,015$), de los pacientes con DCL ($p=0,000$), de los de los pacientes con EP ($p=0,000$) y los pacientes con TE.

También, los pacientes con DCL tienen un deterioro cognitivo significativamente menor que los pacientes con TE ($p=0,019$), (figura 11A.) En los análisis por género demuestran que hay diferencias entre las mujeres con EA y las mujeres control ($p=0,00$), las pacientes con DCL ($p=0,006$), las pacientes de EP ($p=0,000$) y con las de TE. Las mujeres con DCL, a su vez, se diferencian significativamente de las mujeres con TE ($p=0,041$).

En los hombres, se detectan diferencias entre los pacientes con EA y los controles ($p=0,013$),

los pacientes con EP ($p=0,002$), y los pacientes con TE ($p=0,006$). Los análisis por género se encuentran en la figura 11B.

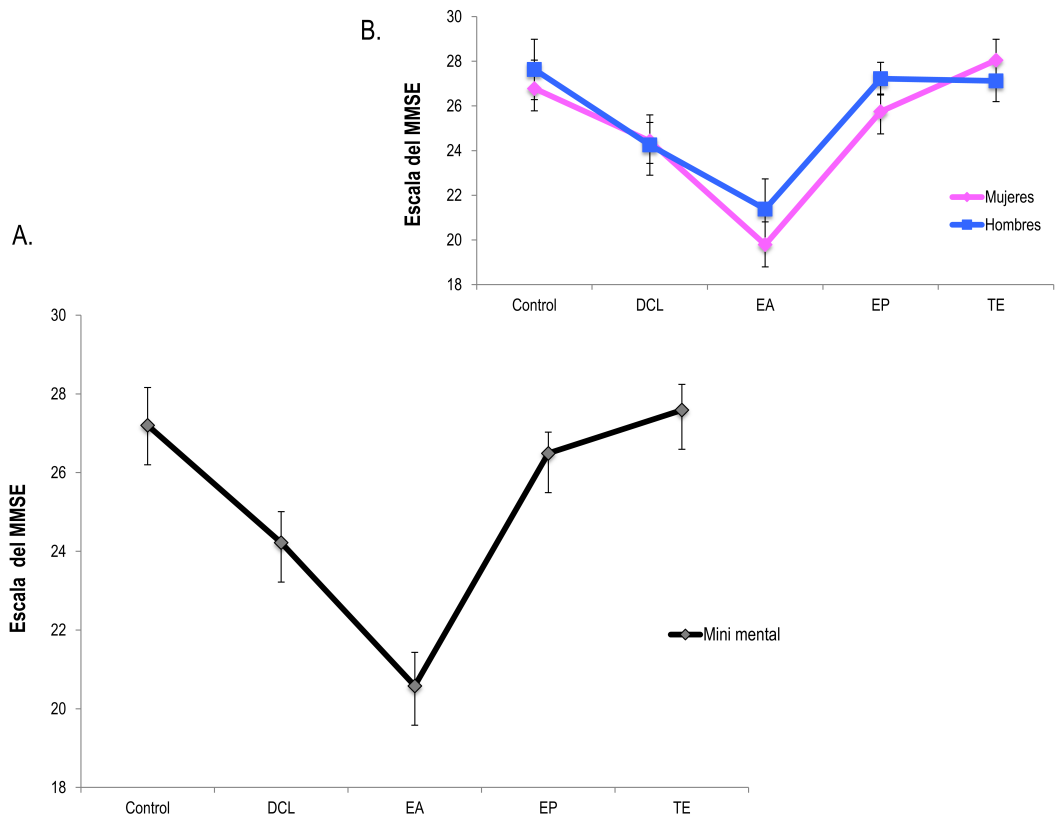


Figura 11. A. Puntuación del MMSE en las enfermedades neurodegenerativas. B. Puntuación del MMSE analizado por género en las enfermedades neurodegenerativas. Los puntos representan valores medios \pm EEM.

6.1.1c. Escala de Depresión geriátrica

Analizamos el grado de depresión de los pacientes utilizando el **GDS**. Una puntuación de 0 a 10 debe ser considerada como normal; 11 ó más, como un posible indicador de depresión; 11 a 14 puntos (moderadamente deprimido) y 15 a 39 puntos (severamente deprimido). Los resultados obtenidos no permiten apreciar diferencias ente los grupos. (Tabla 2).

6.1.1d. Fluidez verbal

La fluidez verbal, medida a través del **Test de Isaac**, sólo se muestra alterada de forma significativa en los pacientes de EA en relación a los controles ($p=0,000$), y con el resto de grupos de pacientes con patologías neurodegenerativas ($p=0,00$) (tabla 2). También, los pacientes con DCL muestran diferencias significativas con los pacientes con TE ($p=0,013$) en

este parámetro. Si contemplamos el género de la muestra, se aprecia que las mujeres con EA se diferencian de las mujeres control ($p=0,033$). También se diferencian las mujeres EA con el resto de grupos de pacientes con patologías neurodegenerativas (con las mujeres DCL ($p=0,005$) y con las mujeres EP y TE ($p=0,00$)). Las mujeres con DCL se diferencian de las mujeres control ($p=0,049$). Los hombres con EA se diferencian de los hombres control ($p=0,000$). Con el resto de patologías, también hay diferencias entre los hombres con EA y los que presentan DCL ($p=0,11$), y entre los hombres con EP y los de TE ($p=0,000$).

En el caso del ítem de la letra P, los pacientes con DCL se diferencian de los controles ($p=0,010$). Al hacer el análisis intra-grupos, encontramos que los pacientes con EA tienen un menor número de aciertos en comparación a los pacientes con TE, con una diferencia significativa ($p=0,031$). También se diferencian significativamente los pacientes con DCL en relación a los pacientes con TE ($p=0,00$) y a los pacientes con EP ($p=0,005$).

6.1.1e. Test de Wechsler

Esta prueba es una herramienta general de evaluación de la memoria en sus diferentes procesos de codificación, retención y recuperación. La prueba completa consiste en 11 subescalas, de las que nosotros hemos utilizado las tres dedicadas a los procesos de atención, procesos ejecutivos y memoria auditiva: La subescala de *Textos*, *Parejas de palabras*, y *Letras y números* en los diferentes procesos evaluados.

Hemos encontrado en el análisis de varianza que, lógicamente, los pacientes con EA mostraron puntuaciones más bajas en todas las pruebas utilizadas que los respectivos controles y que el resto de pacientes. Esto ocurre tanto en **mediciones de recuerdo** como de **reconocimiento de textos I y II** ($p=0,01$), **Números y Letras** ($p=0,001$); **parejas de palabras** ($p=0,05$) y **reconocimiento de parejas de palabras** ($p=0,001$). Los análisis de comparaciones por pares han mostrado una significativa peor ejecución en la subescala de **textos I de recuerdo libre**, de los ítems de los pacientes con EA frente a los pacientes con EP y TE ($p=0,01$ respectivamente). También, encontramos diferencias significativas entre el grupo de pacientes con DCL con respecto a los pacientes con TE ($p=0,001$) y entre el grupo de TE y EP ($p=0,01$). Por último, en la variable **pendiente de aprendizaje auditivo**, la diferencia entre la recuperación en la primera y segunda ocasión en que se oye la historia, encontramos diferencias entre el grupo de EA frente al grupo de EP ($p=0,05$) y de TE

($p=0,001$). Los pacientes de DCL también difieren en esta variable de los pacientes con EA ($p=0,05$). En el **recuerdo de textos II**, los pacientes con TE obtuvieron una puntuación mayor que los pacientes con EA ($p=0,001$), con DCL ($p=0,001$) y con EP ($p=0,001$). Los pacientes de EA tienen una puntuación significativamente menor que los pacientes con EP ($p=0,01$). Un resultado semejante se obtuvo con la **prueba de reconocimiento de las ideas** presentes en los textos. Los pacientes con TE obtuvieron valores significativamente superiores a los pacientes con EA ($p=0,001$), con DCL ($p=0,001$) y EP ($p=0,05$). La puntuación obtenida por los pacientes con EA fue significativamente menor que la obtenida por los pacientes con EP ($p=0,05$). Podemos concluir que la codificación y retención de información auditiva está seriamente dañada en los pacientes con EA frente a los pacientes con EP y TE, y que este proceso muestra también un severo deterioro en los pacientes con EP frente a los pacientes con TE.

En cuanto a la subescala de **Letras y Números**, los pacientes con EA obtuvieron una puntuación menor que los pacientes con EP ($p=0,01$) y que los pacientes con TE ($p=0,01$). Los pacientes con DCL también obtuvieron menores puntuaciones que los pacientes con TE ($p=0,05$). De este modo, podemos concluir que los pacientes con EA y DCL mostraron déficits significativos en los procesos ejecutivos de memoria a corto plazo frente a los pacientes con EP y TE.

En cuanto a la subescala de **Parejas de Palabras**, los pacientes con TE obtuvieron la puntuación más altas, encontrándose diferencias significativas frente a los pacientes con EA ($p=0,01$), con DCL ($p=0,01$) y con los pacientes con EP ($p=0,05$). Los pacientes con DCL obtuvieron menores puntuaciones que los pacientes de EP ($p=0,006$). En cuanto a la **pendiente de aprendizaje**, diferencia entre la primera prueba y la cuarta, los pacientes con TE obtuvieron mayores puntuaciones frente a los pacientes con EA ($p=0,001$), con DCL ($p=0,01$), y con EP ($p=0,05$). Por tanto, parecen mostrarse claros deterioros en los pacientes con EA, DCL y EP en cuanto a la capacidad de codificar y recuperar asociaciones, además de retener estas asociaciones por medio de la repetición. En la prueba de reconocimiento de las parejas de palabras, de nuevo los pacientes con TE obtuvieron puntuaciones mayores frente a los pacientes con EA ($p=0,001$), con DCL ($p=0,001$) y con EP ($p=0,05$). Luego, no es tanto un problema de recuperación, sino un deterioro en los procesos de codificación de nuevas asociaciones. Estos mismos resultados se obtuvieron en el **análisis del porcentaje de**

retención de las parejas de palabras. Los pacientes con TE obtuvieron puntuaciones más altas frente a los pacientes con EA ($p=0,001$), con DCL ($p=0,001$) y con EP ($p=0,05$). Los pacientes con EA tuvieron puntuaciones más bajas que el resto de los grupos ($p=0,001$). De este modo, se confirma el déficit en los procesos de codificación y retención de los pacientes con EA, DCL y EP frente a los pacientes con TE.

	Control	EA	DCL	EP	TE	^a Valor de F	^b Valor de p	
Actividades Funcionales	1,4±1,4	7,92±0,8	9,3±1,2	10,7±1,0*	7,5±0,9	7,4	0,000**	
Escala de depresión geriátrica	6,6±1,5	3,5±0,7*	9,0±1,9*	3,1± 0,9	0,9± 0,4	2,4	0,05*	
Mini mental	27,2±0,9	24,5±0,9	20,7±1,0*	26,5± 0,4	27,6±0,5	14,9	0,00**	
Test de Isaac	36,7±1,2	34,8± 0,9	27,3±1,7*	37,1± 0,5	38,9±0,4*	18,6	0,00**	
Test de Isaac letra P	8,5±0,6	6,6± 0,5*	7,1± 0,6	8,1±0,3	9,1±0,3	4,4	0,002**	
Test De Wechler	Texto	22,0±2,8	13,6±2,2*	8,3± 2,1*	20,1±1,7	29,0±2,1	12,7	0,00**
	Pendiente de aprendizaje	3,1±0,6	2,1± 0,5	0,8± 0,5*	2,9±0,4	4,2±0,5	5,7	0,00**
	Recuerdo de Texto	12,2±2,2	5,9± 1,6*	1,6± 1,5*	10,5±1,4	17,8±1,8	12,1	0,00**
	Reconocimiento de Texto	19,4±1,0	18,1± 0,8	16,1± 0,8*	19,8± 0,7	22,6±0,7*	8,8	0,00**
	Porcentaje de Reconocimiento de Texto	65,7±8,2	36,2±7,6*	10,7±7,5*	60,6±5,5	73,4±5,5	14,7	0,00**
	Letras y Números	4,6± 0,7	3,0± 0,5	1,57±0,6*	4,1±0,4	5,1± 0,5	6,8	0,00**
	Parejas de Palabras	9,2±1,5	3,1±1,2*	4,0±1,3*	8,3±1,0	12,5±1,2	12,0	0,00**
	Pendiente de aprendizaje	1,2±0,4	1,0±0,3	1,5±0,4	2,2±0,3	3,5±0,3*	9,2	0,00**
	Recuerdo de Parejas de Palabras	2,5±0,5	1,1± 0,4*	1,1±0,5	2,6±0,3	4,1±0,4*	9,2	0,00**
	Porcentaje de Retención	66,3±10,9	31,2±8,6*	33,9±11,5	55,2±6,7	84,6±6,3	7,7	0,00**
Reconocimiento Pareja de Palabras	22,9±0,7	21,5±0,7	17,8± 0,9*	22,8 ±0,4	23,8±0,2*	15,4	0,00**	

Tabla 2. Media de la puntuación obtenida en los test cognitivos (± EEM) en pacientes y controles (n=Número de sujetos). a Valor de la F limite inferior para el nivel de significación. b Valor de p significación estadística , se observan diferencias significativas entre grupos (*) para p < 0,05. y (**) para p < 0,001.

6.1.2 Evaluación Motora

Evaluamos la afectación motora en los pacientes de EP y en los pacientes con TE. Para los pacientes de EP utilizamos el UPRDS (Goetz y cols., 2008), y para los pacientes con TE el TETRAS (Deusch y cols., 1998).

6.1.2 a. Evaluación a pacientes de EP con el UPRDS

La escala UPDRS, utilizada como sistema de valoración de la enfermedad, sólo se aplicó en su totalidad a pacientes con EP. Del total de 159 puntos del UPRDS, que se asignan a individuos totalmente funcionales, los pacientes con EP presentaban una puntuación media en el UPDRS de $41,26 \pm 16,13$, con valores inferiores a 30 puntos en el 7,1% de los pacientes, y superiores a 64 en el 47,1% (Anexo III).

La valoración mental, del comportamiento y estado de ánimo (UPDRs I) proporciona una puntuación media de $3,28 \pm 2,60$, a los pacientes evaluados. La subescala UPDRSII, que valora la independencia en actividades de la vida diaria, tenía una puntuación de $12,52 \pm 6,86$. La subescala UPDRs III que explora los aspectos motores, tenía una puntuación media de $22,63 \pm 8,92$, con valores más elevados en los pacientes con enfermedad más grave (34-46 en el 14,28% de los sujetos), que se corresponde como era de esperar, con el mayor tiempo de evolución de la enfermedad (alrededor de 11 años). En la subescala UPDRs IV, que explora los aspectos del tratamiento, la puntuación es de $1,48 \pm 2,29$, sobre 23 puntos.

6.1.2 b. Evaluación a pacientes de TE con el TETRAS.

La evaluación motora a los pacientes de TE realizada mediante el TETRAS, en el cual se estudia el impacto del temblor del paciente en las actividades de la vida diaria, mediante la realización de una serie de movimientos consecutivos. Sobre un total de puntos de 36, los pacientes evaluados muestran una media de $9,74 \pm 3,68$, lo que se traduce en un 73% de independencia (Anexo IV).

6.2. Análisis del habla

Sólo se realizó esta parte del estudio en los sujetos controles y en los pacientes de EP y de EA.

6.2.1. Velocidad en la elocución y articulación entre pacientes con la EP y personas mayores sin patología

Para el análisis de las distintas variables de los parámetros de la voz en los pacientes de EP y controles se realizaron diferentes contrastes estadísticos para comprobar que no existían diferencias significativas entre los grupos en las variables clínicas y sociodemográficas. No se apreciaron diferencias entre los dos grupos en la variable “edad” ($t_{82} = 1,07$), ni en la distribución del género por grupo ($\chi^2 = 3,11$). Tampoco encontramos diferencias en las capacidades cognitivas medidas por el MMSE ($t_{82} = 1,33$). Por último, comprobamos que no había diferencias en cuanto a la fluidez verbal de ambos grupos, medida tanto por una tarea de fluidez verbal semántica (test de Isaacs, $t_{82} = 0,71$) como fonológica (“p”, $t_{82} = 0,47$).

Se comprobó la existencia de diferencias entre ambos grupos en cuatro variables relacionadas con la fluidez verbal. Los resultados ponen de manifiesto que el grupo con EP muestra menor velocidad de elocución ($t_{82} = 2,41$; $p = 0,05$) y articulación ($t_{82} = 2,68$; $p = 0,01$) que el grupo de control; del mismo modo, la duración media de la sílaba es mayor en el grupo con EP ($t_{82} = -2,81$; $p = 0,01$). En relación al número de pausas, los pacientes del grupo con EP realizan pausas menores de 100 ms, con una duración media significativamente mayor ($t_{82} = -2,05$; $p = 0,05$) que el grupo de personas mayores, pero no encontramos diferencias en aquellas pausas de más de 300ms de duración. Estos resultados definen un perfil del paciente de EP con un lenguaje enlentecido en la articulación silábica y prosódica. Enlentecimiento que se refleja en pausas más largas y menor velocidad de elocución y articulación. Por el contrario, no se encuentran diferencias en otras variables como el número de pausas ($t_{82} = -0,08$), el tiempo de fonación ($t_{82} = 1,08$), o el porcentaje de fonación ($t_{82} = -0,85$). En la tabla 3 podemos observar la conversión en puntuaciones de los resultados en cada una de las variables prosódicas utilizadas (tabla 3). De este modo se resalta el perfil prosódico de ambos grupos experimentales. Los resultados de este estudio han sido publicados *Martínez-Sánchez y cols., 2015* (Anexo VI).

	Control(DE)	EP(DE)	t	p
Duración de la tarea	46,05(22,94)	43,77(15,96)	0,52	0,604
Número de pausas ≥ 300 ms	16,91(13,42)	17,13(13,93)	-0,08	0,936
Duración media de la pausa (≥ 300 ms)	0,61(0,18)	0,66(0,16)	-1,28	0,201
Número de micropausas ≥ 10 ms	26,87(17,90)	23,82(13,36)	0,87	0,386
Duración media de la micropausa (≥ 10 ms)	0,46(0,16)	0,53(0,15)	-2,15	0,033
Tiempo de fonación	34,02(12,40)	31,38(7,29)	1,19	0,237
Proporción de fonación	78,70(12,63)	75,22(10,81)	1,34	0,181
Velocidad de elocución	3,49(0,80)	3,10(0,68)	2,41	0,017
Velocidad de articulación	4,40(0,47)	4,09(0,53)	2,80	0,009
Duración media de la sílaba	0,22(0,02)	0,24(0,03)	-2,91	0,005

Tabla 3. Estadística descriptiva y comparación de medias de las variables estudiadas en pacientes con EP y Control. DE=desviación estándar. Los resultados de este estudio se han publicado en la revista de Neurología (Anexo VI) Martínez-Sánchez y cols., (2015) *Neurología*.

6.2.2. Modificaciones del habla en los pacientes de EA y en sujetos control de edad avanzada.

Analizamos la voz de pacientes con EA y controles utilizando oraciones simples. Se realizaron análisis espectrográficos de los siguientes parámetros como porcentaje de roturas de voz, número de periodos de voz, número de roturas de voz, Shimmer (apq3) y la relación de ruidos armónicos. Los resultados se describen en la tabla 4. Las variables fueron analizadas aplicando el coeficiente de Fisher, encontrando diferencias significativas en la mayoría de los parámetros estudiados. Los análisis muestran que los pacientes con EA se caracterizan por tener un número mayor de periodos de voz.

Encontramos que las medidas de discurso, como las variaciones en el porcentaje de roturas de voz, número de periodos de voz, número de roturas de voz, Shimmer (apq 3) y la relación de ruidos armónicos, caracterizan a las personas con EA con una precisión del 84,8%. Por tanto, los parámetros temporales y acústicos analizados nos permiten definir el perfil de las personas con EA de manera valiosa.

El análisis discriminante lineal de las variables estudiadas, hace posible la obtención de una función discriminante altamente significativa (porcentaje de varianza explicada = 100%; valor propio = 1,095, correlación canónica = 0,723; lambda de Wilks = 0,477, $\chi^2 = 45,488$, $df = 5$, $p < 0,001$) que contiene 5 factores (tabla 4). Para la función discriminante, en coeficientes

estandarizados (CE), se tomaron los siguientes parámetros en cuenta: el número total de períodos de voz (CE = 0,874), interrupciones en la voz [calculado tanto como porcentaje de interrupciones de voz (CE = 0,787) como las pausas de voz (CE = -0,683)], la fluctuación de la amplitud del sonido como apq3 brillo (CE = 1,381), y, por último, la relación ruido-armónicos (CE = -1,127). La Tabla 5 muestra Wilks' lambda y coeficientes de Fisher de la matriz estructurada de cada variable. Los centroides no estandarizados para la EA son 1,129 y para el grupo de control de -0,941.

La tabla 4 muestra los parámetros de voz que se midieron y los datos descriptivos. Los resultados de este estudio se han publicado en la revista ***Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*** (Meilán y cols., 2014)(Anexo VIII).

Grupo	Parámetro	Control (media±DE)	EA (media±DE)
Aspectos temporales de la muestra de voz	Duración Total	44,39±18,32	82,19±53,05
	Tiempo de fonación	34,30±13,21	46,72±19,86
	Velocidad Voz, sílabas	3,59±0,67	2,55±0,63
	Velocidad de articulación, sílabas	4,34±0,43	4,05±0,43
Análisis de la Frecuencia fundamental (F ₀)	Media F ₀ ,Hz	161,27±24,48	179,08±29,05
	Mínimo F ₀ ,Hz	68,46±4,00	67,66±3,78
	Máxima F ₀ ,Hz	542,85±124,91	596,63±68,76
	Autocorrelación,Hz	0,89±0,04	0,90±0,05
	Tono alto,Hz	478,12	571,25
	Tono bajo,Hz	76,82	82,50
Análisis de periodos de voz	Pulsos,n	4,221±1,834	6,520±2,872
	Periodos,n	4,126±1,804	6,379±2,830
	Media de Periodos,n	6,38±1,05	5,76±0,88
Interrupción de sonido	% sin voz	35,66±7,40	47,83±12,28
	Roturas de voz,n	84,05±29,95	118,93±68,27
	% roturas de voz	39,62±6,85	51,27±12,03
	Proporción de pausas en la voz	28,67±12,89	51,76±13,55
	Pausas en la voz,n	14,33±9,3	34,5±27,04
Fluctuación en la frecuencia	Jitter(loc),%	2,83±0,61	2,80±0,95
	Jitter(loc, abs),%	182,71±54,65	165,22±75,41
	Jitter(rap),%	1,33±0,34	1,34±0,54
	Jitter(ppq5),%	1,52±0,46	1,54±0,61
Fluctuación en la amplitud del sonido (intensidad de sonido)	Shimmer (loc),%	12,94±4,09	13,28±4,71
	Shimmer (loc),dB	1,58±0,44	1,60±0,51
	Shimmer (apq3),%	5,29±2,19	6,01±2,74
	Shimmer (apq5),%	7,77±3,07	7,92±3,43
	Shimmer (apq11),%	14,04±4,57	12,66±4,58
	Intensidad sin voz,dB	56,62±4,38	53,27±5,15
	Intensidad de voz,dB	71,10±3,98	70,35±2,74
Armónicos/relación ruido	Relación de ruidos-armónicos	0,17±0,65	0,15±0,07
	Relación de los armónicos-ruido	12,43±2,86	12,72±2,64

Tabla 4. Parámetros de voz y datos medidos. loc=Local; loc,abs=absoluto local; rap=perturbación relativa promedio; ppq5= cociente de perturbación periodo punto-5. (Modificado de Meilán y cols., 2014).

Parámetros	Wilks' lambda	Estructura de matriz: función
% roturas de voz	25,711**	0,654
Número de periodos	17,940**	0,471
Número de roturas de voz	14,886**	0,330
Shimmer (apq3)	13,162**	0,131
Relación de ruidos- armónicos	13,142**	-0,138

Tabla 5. Wilks' lambda y coeficiente de Fisher estructura de matriz para cada variable introducida. ** $p < 0,001$. (Modificado de Meilán y cols., 2014).

6.3. Polimorfismos de ADN

Analizamos los SNPs de diferentes genes (ver metodología, tabla 1), a partir del ADN extraído de las muestras de saliva de los sujetos de estudio. Se realizó un análisis de la distribución de la frecuencia en la que aparecen los distintos alelos de cada uno de los polimorfismos génicos estudiados, aplicando el test de χ^2 para analizar su distribución en la población de estudio. Los resultados se aprecian en la tabla 6.

	<i>NRG-1</i> rs3924999	<i>NRG-1</i> rs6994992	<i>COMT</i> rs4680	<i>Drd2</i> rs6277	<i>Drd3</i> rs6280	<i>Drd2</i> rs1800497
N	112	132	113	124	132	122
χ^2 , gl 8	4,176,62	4,74	13,30	5,72	11,63	3,17
p	P=0,847578	p=0,784	p=0,043*	p=0,706	p=0,168	p=0,923

Tabla 6. Valores del análisis de χ^2 sobre la distribución de los diferentes genotipos alélicos en los grupos estudiados. N- Número de casos estudiados. Las diferencias son significativas cuando $p < 0,05$ (*).

6.3.1. Polimorfismos del gen *NRG-1*

6.3.1a. Polimorfismo rs3924999

Las frecuencias genotípicas para el polimorfismo rs3924999 del *NRG1* se reflejan en la figura 12. No se observaron diferencias en la frecuencia genotípica de este polimorfismo en los grupos estudiados. Se observa que el genotipo de mayor frecuencia es el homocigoto G/G, genotipo normal en este gen. El homocigoto A/A, que sería el que presenta más asociaciones con diferentes patologías, presenta una frecuencia menor en todos los grupos de estudio. El odd ratio (OR), en el intervalo de confianza del 95% (IC), es de 3,88 ($p=0,21$) para todos los grupos de pacientes y controles. Analizando la distribución alélica, encontramos que la presencia del fenotipo portador de la patología en relación a los controles no presenta diferencias significativas (tabla 7).

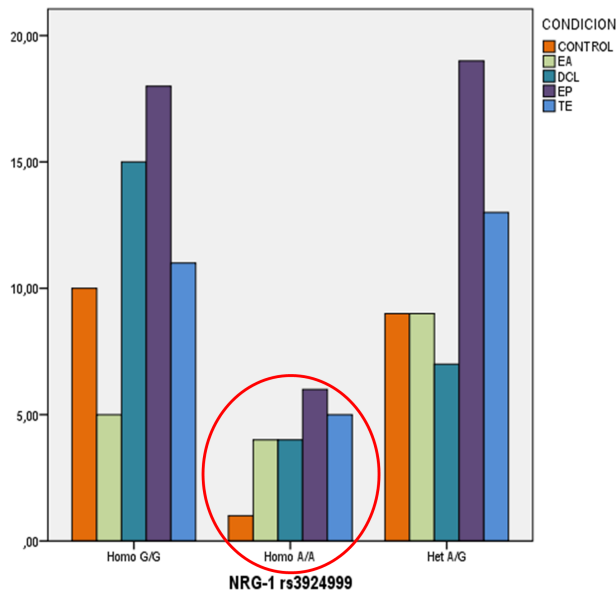


Figura 12. Distribución de la frecuencias genotípicas del polimorfismo rs3924999 del gen *NRG-1* en las enfermedades neurodegenerativas. El círculo rojo indica el genotipo mutado en homocigosis.

		<i>NRG-1</i> rs3924999					Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p
		Control (N=20; 40 alelos)	DCL N=26; 52 alelos)	EA N=18; 36 alelos)	EP N=43; 86 alelos)	TE N=29; 58 alelos)	Control/DCL	Control/EA	Control/EP	Control/TE
Genotipo	A/A	1(5)	4(15,4)	4(22,2)	6(14)	5(17,2)	2,67(0,26-27,5)0,41	8,0(0,70-91,80)0,09	3,33(0,35-31,74)0,3	4,55(0,5-45,9)0,20
	A/G	9(45)	7(26,9)	9(50)	19(44,2)	13(44,8)	0,51(0,14-1,85)0,31	2,0(0,49-8,24)0,34	1,17(0,39-3,55)0,7	1,31(0,40-4,38)0,66
	G/G	10(50)	15(57,7)	5(27,8)	18(41,9)	11(37,9)	2,18(0,32-15,0)0,43	8,0(0,70-91,80)0,09	3,33(0,4-31,7)0,30	4,55(0,6-45,9)0,20
Frecuencia alélica	Portadores	11(27,5)	15(28,8)	17(47,2)	31(36)	23(39,7)	1,07(0,43-2,68)0,89	2,36(0,91-6,12)0,08	1,49(0,65-3,38)0,3	1,73(0,73-4,1)0,22
	No portadores	29(72,5)	37(71,2)	19(52,8)	55(64)	35(60,3)	0,94(0,37-2,34)0,89	0,42(0,16-1,10)0,08	0,67(0,30-1,53)0,3	0,58(0,24-1,38)0,22

Tabla 7. Polimorfismo rs3924999 del *NRG-1*. Frecuencia genotípica y variaciones alélicas entre pacientes con enfermedades neurodegenerativas y controles. Las columnas 1 a 5 representan la frecuencia absoluta y el porcentaje de aparición. Las columnas 6 al 9 representan las comparaciones bilaterales que indican el porcentaje de aparición (OR) en relación al control, en el intervalo de confianza del 95% (IC). Las diferencias son significativas cuando * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$.

6.3.1b. Polimorfismo rs6994992

Para el polimorfismo rs6994992 del gen *NRG-1*, la frecuencia mayoritaria es la heterocigótica C/T en todos los casos (figura 13). El homocigoto C/C, normal, tiene porcentajes más altos de distribución que el genotipo de riesgo, homocigoto T/T. La distribución genotípica analizada no

presenta ninguna diferencia entre los diferentes grupos de estudio (tabla 8).

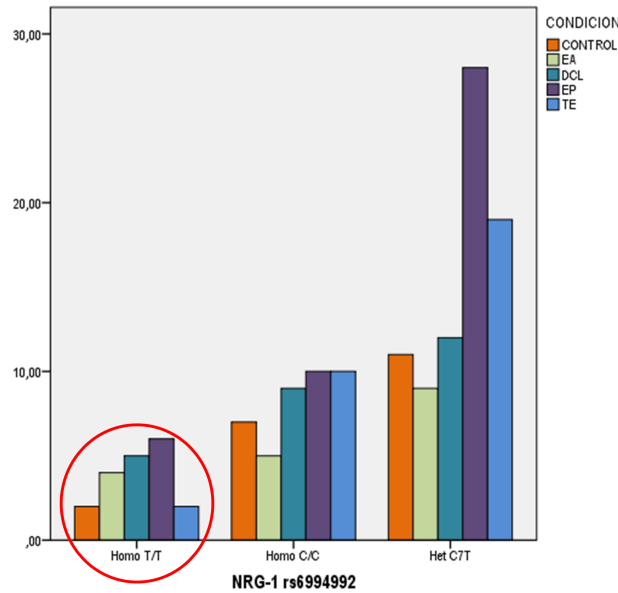


Figura 13. Distribución de la frecuencias genotípicas del polimorfismo rs6994992 del gen *NRG-1* en las enfermedades neurodegenerativas. El círculo rojo indica el genotipo mutado en homocigosis.

<i>NRG-1</i> rs6994992						Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	
Genotipo		Control	DCL	EA	EP	TE	Control/DCL	Control/EA	Control/EP	Control/TE
		(N=20; 40 alelos)	N=26; 52 alelos)	N=18; 36 alelos)	N=44; 88 alelos)	N=31; 62 alelos)				
Genotipo	T/T	2(10)	5(19,2)	4(22,2)	6(13,6)	2(6,5)	2,19(0,32-15,0)0,43	2,8(0,36-21,72)0,33	2,1(0,32-13,61)0,44	0,70(0,08-6,22)0,75
	C/T	11(55)	13(50)	9(50)	28(63,6)	19(61,3)	1,03(0,28-3,77)0,96	1,15(0,27-4,87)0,85	1,78(0,54-5,87)0,34	1,21(0,36-4,10)0,76
	C/C	7(35)	8(30,8)	5(27,8)	10(22,7)	10(32,3)	2,19(0,32-15,0)0,43	2,8(0,36-21,72)0,33	2,1(0,32-13,61)0,44	0,70(0,08-6,22)0,75
Frecuencia alélica	Portadores	15(37,5)	23(44,2)	17(47,2)	40(45,5)	23(37,1)	1,32(0,60-3,07)0,52	1,5(0,60-3,73)0,39	1,39(0,65-2,99)0,40	0,98(0,43-2,24)0,97
	No portadores	25(62,5)	29(55,8)	19(52,8)	48(54,5)	39(62,9)	0,75(0,33-1,76)0,52	0,67(0,27-1,68)0,4	0,72(0,34-1,55)0,40	1,01(0,45-2,31)0,97

Tabla 8. Polimorfismo rs6994992 del *NRG-1*. Frecuencia genotípica y variaciones alélicas del polimorfismo entre pacientes con enfermedades neurodegenerativas y controles. Las columnas 1 a 5 representan la frecuencia absoluta y el porcentaje de aparición. Las columnas 6 al 9 representan las comparaciones bilaterales que indican el porcentaje de aparición (OR) en relación al control, en el intervalo de confianza (IC) del 95%. Las diferencias son significativas cuando * $p < 0,05$ ó ** $p < 0,001$.

6.3.2. Polimorfismos del gen *COMT*

En el análisis de la distribución de la frecuencia de aparición de los diferentes genotipos del polimorfismo del gen *COMT*, encontramos que hay diferencias significativas ($p=0,043$) en los

grupos de estudio. El genotipo A/A, genotipo de riesgo, asociado a diferentes patologías, tiene menor frecuencia de aparición (figura 14).

El análisis de distribución del porcentaje de aparición de los diferentes genotipos en relación al control indica que hay diferencias significativas entre los pacientes con DCL y los controles ($p=0,017$), con una alta susceptibilidad a presentar dicha patología (OR:1,26) (tabla 9).

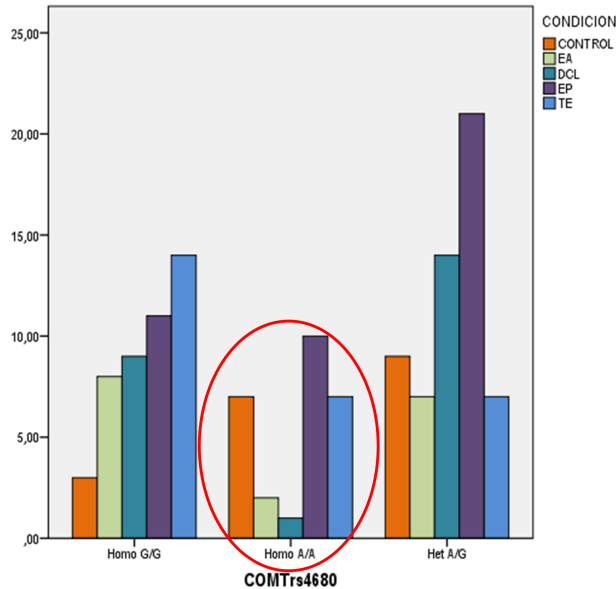


Figura 14. Distribución de la frecuencias genotípicas del polimorfismo rs4680 del gen *COMT* en las enfermedades neurodegenerativas. El círculo rojo indica el genotipo mutado en homocigosis.

<i>COMT</i> rs4680						Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	
Genotipo	Alelo	Control	DCL	EA	EP	TE	Control/DCL	Control/EA	Control/EP	Control/TE
		(N=19; 38 alelos)	(N=24; 48 alelos)	(N=17; 34 alelos)	(N=42; 84 alelos)	(N=28; 56 alelos)				
Genotipo	A/A	7(36,8)	1(4,2)	2(11,8)	10(23,8)	7(25)	21,0(1,8-248,1)0,01*	0,10(0,01-0,84)0,03*	2,57(0,52-12,7)0,25	0,21(0,04-1,09)0,06
	A/G	9(47,4)	14(58,3)	7(41,2)	21(50)	7(25)	10,9(1,1-103,9)0,04*	0,29(0,06-1,52)0,14	1,63(0,47-5,66)0,44	0,17(0,03-0,81)0,02*
	G/G	3(15,8)	9(37,5)	8(47,1)	11(26,2)	14(50)	21,0(1,8-248,1)0,01*	0,10(0,01-0,84)0,03*	2,57(0,52-12,7)0,25	0,21(0,04-1,09)0,06
Frecuencia alélica	Portadores	23(60,5)	16(33,3)	11(32,4)	41(48,8)	21(37,5)	0,33(0,14-0,79)0,01*	0,31(0,12-0,82)0,02*	0,62(0,29-1,36)0,23	0,39(0,17-0,91)0,03*
	No portadores	15(39,5)	32(66,7)	23(67,6)	43(51,2)	35(62,5)	3,07(1,27-7,43)0,01*	3,21(1,22-8,45)0,02*	1,61(0,74-3,50)0,23	2,56(1,10-5,96)0,03*

Tabla 9. Polimorfismo rs4680 del *COMT*. Frecuencia genotípica y variaciones alélicas del polimorfismo entre pacientes con enfermedades neurodegenerativas y controles. Las columnas 1 a 5 representan la frecuencia absoluta y el porcentaje de aparición. Las columnas 6 al 9 representan las comparaciones bilaterales que indican el porcentaje de aparición (OR) en relación al control, en el intervalo de confianza (IC) del 95%. Las diferencias son significativas cuando * $p<0,05$ ó ** $p<0,001$.

6.3.3a. Polimorfismos *Drd2* rs6277

El análisis de distribución del porcentaje de aparición de los diferentes genotipos del polimorfismo rs6277 del gen codificante del receptor D2 de la dopamina en relación al control indica que el homocigoto T/T (normal) presenta una mayor frecuencia en los grupos de estudio que el genotipo mutado (C/C), no encontrándose diferencias entre la frecuencia de las diferentes formas alélicas entre los grupos de estudio (figura 15).

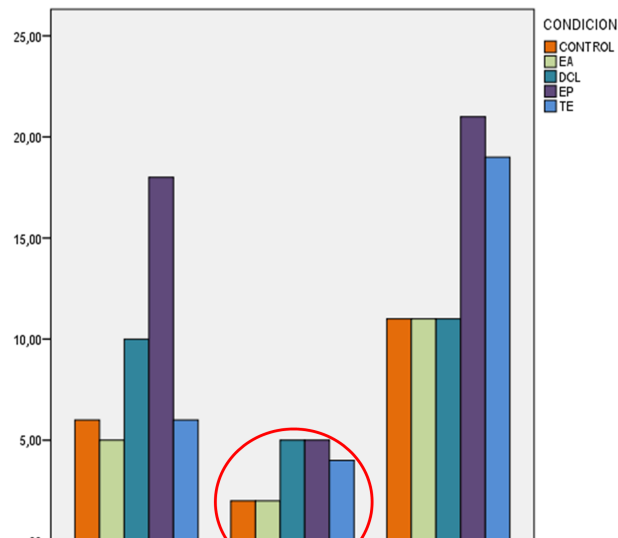


Figura 15. Distribución de la frecuencias genotípicas del polimorfismo rs6277 del gen *Drd2* en las enfermedades neurodegenerativas. El círculo rojo indica el genotipo mutado en homocigosis.

El análisis por patología y género no muestra diferencias significativas entre los grupos. En las tablas de contingencia, en las que se analiza la frecuencia de aparición de los diferentes genotipos y fenotipos en los distintos grupos y en las comparaciones bilaterales entre controles y cada una de las patologías estudiadas, tampoco se apreció ninguna distribución significativamente diferente (tabla 10).

Drd2rs6277						Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	
		Control (N=19; 38 alelos)	DCL N=26; 52 alelos)	EA N=18; 36 alelos)	EP N=44; 88 alelos)	TE N=29; 58 alelos)	Control/DCL	Control/EA	Control/EPA	Control/TE
Genotipo	C/C	2(10,5)	5(19,2)	2(11,1)	5(11,4)	4(13,8)	1,5(0,16-2,23)0,68	1,2(0,12-11,87)0,88	0,83(0,13-5,47)0,85	2,0(0,26-15,38)0,50
	T/C	11(57,9)	11(42,3)	11(61,1)	21(47,7)	19(65,5)	0,6(0,22-10,3)0,45	1,2(0,28-5,12)0,81	0,64(0,20-2,07)0,45	1,73(0,45-6,69)0,43
	T/T	6(31,6)	10(38,5)	5(27,8)	18(40,9)	6(20,7)	1,5(0,16-2,23)0,68	1,2(0,12-11,87)0,88	0,83(0,13-5,47)0,85	2,0(0,26-15,38)0,50
Frecuencia alélica	Portador	15(39,5)	21(40,4)	15(41,7)	31(35,2)	27(46,6)	1,04(0,44-2,44)0,93	1,10(0,43-2,77)0,85	0,83(0,38-1,83)0,6	1,34(0,58-3,06)0,50
	No portador	23(60,5)	31(59,6)	21(58,3)	57(64,8)	21(53,4)	0,96(041-2,26)0,93	0,91(0,36-2,31)0,85	1,20(0,55-2,63)0,6	0,75(1,72)0,50

Tabla 10. Polimorfismo rs6277 del *Drd2*. Frecuencia genotípica y variaciones alélicas del polimorfismo entre pacientes con enfermedades neurodegenerativas y controles. Las columnas 1 a 5 representan la frecuencia absoluta y el porcentaje de aparición. Las columnas 6 al 9 representan las comparaciones bilaterales que indican el porcentaje de aparición (OR) en relación al control, en el intervalo de confianza (IC) del 95%. Las diferencias son significativas cuando * $p < 0,05$ ó ** $p < 0,001$.

6.3.3b. Polimorfismos *Drd2* rs1800497

El análisis de distribución del porcentaje de aparición de los diferentes genotipos del polimorfismo rs1800497 del *Drd2*, muestra que el genotipo T/T, mutado, aparece en porcentajes muy bajos o nulo (en el grupo control y pacientes de TE) en la muestra de estudio. El genotipo C/C, normal, es el que presenta una mayor frecuencia, no obteniendo diferencias significativas en los análisis de distribución de frecuencias (figura 16).

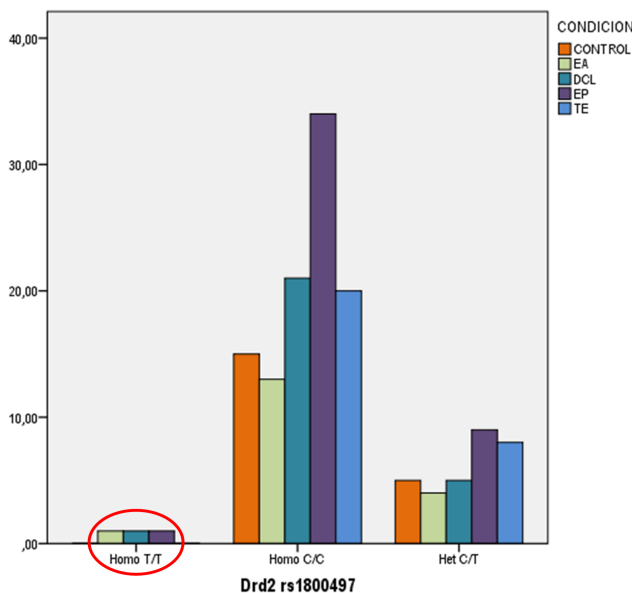


Figura 16. Distribución de la frecuencias genotípicas del polimorfismo rs1800497 del gen *Drd2* en las enfermedades neurodegenerativas. El círculo rojo indica el genotipo mutado en homocigosis.

Drd2rs1800497							Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p
	Control (N=20; 40 alelos)	DCL N=27; 54 alelos)	EA N=18; 36 alelos)	EP N=44; 88 alelos)	TE N=28; 56 alelos)		Control/DCL	Control/EA	Control/EP	Control/TE
Genotipo	T/T	0(0)	1(3,7)	1(5,6)	1(2,3)	0(0)	No computable*	No computable*	7,1E+008(0,0)1,0	0
	T/C	5(25)	5(18,5)	4(22,2)	9(20,5)	8(28,6)	No computable*	0,92(0,20-4,2)0,92	0,79(0,23-2,77)0,72	1,2(0,33-4,41)0,78
	C/C	15(75)	21(77,8)	13(72,2)	34(77,3)	20(71,4)	59384269(14562742,005)0,00	1,0E+008(1,01x10 ⁸ 1,0E+008)0,00	1595963394569400,629-55742516)0,00	1,2(0,33-4,4)0,78
Frecuencia alélica	Portador	5(12,5)	7(13,0)	6(16,7)	11(12,5)	8(14,3)	1,04(0,31-3,56)0,95	1,4(0,39-5,05)0,61	1,0(0,32-3,10)1,0	1,17(0,35-3,87)0,80
	No portador	35(87,5)	47(87)	30(83,3)	77(87,5)	48(85,7)	0,96(0,28-3,28)0,95	0,71(0,20-2,58)0,61	1,0(0,32-3,10)1,0	0,86(0,26-2,84)0,80

Tabla 11. Polimorfismo rs1800497 del *Drd2*. Frecuencia genotípica y variaciones alélicas del polimorfismo entre pacientes con enfermedades neurodegenerativas y controles. Las columnas 1 a 5 representan la frecuencia absoluta y el porcentaje de aparición. Las columnas 6 a 9 representan las comparaciones bilaterales que indican el porcentaje de aparición (OR) en relación al control, en el intervalo de confianza (IC) del 95%. Las diferencias son significativas cuando *p<0,05 ó **p<0,001. *No computable, no se ha calculado por no haber variabilidad en los datos.

6.3.3c. Polimorfismos *Drd3* rs6280

El análisis de la distribución del porcentaje de aparición de los diferentes genotipos del polimorfismo rs6280 (figura 17) del gen *Drd3*, muestra que la presencia del genotipo mutado T/T, presenta una mayor frecuencia en los pacientes de EP en nuestra muestra de estudio, con una diferencia estadísticamente significativa en relación a los controles (p=0,010), siendo el factor de riesgo en esta patología OR:11,08, con un IC (1,96-62,5). En el análisis por género, aparece con una frecuencia significativamente mayor (p=0,001). No encontramos diferencias significativas en la frecuencia de las diferentes formas alélicas entre el resto de grupos de estudio (tabla 12).

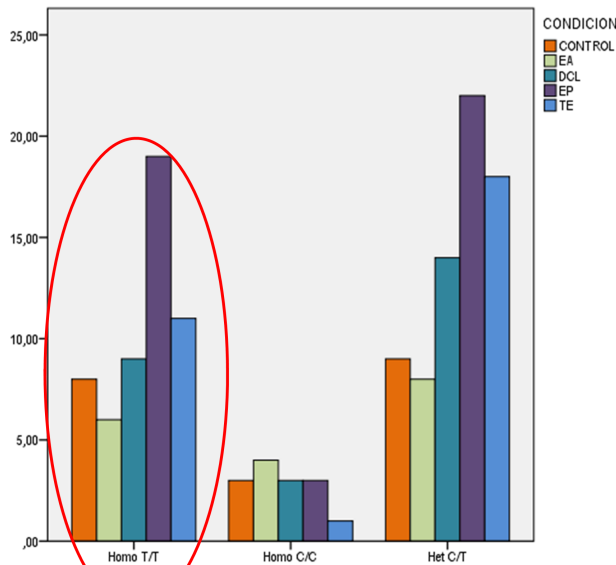


Figura 17. Distribución de la frecuencias genotípicas del polimorfismo rs6280 del gen *Drd3* en las enfermedades neurodegenerativas. El círculo rojo indica el genotipo mutado en homocigosis.

Drd3rs6280					Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p	Comparaciones entre grupos OR(IC95%) , p		
	Control (N=20; 40 alelos)	DCL (N=26; 52 alelos)	EA (N=18; 36 alelos)	EP (N=44; 88 alelos)	TE (N=30; 60 alelos)	Control/DCL	Control/EA	Control/EPA	Control/TE	
Genotipo	T/T	4(20)	9(34,6)	6(33,3)	19(43,2)	8(26,7)	5,17(0,86-59,6)0,11	2,63(0,45-15,3)0,28	11,1(2,0-62,5)0,006*	3,5(0,8-15,2)0,15
	T/C	9(45)	14(53,8)	8(44,4)	22(50)	18(60)	7,16(0,86-59,7)0,7	1,56(0,33-7,36)0,58	5,7(1,2-27,1)0,03*	3,5(0,63-19,5)0,09
	C/C	7(35)	3(11,5)	4(22,2)	3(6,8)	4(13,3)	5,17(0,86-59,6)0,11	2,63(0,45-15,3)0,28	11,1(2,0-62,5)0,006*	3,5(0,63-19,5)0,15
Frecuencia alélica	Portador	17(42,5)	20(55,6)	32(61,5)	60(68,2)	34(56,7)	2,17(0,94-5,01)0,07	1,69(0,68-4,20)0,26	2,90(1,34-6,27)0,007*	1,77(0,79-3,97)0,17
	No portador	23(57,5)	16(44,4)	20(38,5)	28(31,8)	26(43,3)	0,46(0,20-1,07)0,07	0,59(0,24-1,47)0,26	0,35(0,16-0,75)0,007*	0,55(0,25-1,27)0,17

Tabla 12. Polimorfismo rs6280 del *Drd3*. Frecuencia genotípica y variaciones alélicas del polimorfismo entre pacientes con enfermedades neurodegenerativas y controles. Las columnas 1 a 5 representan la frecuencia absoluta y el porcentaje de aparición. Las columnas 6 a 9 representan las comparaciones bilaterales que indican el porcentaje de aparición (OR) en relación al control de ese alelo en relación al control, en el intervalo de confianza (IC) del 95%. Las diferencias son significativas cuando * $p < 0,05$ ó ** $p < 0,001$.

Mirando únicamente el polimorfismo anómalo, asociado a una mayor incidencia de determinadas alteraciones neurológicas, observamos que la incidencia en los diferentes grupos de estudio no es homogénea (figura 18). En controles y en pacientes de TE, no aparece el genotipo mutado del polimorfismo *Drd2* rs1800497.

En los pacientes de DCL y EA, los genotipos codificantes de las variables anómalas de los polimorfismos del *NRG-1*, son más abundantes que en el resto de los grupos estudiados.

Más del 40% de los individuos que presentan el polimorfismo anómalo del *Drd3*, rs6280, presentan la EP.

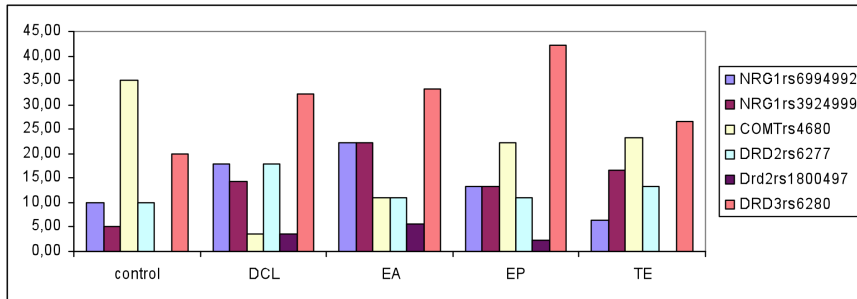


Figura 18. Porcentaje de aparición de polimorfismos asociados a patologías neurológicas (alelo mutado en homocigosis). El análisis de los diferentes genotipos de los genes estudiados y sus variaciones alélicas de controles y pacientes de las diferentes patologías se visualizan en las tablas 7 a 12.

6.4. Determinar las variaciones en las pruebas de RAS/PPI, en pacientes con enfermedades Neurodegenerativas

6.4.1. Reflejo de Sobresalto

Estudiamos el reflejo auditivo de sobresalto en controles (35), pacientes con EA (21), pacientes con DCL (33), pacientes con EP (52) y pacientes con TE (34).

La amplitud del RAS es mayor en los pacientes con DCL que en el resto de las enfermedades neurodegenerativas estudiadas, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa (figura 19A). Las diferencias, sin embargo, sí son significativas en las mujeres con DCL ($p=0,008$) en relación a las controles y a las mujeres con TE ($p=0,026$) (figura 19B). Excepto controles y pacientes con TE, en los que la amplitud media del RAS sigue el patrón habitual de ser mayor en hombres que en mujeres, las mujeres con DCL, EA y EP, tienen una mayor respuesta de sobresalto que los hombres.

En el análisis inter-sujetos (condición x género) encontramos diferencias significativas entre mujeres y hombres con DCL en la amplitud del RAS ($p=0,016$) y entre mujeres con DCL y mujeres controles ($p=0,008$) y mujeres con TE ($p=0,025$).

En cuanto a la latencia del RAS, no hay diferencias significativas entre grupos (tabla 13). En

los análisis por grupo y género encontramos diferencias significativas en la latencia del RAS en los pacientes de EA, es mayor en relación al grupo control ($p=0,04$). También en esta patología, las diferencias son mayores en los hombres que en las mujeres, pero las diferencias no alcanzan significado estadístico.

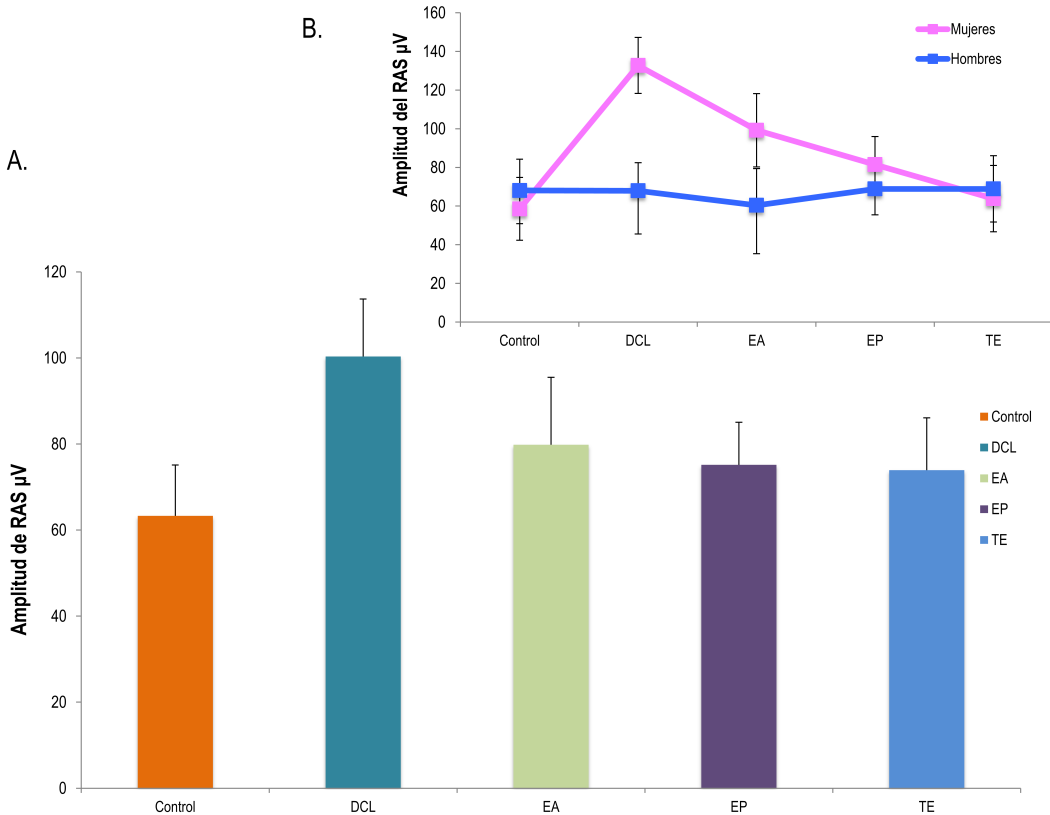


Figura 19. A. Amplitud del Reflejo de sobresalto en las enfermedades neurodegenerativas. B. Amplitud del Reflejo de sobresalto analizado por género en las enfermedades neurodegenerativas. Las columnas (A) y puntos (B) representan valores medios \pm EEM.

6.4.2. Habitación

La habitación de la RAS, medida en valores porcentuales, no presenta diferencias significativas entre las diferentes patologías estudiadas, aunque se aprecia una menor habitación al RAS en pacientes con DCL que en controles (figura 20A).

Si estudiamos el efecto del género sobre este parámetro, vemos que hombres y mujeres presentan patrones diferentes. Las mujeres del grupo control se habitúan menos que el resto de las mujeres afectadas con patologías neurodegenerativas (figura 20B), con la excepción de las pacientes con EA, pero en ningún caso, las diferencias son significativas. Los hombres

controles, por el contrario, presentan una mayor habituación al RAS que el resto de los grupos experimentales, no encontrándose tampoco significado estadístico en esta diferencia.

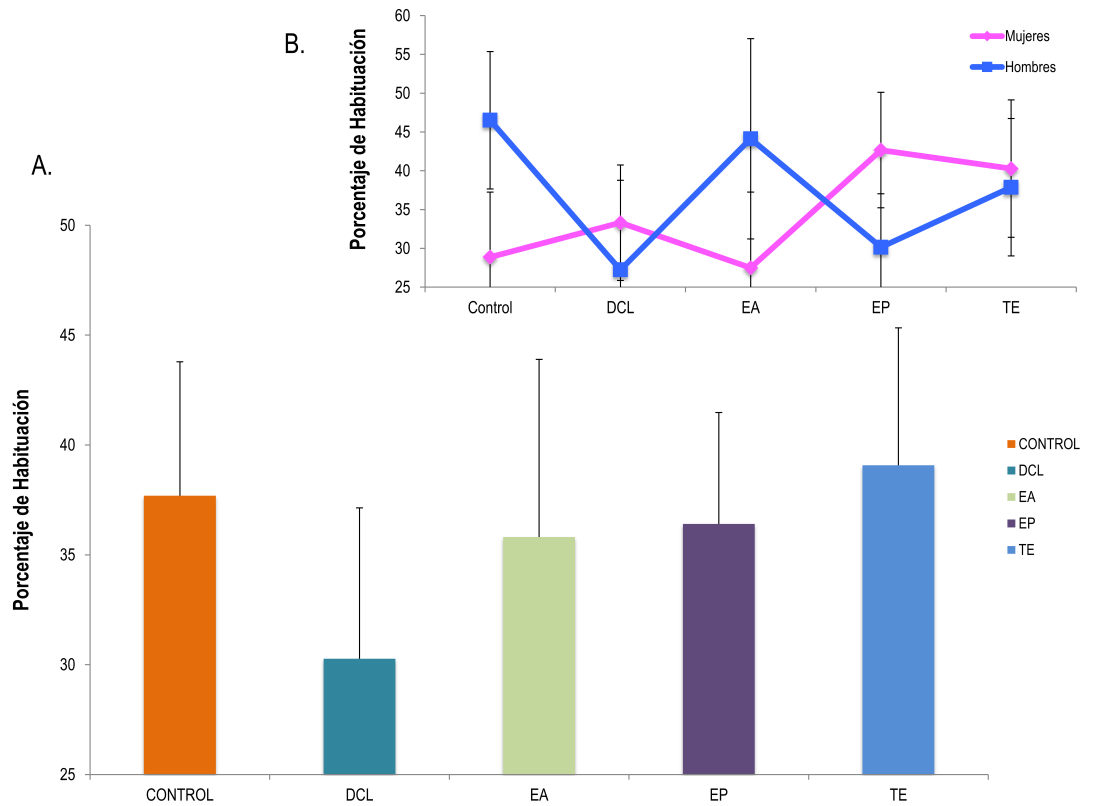


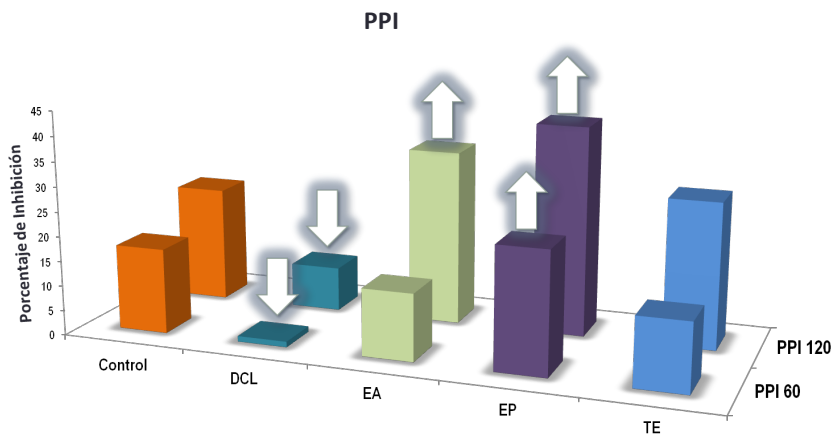
Figura 19. A. Análisis de la Habitación del RS en las enfermedades neurodegenerativas. B. Análisis de la Habitación del RS por género en las enfermedades neurodegenerativas. Las columnas (A) y puntos (B) representan valores medios \pm EEM.

	Control (n=35)	EA (n=22)	DCL (n=34)	EP (n=52)	TE (n=34)	^a Valor de F	^b Valor de p
Amplitud RAS _(μV)	62,77±12,01	79,81±15,73	100,35±13,36	75,18±9,87	73,91±12,17	1,146	0,337
Latencia RAS (ms)	74,73±8,93	73,02±11,70	74,15 ± 9,93	88,31±7,34	70,52±9,05	0,778	0,541
PPI ₆₀	17,13±5,31	13,52±6,95	1,12 ± 5,90	24,51±4,36	13,79±5,38	2,616	0,037*
Latencia PPI ₆₀ (ms)	95,51±3,52	100,98±4,62	102,04±3,91	110,05±2,89	103,41±3,57	2,671	0,034*
PPI ₁₂₀	23,53±5,23	35,14±6,85	8,95±5,81	42,08±4,29	29,39±5,29	5,762	0,000**
Latencia PPI ₁₂₀ (ms)	95,20±4,47	88,88 ± 5,86	90,85±4,97	92,43±3,67	84,38±4,53	0,819	0,514
PPF	23,23±4,61	40,63 ± 6,05	19,26±5,13	45,85±3,79	31,79±4,68	6,190	0,000*
Latencia PPF (ms)	81,38±3,23	69,38 ± 4,24	77,95±3,59	73,58±2,65	73,78±3,27	1,662	0,161
Habitación (%)	37,69±6,09	35,81±8,09	30,27±6,87	36,40±5,08	39,08±6,26	0,55	0,906

Tabla 13. Parámetros de evaluación del RAS y de sus modificaciones. Valores medios (± EEM) en pacientes y controles. Abreviaturas: n= números de sujetos; RAS = Reflejo Auditivo de Sobresalto; PPI = Inhibición por un estímulo previo; PPF= Porcentaje de facilitación. ^a Valor de la F limite inferior para el nivel de significación. ^b Valor de p significación estadística. Grado de significación p<0,05 (*) y p<0,001 (**).

6.4.3. Inhibición por un estímulo previo

Hemos utilizado dos paradigmas experimentales para la medición de este parámetro, 60 y 120 ms de intervalos prepulso-pulso respectivamente. Se aprecia un efecto diferencial de la PPI (figura 21A) cuando el tiempo entre el prepulso-pulso es de 60ms entre los pacientes de DCL y EP, disminuyendo en el primer caso y aumentando en el segundo ($p=0,017$). Cuando el intervalo entre prepulso-pulso es de 120 ms, se puede apreciar que, en relación a los controles, disminuye en los DCL y aumenta en los EP ($F_{1,82}= 8,52$; $p=0,005$) y EA pudiendo encontrar diferencias significativas entre las diferentes patologías. Así, se diferencian los pacientes de DCL y EA ($p=0,04$) y los de DCL y EP ($p=0,000$). Estos análisis los vemos en la figura 21B.



B.

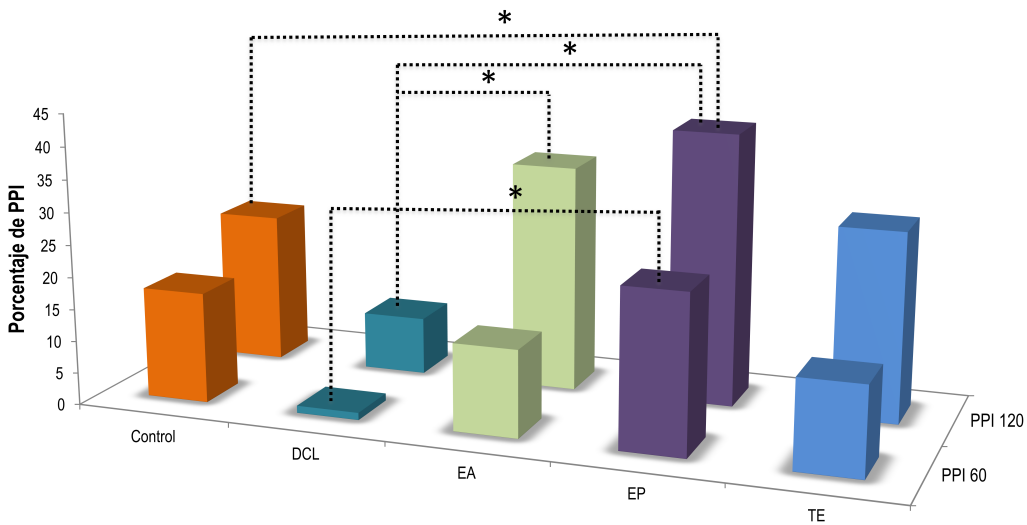


Figura 21. A. Modificaciones de la PPI en las enfermedades neurodegenerativas por diferentes intervalos de prepulso-pulso. **B.** Comparaciones entre grupos en las enfermedades neurodegenerativas y controles. *Abreviaturas:* PPI₆₀, porcentaje de inhibición del RAS cuando el intervalo entre el prepulso-pulso es de 60 ms. PPI₁₂₀, porcentaje de inhibición del RAS cuando el intervalo entre el prepulso-pulso es de 120 ms. (*) indica diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Las columnas representan valores medios.

Los análisis de la latencia en las pruebas de inhibición prepulso a diferentes intervalos prepulso-pulso muestran diferencias significativas entre controles y EP cuando el ISI es de 60ms ($p=0,017$).

Analizando el género (figura 22A), además de la condición, vemos que la diferencia en la PPI₆₀ que se observaba entre DCL y EP, sólo se manifiesta en los hombres ($p=0,017$). Midiendo la PPI₁₂₀, también sólo se aprecian en los hombres diferencias significativas entre los pacientes de DCL y EP ($p=0,00$), los de DCL y TE ($p=0,026$) y los controles y EP ($p=0,019$) (figura 22B).

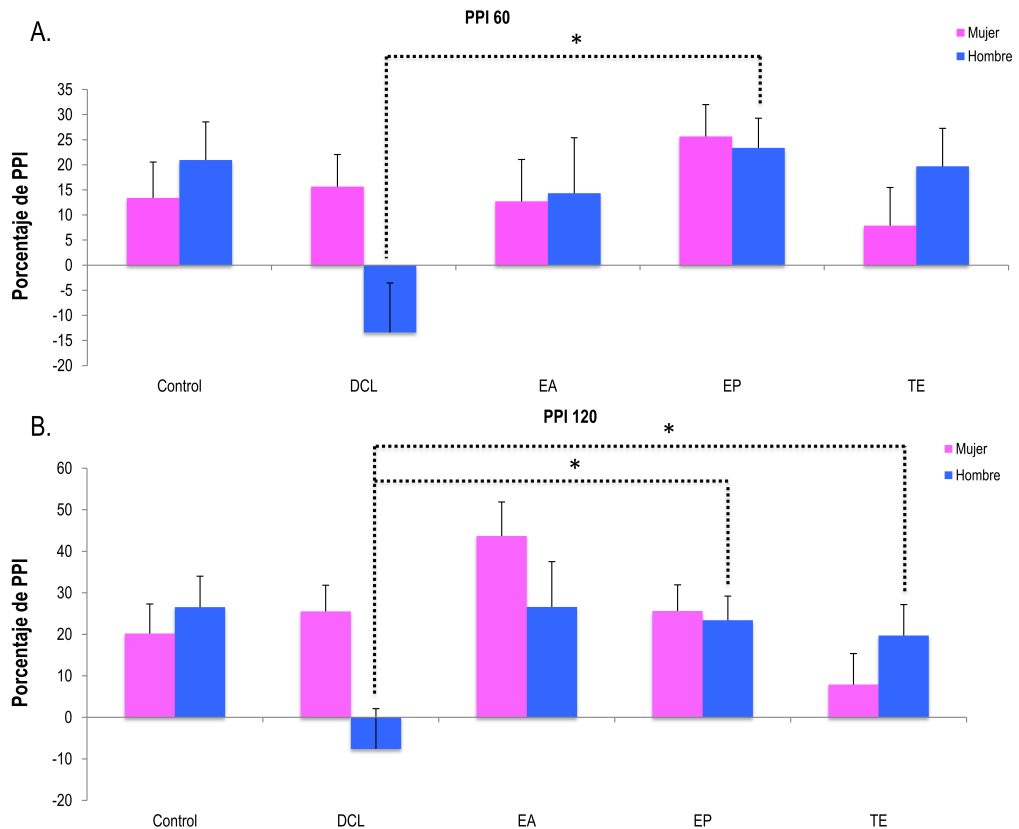


Figura 22. Modificaciones de la inhibición del reflejo de sobresalto en las enfermedades neurodegenerativas analizadas por género. **A.** Cuando el ISI es 60ms. **B.** Cuando el ISI es 120ms. (*) indica diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Las columnas representan valores medios \pm EEM.

6.4.4. Facilitación

Analizando la facilitación del reflejo de sobresalto auditivo (PPF), (figura 23A), se observa que hay una facilitación del reflejo en los EA y EP, con diferencias significativas en relación a los controles en el segundo caso ($p=0,045$). El comportamiento más disimilar lo muestran pacientes con EP y DCL de ($p=0,001$). En el análisis por género, encontramos diferencias significativas entre hombres con EP y Controles ($p=0,045$) y entre hombres EP y DCL ($p=0,001$) (figura 23B).

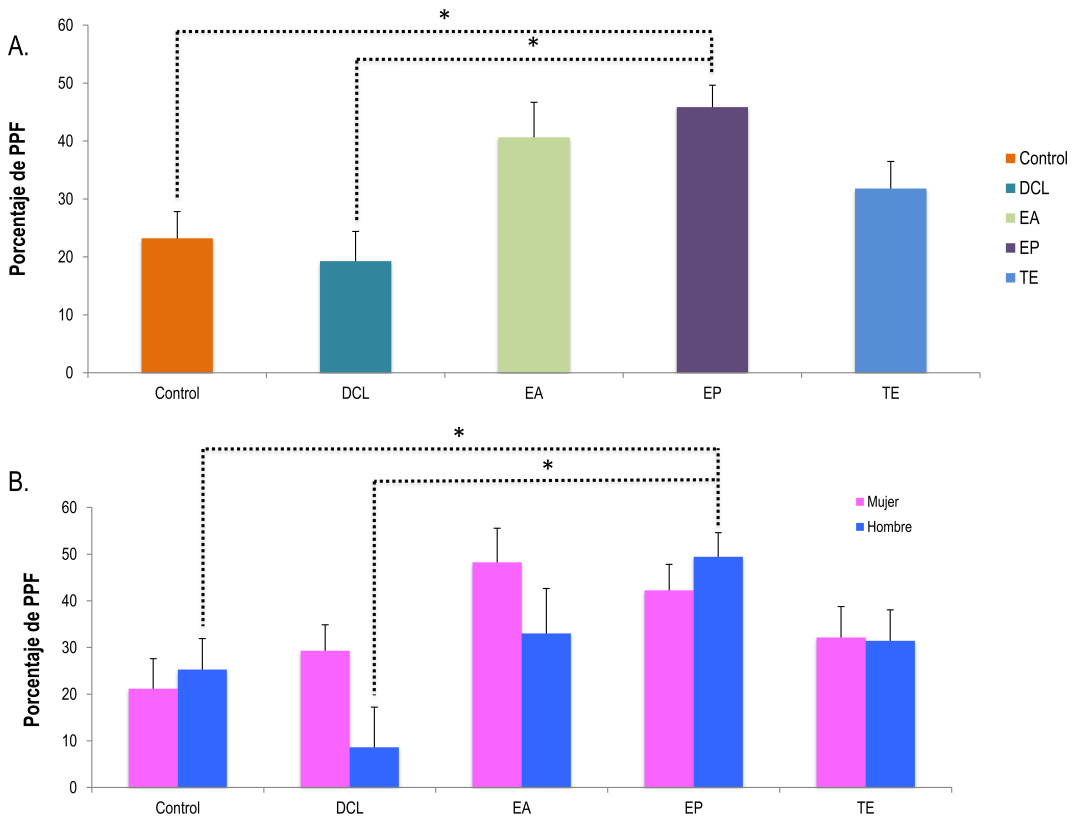


Figura 23. A. Porcentaje de facilitación del RAS (PPF) en las enfermedades neurodegenerativas. **B.** Análisis de la PPF agrupados por género. (*) representa diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Las columnas representan valores medios \pm EEM.

6.5. Correlaciones entre PPI/PPF y las distintas variables estudiadas.

6.5.1. Correlaciones entre PPI/PPF y la evaluación cognitiva.

Utilizando los valores previamente evaluados de la PPI y la evaluación cognitiva realizamos correlaciones de Pearson para ambas variables (tabla 14). Encontramos que hay una relación directa entre el **GDS** y los valores de PPI₁₂₀ ($p=0,010$) y de PPF ($p=0,005$) en pacientes con DCL. En esta variable, no encontramos correlación entre los valores de PPI en los demás grupos de sujetos.

La actividad funcional se correlaciona negativamente en los pacientes de EP con la PPI₁₂₀ ($p=0,010$) y la PPF ($p=0,021$). En el **MMSE**, sólo encontramos correlación en los pacientes con EP, de manera que a medida que aumenta la puntuación del **MMSE**, mayor es la PPI₁₂₀ ($p=0,037$) y la PPF ($p=0,021$).

No se encontró correlación con la **fluidez verbal** y la PPI/PPF en ninguno de los grupos. En cuanto a los test que evalúan atención, memoria de trabajo auditiva y espacial, el **ítem de porcentaje de reconocimiento de texto** tiene una correlación positiva con la PPI₁₂₀ ($p=0,027$) y con la PPF ($p=0,043$) en el DCL.

En el **ítem de recuerdo de parejas de palabras** encontramos una correlación positiva con la PPF ($p=0,021$) en los pacientes con EP. El **ítem de porcentaje de retención pareja de palabras** se correlaciona en los pacientes con TE con la PPI₁₂₀ ($p=0,004$) y con la PPF ($p=0,005$).

	Control			DCL			EA			EP			TE			
	PPI ₆₀	PPI ₁₂₀	PPF	PPI ₆₀	PPI ₁₂₀	PPF	PPI ₆₀	PPI ₁₂₀	PPF	PPI ₆₀	PPI ₁₂₀	PPF	PPI ₆₀	PPI ₁₂₀	PPF	
GDS	0,132	0,265	0,202	0,241	0,472**	0,399*	-0,003	0,130	0,286	0,153	-0,080	-0,093	-0,128	-0,029	0,149	
Actividades Funcionales	0,255	0,220	0,187	0,096	0,120	0,181	-0,329	-0,287	-0,304	0,261	-0,353*	-0,386*	0,293	0,206	0,298	
MMSE	0,196	0,048	0,046	0,006	-0,005	0,016	0,161	0,161	0,085	0,153	0,291*	0,320*	-0,110	-0,167	-0,179	
Test de Isaac	-0,034	0,017	-0,092	0,093	0,149	0,259	0,068	0,078	-0,127	0,211	0,153	0,188	-0,190	-0,042	-0,041	
Test de Isaac letra P	-0,178	-0,353	-0,265	0,251	0,247	0,201	0,387	0,333	0,278	0,052	0,111	0,092	0,137	0,083	0,166	
Test de Wechler	Texto	-0,205	0,031	-0,076	0,250	0,160	0,157	0,095	0,202	0,133	0,105	0,181	0,219	-0,069	0,010	0,028
	Pendiente de aprendizaje de Texto	0,235	-0,169	-0,052	0,122	0,098	0,123	-0,174	0,094	0,135	0,037	0,025	0,030	0,201	0,313	0,211
	Recuerdo de Texto	-0,325	-0,148	-0,156	0,300	0,312	0,253	0,234	0,385	0,288	0,092	0,097	0,107	0,071	0,152	0,148
	Reconocimiento de Texto	-0,205	-0,173	-0,105	0,151	0,107	0,135	0,049	0,127	0,042	0,116	0,196	0,260	0,056	0,178	0,071
	Porcentaje de Reconocimiento de	-0,280	-0,214	-0,258	0,264	0,410*	0,379*	0,259	0,419	0,319	0,198	0,178	0,168	0,081	0,002	-0,034
	Letras y Números	-0,219	-0,200	-0,053	0,280	0,210	0,120	-0,002	0,077	-0,049	0,176	0,209	0,250	0,178	0,118	0,097
	Parejas de Palabras	-0,244	-0,141	-0,140	0,249	0,279	0,241	0,252	0,286	0,214	0,136	0,260	0,269	-0,110	0,057	0,003
	Pendiente de aprendizaje	-0,176	-0,275	-0,081	0,199	0,234	0,171	0,271	0,413	0,374	-0,003	0,201	0,224	-0,036	0,093	0,105
	Recuerdo de Parejas de Palabras	-0,128	-0,097	-0,007	0,203	0,226	0,159	0,173	0,282	0,236	0,121	0,258	0,318*	-0,119	0,200	0,152
	Porcentaje de Retención	0,220	0,091	0,089	0,204	0,230	0,139	0,169	0,156	0,181	-0,002	0,172	0,227	0,237	0,484**	0,473**
Reconocimiento de Parejas de Palabras	0,340	-0,045	0,310	0,022	-0,028	-0,256	0,134	0,298	0,142	0,022	0,059	0,123	-0,110	-0,037	-0,061	

Tabla 14. Correlaciones entre las mediciones de PPI y los parámetros de evaluación cognitiva. R-valor. Correlación de Pearson. Nivel de correlación bilateral significativa $p < 0,01$ (**) y $p < 0,05$ (*).

6.5.2a. Correlaciones entre PPI/PPF y evaluación motora UPDRs

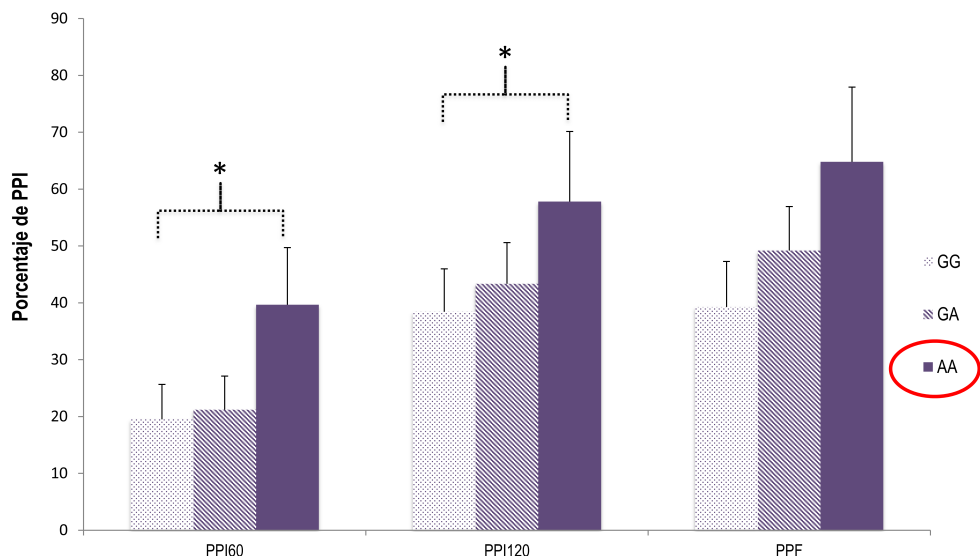
Utilizando los valores previamente evaluados de la PPI y del UPDRs realizamos correlaciones de Pearson para las variables, de PPI₆₀, PPI₁₂₀ y PPF con la puntuación total del UPDRs y la subescala UPDRs III. No encontramos correlación entre los valores de PPI/ PPF de los pacientes de EP y las puntuaciones del UPDRs.

6.4.2b. Correlaciones entre PPI/PPF y evaluación motora TETRAS

Utilizando los valores previamente evaluados de la PPI y el TETRAS realizamos correlaciones de Pearson para las variables, de PPI₆₀, PPI₁₂₀ y PPF con la puntuación total del TETRAS. No encontramos correlación entre los valores de PPI/ PPF de los pacientes de TE y las puntuaciones del TETRAS.

6.5.3. Correlaciones entre PPI/PPF y polimorfismos de ADN

Analizamos en los individuos que presentan EP la diferencia entre las personas con diferentes genotipos de los polimorfismos rs6994992 y rs39924999 del gen *NRG-1* y el valor de la PPI, encontramos que los que poseen el genotipo mutado tienen mayor PPI que los individuos que presentan el genotipo homocigótico control o heterocigótico (figuras 24 A y B).



B.

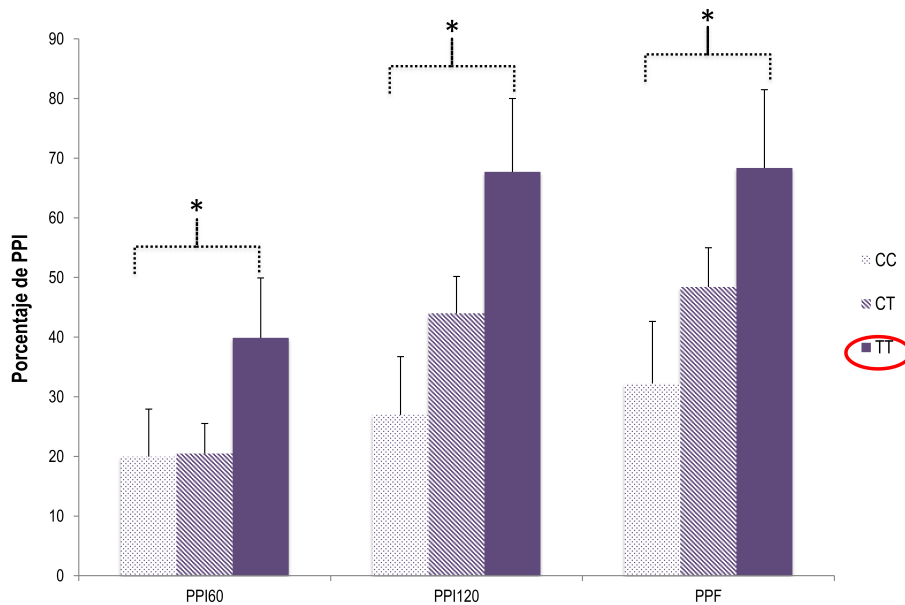


Figura 24 A. Valores de la PPI y PPF agrupados por genotipo para el polimorfismo rs6994992 del gen *NRG-1* en la EP. **B.** Valores de la PPI y PPF agrupados por genotipo para el polimorfismo rs3924999 del gen *NRG-1* en la EP. Las columnas representan valores medios \pm EEM. (*) indica diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

Dos de las patologías que presentan alteraciones cognitivas, DCL y EA, se diferencian en su comportamiento al evaluar la PPI y la PPF en los individuos que presentan el genotipo mutado en homocigosis del polimorfismo rs6994992 del gen *NRG-1* (figura 25).

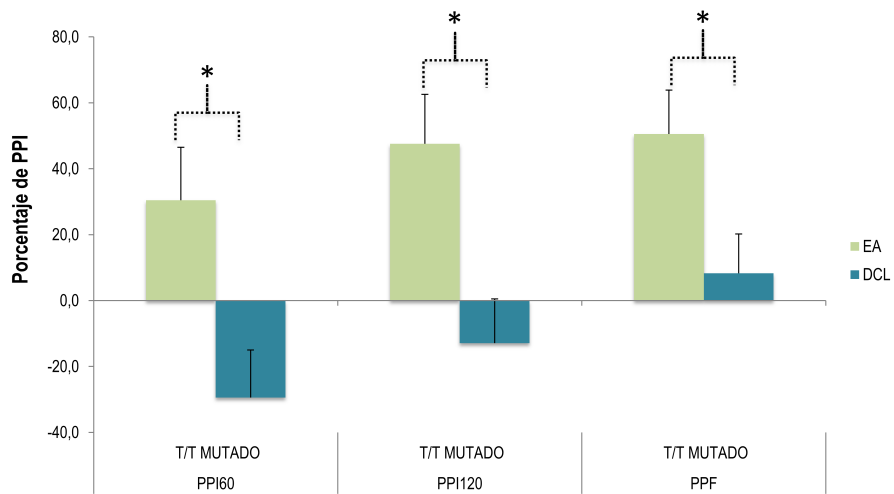


Figura 25. Valores de la PPI y PPF agrupados por genotipo para el polimorfismo rs6994992 del gen *NRG-1* en los pacientes con EA con respecto a los pacientes con DCL. Las columnas representan valores medios \pm EEM. (*) representa diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

Finalmente, el polimorfismo rs6280 del *Drd3* discrimina a los controles de los pacientes EP que presentan genotipo heterocigótico y homocigótico mutado cuando se evalúa la PPI₁₂₀ y la facilitación del RAS (figura 26).

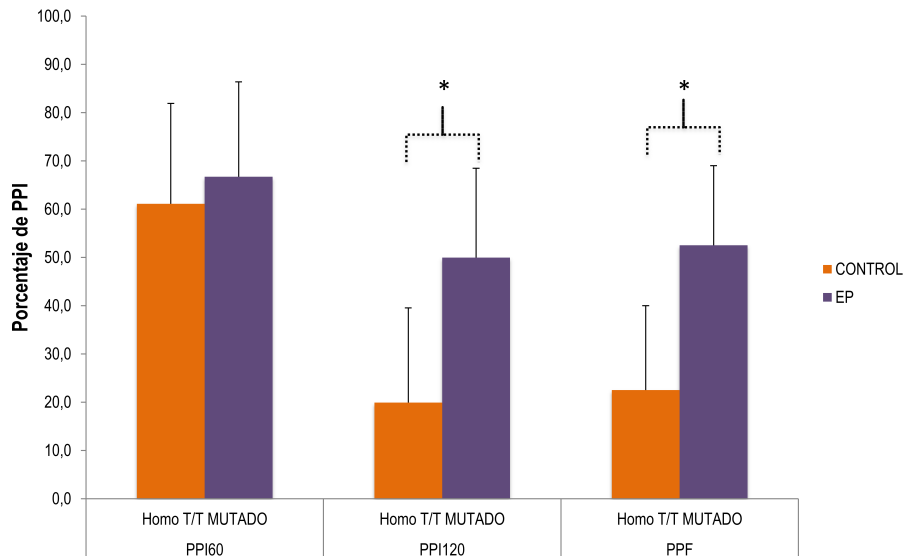


Figura 26. Valores de la PPI y PPF agrupados por genotipo para el polimorfismo rs6280 del gen *Drd3* en los pacientes con EP con respecto a los controles. Las columnas representan valores medios \pm EEM. (*) representa diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

Más correlaciones entre la evaluación de la PPI/PPF y los diferentes genotipos de los polimorfismos estudiados se pueden ver en el Anexo V.

6.6. Resultados de las diferentes pruebas diagnósticas en relación a los controles.

6.6.1. Análisis de las variables estudiadas en el DCL

En la tabla 15 encontramos un resumen del análisis de las variables que son significativas en el DCL con respecto al grupo control. En el DCL la amplitud del RAS, la PPI₆₀ y la habituación diferencia a estos pacientes de los controles, también encontramos diferencias en los distintos test cognitivos y en el polimorfismo de gen *COMT*.

En los análisis del RAS vemos que la amplitud del RAS es mayor en mujeres con DCL que en mujeres control con diferencia significativa ($p=0,019$). La habituación del RAS, medida en valores porcentuales, presenta diferencias significativas entre los hombres con DCL y los hombres control ($p=0,012$), se aprecia una menor habituación al RAS en pacientes con DCL que en controles.

En cuanto a la PPI hemos utilizado dos paradigmas experimentales para la medición de este parámetro, 60 y 120ms, se aprecia un efecto diferencial de la PPI₆₀ entre los hombres de DCL y hombres control ($p=0,005$). Cuando el intervalo entre prepulso-pulso es de 120 ms, se diferencian los hombres controles de los DCL ($p=0,009$).

Los análisis de la latencia de la PPI diferencias significativas entre las mujeres control y DCL en la PPI₆₀ ($p=0,006$).

En la **escala funcional de Pfeffer**, que mide las actividades funcionales de los sujetos de manera inversa, siendo 0 las personas autónomas y 33 las más dependientes, encontramos que hay una diferencia significativa entre controles y DCL ($p=0,059$).

La fluencia verbal, medida a través del **Test de Isaac**, sólo detecta afección en los pacientes de DCL de forma significativa con respecto a los controles ($p=0,020$), en el ítem de la letra P. Esta diferencia también se observa en hombres con DCL y hombres control ($p=0,003$).

En el **test Wechler** utilizamos las escalas dedicadas a los procesos de atención, procesos ejecutivos y memoria auditiva. Encontramos diferencias significativas entre pacientes con DCL y controles en *mediciones de recuerdo, reconocimiento de textos I* ($p=0,023$) (esta diferencia se observa también en hombres con DCL y hombres control $p=0,028$). En análisis por género, encontramos diferencias entre mujeres DCL y mujeres control ($p=0,038$) y hombres DCL y hombres control ($p=0,018$), en el *reconocimiento de parejas de palabras* ($p=0,002$).

En el *recuerdo de textos II*, los pacientes con DCL obtuvieron una puntuación menor que los controles ($p=0,018$); esta diferencia se observa también en hombres con DCL y hombres control ($p=0,019$). Un resultado semejante se obtuvo con la prueba de *reconocimiento de las ideas* presentes en los textos. Los Controles obtuvieron valores significativamente superiores a los pacientes con DCL ($p=0,023$).

Podemos concluir que la codificación y retención de información auditiva está deteriorada en los pacientes con DCL frente a los controles.

En cuanto a la subescala de *Parejas de Palabras como en el reconocimiento de parejas de palabras*, los pacientes con DCL obtuvieron las puntuación más bajas, encontrándose diferencias significativas frente a los controles ($p=0,002$), ($p=0,049$), respectivamente. Luego,

no es tanto un problema de recuperación, sino un deterioro en los procesos de codificación de nuevas asociaciones. Estos mismos resultados se obtuvieron en el análisis del *porcentaje de retención de las parejas de palabras*, en el que los controles obtuvieron puntuaciones más altas frente a los pacientes con DCL ($p=0,015$). De este modo, se confirma el déficit en los procesos de codificación y retención de los pacientes con DCL.

En el análisis de la distribución del polimorfismo del gen *COMT*, indica que hay diferencias significativas entre los pacientes con DCL y los controles ($p=0,017$), con alto índice de riesgo (OR:1,26).

	Control(35)	DCL(33)	Control		DCL		
			Hombre(17)	Mujer(18)	Hombre(13)	Mujer(20)	
Amplitud RAS _(μV)	65,5±16,2	107,0±17,1	68,0±23,2	63,0±22,6	76,0±26,6	137,9±21,4*	
PPI ₆₀	16,5±5,1	3,9±5,4	20,9±7,3	12,0±7,1	-11,4±8,3*	19,3±6,8	
Latencia PPI ₆₀	95,2±3,4	103,1±3,6	98,9±4,9	91,5±4,8	96,1±5,7	110,2±4,6*	
PPI ₁₂₀	23,6±5,6	12,1±5,9	26,5±8,0	20,7±7,9	-6,5±9,2*	30,7±7,4	
Habitación	37,3±6,3	28,1±6,6	46,5±9,0	28,1±8,7	11,4±10,3*	44,9±8,3	
Actividades Funcionales	1,4±0,9	3,5±0,7*	1,9±1,3	0,9±1,2	4,2±1,1	2,8±0,8	
Test de Isaac letra P	8,5±0,6	6,6±0,5*	9,5±0,9	7,6±0,8	5,8±0,8*	7,4±0,6	
Test de Wechler	Texto	22,1±2,8	13,6±2,2*	24,3±4,1	20,0±3,9	11,9±3,5*	15,3±2,7
	Recuerdo de Texto	12,2±2,0	5,9±1,6*	13,4±2,9	11,1±2,8	4,0±2,5*	7,8±2,0
	Reconocimiento de Texto	19,4±1,1	18,1±0,8*	19,8±1,5	19,1±1,5	18,6±1,3	17,6±1,0
	Porcentaje de Reconocimiento de Texto	65,5±9,7	36,2±7,6*	62,5±14,1	68,5±13,3	27,5±12,0	45,0±0,4
	Parejas de Palabras	9,2±1,5	3,1±1,2*	9,0±2,1	9,4±2,0	2,1±1,8*	4,2±1,4*
	Recuerdo Parejas Palabras	2,5±0,5	1,1±0,4*	2,6±0,8	2,4±0,7	0,9±0,7	1,4±0,5
	Porcentaje Retención Parejas de Palabras	66,3±10,9	31,2±8,6*	66,2±15,8	66,3±14,9	29,3±13,5	33,0±10,5
Genotipo COMT rs4680				Comparaciones entre grupos OR(95% IC) (p)			
	A/A	7(36,8)	1(4,2)	21,0(1,8-248,1)0,01*			
	A/G	9(47,4)	14(58,3)	10,9(1,1-103,9)0,04*			
	G/G	3(15,8)	9(37,5)	21,0(1,8-248,1)0,01*			
Frecuencia Alélica	Portador	23(60,5)	16(33,3)	0,33(0,14-0,79)0,01*			
	No portador	15(39,5)	32(66,7)	3,07(1,27-7,43)0,01*			

Tabla 15. Parámetros de evaluación del RAS y de sus modificaciones, test cognitivos y polimorfismos, en pacientes con DCL y controles. Valores medios (± EEM) en pacientes y controles. Las diferencias son significativas cuando *p<0,05 ó ** p<0,001.

6.6.2. Análisis de las variables estudiadas en la EA

Haciendo un resumen de las variables estudiadas en la EA (tabla 16) comparándolas con los controles encontramos que la latencia de la PPI₆₀ por un lado, y la PPF, como su latencia por otro, son marcadores de la EA. En cuanto a las variables de test cognitivos encontramos que en la evaluación de la prueba de Pfeffer hay una diferencia significativa entre controles y pacientes con EA ($p=0,001$), fundamentalmente en los hombres con EA y los controles ($p=0,009$), lo que confirma que estos pacientes tienen una mayor dependencia para desarrollar las actividades de la vida diaria.

Los pacientes con EA muestran un mayor deterioro en sus funciones cognitivas, obteniendo una puntuación muy baja en el **test MMSE**, con una diferencia significativa en relación a los controles ($p=0,000$); en los análisis por género, encontramos diferencias entre los pacientes con EA y los controles ($p=0,013$), siendo los hombres con EA más dependientes.

La *fluidez verbal*, medida a través del **Test de Isaac**, sólo se muestra alterada de forma significativa en los pacientes con EA en relación a los controles ($p=0,000$). Si contemplamos el género de la muestra, se aprecia que tanto las mujeres con EA como los hombres se diferencian de los respectivos controles ($p=0,033$ y $p=0,000$, respectivamente).

En el análisis de varianza, hemos encontrado que, lógicamente, los pacientes con EA mostraron puntuaciones más bajas en todas las pruebas utilizadas que los respectivos controles y que el resto de pacientes. Esto ocurre tanto en *mediciones de recuerdo* como de *reconocimiento de textos I y II* ($p=0,01$), *Números y Letras* ($p=0,001$); *parejas de palabras* ($p=0,05$) y *reconocimiento de parejas de palabras* ($p=0,001$).

	Control(35)	EA(21)	Control		EA		
			Hombre(17)	Mujer(18)	Hombre(7)	Mujer(14)	
Latencia PPI ₆₀	95,2±3,8	100,7±5,2	98,9±5,5	91,5±5,3	92,7±8,5	108,7±6,0*	
PPF	23,1±4,6	39,6±6,3*	25,3±6,6	20,9±6,4	37,1±10,3	42,0±7,3*	
Latencia PPF	80,5±3,2	69,7±4,4*	86,9±4,6	74,2±4,5	69,1±7,1*	70,4±5,1	
Actividades Funcionales	1,4±2,0	9,0±1,9*	1,9±2,9	0,9±2,7	8,9±3,1	9,1±2,1*	
MMSE	27,2±1,1	20,7±1,0**	27,6±1,6	26,8±1,5	21,1±1,7*	19,7±1,2*	
Test de Isaac	36,8±2,0	27,3±1,9**	38,4±2,9	35,2±2,7	26,0±3,1*	28,5±2,1	
Test de Wechler	Texto	22,1±2,2	8,3±2,1**	24,3±3,1	20,0±3,0	8,7±3,4*	7,8±2,3*
	Pendiente de aprendizaje	3,1±0,5	0,8±0,5*	3,0±0,7	3,1±0,7	0,4±0,8*	1,1±0,5*
	Recuerdo de Texto	12,2±1,6	1,6±1,5**	13,4±2,4	11,1±2,3	1,3±2,6**	1,9±1,7*
	Reconocimiento de Texto	19,4±0,8	16,1±0,8*	19,8±1,2	19,1±1,1	15,7±1,3*	16,4±0,9
	Porcentaje de Reconocimiento de Texto	65,5±7,9	10,7±7,5**	62,5±11,5	68,5±10,9	9,2±12,3*	12,3±8,4**
	Letras y Números	4,6±0,6	1,6±0,6**	5,3±0,9	4,0±0,9	2,1±1,0*	1,0±0,7*
	Parejas de Palabras	9,2±1,4	4,0±1,3*	9,0±2,1	9,4±2,0	5,9±2,2	2,1±1,5*
	Porcentaje Retención Parejas de Palabras	66,3±12,2	33,9±11,5	66,3±17,4	66,3±16,7	46,4±19,0	21,3±13,0*
	Reconocimiento Pareja de Palabras	22,9±1,0	17,8±0,9**	22,5±1,4	23,2±1,3	18,7±1,5	16,8±1,0**

Tabla 16. Parámetros de evaluación del RAS y de sus modificaciones, test cognitivos y polimorfismos, en pacientes con EA y controles. Valores medios (\pm EEM) en pacientes y controles. Las diferencias son significativas cuando * $p < 0,05$ ó ** $p < 0,001$.

6.6.3. Análisis de las variables estudiadas en el EP

En la EP, las variables discriminantes en relación a los controles son la PPI₁₂₀ y la PPF (tabla 17). En la PPI₁₂₀ esta diferencia se observa también en los hombres con EP en relación a los controles ($p = 0,019$). Los análisis de la latencia de la PPI, muestran diferencias significativas

entre los pacientes con EP y controles en la PPI₆₀ ($p=0,001$) tanto en hombres ($p=0,033$), como en mujeres ($p=0,013$). Analizando la PPF, también encontramos diferencias entre controles y pacientes con EP ($p=0,00$), tanto en hombres ($p=0,006$) como en mujeres ($p=0,0190$). Finalmente, también encontramos diferencias significativas en la latencia de la PPF entre los hombres con EP y hombres control ($p=0,006$).

En la puntuación obtenida en el **GDS** encontramos diferencias significativas entre los pacientes con EP y los controles ($p=0,049$), indicando síntomas de depresión leve los pacientes EP.

El análisis de la distribución genotípica del polimorfismo rs6280 del gen *Drd3*, indica que la presencia del genotipo alterado T/T, aparece en un porcentaje mayor en los pacientes de EP en nuestro grupo de sujetos, con una frecuencia estadísticamente significativa en relación a los controles ($p=0,010$), siendo el factor de riesgo en esta patología OR:11,08 con un IC de 95% 1,96-62,5.

	Control(35)	EP(52)	Control		EP	
			Hombre(17)	Mujer(18)	Hombre(28)	Mujer(24)
Latencia PPI ₆₀	95,5±3,4±	110,0±2,8**	98,9±4,8	92,1±4,7	112,2±3,8*	107,9±4,1*
PPI ₁₂₀	23,5±4,9	42,1±4*	26,5±7,0	20,5±6,8	47,9±5,5*	36,2±5,9
PPF	23,2±4,7	45,8±3,9**	25,3±6,8	21,2±6,6	49,4±5,3*	42,3±5,7*
Latencia PPF	81,4±3,2	73,6±2,6	86,9±4,6	75,9±4,5	70,4±3,6*	76,7±3,9
Escala de depresión geriátrica	6,6±1,8	10,7±1,0*	5,6±2,6	7,4±2,4	9,9±1,4	11,6±1,5
Genotipo Drd3 rs6280	Comparaciones entre grupos OR(95% IC) (p)					
	T/T	4(20)	19(43,2)	11,1(2,0-62,5)0,006*		
	T/C	9(45)	22(50)	5,7(1,2-27,1)0,03*		
Frecuencia Alelica	C/C	7(35)	3(6,8)	11,1(2,0-62,5)0,006*		
	Portador	23(60,5)	16(33,3)	0,33(0,14-0,79)0,01*		
	No portador	15(39,5)	32(66,7)	3,07(1,27-7,43)0,01*		

Tabla 17. Parámetros de evaluación del RAS y de sus modificaciones, test cognitivos y polimorfismos en pacientes con EP y controles. Valores medios (\pm EEM) en pacientes y controles. Las diferencias son significativas cuando * $p<0,05$ ó ** $p<0,001$.

6.6.4. Análisis de las variables estudiadas en el TE

Resumiendo las variables estudiadas en el TE se aprecia que la latencia en la PPI₆₀ es significativamente diferente entre las mujeres control y TE ($p=0,05$) (Tabla 18).

La *fluencia verbal*, medida a través del **Test de Isaac**, mostró diferencias significativas entre los pacientes con TE y controles ($p=0,005$), con valores mayores en los pacientes con TE que los controles, apreciándose esta diferencia fundamentalmente entre las mujeres TE y las mujeres control ($p=0,000$). En el *ítem de la letra P* encontramos diferencias significativas entre las mujeres con TE y control $p=0,026$.

En el **test Wechler**, encontramos diferencias significativas entre los pacientes TE y controles en el *reconocimiento de textos* ($p=0,011$) y el *reconocimiento de parejas de palabras* ($p=0,029$).

En el *recuerdo de textos II*, los pacientes con TE obtuvieron una puntuación menor que los controles ($p=0,011$) esta diferencia se observa también en mujeres con TE y mujeres control ($p=0,035$).

En cuanto a la subescala de *Parejas de Palabras en pendiente de aprendizaje*, los pacientes con TE obtuvieron la puntuación más alta que los controles, encontrándose diferencias significativas frente a los controles ($p=0,000$). Esta diferencia se observa tanto en hombres ($p=0,011$), como en mujeres ($p=0,032$). En la prueba de *reconocimiento de las parejas de palabras*, de nuevo los pacientes con TE obtuvieron puntuaciones mayores frente a los controles ($p=0,020$), diferencia debida fundamentalmente a los hombres de este grupo ($p=0,027$).

		Control(35)	TE(34)	Control		TE	
				Hombre(17)	Mujer(18)	Hombre(17)	Mujer(17)
Latencia PPI ₆₀		95,5±3,5	103±3,5	98,9±5,0	92,1±4,9	100,8±5,0	106,0±5,0*
Test de Isaac		36,8±0,6	38,9±0,4*	38,4±0,9	35,2±0,8	38,2±0,6	39,6±0,6*
Test de Isaac letra P		8,5±0,4	9,1±0,3	9,5±0,6	7,6±0,5	9,1±0,4	9,1±0,4*
Test de Wechler	Texto	22,1±3,0	29,0±2,1	24,3±4,4	20,0±4,1	27,1±3,0	30,9±3,0*
	Reconocimiento de Texto	19,4±1,0	17,8±1,8*	19,8±1,6	19,1±1,5	22,53±0,99	22,77±0,99*
	Parejas de palabras Pendiente Aprendizaje	1,2±0,5	3,5±0,3**	1,0±0,7	1,3±0,6	3,18±0,46*	3,77±0,46
	Recuerdo Parejas Palabras	2,5±0,6	4,1±0,4*	2,6±0,8	2,4±0,8	4,0±0,57	4,18±0,57
	Reconocimiento Parejas Palabras	22,9±0,3	23,8±0,2*	22,5±0,9	23,2±0,9	23,82±0,33*	23,71±0,33

Tabla 18. Parámetros de evaluación del RAS y de sus modificaciones, test cognitivos y polimorfismos en pacientes con TE y controles. Valores medios (\pm EEM) en pacientes y controles. Las diferencias son significativas cuando * $p < 0,05$ ó ** $p < 0,001$.

6.7. Medidas Longitudinales

A los 9 meses, se repitieron las diferentes técnicas de evaluación diagnóstica a los integrantes del grupo de estudio.

6.7.1. Evaluación Cognitiva

Hemos repetido la evaluación cognitiva de los pacientes utilizando los test que previamente habíamos utilizado para medir la independencia del paciente (**Escala funcional de Pfeffer**), el deterioro cognitivo (**cuestionario MMSE**), la depresión (**GDS**), la fluencia verbal semántica (**test de Isaac**), y la evaluación de la atención y la memoria de trabajo auditiva y espacial (**test de Wechsler III**).

6.7.1a. Evaluación funcional

En la **escala funcional de Pfeffer**, encontramos que los pacientes con DCL se tornan más

dependientes, obteniendo puntuaciones significativamente más altas en la segunda evaluación, tras 9 meses ($p=0,015$), (figura 27). No encontramos diferencias significativas en el resto de pacientes, con lo cual podemos decir que éstos mantienen su independencia.

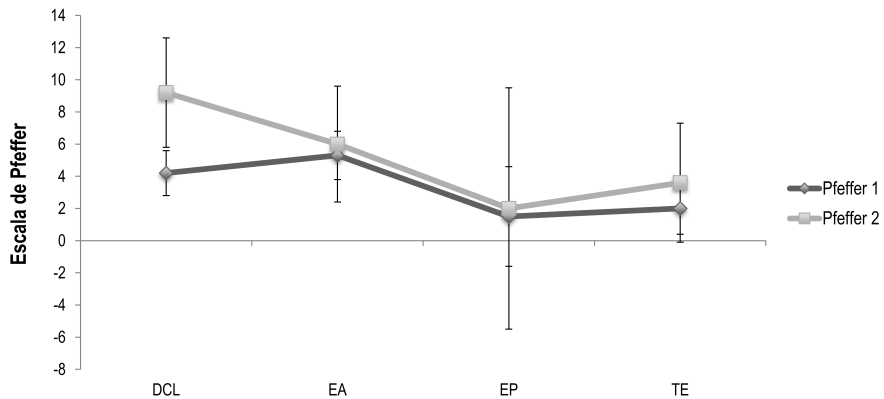


Figura 27. Puntuaciones de la Escala funcional, nueve meses después de la primera evaluación. Los puntos representan valores medios \pm EEM.

6.7.1b. Deterioro cognitivo

Los pacientes con EA muestran un mayor deterioro en sus funciones cognitivas, obteniendo una puntuación muy baja en el **MMSE**. No encontramos diferencias significativas entre la primera y segunda evaluación en ninguno de los casos. En los análisis inter-sujetos, no hay diferencias entre los grupos.

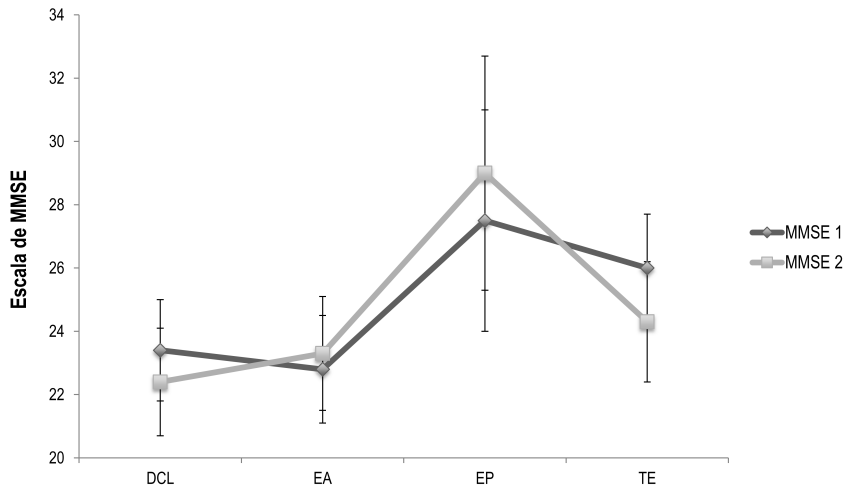


Figura 28. Puntuación del MMSE nueve meses después de la primera evaluación. Los puntos representan valores medios \pm EEM.

6.7.1c. Escala de Depresión geriátrica

Analizamos el grado de depresión de los pacientes mediante la escala de GDS. Los resultados no encuentran diferencias entre los grupos al cabo de 9 meses.

6.7.1d. Fluidez verbal

La fluidez verbal, medida a través del **Test de Isaac**, sólo se modifica en los pacientes de TE de forma significativa con respecto a la primera evaluación ($p=0,028$). En el resto de grupos, se observa una disminución en la fluidez verbal desde la primera a la segunda evaluación (tabla 19), pero no encontramos diferencias significativas en las mediciones.

6.7.1e. Test de Wechsler

Esta prueba es una herramienta general de evaluación de la memoria en sus diferentes procesos de codificación, retención y recuperación. Realizando comparaciones múltiples, observamos que, lógicamente, los pacientes con EA mostraron puntuaciones más bajas en todas las pruebas del test. Sin embargo, son los pacientes con EP los que muestran un mayor deterioro desde la primera a la segunda evaluación. Esto ocurre tanto en *mediciones de*

recuerdo como de *reconocimiento de textos I* ($p=0,01$) y *II* ($p=0,000$), *Números y Letras* ($p=0,04$); y *parejas de palabras* ($p=0,02$). Los análisis de comparaciones por pares indican que no hay diferencias significativas entre los grupos. Sólo en la subescala de *reconocimiento de textos*, hemos apreciado diferencias significativas entre los pacientes TE y el resto de los grupos, con los pacientes de EA ($p=0,05$), de DCL ($p=0,001$) y de EP ($p=0,01$). Por último, en la variable *pendiente de aprendizaje auditivo*, la diferencia entre la recuperación en la primera y segunda ocasión en que se oye la historia es notable entre el grupo de EA frente al grupo de pacientes EP ($p=0,05$) y de TE ($p=0,001$). Los pacientes de DCL también difieren en esta variable de los pacientes con EA ($p=0,05$). En el *recuerdo de textos II*, los pacientes con TE obtuvieron una puntuación mayor que los pacientes con EA ($p=0,001$), con DCL ($p=0,001$) y con EP ($p=0,001$). Los pacientes de EA tienen una puntuación significativamente menor que los pacientes con EP ($p=0,01$). Un resultado semejante se obtuvo con la prueba de *reconocimiento de las ideas presentes en los textos*. Los pacientes con TE obtuvieron valores significativamente superiores a los pacientes con EA ($p=0,001$), con DCL ($p=0,001$) y EP ($p=0,05$). La puntuación obtenida por los pacientes con EA fue significativamente menor que la obtenida por los pacientes con EP ($p=0,05$).

Podemos concluir que la codificación y la retención de la información auditiva están comenzando a deteriorarse en los pacientes de EP.

		EA	DCL	EP	TE	^a Valor de F	^b Valor de p
Actividades Funcionales		4,9±1,3 6,5±3,0 ₍₂₎	3,6±1,1 8,7±2,5* ₍₂₎	1,5±3,0 2,0±7,1 ₍₂₎	2,0±1,5 3,6±3,6 ₍₂₎	0,9 0,6 ₍₂₎	0,5 0,6 ₍₂₎
GDS		11,3±1,2 7,7±1,6 ₍₂₎	8,4±1,0 7,4±1,4 ₍₂₎	5,0±2,9 3,5±3,9 ₍₂₎	4,5±1,5 6,3±1,9 ₍₂₎	4,6 0,4 ₍₂₎	0,009* 0,75 ₍₂₎
MMSE		21,6±1,5 22,1±1,6 ₍₂₎	24,5±1,2 23,8±1,4 ₍₂₎	27,5±3,5 29,0±3,8 ₍₂₎	26,0±1,7 24,2±1,9 ₍₂₎	1,7 1,0 ₍₂₎	0,2 0,4 ₍₂₎
Test de Isaac		30,3±1,9 28,2±3,0 ₍₂₎	34,7±7 31,9±2,5 ₍₂₎	37,0±4,4 34,5±6,9 ₍₂₎	38,5±2,2 33,3±3,4 ₍₂₎	2,9 0,58 ₍₂₎	0,05 0,64 ₍₂₎
Test de Isaac letra P		8,2±0,8 6,8±1,9 ₍₂₎	7,6±0,7 8,3±1,6 ₍₂₎	9,0±1,0 8,5±2,3 ₍₂₎	7,9±1,0 6,0±2,3 ₍₂₎	0,2 0,3 ₍₂₎	0,9 0,9 ₍₂₎
Test de Wechler	Texto	8,6±4,0 11,5±3,5 ₍₂₎	17,0±3,4 12,9±3,0 ₍₂₎	34,0±9,4 18,0±8,3 ₍₂₎	22,5±4,7 24,3±4,1 ₍₂₎	3,0 2,3 ₍₂₎	0,5* 0,1
	Pendiente de aprendizaje	1,0±1,0 1,5±0,9 ₍₂₎	3,1±0,8 3,1±0,8 ₍₂₎	3,5±2,2 2,0±2,1 ₍₂₎	4,8±1,1 3,8±1,0 ₍₂₎	2,3 1,1 ₍₂₎	0,09 0,4 ₍₂₎
	Recuerdo de Texto	3,1±2,7 4,7±2,3 ₍₂₎	8,7±2,3 7,8±2,0 ₍₂₎	31,0±6,2 12,0±5,5** ₍₂₎	13,4±3,1 14,1±2,7 ₍₂₎	6,5 2,5	0,002** 0,08
	Reconocimiento de Texto	17,5±1,5 17,5±1,1 ₍₂₎	17,8±1,3 18,0±0,9 ₍₂₎	24,5±3,5 18,0±2,5* ₍₂₎	19,9±1,7 19,8±1,2 ₍₂₎	1,4 0,7 ₍₂₎	0,3 0,5 ₍₂₎
	Porcentaje de Reconocimiento de Texto	19,7±9,6 28,7±11,3 ₍₂₎	43,9±8,2 46,5±9,7 ₍₂₎	128,5±22,6 97,0±26,5 ₍₂₎	67,9±11,3 77,0±13,3 ₍₂₎	8,2 3,6 ₍₂₎	0,000** 0,02* ₍₂₎
	Letras y Números	2,2±1,0 2,3±0,9 ₍₂₎	2,6±0,8 1,8±0,7 ₍₂₎	6,5±2,4 2,5±2,0 ₍₂₎	4,5±1,2 3,6±1,0 ₍₂₎	1,6 0,8 ₍₂₎	0,2 0,5 ₍₂₎
	Parejas de Palabras	4,7±2,0 1,5±0,6 ₍₂₎	4,5±1,7 1,7±0,4 ₍₂₎	13,5±4,6 1,0±1,3 ₍₂₎	8,8±2,3 1,6±0,7 ₍₂₎	1,8 0,1 ₍₂₎	0,2 1,0 ₍₂₎
	Pendiente de aprendizaje	1,8±0,5 1,5±0,6 ₍₂₎	1,4±0,5 1,7±0,5 ₍₂₎	1,0±1,3 1,0±1,3 ₍₂₎	2,5±0,6 1,6±0,7 ₍₂₎	0,8 0,09 ₍₂₎	0,5 1,0 ₍₂₎
	Recuerdo de Parejas de Palabras	1,7±0,7 1,6±0,7 ₍₂₎	1,6±0,6 1,6±0,6 ₍₂₎	3,5±1,6 2,0±1,7 ₍₂₎	2,6±0,8 2,6±0,0 ₍₂₎	0,7 0,3 ₍₂₎	0,6 0,8 ₍₂₎
	Porcentaje de Retención	40,5±14,5 28,7±11,3 ₍₂₎	39,7±12,4 46,5±9,7 ₍₂₎	43,8±34,0 97,0±26,5 ₍₂₎	75,0±17,0 77,0±13,3 ₍₂₎	1,09 3,6 ₍₂₎	0,4 0,02* ₍₂₎
	Reconocimiento Pareja de Palabras	19,9±1,3 20,1±2,1 ₍₂₎	20,6±1,1 18,8±1,8 ₍₂₎	24,0±3,1 22,5±5,0 ₍₂₎	23,8±1,5 21,0±2,5 ₍₂₎	1,6 0,3 ₍₂₎	0,2 0,8 ₍₂₎

Tabla 19. Media de la puntuación obtenida en los test cognitivos (valores medios ± EEM) en pacientes (n=Número de sujetos). ^a Valor de la F limite inferior para el nivel de significación. ^b Valor de p significación estadística, se observan diferencias significativas entre grupos (*) para p < 0,05. y (**) para p < 0,001). ₍₂₎ Medida de la puntuación obtenida en los test cognitivos 9 meses después de la primera evaluación.

6.7.1.2a.Evaluación motora en la EP

La función motora de los pacientes con EP fue evaluada a los nueve meses después de la primera evaluación, no apreciándose diferencias con respecto a la primera ocasión. Los pacientes con EP presentaban una puntuación media en el UPDRS total en la segunda evaluación de $41,56 \pm 4,32$, con valores inferiores a 30 puntos en el 7,1% de los pacientes, y superiores a 64 en el 47,1%.

La valoración mental del comportamiento y estado de ánimo (UPDRs I) proporciona una puntuación media de $3,00 \pm 0,51$. La puntuación en el UPDRSII, que valora la independencia en actividades de la vida diaria, es de $11,91 \pm 1,70$, mientras que la subescala UPDRs III (que explora los aspectos motores), da una puntuación media de $22,46 \pm 1,75$, con valores más elevados en los pacientes con enfermedad más grave (34-46 en el 14,28% de los sujetos). En la subescala UPDRs IV (que explora los aspectos del tratamiento) la puntuación es de $1,83 \pm 0,80$. (Anexo III).

6.7.1.2b.Evaluación motora en el TE

La evaluación motora de los pacientes de TE no arrojó diferencias entre la primera y la segunda medición en la valoración total obtenida con el TETRAS. Los resultados muestran que disminuye ligeramente el grado de independencia de los pacientes (del 75% al 73,23%). Con respecto a los ítems del test, sólo se aprecian diferencias significativas ($p=0,014$) en la subescala de temblor de miembros inferiores. (Anexo IV).

6.7.2. Evaluación del RAS y la PPI

6.7.2.1.Valoración del RAS

Nueve meses después de la primera evaluación, se repitieron las mediciones del RAS. En esta parte del estudio participaron 15 del total de 33 pacientes con DCL, 9 de los 21 pacientes diagnosticados de EA, 37 de los 52 pacientes de EP, y 19 pacientes del total de 34 con TE.

En la evaluación del RAS, observamos (figura 29A) que sólo hay diferencias entre la primera medición y la segunda en los pacientes de EA($p=0,000$). En el resto de patologías, se puede apreciar que la amplitud del RAS en la segunda medición es mayor, salvo en los pacientes de DCL, en los que la segunda medición se reduce, pero las diferencias no son significativas. En

los análisis entre grupos, encontramos que la EA se diferencia del resto de patologías en la segunda medición (DCL ($p=0,004$), EP ($p=0,027$), TE ($p=0,024$)). En cuanto a la latencia del RAS (figura 29B), no encontramos diferencias con respecto a la primera medición.

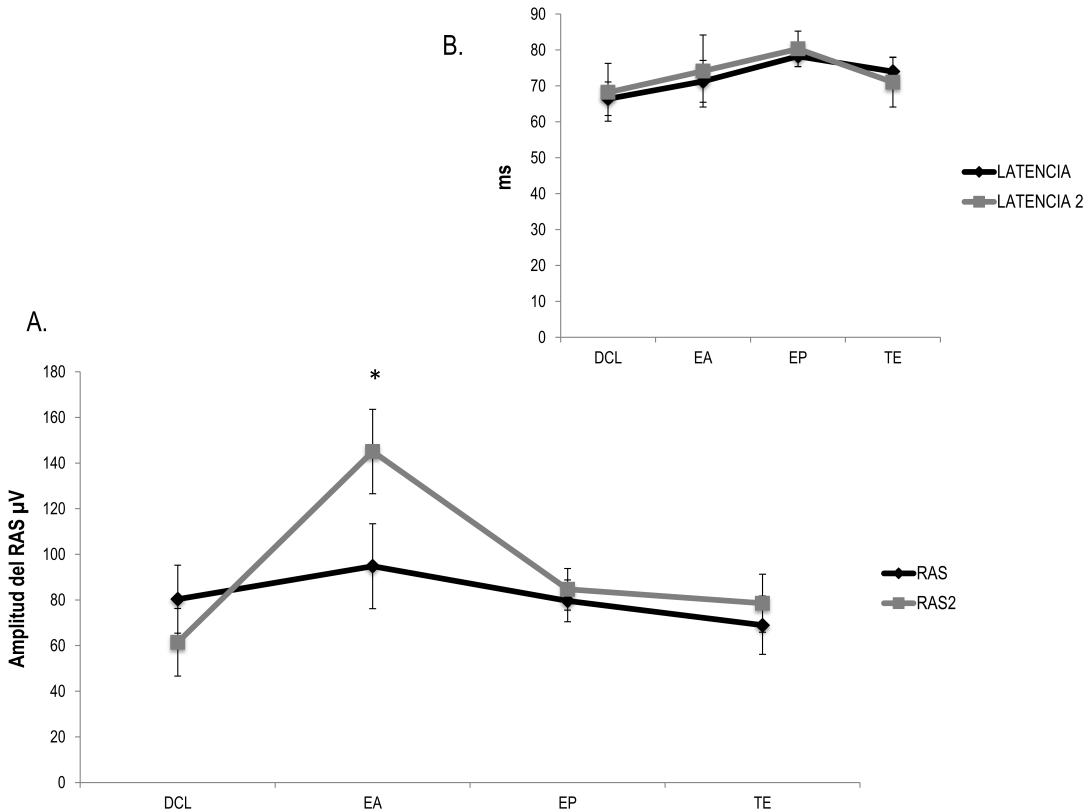
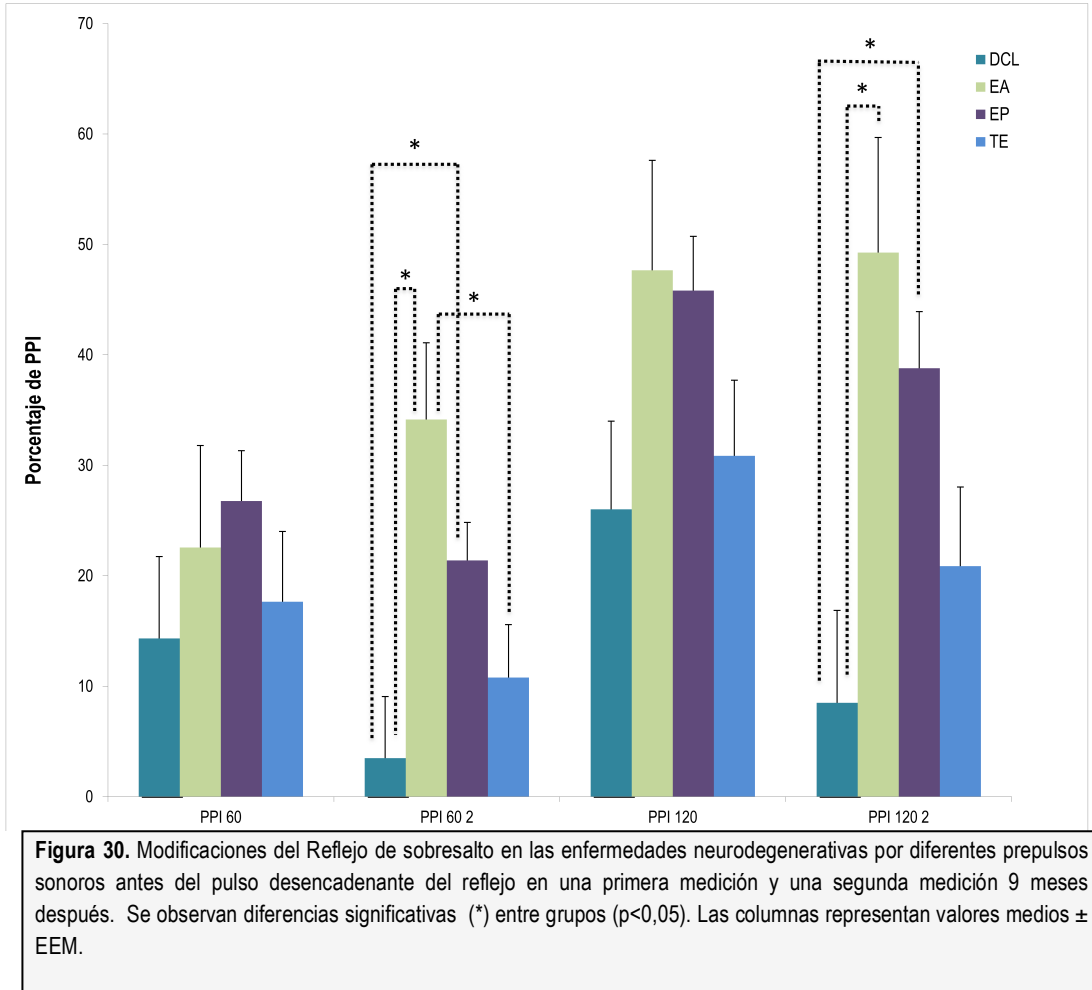


Figura 29. A. Amplitud del Reflejo de sobresalto en las enfermedades neurodegenerativas en dos mediciones realizadas con 9 meses de diferencia. B. Latencia del Reflejo de sobresalto en una primera medición y una segunda medición 9 meses después. Los puntos representan \pm EEM. (*) significación estadística entre grupos, ($p<0,05$).

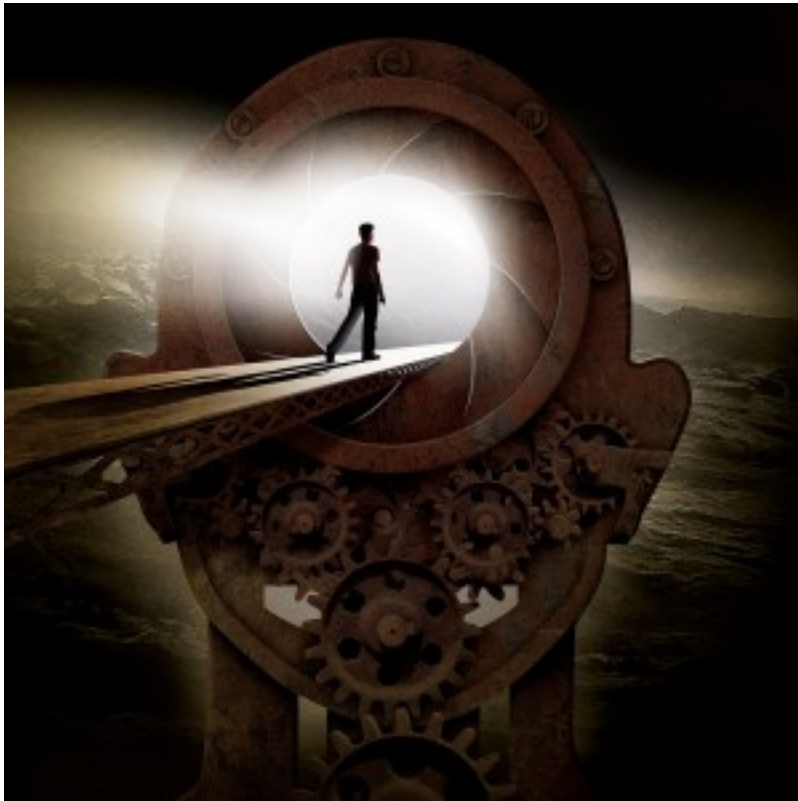
6.7.2.2. Evaluación de PPI y PPF

La PPI tiende a disminuir de la primera a la segunda medición en los dos paradigmas estudiados (PPI_{60} y PPI_{120}), salvo en los pacientes de Alzheimer que aumenta (figura 30), aunque sin significado estadístico. Al comparar entre grupos, encontramos que hay diferencias significativas en la PPI_{60} entre los pacientes con EA y pacientes con DCL ($p=0,006$) y en los pacientes de EA y TE ($p=0,043$). También, encontramos diferencias en la segunda medición de la PPI_{60} entre los DCL y los EP ($p=0,047$). En los análisis de la PPI_{120} encontramos que los pacientes con DCL tienen diferencias significativas respecto al resto (EA $p=0,019$ y EP $p=0,017$).

No hay modificación en las latencias de la primera a la segunda medición, en ningún caso.



En la PPF, ocurre lo contrario, disminuye en la segunda medición con respecto la primera, salvo en los pacientes de EA, que ocurre el efecto contrario, no siendo significativas las diferencias en ningún caso.



(Igor Morski)

Discusión

7. Discusión

7.1 Discusión metodológica

La evaluación neuropsicológica (también denominada evaluación neurocognitiva) es un método diagnóstico que estudia el funcionamiento cerebral y brinda información no suministrada por otros métodos de estudio, como el PET o la resonancia magnética. Este tipo de estudios permite comprender cómo funcionan las diferentes áreas cerebrales de un paciente o evaluar funciones específicas (como problemas de memoria vs. problemas de atención). Es importante detectar el deterioro cognitivo en una etapa temprana, dado que el DCL es un factor de riesgo para la demencia (Aarsland y cols., 2010; Janvin y cols., 2006; Siepel y cols., 2014). La evaluación neuropsicológica llevada a cabo en este estudio implica la medición de los siguientes aspectos: la capacidad intelectual general, el aprendizaje y la memoria. El lenguaje, la atención y la concentración, así como las destrezas de ejecución de alto nivel o funciones ejecutivas (por ej., secuenciación, razonamiento, resolución de problemas) son otras características que podemos evaluar mediante test neuropsicológicos. Algunas capacidades las hemos estudiado en mayor detalle que otras, dependiendo de las peculiaridades de cada patología, y las distintas patologías darán diferentes patrones de puntos fuertes y débiles en las pruebas. Los resultados también pueden ser útiles para determinar qué áreas del cerebro podrían estar involucradas y de qué enfermedades podría tratarse. Por ejemplo, las pruebas de evaluación cognitiva pueden ayudar a diferenciar entre la EA, un accidente cerebro vascular y la depresión, lo cual es importante porque el tratamiento apropiado depende de un diagnóstico preciso.

El análisis de los polimorfismos génicos se realizó utilizando ADN extraído de muestras de saliva. Se eligió la obtención del ADN de esta manera con el objetivo de realizar la prueba de la manera menos invasiva, cómoda y segura para los pacientes. Debido a que la continua secuenciación del genoma es una técnica cara y tediosa, se han desarrollado ensayos TaqMan® basados en PCR, proporcionando una manera más fácil y económica para estudiar genotipos y para los estudios de asociación genética. Por otra parte, los polimorfismos de los genes analizados, fueron elegidos por su relación con el metabolismo dopaminérgico, muy relacionado con el RAS/PPI y con las enfermedades neurodegenerativas estudiadas.

El análisis de los parámetros temporales de la voz sirve como complemento para evaluar en

los pacientes de EP efectos de la degeneración del sistema motor. A través de estos análisis, se pueden evaluar los cambios provocados por la rigidez muscular en la laringe y la alteración del ritmo vibratorio de las cuerdas vocales, lo que se traduce en cambios en los parámetros perceptuales y acústicos de la voz. En el caso de los pacientes con EA, los análisis de la voz pueden aportar información de dominios cognitivos, ya que los cambios en la voz están más asociados a trastornos del lenguaje.

El estudio del RAS constituye un criterio sencillo de evaluación de la normofuncionalidad del sistema nervioso (Geyer y cols., 2001). Este reflejo es un ejemplo de fenómeno atencional no-selectivo (Bakker y cols., 2006), y posee múltiples aplicaciones diagnósticas, ya que se encuentra alterado en numerosas trastornos neurológicos (Wilkins y cols., 1986). De las modulaciones del RAS, la PPI constituye uno de los métodos más usados para evaluar la capacidad del cerebro de filtrar información irrelevante, considerándola como un parámetro de filtrado sensorial (Hoffman y Ison, 1980), que nos permite evaluar la capacidad sensoriomotora en el estudio de diversos patrones conductuales, enfermedades neurológicas o psiquiátricas (Wilkins y cols., 1986).

La medición de RAS/PPI es un instrumento diagnóstico rápido, sencillo, barato e inocuo, y del que puede extraerse mucha información. Con el desarrollo de este proyecto, se ayuda a la consolidación el RAS/PPI como un endofenotipo de enfermedades neurodegenerativas y neuropsiquiátricas establecidas, y como herramienta diagnóstica en los servicios de Neurología y Psiquiatría del Hospital Universitario de Salamanca.

7.2. Evaluación del RAS/PPI, en pacientes con enfermedades Neurodegenerativas

7.2a. Evaluación del RAS

Analizamos las variaciones en la medición del RAS en pacientes con enfermedades neurodegenerativas, estudiando las diferencias entre grupos, intergrupos y con el grupo control.

En el presente estudio, se encontró que los pacientes con distintas enfermedades neurodegenerativas y sujetos control tenían amplitudes similares en el RAS. En el caso de la latencia ocurre lo mismo, salvo en los pacientes con EP que tiene unas latencias mayores que el resto de sujetos. Varios autores (Vidailhet y cols., 1992; Kofler y cols., 2001; Bowers y cols.,

2006) describen que la latencia del RAS en la EP es mayor cuando el registro se hace en el músculo *orbicularis oculi*, y que ésta se incrementa en el estado “on” de la medicación y cuando el paciente está sentado. Nuestros resultados son consistentes con la literatura (Ellwanger y cols., 2003; Ludewig y cols., 2003; Kumari y cols., 2004, 2008), donde se refleja que, con la edad, la amplitud del RAS es menor, fenómeno que afecta a los sujetos sanos de nuestro estudio.

Los resultados del RAS obtenidos en la EP son similares a los previamente publicados, en los cuales se atribuye el tipo de respuesta en estos pacientes a la pérdida neuronal que se produce en los núcleos que controlan la respuesta de sobresalto, los núcleos pontinos de la formación reticular (Vidailhet y cols., 1992). En el caso de los pacientes con TE, presentan mayor amplitud y menor latencia del RAS con respecto al grupo control. Estos hallazgos podrían deberse a la pérdida del mecanismo compensador temprano del LC sobre la SN, que causaría a su vez disfunción del circuito NPP-NCPr con las subsiguientes manifestaciones en el RAS (Lavoie y Parent, 1994). Actualmente, en la literatura no encontramos estudios del RAS en pacientes con TE, por lo que no podemos comparar los resultados. Partiendo de que ambas enfermedades (EP y TE) comparten un sustrato anatomopatológico común, nos encontramos con resultados distintos. Estas diferencias pueden interpretarse en el contexto de que en estas patologías, a pesar de compartir elementos clínicos, presentan diferencias en la afectación de las estructuras subcorticales que modulan y canalizan las vías del reflejo de sobresalto.

Los resultados en el caso del DCL y la EA reflejan una disfunción del circuito a niveles de estructuras que están envueltos en los procesos atencionales. Los pacientes con DCL tienen un RAS con amplitud mayor que los controles y demás grupos de pacientes. Podemos hipotetizar que esta diferencia es debida a la pérdida neuronal en la formación hipocámpica que ocurre en estos pacientes, ya que en el hipocampo y la corteza cingulada anterior, desempeñan un papel en la modulación del reflejo (Lee y Davis, 1997; Medford y Critchley, 2010).

Realizamos los estudios del RAS 9 meses después de la primera medición en los pacientes, y observamos que el RAS aumentó en todos pacientes observándose diferencias significativas en los pacientes con EA de la primera a la segunda medición. La latencia sin embargo se

mantiene estable en todos los casos. Este aumento del RAS podría ser reflejo del progreso de la enfermedad. Necesitamos confirmar estos datos en una muestra mayor de pacientes, y en distintos estadios evolutivos de las diferentes patologías, por la importancia que tendría estandarizar el RAS como biomarcador diferencial en los trastornos degenerativos.

Al realizar el análisis por género, vemos que hay diferencias significativas entre las mujeres con DCL y las mujeres del grupo control. También, encontramos diferencias entre las mujeres con DCL y las mujeres con TE. No hemos encontrado diferencias entre controles y pacientes en la latencia, y tampoco se encuentran diferencias por género. Sólo encontramos diferencias en las latencias entre los pacientes de EA entre hombres y mujeres.

En los análisis del RAS por género, el primer dato reseñable es la diferencia que se establece en el grupo femenino en función de la patología, obteniendo el grupo de mujeres con DCL diferencias significativas en amplitud frente al grupo de mujeres control y el grupo de mujeres con TE. Los resultados en relación a la amplitud muestran niveles más altos en los grupos de mujeres, estando esta tendencia en consonancia con los trabajos publicados por Kofler y cols., 2001, según el cual, las mujeres de edad avanzada presentan una latencia de respuesta menor que los hombres. Estas diferencias de comportamiento en lo que a la respuesta refleja se refiere en relación a las diferencias en la producción de esteroides sexuales y por tanto entre ambos géneros, son el reflejo de la acción hormonal sobre el SNC; aunque los mecanismos no son bien conocidos, ejercen, por una parte, una acción moduladora y por otra, muy importante, neuroprotectora, sobre todo los estrógenos (Green y Simpkins, 2000) y puede que sea este hecho la base de las diferencias existentes en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas entre hombres y mujeres. Este patrón ha sido confirmado mediante estudios epidemiológicos (Schrag y cols., 2000). Aunque se esperaría que en nuestro grupo de estudio el efecto hormonal en el RAS estuviese descartado, debido a la media de edad de los sujetos de la muestra, observamos que la tendencia de las mujeres a tener una amplitud mayor de RAS se mantiene.

7.2b. Habitación

La habitación puede proporcionar un paradigma útil para la investigación de los correlatos psicobiológicos del envejecimiento, ya que se ha sugerido que el aumento de la tendencia a habituarse, como se ve en los seres humanos de edad avanzada, tiene una relación

importante con la edad, y está asociado a déficits de memoria y de aprendizaje (Botwinick, 1970). Este patrón puede aplicarse únicamente en nuestro grupo de estudio a las mujeres, encontrándose que las del grupo control se habituaban menos que el resto de las mujeres afectadas con patologías neurodegenerativas.

Curiosamente, los hombres con DCL presentan diferencias de habituación al RAS en relación a los controles, pero a diferencia de lo esperado, tienen un menor porcentaje de habituación, lo que se contradice los datos anteriores. Las mujeres de este grupo, no presentan diferencias en la habituación del reflejo con los controles de su mismo género. Este diferente comportamiento intergenérico está descrito, teniendo las mujeres de edad avanzada un patrón de habituación similar a las jóvenes (Rinaldi y Thompson, 1985).

Aunque no es significativa la diferencia, los pacientes con EA muestran una gran habituación, lo que les sitúa en la línea de la hipótesis planteada por Botwinick (Botwinick, 1970).

7.2c. Evaluación de la PPI

En la PPI no encontramos cambios significativos entre los grupos de pacientes y controles cuando el intervalo entre prepulso-a-pulso era de 60 ms, aunque sí se aprecia una tendencia de los pacientes con DCL a disminuir la PPI y en los pacientes con EP la tendencia contraria. En la PPI₁₂₀, encontramos diferencias significativas entre los pacientes de EP y controles, y una marcada tendencia a aumentar en los pacientes con EA y a disminuir en los pacientes con DCL. En los análisis por grupos, encontramos diferencias significativas entre los pacientes de EP y los pacientes de DCL.

La PPI evidencia el control que ejercen los ganglios basales en los reflejos del tronco cerebral, tal como vemos en las distintas enfermedades neurodegenerativas que hemos estudiado, las cuales constan de alteraciones en el circuito troncoencefálico y sus neurotransmisores.

Los resultados de nuestro estudio concuerdan con lo publicado previamente, ya que no encontramos diferencias significativas en la PPI en los diferentes intervalos prepulso-pulso entre pacientes con DCL y EA (Hejl y cols., 2004). Por otra parte, tanto nuestros resultados como lo publicado por el grupo de Hejl (Hejl y cols., 2004), se contradice con los datos aportados por Ueki y cols., 2006, quienes encontraron que pacientes con DCL presentaban un aumento en la PPI, mientras que los pacientes con EA inicial, mostraban un déficit en la PPI

en relación a los controles. Esta diferencia en los resultados pudiera deberse a una diferencia metodológica, en el estudio de Ueki y cols., 2006, utilizan un acelerómetro para la medición de la contracción muscular, mientras que nosotros y el grupo de Hejl y cols., 2005, utilizamos un registro electromiográfico. La mayor inhibición observada en los pacientes con EA en nuestro estudio podría ser debida al tratamiento farmacológico al cual están sometidos (Anexo II). Estudios no publicados realizados en nuestro laboratorio en animales de experimentación, muestran un incremento en la PPI tras el tratamiento con anticolinérgicos. Este efecto encontrado en animales pudiera extrapolarse a nuestros pacientes.

El patrón de anomalías en la PPI se ha relacionado con alteraciones anatomopatológicas en la corteza límbica (principalmente en la corteza entorrinal), que se producirían en los primeros estadios del DCL (García-Sánchez y cols., 2011). Habría que incrementar la muestra para que las diferencias encontradas en nuestro estudio encuentren significado estadístico, y poder así considerar este paradigma, PPI₁₂₀, como un posible marcador biológico en el DCL y la EA.

Al comparar con los controles, los pacientes con EP, estos mostraron mayor PPI₆₀ y PPI₁₂₀, lo que confirma nuestra hipótesis de que la EP presenta alteraciones en la capacidad sensoriomotora. Nuestros datos también coinciden con lo publicado por Periol y cols., (2005), quienes reportan diferencias significativas en la PPI₁₂₀, mostrando los pacientes con EP una mayor inhibición con respecto a los controles. En su estudio, comparan también pacientes con EA y con demencia por cuerpos Lewy, sugiriendo la implicación del sistema dopaminérgico subcortico-tálamo-cortical en la regulación de la PPI, siendo la desregulación más grave en la demencia con cuerpos Lewy que en la EP (Periol y cols., 2005). El grupo de Valls-Solé (Valls-Solé y cols., 2004) también reporta un aumento de la PPI en pacientes con EP. La activación sensorial excesiva en la EP puede reflejar una alteración en la integración de la información sensorial, lo que origina una alteración de movimientos específicos (Bischoff-Grethe y cols., 2003). La bradicinesia en la EP afecta a la capacidad de iniciar y coordinar una serie de tareas motoras (Schindler y Kelly, 2002). Este deterioro de la capacidad para inhibir los movimientos motores justifica tanto el retraso en la aparición de las respuestas motoras, como la interrupción de los movimientos, una vez que se han iniciado (Obeso y cols., 2011). El deterioro de las regiones sensoriomotoras (GB, la corteza cerebral y otras regiones asociadas), para recibir los aferentes precisos de entrada puede ser la causa de los errores en el inicio, el tiempo, y la amplitud de los movimientos (Bischoff-Grethe y cols., 2003). El hecho

de que los individuos con EP a menudo muestren un aumento en el tono muscular y la rigidez, puede reflejar una tendencia del SNC para permanecer en un estado de alerta y en preparación para ejecutar un movimiento mientras se espera la llegada de la señal aferente, lo que se traduce en una ejecución de movimiento lenta o aberrante (Bischoff-Grethe y cols., 2003; Farrell y cols., 2005).

En la evaluación de las funciones motoras en los pacientes con EP mediante el UPRDs, encontramos que el 7.1% de los pacientes presentaba una puntuación media inferior a 30 puntos, y un 41,26 %, valores superiores a 64 puntos, sobre un total de 159 puntos, los cuales representarían la incapacidad total de los pacientes. En el UPRDsIII, que evalúa específicamente las funciones motoras, nuestros pacientes obtuvieron una puntuación media de $22,63 \pm 8,92$, con valores más elevados en los pacientes con enfermedad más grave (34-46 en el 14,28% de los sujetos). Teniendo en cuenta estos resultados, correlacionamos la puntuación de la escala motora del UPRDs con los diferentes paradigmas de la PPI, y debido a la heterogeneidad de la muestra, no encontramos correlación entre las variables de PPI y UPDRs. Aunque las variables por sí solas presentan una alteración, en estos pacientes creemos que debido a la diferencia de áreas que se reclutan para las respuestas reflejas y movimientos específicos, y el estadio en el que se encuentran los pacientes no se pueden correlacionar. Habría que realizar el estudio en un grupo más homogéneo, que presentara un estadio avanzado para intentar correlacionar estas dos variables.

En el caso del TE, se mantiene la misma tendencia que en la EP, presentando los pacientes con TE una mayor PPI₁₂₀ que los controles. Aunque no hemos encontrado publicaciones en las cuales se estudie las modulaciones del RAS en esta enfermedad, creemos que esta diferencia refleja las alteraciones existentes en los GB.

Para la evaluación de los pacientes con TE utilizamos la escala TETRAS, en el cual se estudia el impacto del temblor del paciente en las actividades de la vida diaria, mediante la realización de una serie de movimientos consecutivos. En nuestros pacientes, encontramos que mantienen un 73% de independencia. Al intentar correlacionar estos resultados con la PPI, sucede lo mismo que en la EP; en el estadio que se encuentran los pacientes no hay correlación entre las variables.

La determinación del paradigma de medición de la PPI óptimo, con distintos intervalos de

prepulso-pulso, podría constituir una herramienta importante para el diagnóstico diferencial temprano y el seguimiento de enfermedades degenerativas que cursan con pérdida neuronal a nivel reticular.

La evolución de las enfermedades neurodegenerativas puede ser muy rápida, como en algunos casos, o de progresión lenta en otros, por lo que el estudio longitudinal de estas enfermedades nos puede dar una idea de las distintas etapas y progresión. Analizamos los cambios en la PPI con 9 meses de diferencia entre mediciones, y no encontramos diferencias entre la primera y la segunda medición intragrupo.

En la segunda medición, sí se aprecian cambios significativos entre los grupos; los pacientes con DCL mostraron una disminución significativa en la PPI en relación a los pacientes de EA, los cuales mostraron incrementaron su PPI. También, los pacientes de DCL mostraron diferencias significativas con respecto a los pacientes con TE y EP quienes mostraron descensos en los valores de la PPI. Estos cambios puede ser un reflejo de la progresión de la enfermedad y los efectos de los distintos tratamientos farmacológicos a los que están sometidos los pacientes (Anexos I-IV). En ese sentido, en animales de experimentación, se ha demostrado que tras lesión del núcleo basal magnocelular, y posterior tratamiento con anticolinérgicos aumentan los niveles de PPI (Ballmaier y cols., 2002), mientras que el tratamiento con fármacos dopaminérgicos deteriora la respuesta de la PPI (Lindemann y cols., 2012).

En resumen, diferentes áreas corticales y subcorticales, el hipocampo, así como el AVT afectan la regulación de la PPI. De diferentes maneras, modulaciones de estas estructuras pueden causar interrupciones o reducciones de la PPI, lo que origina la desinhibición del circuito del RAS, por lo cual se altera la capacidad sensoriomotora. En tales casos, a pesar de haber un prepulso se produce una fuerte reacción de respuesta.

7.2b. Facilitación del reflejo de sobresalto

El análisis de la facilitación del RAS (medida en valores porcentuales, PPF) también mostró una diferencia significativa entre pacientes y controles. Así, hay una mayor PPF en los pacientes con EA, encontrándose una facilitación del reflejo en relación a los controles, lo que está en consonancia con lo publicado por Ueki y cols., (2006). También, los EP mostraron

mayor PPF que el grupo control y que el grupo de pacientes con DCL.

La PPF es un proceso menos estudiado y comprendido. Ha sido asociado con una etapa posterior de alerta generalizada (Dawson y cols., 1982), y refleja la mejora de la capacidad sensorial y la atención selectiva (Graham, 1975; Anthony y Graham 1985; Kumari y cols., 2004).

El estudio publicado por Wynn y cols., 2004 sobre la PPF en pacientes esquizofrénicos muestra que estos pacientes y sus hermanos tienen una PPF menor que los controles, atribuyendo este hallazgo a un déficit en la atención selectiva. Estudios realizados por el grupo de Ison (2006), atribuyen la PPF a respuestas motoras periféricas en lugar de estados de alerta, sugiriendo que las vías por las cuales se conduce la PPF pueden no depender del procesamiento sensoriomotor (Bowen y Ison, 2006), participando las proyecciones de la corteza auditiva al colículo inferior en estos procesos (Andersen y cols., 1980; Brown, 1998). La posibilidad de que la alteración de estructuras subcorticales en estas patologías puedan provocar alteraciones en el RAS o en sus modulaciones, es de crucial importancia, ya que podría permitir establecer diferencias entre estas enfermedades neurodegenerativas según el grado de alteración de las vías y núcleos implicados.

Con el fin de explicar los hallazgos de una menor facilitación del reflejo en los pacientes es necesario ahondar en estos estudios, empleando distintos intervalos que desencadenen esta facilitación y correlacionar a su vez con test concretos de atención, para así obtener una evaluación más específica.

En nuestro estudio, no hemos encontrado ninguna correlación entre la facilitación del RAS y los test específicos de evaluación de los trastornos del movimiento como es el UPRDs y el TETRAS. Tampoco encontramos diferencias al hacer el estudio longitudinal de la PPF en los pacientes.

7.3 Valoración Cognitiva

Hemos realizado una evaluación cognitiva de los pacientes utilizando diversos test que miden la independencia del paciente (**Escala funcional de Pfeffer**), el deterioro cognitivo (**MMSE**), la depresión (**GDS**), la fluencia verbal semántica (**Test de Isaac**), y la evaluación de la atención y la memoria de trabajo auditiva y espacial (**test de Wechsler III**).

De forma global, el perfil del deterioro cognitivo es mayor en los pacientes EA que en el resto de los grupos de estudio; presentan una mayor dependencia, (según la escala funcional de Pfeffer) y una menor puntuación en el **MMSE**, significativamente más bajas que las obtenidas por el resto de pacientes.

En nuestro estudio, ni los pacientes ni los controles presentan un grado de depresión significativo (evaluado por el **GDS**). En cuanto a la *fluencia verbal*, los resultados sólo detectan anomalías significativas en los pacientes de EA en relación a los controles, y con el resto de grupos de pacientes con patologías neurodegenerativas.

En el caso del *ítem de la letra P*, los pacientes con DCL se diferencian de los controles, y al hacer el análisis intra-grupos encontramos que los pacientes con EA tienen un menor número de aciertos en comparación a los pacientes con TE.

El deterioro cognitivo es la pérdida de funciones cognitivas o una alteración adquirida en una persona previamente normal. La valoración de las funciones cognitivas, realizada en nuestro estudio, muestra un claro predominio de trastornos en las funciones ejecutivas, con alteración en la memoria y lenguaje en pacientes con EA, a diferencia del resto de pacientes con enfermedades degenerativas estudiados. Los pacientes con EA tienen alteración en las actividades de la vida diaria, comprobada a través del la **Escala Funcional de Pfeffer**, la cual está claramente afectada en estos pacientes en comparación con el resto.

El resto de los sujetos con enfermedades neurodegenerativas mantienen su estado de independencia. En el caso de la EP y del TE, el leve deterioro encontrado en las actividades de la vida diaria puede atribuirse a los cambios anatomopatológicos subyacentes, que causan que los pacientes no puedan desenvolverse adecuadamente debido a los trastornos de movimiento.

Los déficits cognitivos y la demencia suelen cursar con depresión, particularmente en sus estadios iniciales, y puede asociarse a una depresión reactiva, por lo que la ejecución de tareas puede ver afectada por los estados anímicos. En el caso de nuestros pacientes con DCL, aunque no encontramos cuadros de depresión, al correlacionar las puntuaciones obtenidas en el GDS con los resultados de la PPI/PPF se evidencia una correlación en el estado anímico y la respuesta de la PPI y la PPF. Se ha descrito una relación entre la PPI y la

depresión, encontrándose una reducción de ésta en los pacientes deprimidos en comparación con los controles (Perry y cols., 1991; Ludwig y Ludwig, 2003; Perry y cols., 2004; Quednow y cols., 2006). Teniendo en cuenta estos estudios, la correlación encontrada en los pacientes de DCL en la PPI y el GDS pudiera explicarse a la existencia de una leve depresión en los individuos con esta patología.

La alteración cognitiva básica de la demencia es el deterioro de la memoria que puede verse alterada en alguno de sus tres procesos básicos: registro, retención o evocación. Realizamos el **MMSE** para evaluar a todos los pacientes, por ser una prueba ampliamente utilizada en clínica, de fácil realización y que facilita la comparación de los resultados. En la EA, nuestros resultados reflejan un perfil disejecutivo, ya que los individuos de este grupo tienen puntuaciones bajas en el MMSE en comparación al resto de pacientes. Los pacientes con DCL, aunque se considera un estado transicional entre las alteraciones cognitivas propias del envejecimiento fisiológico y la demencia, mantienen las habilidades cognitivas y funcionales. En el caso del EP y el TE, el desarrollo de deterioro cognitivo cursa con un predominio de trastorno en las funciones ejecutivas (o trastornos disejecutivos), alteración en las habilidades visoespaciales y en algunas modalidades de memoria y lenguaje (Brown y Schneider, 1997), mientras se mantiene una puntuación no excesivamente baja en el **MMSE**, como sucede en nuestro estudio. El tipo de deterioro observado en la EP y en el TE se puede considerar como perteneciente a las demencias subcorticales, ya que es causado en su mayoría por los síntomas y signos de la enfermedad. Estos síntomas a su vez están mayormente causados por la afectación de estructuras como el estriado, tálamo, sustancia blanca subcortical, núcleos del tronco cerebral o cerebelo. Aunque las puntuaciones del **MMSE** en pacientes con EP se mantienen en los valores de la normalidad, encontramos que éstas se correlacionan con los valores de la PPI y la PPF. Esta correlación puede explicar que la pequeña alteración que existe en las funciones ejecutivas sea la que contribuye a que los valores de la PPF en estos pacientes esté alterada, ya que la PPF está asociada a procesos de orientación o de atención. En la EP, hay dificultades en la memoria explícita, más relacionadas con la recuperación que con el almacenamiento de la información, lo cual se correspondería con el síndrome disejecutivo subyacente.

Los resultados del **test de Wechsler** en el que hemos evaluado procesos de atención, procesos ejecutivos y memoria auditiva, encontramos lógicamente que los pacientes con EA

mostraron puntuaciones más bajas en todas las pruebas utilizadas que los respectivos controles y que el resto de pacientes. En las comparaciones por pares, encontramos que el *ítem de textos*, los pacientes con EA y DCL tienen una peor ejecución que los pacientes con EP y TE. También, hemos encontrado diferencias entre los pacientes con EP y TE. Con estos resultados concluimos que la codificación y retención auditiva está seriamente dañada en los pacientes con EA frente al resto de pacientes. Este proceso también se encuentra dañado en los pacientes de EP al compararlos con los pacientes con TE. Los resultados de nuestro estudio están de acuerdo con lo publicado en la bibliografía que reportan deterioro cognitivo en pacientes de EP en estadíos iniciales (Bocanegra y cols., 2014). Hemos encontrado en el grupo de EP un deterioro significativo en el recuerdo auditivo inmediato y en el auditivo demorado de la escala de Wechler en las medidas longitudinales, así como en la orientación espacial, datos coincidentes con algunas publicaciones (Kovari y cols., 2003).

Las alteraciones iniciales cognitivas, que evidencian un perfil frontal, pueden explicarse por las disfunciones dopaminérgicas del circuito nigro-estriado-frontal (Lewis y cols., 2005; Lange y cols., 1992; Cools y cols., 2001) que explicarían las alteraciones observadas en la EP, mientras que los cambios cognitivos de origen cortical posterior pueden deberse a alteraciones colinérgicas (Perry y cols., 1985; Candy y cols., 1983; Gaspar y cols., 1984; Mattila y cols., 2001; Shinotoh y cols., 1999; Bohnen y cols., 2003, 2012; Hilker y cols., 2005) y a cambios atróficos en amplias zonas de la corteza (Kenny y cols., 2008; Nagano-Saito y cols., 2005; Summerfield y cols., 2005; Melzer y cols., 2012), lo que explicaría los cambios encontrados en los pacientes con EA y DCL. En los pacientes con TE no se encuentran cambios cognitivos en relación a los controles, con lo cual asumimos que las funciones cognitivas están preservadas.

En nuestro estudio, el recuerdo auditivo demorado (medido a través de los test de *recuerdo de pareja de palabras*) es un factor pronóstico del deterioro de la función motora en la EP, y guarda correlación con la valoración de la PPF, lo que le convierte en un buen marcador de evolución de la enfermedad. Hemos intentado correlacionar los parámetros de memoria auditiva con el RAS, aunque sin resultados concluyentes, posiblemente debido al tamaño de la muestra.

Los estudios longitudinales son contundentes en demostrar el desarrollo de demencia en un

alto porcentaje de pacientes a medida que avanza el cuadro clínico de la enfermedad. En nuestro estudio, sólo hemos encontrado un declive cognitivo en los pacientes con EA que presentan una disminución en el **MMSE**. Desafortunadamente, no pudimos re-evaluar a todos los pacientes incluidos, por lo que para obtener datos más contundentes, tendríamos que ampliar el tamaño de la muestra y el tiempo de estudio.

7.4 Análisis de la Voz

7.4.1 Análisis de la Voz en la EP

Hemos analizado la velocidad de fluencia y articulación en un grupo de pacientes con EP. Los resultados ponen de manifiesto que la EP se asocia a un decremento en la velocidad de elocución y articulación.

El control de frecuencias específicas se aprende en la infancia, y requiere la coordinación de las estructuras vocales de ajuste de resonancias acústicas del tracto vocal (Saxena y cols., 2014; Bunton, 2008; Wolfe y cols., 2009), proceso de coordinación motora afectada en la EP. Nuestros resultados fueron consistentes con estudios previos (Saxena y cols., 2014; Bunton, 2008; Wolfe y cols., 2009) y hemos observado diferencias significativas entre controles y pacientes con EP. Como se refleja en los estudios de voz habituales en la EP (Canter, 1963; Griffiths y Bough, 1989; Cannizzaro y cols., 2004), encontramos que hubo interrupciones en los aspectos temporales de la muestra de voz, como rotura en la prosodia, el tiempo de fonación mal controlada y menos pausas y roturas de voz. Nuestros resultados reflejan una voz más aguda, menos control de las frecuencias bajas, lo que impide por otra parte los ruidos característicos en la voz de las personas de edad avanzada. Finalmente, la falta de control aumenta la intensidad del sonido, con un aumento sustancial en dB, pero al mismo tiempo, la falta de control de las emisiones causa una voz altamente monótona debido a las pocas variaciones acentuales (Martínez y cols., 2015).

Es de esperar que el trastorno motor propio de la EP y su repercusión sobre los sistemas respiratorio, fonatorio y articulatorio afecten al ritmo del habla del paciente (Logemann y cols., 1978), como resultado de la alteración de los circuitos de control motor de los ganglios basales (Alm, 2004). Nuestros resultados apoyan la existencia de una reducción en la velocidad de elocución y articulación (Martínez y cols., 2015), y contrastan con aquéllos que informan del

efecto opuesto (De Letter y cols., 2006; Hammen y cols., 1996). El incremento en la velocidad de fluencia puede atribuirse a un mecanismo compensatorio por el cual el paciente con EP mostraría involuntariamente una velocidad de elocución mayor bajo ciertas circunstancias. Diversos estudios, en los que se han analizado los movimientos de labios y mandíbula durante el habla en EP, podrían explicar este fenómeno. Así, Caligiuri,(1989) señala que los movimientos de los labios son normales a tasas normales de elocución (entre 3 y 5 sílabas por segundo), pero éstos se reducen a tasas mayores (entre 5 y 7 sílabas por segundo) cuando se les pide a los pacientes que hablen más rápido. Este hecho podría explicar que los pacientes intenten hablar más lentamente para controlar su tendencia a realizar articulaciones más imprecisas, y evitar el deterioro de la velocidad de elocución al hablar a velocidades más altas. Del mismo modo, Ackermann y cols., (1997) demuestran que cuando se pide a los sujetos que sincronicen a una frecuencia de entre 2,5 y 6 Hz su habla, mientras repiten una sucesión rápida de sílabas, la velocidad de articulación es superior cuando se les pide que la sincronicen a una frecuencia de entre 8 y 9 Hz. La demanda de la tarea en los estudios sobre fluencia (o ante demandas situaciones en las que el sujeto ha de hablar cotidianamente) podría explicar que en ocasiones, su velocidad de elocución sea mayor y, en otras, menor de lo normal. Así, durante el habla espontánea, la fluencia se incrementaría y paralelamente se reduciría su inteligibilidad, ya que en ausencia de un modelo temporal al que sincronizar su programa motor vocal (como en el caso de la repetición de sílabas o la lectura de un texto), la alteración del control motor sería más evidente y tanto más difluente.

7.4.2 Análisis de la voz en EA

Los resultados de nuestro estudio reflejan que los análisis discriminantes de la voz son una herramienta útil para diferenciar los pacientes de EA de sujetos sanos. Los hallazgos sugieren que las medidas de voz pueden ser valiosas en la detección de la EA. Los resultados mostraron que los dos grupos se diferencian cualitativamente en las tareas de producción de lenguaje, y los participantes se clasifican en dos grupos, pacientes o controles en función de cinco factores: porcentaje de roturas de voz, número de períodos de voz, número de roturas de voz, Shimmer (apq3) y radio de ruidos armónicos. Así, los valores prosódicos analizados son de enorme valor dado que nos permiten definir el perfil de las personas con EA.

Las variables fueron interpretadas utilizando coeficientes Fisher de estructura de la matriz. Los

pacientes con EA muestran un mayor número de periodos de voz, lo que implica que las frecuencias utilizadas son más bajas, con un menor número de ciclos por segundo. Estas características tienen como consecuencia, que el grupo de EA tengan una voz más profunda, más lenta, con una tasa menor de velocidad o ritmo de los pulsos glotales dando lugar a una voz monótona. En las interrupciones de voz, se encontró que en el habla de los pacientes con EA hay una mayor proporción del número de roturas de voz. Recientemente, Meilán y cols., (2012); encontró que el aumento en el porcentaje de segmentos sin voz en el habla de los pacientes, es una muestra que explica más del 34% de la varianza en las puntuaciones obtenidas en test específicos de lenguaje y memoria. Otros estudios realizados por Roark y cols., (2011); demostraron que la frecuencia de las pausas era útil para discriminar entre los sujetos sanos y los sujetos con DCL. Las interrupciones de voz muestran una serie de características fonéticas del habla, tales como estrechamiento del rango fonacional, roturas de voz y la reducción excesiva de la frecuencia fundamental, y son el resultado de las dificultades de los cambios musculares que se producen en la laringe en los rápidos cambios en la frecuencia. Las roturas de voz son un trastorno en el que el tono de la voz cambia de repente, y el número de distancias entre pulsos consecutivos son más largas de 1,25 dividido por el tono basal. Considerando este factor, encontramos que la voz en la EA se torna contaminada y encontramos ruidos característicos como burbujas, o temblor en la voz. Por otra parte, en la relación armónica de ruidos, la cual proporciona una indicación de la periodicidad general de la señal de la voz, mediante la cuantificación de la relación entre los componentes aperiódicos (ruido) y componentes periódicos (parte armónica), el grupo con EA tiene una proporción menor que el grupo control, con la ejecución de mayores frecuencias de ruido en los pacientes con EA que en el grupo control.

En conclusión, los parámetros relacionados con el ruido y la rotura de voz nos dan información sobre la cantidad de componentes de ruido en la voz. En el análisis de las fluctuaciones en la amplitud del sonido, en el discurso de los participantes con EA hubo un mayor cociente de perturbación de amplitud entre la amplitud de un período y el promedio de las amplitudes de sus vecinos, divididos por la amplitud media (Shimmer apq3). El grupo con EA mostró una mayor variación en la intensidad de las ondas sonoras producidas de forma continua, especialmente en la variación de las amplitudes de las ondas adyacentes. Las fluctuaciones en la amplitud del sonido se refieren a la variación en la amplitud período-a-período en la voz.

Los pacientes con EA mostraron una voz temblorosa, con menos intensidad y menos control del flujo de aire que el grupo de control.

Podemos concluir que el análisis de los parámetros temporales de la voz es una prueba directa para medir la producción del lenguaje a través de una tarea objetiva, y que se puede aplicar en un período muy corto de tiempo. Es un método para medir automáticamente las características de la voz y hemos examinado la utilidad de estas medidas para discriminar entre pacientes con enfermedades neurodegenerativas como la EA y la EP respecto a un grupo control, con el fin de la obtención de un diagnóstico preciso. Las medidas de voz pueden de hecho ser valiosa en la detección de la EA números estudios lo comprueban (Meilán y cols., 2012, 2014; Martínez-Sánchez y cols., 2012,2013). El examen de la voz es relativamente barato y una técnica fácil de usar; además tiene la ventaja de no ser invasiva. El uso de herramientas de análisis espectral de la voz nos aporta una descripción objetiva que permite a los especialistas la unificación de conceptos. Estas características del lenguaje están determinadas por los procesos cognitivos tanto ejecutivos y de acceso a la memoria léxico-semántica.

7.5 Análisis de polimorfismos genéticos

Analizamos los SNPs del gen *NRG-1*, del gen *COMT* y de los receptores de la dopamina *Drd2* y *Drd3*.

7.5.1 Análisis del genotipo del gen *NRG-1*

El análisis de la distribución genotípica de los polimorfismos rs3924999 y rs6994992 del gen *NRG-1* no mostró diferencias significativas respecto al grupo control. En el caso del polimorfismo rs3924999, el genotipo predominante fue el G/G, genotipo normal; en el polimorfismo rs6994992 el genotipo predominante fue el C/T. Para ambos polimorfismos de este gen nuestros resultados mostraron una baja presencia del genotipo mutado, por lo cual podemos decir que aunque haya una alta presencia del genotipo heterocigótico en ambos polimorfismos. El alelo mutado (A para el SNP rs3924999 y T para el SNP 6994992) no presenta un factor de riesgo. Aunque el gen *NRG-1* está asociado a diversas patologías psiquiátricas, y se cree que influye en el desarrollo neurológico y plasticidad del sistema nervioso (Díez y cols., 2014), en nuestro estudio no resulta ser marcador de ninguna de las

patologías degenerativas estudiadas.

Los análisis realizados para correlacionar los distintos genotipos de ambos SNPs con los valores de la PPI muestran que el genotipo A/A del SNP rs3924999 y el genotipo T/T del SNP rs6994992 están asociados con valores anormales de la PPI. Encontramos diferencias significativas asociadas a la PPI₁₂₀ entre controles y pacientes con EP y entre pacientes con EP y DCL y los pacientes con EA y EP (Anexo V). A pesar de que por sí mismo el genotipo mutado de los polimorfismos (rs3924999, rs6994993) de este gen no presenta factor de riesgo, al correlacionarlo con la PPI encontramos que el genotipo A/A (mutado para el SNP rs3924999) y el genotipo C/C (mutado para el SNP rs6994992) está asociado a alteraciones en el filtrado sensorial, ya que los valores de PPI son mayores en los pacientes que presentan el genotipo mutado. Actualmente, sólo se ha correlacionado alteraciones en este gen en pacientes con EA que padecen psicosis (Go y cols., 2005). En nuestro estudio, utilizamos como factor de exclusión patologías neuropsiquiátricas, por lo que no encontramos relación entre los SNPs de este gen y la EA. Las alteraciones de diferentes polimorfismos de la *NRG-1* han sido señaladas como factores predictivos de la esquizofrenia (Hong y cols., 2008) y el genotipo mutado de este gen ha sido asociado a anomalías en el filtrado sensorial en pacientes con esquizofrenia (Roussos y cols., 2011). Aunque nuestros resultados no muestran que el genotipo mutado sea marcador de las patologías incluidas en el estudio, podemos afirmar que la asociación encontrada entre el genotipo mutado y los patrones anómalos de la PPI en las enfermedades degenerativas puede ser una prueba más de la asociación que hay en la PPI como una medida neurofisiológica cuantificable, que puede ser heredada y estar asociada a alteraciones genéticas (Braff y cols., 1990; Cadenhead y cols., 2000; Geyer y cols 2001; Anokhin y cols., 2003; Kumari y cols., 2005; Hong y cols., 2008).

7.5.2 Análisis del polimorfismo del gen *COMT*

En el análisis del polimorfismo rs4680 del gen *COMT* hemos encontrado que hay diferencias significativas en la frecuencia de presentación de los diferentes genotipos. El genotipo A/A, genotipo defectuoso, tiene menor frecuencia de aparición. Nuestros resultados están en consonancia con lo previamente publicado que el *COMT* rs4680 influye en las características clínico-anatómicas de pacientes con demencia (Lanni y cols., 2012). En nuestro estudio, hemos encontrado una prevalencia menor del genotipo A/A para los pacientes con DCL, lo

que podría indicar que los portadores de este genotipo tienen un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad, comportándose este genotipo de manera recesiva. En este aspecto, encontramos que los sujetos homocigotos para A (Met) tienen unos valores de PPI más altos que en el resto de genotipos. Esto se observa especialmente en los pacientes con DCL y en los pacientes con EA en relación a los controles, ya que se conoce que el alelo A está relacionado con funciones cognitivas (Harrison y cols., 2008; Talledo y cols., 2009; Quednow y cols., 2009). Los estudios en controles sugieren que la proteína COMT influye en el procesamiento cognitivo, el sistema de recompensa y la emociones (Gennatas y cols., 2012). Numerosos estudios han asociado el polimorfismo rs4680 del *COMT* con la presencia de psicosis en la EA (Sweet y cols., 2005; Borroni y cols., 2006, 2007; DeMichele-Sweet y cols., 2010). En nuestro estudio, no hemos abordado la presencia de psicosis en los pacientes ya que en estadíos tempranos de EA no hay presencia de psicosis.

7.5.3 Análisis de polimorfismos de receptores de dopamina

Los polimorfismos de genes que codifican receptores de dopamina del receptor *Drd2* (*Drd2* rs6277, *Drd2* rs1800497) no presentaron resultados significativos en la muestra estudiada. Para el SNP rs6277, el genotipo normal (T/T) fue el predominante, siendo la frecuencia del genotipo mutado (C/C) muy baja. Para las patologías estudiadas, la presencia del alelo mutado (C) en los pacientes con genotipo heterocigoto no presenta ningún riesgo. En el caso del SNP rs1800497, encontramos que el genotipo mutado no se detecta en sujetos control y ni en pacientes con TE. La frecuencia para este genotipo es muy baja en el resto de patologías. La heterocigocidad para este gen también se encuentra en frecuencias muy bajas. Los resultados de nuestro estudio están de acuerdo con la literatura, en la que no se encuentra asociación entre enfermedades neurodegenerativas y los polimorfismos *Drd2* (Singh y cols., 2008; De Palma y cols., 2010; Tan y cols., 2003; Costa-Mallen y cols., 2000; Comings y cols., 1991; Kiyohara y cols., 2011). Esto está en contradicción con lo que se esperaría encontrar, ya que los receptores D2 tienen un papel importante en el control dopaminérgico del movimiento y la conducta (Van-Ham y cols., 2007).

En el caso del gen codificante del receptor D3, *Drd3*, el polimorfismo rs6280 se encontró como factor de riesgo en la EP. Los resultados muestran una presencia menor del genotipo C/C, lo

que puede indicar que en los sujetos heterocigotos la presencia del alelo T puede ser un factor de riesgo.

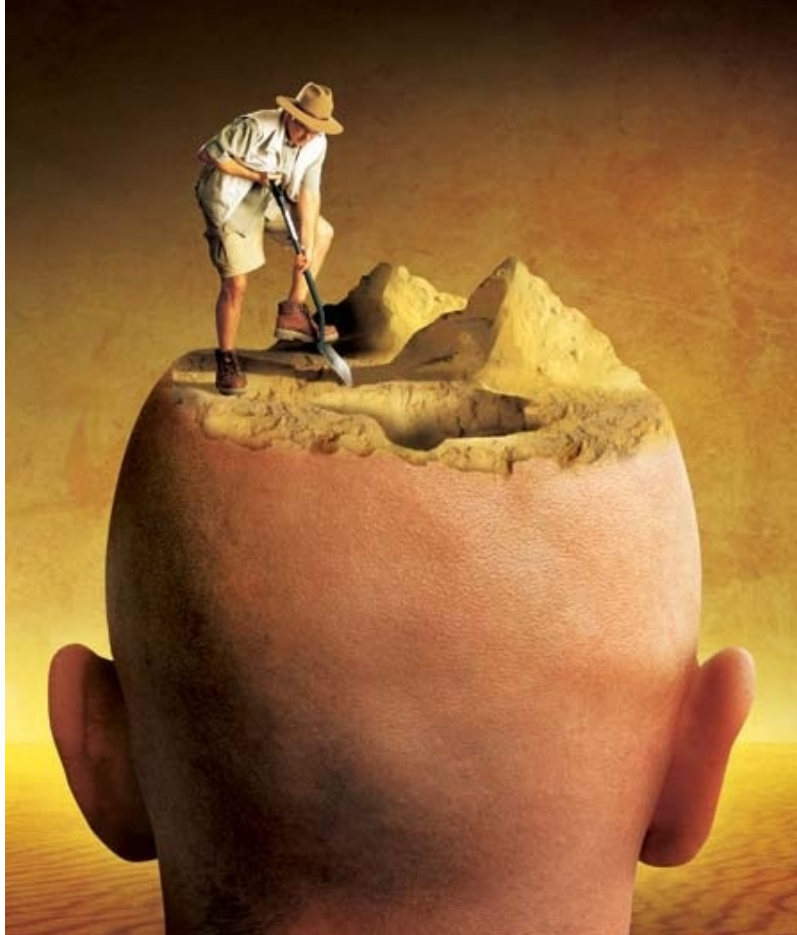
Correlacionando las distribuciones genotípicas de los genes codificantes de los receptores de dopamina (*Drd2* y *Drd3*) con la PPI observamos que el genotipo mutado para ambos polimorfismos del receptor *Drd2* (rs6277 (C/C); rs1800497 (T/T)) se correlaciona con valores anómalos de la PPI y la PPF. Lo mismo ocurre en el SNP del *Drd3*, tanto en la PPI como en la PPF. Nuestros resultados son similares con los hallados por el grupo de Roussos (2008), en el que encontraron que en sujetos sanos hay una relación lineal entre los niveles de PPI y genotipo. Homocigotos C presentaban niveles de PPI más bajo y homocigotos T niveles más altos, mientras que los heterocigotos fueron intermedios. Tanto las investigaciones farmacológicas, como los estudios de asociación genética y la investigación en esquizofrenia indican una influencia importante del sistema dopaminérgico sobre la capacidad sensoriomotora, medida por la inhibición del RAS. En particular, los agonistas de los receptores de dopamina han demostrado que alteran PPI en los seres humanos y roedores (Peng y cols., 1990; Caine y cols., 1995; Swerdlow y cols., 2002). Ha sido ampliamente demostrado que el sistema dopaminérgico estriatal modula la PPI (Swerdlow y cols., 2008). Los hallazgos encontrados con relación a la PPI y los polimorfismos estudiados del *Drd2* confirman la relación entre los receptores dopaminérgicos y la PPI. Nuestros resultados muestran relación entre los SNPs y los distintos paradigmas de PPI estudiados al igual que en otros estudios (Völter y cols., 2011; Roussos y cols., 2008). La señalización de los receptores D2 y D3 en el sistema estriatal puede ser responsable de los déficits de la PPI (Völter y cols., 2011). Aunque no hemos encontrado asociación significativa con el genotipo de los receptores D2 y la patología, el hecho de que encontráramos asociación con los valores de la PPI, el genotipo y patología podrían ser valores predictivos. La asociación entre receptores de dopamina y PPI ha sido estudiada principalmente en pacientes con esquizofrenia y en modelos animales de esquizofrenia, y resultados en sujetos sanos confirman la asociación entre la PPI y receptores D2 y D3 (Roussos y cols., 2008; Völter y cols., 2011).

Aunque no hemos encontrado asociación significativa entre todos los genes estudiados y la patología, el hecho que encontremos asociación con los valores de la PPI y el genotipo de algunos SNPs puede ser un endofenotipo predictor de las enfermedades degenerativas

estudiadas. La combinación del estudio neurofisiológico con pruebas que evalúen el estado cognitivo puede ser utilizada como técnicas no invasivas para una primera evaluación. Necesitaríamos ampliar la muestra y hacer un estudio longitudinal de mayor duración para obtener pruebas más concretas de la evolución de las patologías y su relación con el deterioro en las distintas pruebas. En cuanto a la asociación genética con las patologías estudiadas se tendría que tener en cuenta las características demográficas de los sujetos de estudio y contar con una muestra más grande para poder aseverar la misma, ya que estudios en diferentes regiones encuentran asociación entre variantes alélicas y el riesgo de enfermedad (Dai y cols., 2014), mientras que otros estudios no la encuentran (Keeling y cols., 2009).

La evolución de las enfermedades neurodegenerativas puede ser muy rápida, como en algunos casos de EA, o de progresión lenta, como en el caso de TE. Los estudios que evidencian la participación del sistema sensorial en la fisiopatología de ciertos trastornos del movimiento, hace que sea esencial tener en cuenta la contribución potencial de los cambios en la integración sensoriomotora en la ejecución del motora (Abbruzzese y Berardelli, 2003). A través del estudio, hemos visto cómo la evaluación de la PPI puede servir como valor endofenotípico para discriminar algunas enfermedades neurodegenerativas. La determinación del paradigma de medición de la PPI óptimo, con distintos intervalos de prepulso-pulso, podría constituir una herramienta importante para el diagnóstico diferencial temprano y el seguimiento de enfermedades degenerativas. En la misma línea, el empleo de otros posibles biomarcadores, como polimorfismos de ADN asociados, podría colaborar en la identificación de los subgrupos, ayudando a mejorar el pronóstico por la individualización del tratamiento. La asociación encontrada entre el genotipo mutado y los patrones anómalos de la PPI en las enfermedades degenerativas puede ser una prueba más de la asociación que hay en la PPI como una medida neurofisiológica cuantificable. Esto da a lugar a encontrar una variación en la respuesta, y obtener patrones específicos para cada patología.

Finalmente, las modificaciones de los parámetros acústicos y perceptuales de la voz y el habla, podrían ser usados como complemento a las técnicas para valorar síntomas iniciales en distintas patologías neurodegenerativas. Es necesario realizar el estudio con grupos más homogéneos para sacar valores más significativos que nos permitir realizar un algoritmo predictivo que combine los diferentes parámetros estudiados.



(Igor Morski)

Conclusiones

Conclusiones:

Primera

La capacidad sensoriomotora se altera en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas.

Segunda

Podemos establecer el intervalo prepulso-pulso de 120 ms como el mejor paradigma experimental de la valoración de la PPI para discriminar los grupos de pacientes.

Tercera

Los pacientes con EA y DCL muestran un deterioro cognitivo mayor que el resto de los grupos de la muestra de estudio .

Cuarta

Los pacientes con EP tienen un lenguaje enlentecido en la articulación silábica y prosódica.

Quinta

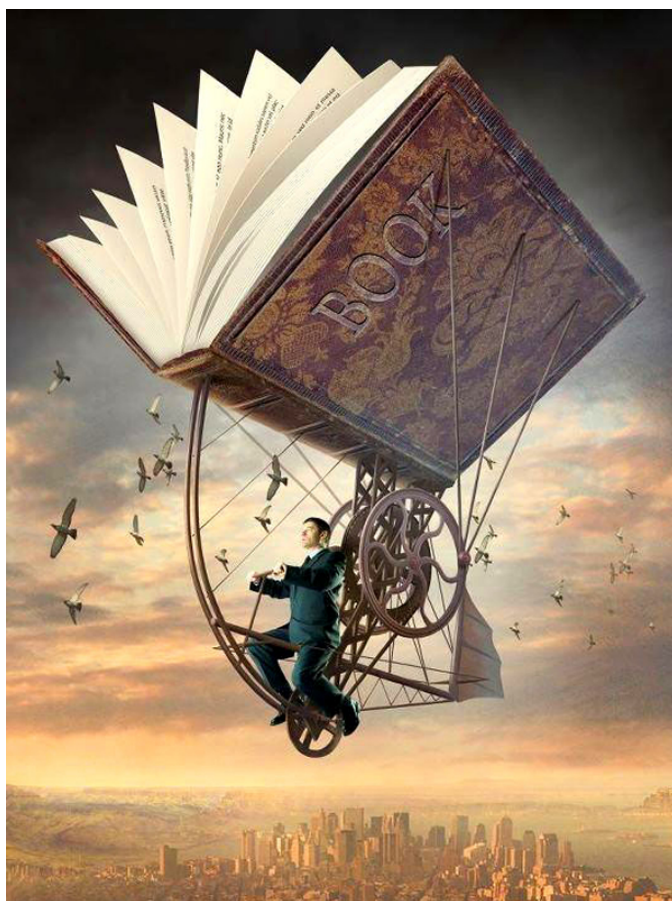
El estudio de los parámetros temporales y acústicos de la voz permite definir el perfil de las personas con EA de manera discriminativa, ya que muestran diferencias en las tareas de producción de lenguaje.

Sexta

El SNP rs4680 y las variantes alélicas gen *COMT* diferencia a los pacientes con DCL de los sujetos sanos.

Séptima

El SNP rs6280 del *Drd3* y las variantes alélicas constituyen un marcador de riesgo de EP, apareciendo el genotipo mutado en un porcentaje mucho más elevado que en el resto de pacientes con enfermedades neurodegenerativas.



(Igor Morski)

Bibliografía

9. Bibliografía

A

- Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Lolk A, Nielsen H, Kragh-Sorensen P. (2001). Risk of dementia in Parkinson's disease: a community-based, prospective study. *Neurology*. 56(6):730–736.
- Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Perry R, Wentzel-Larsen T, Lolk A, Kragh-Sørensen P. (2004). The rate of cognitive decline in Parkinson disease. *Arch Neurol*. 61(12):1906-1911.
- Aarsland D, Bronnick K, Williams-Gray C, Weintraub D, Marder K, Kulisevsky J, Burn D, Barone P, Pagonabarraga J, Allcock L, Santangelo G, Foltynie T, Janvin C, Larsen JP, Barker RA, Emre M. (2010). Mild cognitive impairment in Parkinson disease: a multicenter pooled analysis. *Neurology*. 75:1062-1069.
- Abbruzzese G, Berardelli A. (2003). Sensorimotor integration in movement disorders. *Mov Disord*. 18(3): 231-240.
- Ackermann H, Konczak J, Hertrich I. (1997). The temporal control of repetitive articulatory movements in Parkinson's disease. *Brain Lang*. 57:312–319.
- Ackermann H, Ziegler W. (1991). Articulatory deficits in parkinsonian dysarthria: an acoustic analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 54: 1093-8.
- Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, Snyder PJ, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH. (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 7(3):270-9.
- Albin RL, Young AB, Penney JB. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*. 12(10): 366-375.
- Alm PA. (2004). Stuttering and the basal ganglia circuits. *J Commun Disord*. 37:325–369.
- Andersen RA, Knight PL, Merzenich MM. (1980). The thalamocortical and corticothalamic connections of AI, All and the anterior auditory field (AAF) in the cat: evidence for two largely segregated systems of connections. *J Comp Neurol*. 194:663-701.
- Andersen RA, Roth GL, Aitkin LM, Merzenich MM. (1980). The efferent projections of the central nucleus and the pericentral nucleus of the inferior colliculus in the cat. *J Comp Neurol*. 194:649-662.
- Angrilli A, Mauri A, Palomba D, Flor H, Birbaumer N, Sartori G, di Paola F. (1996). Startle reflex and emotion modulation impairment after right amygdala lesion. *Brain*. 119:1991-2000.
- Anokhin AP, Heath AC, Myers E, Ralano A, Wood S. (2003). Genetic influences on prepulse inhibition of startle reflex in humans. *Neurosci Lett*. 15:353(1):45-48.
- Anthony BJ, Graham FK. (1985). Blink reflex modification by selective attention: Evidence for the modulation of automatic processing. *Biological Psychology*. 21(1): 43-59.
- Aston-Jones G, Bloom FE. (1981). Norepinephrine containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli. *J. Neurosci*. 1, 887–900.
- Axelrad JE, Louis ED, Honig LS, Flores I, Ross GW, Pahwa R. (2008) Reduced purkinje cell number in essential tremor: a postmortem study. *Arch Neurol*; 65: 101-107.

B

- Bakker MJ, van Dijk JG, van den Maagdenberg AM, Tijssen MA. (2006). Startle syndromes. Review. *Lancet Neurol*. 5(6):513-524.
- Ballmaier M, Casamenti F, Scali C, Mazzoncini R, Zoli M, Pepeu G, Spano PF. (2002). Rivastigmine antagonizes deficits in prepulse inhibition induced by selective immunolesioning of cholinergic neurons in nucleus basalis magnocellularis. *Neuroscience*. 114(1):91-98.
- Ben-David E, Tu R. (2014). Genetics of Parkinson Disease. *Am J Neuroradiol*. 36(3):445-447.
- Benito-León J, Louis ED. (2006). Essential tremor: emerging views of a common disorder. *Nat Clin Pract Neurol*. 2:666–678.
- Benito-León J, Louis ED. (2007). Clinical update: diagnosis and treatment of essential tremor. *Lancet*. 369:1152–1154.
- Benito-León J, Bermejo-Pareja F, Louis ED. (2005). Neurological Disorders in Central Spain (NEDICES) Study Group. Incidence of essential tremor in three elderly populations of central Spain. *Neurology*. 64:1721–1725.
- Benito-León J, Bermejo-Pareja F, Morales JM, Vega S, Molina JA. (2003). Prevalence of essential tremor in three elderly populations of central Spain. *Mov Disord*. 18:389–94.
- Benke T, Hohenstein C, Poewe W, Butterworth B. (2000). Repetitive speech phenomena in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.

69: 319-24.

Bermejo-Pareja F, Louis ED, Benito-Leon J. (2007). Risk of incident dementia in essential tremor: a population-based study. *Mov Disord.* 22: 1573-1580.

Bischoff-Grethe A, Crowley MG, Arbib MA. (2003). Movement Inhibition and Next Sensory State Prediction in the Basal Ganglia, In Graybiel A, Delong M, Kitai ST Eds. *The Basal Ganglia VI Advances in Behavioral Biology Springer US.* 54:267-277.

Bocanegra Y, Trujillo-Orrego N, Pineda D. (2014). Dementia and mild cognitive impairment in Parkinson's disease: a review. *Rev Neurol.* 16;59(12):555-569.

Bohnen NI, Kaufer DI, Ivanko LS, Lopresti B, Koeppe RA, Davis JG, Mathis CA, Moore RY, DeKosky ST. (2003). Cortical cholinergic function is more severely affected in parkinsonian dementia than in Alzheimer disease: an in vivo PET study. *Arch Neurol.* 60: 1745-1748.

Bohnen NI, Müller ML, Kotagal V, Koeppe RA, Kilbourn MR, Gilman S, Albin RL, Frey KA. (2012). Heterogeneity of cholinergic denervation in Parkinson's disease without dementia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 32: 1609-1617.

Borroni B, Grassi M, Agosti C, Costanzi C, Archetti S, Franzoni S, Caltagirone C, Di Luca M, Caimi L, Padovani A. (2006). Genetic correlates of behavioral endophenotypes in Alzheimer disease: Role of COMT, 5-HTTLPR and APOE polymorphisms. *Neurobiol Aging.* 11:1595-1603.

Borroni B, Grassi M, Costanzi C, Zanetti M, Archetti S, Franzoni S, Caimi L, Padovani A. (2007). Haplotypes in catechol-O-methyltransferase gene confer increased risk for psychosis in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* 28:1231-1238.

Bosch D, Schmid S. (2008). Cholinergic mechanism underlying prepulse inhibition of the startle response in rats. *Neuroscience* 155(1):326-335.

Botwinick J. 1970. Geropsychology. *Annu Rev Psychol* 21: 239-272

Bowen J, Teri L, Kukull W, McCormick W, McCurry SM, Larson EB. (1997). Progression to dementia in patients with isolated memory loss. *Lancet.* 349:763-765.

Bowen GP, Ison JR. (2006). Excision of visual cortex does not affect the facilitatory and inhibitory effects of a light flash prepulse on the acoustic startle reflex in the rat. *Behav Brain Res.* 168(1):114-119.

Bowers D, Miller K, Mikos A, Kirsch-Darrow L, Springer U, Fernandez H, Foote K, Okun M. (2006). Startling facts about emotion in Parkinson's disease: blunted reactivity to aversive stimuli. *Brain* 129(12): 3356-3365.

Bozoki A, Giordani B, Heidebrink JL, Berent S, Foster N. (2001). Mild cognitive impairment predicts dementia in non demented elderly patients with memory loss. *Arch Neurol.* 58:411-416.

Braak H, Braak E. (1991). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol.* 1(3):213-216.

Braak H, Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82(4):239-59.

Braak H, Braak E. (2000). Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol.* 247 (2): 3-10.

Braak H, Rüb U, Sandmann-Keil D, Gai WP, de Vos RA, Jansen Steur EN, Arai K, Braak E. (2000). Parkinson's disease: affection of brain stem nuclei controlling premotor and motor neurons of the somatomotor system. *Acta Neuropathol.* 99(5): 489-495.

Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur E N, Braak E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 24(2): 197-211.

Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR. (2001). Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology.* 156:234-258.

Braff D, Stone C, Callaway E, Geyer M, Glick I, Bali L. (1978). Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology.* 15 (4): 339-343.

Brooks DN. (1976). Wechsler Memory Scale performance and its relationship to brain damage after severe closed head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 39(6):593-601.

Brown P. (1995). Physiology of startle phenomena. *Adv Neurol.* 67:273-287.

Brown P. (1998). Physiology of the normal startle response. Valls-Solé J, Tolosa E, editors. *Brainstem Reflexes and Functions 1st ed.* Madrid ENE Publicidad, S.A., 1998; 107-118.

Brown LL, Schneider Js. (1997). Sensory and cognitive functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol.* 7:157-163.

Bunton K. Speech versus nonspeech: different tasks, different neural organization.(2008). *Semin Speech Lang.* 29(4):267-75.

Butler RW, Braff DL, Rausch JL, Jenkins MA, Sprock J, Geyer MA. (1990). Physiological evidence of exaggerated startle response in a subgroup of Vietnam Veterans with combat related PTSD. *Am J Psychiatry.* 147: 1308-1312.

C

- Cadenhead KS, Light GA, Geyer MA, Braff DL. (2000). Sensory gating deficits assessed by the P50 event-related potential in subjects with schizotypal personality disorder. *Am J Psychiatry*.157(1):55-59.
- Caine SB, Geyer MA, Swerdlow NR (1995). Effects of D3/D2 dopamine receptor agonists and antagonists on prepulse inhibition of acoustic startle in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 12: 139–145.
- Caligiuri MP. (1989). The influence of speaking rate on articulatory hypokinesia in Parkinsonian dysarthria. *Brain Lang*. 36:493–502.
- Candy JM, Perry RH, Perry EK, Irving D, Blessed G, Fairbairn AF. (1983). Pathological changes in the nucleus of Meynert in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Neurol Sci*. 59: 277-89.
- Cannizzaro M, Harel B, Reilly N, Chappell P, Snyder PJ. (2004). Voice acoustical measurement of the severity of major depression. *Brain Cogn*. 56(1): 30-35.
- Canter GJ.(1963). Speech Characteristics of Patients with Parkinson's disease: I. Intensity, Pitch, and Duration. *J Speech Hear Disord*. 28: 221-229.
- Caramelli P, Mansur LL, Nitrini R. (1998). Language and communication disorders in dementia of the Alzheimer type. In B. Stemmer, & H. A. Whitaker (Eds.), *Handbook of neurolinguistics* (p.463-473). Academic Press, San Diego, CA.
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES. (1999). Characterisation of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet*. 22:231–238.
- Castellano Benítez O y López DE. (2004). Alteración del reflejo auditivo de sobresalto inducida por lesión de la vía nigroestriatal Ed. Catellano Benítez, ISBN 84-609-2844-6. Salamanca.
- Cavallotti C, Cavallotti D, Tonnarini G, Leali FM. (2004). Dopamine receptors in the human dura mater. *Neurochem Res*. 29(8):1499-1504.
- Chouraki V, Seshadri S. (2014). Genetics of Alzheimer's disease. *Adv Genet*. 87:245-294.
- Cohen O, Pullman S, Jurewicz E, Watner D, Louis ED. (2003). Rest tremor in patients with essential tremor: prevalence, clinical correlates, and electrophysiologic characteristics. *Arch Neurol*. 60: 405–410.
- Comings DE, Comings BG, Muhleman D, Dietz G, Shahbahrani B, Tast D, Knell E, Kocsis P, Baumgarten R, Kovacs BW, Levy DL, Smith M, Borison RL, Evans DD, Klein DN, MacMurray J, Tosk JM, Sverd J, Gysin R, Flanagan SD. (1991). The dopamine D2 receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders. *JAMA*. 266:1793–1800.
- Cools R. (2011). Dopaminergic control of the striatum for high-level cognition. *Curr Opin Neurobiol*.21:402-407.
- Cools R, Barker RA, Sahakian BJ, Robbins TW. (2001). Enhanced or impaired cognitive function in Parkinson's disease as a function of dopaminergic medication and task demands. *Cereb Cortex*.11: 1136-1143.
- Costa PT Jr, Williams TF, Somerfield M. (1996). Clinical Practice Guideline No. 19: Recognition and Initial Assessment of Alzheimer's Disease and Related Dementias. AHCP publication 97-0702 (4th ed.)US Dept of Health and Human Services, Agency for Health Care Policy and Research, Rockville, Md (1996).
- Costa-Mallen P, Costa LG, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Checkoway H. (2000). Genetic polymorphism of dopamine D2 receptors in Parkinson's disease and interactions with cigarette smoking and MAO-B intron 13 polymorphism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 69(4):535-537.
- Critchley M, Greenfield JG. (1948). Olivo-pontocerebellar atrophy. *Brain* 71: 343-364.
- Cummings JL, Masterman DL. (1999). Depression in patients with Parkinson's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 14: 711-8.

D

- Dai D, Wang Y, Wang L, Li J, Ma Q, Tao J, Zhou X, Zhou H, Jiang Y, Pan G, Xu L, Ru P, Lin D, Pan J, Xu L, Ye M, Duan S. (2014). Polymorphisms of DRD2 and DRD3 genes and Parkinson's disease: A meta-analysis. *Biomed Rep*. 2(2):275-281.
- Dawson ME, Schell AM, Beers JR, Kelly A. (1982). Allocation of cognitive processing capacity during human autonomic classical conditioning. *J Exp Psychol Gen*. 111(3): 273-295.
- De Jong NH, Wempe T. (2009). Praat script to detect syllable nuclei and measure speech rate automatically. *Behav Res Methods*. 41:385-390..
- De Letter M, Santens P, de Bode M, Boon P, van Borsel J.(2006). Levodopa-induced alterations in speech rate in advanced Parkinson's disease. *Acta Neurol Belgica*.106:19–22.
- De Palma G, Dick FD, Calzetti S, Scott NW, Prescott GJ, Osborne A, Haites N, Mozzoni P, Negrotti A, Scaglioni A, Mutti A. (2010). A case-control

study of Parkinson's disease and tobacco use: gene-tobacco interactions. *Mov Disord.* 25:912–919..

Dehmel S, Eisinger D, Shore SE. (2012). Gap prepulse inhibition and auditory brainstem-evoked potentials as objective measures for tinnitus in guinea pigs. *Front Syst Neurosci.* 6:42.

DeMichele-Sweet MA, Sweet RA. (2010). Genetics of psychosis in Alzheimer's disease: a review. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(3):761-780.

De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV. (2012). Alzheimer's disease. *Subcell Biochem.* 65:329-352.

Deuschl G, Bain P, Brin M. (1998). Consensus statement of the Movement Disorder Society on Tremor. Ad Hoc Scientific Committee. *Mov Disord.* 13 Suppl 3:2-23.

Díez A, Cieza-Borrella C, Suazo V, González-Sarmiento R, Papiol S, Molina V.(2014) Cognitive outcome and gamma noise power unrelated to neuregulin 1 and 3 variation in schizophrenia. *Ann Gen Psychiatry.*13:18.

Duane DD, Vermillion KJ. (2002). Cognitive deficits in patients with essential tremor. *Neurology.* 58:1706–1707.

Duchesne N, Soucy JP, Masson H, Chouinard S, Bedard MA. (2002). Cognitive deficits and striatal dopaminergic denervation in Parkinson's disease: a single photon emission computed tomography study using 123iodine-beta-CIT in patients on and off levodopa. *Clin Neuropharmacol.* 25:216-224.

E

Eddinger L and Fisher B.(1913). Ein Mensch ohne Grohirn. *Pfluegers Ges Physiol.* 152:535–562.

Ekman U, Eriksson J, Forsgren L, Mo SJ, Riklund K, Nyberg L. (2012). Functional brain activity and presynaptic dopamine uptake in patients with Parkinson's disease and mild cognitive impairment: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* 11:679-687.

Ellwanger J, Geyer MA, Braff DL. (2003). The relationship of age to prepulse inhibition and habituation of the acoustic startle response. *Biol Psychol.* 62(3): 175-195.

F

Farrell A, Theodoros D, Ward E, Hall B, Silburn P. (2005). Effects of neurosurgical management of Parkinson's disease on speech characteristics and oromotor function. *J Speech Lang Hear Res.* 48(1): 5-20.

Fendt M, Koch M. (1999). Cholinergic modulation of the acoustic startle response in the caudal pontine reticular nucleus of the rat. *Eur J Pharmacol.* 370; 101–107.

Fendt M, Li L, Yeomans JS. (2001). Brain stem circuits mediating prepulseinhibition of the startler reflex. *Psychopharmacology (Berl).*156(2-3):216-224.

Fernández S, Ruba D, Marqués M, Sarraqueta L.(2006). Voz del anciano. *Rev Med Univ Navarra.* 50: 44-8.

Ferrer I. (2008). Neuropatología de las enfermedades de los ganglios basales. En "Tratado de los trastornos del movimiento" Eds.F.J. Jiménez Jiménez, M. R. Luquín, J.A. Molina, G. Linazasoro. Editorial Viguera. Barcelona, 2008. 169-176.

Filion D, Poje A. (2003). Selective and nonselective attention effects on prepulse inhibition of startle: a comparison of task and no-task protocols. *Biol Psychol.* 64:283–296.

Flowers KA, Robertson C, Sheridan MR. (1995). Some characteristics of word fluency in Parkinson's Disease. *J Neurolinguistics.* 9: 33-46.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. (1975). Minimental-State: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr. Res.*12: 189-198.

Forno LS. (1969). Concentric hyalin intraneuronal inclusions of the Lewy type in the brains of elderly persons (50 incidental cases):Relationship to Parkinsonism. *J. Amer. get. Soc.* 17, 557-575.

Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 66:137–147.

Frisina PG, Thomas WT, Hälbig D, Libow LS. (2009). The Pattern of Cognitive-Functional Decline in Elderly Essential Tremor Patients: An Exploratory-Comparative Study With Parkinson's and Alzheimer's Disease Patients Journal of the American Medical Directors Association, Volume 10, Issue 4, 238-242.

G

García -Martín E, Martínez C, Alonso-Navarro H, Benito-León J, Puertas I, Rubio L, López-Alburquerque T, Agúndez JA, Jiménez-Jiménez F.J. (2009). Dopamine receptor D3 (DRD3) genotype and allelic variants and risk for essential tremor. *Mov Disord.* 24(13):1910-5.

- García-Sánchez F, Martínez-Gras I, Rodríguez-Jiménez R, Rubio G. (2011). Inhibición prepulso del reflejo de la respuesta de sobresalto en los trastornos neuropsiquiátricos. *Rev Neurol.* 1;53(7):422-432.
- Gaspar P, Gray F. (1984). Dementia in idiopathic Parkinson's disease. A neuropathological study of 32 cases. *Acta Neuropathol.* 64: 43-52.
- Gauthier S. (2002). Advances in the pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *CMAJ.* 166:616–623.
- Gennatas ED, Cholfin JA, Zhou J, Crawford RK, Sasaki DA, Karydas A, Boxer AL, Bonasera SJ, Rankin KP, Gorno-Tempini ML, Rosen HJ, Kramer JH, Weiner M, Miller BL, Seeley WW. (2012). COMT Val158Met genotype influences neurodegeneration within dopamine-innervated brain structures. *Neurology.* 78(21):1663-1669.
- Geyer MA. (2006). Are cross-species measures of sensorimotor gating useful for the discovery of procognitive cotreatments for schizophrenia? *Dialogues Clin Neurosci.* 8(1):9-16. Review.
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. (2001). Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl).* 156(2-3):117-154.
- Gerwitz JC, Davis M. (1995). Habituation of prepulse inhibition of the startle reflex using an auditory close to background noise. *Behav Neurosci.* 109(3):388-395.
- Giakoumaki SG, Roussos P, Frangou S, Bitsios P. (2008). Disruption of prepulse inhibition of the startle reflex by the preferential D(3) agonist ropinirole in healthy males. *Psychopharmacology (Berl).* 194(3):289-295.
- Go RC, Perry RT, Wiener H, Bassett SS, Blacker D, Devlin B, Sweet RA. (2005). Neuregulin-1 polymorphism in late onset Alzheimer's disease families with psychoses. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 139B(1):28-32.
- Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR. y cols., (2008). Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Scale presentation and clinimetric testing results. *Movement Disorders.* 23(15): 2129-2170.
- Gómez-Nieto R, de Castro JA, Castellano O, Herrero-Turrion J, Rubio ME, López DE. (2008). Neurochemistry of the afferents to the rat cochlear root nucleus: Possible synaptic modulation of the acoustic startle. *Neuroscience* 54(1):51-64.
- Gómez-Nieto R, Horta-Júnior Jde A, Castellano O, Millian-Morell L, Rubio ME, López DE. (2014). Origin and function of short-latency inputs to the neural substrates underlying the acoustic startle reflex. *Front Neurosci.* 8:216.
- Graham FK. (1975). Presidential Address, 1974. The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology.* 12(3): 238-248.
- Graham F, Murray GM. (1977). Discordant effects of weak prestimulation on magnitude and latency of the reflex blink. *Physiological Psychology.* 5(1): 108-114.
- Graham FK. (1979). Distinguishing among orienting, defense, and startle reflexes. In H. D. Kimmel, E. H. van Olst, & J. F. Orlebeke (Eds.), *The orienting reflex in humans. An international conference sponsored by the Scientific Affairs Division of the North Atlantic Treaty Organization* (p. 137-167). Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- Green PS, Simpkins JW. (2000). Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *Int J Dev Neurosci.* 18(4-5):347-358. Review
- Greenwood TA, Braff DL, Light GA, Cadenhead KS, Calkins ME, Dobie DJ, Freedman R, Green MF, Gur RE, Gur RC, Mintz J, Nuechterlein KH, Olincy A, Radant AD, Seidman LJ, Siever LJ, Silverman JM, Stone WS, Swerdlow NR, Tsuang DW, Tsuang MT, Turetsky BI, Schork NJ. (2007). The Consortium on the Genetics of Schizophrenia (COGS): initial heritability analyses of endophenotypic measures for schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry.* 64 (11), 1242–1250.
- Greenwood TA, Lazzaroni LC, Murray SS, Cadenhead KS, Calkins ME, Dobie DJ, Green MF, Gur RE, Gur RC, Hardiman G, Kelsoe JR, Leonard S, Light GA, Nuechterlein KH, Olincy A, Radant AD, Schork NJ, Seidman LJ, Siever LJ, Silverman JM, Stone WS, Swerdlow NR, Tsuang DW, Tsuang MT, Turetsky BI, Freedman R, Braff DL. (2011). Analysis of 94 candidate genes and twelve endophenotypes for schizophrenia from the Consortium on the Genetics of Schizophrenia. *Am. J. Psychiatry.* 168 (9):930–946.
- Greenwood TA, Light GA, Swerdlow NR, Radant AD, Braff DL. (2012). Association analysis of 94 candidate genes and schizophrenia-related endophenotypes. *PLoS One.* 7 (1): e1002134.
- Griffiths C, Bough ID Jr.(1989). Neurologic Diseases and Their Effect on Voice. *Journal of Voice.* 3(2):148-156.
- Grundman M, Petersen RC, Ferris SH y cols. (2004). Mild cognitive impairment can be distinguished from Alzheimer disease and normal aging for clinical trials. *Arch. Neurol.* 61:59–66.
- Grupo de Estudio de Neurología de la Conducta y Demencias. GENCD-SEN (2003). Guías en Demencias. Conceptos, criterios, y recomendaciones para el estudio del paciente con demencia: revisión 2002. Sociedad Española de Neurología. Barcelona: Masson
- Guinea-Hidalgo A, Luna-Lario P, Tirapu-Ustároz J. (2009). Evaluation of memory in acquired brain injury: a comparison between the Wechsler Memory Scale and the Rivermead Behaviour Memory Test. *Rev Neurol.* 49(5):240-247.

H

- Hammen V, Yorkston K. (1996). Speech and pause characteristics following speech rate reduction in hypokinetic dysarthria. *J Comm Disord.* 29:429-445.
- Harrison JM, Warr WB, Irving RE. (1962). Second order neurons in the acoustic nerve. *Science.* 138:893–895.
- Harrison PJ, Tunbridge EM. (2008). Catechol-O methyltransferase (COMT): a gene contributing to sex differences in brain function, and to sexual dimorphism in the predisposition to psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology.* 33(13):3037-3045.
- Hassler R. (1938). Zur Pathologie der paralysis agitans und des postenzephalitischen Parkinsonismus. *J Psychol Neurol.* 48:387-476.
- Hejl AM, Glenthøj B, Mackeprang T, Hemmingsen R, Waldemar G. (2004). Prepulse inhibition in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 25(8):1045-1050.
- Hilker R, Thomas AV, Klein JC, Weisenbach S, Kalbe E, Burghaus L. (2005). Dementia in Parkinson disease: functional imaging of cholinergic and dopaminergic pathways. *Neurology.* 65: 1716-1722.
- Hirano S, Shinotoh H, Eidelberg D. (2012). Functional brain imaging of cognitive dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 83:963-969.
- Hodges JR, Salmon DP, Butters N. (1992). Semantic memory impairment in Alzheimer's disease. Failure of access or degraded knowledge? *Neuropsychologia.* 30:301-314.
- Hoehn MM, Yahr MD. (1967). Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology.* 17(5): 427-442.
- Hoffman HS, Ison JR. (1980). Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Rev.* 87(2): 175-189.
- Hogan DB, Eby EM. (2000). Predicting who will develop dementia in a cohort of Canadian seniors. *Can J Neurol Sci.* 27:18-24.
- Hong LE, Wonodi I, Stine OC, Mitchell BD, Thaker GK. (2007). Evidence of missense mutations on the neuregulin 1 gene affecting function of prepulse inhibition. *Biol Psychiatry.* 1;63(1):17-23.
- Hornberger M, Piguet O. (2012). Episodic memory in frontotemporal dementia: a critical review. *Brain.* 135:678-692.
- Hsieh MH, Swerdlow NR, Braff DL. (2006). Effects of background and prepulse characteristics on prepulse inhibition and facilitation: implications for neuropsychiatric research. *Biol Psychiatry.* 59:555-559.
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. (1992). Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. A clinico-pathological study of 100 cases. *JNNP.* 55:181-184.
- Hughes TA, Ross HF, Musa S, Bhattacharjee S, Nathan RN, Mindham RH, Spokes EG. (2000). A 10-year study of the incidence of and factors predicting dementia in Parkinson's disease. *Neurology.* 54(8):1596–1602.

I

- Isaacs B, Akhtar AJ. (1972). The set test: a rapid test of mental function in old people. *Age Ageing.* 1(4):222-226.

J

- Janvin CC, Larsen JP, Aarsland D, Hugdahl K. (2006). Subtypes of mild cognitive impairment in Parkinson's disease: progression to dementia. *Mov Disord.* 21:1343-1349.
- Jenner P, Schapira AH, Marsden CD. (1992). New insights into the cause of Parkinson's disease. *Neurology.* 42(12):2241-2250.
- Jorm AF, Jolley D. (1998). The incidence of dementia. A meta-analysis. *Neurology.* 51:728-733.
- Jung SH, Jang W. (2006). How accurately can we control the FDR in analyzing microarray data? *Bioinformatics.* 22:1730–1736.

K

- Kehagia AA, Barker RA, Robbins TW. (2010). Neuropsychological and clinical heterogeneity of cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 9:1200-1213.
- Keeling BH, Vilariño-Güell C, Ross OA, Wszolek ZK, Uitti RJ, Farrer MJ. (2009). DRD3 Ser9Gly and HS1BP3 Ala265Gly are not associated with Parkinson disease. *Neurosci Lett.* 18;461(2):74-75.
- Kenny ER, Burton EJ, O'Brien JT. (2008). A volumetric magnetic resonance imaging study of entorhinal cortex volume in dementia with lewy

bodies. A comparison with Alzheimer's disease and Parkinson's disease with and without dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 26: 218-225.

Kiyohara C, Miyake Y, Koyanagi M, Fujimoto T, Shirasawa S, Tanaka K, Fukushima W, Sasaki S, Tsuboi Y, Yamada T, Oeda T, Shimada H, Kawamura N, Sakae N, Fukuyama H, Hirota Y, Nagai M; Fukuoka Kinki Parkinson's Disease Study Group. (2011). Genetic polymorphisms involved in dopaminergic neurotransmission and risk for Parkinson's disease in a Japanese population. *BMC Neurol*. 11:8.

Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, Small GW, Miller B, Stevens JC. (2001). Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 8;56(9):1143-1153.

Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR. (1996). A neostriatal habit learning system in humans. *Science*. 273:1399-1402.

Koch M. (1999). The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol*. 59:107-128.

Koch M, Ebert U. (1993). Enhancement of the acoustic startle response by stimulation of an excitatory pathway from the central amygdala/basal nucleus of Meynert to the pontine reticular formation. *Exp Brain Res*. 93:231-241.

Koch M, Fendt M, Kretschmer BD. (2000). Role of the substantia nigra pars reticulata in sensorimotor gating, measured by prepulse inhibition of startle in rats. *Behav Brain Res*. 117(1-2):153-162.

Koch M, Lingenhöhl K, Pilz PK. (1993). Loss of the acoustic startle response following neurotoxic lesions of the caudal pontine reticular formation: possible role of giant neurons. *Neuroscience*. 49:617-625.

Koch M, Schnitzler HU. (1997). The acoustic startle response in rats—circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav. Brain Res*. 89, 35-49.

Kofler M, Müller J, Wenning GK, Reggiani L, Hollosi P, Bösch S, Ransmayr G, Valls-Solé J, Poewe W. (2001). The auditory startle reaction in parkinsonian disorders. *Mov Disord*. 16(1): 62-71.

Kovari E, Gold G. (2003). Lewy body densities in the entorhinal and anterior cingulate cortex predict cognitive deficits in parkinsons disease. *Acta Neuropathol*. 106:83-88.

Kumari V, Aasen I, Papadopoulos A, Bojang F, Poon L, Halari R, Cleare AJ. (2008). A comparison of prepulse inhibition in pre- and postmenopausal women and age-matched men. *Neuropsychopharmacology*. 33(11): 2610-2618.

Kumari V, Aasen I, Sharma T. (2004). Sex differences in prepulse inhibition deficits in chronic schizophrenia. *Schizophr Res*. 69(2-3): 219-235.

Kumari V, Das M, Zachariah E, Ettinger U, Sharma T. (2005). Reduced prepulse inhibition in unaffected siblings of schizophrenia patients. *Psychophysiology*. 42(5):588-594.

Kumari V, Gray JA, Gupta P, Luscher S, Sharma T. (2003) Sex differences in prepulse inhibition of the acoustic startle reflex. *Personality and Individual Differences*. 35:733-742.

Kumari V, Soni W, Sharma T. (1999). Normalization of information processing deficits in schizophrenia with clozapine. *Am J Psychiatry*. 156: 1046-1051.

Kumari V, Sharma T. (2000). Modulation of the startle response: An objective measure of cognitive and affective processes. *Journal of Advances in Schizophrenia & Brain Research*. 3:(1)9-15.

L

Labiano-Fontcuberta A, Benito-León J, Bermejo-Pareja F. (2012). Alteraciones neuropsiquiátricas en el temblor esencial. *Med Clin (Barc)*. 138(4):171-176.

Lacritz LH, Dewey R, Giller C, Munro-Cullum C. (2002). Cognitive functioning in individuals with "benign" essential tremor. *J Int Neuropsychol Soc*. 8:125-129.

Lange KW, Robbins TW, Marsden CD, James M, Owen AM, Paul GM. (1992). L-dopa withdrawal in Parkinson's disease selectively impairs cognitive performance in tests sensitive to frontal lobe dysfunction. *Psychopharmacology*. 107: 394-404.

Lanni C, Garbin G, Lisa A, Biundo F, Ranzenigo A, Sinforiani E, Cuzzoni G, Govoni S, Ranzani GN, Racchi M. (2012). Influence of COMT Val158Met polymorphism on Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in Italian patients. *J Alzheimers Dis*. 32(4):919-926.

Laurer LJ, Andersen K, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Amaducci LA, Brayne C, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A. (1999). Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. European Studies of Dementia. *Neurology*. 52: 78-84.

Lavoie B, Parent A. (1994). Pedunclopontine nucleus in the squirrel monkey: cholinergic and glutamatergic projections to the substantia nigra. *J Comp Neurol*. 344(2):232-241.

Lee Y, Davis M. (1997). Role of the hippocampus, the bed nucleus of the stria terminalis, and the amygdala in the excitatory effect of corticotropin-

releasing hormone on the acoustic startle reflex. *J Neurosci.* 17(16):6434-6446.

Lee JY, Lee EK, Park SS, Lim JY, Kim HJ, Kim JS, Jeon BS. (2009). Association of DRD3 and GRIN2B with impulse control and related behaviors in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 24:1803-1810.

Lee Y, López DE, Meloni EG, Davis M. (1996). A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *J Neurosci.* 16(11):3775-3789.

Lewis SJ, Slabosz A, Robbins TW, Barker RA, Owen AM. (2005). Dopaminergic basis for deficits in working memory but not attentional set-shifting in Parkinson's disease. *Neuropsychologia.* 43: 823-832.

Liegeois-Chauvel C, Morin C, Musolino A, Bancaud J, Chauvel P. (1989). Evidence for a contribution of the auditory cortex to audiospinal facilitation in man. *Brain.* 112 :375-391.

Lindemann C, Krauss JK, Schwabe K. (2012). Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease: effects on sensorimotor gating. *Behav Brain Res.* 230(1):243-250.

Lingenhöhl K., Friauf E. (1994). Giant neurons in the rat reticular formation: a sensorimotor interface in the elementary acoustic startle circuit? *J. Neurosci.* 14, 1176-1194.

Linville SE. (2004). Voice disorders of aging. In Kent RD, ed. *The MIT encyclopedia of communication disorders.* Boston: MIT Press. 72-75.

Lombardi WJ, Woolston DJ, Roberts JW, Gross RE. (2001). Cognitive deficits in patients with essential tremor. *Neurology.* 57:785-790.

Logemann JA, Fisher HB, Boshes B, Blonsky ER. (1978). Frequency and cooccurrence of vocal tract dysfunctions in the speech of a large sample of Parkinson patients. *J Speech Hear Disord.* 43:47-57.

Lopez DE, Warr WB, Sincx DC. (1993). The cochlear root neurons: first sentinels of the auditory pathway. Sixteenth ARO meeting Abstract 471.

López DE, Merchán, MA, Bajo, VM, Saldaña E. (1993). The cochlear root neurons in the rat, mouse and gerbil, in *The Mammalian Cochlear Nuclei: Organization and Function*, eds MA Merchán, JM. Juiz, DA. Godfrey, and E. Mugnaini (New York, NY: Plenum Press), 291-301.

López, DE, Saldaña E, Nodal FR, Merchán MA, and Warr WB. (1999). Projections of cochlear root neurons, sentinels of the auditory pathway in the rat. *J. Comp. Neurol.* 415:160-174.

Louis ED. (2010). Temblor esencial: ¿un trastorno de degeneración cerebelosa? *Rev Neurol.* 50 (1): 47-49.

Louis ED, Faust PL, Vonsattel JP, Honig LS, Rajput A, Robinson CA. (2007). Neuropathological changes in essential tremor: 33 cases compared with 21 controls. *Brain.* 130: 3297-3307.

Louis ED, Honig LS, Vonsattel JP, Maraganore DM, Borden S, Moskowitz CB. (2005). Essential tremor associated with focal nonnigral Lewy bodies: a clinicopathologic study. *Arch Neurol.* 62: 1004-1007.

Ludewig, Ludewig K. (2003). No prepulse inhibition deficits in patients with unipolar depression. *Depression and Anxiety.* 17(4):224-225.

Ludewig K, Ludewig S, Seitz A, Obrist M, Geyer MA, Vollenweider FX. (2003). The acoustic startle reflex and its modulation: effects of age and gender in humans. *Biol Psychol.* 63(3): 311-323.

Luschei ES, Ramig LO, Baker KL, Smith ME. (1999). Discharge characteristics of laryngeal single motor units during phonation in young and older adults and in persons with Parkinson disease. *J Neurophysiol.* 81: 2131-2139.

M

Manzano S, González JL, Marcos A, Payno M, Villanueva C, Matias-Guiñ J. (2009). Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer. *Neurología.* 24(4):255-262.

Marquis S, Moore M, Howieson DB, Sexton G, Payami H, Kaye A, Camicioli R. (2002). Independent predictors of cognitive decline in healthy elderly persons. *Arch Neurol.* 59:601-606.

Martin GF, Holstege G, Mehler WR. (1990). Reticular formation of the pons and medulla. In *The Human Nervous System*, pp. 203-220. Ed. G. Paxinos. Academic Press, San Diego, CA.

Martínez MF, Martín XE, Alcelay LG, Flores JC, Valiente JM, Juanbeltz BI, Beldarrain MA, López JM, Gonzalez-Fernández MC, Salazar AM, Gandarias RB, Borda SI, Marqués NO, Amillano MB, Zabaleta MC, de Pancorbo MM. (2009). The COMT Val158 Met polymorphism as an associated risk factor for Alzheimer disease and mild cognitive impairment in APOE 4 carriers. *BMC Neurosci.* 10:125.

Martínez-Sánchez F, Meilán JJ, Carro J, Gómez Íñiguez C, Millian-Morell L, Pujante Valverde IM, López-Alburquerque T, López DE. (2015). Estudio controlado del ritmo del habla en la enfermedad de Parkinson. *Neurología.* pii: S0213-4853(14)264-273.

Martínez-Sánchez F, Meilán JJ, García-Sevilla J, Carro J, Arana JM. (2013). Oral reading fluency analysis in patients with Alzheimer disease and asymptomatic control subjects. *Neurología.* 28(6):325-331.

- Martínez-Sánchez F, García Meilán JJ, Pérez E, Carro J, Arana JM.(2012). Expressive prosodic patterns in individuals with Alzheimer's disease. *Psicothema*. 24(1):16-21.
- Mattila PM, Róyttä M, Lönnberg P, Marjamäki P, Helenius H, Rinne JO. (2001). Choline acetyltransferase activity and striatal dopamine receptors in Parkinson's disease in relation to cognitive impairment. *Acta Neuropathol*. 102: 160-166.
- McAllister WR, McAllister DE. (1971). Behavioral measurements of conditioned fear. In: Brush FR, editor. Aversive conditioning and learning. New York: Academic Press; 1971. 105–179.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology*. 34: 939-944.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH.(2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 7(3):263-269.
- McGuire V, Van Den Eeden SK, Tanner CM, Kamel F, Umbach DM, Marder K, Mayeux R, Ritz B, Ross GW, Petrovitch H, Topol B, Popat RA, Costello S, Manthripragada AD, Southwick A, Myers RM, Nelson LM. (2011). Association of DRD2 and DRD3 polymorphisms with Parkinson's disease in a multiethnic consortium. *J Neurol Sci*. 307(1-2):22-29.
- Meador-Woodruff JH, Damask SP, Wang J, Haroutunian V, Davis KL, Watson SJ. (1996). Dopamine receptor mRNA expression in human striatum and neocortex. *Neuropsychopharmacology*. 15:17–29.
- Medford N, Critchley HD. (2010). Conjoint activity of anterior insular and anterior cingulate cortex: awareness and response. *Brain Struct Funct*. 214(5-6):535-549.
- Meilán JJ, Martínez-Sánchez F, Carro J, López DE, Millian-Morell L, Arana JM. (2014). Speech in Alzheimer's disease: can temporal and acoustic parameters discriminate dementia? *Dement Geriatr Cogn Disord*. 37(5-6):327-334.
- Meilán JJ, Martínez-Sánchez F, Carro J, Sánchez JA, Pérez E. (2012). Acoustic markers associated with impairment in language processing in Alzheimer's Disease. *Span J Psychol*. 15(2):487-94.
- Melzer TR, Watts R, MacAskill MR, Pitcher TL, Livingston L, Keenan RJ, Dalrymple-Alford JC, Anderson TJ. (2012). Grey matter atrophy in cognitively impaired Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 83: 188-194.
- Merchán MA, Collía F, López DE, Saldaña E. (1988). Morphology of cochlear root neurons in the rat. *J Neurocytol*.17:711–725.
- Metter J, Hanson W.(1986). Clinical and acoustical variability in hypokinetic dysarthria. *J Commun Disord*.19: 347-366.
- Midham RHS. (1970). Psychiatric syndromes in Parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.30:188-191.
- Mirra SS, Heyman A,McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM,Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L. (1991). The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 41:479–486.
- Modrego PJ, Ferrandez J. (2004). Depression in patients with mild cognitive impairment increases the risk of developing dementia of Alzheimer type: a prospective cohort study. *Arch Neurol*. 61:1290-1293.
- Mora-Simon S, Garcia-Garcia R, Perea-Bartolome MV, Ladera-Fernandez V, Unzueta-Arce J, Patino-Alonso MC, Rodriguez-Sanchez E. (2012). Mild cognitive impairment: early detection and new perspectives. *Rev Neurol*. 54(5):303-10.
- Morris JC, Storandt M, Miller P, Mckeel DW, Price JL, Rubin EH, Berg L. (2001). Mild Cognitive Impairment Represent Early-Stage Alzheimer Disease. *Arch Neurol*. 58:397-405.
- Muller U, Wachter T, Barthel H, Reuter M, von Cramon DY. (2000). Striatal [123I]beta-CIT SPECT and prefrontal cognitive functions in Parkinson's disease. *J Neural Transm*.107:303-319.

N

- Nagano-Saito A, Washimi Y, Arahata Y, Kachi T, Lerch JP, Evans AC, Dagher A, Ito K. (2005). Cerebral atrophy and its relation to cognitive impairment in Parkinson disease. *Neurology*. 64: 224-229.
- Narayanan NS, Rodnitzky RL, Uc EY.(2013). Prefrontal dopamine signaling and cognitive symptoms of Parkinson's disease. *Rev Neurosci*. 24:267-278.
- Nobili F, Campus C, Arnaldi D, De Carli F, Cabassi G, Brugnolo A, Dessi B, Morbelli S, Sambuceti G, Abbruzzese G, Rodriguez G. (2010). Cognitive nigrostriatal relationships in de novo, drug-naive Parkinson's disease patients: a [1-123I]FP-CIT SPECT study. *Mov Disord*. 25:35-43.

Nodal FR, López DE. (2003) Direct input from cochlear root neurons to pontine reticulospinal neurons in albino rat. *Journal Comp. Neurol.* 460:80-93.

O

Obeso I, Wilkinson L, Casabona E, Bringas ML, Álvarez M, Álvarez L, Pavón N, Rodríguez-Oroz MC, Macías R, Obeso JA, Jahanshahi M. (2011). Deficits in inhibitory control and conflict resolution on cognitive and motor tasks in Parkinson's disease. *Exp Brain Res.* 212(3): 371-384.

Osen KK, López DE, Slyngstad TA, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. (1991). GABA-like and glycine-like immunoreactivities of the cochlear root nucleus in rat. *J. Neurocytol.* 20, 17–25. doi: 10.1007/BF01187131.

Owen AM, Beksinska M, James M, Leigh PN, Summers BA, Marsden CD, Quinn NP, Sahakian BJ, Robbins TW. (1993) Visuospatial memory deficits at different stages of Parkinson's disease. *Neuropsychologia.* 31(7):627-644.

P

Parasuraman R.(1998). *The Attentive Brain.* MIT Press. London. ISBN 0 262 16172 9.

Peng RY, Mansbach RS, Braff DL, Geyer MA. (1990). A D2 dopamine receptor agonist disrupts sensorimotor gating in rats. Implications for dopaminergic abnormalities in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 3: 211–218.

Penner H, Miller N, Wolters M. (2007). Motor speech disorders in three parkinsonian syndromes: a comparative study. 16th International Congress of Phonetic Sciences, Saarbruecken, Germany. 1989-1992.

Perry EK, Curtis M, Dick DJ, Candy JM, Atack JR, Bloxham CA, Blessed G, Fairbairn A, Tomlinson BE, Perry RH. (1985). Cholinergic correlates of cognitive impairment in Parkinson's disease: comparisons with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 48: 413-421.

Perry W, Minassian A, Feifel D. (2004). Prepulse inhibition in patients with nonpsychotic major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders.* 81(2):179–184.

Perry W, Viglione Jr DJ. (1991). The Ego Impairment Index as a predictor of outcome in melancholic depressed patients treated with tricyclic antidepressants. *Journal of Personality Assessment.* 56(3):487-501.

Perriol M, Dujardin K, Derambure P, Marcq A, Bourriez JL, Laureau E, Pasquier F, Defebvre L, Destée A. (2005). Disturbance of sensory filtering in dementia with Lewy bodies: comparison with Parkinson's disease dementia and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* Jan;76(1):106-108.

Petersen RC, Stevens JC, Ganguli M, Tangalos EG, Cummings JL, DeKosky ST. (2001). Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review): report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 56: 1133–1142.

Pfeffer R I, Kurosaki TT, Harrah CH Jr., Chance JM, Filos S. (1982). Measurement of functional activities in older adults in the community. *J. Gerontol.*37, 323–329.

Pilz PKD. (1996). Sensitization of the acoustic startle response in rats is sensitive to a change of the environment. In Goettingen Neurobiology Report 1996, p. 223. Eds. N. Elsner and H.-U. Schnitzler. Thieme Verlag Stuttgart, New York.

Polito C, Berti V, Ramat S, Vanzi E, De Cristofaro MT, Pellicanò G, Mungai F, Marini P, Formiconi AR, Sorbi S, Pupi A. (2012). Interaction of caudate dopamine depletion and brain metabolic changes with cognitive dysfunction in early Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 33:206;29-39.

Q

Quednow BB, Schmechtig A, Ettinger U, Petrovsky N, Collier DA, Vollenweider FX, Wagner M, Kumari V. (2009). Sensorimotor gating depends on polymorphisms of the serotonin-2A receptor and catechol-O-methyltransferase, but not on neuregulin-1 Arg38Gln genotype: a replication study. *Biol Psychiatry.* 66(6):614-620.

Quednow BB, Westheide J, Kühn KU, Werner P, Maier W, Hawellek B, Wagner M. (2006). Normal prepulse inhibition and habituation of acoustic startle response in suicidal depressive patients without psychotic symptoms. *Journal of Affective Disorders.* 92(2e3):299-303.

R

Rinaldi PC, Thompson RF. (1985). Age, sex and strain comparison of habituation of the startle response in the rat. *Physiol Behav.* 35(1):9-13.

Rinne JO, Portin R, Ruottinen H, Nurmi E, Bergman J, Haaparanta M, Solin O. (2000). Cognitive impairment and the brain dopaminergic system in Parkinson disease: [18F] fluorodopa positron emission tomographic study. *Arch Neurol.* 57:470-475.

Roark B, Mitchell M, Hosom JP, Hollingshead K, Kaye J. (2011). Spoken language derived measures for detecting mild cognitive impairment. *IEEE*

trans audio speech. 19;2081-2090.

Rosen JB, Hitchcock JM, Sananes CB, Miserendino MJD, Davis M. (1991). A direct projection from the ventral nucleus of the amygdala to the acoustic startle pathway: anterograde and retrograde tracing studies. *Behav Neurosci.* 105:817-825.

Roussos P, Giakoumaki SG, Adamaki E, Bitsios P. (2011). The influence of schizophrenia-related neuregulin-1 polymorphisms on sensorimotor gating in healthy males. *Biol Psychiatry.* 69(5):479-486.

Roussos P, Giakoumaki SG, Rogdaki M, Pavlakis S, Frangou S, Bitsios P. (2008). Prepulse inhibition of the startle reflex depends on the catechol O-methyltransferase Val158Met gene polymorphism. *Psychol Med.* 38(11):1651-1658..

S

Saint-Cyr JA, Taylor AE, Lang AE. (1988). Procedural learning and neostriatal dysfunction in man. *Brain.* 111:941-959.

Salloum RH, Yurosko C, Santiago L, Sandridge SA, Kaltenebach JA. (2014). Induction of enhanced acoustic startle response by noise exposure: dependence on exposure conditions and testing parameters and possible relevance to hyperacusis. *PLoS One.* 9(10):e111747.

Samuels MA. (2007). Brains and mysteries. *Newsweek.* 150(24):90.

Saxena M, Behari M, Kumaran SS, Goyal V, Narang V. (2014). Assessing speech dysfunction using BOLD and acoustic analysis in parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* (14) 177-181.

Schindler JS, Kelly JH. (2002) Swallowing disorders in the elderly. *The Laryngoscope* 112(4): 589-602.

Schleinitz D, Distefano JK, Kovacs P. (2011) Targeted SNP genotyping using the TaqMan® assay. *Methods Mol Biol.* 700:77-87.

Scholes KE, Martin-Iverson MT. (2009). Relationships between prepulse inhibition and cognition are mediated by attentional processes. *Behavioural Brain Research.* 205:456-467.

Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn NP. (2000). Cross sectional prevalence survey of idiopathic Parkinson's disease and Parkinsonism in London. *Br Med J.* 321:21-22.

Schwartz M, Groshar D, Inzelberg R, Hocherman S. (2004). Dopamine-transporter imaging and visuo-motor testing in essential tremor, practical possibilities for detection of early stage Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 10: 385-389.

Sherwin BB. (2000). Mild cognitive impairment: potential pharmacological treatment options. *J Am Geriatr Soc.* 48:431-441.

Shill HA, Adler CH, Sabbagh MN. (2008). Pathologic findings in prospectively ascertained essential tremor subjects. *Neurology.* 70(16):1452-1455.

Shinotoh H, Namba H, Yamaguchi M, Fukushi K, Nagatsuka S, Iyo M, Asahina M, Hattori T, Tanada S, Irie T. (1999). Positron emission tomographic measurement of acetylcholinesterase activity reveals differential loss of ascending cholinergic systems in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol.* 46: 62-69.

Shohamy D, Myers CE, Grossman S, Sage J, Gluck MA. (2005). The role of dopamine in cognitive sequence learning: evidence from Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 156(2):191-199.

Siepel FJ, Brønneck KS, Booij J, Ravina BM, Lebedev AV, Pereira JB, Grüner R, Aarsland D. (2014). Cognitive executive impairment and dopaminergic deficits in de novo Parkinson's disease. *Mov Disord.* (14):1802-1808.

Sievers J, Berry M, Baumgarten H. (1981). The role of noradrenergic fibres in the control of post-natal cerebellar development. *Brain Res.* 207(1):200-208.

Singh M, Khan AJ, Shah PP, Shukla R, Khanna VK, Parmar D. (2008). Polymorphism in environment responsive genes and association with Parkinson disease. *Mol Cell Biochem.* 312:131-138.

Sinoff G, Badamy S. (2014). Mild cognitive impairment, dementia, and affective disorders in essential tremor: a prospective study. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y).* 4:227.

Skodda S, Schlegel U. (2008). Speech rate and rhythm in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 23: 985-92. 7.

Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT, Hjaltason O, Birgisdottir B, Jonsson H, Gudnadottir VG, Gudmundsdottir E, Bjornsson A, Ingvarsson B, Ingason A, Sigfusson S, Hardardottir H, Harvey RP, Lai D, Zhou M, Brunner D, Mutel V, Gonzalo A, Lemke G, Sainz J, Johannesson G, Andresson T, y cols., (2002). Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet.* 71:877-892.

Stoessl AJ. (2011). Neuroimaging in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics.* 8(1): 72-81.

Summerfield C, Junqué C, Tolosa E, Salgado-Pineda P, Gómez-Ansón B, Martí MJ, Pastor P, Ramírez-Ruiz B, Mercader J. (2005). Structural brain changes in Parkinson disease with dementia: a voxel-based morphometry study. *Arch Neurol.* 62: 281-285.

- Sun W, Deng A, Jayaram A, Gibson B. (2012). Noise exposure enhances auditory cortex responses related to hyperacusis behavior. *Brain Res.* 1485: 108–116.
- Swanson LW, Hartman BK. (1975). The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J Comp Neurol.* 15;163(4):467-505.
- Sweet RA, Devlin B, Pollock BG, Sukonick DL, Kastango KB, Bacanu S-A, Chowdari KV, DeKosky ST, Ferrell RE. (2005). Catechol-O-methyltransferase haplotypes are associated with psychosis in Alzheimer disease. *Mol Psychiatry.* 10:1026–1036.
- Swerdlow NR, Eastvold A, Karban B. (2002). Dopamine agonist effects on startle and sensorimotor gating in normal male subjects: time course studies. *Psychopharmacology (Berl).* 161: 189–201.
- Swerdlow NR, Geyer MA. (1993). Clozapine and haloperidol in an animal model of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Pharmacol Biochem Behav.* 44;741–744.
- Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL. (2001). Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology.* 156(2-3): 194-215.
- Swerdlow NR, Hines SR, Herrera SD, Weber M, Breier MR. (2013). Opposite effects of tolcapone on amphetamine-disrupted startle gating in low vs. high COMT-expressing rat strains. *Pharmacol Biochem Behav.* 106:128-131.
- Swerdlow NR, Light GA, Sprock J, Calkins ME, Green MF, Greenwood TA, Gur RE, Gur RC, Lazzaroni LC, Nuechterlein KH, Radant AD, Ray A, Seidman LJ, Siever LJ, Silverman JM, Stone WS, Sugar CA, Tsuang DW, Tsuang MT, Turetsky BI, Braff DL. (2014). Deficient prepulse inhibition in schizophrenia detected by the multi-site COGS. *Schizophr Res.* 152(2-3):503-512.
- Swerdlow NR, Weber M, Qu Y, Light GA, Braff DL. (2008). Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. *Psychopharmacology.* 199 (3): 331–388.
- Szumilas M. (2010). Explaining odds ratios. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry.* 3:227-229.

T

- Taler V, Phillips NA (2008). Language performance in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A comparative review. *J clin exp neuropsych.* 30, 501-556.
- Talledo JA, Sutherland Owens AN, Schortinghuis T, Swerdlow NR. (2009). Amphetamine effects on startle gating in normal women and female rats. *Psychopharmacology (Berl).* 204(1):165-175.
- Tan EK, Chai A, Lum SY, Shen H, Tan C, Teoh ML, Yih Y, Wong MC, Zhao Y. (2003). Monoamine oxidase B polymorphism, cigarette smoking and risk of Parkinson's disease: a study in an Asian population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 120B:58–62.
- Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H. (2002). Phases of Abeta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58:1791–1800.
- Thiel CM, Fink GR. (2007). Visual and auditory alertness: modality-specific and supramodal neural mechanisms and their modulation by nicotine. *J Neurophysiol.* 97(4):2758-2768.
- Tindall EA, Speight G, Petersen DC, Padilla EJD, Hayes VM. (2007). Novel Plexor™ SNP genotyping technology: comparisons with TaqMan® and homogenous MassEXTEND™ MALDI-TOF mass spectrometry. *Hum Mutat.* 28(9):922–927.
- Tiraboschi P, Hansen LA, Alford M, Sabbagh MN, Schoos B, Masliah E, Thal LJ, Corey-Bloom J. (2000). Cholinergic dysfunction in diseases with Lewy bodies. *Neurology* 54:407–411.
- Tomé M, Jiménez AJ, Richter H, Vío K, Bermúdez-Silva FJ, Rodríguez EM, Pérez-Fígares JM. (2004). The subcommissural organ expresses D2, D3, D4, and D5 dopamine receptors. *Cell Tissue Res.* 317(1):65-77.
- Torkaman-Boutorabi A1, Ali Shahidi G, Choopani S, Reza Zarrindast M. (2012). Association of monoamine oxidase B and catechol-O-methyltransferase polymorphisms with sporadic Parkinson's disease in an Iranian population. *Folia Neuropathol.* 50(4):382-389.

U

- Ueki A, Goto K, Sato N, Iso H, Morita Y. (2006). Prepulse inhibition of Acoustic Startle Response in mild cognitive impairment and mild dementia of Alzheimer type. *Psychiatry and Clinical Neuroscience.* 60:55-62.

V

- Valdeoriola F, Valls-Solé J, Tolosa E, Ventura PJ, Nobbe FA, Martí MJ. (1998). Effects of a startling acoustic stimulus on reaction time in different parkinsonian syndromes. *Neurology.* 51(5):1315-1320.

- Vallelunga A, Flaibani R, Formento-Dojot P, Biundo R, Facchini S, Antonini A. (2012). Role of genetic polymorphisms of the dopaminergic system in Parkinson's disease patients with impulse control disorders. *Parkinsonism Relat Disord.*18(4):397-399.
- Valls-Pedret C, Molinuevo JL, Rami L. (2010). Diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer: fase prodrómica y preclínica. *Rev Neurol.* 51 (8): 471-480.
- Valls-Solé, J. (1998). Acoustic and somatosensory prepulse modulation of the blink reflex and the startle reaction. *The Brainstem Reflexes and Functions.* eds. Litofinter,S.A. Madrid, pp: 119-131.
- Valls-Solé J. (2000). Neurophysiological characterization of parkinsonian syndromes. *Neurophysiol Clin.* 30(6):352-367.
- Valls-Solé J. (2004). Funciones y disfunciones de la reaccion de sobresalto en el ser humano. *Revista de Neurologia.* 20(10):46-55.
- Valls-Solé J, Muñoz JE, Valdeoriola F. (2004). Abnormalities of prepulse inhibition do not depend on blink reflex excitability: a study in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Clinical Neurophysiology.*115:1527-1536.
- Van-Ham II, Banihashemi B, Wilson AM, Jacobsen KX, Czesak M, Albert PR. (2007). Differential signaling of dopamine-D2S and -D2L receptors to inhibit ERK1/2 phosphorylation. *J Neurochem.* 102(6):1796-804.
- Venneri A, Forbes-McKay KE, Shanks MF. (2005). Impoverishment of spontaneous language and the prediction of Alzheimer's disease. *Brain* 128, E27.
- Vidaiheld M, Rothwell JC, Thompson PD, Lee AJ, Marsden CD. (1992). The auditory startle response in the Steele-Richardson- Olszewski syndrome and Parkinson's Disease. *Brain.* 115:1181-1192.
- Voordecker Ph, Mavroudakis N, Blecic S, Hildebrand J, Zergers de Beyl D. (1997). Audiogenic startle in acute hemiplegia. *Neurology.* 49: 470-473.
- Völter C, Riedel M, Wöstmann N, Aichert DS, Lobo S, Costa A, Schmechtig A, Collier DA, Hartmann AM, Giegling I, Möller HJ, Quednow BB, Rujescu D, Kumari V, Etinger U. (2012). Sensorimotor gating and D2 receptor signalling: evidence from a molecular genetic approach. *Int J Neuropsychopharmacol.*15(10):1427-1440.

W

- Williams BR. (2001). Geriatric dementias. M.A. Koda-Kimble, L.Y. Young (Eds.), *Applied Therapeutics—The Clinical Use of Drugs* (7th ed.), Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa (2001), 98.1–98.17
- Williams BR, Nazarians D, Gill MA. (2003). A Review of Rivastigmine: A Reversible Cholinesterase Inhibitor. *Clinical Therapeutics.* 25(6):1634-1653.
- Wilkins DE, Hallet M, Wess MM. (1986). Audiogenic startle reflex of man and its relationship to startle syndromes. *Brain.*109:561-573.
- Wolf H, Grunwald M, Ecke GM, Zedlick D, Bettin S, Dannenberg C, Dietrich J, Eschrich K, Arendt T, Gertz HJ. (1998). The prognosis of mild cognitive impairment in the elderly. *J Neural Transm Suppl.* 54:31-50.
- Wolfe J, Maëva G, John S.(2009). Vocal tract resonances in speech, singing, and playing musical instruments. *HFSP J.*3(1):6-23.
- Wong AH, Buckle CE, Van Tol HH. (2000). Polymorphisms in dopamine receptors: what do they tell us? *Eur J Pharmacol.* 410(2-3):183-203.
- Wu MF, Krueger J, Ison JR, Gerrard RL. (1984). Startle reflex inhibition in the rats: its persistence after extended repetition of the inhibitory stimulus. *J Exp Psychol Anim Behav Process.* 10(2):221-228.
- Wynn JK, Dawson ME, Schell AM, McGee M, Salveson D, Green MF. (2004). Prepulse facilitation and prepulse inhibition in schizophrenia patients and their unaffected siblings. *Biol Psychiatry.* 55(5): 518-523.

Y

- Yeomans JS, Frankland PW. (1996). The acoustic startle reflex: neurons and connections. *Brain Res Rev.* 21:301-314.
- Yesavage JA, Brink TL, Rose TL, Lum O, Huang V, Adey MB, Leirer VO.(1983). Development and validation of a geriatric depression screening scale: A preliminary report. *Journal of Psychiatric Research.* 17: 37-49.
- Yoshihisa K, Mizuno Y. (2003). Parkinson's disease. In Dickson D, ed. *Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movements disorders.* Basel. *ISN Neuropath Press.* 159-187

Z

- Zhang L, Hu XZ, Li H, Li X, Smerin S, Benedek DM, Ursano R. (2011). Startle response related genes. *Med Hypotheses.*77(4):685-691.



(Igor Morski)

Anexos

10. ANEXOS

ANEXO I

I. Modificaciones del Reflejo de Sobresalto en el DCL

	Control(35)	DCL(33)	Control		DCL	
			Hombre(17)	Mujer(18)	Hombre(13)	Mujer(20)
Amplitud RAS _(μV)	65,5±16,2	107,0±17,1	68,0±23,2	63,0±22,6	76,0±26,6	137,9±21,4*
Latencia RAS (ms)	76,9±3,8	74,2±4,0	79,6±5,4	74,2±5,2	81,2±6,1	67,1±5,0
PPI ₆₀	16,5±5,1	3,9±5,4	20,9±7,3	12,0±7,1	-11,4±8,3*	19,3±6,8
Latencia PPI ₆₀	95,2±3,4	103,1±3,6	98,9±4,9	91,5±4,8	96,1±5,7	110,2±4,6*
PPI ₁₂₀	23,6±5,6	12,1±5,9	26,5±8,0	20,7±7,9	-6,5±9,2*	30,7±7,4
Latencia PPI ₁₂₀	94,7±5,1	93,7±5,4	103,3±7,4	86,1±7,2	102,8±8,4	84,7±6,8
PPF	23,0±4,1	21,2±4,4	25,3±6,0	20,9±5,8	7,4±6,9*	35,1±5,5
Latencia PPF	80,5±3,6	80,1±3,9	86,9±5,3	74,2±5,1	84,1±6,0	76,1±4,9
Habitación	37,3±6,3	28,1±6,6	46,5±9,0	28,1±8,7	11,4±10,3*	44,9±8,3

Tabla 20. Media (± error estándar de la media) en pacientes con DCL y controles (n=al números de sujetos).RAS = Reflejo Auditivo de Sobresalto; PPI = Inhibición por un estímulo previo; PPF= Facilitación. Grado de significación p<0,05 (*) y p<0,001 (**).

II. Evaluación Cognitiva DCL

	Control(35)	DCL(33)	Control		DCL		
			Hombre(17)	Mujer(18)	Hombre(13)	Mujer(20)	
Actividades Funcionales	1,4±0,9	3,5±0,7*	1,9±1,3	0,9±1,2	4,2±1,1	2,8±0,8	
GDSátrica	6,6±1,0	7,9±0,8	5,8±1,5	7,4±1,4	6,9±1,3	8,9±1,0	
MMSE	27,2±1,2	24,5±0,9	27,6±1,7	26,8±1,6	24,8±1,4	24,1±1,1	
Test de Isaac	36,8±1,2	34,8±0,9	38,4±1,7	35,2±1,6	34,9±1,5	34,7±1,1	
Test de Isaac letra P	8,5±0,6	6,6±0,5*	9,5±0,9	7,6±0,8	5,8±0,8	7,4±0,6	
Test de Wechler	Texto	22,1±2,8	13,6±2,2*	24,3±4,1	20,0±3,9	11,9±3,5*	15,3±2,7
	Pendiente de aprendizaje	3,1±0,6	2,1±0,5	3,0±0,9	3,1±0,9	1,3±0,8*	3,0±0,6
	Recuerdo de Texto	12,2±2,0	5,9±1,6*	13,4±2,9	11,1±2,8	4,0±2,5*	7,8±2,0
	Reconocimiento de Texto	19,4±1,1	18,1±0,8*	19,8±1,5	19,1±1,5	18,6±1,3	17,6±1,0
	Porcentaje de Reconocimiento de Texto	65,5±9,7	36,2±7,6*	62,5±14,1	68,5±13,3	27,5±12,0	45,0±0,4
	Letras y Números	4,6±0,7	3,0±0,5	5,3±1,0	4,0±0,9	3,3±0,8	2,8±0,7
	Parejas de Palabras	9,2±1,5	3,1±1,2*	9,0±2,1	9,4±2,0	2,1±1,8*	4,2±1,4*
	Pendiente Aprendizaje	1,2±0,4	1,0±0,3	1,0±0,6	1,3±0,5	0,8±0,5	1,2±0,4
	Recuerdo Parejas Palabras	2,5±0,5	1,1±0,4*	2,6±0,8	2,4±0,7	0,9±0,7	1,4±0,5
	Porcentaje Retención Parejas de Palabras	66,3±10,9	31,2±8,6*	66,2±15,8	66,3±14,9	29,3±13,5	33,0±10,5
	Reconocimiento Pareja de Palabras	22,9±0,9	21,5±0,7	22,5±1,3	23,2±1,2	21,6±1,1	21,4±0,9

Tabla 21. Media de la puntuación obtenida en los test cognitivos (\pm error estándar de la media) en pacientes con DCL y controles (n=Número de sujetos). Se observan diferencias significativas entre grupos (*) para $p < 0,05$, y (**) para $p < 0,001$.

III. Análisis de Polimorfismos en DCL

	Control	DCL	Comparaciones entre grupos OR(95% IC) (p)
Genotipo NRG-1 rs6994992			
T/T	2(10)	5(19,2)	2,19(0,32-15,0)0,43
C/T	11(55)	13(50)	1,03(0,28-3,77)0,96
C/C	7(35)	8(30,8)	2,19(0,32-15,0)0,43
Frecuencia Alélica			
Portador	15(37,5)	23(44,2)	1,32(0,60-3,07)0,52
No portador	25(62,5)	29(55,8)	0,75(0,33-1,76)0,52
Genotipo NRG-1 rs3924999			
A/A	1(5)	4(15,4)	2,67(0,26-27,49)0,41
A/G	9(45)	7(26,9)	0,51(0,14-1,85)0,31
G/G	10(50)	15(57,7)	2,18(0,32-15,04)0,43
Frecuencia Alélica			
Portador	11(27,5)	15(28,8)	1,07(0,43-2,68)0,89
No portador	29(72,5)	37(71,2)	0,94(0,37-2,34)0,89
Genotipo COMT rs4680			
A/A	7(36,8)	1(4,2)	21,0(1,8-248,1)0,01*
A/G	9(47,4)	14(58,3)	10,9(1,1-103,9)0,04*
G/G	3(15,8)	9(37,5)	21,0(1,8-248,1)0,01*
Frecuencia Alélica			
Portador	23(60,5)	16(33,3)	0,33(0,14-0,79)0,01*
No portador	15(39,5)	32(66,7)	3,07(1,27-7,43)0,01*
Genotipo Drd2 rs6277			
C/C	2(10,5)	5(19,2)	1,5(0,16-2,23)0,68
T/C	11(57,9)	11(42,3)	0,6(0,22-10,3)0,45
T/T	6(31,6)	10(38,5)	1,5(0,16-2,23)0,68
Frecuencia Alélica			
Portador	15(39,5)	21(40,4)	1,04(0,44-2,44)0,93
No portador	23(60,5)	31(59,6)	0,96(0,41-2,26)0,93
Genotipo Drd2 rs1800497			
T/T	0(0)	1(3,7)	1,2E+009(0,0)1,0
C/T	5(25)	5(18,5)	0,71(0,18-2,91)64
C/C	15(75)	21(77,8)	59384269(14562742,005)0,00
Frecuencia Alélica			
Portador	5(12,5)	7(13,0)	1,04(0,31-3,56)0,95
No portador	35(87,5)	47(87)	0,96(0,28-3,28)0,95
Genotipo Drd3 rs6280			
T/T	4(20)	9(34,6)	5,17(0,86-59,6)0,11
C/T	9(45)	14(53,8)	7,16(0,86-59,7)0,7
C/C	7(35)	3(11,5)	5,17(0,86-59,6)0,11
Frecuencia Alélica			
Portador	17(42,5)	20(55,6)	2,17(0,94-5,01)0,07
No portador	23(57,5)	16(44,4)	0,46(0,20-1,07)0,07

Tabla 22. Genotipos NRG-1 rs6994992, rs3924999; COMT rs4680; Drd2 rs6277, rs1800497 y Drd3 rs6280 y variaciones alélicas de los distintos polimorfismos entre pacientes con DCL y controles. Las columnas 2 y 3 representan la frecuencia absoluta y porcentaje de aparición. Las columna 4 representa las comparaciones bilaterales que indican el porcentaje de aparición (odd ratio, OR) de ese alelo en relación al control, en un intervalo de confianza (IC) del 95%. Las diferencias son significativas cuando *p<0,05 o **p<0,001.

ANEXO II.

I. Modificaciones del Reflejo de Sobresalto en la EA

	Control(35)	EA(21)	Control		EA	
			Hombre(17)	Mujer(18)	Hombre(7)	Mujer(14)
Amplitud RAS _(μV)	65,5 \pm 9,2	72,3 \pm 12,5	68,0 \pm 13,1	63,0 \pm 12,8	53,3 \pm 20,5	91,3 \pm 14,5
Latencia RAS (ms)	76,9 \pm 4,0	71,5 \pm 5,5	79,6 \pm 5,8	74,2 \pm 5,6	69,5 \pm 9,0	73,6 \pm 6,4
PPI ₆₀	16,5 \pm 6,0	12,5 \pm 8,2	20,9 \pm 8,6	12,0 \pm 8,3	-15,9 \pm 13,4	9,1 \pm 9,5
Latencia PPI ₆₀	95,2 \pm 3,8	100,7 \pm 5,2	98,9 \pm 5,5	91,5 \pm 5,3	92,7 \pm 8,5	108,7 \pm 6,0*
PPI ₁₂₀	23,6 \pm 5,1	35,0 \pm 6,9	26,5 \pm 7,3	20,7 \pm 7,0	30,2 \pm 11,3	39,8 \pm 8,0
Latencia PPI ₁₂₀	94,7 \pm 5,1	88,6 \pm 7,0	103,3 \pm 7,3	86,1 \pm 7,1	92,9 \pm 11,4	84,2 \pm 8,1
PPF	23,1 \pm 4,6	39,6 \pm 6,3*	25,3 \pm 6,6	20,9 \pm 6,4	37,1 \pm 10,3	42,0 \pm 7,3*
Latencia PPF	80,5 \pm 3,2	69,7 \pm 4,4*	86,9 \pm 4,6	74,2 \pm 4,5	69,1 \pm 7,1*	70,4 \pm 5,1
Habitación	37,3 \pm 7,1	37,3 \pm 9,8	46,5 \pm 10,2	28,2 \pm 9,9	50,6 \pm 16,0	24,0 \pm 11,3

Tabla 23. Media (\pm error estándar de la media) en pacientes con EA y controles (n= al números de sujetos).RAS = Reflejo Auditivo de Sobresalto; PPI = Inhibición por un estímulo previo; PPF= Facilitación. Grado de significación p<0,05 (*) y p<0,001 (**).

II. Tratamiento Farmacológico

15 de los 21 pacientes de EA estaban bajo tratamiento con Exelon o Prometax Parche transdérmico 4,6 mg/24 h.

III.Evaluación Cognitiva EA

	Control(35)	EA(21)	Control		EA		
			Hombre(17)	Mujer(18)	Hombre(7)	Mujer(14)	
Actividades Funcionales	1,4±2,0	9,0±1,9*	1,9±2,9	0,9±2,7	8,9±3,1	9,1±2,1*	
GDSátrica	6,6±1,1	9,3±1,1	5,8±1,7	7,4±1,6	8,1±1,8	10,5±,2	
MMSE	27,2±1,1	20,7±1,0**	27,6±1,6	26,8±1,5	21,1±1,7*	19,7±1,2*	
Test de Isaac	36,8±2,0	27,3±1,9**	38,4±2,9	35,2±2,7	26,0±3,1*	28,5±2,1	
Test de Isaac letra P	8,5±0,6	7,1±0,6	9,5±0,9	7,6±0,9	7,3±1,0	7,0±0,7	
Test de Wechler	Texto	22,1±2,2	8,3±2,1**	24,3±3,1	20,0±3,0	8,7±3,4*	7,8±2,3*
	Pendiente de aprendizaje	3,1±0,5	0,8±0,5*	3,0±0,7	3,1±0,7	0,4±0,8*	1,1±0,5*
	Recuerdo de Texto	12,2±1,6	1,6±1,5**	13,4±2,4	11,1±2,3	1,3±2,6**	1,9±1,7*
	Reconocimiento de Texto	19,4±0,8	16,1±0,8*	19,8±1,2	19,1±1,1	15,7±1,3*	16,4±0,9
	Porcentaje de Reconocimiento de Texto	65,5±7,9	10,7±7,5**	62,5±11,5	68,5±10,9	9,2±12,3*	12,3±8,4**
Test de Wechler	Letras y Números	4,6±0,6	1,6±0,6**	5,3±0,9	4,0±0,9	2,1±1,0*	1,0±0,7*
	Parejas de Palabras	9,2±1,4	4,0±1,3*	9,0±2,1	9,4±2,0	5,9±2,2	2,1±1,5*
	Pendiente Aprendizaje	1,2±0,4	1,5±0,4	1,0±0,6	1,3±0,6	2,1±0,6	0,9±0,4
	Recuerdo Parejas Palabras	2,5±0,6	1,1±0,5	2,6±0,8	2,4±0,8	1,3±0,9	0,9±0,6
	Porcentaje Retención Parejas de Palabras	66,3±12,2	33,9±11,5	66,3±17,4	66,3±16,7	46,4±19,0	21,3±13,0*
	Reconocimiento Pareja de Palabras	22,9±1,0	17,8±0,9**	22,5±1,4	23,2±1,3	18,7±1,5	16,8±1,0**

Tabla 24. Media de la puntuación obtenida en los test cognitivos (\pm error estándar de la media) en pacientes con EA y controles (n=Número de sujetos). Se observan diferencias significativas entre grupos (*) para $p < 0,05$ y (**) para $p < 0,001$.

IV. Análisis de Polimorfismos en la EA

	Control	EA	Comparaciones entre grupos Exp(B) (p)
Genotipo COMT rs4680			
A/A	7(36,8)	2(11,8)	0,10(0,01-0,84)0,03*
A/G	9(47,4)	7(41,2)	0,29(0,06-1,52)0,14
G/G	3(15,8)	8(47,1)	0,10(0,01-0,84)0,03*
Frecuencia alélica			
Portadores	23(60,5)	11(32,4)	16(33,3)
No portadores	15(39,5)	23(67,6)	32(66,7)
Genotipo Drd2 rs1800497			
T/T	0(0)	1(5,6)	1,9E+009(0,0)1,0
C/T	5(25)	4(22,2)	0,92(0,20-4,2)0,92
C/C	15(75)	13(72,2)	1,0E+008(101005290,51-1,0E+008)0,00
Frecuencia alélica			
Portadores	5(12,5)	6(16,7)	1,4(0,39-5,05)0,61
No portadores	35(87,5)	30(83,3)	0,71(0,20-2,58)0,61
Genotipo Drd2 rs6277			
C/C	2(10,5)	2(11,1)	1,2(0,12-11,87)0,88
T/C	11(57,9)	11(61,1)	1,2(0,28-5,12)0,81
T/T	6(31,6)	5(27,8)	1,2(0,12-11,87)0,88
Frecuencia alélica			
Portadores	15(39,5)	15(41,7)	1,10(0,43-2,77)0,85
No portadores	23(60,5)	21(58,3)	0,91(0,36-2,31)0,85
Genotipo Drd3 rs6280			
T/T	4(20)	6(33,3)	2,63(0,45-15,3)0,28
C/T	9(45)	8(44,4)	1,56(0,33-7,36)0,58
C/C	7(35)	4(22,2)	2,63(0,45-15,3)0,28
Frecuencia alélica			
Portadores	17(42,5)	32(61,5)	1,69(0,68-4,20)0,26
No portadores	23(57,5)	20(38,5)	0,59(0,24-1,47)0,26
Genotipo NRG-1 rs6994992			
T/T	2(10)	4(22,2)	2,8(0,36-21,72)0,33
C/T	11(55)	9(50)	1,15(0,27-4,87)0,85
C/C	7(35)	5(27,8)	2,8(0,36-21,72)0,33
Frecuencia alélica			
Portadores	15(37,5)	17(47,2)	1,5(0,60-3,73)0,39
No portadores	25(62,5)	19(52,8)	0,67(0,27-1,68)0,4
Genotipo NRG-1 rs3924999			
A/A	1(5)	4(22,2)	8,0(0,70-91,80)0,09
A/G	9(45)	9(50)	2,0(0,49-8,24)0,34
G/G	10(50)	5(27,8)	8,0(0,70-91,80)0,09
Frecuencia alélica			
Portadores	11(27,5)	17(47,2)	2,36(0,91-6,12)0,08
No portadores	29(72,5)	19(52,8)	0,42(0,16-1,10)0,08

Tabla 25. Genotipos NRG-1 rs6994992, rs3924999; COMT rs4680; Drd2 rs6277, rs1800497 y Drd3 rs6280 y variaciones alélicas de los distintos polimorfismos entre pacientes con EA y controles. Las columnas 2 y 3 representan la frecuencia absoluta y porcentaje de aparición. Las columnas 4 representa las comparaciones bilaterales que indican el porcentaje de aparición (odd ratio, OR) de ese alelo en relación al control, en un intervalo de confianza (IC) del 95%. Las diferencias son significativas cuando * $p < 0,05$ o ** $p < 0,001$.

ANEXO III.

I. Modificaciones del Reflejo de Sobresalto en la Enfermedad de Parkinson

	Control(35)	EP(52)	Control		EP	
			Hombre(17)	Mujer(18)	Hombre(28)	Mujer(24)
Amplitud RAS(μ V)	62,8 \pm 8,4	75,2 \pm 6,9	68,0 \pm 12,0	57,5 \pm 11,7	68,9 \pm 9,4	81,5 \pm 10,1
Latencia RAS (ms)	74,7 \pm 12,2	88,3 \pm 10,1	79,6 \pm 17,6	69,9 \pm 17,1	97,7 \pm 13,7	79,0 \pm 14,8
PPI ₆₀	17,1 \pm 4,2	24,5 \pm 3,5	20,9 \pm 6,1	13,3 \pm 5,9	23,4 \pm 4,7	25,6 \pm 5,1
Latencia PPI ₆₀	95,5 \pm 3,4 \pm	110,0 \pm 2,8**	98,9 \pm 4,8	92,1 \pm 4,7	112,2 \pm 3,8*	107,9 \pm 4,1*
PPI ₁₂₀	23,5 \pm 4,9	42,1 \pm 4*	26,5 \pm 7,0	20,5 \pm 6,8	47,9 \pm 5,5*	36,2 \pm 5,9
Latencia PPI ₁₂₀	95,2 \pm 4,6	92,4 \pm 3,8	103,3 \pm 6,6	87,1 \pm 6,4	90,3 \pm 5,2	94,5 \pm 5,6
PPF	23,2 \pm 4,7	45,8 \pm 3,9**	25,3 \pm 6,8	21,2 \pm 6,6	49,4 \pm 5,3*	42,3 \pm 5,7*
Latencia PPF	81,4 \pm 3,2	73,6 \pm 2,6	86,9 \pm 4,6	75,9 \pm 4,5	70,4 \pm 3,6*	76,7 \pm 3,9
Habitación	38,1 \pm 5,6	36,4 \pm 4,5	46,5 \pm 8,0	29,7 \pm 7,8	30,1 \pm 6,2	42,7 \pm 6,7

Tabla 26. Media (\pm error estándar de la media) en pacientes con EP y controles (n= al números de sujetos).RAS = Reflejo Auditivo de Sobresalto; PPI = Inhibición por un estímulo previo; PPF= Facilitación. Grado de significación $p < 0,05$ (*).

II. Evaluación Cognitiva EP

	Control(35)	EP(52)	Control		EP		
			Hombre(17)	Mujer(18)	Hombre(28)	Mujer(24)	
Actividades Funcionales	1,4±1,5	3,1±0,9	1,9±2,2	0,9±2,0	3,1±1,2	3,0±1,3	
GDSátrica	6,6±1,8	10,7±1,0*	5,6±2,6	7,4±2,4	9,9±1,4	11,6±1,5	
MMSE	27,2±0,6	26,5±0,4	27,6±0,9	26,8±0,8	27,2±0,5	25,8±0,5	
Test de Isaac	36,8±0,8	37,1±0,5	38,4±1,2	35,2±1,1	36,7±0,6	37,6±0,7	
Test de Isaac letra P	8,5±0,5	8,1±0,3	9,5±0,8	7,6±0,7	8,4±0,4	7,9±0,5	
Test de Wechler	Texto	22,1±2,9	20,1±1,7	24,3±4,1	20,0±3,9	20,5±2,3	19,8±2,4
	Pendiente de aprendizaje	3,1±0,6	2,9±0,4	3,0±0,9	3,1±0,8	2,5±0,5	3,3±0,5
	Recuerdo de Texto	12,2±2,4	10,5±1,4	13,4±3,5	11,1±3,3	10,7±2,0	10,3±2,1
	Reconocimiento de Texto	19,4±1,1	19,8±0,7	19,8±1,6	19,1±1,5	20,2±0,9	19,4±1,0
	Porcentaje de Reconocimiento de Texto	65,5±9,4	60,6±5,5	62,5±13,7	68,5±12,9	63,4±7,6	57,8±8,1
Test de Wechler	Letras y Números	4,6±0,7	4,1±0,4	5,3±1,1	4,0±1,0	5,2±0,6	2,3±0,6
	Parejas de Palabras	9,2±1,7	8,3±1,0	9,0±2,4	9,4±2,3	9,8±1,3	6,8±1,4
	Pendiente Aprendizaje	1,7±0,5	2,2±0,3*	1,0±0,7	1,3±0,6	2,0±0,4	2,4±0,4
	Recuerdo Parejas Palabras	2,5±0,6	2,6±0,3	2,6±0,8	2,4±0,8	2,9±0,5	2,1±0,5
	Porcentaje Retención Parejas de Palabras	66,3±11,4	55,2±6,7	66,3±16,6	66,3±15,7	63,3±9,2	47,1±9,8
	Reconocimiento Pareja de Palabras	22,9±0,6	22,8±0,6	22,5±0,9	23,2±0,9	22,8±0,5	22,7±0,6

Tabla 27. Media de la puntuación obtenida en los test cognitivos (\pm error estándar de la media) en pacientes con EP y controles (n=Número de sujetos). Se observan diferencias significativas entre grupos (*) para p

III. Análisis de Polimorfismos en EP

	Control	EP	Comparaciones entre grupos Exp(B) (p)
Genotipo COMT rs4680			
A/A	7(36,8)	10(23,8)	2,57(0,52-12,7)0,25
A/G	9(47,4)	21(50)	1,63(0,47-5,66)0,44
G/G	3(15,8)	11(26,2)	2,57(0,52-12,7)0,25
Frecuencia alélica			
Portadores	23(60,5)	41(48,8)	0,62(0,29-1,36)0,23
No portadores	15(39,5)	43(51,2)	1,61(0,74-3,50)0,23
Genotipo Drd2 rs1800497			
T/T	0(0)	1(5,6)	7,1E+008(0,0)1,0
C/T	5(25)	4(22,2)	0,79(0,23-2,77)0,72
C/C	15(75)	13(72,2)	1595963394569400,629-55742516)0,00
Frecuencia alélica			
Portadores	5(12,5)	11(12,5)	1,0(0,32-3,10)1,0
No portadores	35(87,5)	77(87,5)	1,0(0,32-3,10)1,0
Genotipo Drd2 rs6277			
C/C	2(10,5)	5(11,4)	0,83(0,13-5,47)0,85
T/C	11(57,9)	21(47,7)	0,64(0,20-2,07)0,45
T/T	6(31,6)	18(40,9)	0,83(0,13-5,47)0,85
Frecuencia alélica			
Portadores	15(39,5)	31(35,2)	0,83(0,38-1,83)0,65
No portadores	23(60,5)	57(64,8)	1,20(0,55-2,63)0,65
Genotipo Drd3 rs6280			
T/T	4(20)	19(43,2)	11,1(2,0-62,5)0,006*
C/T	9(45)	22(50)	5,7(1,2-27,1)0,03*
C/C	7(35)	3(6,8)	11,1(2,0-62,5)0,006*
Frecuencia alélica			
Portadores	17(42,5)	60(68,2)	2,90(1,34-6,27)0,007*
No portadores	23(57,5)	28(31,8)	0,35(0,16-0,75)0,007*
Genotipo NRG-1 rs6994992			
T/T	2(10)	6(13,6)	2,1(0,32-13,61)0,44
C/T	11(55)	28(63,6)	1,78(0,54-5,87)0,34
C/C	7(35)	10(22,7)	2,1(0,32-13,61)0,44
Frecuencia alélica			
Portadores	15(37,5)	40(45,5)	1,39(0,65-2,99)0,40
No portadores	25(62,5)	48(54,5)	0,72(0,34-1,55)0,40
Genotipo NRG-1 rs3924999			
A/A	1(5)	6(14)	3,33(0,35-31,74)0,30
A/G	9(45)	19(44,2)	1,17(0,39-3,55)0,78
G/G	10(50)	18(41,9)	3,33(0,35-31,74)0,30
Frecuencia alélica			
Portadores	11(27,5)	31(36)	1,73(0,73-4,14)0,22
No portadores	29(72,5)	55(64)	0,58(0,24-1,38)0,22

Tabla 28. Genotipos NRG-1 rs6994992, rs3924999; COMT rs4680; Drd2 rs6277, rs1800497 y Drd3 rs6280 y variaciones alélicas de los distintos polimorfismos entre pacientes con EP y controles. Las columnas 2 y 3 representan la frecuencia absoluta y porcentaje de aparición. Las columna 4 representa las comparaciones bilaterales que indican el porcentaje de aparición (odd ratio, OR) de ese alelo en relación al control, en un intervalo de confianza (IC) del 95%. Las diferencias son significativas cuando *p<0,05 o ** p<0,001.

IV. Evaluación Motora

	UPDRS	UPDRS I (mental)	UPDRS II (actividad diaria)	UPDRS III (motor)	Temblor reposo MMSS	Temblor reposo MMII	Temblor intención	NIH
EP	43,8 ±15,1	3,8 ±2,1	14,6±6,4	22,6±8,7	2,5±1	1,9± 1	1,8±1,1	2,8 ±0,9
Puntuaciones (% pacientes)		1-3: (57,1) 4-6: (35,7) >7: (14)	<6: (14,2) 10-18: (50) 19-26: (28,5) >27: (7,1)	8-18: (28,6) 9-29: (57,1) >30: (14,3)				
TABLA 29. VALORACIÓN MOTORA Y DEL TEMBLOR EN ENFERMEDAD DE PARKINSON. UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale). NIH (Tremor severity Scale)								

V. Tratamiento farmacológico pacientes de EP

N° Pacientes	Levodopa	Ropirinol	Rasagilina	Propanolol	Pramipexol
2				31,5mg	2,5
ilina	300 mg			40 mg	2 mg
3	250 mg	7,33 mg	1 mg		2,33 mg
7	264,28mg		1 mg		1,85 mg
3					1,33mg
11	360,90 mg				2,09mg
1			1mg		1mg
3	208mg				
4	212,5mg		1,75mg		
2	700mg	11mg			2,5mg
1				3mg	2mg
1			3mg		
2	200mg	7mg			
1	200mg	4mg	1mg	40mg	

Tabla 30. Tratamiento farmacológico de los pacientes con EP.

ANEXO IV.

I. Modificaciones del Reflejo de Sobresalto en el TE

	Control(35)	TE(34)	Control		TE	
			Hombre(17)	Mujer(18)	Hombre(17)	Mujer(17)
Amplitud RAS _(μV)	62,8 \pm 7,9	73,9 \pm 8,1	68,0 \pm 11,4	57,5 \pm 11,1	84,0 \pm 11,4	63,8 \pm 11,4
Latencia RAS (ms)	74,7 \pm 3,5	70,5 \pm 3,5	79,6 \pm 5,0	69,9 \pm 4,9	68,6 \pm 5,0	72,4 \pm 5,0
PPI ₆₀	17,1 \pm 3,8	13,8 \pm 3,9	13,3 \pm 5,3	20,9 \pm 5,5	19,7 \pm 5,5	7,9 \pm 5,5
Latencia PPI ₆₀	95,5 \pm 3,5	103 \pm 3,5	98,9 \pm 5,0	92,1 \pm 4,9	100,8 \pm 5,0	106,0 \pm 5,0*
PPI ₁₂₀	23,5 \pm 4,5	29,4 \pm 4,6	26,5 \pm 6,5	20,5 \pm 6,3	29,9 \pm 6,5	28,9 \pm 6,5
Latencia PPI ₁₂₀	95,2 \pm 5,0	84,4 \pm 5,1	103,3 \pm 7,2	87,1 \pm 7,0	87,2 \pm 7,2	81,6 \pm 7,2
PPF	23,2 \pm 4,4	31,8 \pm 4,5	25,3 \pm 6,4	21,2 \pm 6,2	31,5 \pm 6,4	32,1 \pm 6,4
Latencia PPF	81,4 \pm 4,0	73,8 \pm 3,5	86,9 \pm 4,9	75,9 \pm 4,8	75,6 \pm 4,9	72,0 \pm 4,9
Habitación	38,1 \pm 5,1	39,1 \pm 5,2	46,5 \pm 7,3	29,7 \pm 7,1	37,9 \pm 7,3	40,3 \pm 7,3

Tabla 31. Media (\pm error estándar de la media) en pacientes con TE y controles (n= al números de sujetos).RAS = Reflejo Auditivo de Sobresalto; PPI = Inhibición por un estímulo previo; PPF= Facilitación. Grado de significación $p < 0,05$ (*) y $p < 0,001$ (**).

	Control(35)	TE(34)	Control		TE		
			Hombre(17)	Mujer(18)	Hombre(17)	Mujer(17)	
Actividades Funcionales	1,4±0,5	0,9±0,4	1,9±0,8	0,9±0,7	1,2±0,5	0,6±0,5	
GDSátrica	6,6±1,3	7,5±0,9	5,6±1,9	7,4±1,8	6,6±1,3	8,4±1,3	
MMSE	27,2±0,7	27,6±0,5	27,6±1,0	26,8±0,9	27,1±0,7	28,1±0,7	
Test de Isaac	36,8±0,6	38,9±0,4*	38,4±0,9	35,2±0,8	38,2±0,6	39,6±0,6	
Test de Isaac letra P	8,5±0,4	9,1±0,3	9,5±0,6	7,6±0,5	9,1±0,4	9,1±0,4	
Test de Wechler	Texto	22,1±3,0	29,0±2,1	24,3±4,4	20,0±4,1	27,1±3,0	30,9±3,0*
	Pendiente de aprendizaje	3,1±0,7	4,2±0,5	3,0±1,0	3,1±0,9	4,2±0,69	4,2±0,69
	Recuerdo de Texto	12,2±2,6	17,8±1,8	13,4±3,5	11,1±3,3	16,5±2,6	19,1±2,6
	Reconocimiento de Texto	19,4±1,0	17,8±1,8*	19,8±1,6	19,1±1,5	22,5±1,0	22,8±1,0*
	Porcentaje de Reconocimiento de Texto	65,5±7,8	73,4±5,5	62,5±13,7	68,5±12,9	74,1±7,8	72,7±7,8
	Letras y Números	4,6±0,7	5,1±0,5	5,3±1,1	4,0±1,0	5,4±0,72	4,9±0,72
	Parejas de Palabras	9,2±1,7	12,5±1,2	9,0±2,4	9,4±2,3	12,6±1,7	12,4±1,7
	Pendiente Aprendizaje	1,2±0,5	3,5±0,3**	1,0±0,7	1,3±0,6	3,2±0,50*	3,8±0,50*
	Recuerdo Parejas Palabras	2,5±0,6	4,1±0,4*	2,6±0,8	2,4±0,8	4,0±0,6	4,2±0,6
	Porcentaje Retención Parejas de Palabras	66,3±9,0	84,6±6,3	66,3±16,6	66,3±15,7	84,4±8,9	84,8±8,9
	Reconocimiento Pareja de Palabras	22,9±0,3	23,8±0,2*	22,5±0,9	23,2±0,9	23,8±0,3	23,7±0,3*

Tabla 32. Media de la puntuación obtenida en los test cognitivos (\pm error estándar de la media) en pacientes con TE y controles (n=Número de sujetos). Se observan diferencias significativas entre grupos (*) para $p < 0,05$.

III. Evaluación de polimorfismos en TE

	Control (20)	TE(34)	Comparaciones entre grupos Exp(B) (p)
Genotipo COMT rs4680			
A/A	7(36,8)	7(25)	0,21(0,04-1,09)0,06
A/G	9(47,4)	7(25)	0,17(0,03-0,81)0,02*
G/G	3(15,8)	14(50)	0,21(0,04-1,09)0,06
Frecuencia alélica			
Portador	23(60,5)	21(37,5)	0,39(0,17-0,91)0,03*
No Portador	15(39,5)	35(62,5)	2,56(1,10-5,96)0,03*
Genotipo Drd2 rs1800497			
T/T	0(0)	0(0)	0
C/T	5(25)	8(28,6)	1,2(0,33-4,41)0,78
C/C	15(75)	20(71,4)	1,2(0,33-4,4)0,78
Frecuencia alélica			
Portador	5(12,5)	8(14,3)	1,17(0,35-3,87)0,80
No Portador	35(87,5)	48(85,7)	0,86(0,26-2,84)0,80
Genotipo Drd2 rs6277			
C/C	2(10,5)	4(13,8)	2,0(0,26-15,38)0,50
T/C	11(57,9)	19(65,5)	1,73(0,45-6,69)0,43
T/T	6(31,6)	6(20,7)	2,0(0,26-15,38)0,50
Frecuencia alélica			
Portador	15(39,5)	27(46,6)	1,34(0,58-3,06)0,50
No Portador	23(60,5)	21(53,4)	0,75(1,72)0,50
Genotipo Drd3 rs6280			
T/T	4(20)	17(42,5)	3,5(0,8-15,2)0,15
C/T	9(45)	23(57,5)	3,5(0,63-19,5)0,09
C/C	7(35)	17(42,5)	3,5(0,63-19,5)0,15
Frecuencia alélica			
Portador	17(42,5)	34(56,7)	1,77(0,79-3,97)0,17
No Portador	23(57,5)	26(43,3)	0,55(0,25-1,27)0,17
Genotipo NRG-1 rs6994992			
T/T	2(10)	2(6,5)	0,70(0,08-6,22)0,75
C/T	11(55)	19(61,3)	1,21(0,36-4,10)0,76
C/C	7(35)	10(32,3)	0,70(0,08-6,22)0,75
Frecuencia alélica			
Portador	15(37,5)	23(37,1)	0,98(0,43-2,24)0,97
No Portador	25(62,5)	39(62,9)	1,01(0,45-2,31)0,97
Genotipo NRG-1 rs3924999			
A/A	1(5)	5(17,2)	4,55(0,45-45,86)0,20
A/G	9(45)	13(44,8)	1,31(0,40-4,38)0,66
G/G	10(50)	11(37,9)	4,55(0,45-45,86)0,20
Frecuencia alélica			
Portador	11(27,5)	23(39,7)	1,73(0,73-4,14)0,22
No Portador	29(72,5)	35(60,3)	0,58(0,24-1,38)0,22

Tabla 33. Genotipos NRG-1 rs6994992, rs3924999; COMT rs4680; Drd2 rs6277, rs1800497 y Drd3 rs6280 y variaciones alélicas de los distintos polimorfismos entre pacientes con TE y controles. Las columnas 2 y 3 representan la frecuencia absoluta y porcentaje de aparición. La columna 4 representa las comparaciones bilaterales que indican el porcentaje de aparición (odds ratio, OR) de ese alelo en relación al control, en un intervalo de confianza (IC) del 95%. Las diferencias son significativas cuando * $p < 0,05$ o ** $p < 0,001$.

IV. Evaluación Motora

	TETRAS total	Cabeza	Cara	Voz	Miembro superior	Miembro inferior	Espiral	Cursiva	Aproximación puntos	Standing
Temblores	9,74±3,68	0,66±1,18	0,28±0,81	0,75±1,14	1,97±0,59	0,59±0,71	1,81±0,97	1,65±0,87	2,13±0,61	0,19±0,47
Eencial										

TABLA 34. VALORACIÓN MOTORA TEMBLOR TEMBLOR ESENCIAL TETRAS

V. Tratamiento farmacológico pacientes de TE

N° Pacientes	Levodopa	Ropirinol	Rasagilina	Propanolol	Pramipexol
2				31,5mg	2,5
1	300 mg			40 mg	2 mg
3	250 mg	7,33 mg	1 mg		2,33 mg
7	264,28mg		1 mg		1,85 mg
3					1,33mg
11	360,90 mg				2,09mg
1			1mg		1mg
3	208mg				
4	212,5mg		1,75mg		
2	700mg	11mg			2,5mg
1				3mg	2mg
1			3mg		
2	200mg	7mg			
1	200mg	4mg	1mg	40mg	

Tabla 35. Tratamiento Farmacológico pacientes con TE.

Anexo V.

Ampliación de relaciones entre PPI/PPF y polimorfismos genéticos

I. Correlaciones entre PPI/PPF SNPs del gen *NRG-1*

1a. Polimorfismo rs6994992

Los diferentes parámetros de la PPI presentan valores distintos en función del genotipo del polimorfismo rs6994992 del gen *NRG-1*, como puede apreciarse en las figuras 31 y 32.

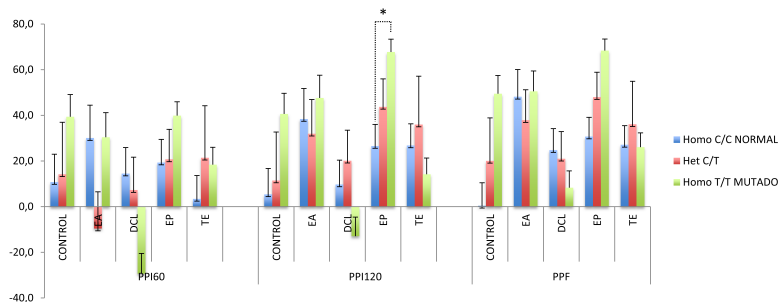


Figura 31. Valores de la PPI en función del genotipo, para el polimorfismo rs6994992 del gen *NRG-1*. Las barras de error presentan valores medios \pm EEM. (*) representa diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

El análisis de los resultados, indica que los valores de PPI y PPF difieren según su genotipo. Dentro de cada uno de los grupos, sólo hay diferencias significativas entre el genotipo control y mutado de los EP en la en la PPI₁₂₀ ($p = 0,027$) y en la PPF ($p = 0,021$).

Comparando entre grupos, vemos que las mayores diferencias se aprecian en los valores de PPF. Entre los individuos que presentan el genotipo mutado, son significativas las diferencias entre los pacientes de DCL y de EP en la PPI₆₀ ($p = 0,005$) y en la PPF ($p = 0,03$); también, entre los de DCL y EA en la PPI₁₂₀ ($p = 0,032$) y en la PPF ($p = 0,005$). Otras diferencias significativas pueden verse en la figura 32.

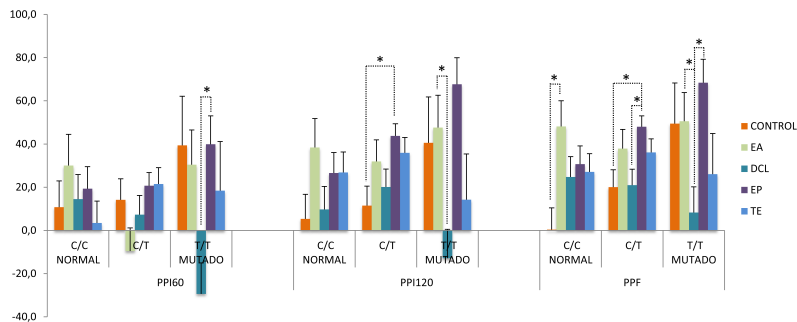


Figura 32. Valores de la PPI y PPF agrupados por genotipo del polimorfismo rs6994992 del gen *NRG-1*. Las barras de error representan \pm EEM.

Ib. Polimorfismo rs3924999

Los valores medios de la PPI encontrados en pacientes con diferentes genotipos del polimorfismo *NRG-1* rs3924999 según se observa en la figura 33.

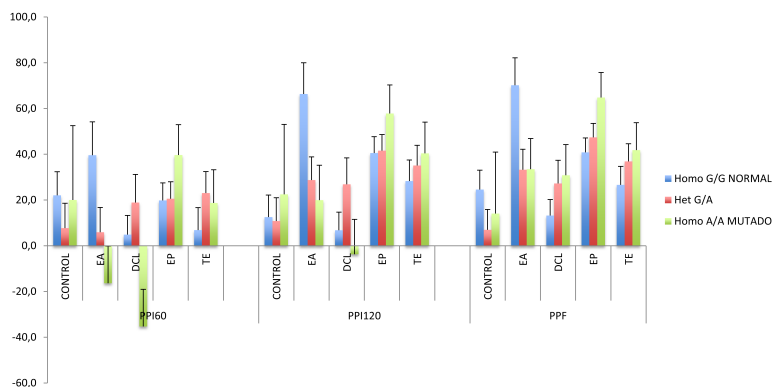


Figura 33. Valores de la PPI en función del genotipo, para el polimorfismo rs3924999 del gen *NRG-1*. Las barras de error representan valores medios \pm EEM. (*) representa diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

Valores medios de la PPI encontrados en pacientes con diferentes genotipos del polimorfismo NRG-1 rs3924999 como se observa en la Figura 34. Hay diferencias entre controles y pacientes de EA en los individuos que presentan el genotipo normal GG en la PPI₁₂₀ ($p=0,017$) y en la PPF ($p=0,024$). Entre los pacientes de DCL y EA en la PPI₁₂₀ ($p=0,002$) y en la PPF ($p=0,001$), y entre los pacientes de DCL y EP en la PPI₁₂₀ ($p=0,02$) y en la PPF ($p=0,039$). Finalmente, pacientes de EA y TE en la PPF ($p=0,032$). Entre los heterocigotos, se diferencian los controles y los EP en la PPF ($p=0,003$). El genotipo mutado, AA, discrimina a los pacientes de DCL y EP en la PPI₆₀ ($p=0,005$) y en la PPI₁₂₀ ($p=0,022$).

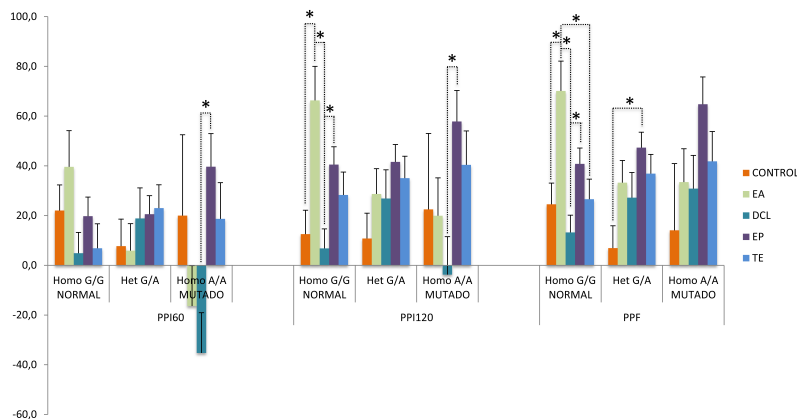


Figura 34. Valores de la PPI y PPF agrupados por genotipo para el polimorfismo rs3924999 del gen *NRG-1*. Las barras de error representan valores medios \pm EEM. (*) representa diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

II. Correlaciones entre PPI/PPF y el SNPs del gen *COMT*

Ia. Polimorfismo rs4680

El análisis de los valores medios de la PPI agrupando los pacientes según el genotipo del Polimorfismo del gen *COMT* rs4680 se observan en la figura 35.

En la figura 36 podemos ver los valores medios de la PPI encontrados en pacientes con diferentes genotipos. En los análisis por pares encontramos diferencias entre los heterocigotos, con diferencias significativas entre los controles y los pacientes de EP en la PPI₁₂₀ ($p=0,045$).

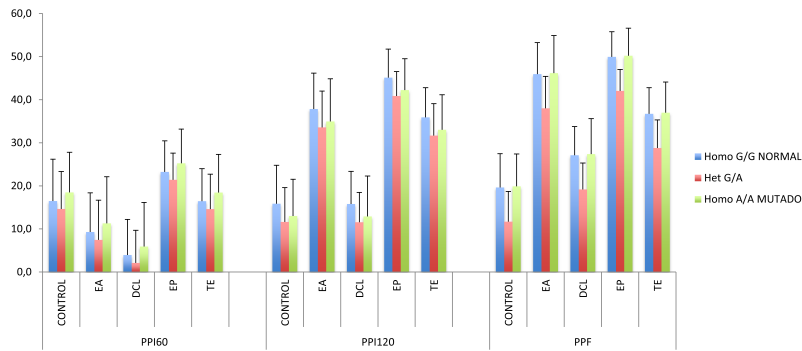


Figura 35. Valores de la PPI en función del genotipo, para el polimorfismo rs4680 del gen *COMT*. Las Las barras de error representan valores medios \pm EEM. (*) representa diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

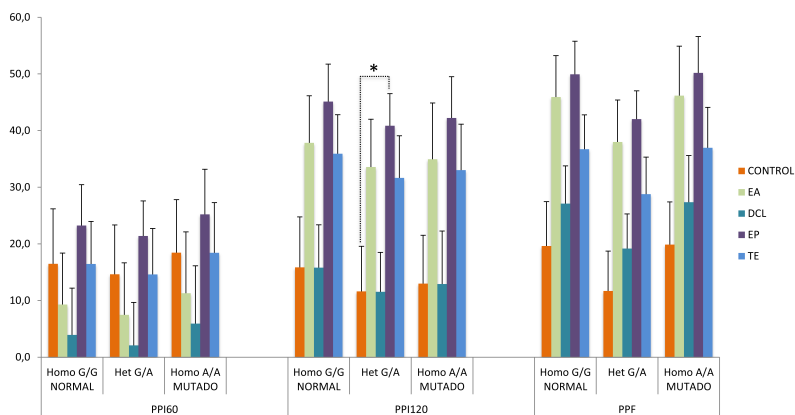


Figura 36. Valores de la PPI y PPF agrupados por genotipo del polimorfismo rs4680 del gen *COMT*. Las Las barras de error presentan valores medios \pm EEM. (*) representa diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

III. Correlaciones entre PPI/PPF SNPs de receptores de dopamina

IIIa. Polimorfismo rs6277 del *Drd2*

Los valores medios de la PPI encontrados en pacientes con diferentes genotipos del polimorfismo *Drd2* rs6277 los vemos en la figura 37.

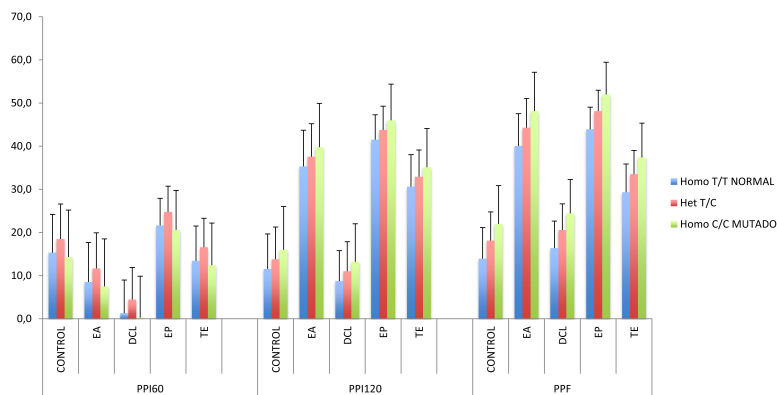


Figura 37. Valores de la PPI en función del genotipo, para el polimorfismo rs6277 del *Drd2*. Las barras de error presentan valores medios \pm EEM.

Al hacer los análisis por pares, encontramos diferencias entre controles y pacientes de EA en los individuos que presentan el genotipo normal TT en la PPF ($p=0,02$) y en los pacientes de EP con respecto a los controles ($p=0,025$).

Se encuentran diferencias entre los pacientes de EP y controles ($p=0,010$) entre los heterocigotos en la PPI₁₂₀ y en la PPF ($p=0,048$).

En los pacientes con genotipo heterocigótico encontramos diferencias significativas entre los EP y los pacientes de DCL en la PPI₁₂₀ ($p=0,041$) y en la PPF ($p=0,010$). Los pacientes con genotipo heterocigoto de EP presentan diferencias significativas ($p=0,032$) con respecto a los pacientes con TE en la PPF.

El genotipo mutado, CC, discrimina a los pacientes de DCL y TE con una diferencia significativa

($p=0,019$) en la PPI₁₂₀.

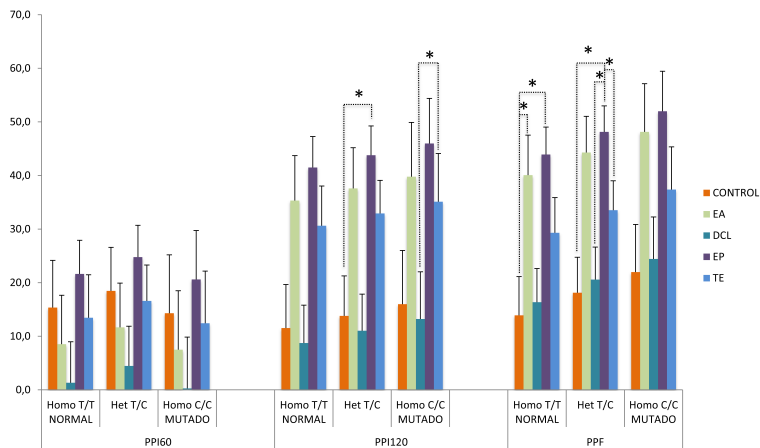


Figura 38. Valores de la PPI y PPF agrupados por genotipos del polimorfismo rs6277 del fen *Drd2*. Las barras de error presentan valores medios \pm EEM. (*) representa diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

IIIb. Polimorfismo rs1800497 del *Drd2*

En el análisis del genotipo del polimorfismo rs1800497 del *Drd2* y la distribución por valores medios de la PPI se observa en la figura 39.

Los análisis de comparación de los valores medios de la PPI encontrados en pacientes con diferentes genotipos del polimorfismo rs1800497 del *Drd2* (figura 40), en los individuos que presentan el genotipo normal CC en la PPI₁₂₀ muestran diferencias entre controles y pacientes de EP ($p=0,021$) y pacientes con EP y DCL ($p=0,018$). En la PPF, los individuos con genotipo normal para este polimorfismo muestran diferencias entre controles y pacientes de EP ($p=0,001$), entre controles y pacientes EA ($p=0,01$) y entre los pacientes EP y DCL ($p=0,01$).

Los EP con genotipo heterocigoto para este polimorfismo, presentan diferencias significativas ($p=0,032$) con los pacientes DCL en la PPI₁₂₀.

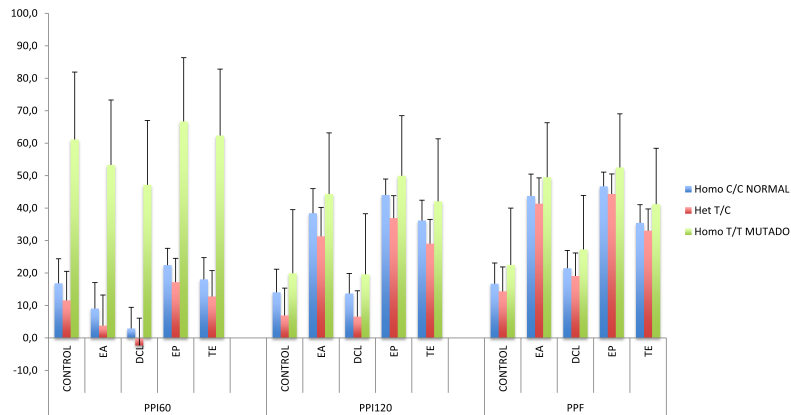


Figura 39. Valores de la PPI en función del genotipo, para el polimorfismo Drd2 rs1800497. Las barras de error presentan \pm EEM.

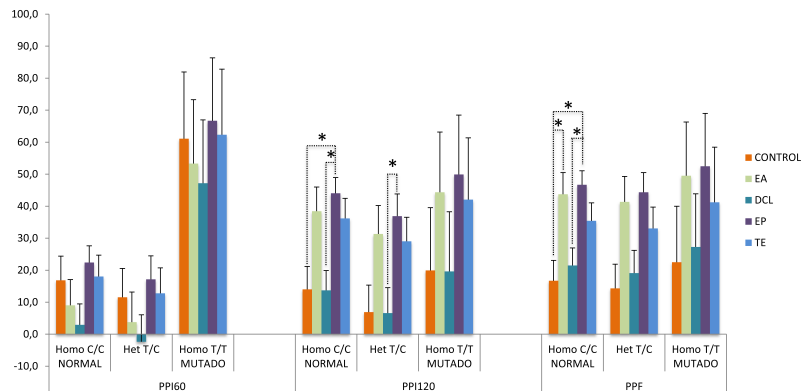


Figura 40. Valores de la PPI y PPF agrupados por genotipos del polimorfismo Drd2 rs1800497. Las barras de error presentan \pm EEM. *Se encuentran diferencias significativas $p < 0,05$.

IIIc. Polimorfismo Drd3 rs6280

El análisis de la distribución de los valores medio de la PPI por genotipos lo encontramos en la Figura 34.

En los análisis de los valores medios de la PPI encontrados en pacientes con diferentes genotipos del

polimorfismo *Drd3* rs6280 (Figura 41), encontramos que hay diferencias entre controles y pacientes de DCL en los individuos que presentan el genotipo normal CC en la PPI₆₀ ($p=0,001$). En los análisis entre grupos encontramos diferencias significativas entre los pacientes con DCL y los pacientes con EA ($p=0,024$), y los pacientes con EP ($p=0,036$) cuando el genotipo es CC y la PPI₆₀.

El genotipo CC presentan diferencias significativas entre los controles y pacientes con DCL ($p=0,010$) en la PPI₁₂₀. En el análisis entre grupos en la PPI₁₂₀ encontramos diferencias entre los pacientes de DCL y el resto de grupos de pacientes EA ($p=0,008$), EP ($p=0,013$) y los pacientes TE ($p=0,001$) cuando el genotipo es CC.

Para el genotipo mutado TT se encuentran diferencias entre los pacientes de EP y controles entre los individuos en la PPI₁₂₀ ($p=0,011$) y en la PPF ($p=0,006$).

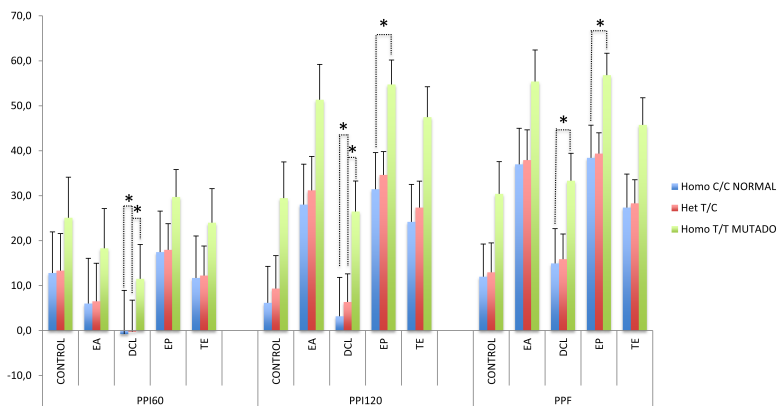


Figura 41. Valores de la PPI en función del genotipo, para el polimorfismo *Drd3* rs6380. Las barras de error presentan \pm EEM. *Se encuentran diferencias significativas $p < 0,05$.

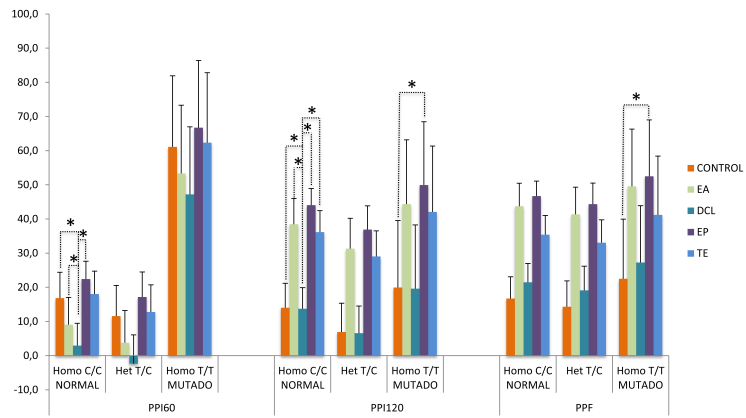
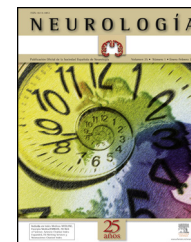


Figura 42. Valores de la PPI y PPF agrupados por genotipos del polimorfismo Drd2 rs1800497. Las barras de error presentan \pm EEM. *Se encuentran diferencias significativas $p < 0,05$.



NEUROLOGÍA

www.elsevier.es/neurologia



ORIGINAL

Estudio controlado del ritmo del habla en la enfermedad de Parkinson

F. Martínez-Sánchez^{a,*}, J.J.G. Meilán^{b,c}, J. Carro^{b,c}, C. Gómez Íñiguez^d,
L. Millian-Morell^c, I.M. Pujante Valverde^a, T. López-Alburquerque^c y D.E. López^c

^a Facultad de Psicología, Universidad de Murcia, Murcia, España

^b Facultad de Psicología, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

^c Instituto de Neurociencias de Castilla y León, INCYL, España

^d Facultad de Psicología, Universidad Jaume I de Castellón, Castellón, España

Recibido el 10 de junio de 2014; aceptado el 2 de diciembre de 2014

PALABRAS CLAVE

Enfermedad de Parkinson;
Habla;
Voz;
Velocidad de elocución;
Velocidad articularia;
L-dopa

Resumen

Introducción: Las alteraciones en el habla aparecen en la mayoría de los pacientes con la enfermedad de Parkinson (EP) en el curso del trastorno. Su origen y gravedad son de interés clínico y diagnóstico.

Objetivo: Evaluar los patrones de deterioro en el habla en pacientes con la EP, e identificar diferencias en la velocidad de elocución y articulación en comparación con sujetos de control, empleando un método de análisis automático en una tarea de lectura.

Pacientes: Participaron 39 pacientes con la EP y 45 controles asintomáticos igualados en sexo y edad. Los pacientes con la EP, en estado *on*, no presentaban fluctuaciones motoras ni discinesias durante la evaluación del habla.

Resultados: El grupo de pacientes con la EP muestran una significativa reducción de la velocidad de elocución y articulación. No se encontraron correlaciones significativas entre los parámetros del habla estudiados y las características de los pacientes, tales como la dosis de L-dopa, duración del trastorno, edad, ni en las puntuaciones en las escalas UPDRS III o Hoehn y Yahr.

Conclusiones: Los pacientes con la EP muestran un patrón característico de deterioro del ritmo del habla. Estos resultados indican que las disfluencias en la EP son el resultado de la alteración del movimiento que afecta a la fisiología de los sistemas de producción del habla.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: franms@um.es (F. Martínez-Sánchez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2014.12.002>

0213-4853/© 2014 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Parkinson's disease;
Speech;
Voice;
Speech rate;
Articulation rate;
L-dopa

Speech rate in Parkinson's disease: A controlled study

Abstract

Introduction: Speech disturbances will affect most patients with Parkinson's disease (PD) over the course of the disease. The origin and severity of these symptoms are of clinical and diagnostic interest.

Purpose: To evaluate the clinical pattern of speech impairment in PD patients and identify significant differences in speech rate and articulation compared to control subjects. Speech rate and articulation in a reading task were measured using an automatic analytical method.

Patients: A total of 39 PD patients in the 'on' state and 45 age- and sex-matched asymptomatic controls participated in the study. None of the patients experienced dyskinesias or motor fluctuations during the test.

Results: The patients with PD displayed a significant reduction in speech and articulation rates; there were no significant correlations between the studied speech parameters and patient characteristics such as L-dopa dose, duration of the disorder, age, and UPDRS III scores and Hoehn & Yahr scales.

Conclusion: Patients with PD show a characteristic pattern of declining speech rate. These results suggest that in PD, disfluencies are the result of the movement disorder affecting the physiology of speech production systems.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

La disartria hipocinética es una complicación frecuente en la enfermedad de Parkinson (EP) que afecta a un alto porcentaje de pacientes¹, incrementándose su prevalencia conforme avanza la enfermedad.

El habla del parkinsoniano se caracteriza por tener una sonoridad e intensidad monótonas y pobremente prosódicas, que tienden a desvanecerse al final de la fonación. El habla se produce habitualmente en lentos ataques y pausas prolongadas para respirar entre palabras y sílabas, reduciéndose la fluidez y el ritmo. La articulación está empobrecida², lo que afecta significativamente a su inteligibilidad y dificulta la identificación de su estado emocional y motivacional³.

Aparecen además otras alteraciones en el habla y la voz en la EP, como son el deterioro en la capacidad para iniciar el habla, seguido de una rápida aceleración (taquifemia) en forma espasmódica, así como de rápidas repeticiones de palabras (palilalia) y, en ocasiones, del fenómeno de la punta de la lengua; además, el tono de voz se hace progresivamente más débil (hipofonía)¹. Muchas de estas alteraciones están asociadas a estados hiperdopaminérgicos^{4,5}.

Las características acústicas del habla disártrica del paciente con EP reflejan los cambios fisiológicos y anatómicos causados por el déficit dopaminérgico tales como el temblor, bradicinesia, rigidez muscular e inestabilidad postural. Estos cambios afectan adversamente a los 3 subsistemas relacionados con el control motor del habla: respiratorio, fonatorio y articulatorio. La rigidez asociada a la EP afecta al sistema respiratorio, encargado de facilitar el flujo y presión del aire precisos para generar la voz, alterando la habilidad y el rango para modular su intensidad. La alteración del sistema fonatorio afecta principalmente al ritmo vibratorio de las cuerdas vocales, lo que se traduce en el incremento de la frecuencia fundamental (F0)

y la reducción de su variabilidad, la entonación y la curva melódica del habla. Finalmente, el sistema articulatorio se ve también alterado paralelamente al curso de la enfermedad, produciendo imprecisiones articulatorias e incremento en las pausas, causadas por la reducida amplitud de los movimientos articulatorios⁶.

Tanto la velocidad de elocución (número de sonidos que un hablante puede emitir en una unidad de tiempo, incluyendo las pausas), como la velocidad de articulación (número de sonidos emitidos, excluyendo las pausas) son temas recurrentemente investigados en la EP. Los resultados de numerosas investigaciones son inconsistentes ya que, mientras que algunos autores⁷⁻⁹ informan de una significativa reducción en la velocidad de elocución cuando se solicita a los pacientes que repitan con rapidez una sucesión de sílabas (/pa/, /ta/, /ka/) otros, por el contrario, informan del efecto opuesto^{10,11}.

Cuando se han empleado tareas para evaluar el habla continua (habitualmente lecturas de textos de corta duración), se ha observado también un incremento en la velocidad de elocución^{12,13}. Otros estudios, por el contrario, no observan diferencias entre grupos¹⁴ o bien informan de una reducción en la velocidad de locución. Dos estudios longitudinales ponen de manifiesto el deterioro progresivo de la velocidad de elocución al comparar esta en periodos que van desde los 32 a los 25 meses^{15,16}.

La velocidad de elocución está fuertemente determinada por el número y duración de las pausas; también existen resultados contradictorios con relación a estas pues, mientras que varios trabajos^{17,18} no encuentran diferencias en el número de pausas o su duración en una tarea de lectura otros, por el contrario, describen un incremento significativo^{12,13} o incluso se describe la reducción del número de pausas, pero de mayor duración¹⁹.

Cabría esperar que la administración de L-dopa, a la vez que reduce la hipocinesia y la rigidez de los sistemas relacionados con la producción del habla, influyera positivamente en el aumento de la velocidad de elocución. Sin embargo los resultados no parecen confirmarlo ya que mientras algunos autores^{12,20,21} no aprecian diferencias en la velocidad de elocución entre estados *on* y *off*, otros²² observan la existencia de una significativa mejoría en estado *on*. Por último, el tratamiento con estimulación cerebral profunda del núcleo subtalámico tampoco parece producir efectos significativos en la velocidad de elocución^{22,23} aunque puede mejorar el habla de contados pacientes²⁴, generalmente sin mejoría de su inteligibilidad²⁵. Muchas de estas inconsistencias pueden atribuirse a la selección de grupos relativamente pequeños de participantes (de entre 2 y 30), a la ausencia de control sobre las funciones cognitivas de estos, así como a aspectos relacionados con la metodología empleada en los análisis de la elocución²⁶.

En este trabajo se analiza la velocidad de elocución y articulación en una tarea de lectura en una muestra representativa de pacientes con la EP sin fluctuaciones motoras ni discinesias durante la prueba, con el objetivo de valorar la hipótesis que defiende el efecto de la reducción en la velocidad de elocución y articulación, así como su relación con la duración y gravedad del trastorno.

Método

Diseño estadístico

Se empleó un diseño transversal, analítico, observacional y retrospectivo.

Pacientes

Entre 2011 y 2012 se reclutó una muestra compuesta por 84 participantes sin historial anterior de consumo de fármacos o abuso de alcohol, ni síntomas de depresión (Escala de Depresión Geriátrica < 10), divididos en 2 grupos, formados por personas mayores de 60 años sin enfermedad neurológica conocida (n=45) y pacientes con EP (n=39).

El grupo control (edad media = 71,95 años; DE = 10,22 años) estaba formado por sujetos diestros y cuyo idioma nativo era el castellano, sin historia anterior de daño cerebral, trastorno neurológico, psicótico ni demencia (MMSE > 25). Todos ellos eran asistentes a los cursos que imparte la Universidad de Salamanca, dentro del programa interuniversitario para mayores de 55 años. Ninguno de ellos estaba en tratamiento farmacológico con anticolinérgicos, inhibidores de la colinesterasa o neurolepticos, criterios que fueron motivos de exclusión.

Por otra parte, el grupo con EP (edad media = 69,56 años; DE = 9,01 años), estaba formado por pacientes del Servicio de Neurología del Hospital Clínico de Salamanca, todos ellos diagnosticados y en tratamiento por EP idiopática, de acuerdo a los criterios del United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank (UKPDSBB)²⁷. Las características de ambos grupos se recogen en la [tabla 1](#).

Tabla 1 Descripción de los grupos de control y EP

	Grupo	
	Control	Parkinson
<i>N</i> (% hombres-mujeres)	45 (60,0-40,0)	39 (55,3-44,7)
Edad media (DE)	71,95 (10,22)	69,56 (9,01)
MMSE (DE)	27,12 (3,38)	26,33 (2,26)
Duración EP (años) (DE)		5,30 (4,33)
Escala de Hoehn y Yahr		2,08 (0,51)
Dosis equivalente L-dopa (mg)		298,33 (187,67)
UPDRS total (DE)		47,57 (16,61)
Escala I		4,00 (2,31)
Escala II		14,56 (7,05)
Escala III		24,92 (9,42)
Escala IV		2,24 (2,89)

DE: desviación estándar; EP: enfermedad de Parkinson; MMSE: Mini-Mental State Examination; UPDRS: Unified Parkinson's Disease Rating Scale.

Materiales

Mini-Mental State Examination (MMSE)²⁸. El MMSE es el instrumento más frecuentemente utilizado para el *screening* del estado mental, ofreciendo el índice de gravedad de demencia más frecuentemente empleado. Su puntuación total máxima es de 30 puntos.

Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS)²⁹. El UPDRS es un sistema de clasificación para seguir el curso longitudinal de la EP, su puntuación máxima es de 159 puntos.

Escala de evaluación de Hoehn y Yahr (H&Y)³⁰. La H&Y es una escala de estadificación de la EP descriptiva simple que recoge de forma combinada la discapacidad y los signos de deterioro.

Para el registro del habla se utilizó un grabador profesional Fostex FR-2LE, con una resolución de 24 bites y 48 kHz de tasa de muestreo, con un micrófono cardioide AKG D3700S. Todas las muestras fueron editadas usando el programa de análisis de voz Praat 5.1.42³¹, que permite realizar análisis acústicos, síntesis articulatoria, edición y manipulación de señales de audio. En el [Anexo I](#) se recoge la definición de los distintos parámetros de fluencia analizados en este estudio.

Procedimiento

Se informó a los pacientes para obtener su consentimiento siguiendo los protocolos aprobados por los Comités de Bioética de las instituciones participantes. El procedimiento se realizó en 2 sesiones, en la primera se recabó la información biográfica y clínica y se administraron el MMSE, H&Y y la UPDRS, y en la segunda sesión, realizada entre 3 y 5 días después, se obtuvieron las grabaciones. Durante la

Tabla 2 Estadística descriptiva y comparación de medias de las variables estudiadas en ambos grupos

VV. DD.	Grupo		t	p
	Control (DE)	EP (DE)		
Duración de la tarea	46,05 (22,94)	43,77 (15,96)	0,52	0,604
Número de pausas \geq 300 ms	16,91 (13,42)	17,13 (13,93)	-0,08	0,936
Duración media de la pausa (\geq 300 ms)	0,61 (,18)	0,66 (0,16)	-1,28	0,201
Número de micropausas \geq 10 ms	26,87 (17,90)	23,82 (13,36)	0,87	0,386
Duración media de la micropausa (\geq 10 ms)	0,46 (0,16)	0,53 (0,15)	-2,15	0,033
Tiempo de fonación	34,02 (12,40)	31,38 (7,29)	1,19	0,237
Proporción de fonación	78,70 (12,63)	75,22 (10,81)	1,34	0,181
Velocidad de elocución	3,49 (0,80)	3,10 (0,68)	2,41	0,017
Velocidad de articulación	4,40 (0,47)	4,09 (0,53)	2,80	0,009
Duración media de la sílaba	0,22 (0,02)	0,24 (0,03)	-2,91	0,005

DE: desviación estándar.

grabación del habla, todos los sujetos del grupo de EP estaban en estado *on*, sin fluctuaciones motoras ni discinesias evidentes.

La tarea de lectura, realizada bajo condiciones controladas, consistía en leer en un monitor con un tamaño de letra de 48 puntos para facilitar su lectura, la primera frase del libro «El Quijote» de Miguel de Cervantes. El párrafo está compuesto por 126 sílabas. Si bien no está equilibrado fonéticamente, se seleccionó por su familiaridad para todos los participantes.

Las grabaciones las realizó el mismo examinador en una sala aislada del ruido, pero no aislada acústicamente, ubicando el micrófono a 8 cm y en un ángulo aproximado de 45° de la boca para evitar el ruido aerodinámico.

La valoración de la velocidad de elocución implica la detección del núcleo silábico. La identificación de las sílabas y pausas se realizó automáticamente mediante el empleo del algoritmo desarrollado por de Jong y Wempe³² que analiza los picos de intensidad precedidos y seguidos por caídas de intensidad de al menos 2 dB; este procedimiento se ha mostrado válido y fiable en estudios de fluencia³³.

Tras la identificación automática del núcleo silábico, se verificó cada uno de ellos empleando el sonograma y espectrograma de banda ancha y, en su caso, se procedió a su corrección. La identificación de pausas se realizó también de forma automática, estableciendo como criterio de pausa los segmentos sin sonido \geq 300 ms, así como también los segmentos \geq 10 ms para identificar las micropausas, por ser este un criterio frecuentemente utilizado en estudios de fluencia en la EP¹⁶.

Análisis de datos

Fueron realizados con el paquete estadístico IBM SPSS para Apple (versión 21). Inicialmente se valoró el cumplimiento del supuesto de normalidad de la distribución de puntuaciones en la variable velocidad de elocución y articulación. Los resultados mostraron que esta variable se distribuye normalmente mediante la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov ($z = 0,046$; $p = 0,20$). Se empleó la prueba de comparación de medias de Student de muestras independientes para comparar ambos grupos y definir de esta manera el perfil diferencial de fluencia, así como

correlaciones de Pearson para valorar la relación entre las distintas variables.

Resultados

Se realizaron diferentes contrastes estadísticos para valorar la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las variables clínicas y sociodemográficas. No se apreciaron diferencias entre los 2 grupos en la variable «edad» ($t_{82} = 1,07$; $p = 0,265$), ni en la distribución del sexo por grupo ($\chi^2 = 3,11$; $p = 0,078$). Tampoco encontramos diferencias en las capacidades cognitivas medidas por el MMSE ($t_{82} = 1,33$; $p = 0,227$). Por último, comprobamos que había ausencia de diferencias en cuanto a la fluidez verbal de ambos grupos, medida tanto por una tarea de fluidez verbal semántica ($t_{82} = 0,41$; $p = 0,639$) como fonológica ($t_{82} = 0,47$; $p = 0,655$).

Posteriormente se comprobó la posible existencia de diferencias entre ambos grupos en las variables estudiadas. Los resultados (véase la [tabla 2](#)) ponen de manifiesto que el grupo con EP muestra una menor velocidad de elocución ($t_{82} = 2,41$; $p < 0,05$) y articulación ($t_{82} = 2,80$; $p < 0,01$) que el grupo de control ([fig. 1](#)); del mismo modo, la duración media de la sílaba es mayor en el grupo con EP ($t_{82} = -2,81$; $p < 0,01$). Con relación al número de pausas, si bien el número de pausas (\geq 300 ms) y micropausas (\geq 10 ms) no difiere entre grupos, la duración media de las micropausas es mayor en el grupo con EP ($t_{82} = -2,15$; $p < 0,05$) que en el de control.

Finalmente se analizó la relación entre las variables relacionadas con el habla y la edad, la evolución de la EP y la dosis de L-dopa, así como de los cuestionarios administrados (MMSE, H&Y y UPDRS). Los resultados muestran, como cabría esperar, una relación positiva entre la dosis de L-dopa y los años de evolución de la enfermedad (años transcurridos desde el diagnóstico) ($r = 0,405$; $p < 0,05$), pero escasas correlaciones entre su evolución y las variables de fluencia, así como entre estas y la dosis de L-dopa, excepto en el caso de la velocidad de articulación ($r = -0,432$; $p < 0,05$), poniendo de manifiesto que la velocidad de articulación es tanto menor cuanto más alta es la dosis de L-dopa. Por su parte, la H&Y mostró escasa relación con las variables de

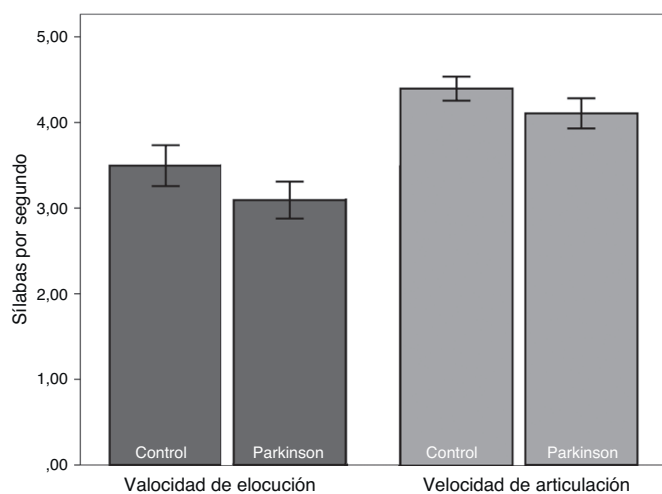


Figura 1 Velocidad de elocución y articulación en ambos grupos (sílabas por segundo).

fluencia, excepto en el porcentaje de fonación ($r = -0,398$; $p < 0,05$). Por último, la puntuación global de la UPDRS tampoco correlacionó significativamente con la velocidad de elocución ($r = -0,090$; $p > 0,05$) ni de articulación ($r = 0,030$; $p > 0,05$).

Discusión

El objetivo principal de este trabajo fue analizar la velocidad de fluencia y articulación en un grupo de pacientes con la EP. Los resultados ponen de manifiesto que la EP se asocia a un decremento en la velocidad de elocución y articulación; resultados que son coincidentes con los reportados en algunas investigaciones^{15,16,19}.

El habla es fruto de acciones coordinadas complejas que requieren de la participación de mayor número de fibras musculares que cualquier otro sistema motor humano; por su parte, el ritmo es el resultado de los constantes ajustes temporales de la regulación de los movimientos motores del habla para producir segmentos de sonido a muy alta velocidad. Es de esperar que el trastorno motor propio de la EP y su repercusión sobre los sistemas respiratorio, fonatorio y articulatorio afecten al ritmo del paciente con la EP⁸, como resultado de la alteración de los circuitos de control motor de los ganglios basales³⁴.

Nuestros resultados apoyan la existencia de una reducción en la velocidad de elocución y articulación, y contrastan con aquellos que informan del efecto opuesto^{12,13}. El incremento en la velocidad de fluencia puede atribuirse a un mecanismo compensatorio por el cual el paciente con la EP mostraría involuntariamente una velocidad de elocución mayor bajo ciertas circunstancias. Diversos estudios en los que se han analizado los movimientos de labios y mandíbula durante el habla en la EP podrían explicar este fenómeno. Así, Caligiuri³⁵ señala que los movimientos de los labios son normales a tasas normales de elocución (entre 3 y 5 sílabas por segundo), pero estos se reducen a tasas mayores (entre 5 y 7 sílabas por segundo) cuando se les pide a los pacientes que hablen más rápido. Este hecho podría explicar que los pacientes intenten hablar más lentamente para

controlar su tendencia a realizar articulaciones más imprecisas y evitar el deterioro de la velocidad de elocución al hablar a velocidades más altas. Del mismo modo, Ackermann et al.³⁶ demuestran que cuando se pide a los sujetos que sincronicen a una frecuencia de entre 2,5 y 6 Hz su habla, mientras repiten una sucesión rápida de sílabas, la velocidad de articulación es superior a cuando se les pide que la sincronicen a una frecuencia de entre 8 y 9 Hz. La demanda de la tarea en los estudios sobre fluencia³⁷ (o ante demandas situacionales en las que el sujeto ha de hablar cotidianamente) podría explicar que en ocasiones su velocidad de elocución sea mayor y, en otras, menor de lo normal. Así, durante el habla espontánea la fluencia se incrementaría y paralelamente se reduciría su inteligibilidad, ya que en ausencia de un modelo temporal al que sincronizar su programa motor vocal (como en el caso de la repetición de sílabas o la lectura de un texto), la alteración del control motor sería más evidente y tanto más disfluyente.

Por otra parte, la reducción en la velocidad de articulación está justificada por el alto número de estos pacientes que padecen problemas articulatorios; así Logemann et al.³⁸ informan que el 45% de 200 pacientes con EP presenta estas alteraciones, y las atribuyen al cierre inadecuado del tracto vocal causado por la hipocinesia provocada por la enfermedad. Del mismo modo, Sapir et al.³⁹ informan de anomalías articulatorias en el 50% de 42 pacientes con la EP en tratamiento farmacológico; asimismo Kleinow et al.⁴⁰ encontraron niveles normales en los movimientos del labio inferior y la mandíbula durante la producción de una frase sintácticamente simple, usando medidas espaciales y temporales. Sin embargo, cuando se pedía que cambiaran la velocidad y el volumen, los resultados variaban significativamente.

El decremento en la velocidad de articulación observada en este estudio puede atribuirse básicamente a la alteración fisiológica, resultado de la alteración del control motor del habla de la enfermedad. Se sabe que los pares de músculos antagonistas, normalmente inervados para mantener el tono muscular necesario para la producción del habla, aparecen contraídos simultáneamente en los pacientes con EP (debido a la disfunción en los ganglios basales). Este fenómeno provoca un pobre control sobre la contracción muscular que incapacita para la normal articulación en el lenguaje⁴¹; del mismo modo, la reducción en los movimientos de los labios y mandíbula⁴² tiene su traslación perceptiva en una imprecisa articulación y, por tanto, en una reducción de la velocidad de elocución y articulación¹⁵.

En nuestros resultados, el número de micropausas de duración mayor de 10 ms es inferior en el grupo con la EP, si bien la diferencia no es estadísticamente significativa en comparación con el grupo de control; este resultado es coincidente con los reportados por Skodda et al.¹⁹. El incremento en el número de pausas es un fenómeno reiteradamente informado por diversos investigadores. Así, por ejemplo, Logeman et al.⁸ describen que el 89% de 200 pacientes con la EP realizan excesivas pausas en el habla; esta observación indica la existencia de alteraciones en la inervación de los músculos laringeos, fruto de la dificultad para iniciar la fonación o el ritmo fonatorio con movimientos articulatorios. Fräile y Cohen⁴³ informan de una significativa reducción en los periodos sin voz en el habla de los pacientes con

EP, causada, posiblemente, por la dificultad para inhibir la actividad laríngea. Es la alteración de la capacidad de inhibición de movimientos motores la que justifica tanto el enlentecimiento en el inicio de las respuestas motoras como en la interrupción de los movimientos una vez han sido iniciados⁴⁴. Este hecho puede servir como estrategia compensatoria para mantener una velocidad de elocución «normal» mediante la reducción de la duración y el número de pausas⁴³. Resultados similares observaron Kegl, Cohen y Poizner⁴⁵ en una tarea de repetición de sílabas, quienes concluyen que el cierre incompleto del tracto vocal puede usarse para evitar o minimizar las dificultades para iniciar la fonación, manteniendo un nivel de activación continuo de las cuerdas vocales.

Por otra parte, la ausencia de relaciones significativas entre los parámetros de fluencia evaluados y las puntuaciones de las escalas UPDRS y H&Y ha sido observada con anterioridad en otras investigaciones^{16,19}. Son conocidos los problemas de fiabilidad de la escala⁴⁶, así como la escasa atención en la evaluación de los componentes del habla, que están representados exclusivamente por 2 ítems (5 y 18) que poseen reducidos índices kappa (0,660 y 0,602 respectivamente)⁴⁶.

Nuestros resultados confirman también la ausencia de relación entre la dosis de L-dopa y los parámetros de fluencia observada en diversos estudios^{12,20,21}. Ciertamente, en este estudio se observa que la velocidad de articulación es tanto menor cuanto más alta es la dosis de L-dopa, sin embargo este efecto puede atribuirse a un deterioro fruto de la evolución de la enfermedad, ya que la dosis de L-dopa se incrementa paulatinamente con los años transcurridos desde el diagnóstico de la EP.

En su conjunto, estos resultados muestran la existencia de marcadas alteraciones de la fluidez verbal en los pacientes con la EP que, junto a las anomalías en la voz ya señaladas^{15,47}, producen una afectación significativa en la capacidad comunicativa y la calidad de vida del paciente. Además, estas alteraciones mejoran pobremente con los tratamientos farmacológicos^{20,21,48}, y de estimulación cerebral profunda^{23,25,49}.

Este estudio presenta diversas limitaciones que han de tenerse en cuenta. La primera de ellas se deriva de la tarea empleada para evaluar el habla, puesto que la familiaridad con la lectura es un determinante de los análisis de fluencia, aunque la relativamente amplia muestra empleada minimiza los efectos indeseados atribuibles a este factor; el uso de procedimientos de análisis de habla espontánea es una alternativa plausible. Por otra parte, la evaluación del habla se ha realizado en sujetos sin fluctuaciones motoras ni discinesias. Sería deseable realizar estudios que evaluaran el efecto diferencial de los estados *on* y *off*, así como también en los que se incrementara el número de pacientes y se valorara longitudinalmente la relación entre los distintos parámetros que afectan el habla.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

El presente trabajo está realizado gracias al apoyo financiero de MICINN (BFU2010-17754) para D.E.L. JCyL, de #GRS 857/A/ para T.L-A. y de JCyL (BIO/SA84/) para J.J.G.M.

Anexo I. Definición de parámetros utilizados

Medida	Descripción
Duración	Duración total de la tarea de lectura (s) (con pausas)
Número de pausas ≥ 300 ms	N.º de pausas intersilábicas de duración ≥ 300 ms (n)
Duración media de la pausa (≥ 300 ms)	Duración media de la pausa (≥ 300 ms)
Número de micropausas (≥ 10 ms)	N.º de pausas intersilábicas de duración ≥ 10 ms (n)
Duración media de la micropausa (≥ 10 ms)	Duración media de la micropausa (≥ 10 ms)
Tiempo de fonación	Tiempo intra- e internúcleos fonatorios (s) (sin pausas)
Proporción de fonación	Tiempo de fonación respecto al tiempo total de lectura (%)
Velocidad de elocución	N.º de sílabas/tiempo total de lectura (sílabas/s)
Velocidad de articulación	N.º de sílabas/tiempo de fonación sin pausas (sílabas/s)
Duración media de la sílaba	Tiempo de habla/n.º de sílabas (s)

Bibliografía

- Ramig L, Fox C, Sapir S. Speech and voice disorders in Parkinson's disease. En: Olanow CW, Stocchi F, Lang AE, editores. *Parkinson's disease: Non-motor and non-dopaminergic features*. Oxford: Wiley-Blackwell Inc; 2011. p. 346–60.
- Gamboa J, Jiménez-Jiménez FJ, Mate MA, Cobeta I. Alteraciones de la voz causadas por enfermedades neurológicas. *Rev Neurol*. 2001;33:153–68.
- Miller N, Allcock L, Jones D, Noble E, Hildreth AJ, Burn D. Prevalence and pattern of perceived intelligibility changes in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78:1188–90.
- Sakai T, Miyamura M, Kuzuhara S. Palilalia and acquired stuttering in a case of Parkinson's disease. *Rinsho Shinkeigaku*. 1992;32:859–63.
- Ackermann H, Ziegler W, Oertel WH. Palilalia as a symptom of levodopa induced hyperkinesia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1989;52:805–7.
- Martínez-Sánchez F. Trastornos del habla y la voz en la enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol*. 2010;51:542–50.
- Dworkin JP, Aronson AE. Tongue strength and alternate motion rates in normal and dysarthric speakers. *J Commun Disord*. 1986;19:115–32.
- Logemann JA, Fisher HB, Boshes B, Blonsky ER. Frequency and cooccurrence of vocal tract dysfunctions in the speech of a large sample of Parkinsonian patients. *J Speech Hear Dis*. 1978;43:47–57.

9. Ludlow CL, Connor NP, Bassich CJ. Speech timing in Parkinson's and Huntington's disease. *Brain Lang.* 1987;32:195–214.
10. Ackermann H, Hertrich I, Hehr T. Oral diadochokinesis in neurological dysarthrias. *Folia Phoniatr Logop.* 1995;47:15–23.
11. Hirose H, Kiritani S, Sawashima M. Velocity of articulatory movements in normal and dysarthric subjects. *Folia Phoniatr Logop.* 1982;34:210–5.
12. De Letter M, Santens P, de Bodt M, Boon P, van Borsel J. Levodopa-induced alterations in speech rate in advanced Parkinson's disease. *Acta Neurol Belgica.* 2006;106:19–22.
13. Hammen V, Yorkston K. Speech and pause characteristics following speech rate reduction in hypokinetic dysarthria. *J Commun Disord.* 1996;29:429–45.
14. Duez D. Syllable structure, syllable duration, and final lengthening in Parkinsonian French speech. *J Multiling Commun Disord.* 2006;4:45–57.
15. Skodda S, Grönheit W, Mancinelli N, Schlegel U. Progression of voice and speech impairment in the course of Parkinson's disease: A longitudinal study. *Parkinsons Dis.* 2013. Artículo ID 389195, 8 págs. [consultado 25 Abr 2014]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/389195>.
16. Skodda S, Rinsche H, Schlegel U. Progression of dysprosody in Parkinson's disease over time - A longitudinal study. *Mov Disord.* 2009;24:716–22.
17. Canter GJ. Speech characteristics of patients with Parkinson's disease I: Intensity, pitch, and duration. *J Speech Hear Dis.* 1963;28:221–9.
18. Volkmann J, Hefter H, Lange HW, Freund HJ. Impairment of temporal organisation of speech in basal ganglia diseases. *Brain Lang.* 1992;43:386–99.
19. Skodda S, Schlegel U. Speech rate and rhythm in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2008;23:985–92.
20. Skodda S, Flasskamp A, Schlegel U. Instability of syllable repetition in Parkinson's disease — influence of levodopa and deep brain stimulation. *Mov Disord.* 2010;26:728–30.
21. Skodda S, Grönheit W, Schlegel U. Intonation and speech rate in Parkinson's disease: General and dynamic aspects and responsiveness to levodopa admission. *J Voice.* 2011;25:199–205.
22. Schulz GM, Hosey LA, Bradberry TJ, Stager SW, Lee LC, Pawha R, et al. Selective left, right and bilateral stimulation of subthalamic nuclei in Parkinson's disease: Differential effects on motor, speech and language function. *J Parkinsons Dis.* 2012;2:29–40.
23. Skodda S, Grönheit W, Schlegel U, Südmeyer M, Schnitzler A, Wojtecki L. Effect of subthalamic stimulation on voice and speech in Parkinson's disease: For the better or worse? *Front Neurol.* 2014;4, doi: 10.3389/fneur.2013.00218.
24. Hoffman-Ruddy B, Schulz G, Vitek J, Evatt MA. Preliminary study of the side effects of subthalamic nucleus deep brain stimulation on voice and speech characteristics in Parkinson's disease. *Clin Linguist Phon.* 2001;15:97–101.
25. Skodda S. Effect of deep brain stimulation on speech performance in Parkinson's disease. *Parkinson Dis.* 2012;2012:850596. doi:10.1155/2012/850596.
26. Skodda S. Aspects of speech rate and regularity in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2011;310:231–6.
27. Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1988;51:745–52.
28. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. «Mini-mental state». A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975;12:189–98.
29. Fahn S, Elton RL, UPDRS Development Committee. Unified Parkinson's Disease Rating Scale. En: Fahn S, Marsden CD, Calne DB, Goldstein M, editores. *Recent developments in Parkinson's disease.* Florham Park, NJ: Macmillan; 1987. p. 153–63.
30. Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: Onset, progression and mortality. *Neurology.* 1967;17:427–42.
31. Boersma P, Weenink D. Praat: Doing phonetics by computer (versión 5.1.42). [Programa informático] 2013 [consultado 21 Abr 2013]. Disponible en: <http://www.praat.org/>
32. De Jong NH, Wempe T. Praat script to detect syllable nuclei and measure speech rate automatically. *Behav Res Methods.* 2009;41:385–90.
33. Martínez-Sánchez F, Meilán JJG, García-Sevilla J, Carro J, Arana JM. Análisis de la fluencia lectora en pacientes con la enfermedad de Alzheimer y controles asintomáticos. *Neurología.* 2013;28:325–31.
34. Alm PA. Stuttering and the basal ganglia circuits. *J Commun Disord.* 2004;37:325–69.
35. Caligiuri MP. The influence of speaking rate on articulatory hypokinesia in Parkinsonian dysarthria. *Brain Lang.* 1989;36:493–502.
36. Ackermann H, Konczak J, Hertrich I. The temporal control of repetitive articulatory movements in Parkinson's disease. *Brain Lang.* 1997;57:312–9.
37. Sidtis D, Cameron K, Bonura L, Sidtis JJ. Speech intelligibility by listening in Parkinson speech with and without deep brain stimulation: Task effects. *J Neurolinguistics.* 2012;25:121–32.
38. Logemann JA, Fisher HB, Boshes B, Blonsky ER. Frequency and cooccurrence of vocal tract dysfunctions in the speech of a large sample of Parkinson patients. *J Speech Hear Disord.* 1978;43:47–57.
39. Sapir S, Ramig L, Hoyt P, O'Brien C, Hoehn M. Phonatory-respiratory effort (LSVT) vs. respiratory effort treatment for hypokinetic dysarthria: Comparing speech loudness and quality before and 12 months after treatment. *Folia Phoniatr.* 2002;54:296–303.
40. Kleinow J, Smith A, Ramig LO. Speech motor stability in IPD: Effects of rate and loudness manipulations. *J Speech Hear Disord.* 2001;44:1041–51.
41. Hirose H, Kiritani S, Ushijima T, Yoshioka H, Sawshima M. Patterns of dysarthric movements in patients with parkinsonism. *Folia Phoniatr.* 1981;33:204–15.
42. Walsh B, Smith A. Basic parameters of articulatory movements and acoustics in individuals with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2012;27:843–50.
43. Fraile V, Cohen H. Temporal control of voicing in Parkinson's disease and tardive dyskinesia speech. *Brain Cogn.* 1999;40:118–22.
44. Obeso I, Wilkinson L, Casabona E, Bringas ML, Alvarez M, Alvarez L, et al. Deficits in inhibitory control and conflict resolution on cognitive and motor tasks in Parkinson's disease. *Exp Brain Res.* 2011;212:371–84.
45. Kegl J, Cohen H, Poizner H. Articulatory consequences of Parkinson's disease: Perspectives from two modalities. *Brain Cogn.* 1999;40:355–86.
46. Siderowf A, McDermott M, Kiebertz K, Blindauer K, Plumb S, Shoulton I, et al. Test-retest reliability of the unified parkinson's disease rating scale in patients with early parkinson's disease: Results from a multicenter clinical trial. *Mov Disord.* 2002;17:758–63.
47. Jiménez-Jiménez F, Gamboa J, Nieto A, Guerrero J, Orti-Pareja M, Molina J, et al. Acoustic voice analysis in untreated patients with Parkinson's disease. *Park Related Dis.* 1997;3:111–6.
48. Gamboa J, Jimenez-Jimenez FJ, Nieto A, Montojo J, Orti-Pareja M, Molina JA, et al. Acoustic voice analysis in patients with Parkinson's disease treated with dopaminergic drugs. *J Voice.* 1997;11:314–20.
49. Mate MA, Cobeta I, Jiménez-Jiménez F, Figuerias R. Digital voice analysis in patients with advanced Parkinson's disease undergoing deep brain stimulation therapy. *J Voice.* 2012;26:496–501.



Origin and function of short-latency inputs to the neural substrates underlying the acoustic startle reflex

Ricardo Gómez-Nieto^{1,2,3}, José de Anchieta C. Horta-Júnior^{1,4}, Orlando Castellano^{1,2,3},
Lymarie Millian-Morell^{1,3}, Maria E. Rubio⁵ and Dolores E. López^{1,2,3*}

¹ Neuroscience Institute of Castilla y León, University of Salamanca, Salamanca, Spain

² Department of Cell Biology and Pathology, University of Salamanca, Salamanca, Spain

³ Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, Salamanca, Spain

⁴ Department of Anatomy, Biosciences Institute, São Paulo State University Botucatu, São Paulo, Brazil

⁵ Department of Otolaryngology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

Edited by:

Monica Muñoz-Lopez, University of Castilla-La Mancha, Spain

Reviewed by:

Alicia Mohedano-Moriano,
University of Castilla-La Mancha,
Spain

Antonio Viñuela, SECUGEN SL,
Spain

*Correspondence:

Dolores E. López, Neuroscience
Institute of Castilla y León,
University of Salamanca, C/Pintor
Fernando Gallego, 1, 37007
Salamanca, Spain
e-mail: lopezde@usal.es

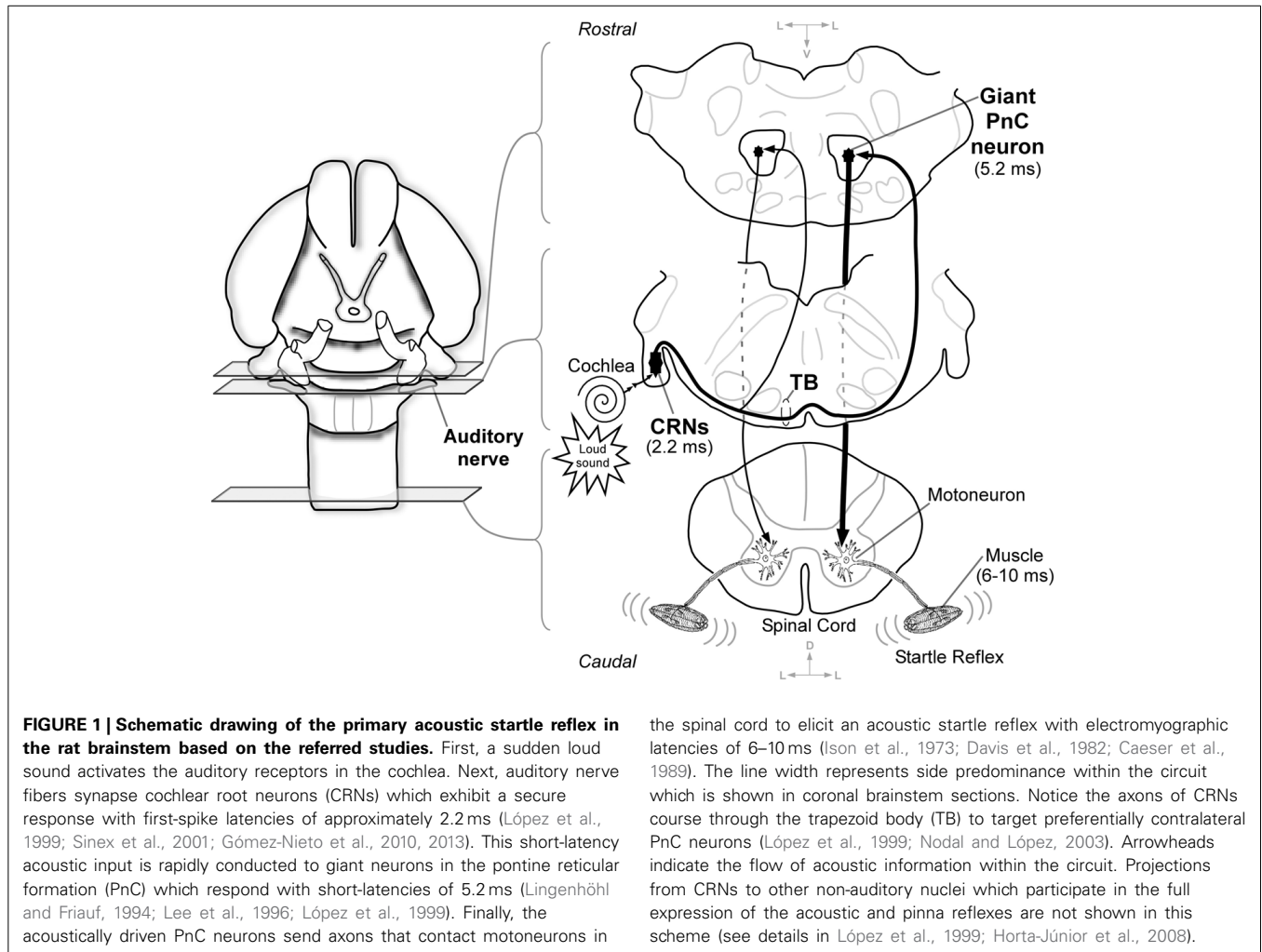
The acoustic startle reflex (ASR) is a survival mechanism of alarm, which rapidly alerts the organism to a sudden loud auditory stimulus. In rats, the primary ASR circuit encompasses three serially connected structures: cochlear root neurons (CRNs), neurons in the caudal pontine reticular nucleus (PnC), and motoneurons in the medulla and spinal cord. It is well-established that both CRNs and PnC neurons receive short-latency auditory inputs to mediate the ASR. Here, we investigated the anatomical origin and functional role of these inputs using a multidisciplinary approach that combines morphological, electrophysiological and behavioral techniques. Anterograde tracer injections into the cochlea suggest that CRNs somata and dendrites receive inputs depending, respectively, on their basal or apical cochlear origin. Confocal colocalization experiments demonstrated that these cochlear inputs are immunopositive for the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1). Using extracellular recordings *in vivo* followed by subsequent tracer injections, we investigated the response of PnC neurons after contra-, ipsi-, and bilateral acoustic stimulation and identified the source of their auditory afferents. Our results showed that the binaural firing rate of PnC neurons was higher than the monaural, exhibiting higher spike discharges with contralateral than ipsilateral acoustic stimulations. Our histological analysis confirmed the CRNs as the principal source of short-latency acoustic inputs, and indicated that other areas of the cochlear nucleus complex are not likely to innervate PnC. Behaviorally, we observed a strong reduction of ASR amplitude in monaural earplugged rats that corresponds with the binaural summation process shown in our electrophysiological findings. Our study contributes to understand better the role of neuronal mechanisms in auditory alerting behaviors and provides strong evidence that the CRNs-PnC pathway mediates fast neurotransmission and binaural summation of the ASR.

Keywords: alertness system, binaural summation, cochlear root neurons, extracellular recordings, neuronal tracers, pontine reticular formation, rat, vglut1-auditory nerve

INTRODUCTION

The acoustic startle reflex (ASR) is a survival mechanism of alarm, which rapidly alerts and arouses organisms to a sudden loud auditory stimulus. Behaviorally, the ASR involves a rapid and sequential activation of muscles along the length of the body as well as an autonomic physiological response (Prosser and Hunter, 1936; Szabo, 1964; Hoffman and Ison, 1980). The ASR and its modulations, which are sensible to a variety of experimental approaches, can be easily tested in humans and rodents (Braff and Geyer, 1990; Lehmann et al., 1999). Thus, the ASR has been consolidated as an important research tool for studying brain mechanisms of learning, memory, emotions, sensory gating, and movement control (Davis and Sheard, 1974; Davis, 1990; Lang et al., 1990; Yeomans and Frankland, 1996; Koch, 1999; Swerdlow et al., 2001). The rat is an excellent animal model to study the ASR, and hence, the neuronal circuits underlying the ASR in rats are of great interest.

It is well established that a relatively simple pathway in the brainstem mediates the ASR (Figure 1). The cochlear root neurons (CRNs), true sentinels of the rodent auditory pathway, are the first brainstem neurons receiving direct input from spiral ganglion cells (Harrison et al., 1962; Merchán et al., 1988; Osen et al., 1991; López et al., 1993, 1999). Collectively, they comprise the so-called cochlear root nucleus, and are morphologically characterized by their large cell body and thick dendrites that distribute among the eighth nerve fibers (Merchán et al., 1988; López et al., 1993). The thick myelinated axons of CRNs course through the trapezoid body (TB) to innervate neurons in the caudal pontine reticular nucleus (PnC) on both sides of the brainstem, with a clear contralateral predominance (López et al., 1999; Nodal and López, 2003). Finally, the acoustically driven PnC neurons project to facial, cranial and spinal motoneurons that rapidly activate the muscle contractions (Lingenhöhl and Friauf, 1994; Lee et al.,



1996; Yeomans and Frankland, 1996; Koch and Schnitzler, 1997). The electromyographic latencies of the muscles during the ASR are extremely short (6–10 ms) (Ison et al., 1973; Davis et al., 1982; Caesar et al., 1989). Such short-latency motor response is consistent with the neuronal latencies observed in the primary ASR mediating circuit (Figure 1). Thus, CRNs exhibit a secure electrophysiological response to tone burst, with first-spike latencies of approximately 2.2 ms (Sinex et al., 2001; Gómez-Nieto et al., 2010, 2013), and giant PnC neurons that receive acoustic inputs show first-spike latencies of 5.2 ms (Lingenhöhl and Friauf, 1994). The main purpose of this study is to reappraise the anatomical origin of short-latency auditory inputs to CRNs and PnC neurons and investigate whether the CRNs-PnC neuronal pathway is responsible for the binaural summation that occurs during the ASR. Although much is currently known about the cochlear nerve projection to the cochlear root nucleus (Harrison et al., 1962; Merchán et al., 1988; Osen et al., 1991; López et al., 1993, 1999), the neuroanatomical and neurochemical mechanisms by which CRNs integrate fast and frequency-specific acoustic information has not been clearly established. The rats are extremely sensitive to high frequency sounds, and the amplitude of the ASR depends on sound features such as intensity, duration and

frequency (Gourevitch and Hack, 1966; Błaszczuk and Tajchert, 1997). Since the characteristic frequency of CRNs is approximately 30 kHz (Sinex et al., 2001; Gómez-Nieto et al., 2013), we aimed to determine whether auditory nerve afferents tonotopically innervate CRNs. The primary auditory afferents use glutamate as neurotransmitter (Hackney et al., 1996; Furness and Lawton, 2003; Rubio and Juiz, 2004) and their endings contain the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) as it has shown in other areas of the cochlear nucleus complex (Zhou et al., 2007; Gómez-Nieto and Rubio, 2009). Here, we demonstrated that VGLUT1 is also associated with auditory nerve afferents that terminate onto CRNs, which suggests a fast mechanism of controlling and securing excitatory transmission in the cochlear root nucleus. Additionally, there are two questions that have been raised about the primary ASR circuit at the level of the PnC. One question is whether, in addition to the CRNs, other neuronal types within the cochlear nucleus complex provide short-latency acoustic inputs to PnC neurons, as proposed by other researchers (Davis et al., 1982; Kandler and Herbert, 1991; Lingenhöhl and Friauf, 1994; Meloni and Davis, 1998). The other question relates to the neuronal bases underlying the binaural summation of the startle reflex, which has yet to be elucidated (Marsh et al., 1973;

Li and Frost, 1996; Yeomans et al., 2002). To address these issues, we used extracellular recordings *in vivo* followed by subsequent tracer injections to investigate the sound evoked responses of PnC neurons after contra-, ipsi-, and bilateral stimulation, and identify the source of their auditory afferents. Our electrophysiological study combined with neuronal tracing indicated the existence of a binaural summation process in the pontine reticular formation, and demonstrated that CRNs are the main source of short-latency acoustic inputs to PnC neurons. Additional anterogradely tracing experiments were also performed to verify whether neurons of the dorsal and ventral cochlear nucleus (DCN and VCN, respectively) innervate PnC neurons. Furthermore, we correlated our electrophysiological findings with changes in the ASR behavioral performance of monaural earplugged rats. Monaural earplugging reduces auditory nerve activity and affects processing through the auditory pathways (Potash and Kelly, 1980). Since the startle depends on normal binaural auditory interaction (reviewed in Yeomans et al., 2002), we found a reduction of the ASR amplitude in rats under monaural sound-deprivation conditions, which was consistent with the PnC neurons' response to monaural acoustic stimulation. Our study provides convergent anatomical, electrophysiological and behavioral evidence for the role of the CRNs-PnC projection in fast neurotransmission and binaural summation of the ASR and offers new insights into the structure and function of the primary ASR neuronal circuit.

MATERIALS AND METHODS

EXPERIMENTAL ANIMALS

In total, 36 adult female Wistar rats (Charles River Laboratories) weighing 165–320 g were used in this study. The animals were randomly housed and maintained under normal 12/12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 h) in a temperature- and humidity-controlled environment. The rats were given *ad libitum* access to food and water over the study period. The experiments were conducted in compliance with the guidelines for the use and care of laboratory animals of the European Communities Council Directive (2010/63/EU), the current Spanish legislation (RD 1201/05), and with those established by the Institutional Bioethics Committee. All efforts were made to minimize the number of animals used. For the surgical procedures, the animals were deeply anesthetized with a mixture of ketamine (40 mg/kg body weight) and xylazine (7 mg/kg body weight). The suffering of the animals was minimized during the surgery by monitoring the depth of anesthesia carefully. Supplementary doses of anesthetic were administrated as required to maintain deep anesthesia throughout the duration of the experiment.

NEUROANATOMICAL EXPERIMENTS: SURGERY, TRACER INJECTIONS, AND TISSUE PROCESSING

A total of 17 animals were used in the neuroanatomical experiments with the aim of studying the source of acoustic inputs to CRNs and PnC Neurons. To investigate the distribution of cochlear nerve inputs on CRNs, 4 rats received anterograde horseradish peroxidase (HRP, type VI, Sigma, St Louis, MO) injections into basal and apical regions of the cochlea following the procedure described by Osen et al. (1991). Once anesthetized, the tympanic bulla was exposed and a small orifice was made

in the lateral wall of the cochlea at various apico-basal levels. HRP (20% in distilled water) was pressure-injected through a glass micropipette for 10–20 min, and a second micropipette was placed in the oval window for fluid removal. After the wound was washed and sutured, the animals were allowed to recover for 2 days. In cases with electrophysiological recordings in the right PnC (see below), we injected the bidirectional tracer, biotinylated dextran amine (BDA, 10,000 MW; #D-1956; Molecular Probes, Eugene, OR) to verify the recording site and investigate the source of cochlear nucleus inputs to PnC neurons. In another set of experiments, 6 rats received unilaterally injections of BDA into the left DCN and VCN. All surgical and stereotaxic procedures for injecting the BDA were identical to that used in our previous studies (Gómez-Nieto et al., 2008a, 2013; Horta-Júnior et al., 2008). BDA (10% in distilled water) were injected iontophoretically via a glass micropipette (25 μ m tip diameter), with 3 μ A positive current pulses (7 s on/7 s off) for a period of 15 min. The stereotaxic coordinates for the right PnC was based on previous reports which studied afferent projections from auditory brainstem nuclei into the PnC (Lingenhöhl and Friauf, 1994; Lee et al., 1996; López et al., 1999; Nodal and López, 2003). The coordinates for the left VCN were precisely the same as those used by (Gómez-Nieto et al., 2013). All stereotaxic coordinates, including those for the DCN, were obtained from the atlas of the rat brain (Paxinos and Watson, 2009), using an electrode angle calibrator (David Kopf Instruments). After the tracer injection, the scalp was sutured and the animal was allowed to recover for a minimum of 7 days. Tissue preparation for light microscopy included: perfusion of the animals, brain dissection and subsequent cryoprotection with sucrose, freezing and serially slicing at 40 μ m thickness along parasagittal and coronal planes, visualization of HRP and BDA neurotracers, and calbindin protein-D28K (CaBP) immunohistochemistry. All these techniques were applied in a manner identical to that used in our previous reports (Osen et al., 1991; López et al., 1993, 1999; Gómez-Nieto et al., 2008a, 2013). In cases with HRP injections, we followed a standard immunostaining protocol to visualize CaBP as described by Gómez-Nieto et al. (2008a). CaBP immunoreactivity has been extensively utilized for detecting the cell body and dendrites of the CRNs (López et al., 1993; Gómez-Nieto et al., 2008a, 2013). Thus, nickel-intensified peroxidase reaction was developed for HRP visualization in order to distinguish from CaBP immunohistochemistry without heavy metal intensification of diaminobenzidine (Gómez-Nieto et al., 2008a). Detailed information of the antibodies and dilutions used for CaBP immunohistochemistry is shown in **Table 1**. All sections processed for light microscopic analysis were mounted on slides and 4 alternate series were counterstained with cresyl violet to highlight cytoarchitectonic divisions; the other sections were dehydrated in ethanol and coverslipped with Entellan Neu (#107961; Merck, Darmstadt, Germany).

Double fluorescent tract-tracing experiments

To label CRNs and the cochlear nerve, we used identical procedures to those used in our previous studies (Gómez-Nieto et al., 2008b; Gómez-Nieto and Rubio, 2009). Three animals received a unilateral injection of the fluorescent tracer, dextran fluorescein isothiocyanate (D-FITC; #D-1820; Molecular Probes,

Table 1 | List of antibodies and dilutions used in the immunohistochemistry techniques.

Antigen	Primary antibody [†]	Catalog/Brand*	Dilution	Secondary antibody	Dilution	Catalog/Brand*	Processing [‡]	References
CaBP	Mouse anti-CaBP	#C-8666/Sigma	1:200	Biotinylated horse anti-mouse	1:200	#BA-2000/Vector	LM	Gómez-Nieto et al., 2008a,b, 2013
VGLUT1	Rabbit anti-VGLUT1	#135-302/Synaptic Systems	1:1000	Cy3 goat anti-rabbit	1:200	#111-165-003/JI	CM	Gómez-Nieto et al., 2008b; Gómez-Nieto and Rubio, 2009
				Cy5 goat anti-rabbit	1:200	#115-175-003/JI		
c-Fos	Rabbit anti-c Fos	#SC-52/SCB	1:2500	Biotinylated goat anti-rabbit	1:200	#BA-1000/Vector	LM	Castellano et al., 2009, 2013

*Antibody manufacturers: JI, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA; SCB, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); Synaptic Systems, Göttingen, Germany; Sigma, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; Vector, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA.

[†]Specificity and immunogen sequence of primary antibodies: (1) The anti-CaBP was a mouse IgG isotype produced by hybridization of mouse myeloma cells with spleen cells from mice immunized with calbindin D-28k purified from chicken gut. The antibody specifically stains the 45Ca-binding spot of the calbindin D-28k (MW 28 kDa) of tissue originating from rat brain in two-dimensional immunoblots; (2) The anti-VGLUT1 is a polyclonal antibody generated in rabbits against Strep-Tag fusion protein containing amino acid residues 456–560 of rat VGLUT1. This antibody has been tested in preadsorption experiments that blocked efficiently and specifically the corresponding signals (manufacturer's technical information; see also Zhou et al., 2007); (3) The anti-c Fos is a rabbit polyclonal antibody produced against an epitope mapping at the N-terminus of c-Fos of human origin (see details in manufacturer's technical information).

[‡] Tissue processed for light microscopy (LM) or confocal microscopy (CM).

Eugene, OR), into the left TB to label CRNs retrogradely. The stereotaxic coordinates targeted the course of CRN axons which project to PnC neurons via the TB (López et al., 1999). A volume of 0.15–0.2 μl of D-FITC (10% in distilled water) were pressure-delivered with a Hamilton syringe (#710; Hamilton Co., Reno, NV) attached to a Stereotaxic Injector (Stoelting Co., Wood Dale, IL). After the scalp was sutured, the animals were allowed to recover for 4–7 days. Then, the animals were deeply anesthetized and perfused through the heart with 0.5% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The cochlea was removed, and crystals of the lipophilic dye DiI (#D-3911; 1.1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes) were placed on the exposed auditory nerve. The brains were stored in 4% PFA for approximately 30 days at room temperature protected from light and were processed for confocal microscopy as described by Gómez-Nieto and Rubio (2009).

VGLUT1 immunofluorescence and colocalization experiments

Two rats were used to identify VGLUT1 immunopositive terminals in the cochlear root nucleus. The immunofluorescence was performed following the same protocol described by Gómez-Nieto and Rubio (2009). After obtaining the brain tissue, free-floating sections (40 μm in thickness) were pretreated with phosphate buffer saline (PBS) 0.3% TritonX-100, and blocked for 1 h at room temperature with 6% normal goat serum (#S-1000, Vector Laboratories) in PBS. Subsequently, the brain slices followed overnight incubation at 4°C with the primary antibody (see Table 1 for complete information of antibodies). Thereafter, the sections were rinsed extensively in PBS and incubated for 1 h at room temperature with their corresponding fluorophore conjugated secondary antibody (Table 1). In another set of experiments, we studied the codistribution of cochlear

nerve terminals and VGLUT1 on CRNs retrogradely labeled with D-FITC. For this purpose, we analyzed 2 animals from our previous studies in which a triple-labeling procedure was designed to detect colocalization of VGLUT1 with auditory nerve terminals on bushy cells dendrites (Gómez-Nieto and Rubio, 2009). These animals received an injection of D-FITC in the TB and insertions of DiI crystals in the cochlear nerve root, and finally the brainstem sections were processed for VGLUT1 immunofluorescence as described above. In these colocalization experiments, we used Cy5 goat anti-rabbit (blue emission) to distinguish the signal from the DiI (red emission)-labeled auditory nerve endings. Finally, all sections were rinsed extensively in PBS, dipped briefly in distilled water, mounted onto fluorescence-free slides, air-dried, and coverslipped with ProLong Antifade Kit (#P7481; Molecular Probes) to prevent photobleaching. In all immunofluorescence experiments, negative controls were not treated with primary antibodies, and this resulted in the complete absence of immunolabeling.

ELECTROPHYSIOLOGY EXPERIMENTS COMBINED WITH BDA INJECTIONS

Seven rats were used for extracellular multi-unit recordings of acoustically driven PnC neurons, and subsequent neuronal tract-tracing study. The animal's body temperature was monitored and maintained at 38°C by a thermostatically controlled electrical blanket. Once anesthetized, each animal was placed inside a sound-attenuated room in a stereotaxic frame in which the ear bars were replaced by a hollow speculum coupled to a sound delivery system (Sony MDR E-868 earphones). The output of the system at each ear was calibrated *in situ* using a DI-2200 spectrum analyzer and a Brüel and Kjær 4134 microphone. This standard calibration was used to set the levels of tones and white noise in all experiments. Both pure tones and bursts of white noise were

generated using a waveform generator (Hewlett Packard-8904A multifunction synthesizer) controlled by a computer. Acoustic stimuli were delivered to the ears monaurally, ipsi- and contralateral to the recording site, as well as binaurally. After craniotomy and brain surface exposure, a glass micropipette with the tip broken to a diameter of 10 μm was filled with 10% of BDA in 2M NaCl (15–25 M Ω) and lowered through the brainstem using a piezoelectric microdrive (Burleigh 6000 ULN, Burleigh Instruments, Fishers, NY) with a resolution of 1 μm . The electrode was aimed to target PnC neurons in the right side of the brainstem following the same stereotaxic approach described above. As the micropipette was advanced into the brainstem, we used white noise as search stimuli. Extracellularly recorded action potentials were amplified ($\times 10,000$; BAK MDA-4I), filtered (0.3–3 kHz), discriminated (BAK DIS-1) and time-stamped with an accuracy of 10 μs by a CED-1401plus Laboratory Interface (Cambridge Electronic Design). Once significant evoked activity was detected, bursts of white noise and pure tones were used as experimental stimuli to assess the modifications of PnC neural responses at different conditions (intensity, frequency and side of stimuli presentation). Stimuli were 100 presentations of 75 ms pure tones (5 ms rise/fall time) or noise bursts at a rate of 2/s. Sound level was varied from 60 to 90 dB in 10-dB steps and frequency from 0.5 to 35 kHz. These intensity and frequency ranges were chosen based on the high firing thresholds and broad frequency tuning of PnC neurons (Lingenhöhl and Friauf, 1994). The spikes times evoked by the different stimuli were stored and were used to calculate the response magnitude (spikes per ms) and first spike latencies. The integration window to calculate the mean firing rate was the first 25 ms after stimuli presentation. For each recording, we obtained peristimulus time histograms to display the responses to the stimuli. Data from first spike latencies and responses of PnC neurons were pooled for statistical comparison between stimulation with pure tones and noise bursts as well as the side of stimuli presentation. At the end of each experiment, BDA was injected iontophoretically following the same procedure described above. Finally, the animal was allowed to recover for a minimum of 7 days and followed the histological procedure to visualize the neuronal tracer at light microscopy (López et al., 1999; Gómez-Nieto et al., 2008a, 2013).

BEHAVIORAL EXPERIMENTS

A total of 12 rats were used to study the behavioral paradigm of the ASR under monaural sound-deprivation conditions. The animals were randomly divided into one experimental group with monaural earplugging ($n = 6$) and an intact control group ($n = 6$). The ASR amplitude was assessed in rats from the experimental group prior to and following 4 days of monaural earplugging, and their ASR was compared with those from the control group. After the behavioral test, the animals were kept at rest during 60 min, and then followed the tissue preparation to detect c-Fos immunoreactivity at light microscopy (see below).

ASR apparatus (system) and procedure

Before testing, the rats were habituated to the experimental conditions, especially to their placement into the ASR apparatus. All testing was carried out between 9:00 A.M. and 11:00 A.M.,

using the SR-LAB system (SDI, San Diego, CA, USA) as described by Castellano et al. (2009). The acoustic startle reflexes were measured in six identical startle response systems (SR-LAB). Acoustic stimulus intensities and response sensitivities were calibrated (using an SR-LAB Startle Calibration System) to be nearly identical in each of the six SR-LAB systems (maximum variability <1% of stimulus range and <5% of response ranges). Each system consisted of a nonrestrictive Plexiglas cylinder, 8.7 cm in internal diameter and 20.5 cm long, mounted on a platform which was located in a ventilated, sound-attenuated chamber. Cylinder movements were detected by a piezoelectric accelerometer mounted under each platform and were digitized and stored by an interfacing computer assembly. A loudspeaker mounted 14.5 cm above the cylinder provided the broadband background noise and acoustic stimuli. Each testing session consisted of an acclimatization period of 5 min and 64 trials with a 30 s interval between them. The trials were a single noise pulse (20 ms bursts of white noise) presented at different intensities (95, 105, and 115 dB SPL) in a random manner. Whole body ballistic movements corresponding to startling responses were collected and analyzed by the SR-LAB system providing two main values of interest: V_{max} and T_{max} . The V_{max} represents the peak startle response (ASR amplitude) that occurs during each trial while T_{max} is the time from stimulus to the peak startle response (ASR latency). The background noise of 65 dB SPL was generated throughout the entire session in order to avoid interference from external noise and ensure equal experimental conditions.

Monoaural earplugging

After ASR testing, animals from the experimental group were anesthetized and put on a warm blanket under a stereomicroscope. The skin was disinfected and foam earplugs (Moldex®, Culver City, CA) were cut to appropriate size and introduced into the right external canal as described by Whiting et al. (2009). Once the ear canal was sealed, the animal was maintained under normal conditions for 4 days until the ASR was measured again. After earplugging, the animals showed no symptoms of stress or infection, and kept their weight steady (see table in **Supplemental Figure 6**). Acoustic effects of monaural earplugging in rats include attenuation of approximately 40 dB on the same side to the earplug as well as modifications of the threshold, amplitude and latency of acoustic brain response waveforms (Whiting et al., 2009; Popescu and Polley, 2010; Wang et al., 2011).

Fos immunohistochemistry

Once the behavioral tests were completed, animals from the control and the monaural experimental group were processed to detect c-Fos immunoreactivity in the auditory pathway, and more specifically in the inferior colliculus (IC). The noise bursts used to measure the ASR served to induce the c-Fos expression in the auditory pathway. Since c-Fos protein has been widely used as a marker of early neuronal activation (Sagar et al., 1988; Dragunow and Faull, 1989; Murphy and Feldon, 2001), the quantification c-Fos immunoreactivity in the IC allowed us to check the efficiency of the earplugging. Perfusion of the animals, serial brain slicing into 40 μm coronal sections and c-Fos immunohistochemical

staining protocol was described in detail elsewhere (Castellano et al., 2009, 2013). Sections were incubated in primary anti-serum against c-Fos protein for 72 h at 4°C. The tissue was then washed and incubated with its corresponding biotinylated secondary antibody for 2 h at room temperature, and finally visualized with the avidin-biotin-peroxidase complex procedure (Vectastain, Vector Labs.) and histochemistry for peroxidase without heavy-metal intensification. Complete information of the primary and secondary antibodies used for c-Fos immunohistochemistry is provided in **Table 1**. Immunolabeling was abolished by omission of the primary antibody. For each brain, all sections were mounted on slides, dehydrated and coverslipped as described above.

IMAGE, DATA, AND STATISTICAL ANALYSIS

The sections processed for light microscopy were examined on an upright brightfield microscope (#BX5; Olympus, Center Valley, PA, USA) equipped with a digital camera (SpotRt®; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA). Low-magnification images were taken with the 4×, 10×, or 20× objective lens, and high magnification images were taken with a 40× or 100× objective lens (oil immersion) for morphometric measures of labeled structures. The morphometric analysis was carried out with ImageJ (version 1.42; Rasband W.S., ImageJ, Bethesda, Maryland, USA, U.S. National Institutes of Health; 1997–2011. <http://imagej.nih.gov/ij/>). In the behavioral experiments, we estimated the number of c-Fos-immunolabeled neurons in the IC using a similar quantitative analysis as previously described by Castellano et al. (2013). High magnification micrographs (×40) of the ipsilateral and contralateral IC were taken with a Leica microscope (model # DMRB) coupled to a motorized *x–y–z* motor stage, and connected to a PC with Stereo Investigator software (MicroBrightField, VT, USA). The stereological analysis was accomplished with the aid of the optical fractionator method (Gundersen et al., 1988). We selected one section containing the left and right IC in each one of the 12 animals used in the behavioral experiments. To guarantee the homogeneity and the reproducibility of the area of interest, the contour of the IC was drawn at low magnification (2×), using transparent templates taken from the atlas of the rat brain (Paxinos and Watson, 2009) at 0.2 mm anterior from the interaural plane. The templates were placed on the screen of the computer and served to select the same area of interest in all histological sections. After that, the Stereo Investigator system automatically estimated the size of the counting grid (optical disector) and the number of zones to be sampled. The neurons were counted according to the optical disector counting rules as they first came into focus from 3 μm below the upper surface of the section and did not touch the right inferior and superior edges of the disector. Quantification was carried out in a single-blind assessment by two different investigators and only neurons that displayed a clearly staining above the background were considered as a count. For the immunofluorescence and colocalization experiments, the sections were examined with a conventional brightfield microscope equipped with epifluorescence. In selected slides, the sections were analyzed with a Leica TCS SP2 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Mannheim,

Germany) coupled to a Leica DM IRE2 inverted microscope and equipped with argon and helium neon lasers with excitation wavelengths of 458, 476, 488, 543, 568, and 633 nm. The fluorochromes FITC, Cy3, DiI, and Cy5 were detected sequentially, stack by stack, with the acousto-optical tunable filter system and triple dichroic mirror TD488/543/633. The background was controlled, and the photomultiplier voltage (800 V) was selected for maximal sensitivity in the linear range. The objectives used were oil immersion ×40 and ×63/numerical aperture 1.30, providing a resolution of ×150 nm in the *xy* plane and ×300 nm along the *z*-axis (pinhole 1 Airy unit), as well as several electronic zoom factors up to ×1.58. To determine the codistribution of the immunolabeled terminals, series of 25–50 confocal images were obtained to generate a maximal-intensity *z* projection of stacks and an orthogonal projection (= *xy*, *xz*, *yz* planes, for *z* stacks series). Colocalization of the fluorochromes within positive terminals was verified in the orthogonal view. All photomicrographs shown in the figures were processed with minor modifications in brightness, contrast and to remove the tissue free background using Adobe Photoshop® CS3 Extended (Version 10.0) and assembled in Canvas 7.0 software. Statistical analyses were performed using the SPSS software, version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All mean values were expressed ± the standard error of the mean. Comparisons between groups were made by analysis of variance (mixed ANOVA split-plot), with pairwise comparisons Sheffe (between-subjects analysis) and Bonferroni post-hoc test (intra-subject analysis). To compare differences between two means, we used Student's *t*-test taking into account the Levene's test for equality of variances. The differences between groups were regarded as statistically significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS

HRP INJECTIONS INTO THE BASAL AND APICAL COILS OF THE COCHLEA

To determine whether cochlear nerve terminals innervate CRNs in a tonotopic specific manner, we injected HRP into the basal and apical regions of the cochlea. In parasagittal sections of the cochlear nucleus complex, we observed HRP labeling as an intense black reaction product in which a densely bundle of axons were identified (**Figure 2**). These HRP labeled axons followed the characteristic V-shaped branching pattern of the primary cochlear afferents (**Figures 2A,B**). To define the injection site, we followed the criteria established by Merchán et al. (1988) and examined the areas of the cochlear nucleus complex in which the HRP-labeled fibers decussated and terminated. In cases with HRP injections in the basal coil of the cochlea, the cochlear nerve fibers bifurcate dorsally and give rise terminals into dorsal parts of the cochlear nucleus complex (**Figure 2A**). We examined the course of HRP-labeled axons within the cochlear root nucleus, and found that they give off collaterals of various diameters (ranged from 0.4 to 1.6 μm) and numerous endings that terminated on CRNs somata, but not exclusively (**Figures 2A1,A2**). To verify that HRP-labeled fibers terminate on the cell body of CRNs, we immunostained brainstem sections for CaBP. The cochlear nerve collaterals were orientated perpendicular to the parent fibers, and extended approximately 70 μm in length to innervate the cell body of CRNs

immunostained for CaBP (Figures 2A3,A4). In cases with HRP injections in the apical coil of the cochlea, the cochlear nerve fibers divided more ventrally and form axonal terminals into ventral parts of the cochlear nucleus complex (Figure 2B). In the cochlear root nucleus of these cases, we observed numerous HRP-labeled fibers that span away from the CRNs cell body and followed the course of CRNs dendrites (Figure 2B1). Although we also observed that HRP-labeled fibers give off terminals on cell bodies of CRNs (Figure 2B2), a greater number of these terminals appear to establish contact on primary and distal CRNs

dendrites (Figures 2B3,B4). This set of data suggests that auditory nerve inputs could be distributed preferentially on the cell body and dendrites of CRNs depending, respectively, on their basal or apical cochlear origin.

COCHLEAR NERVE ENDINGS ON CRNs COLABEL WITH VGLUT1

Our HRP injections in the apical regions of the spiral ganglion gave evidence that primary auditory afferents might innervate dendrites of CRNs. To fully confirm this result, we retrogradely labeled CRNs by injecting D-FICT in the TB and inserted DiI crystals into the cochlear nerve root (Figure 3). The D-FICT injection sites in the TB were equal as those reported in our previous studies (Gómez-Nieto et al., 2008b; Gómez-Nieto and Rubio, 2009). Our D-FICT injections filled axons of approximately 3 μm in diameter that coursed through the contralateral TB (Figure 3A, see also Figure 4A below). We followed the directions of these labeled axons and found that they emerged from retrogradely labeled cell bodies of CRNs (Figure 3A). The DiI

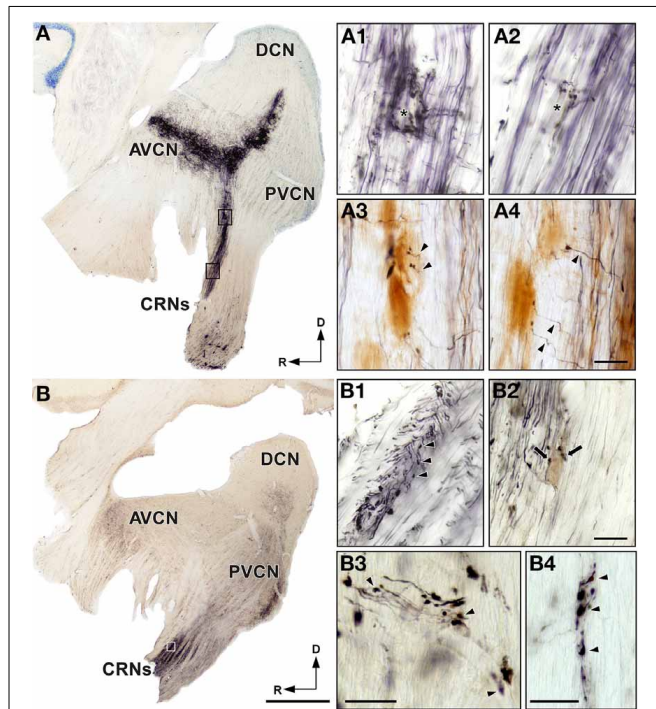


FIGURE 2 | Injections of HRP in the basal and apical regions of the spiral ganglion generate respectively labeled auditory nerve endings on the cell body and dendrites of cochlear root neurons (CRNs). (A) Parasagittal section of the cochlear nucleus complex shows labeled primary auditory afferents after injection of HRP in the basal coil of the cochlea. Notice that auditory nerve fibers divide dorsally and terminate in the dorsal part of the anteroventral cochlear nucleus (AVCN) and posteroventral cochlear nucleus (PVCN). (A1,A2) Higher magnification of the cochlear root nucleus corresponding to the frames in (A). Note HRP-labeled endings outlining the unlabeled neuronal somata of CRNs (asterisks). (A3,A4) High magnification micrographs of the cochlear root nucleus show HRP-labeled collaterals of primary auditory fibers (arrowheads) that terminate on the cell body of CRNs immunolabeled for CaBP. (B) Parasagittal section of the cochlear nucleus complex shows labeled primary auditory afferents after injection of HRP in the apical coil of the cochlea. Notice that auditory nerve fibers bifurcate ventrally and terminate in the ventral part of the AVCN and PVCN. (B1) High magnification of the cochlear root nucleus corresponding to the frame in (B) shows HRP-labeled endings (arrowheads) outlining the unlabeled dendrite of a CRN. (B2) High magnification micrograph shows HRP-labeled auditory nerve endings (arrows) outlining the cell body of a CRN. (B3,B4) High magnification of the cochlear root nucleus shows details of HRP-labeled endings (arrowheads) outlining perpendicular (B3) and parallel (B4) unlabeled dendrites of CRNs after HRP injection in the apical coil of the cochlea. DCN, dorsal cochlear nucleus. Scale bars = 1 mm in A and B; 25 μm in A1–A4, B1–B4.

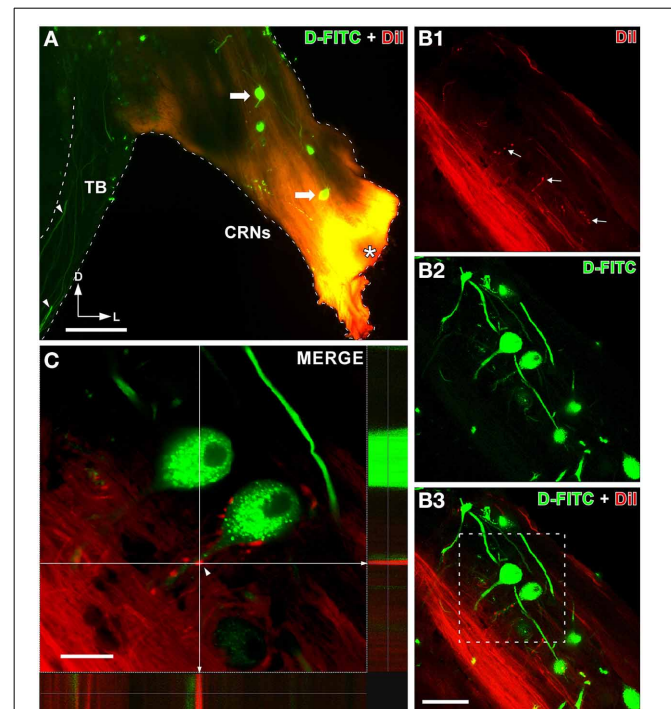


FIGURE 3 | Auditory nerve projections to cochlear root neurons (CRNs) dendrites. (A) Epi-fluorescence micrograph of a coronal section shows a representative case with an insertion of DiI crystals into the cochlear root (asterisk) and retrogradely labeled CRNs (arrows) after D-FITC injection into the trapezoid body (TB). Notice thick CRNs axons (arrowheads) labeled with D-FITC coursing through the TB. (B1–B3) Confocal micrographs show auditory nerve terminals on dendrites of CRNs. DiI-labeled auditory nerve fibers which send collaterals (arrows) into the region of CRNs are shown in (B1) (in red). CRNs retrogradely labeled with D-FITC are shown in (B2) (in green). The image (B3) is the merge of the two maximum z-series projection shown in (B1,B2). (C) Detail of the boxed area in (B3) show a dendrite of a CRN decorated with auditory terminals. The orthogonal view in (C) confirms that auditory nerve terminals are in close apposition with the dendrite (arrowhead). Scale bars = 200 μm in A; 75 μm in B1–B3; 25 μm in C.

crystals inserted into the cochlear nerve root led to diffusion along auditory nerve fibers (Figure 3A). In the cochlear root nucleus, we observed thin DiI-labeled collaterals branching perpendicularly from the main auditory nerve fibers (Figure 3B1). The DiI-labeled collaterals gave rise to small endings that terminated on dendrites of CRNs (Figures 3B1–B3). The orthogonal view of confocal z-stack confirmed that those cochlear nerve endings were in close apposition to dendrites of CRNs (Figure 3C).

The excitatory synaptic marker VGLUT1 has been associated with the mediation of glutamate transport at cochlear nerve fibers in other areas of the cochlear nucleus complex (Zhou et al., 2007; Gómez-Nieto and Rubio, 2009). As expected from our previous report (Gómez-Nieto et al., 2008b), we found a strong immunoreactivity for VGLUT1 in the cochlear root nucleus (Supplemental Figure 1). VGLUT1-labeled endings equally distributed throughout dorsal and ventral portions of the cochlear root nucleus (Supplemental Figure 1). They were quite numerous and fully decorated cell bodies as well as primary and distal dendrites of CRNs (Supplemental Figure 1). To determine whether these VGLUT1 immunopositive endings colabel with terminals of the auditory nerve, we used a triple-labeling method consisting of double tract-tracing with D-FITC for CRNs and DiI for cochlear nerve endings, combined with immunofluorescence for VGLUT1. As described in the above experiments, D-FITC injection in the TB retrogradely labeled the cell body and dendrites of CRNs (Figures 4A,B). The inserted DiI crystals into the cochlear nerve root diffused through cochlear nerve fibers and collaterals, allowing us to label cochlear nerve terminals (Figure 4C). We also found many VGLUT1-immunopositive endings that were outlining cell bodies and dendrites (Figure 4D). Our confocal analyses identified cochlear nerve terminals as VGLUT1-immunopositive endings that were closely apposed to CRNs (Figure 4E). The orthogonal view of cochlear nerve endings confirmed the colocalization DiI-labeled endings with VGLUT1 immunolabeling (Figure 4F).

ELECTROPHYSIOLOGICAL RESPONSES OF PnC NEURONS TO CONTRA-, IPSI-, AND BILATERAL ACOUSTIC STIMULATIONS

To determine whether acoustically driven PnC neurons are involved in binaural summation processing, pure tones (frequency range from 0.5 to 35 kHz) and noise bursts of 75 ms duration were presented contra-, ipsi-, and bilateral to the recording site at four different intensities (60, 70, 80, and 90 dB SPL). A total of 169 and 49 multi-units recordings were obtained using pure tones and noise bursts, respectively. PnC neuronal activity exhibited an onset response with very short first spike latencies (Figure 5). For example, in Figure 5A noise bursts of 90 dB SPL evoked the PnC neuronal activity with a mean spike latency of 4.39 ± 0.12 ms. The major firing rate was observed within the first 25 ms after stimuli presentation (Figure 5A). Using this integration window, we examined the mean spike latency and firing rate of PnC neurons depending on acoustic stimuli (noise bursts and pure tones) and on the side of stimuli presentation (Figures 5B,C). We found that the mean spike latency was shorter with pure tone (3.94 ± 0.39 ms) than with noise burst stimulations ($4.83 \pm$

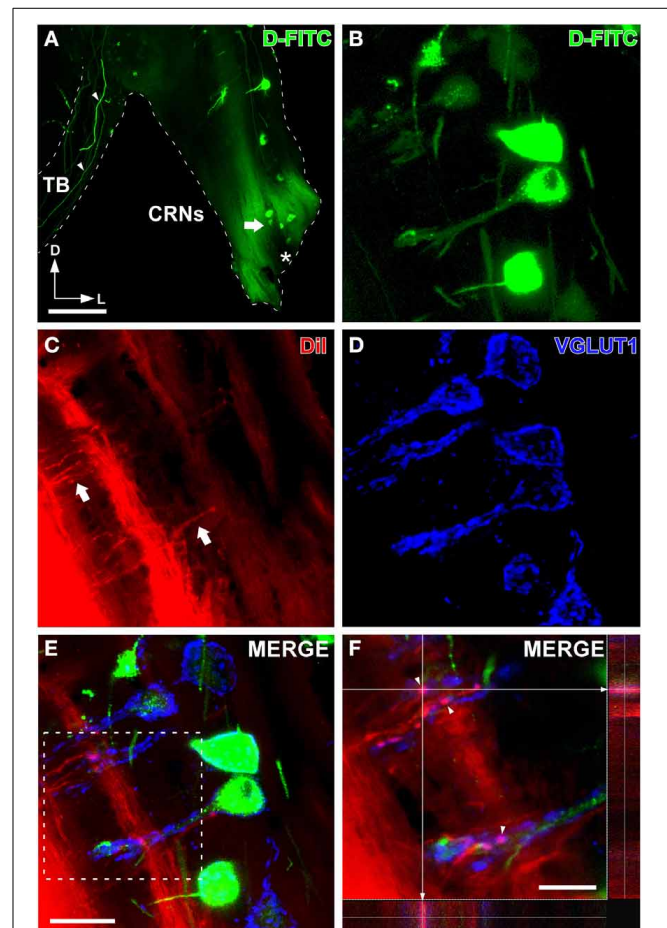


FIGURE 4 | Auditory nerve endings onto cochlear root neurons (CRNs) colabel with VGLUT1. (A) Epi-fluorescence micrograph of a coronal section shows retrogradely labeled CRNs after D-FITC injection into the trapezoid body (TB) and the insertion site of DiI crystals into the cochlear root (asterisk). Notice thick CRNs axons (arrowheads) labeled with D-FITC coursing through the TB. **(B)** Confocal image of retrogradely labeled CRNs with D-FITC (position denoted by an arrow in **A**). **(C)** Confocal image of DiI-labeled endings which arise from auditory nerve collaterals (arrows). **(D)** Confocal image shows VGLUT1-immunolabeled endings. **(E)** Confocal image shows VGLUT1 colabeled with auditory nerve terminals on CRNs. This image is the merge of the three maximum z-series projection shown in **(B–D)**. **(F)** Detail of the boxed area in **E** shows VGLUT1-auditory nerve terminals (arrowheads) on dendrites of CRNs. Colocalization of VGLUT1 puncta and DiI is confirmed by the orthogonal view. Scale bars = 500 μ m in **A**; 40 μ m in **B–E**; 20 μ m in **F**.

0.58 ms), showing significant differences when they were presented monaurally (both contra- and ipsilateral to the recording site). However, no significant difference was found between pure tone and noise burst stimulations after binaural presentations (Figure 5B). There was also no significant difference in spike latencies when comparing binaural with monaural presentation of pure tones or noise bursts. Regarding the PnC neuronal activity, we found that the mean firing rate (spikes/ms) was significantly greater with binaural than with monaural presentations (Figure 5C). Thus, we consistently observed that either pure tones

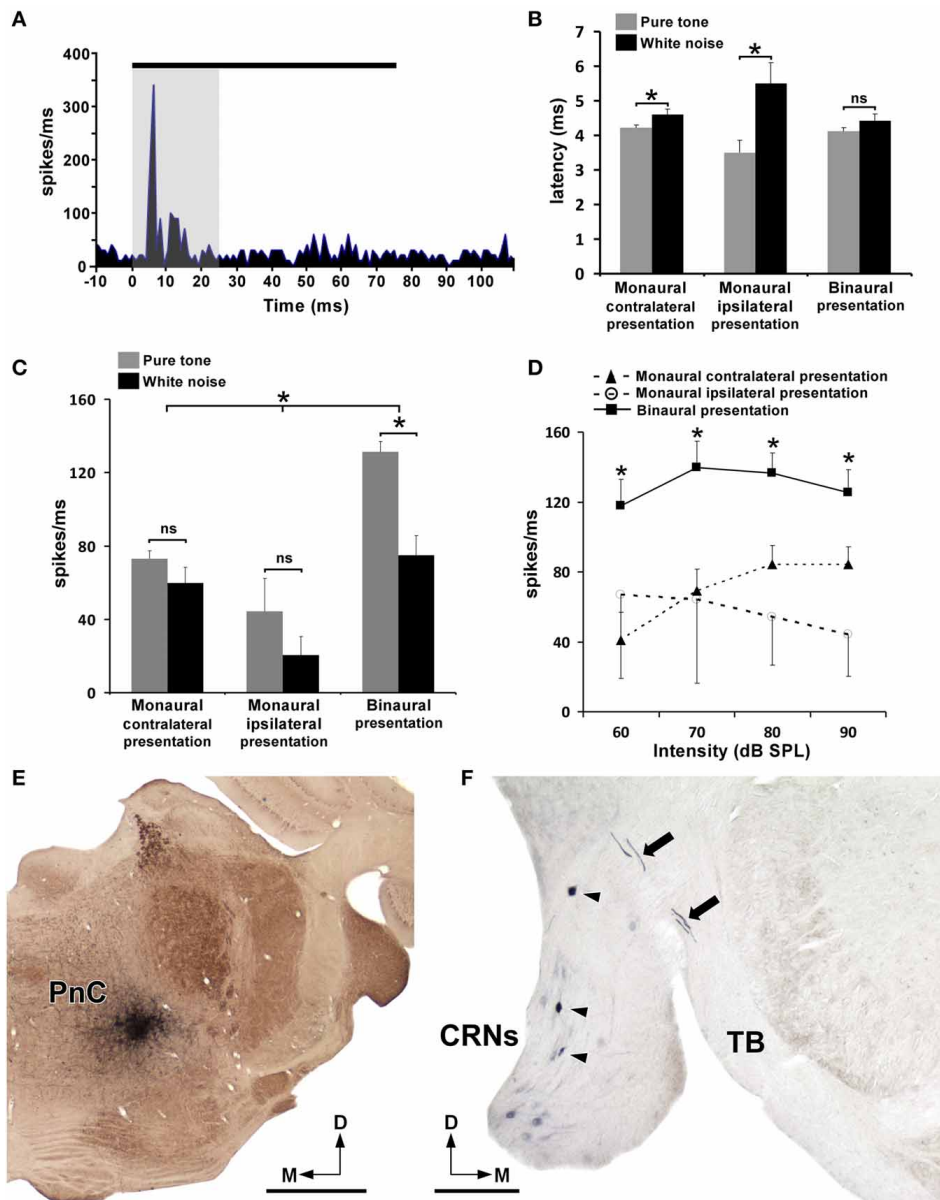


FIGURE 5 | Electrophysiological responses of PnC neurons to contra-, ipsi-, and bilateral acoustic stimulations. (A) PST histogram shows the PnC neuronal activity (spikes/ms) evoked by noise bursts of 90 dB SPL and 75 ms duration (black line) delivered contralaterally to the recording site. Notice that the mean first spike latency is very short (4.39 ± 0.12 ms). The shadow area displays the integration window (first 25 ms after stimuli presentation) used to calculate the firing rate. **(B)** Histogram shows mean spike latencies of PnC neurons after contra-, ipsi-, and bilateral acoustic stimulations with noise bursts and pure tones. Notice that the spike latencies are shorter following pure tone than noise burst stimulations, with significant differences when stimuli were presented monaurally (both contra- and ipsilateral to the recording site). No significant difference (ns) was found after binaural presentations. Bars represent mean values and SEM, * [contralateral presentation, $F_{(1,216)} = 4.399$, $p = 0.037$; ipsilateral presentation, $F_{(1,216)} = 8.137$, $p = 0.005$]. **(C)** Histogram shows the mean firing rate (spikes/ms) of PnC neurons within the first 25 ms after contra-, ipsi-, and bilateral acoustic

stimulations with noise bursts and pure tones. Binaural presentations showed significantly higher firing rates than monaural [*], $F_{(2,216)} = 14.852$, $p = 0.000$). Significant differences were found between noise bursts and pure tones following binaural presentations [*], $F_{(2,216)} = 4.037$, $p = 0.019$], whereas no significant differences (ns) were found in monaural presentations. Bars represent mean values and SEM. **(D)** Firing rate-intensity function of PnC neurons in response to pure tones following contra-, ipsi-, and bilateral stimulus presentations. Binaural presentations showed significant differences with monaural presentations (both contra- and ipsilateral to the recording site) for tones of 60, 70, 80, and 90 dB SPL. Data points represent the means with SEM, [*], $F_{(6,216)} = 3.014$, $p = 0.015$]. **(E)** Low magnification micrograph shows a representative case of a recording site labeled with BDA. **(F)** Micrograph shows CRNs retrogradely labeled with BDA (arrowheads) after the injection site shown in **(E)**. Notice thick BDA-labeled axons of CRNs in the trapezoid body (TB, arrows). CRNs, cochlear root neurons; PnC, caudal pontine reticular nucleus. Scale bars = 1 mm in **E**; 200 μ m in **F**.

or noise bursts evoked higher responses when they were presented binaurally than when delivered monaurally. Significant differences were also found between pure tone and noise burst stimulations following binaural presentations, whereas monaural presentations showed no significant differences (Figure 5C). We further studied the neuronal activity of PnC neurons by presenting contra-, ipsi-, and bilateral pure tones at many intensities (Figure 5D). With contralateral presentations of the tones, we observed a greater increase in firing rates with increasing stimulus intensity. In contrast, this effect of the intensity was not observed with ipsilateral presentations of the tones (Figure 5D). For all the intensities tested, the firing rate was significantly greater with binaural than with monaural presentations (Figure 5D). In all the experiments, the bilateral evoked responses in PnC were almost equal to the sum of the contralateral and ipsilateral evoked responses, suggesting the existence of a binaural summation process (Figures 5C,D). To identify the origin of short-latency acoustic inputs to the acoustically driven area of PnC, we injected BDA at the end of each experiment. The BDA injections were small (~0.3 mm), round in shape, and restricted to ventrocaudal regions of the PnC (Figure 5E, see also Supplemental Figures 2, 3). In all cases, we found BDA-labeled axons in the TB that emerged from retrogradely labeled CRNs (Figure 5F). The number of BDA-labeled neurons located on the contralateral cochlear root nucleus (75.6%) was considerably higher than on the ipsilateral nucleus (24.4%). This result indicates that CRNs provide short latency acoustic inputs to PnC with a clear contralateral preference. Because BDA is an effective bidirectional pathway tracer (Rajakumar et al., 1993), we also observed retrogradely labeled neurons and anterogradely labeled terminals in the PnC contralateral to the recording/injection site (Supplemental Figures 2, 3). The labeled fibers from PnC neurons of the right side crossed the midline and enter into the opposite (left) reticular formation giving off BDA-labeled terminals onto retrogradely labeled PnC neurons (Supplemental Figures 2, 3). This result supports the idea that reciprocal connections might exist between the left and right PnC. In cases with slightly larger injections, we also found very few neurons retrogradely labeled by BDA in the DCN and VCN (Supplemental Figure 4). However, the number of retrogradely labeled neurons in the DCN and VCN was considerably less than those labeled in the cochlear root nucleus (see table in Supplemental Figure 4).

BDA INJECTIONS IN THE DORSAL AND VENTRAL COCHLEAR NUCLEUS

The results described above indicated that acoustically driven PnC neurons receive bilateral, but mainly contralateral, inputs from CRNs. However, the presence of very few retrogradely labeled neurons in other areas of the cochlear nucleus complex led us to investigate whether these regions innervate PnC neurons. This was done by injecting BDA into the left DCN and VCN. All injection sites of BDA in the DCN and VCN were restricted to the corresponding nucleus and did not spread to adjacent areas of the cochlear nucleus complex (Figures 6A, 7A). BDA injections in the DCN were small (0.5–0.7 mm in diameter) and round in shape (Figure 6A). To check the efficiency of BDA injections in the DCN, we analyzed the distribution of

anterograde labeling in nuclei that are well known to receive DCN inputs (Cant and Gaston, 1982; Malmierca et al., 2002; Cant and Benson, 2003). Our material showed BDA-labeled fibers and terminals in the contralateral DCN (Figure 6B), the ipsilateral (data not shown) and contralateral VCN (Figure 6C), the contralateral IC (Figure 6D), and the contralateral medial geniculate body (Figure 6E). We also observed thin and thick labeled fibers of approximately 0.7 and 2.8 μm in diameter, respectively, in the pontine reticular formation (Figures 6F,G). We examined both type of BDA-labeled fibers and found that they do not innervate giant PnC neurons (Figure 6G). Due to the bidirectional nature of the transport of the BDA, the cochlear nerve terminals that innervate DCN neurons uptake the tracer and filled retrogradely cochlear nerve fibers (Supplemental Figure 5). We followed these retrogradely labeled fibers and found that they innervate CRNs somata in a similar pattern than that observed in our HRP injections in the basal coil of the cochlea (for comparisons see Figures 2A1–A4 and Supplemental Figure 5). In cases with BDA injection in the VCN, we obtained small (0.3–0.8 mm in diameter) and slightly elongated injection sites (e.g., in Figure 7A). These injections generated anterograde labeling in nuclei that are known to be targeted by VCN projecting neurons (Cant and Gaston, 1982; Friauf and Ostwald, 1988; Doucet and Ryugo, 1997, 2003; Cant and Benson, 2003). Thus, we observed a thin band of axons and swellings in the ipsilateral lateral superior olive (Figure 7A2) as well as BDA-labeled terminals in the contralateral medial nucleus of the TB (Figure 7B), the contralateral DCN (Figure 7C), and the contralateral anteroventral cochlear nucleus (Figure 7D2). In the reticular pontine formation, we found BDA-labeled fibers that passed in close proximity to giant PnC neurons, but without giving off any terminal fields (Figure 7D1). In sum, these track-tracing experiments suggest that other areas of the cochlear nucleus complex are not likely to innervate PnC neurons.

THE ACOUSTIC STARTLE REFLEX IN RATS WITH MONAURAL SOUND-DEPRIVATION

Our electrophysiological and morphological studies indicated the existence of a binaural summation process in the neuronal activity of PnC neurons that receive acoustic inputs from CRNs. To determine whether these results are consistent with the binaural summation of the behavioral response, we investigated the ASR in rats prior to and following monaural earplugging. By plugging the sound reaching from one ear, the acoustic inputs to the CRNs in the right was reduced, and hence affected the bilateral afferent processing within the ASR pathway. Changes of the ASR amplitude for each intensity of the stimulus (noise bursts of 95, 105, and 115 dB SPL) are shown in Figure 8A and Supplemental Figure 6. In general, an increase of the acoustic stimulus intensity resulted in a proportional increase of the ASR amplitude. As compared to controls animals, we observed that the ASR amplitude was significantly lower in monaural earplugged rats [$F_{(1,12)} = 6.32$; $p = 0.04$]. A similar reduction was found when compared the experimental group prior to and following monaural earplugging, showing significant differences in the tested range of stimulus intensity [$F_{(5,6)} = 8.45$; $p = 0.008$]. On the contrary, there were no significant differences in ASR amplitude between control and

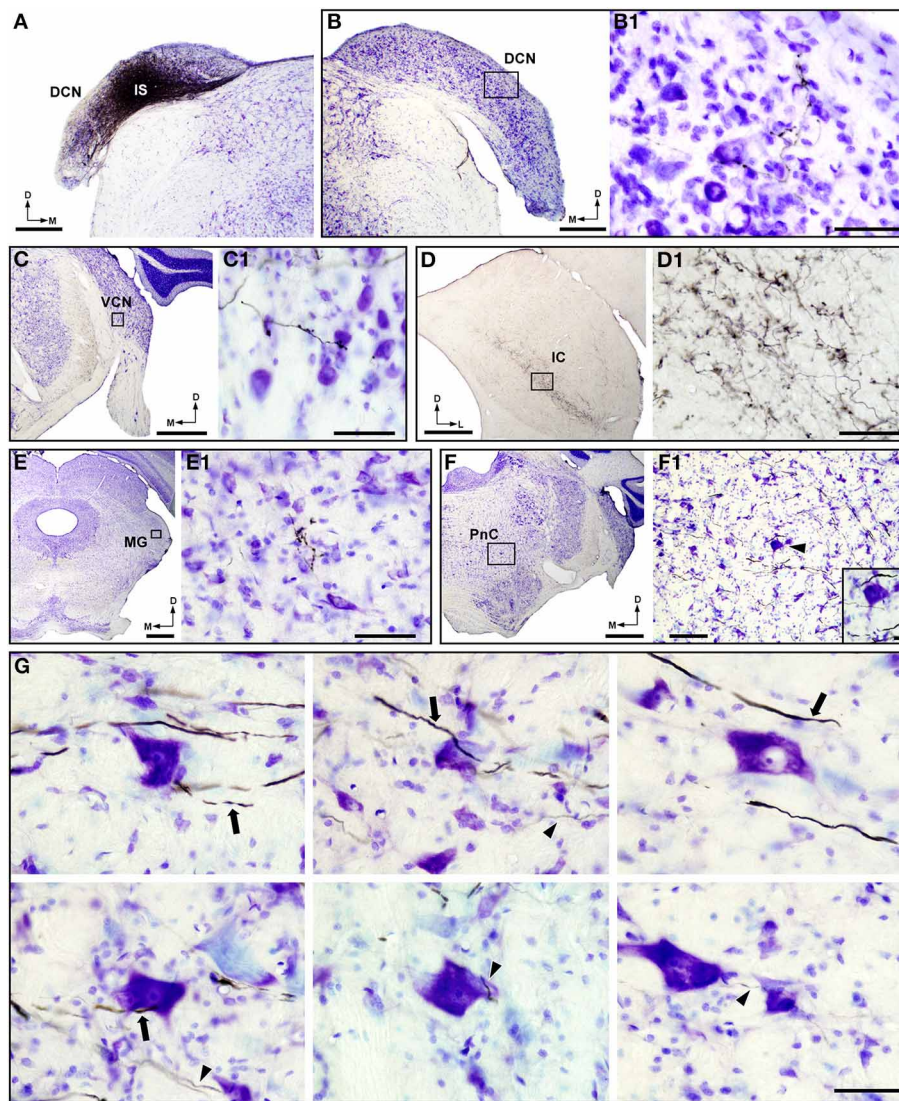


FIGURE 6 | BDA injections in the dorsal cochlear nucleus (DCN) do not generate labeled terminals on giant neurons of the caudal pontine reticular nucleus (PnC). (A) Micrograph of a Nissl-stained coronal section shows a BDA injection site (IS) in the DCN. (B–E) Micrographs of the contralateral DCN (B), the contralateral ventral cochlear nucleus (VCN; C), the contralateral inferior colliculus (IC; D) and the contralateral medial geniculate body (MG; E) show anterograde labeling after the BDA injection shown in (A). (B1–E1) Higher magnification corresponding to the frames in (B–E) respectively, shows details of BDA-labeled terminals in those nuclei. (F)

Nissl-stained section of the contralateral PnC shows axons labeled with BDA crossing the pontine reticular formation (see higher magnification in F1). The F1 inset (position denoted by an arrowhead) shows the absence of labeled terminals on a giant PnC neuron. (G) High magnification micrographs show representative examples of thick and thin BDA-labeled axons (denoted by arrows and arrowheads, respectively) crossing the caudal pontine reticular formation. Notice that DCN projecting axons do not give off endings onto Nissl-stained PnC neurons. Scale bars = 500 μm in A and B; 50 μm in B1, C1, D1, E1, and G; 1 mm in C–F; 200 μm in F1; 25 μm in the F1 inset.

pre-earplugged animals (Figure 8A). We also found no significant differences in ASR latency between normal hearing (control and pre-earplugged animals) and monaural earplugged conditions at all stimulus intensities tested (Supplemental Figure 6). As a histological control, c-Fos immunoreactivity in the IC was assessed to check the efficiency of the monaural earplugging (Figures 8B–E). In the contralateral plugged side, the number of c-Fos immunolabeled neurons was significantly less in earplugged rats than in controls ($p < 0.05$), whereas a similar number of neurons were observed in the ipsilateral side (Figure 8B). When the

ipsi- and contralateral sides to the earplugging were compared, the contralateral side showed a comparative largest decrease in c-Fos immunolabeling (Figures 8C–E). This indicates that the earplug attenuated the sound from reaching the right ear, and hence, reduced the neuronal activity of the contralateral auditory pathway including the left IC (Figures 8C–E). In sum, we showed that the ASR amplitude was higher when the acoustic startling stimulus was processed binaurally than when it was processed monaurally, indicating that there is a strong summation for ASR. Comparing the electrophysiological and behavioral experiments,

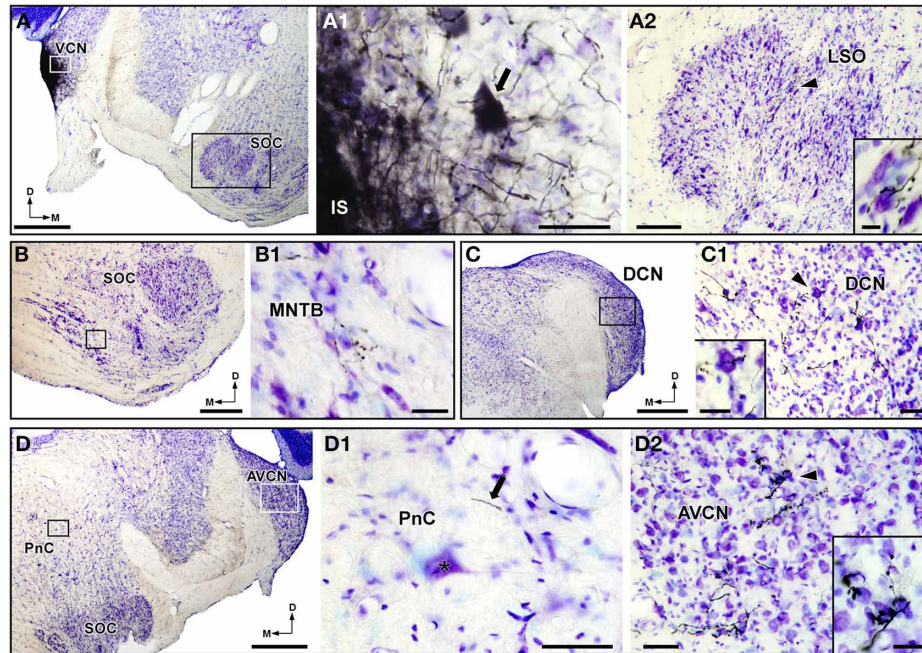


FIGURE 7 | BDA injections in the ventral cochlear nucleus (VCN) do not generate labeled terminals on giant neurons of the caudal pontine reticular nucleus (PnC). (A) Micrograph of a Nissl-stained coronal section shows a case with BDA injections in the VCN. (A1) A higher magnification (corresponding to the white frame in A) shows a labeled VCN projection neuron (arrow) in the proximity of the BDA injection sites (IS). (A2) Nissl-stained section of the ipsilateral lateral superior olive (LSO), corresponding to the black frame in (A), shows the characteristic projection pattern of VCN neurons. The inset in (A2) (position denoted with an arrowhead) illustrates a higher magnification of BDA-labeled terminals in the LSO. (B,C) Micrographs of the contralateral medial nucleus of the trapezoid body (MNTB; B) and the contralateral dorsal cochlear nucleus (DCN; C) show anterograde labeling after the BDA injections shown in (A). (B1–C1) Higher

magnification of BDA-labeled terminals corresponding to the frame in (B,C), respectively. The inset in (C1) (position denoted with an arrowhead) illustrates a higher magnification of BDA-labeled terminals on a Nissl-stained DCN neuron. (D) Micrograph of a Nissl-stained section containing the contralateral PnC and the anteroventral cochlear nucleus (AVCN). (D1) High magnification (corresponding to the black frame in D) shows the absence of labeled terminals on PnC neurons (asterisk). Note that labeled fibers (arrow) do not give off terminals. (D2) High magnification (corresponding to the white frame in D) shows anterograde labeling in the contralateral AVCN. The inset in (D2) (position denoted with an arrowhead) illustrates details of BDA-labeled terminals on Nissl-stained AVCN neurons. SOC, superior olivary complex. Scale bars = 1 mm in A, C, and D; 50 μ m in A1, C1, D1, and D2; 200 μ m in A2; 10 μ m in A2 inset; 500 μ m in B; 25 μ m in B1 and insets of C1 and D2.

we found that the reduction of PnC neurons' responses after monaural acoustic stimulation is consistent with the reduction in the ASR amplitude following the monaural sound-deprivation (for comparisons see Figures 5D, 8A).

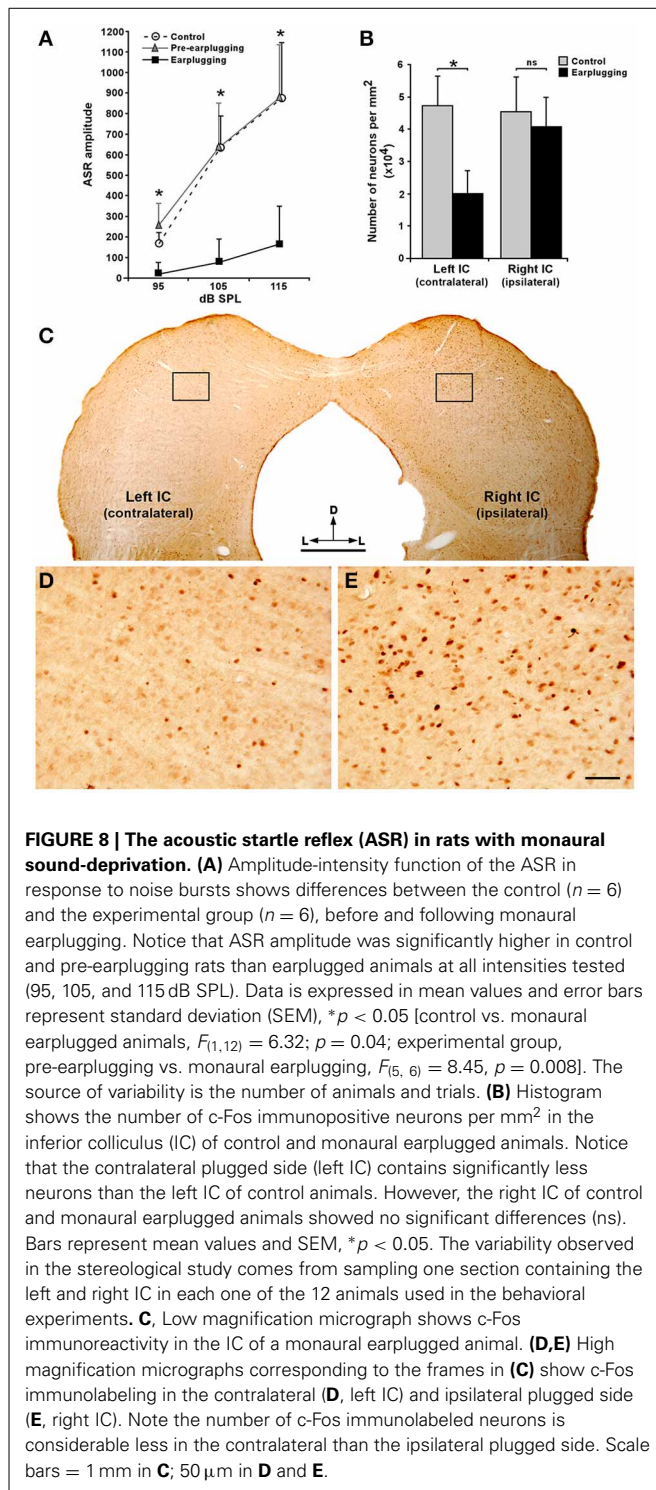
DISCUSSION

In this study, we showed key morphofunctional aspects of the ASR primary neuronal circuit. In the first central relay station, we found that dendrites and cell bodies of CRNs receive selective inputs from specific regions of the cochlea. We also verified that these cochlear nerve inputs are immunopositive for VGLUT1 as occurs in other areas of the cochlear nucleus complex (Zhou et al., 2007; Gómez-Nieto and Rubio, 2009). In the second central relay station, we demonstrated that the short-latency acoustic inputs to PnC neurons are provided mainly, if not exclusively, by CRNs. Our electrophysiological results indicated that there is a strong binaural summation in the neuronal activity of PnC neurons which can be linked to the bilateral projections from the cochlear root nucleus to the PnC (López et al., 1999; Nodal and López, 2003). Finally and accordingly with our electrophysiological findings, we showed that the overall response of the behavioral

paradigm is higher when the acoustic startling stimulus is processed binaurally than when processed monaurally. Our study clearly supports that the functional connections of the cochlear root nucleus with PnC constitutes the neuronal bases underlying the rapid short-latency and binaural summation of the ASR.

TONOTOPIC-SPECIFIC DISTRIBUTION THROUGH THE CELL BODY AND DENDRITES OF CRNs

Alerting and escape behaviors have high dependence on the frequency of sounds, which are of great importance in the life of rodents. For example, rats emit ultrasounds in the frequency range between 18 and 30 kHz in response to a threatening stimulus (predator exposure), and hence, serve as alarm calls to specifically warn other individuals (Cuomo and Cagiano, 1987; Blanchard et al., 1991). CRNs provide acoustic information to a wide variety of non-auditory nuclei involved in the startle reflex, orientation of head and ears toward a novel sound, vocalization, emotional information, and escape (López et al., 1999; Nodal and López, 2003; Horta-Júnior et al., 2008). Since these sensory events and escape behaviors are initially mediated by CRNs (Lee et al., 1996; López et al., 1999), it is likely that



CRNs receive selective inputs from specific regions of the cochlea. Our HRP injections in apical and basal coils of the cochlea indicated that the cell body and dendrites of CRNs are preferentially innervated by different portions of the cochlea. Fibers from basal, high frequency parts of the cochlea, terminated preferentially on the cell body whereas those from more apical, low frequency parts of the cochlea, mainly terminated on dendrites.

These qualitative observations are in agreement with Osen et al. (1991) studies, which showed that the base of the cochlea is the source of most primary inputs to CRNs somata. Our study further demonstrated that dendrites of CRNs, which are quite extensive, are highly innervated by cochlear nerve inputs. The technical challenge of labeling dendrites of CRNs while analyzing the primary afferents might explain why this result was not shown in our previous reports (Merchán et al., 1988; Osen et al., 1991; López et al., 1993). In the present study, the experimental approach designed by Gómez-Nieto and Rubio (2009) combining two neuronal tracers, D-FICT in the TB and DiI in the cochlear nerve root, allowed us to confirm that CRNs dendrites also receive cochlear nerve inputs. The frequency-specific distribution described in our study provides an explanation for the frequency tuning curves observed in extracellular recordings of CRNs (Sinex et al., 2001; Gómez-Nieto et al., 2013). Thus, our results showed that CRNs somata and primary dendrites receive massive high-frequency inputs that might be responsible for the high characteristic frequency of CRNs (~ 30 kHz). Since the basal regions of the cochlea have also the shortest latencies, these might provide a specialization to minimize the response latency in CRNs (Sinex et al., 2001). Furthermore, it is interesting to point out that CRNs responded to a frequency range from 1.5 to 40 kHz that is nearly the entire audiogram of the rat (Kelly and Masterton, 1977; Sinex et al., 2001), which is in line with our observations showing high and mostly low frequency inputs on CRNs dendrites. Our data together with the fact that the synaptic strength becomes larger as one moves along the dendrite (Spruston, 2000; London and Segev, 2001) suggest that CRNs, which are high frequency specialized neurons, might also integrate a wide range of frequencies in their dendrites.

RAPID GLUTAMATERGIC TRANSMISSION IN THE COCHLEAR ROOT NUCLEUS

The ASR behavioral paradigm is defined by its rapid and short latency reflex actions (Szabo, 1964; Hoffman and Ison, 1980). For that, CRNs have specific morphological, physiological and neurochemical properties that provide them the capacity of mediating fast and secure neurotransmission of short-latency auditory cues (López et al., 1993, 1999; Sinex et al., 2001). An important outcome of our study was to demonstrate that cochlear nerve inputs on CRNs colabeled with VGLUT1. This result together with the fact that VGLUT1 terminals massively covered CRNs on the z axis (Gómez-Nieto et al., 2008b; see also our results) indicates that auditory nerve terminals on CRNs are far more numerous than reported in previous studies (Merchán et al., 1988). Since cochlear nerve fibers use glutamate as neurotransmitter (Hackney et al., 1996; Rubio and Juiz, 2004; Rubio, 2006), VGLUT1 might contribute to the synaptic efficacy by regulation of vesicle cycling and filling (Wilson et al., 2005). Furthermore, the relatively low affinity for their substrate allows the VGLUT1 to transport large amounts of glutamate more rapidly (Bergles and Edwards, 2008). Thus, our results showed that CRNs somata and dendrites are fully covered by VGLUT1-cochlear nerve terminals which provide a great speed on synaptic signaling in the first component of the ASR circuit. This VGLUT1-cochlear nerve colabeling has

been also found on bushy cells of the VCN (Gómez-Nieto and Rubio, 2009), a neuronal type that encodes features of the acoustic waveform and conveys precise temporal information to upper auditory structures (Friauf and Ostwald, 1988; Cant and Benson, 2003). VGLUT1 terminals on CRNs (ASR pathway) and bushy cells (auditory pathway) exhibit an altered morphology in mice with targeted deletion of the gene coding for the auxiliary subunit $\alpha_2\delta_3$ of voltage-gated calcium channels (Pirone et al., 2014). Both neuronal types express the $\alpha_2\delta_3$ subunit and its lack lead to neuronal deficits in the auditory and the ASR pathway, including the inability to discriminate temporal dimensions of sounds (Pirone et al., 2014). Thus, CRNs might provide fast acoustic information with accurate temporal precision to the ASR pathway just as bushy cells do for the ascending auditory pathway. This idea is in line with our findings that support the CRNs-PnC projection as the neuronal pathway underlying the binaural summation of the ASR (discussed below).

ORIGIN OF SHORT-LATENCY ACOUSTIC INPUTS TO PnC NEURONS

A conclusive demonstration that one nucleus is not innervated by another is difficult to accomplish in any region of the central nervous system. This became more difficult if that nucleus, as occurs in PnC, receives a large number of inputs and contains numerous crossing fibers. Bearing this argument in mind, our study provided evidence that supports the CRNs as the sole source of short-latency acoustic inputs to giant PnC neurons. Our electrophysiological experiments with subsequent neuronal tracing showed retrogradely labeled CRNs after recording acoustically driven PnC neurons. This result is consistent with our previous reports that demonstrated the projections from the cochlear root nucleus to PnC neurons (López et al., 1999; Nodal and López, 2003). In addition, our BDA injections in PnC also generated very few retrogradely labeled neurons in the DCN and VCN, which in principle suggests that other areas of cochlear nucleus complex might provide short-latency acoustic inputs to PnC as proposed by other studies (Davis et al., 1982; Kandler and Herbert, 1991; Lingenhöhl and Friauf, 1994; Meloni and Davis, 1998). Lingenhöhl and Friauf (1994) reported retrogradely labeled somata in DCN and VCN after injecting a pure retrograde tracer (FluoroGold) in PnC. By contrast, our restricted BDA injections into the DCN and VCN were unable to demonstrate the connection of these two areas with giant PnC neurons. Although we filled a great number of DCN and VCN projecting neurons, as shown by the labeled terminal fields in many nuclei known to receive innervations from the DCN and VCN (reviewed in Cant and Benson, 2003), we did not find any terminal fields on PnC neurons. A possible explanation for these contradictory results is that DCN and VCN neurons were retrogradely labeled after tracer injections in PnC as a consequence of the tracer uptake by fibers of passage rather than by terminals on PnC neurons. This idea seems to be consistent with previous studies reporting that DCN and VCN projections to PnC were very weak, and not as dense as those from the cochlear root nucleus (Friauf and Ostwald, 1988; Kandler and Herbert, 1991; Meloni and Davis, 1998). In accordance with this morphological data, behavioral studies showed that chemical lesions of CRNs drastically reduced the startle response at all intensities (Lee et al., 1996), whereas

electrolytic lesions of the DCN did not (Davis et al., 1982; Meloni and Davis, 1998). Meloni and Davis (1998) found that electrolytic lesions of the DCN lead to a significant reduction in ASR amplitude at 110 and 115 dB SPL startle-eliciting intensities and normal responses on all other intensities. Interestingly, one finding of our BDA injections in DCN was that some auditory nerve terminals on CRNs and DCN neurons arise from the same parent auditory nerve fiber. According to this, electrolytic lesions of the DCN might damage auditory nerve terminals on CRNs, and might reduce the ASR amplitude at high intensities. It is well established that auditory nerve fibers that reach the dorsal part of the cochlear nucleus complex originated from the basal coils (high-frequency) of the cochlea (Saint Marie et al., 1999). Thus, our BDA injections in the dorsal part of the DCN generated retrograde labeled terminals on the cell body of CRNs in a similar pattern than that observed in our HRP injections in the basal coil of the cochlea. This result verifies the tonotopic-specific distribution through the cell body and dendrites of CRNs and suggests that both CRNs and DCN neurons receive similar acoustic information. DCN projects to the IC (Beyerl, 1978; Oliver and Shneiderman, 1991; Oliver et al., 1999; Cant and Benson, 2003), which is known to participate in the modulation of the ASR (Leitner and Cohen, 1985; Fendt et al., 2001; Yeomans et al., 2006; Gómez-Nieto et al., 2008a, 2013). It is, therefore, likely that DCN might provide acoustic information to ASR modulation pathways rather than being necessary for the initiation and elicitation of the ASR.

NEURONAL BASES UNDERLYING BINAURAL SUMMATION OF THE ACOUSTIC STARTLE REFLEX

Our electrophysiological data showed that PnC neurons, which are innervated by CRNs, responded with very short spike latencies to noise bursts. The fact that sounds that contain every frequency activate PnC neurons is consistent with our hypothesis that frequency integration occurs in CRNs dendrites, and implies that CRNs provide precise and rapid acoustic information to PnC neurons. Our previous studies reported that CRNs have thick myelinated axons and contain calcium binding proteins that confer to the cochlear root nucleus the necessary specializations for sending fast electric signals to PnC (López et al., 1993, 1999). Accordingly, more recent studies have demonstrated that proteins such as the potassium channel subunit Kv1.1 and the transcription factor Math5-lacZ are highly expressed in CRNs (Oertel et al., 2008; Saul et al., 2008). These proteins have been found to participate in fast neurotransmission, temporal synchrony, and processing of binaural information (Saul et al., 2008; Allen and Ison, 2012). Consistently with the molecular specializations of CRNs, an important conclusion that we draw from our electrophysiological experiments is that the CRNs-PnC projections determine the binaural summation of the ASR. This phenomenon of binaural summation provides that the startling stimulus presented to both ears is perceived as more intense than if it were presented in monaural mode. Therefore, there is strong binaural summation for startle, with a preference for acoustic stimuli delivered near the midline to activate both ears simultaneously (reviewed in Yeomans et al., 2002). Accordingly, we showed that the binaural evoked responses of PnC neurons were almost the

sum of those evoked monaurally. The fact that the bilateral CRNs-PnC projections have a clear contralateral predominance (López et al., 1999; Nodal and López, 2003) might explain our result showing higher PnC neurons' responses evoked with contralateral than ipsilateral acoustic stimulations. Our electrophysiological analysis also revealed that PnC neurons' responses increased as the contralateral stimulus intensity increases, a result which is in line with our behavioral data and the contralateral predominance of the CRNs-PnC pathway. Wagner et al. (2000) suggested that the superior olivary complex, which is involved in binaural processing, is necessary for the full expression of the ASR. However, the possibility that neuronal circuits beyond the cochlear nucleus complex contribute to the binaural summation of the ASR seems very limited. The ASR mediated via the superior olivary complex involves too many synapses to accomplish the short latency of the ASR, and this led us to restrict the binaural summation to the CRNs-PnC pathway. In accordance with two reports in rats (Lingenhöhl and Friauf, 1994) and cats (Walberg, 1974), our study suggests the existence of reciprocal connections between the left and right PnC, which need to be accounted for the final evoked response of PnC neurons. Further research is required to learn more about these crossed reticulo-reticular connections and their possible functional role in the ASR. It is also relevant to note that our electrophysiological results were consistent with our behavioral experiments showing that the ASR amplitude was higher when the acoustic startling stimulus was processed binaurally than when it was processed monaurally. We came to this conclusion comparing the behavioral response of the control animals with that of monaural earplugged animals. Therefore, it was essential in this experimental design to verify the effectiveness of the earplugging. Since c-Fos protein has been widely used as a marker of early neuronal activation (Sagar et al., 1988; Dragunow and Faull, 1989; Murphy and Feldon, 2001), we quantified the c-Fos immunolabeling in the IC. The IC was selected for c-Fos quantification because it is an obligatory relay center for most ascending auditory tracts (Beyerl, 1978; Oliver and Shneiderman, 1991) and plays an important role in the prepulse inhibition of the ASR (Leitner and Cohen, 1985; Fendt et al., 2001; Li and Yue, 2002; Yeomans et al., 2006; Gómez-Nieto et al., 2008a, 2013). Our results showed that the number of c-Fos immunolabeled neurons in the contralateral IC was drastically reduced by the earplugging. This reduction was not found in the ipsilateral side to the earplugging because the IC receives auditory inputs from the contralateral cochlear nucleus (Beyerl, 1978; Oliver and Shneiderman, 1991). Since monaural conductive hearing loss reduces auditory nerve activity and affects sound processing along the central auditory pathway (Potash and Kelly, 1980), the reduction of c-Fos immunoreactivity in the IC indicates that bilateral afferent processing within the ASR pathway was affected by the earplugging. As expected by Davis and Wagner (1969) report, we found that the ASR amplitude increased with increasing stimulus intensity in control and pre-earplugged animals. In contrast, earplugged animals showed much less ASR amplitude, suggesting that the binaural ASR pathway is required to elicit a full startling response. Our study suggests the CRNs-PnC pathway as an anatomical and physiological specialization that determines the binaural summation of the

ASR. Since CRNs also projects to non-auditory nuclei involved in other startling reflex modalities (López et al., 1999; Horta-Júnior et al., 2008), it is reasonable to propose that the CRNs projections might also participate in cross-modal summation of the ASR (Yeomans et al., 2002). In conclusion, our study consolidates the CRNs as the "early warning system" responsible for the execution and propagation of bilateral acoustic startling signals at very short latencies, and that is what defines the ASR in itself.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sonia Hernández and David Sánchez for excellent technical assistance in the quantitative analyses of c-Fos immunoreactivity. This research was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN, #BFU2010-17754) to Dr. Dolores E. López; the São Paulo State Research Foundation (FAPESP, #2008/02771-6) to Dr. José de Anchieta C. Horta-Júnior; and the 1R01DC013048-01 to Dr. María E. Rubio.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fnins.2014.00216/abstract>

Supplemental Figure 1 | Distribution of VGLUT1-immunolabeled endings in the cochlear root nucleus. (A) Epi-fluorescence micrograph of a coronal section shows VGLUT1-immunolabeled endings (Cy3 fluorochrome) in the cochlear root nucleus. **(B–E)** Epi-fluorescence micrographs of the boxed areas in **(A)** show distribution of VGLUT1-immunolabeled endings from dorsal to ventral regions of the cochlear root nucleus. Note that numerous VGLUT1-immunolabeled endings decorate unlabeled cell bodies (arrows) and dendrites (arrowheads) of cochlear root neurons (CRNs). TB, trapezoid body. Scale bars = 200 μ m in **A**; 25 μ m in **B–E**.

Supplemental Figure 2 | BDA injections in the caudal pontine reticular nucleus (PnC) generate anterograde and retrograde labeling in the contralateral PnC. (A) Low magnification micrograph of a coronal section of the brainstem shows a representative case with BDA injection sites (IS) in the right PnC. The tracer was injected after recording of acoustically driven PnC neurons. Notice numerous BDA-labeled axons (arrowheads) crossing the midline toward the contralateral PnC. Also, thick axons of cochlear root neurons (position denoted with an arrow) were retrogradely labeled with BDA in the trapezoid body (TB). **(B)** Higher magnification corresponding to the frame in **(A)** shows details of BDA-labeled terminals onto retrogradely labeled giant PnC neurons (arrows). Scale bars = 1 mm in **A**; 200 μ m in **B**.

Supplemental Figure 3 | Reciprocal connections between the left and right caudal pontine reticular nuclei (PnC). (A) Micrograph of a Nissl-stained coronal section shows a BDA injection site (IS) in the right PnC. The tracer was injected after recording of acoustically driven PnC neurons. Arrowheads indicate crossed reticulo-reticular projections labeled with BDA. Also, thick axons of cochlear root neurons (position denoted with an arrow) were retrogradely labeled with BDA in the trapezoid body (TB). **(B,C)** Higher magnification corresponding to the frames in **(A)** shows details of BDA-labeled terminals (arrowheads) onto Nissl-stained giant PnC neurons. Notice a PnC neuron retrogradely labeled by BDA (asterisk in **C**). Scale bars = 1 mm in **A**; 25 μ m in **B** and **C**.

Supplemental Figure 4 | Retrograde labeling in the cochlear nucleus complex after BDA injections in the acoustically driven area of the caudal pontine reticular nucleus (PnC). (A) High magnification micrograph shows a coronal section of the contralateral dorsal cochlear nucleus (DCN) in which a BDA-retrogradely labeled neuron (arrow) was found after the injection site shown in **Supplemental Figure 2A**. (B) High magnification micrograph shows a BDA-retrogradely labeled neuron (arrow) in the contralateral ventral cochlear nucleus (VCN). (C) Quantitative distribution of retrogradely labeled neurons in the cochlear nucleus complex after BDA injections in the acoustically driven area of PnC. The table shows the retrograde labeling obtained in the seven cases used in the electrophysiological experiments. Notice that the number of retrogradely labeled neurons in the DCN and VCN is considerably less than those labeled in the cochlear root nucleus. Scale bar = 200 μm in **A** and **B**.

Supplemental Figure 5 | BDA injections in the dorsal cochlear nucleus (DCN) generate retrogradely labeled terminals on the cell body of cochlear root neurons (CRNs). (A) Nissl-stained coronal section of the cochlear root nucleus shows retrogradely labeled fibers after the BDA injections shown in **Figure 6A**. (B) Higher magnification corresponding to the frame in **A** shows details of BDA-labeled terminals (arrowheads) on CRNs somata. Notice that the morphology and distribution of these BDA-labeled terminals resemble those of the cochlear nerve after HRP injections in the basal coil of the cochlea (see **Figures 2A1–A4**). VCN, ventral cochlear nucleus. Scale bars = 400 μm in **A**; 50 μm in **B**.

Supplemental Figure 6 | ASR amplitude, ASR latency and weight in rats prior to and following monaural earplugging. (A) Histograms show the ASR amplitude in response to noise burst of 95, 105, and 115 dB SPL in rats before and following 4 days of monaural earplugging. Notice that ASR amplitude was significantly higher in normal hearing than following monaural earplugging at all intensities tested (95, 105, and 115 dB SPL). Data is expressed in mean values and error bars represent standard deviation (SEM), * $p < 0.05$ [experimental group, pre-earplugging vs. monaural earplugging, $F_{(5,6)} = 8.45$, $p = 0.008$]. (B) Data-set tables display the ASR amplitude (mean values of V_{max} within the testing session), ASR latency (mean values of T_{max} within the testing session) and weight of each animal in normal hearing conditions (pre-earplugging) and following monaural earplugging. There were no significant differences in the ASR latency between the normal hearing and earplugged conditions for all stimulus intensities tested. Notice the animals maintained their weight steady throughout the behavioral experiment.

REFERENCES

- Allen, P. D., and Ison, J. R. (2012). Kcna1 gene deletion lowers the behavioral sensitivity of mice to small changes in sound location and increases asynchronous brainstem auditory evoked potentials but does not affect hearing thresholds. *J. Neurosci.* 32, 2538–2543. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1958-11.2012
- Bergles, D. E., and Edwards, R. H. (2008). “The role of glutamate transporters in synaptic transmission,” in *Structural and Functional Organization of the Synapse*, eds W. Hell and M. D. Ehlers (New York, NY: Springer), 23–61. doi: 10.1007/978-0-387-77232-5_2
- Beyerl, B. D. (1978). Afferent projections to the central nucleus of the inferior colliculus in the rat. *Brain Res.* 145, 209–223. doi: 10.1016/0006-8993(78)90858-2
- Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Agullana, R., and Weiss, S. M. (1991). Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol. Behav.* 50, 967–972. doi: 10.1016/0031-9384(91)90423-L
- Błaszczak, J. W., and Tajchert, K. (1997). Effect of acoustic stimulus characteristics on the startle response in hooded rats. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 57, 315–321.
- Bruff, D. L., and Geyer, M. A. (1990). Sensorimotor gating and schizophrenia: human and animal model studies. *Arch. Gen. Psychiatry* 47, 181–188. doi: 10.1001/archpsyc.1990.01810140081011
- Caesar, M., Ostwald, J., and Pilz, P. K. D. (1989). Startle responses measured in muscles innervated by facial and trigeminal nerves show common modulation. *Behav. Neurosci.* 103, 1075–1081.
- Cant, N. B., and Benson, C. G. (2003). Parallel auditory pathways: projection patterns of the different neuronal populations in the dorsal and ventral cochlear nuclei. *Brain Res. Bull.* 60, 457–474. doi: 10.1016/S0361-9230(03)00050-9
- Cant, N. B., and Gaston, K. C. (1982). Pathways connecting the right and left cochlear nuclei. *J. Comp. Neurol.* 212, 313–326. doi: 10.1002/cne.902120308
- Castellano, O., Arji, M., Sancho, C., Carro, J., Riobobos, A. S., Molina, V., et al. (2013). Chronic administration of risperidone in a rat model of schizophrenia: a behavioural, morphological and molecular study. *Behav. Brain Res.* 242, 178–190. doi: 10.1016/j.bbr.2012.12.036
- Castellano, O., Moscoso, A., Riobobos, A. S., Carro, J., Arji, M., Molina, V., et al. (2009). Chronic administration of risperidone to healthy rats: a behavioural and morphological study. *Behav. Brain Res.* 205, 488–498. doi: 10.1016/j.bbr.2009.08.002
- Cuomo, V., and Cagiano, R. (1987). Ultrasonic vocalization in rodents: a new potential tool for detecting emotional and motivational changes produced by adverse treatments. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. B.* 185, 55–60.
- Davis, M. (1990). Animal models of anxiety based on classical conditioning: the conditioned emotional response (CER) and the fear-potentiated startle effect. *Pharmacol. Ther.* 47, 147–165. doi: 10.1016/0163-7258(90)90084-F
- Davis, M., Gendelman, D. S., Tischler, M. D., and Gendelman, P. M. (1982). A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies. *J. Neurosci.* 2, 791–805.
- Davis, M., and Sheard, M. H. (1974). Habituation and sensitization of the rat startle response: effects of raphe lesions. *Physiol. Behav.* 12, 425–431. doi: 10.1016/0031-9384(74)90120-6
- Davis, M., and Wagner, A. R. (1969). Habituation of startle response under incremental sequence of stimulus intensities. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 67, 486–492.
- Doucet, J. R., and Ryugo, D. K. (1997). Projections from the ventral cochlear nucleus to the dorsal cochlear nucleus in rats. *J. Comp. Neurol.* 385, 245–264.
- Doucet, J. R., and Ryugo, D. K. (2003). Axonal pathways to the lateral superior olive labeled with biotinylated dextran amine injections in the dorsal cochlear nucleus of rats. *J. Comp. Neurol.* 461, 452–465. doi: 10.1002/cne.10722
- Dragunow, M., and Faull, R. (1989). The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J. Neurosci. Methods* 29, 261–265. doi: 10.1016/0165-0270(89)90150-7
- Fendt, M., Li, L., and Yeomans, J. S. (2001). Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. *Psychopharmacology* 156, 216–224. doi: 10.1007/s002130100794
- Friauf, E., and Ostwald, J. (1988). Divergent projections of physiologically characterized rat ventral cochlear nucleus neurons as shown by intraaxonal injection of horseradish peroxidase. *Exp. Brain Res.* 73, 263–284. doi: 10.1007/BF00248219
- Furness, D. N., and Lawton, D. M. (2003). Comparative distribution of glutamate transporters and receptors in relation to afferent innervation density in the mammalian cochlea. *J. Neurosci.* 23, 11296–11304.
- Gómez-Nieto, R., Horta-Junior, J. A., Castellano, O., Herrero-Turrión, M. J., Rubio, M. E., and López, D. E. (2008b). Neurochemistry of the afferents to the rat cochlear root nucleus: possible synaptic modulation of the acoustic startle. *Neuroscience* 154, 51–64. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.01.079
- Gómez-Nieto, R., Horta-Junior, J. A., Castellano, O., Sinex, D. G., and López, D. E. (2010). “Auditory prepulse inhibition of neuronal activity in the rat cochlear root nucleus,” in *The Neurophysiological Bases of Auditory Perception*, eds E. A. López Poveda, A. R. Palmer, and R. Meddis (New York, NY: Springer), 79–90. doi: 10.1007/978-1-4419-5686-6_8
- Gómez-Nieto, R., and Rubio, M. E. (2009). A bushy cell network in the rat ventral cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 516, 241–263. doi: 10.1002/cne.22139
- Gómez-Nieto, R., Rubio, M. E., and López, D. E. (2008a). Cholinergic input from the ventral nucleus of the trapezoid body to cochlear root neurons in rats. *J. Comp. Neurol.* 506, 452–468. doi: 10.1002/cne.21554
- Gómez-Nieto, R., Sinex, D. G., Horta-Junior, J. D., Castellano, O., Herrero-Turrión, J. M., and López, D. E. (2013). A fast cholinergic modulation of the

- primary acoustic startle circuit in rats. *Brain Struct. Funct.* doi: 10.1007/s00429-013-0585-8. [Epub ahead of print].
- Gourevitch, G., and Hack, H. M. (1966). Audibility in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 62, 289–291. doi: 10.1037/h0023669
- Gundersen, H. J., Bendtsen, T. F., Korbo, L., Marcussen, N., Møller, A., Nielsen, K., et al. (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96, 379–394. doi: 10.1111/j.1699-0463.1988.tb05320.x
- Hackney, C. M., Osen, K. K., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., and Manjaly, G. (1996). Immunocytochemical evidence that glutamate is a neurotransmitter in the cochlear nerve: a quantitative study in the guineapig anteroventral cochlear nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 8, 79–91. doi: 10.1111/j.1460-9568.1996.tb01169.x
- Harrison, J. M., Warr, W. B., and Irving, R. E. (1962). Second order neurons in the acoustic nerve. *Science* 138, 893–895. doi: 10.1126/science.138.3543.893
- Hoffman, H. S., and Ison, J. R. (1980). Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implication for how the nervous system processes sensory input. *Psychol. Rev.* 87, 175–189.
- Horta-Júnior, J. A., López, D. E., Alvarez-Morujó, A. J., and Bittencourt, J.C. (2008). Direct and indirect connections between cochlear root neurons and facial motor neurons: pathways underlying the acoustic pinna reflex in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 507, 1763–1779. doi: 10.1002/cne.21625
- Ison, J. R., and McAdam, D. W., and Hammond, G. R. (1973). Latency and amplitude changes in the acoustic startle reflex of the rat produced by variation in auditory prestimulation. *Physiol. Behav.* 10, 1035–1039. doi: 10.1016/0031-9384(73)90185-6
- Kandler, K., and Herbert, H. (1991). Auditory projections from the cochlear nucleus to pontine and mesencephalic reticular nuclei in the rat. *Brain Res.* 562, 230–242. doi: 10.1016/0006-8993(91)90626-7
- Kelly, J. B., and Masterton, B. (1977). Auditory sensitivity of the albino rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 91, 930–936. doi: 10.1037/h0077356
- Koch, M. (1999). The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.* 59, 107–128. doi: 10.1016/S0301-0082(98)00098-7
- Koch, M., and Schnitzler, H. U. (1997). The acoustic startle response in rats—circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav. Brain Res.* 89, 35–49. doi: 10.1016/S0166-4328(97)02296-1
- Lang, P. J., Bradley, M. M., and Cuthbert, B. N. (1990). Emotion, attention, and the startle reflex. *Psychol. Rev.* 97, 377–395.
- Lee, Y., López, D. E., Meloni, E. G., and Davis, M. (1996). A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *J. Neurosci.* 16, 3775–3789.
- Lehmann, J., Pryce, C. R., and Feldon, J. (1999). Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in Wistar rats. *Behav. Brain Res.* 104, 113–117. doi: 10.1016/S0166-4328(99)00058-3
- Leitner, D. S., and Cohen, M. E. (1985). Role of the inferior colliculus in the inhibition of acoustic startle in the rat. *Physiol. Behav.* 34, 65–70. doi: 10.1016/0031-9384(85)90079-4
- Li, L., and Frost, B. J. (1996). Azimuthal sensitivity of rat pinna reflex: EMG recordings from cervicoauricular muscles. *Hear. Res.* 100, 192–200. doi: 10.1016/0378-5955(96)00119-0
- Li, L., and Yue, Q. (2002). Auditory gating processes and binaural inhibition in the inferior colliculus. *Hear. Res.* 168, 98–109. doi: 10.1016/S0378-5955(02)00356-8
- Lingenhöhl, K., and Friauf, E. (1994). Giant neurons in the rat reticular formation: a sensorimotor interface in the elementary acoustic startle circuit? *J. Neurosci.* 14, 1176–1194.
- London, M., and Segev, I. (2001). Synaptic scaling *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Neurosci.* 4, 853–855. doi: 10.1038/nn0901-853
- López, D. E., Merchán, M. A., Bajo, V. M., and Saldaña, E. (1993). “The cochlear root neurons in the rat, mouse and gerbil,” in *The Mammalian Cochlear Nuclei: Organization and Function*, eds M. A. Merchán, J. M. Juiz, D. A. Godfrey, and E. Mugnaini (New York, NY: Plenum Press), 291–301.
- López, D. E., Saldaña, E., Nodal, F. R., Merchán, M. A., and Warr, W. B. (1999). Projections of cochlear root neurons, sentinels of the auditory pathway in the rat. *J. Comp. Neurol.* 415, 160–174.
- Malmierca, M. S., Merchán, M., Henkel, C. K., and Oliver, D. L. (2002). Direct projections from the dorsal cochlear nucleus to the auditory thalamus in the rat. *J. Neurosci.* 22, 10891–10897.
- Marsh, R., Hoffman, H. S., and Stitt, C. L. (1973). Temporal integration in the acoustic startle reflex of the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 82, 507–511. doi: 10.1037/h0034129
- Meloni, E. G., and Davis, M. (1998). The dorsal cochlear nucleus contributes to a high intensity component of the acoustic startle reflex in rats. *Hear. Res.* 119, 69–80.
- Merchán, M. A., Collía, F., López, D. E., and Saldaña, E. (1988). Morphology of cochlear root neurons in the rat. *J. Neurocytol.* 17, 711–725.
- Murphy, C. A., and Feldon, J. (2001). Interactions between environmental stimulation and antipsychotic drug effects on forebrain c-fos activation. *Neuroscience* 104, 717–730. doi: 10.1016/S0306-4522(01)00110-5
- Nodal, F. R., and López, D. E. (2003). Direct input from cochlear root neurons to pontine reticulospinal neurons in albino rat. *J. Comp. Neurol.* 460, 80–93. doi: 10.1002/cne.10656
- Oertel, D., Shatadal, S., and Cao, X. J. (2008). In the ventral cochlear nucleus Kv1.1 and subunits of HCN1 are colocalized at surfaces of neurons that have low-voltage-activated and hyperpolarization-activated conductances. *Neuroscience*. 154, 77–86. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.01.085
- Oliver, D. L., Ostapoff, E. M., and Beckius, G. E. (1999). Direct innervation of identified tectothalamic neurons in the inferior colliculus by axons from the cochlear nucleus. *Neuroscience*. 93, 643–658. doi: 10.1016/S0306-4522(99)00143-8
- Oliver, D. L., and Shneiderman, A. (1991). “The anatomy of the inferior colliculus, A cellular basis for integration of monaural and binaural information,” in *Neurobiology of Hearing*, eds R. A. Altschuler, R. P. Bobbin, B. M. Clopton, and D. W. Hoffmann (New York, NY: Raven Press), 195–222.
- Osen, K. K., López, D. E., Slyngstad, T. A., Ottersen, O. P., and Storm-Mathisen, J. (1991). GABA-like and glycine-like immunoreactivities of the cochlear root nucleus in rat. *J. Neurocytol.* 20, 17–25. doi: 10.1007/BF01187131
- Paxinos, G., and Watson, C. (2009). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact 6th Edn*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
- Pirone, A., Kart, S., Zuccotti, A., Rüttiger, L., Pilz, P., Brown, D. H., et al. (2014). $\alpha 2\delta 3$ is essential for normal structure and function of auditory nerve synapses and is a novel candidate for auditory processing disorders. *J. Neurosci.* 34, 434–445. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3085-13.2014
- Popescu, M. V., and Polley, D. B. (2010). Monaural deprivation disrupts development of binaural selectivity in auditory midbrain and cortex. *Neuron* 65, 718–731. doi: 10.1016/j.neuron.2010.02.019
- Potash, M., and Kelly, J. (1980). Development of directional responses to sounds in the rat (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Physiol. Psychol.* 94, 864–877.
- Prosser, C. L., and Hunter, W. S. (1936). The extinction of startle responses and spinal reflexes in the white rat. *Am. J. Physiol.* 117, 609–618.
- Rajakumar, N., Elisevich, K., and Flumerfelt, B. A. (1993). Biotinylated dextran: a versatile anterograde and retrograde neuronal tracer. *Brain Res.* 607, 47–53. doi: 10.1016/0006-8993(93)91488-E
- Rubio, M. E. (2006). Redistribution of synaptic AMPA receptors at glutamatergic synapses in the dorsal cochlear nucleus as an early response to cochlear ablation in rats. *Hear. Res.* 216–217, 154–167. doi: 10.1016/j.heares.2006.03.007
- Rubio, M. E., and Juiz, J. M. (2004). Differential distribution of synaptic endings containing glutamate, glycine, and GABA in the rat dorsal cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 477, 253–272. doi: 10.1002/cne.20248
- Sagar, S. M., Sharp, F. R., and Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240, 1328–1331. doi: 10.1126/science.3131879
- Saint Marie, R. L., Luo, L., and Ryan, A. F. (1999). Effects of stimulus frequency and intensity on c-fos mRNA expression in the adult rat auditory brainstem. *J. Comp. Neurol.* 404, 258–270.
- Saul, S. M., Brzezinski, J. A. 4th., Altschuler, R. A., Shore, S. E., Rudolph, D. D., Kabara, L. L., et al. (2008). Math5 expression and function in the central auditory system. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 153–169. doi: 10.1016/j.mcn.2007.09.006
- Sinex, D. G., López, D. E., and Warr, W. B. (2001). Electrophysiological responses of cochlear root neurons. *Hear. Res.* 158, 28–38. doi: 10.1016/S0378-5955(01)00293-3
- Spruston, N. (2000). Distant synapses raise their voices. *Nat. Neurosci.* 8, 849–851. doi: 10.1038/78734
- Swerdlow, N. R., Geyer, M. A., and Braff, D. L. (2001). Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology* 156, 194–215. doi: 10.1007/s002130100799
- Szabo, I. (1964). Analysis of the muscular action potentials accompanying the acoustic startle reaction. *Acta Physiol. Hung.* 27, 167–178.
- Wagner, T., Pilz, P. K., and Fendt, M. (2000). The superior olivary complex is necessary for the full expression of the acoustic but not tactile startle

- response in rats. *Behav. Brain Res.* 108, 181–188. doi: 10.1016/S0166-4328(99)00146-1
- Walberg, F. (1974). Crossed reticulo-reticular projections in the medulla, pons and mesencephalon. An autoradiographic study in the cat. *Kidney Int.* 5, 127–134.
- Wang, H., Yin, G., Rogers, K., Miralles, C., de Blas, A. L., and Rubio, M. E. (2011). Monaural conductive hearing loss alters the expression of the GluA3 AMPA and glycine receptor alpha1 subunits in bushy and fusiform cells of the cochlear nucleus. *Neuroscience* 199, 438–451. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.021
- Whiting, B., Moiseff, A., and Rubio, M. E. (2009). Cochlear nucleus neurons redistribute synaptic AMPA and glycine receptors in response to monaural conductive hearing loss. *Neuroscience* 163, 1264–1276 doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.07.049
- Wilson, N. R., Kang, J., Hueste, E. V., Leung, T., Varoqui, H., Murnick, J. G., et al. (2005). Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1. *J. Neurosci.* 25, 6221–6234. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3003-04.2005
- Yeomans, J. S., and Frankland, P. W. (1996). The acoustic startle reflex: neurons and connections. *Brain Res. Rev.* 21, 301–314. doi: 10.1016/0165-0173(96)00004-5
- Yeomans, J. S., Lee, J., Yeomans, M. H., Steidl, S., and Li, L. (2006). Midbrain pathways for prepulse inhibition and startle activation in rat. *Neuroscience* 142, 921–929. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.06.025
- Yeomans, J. S., Li, L., Scout, B. W., and Frankland, P. W. (2002). Tactile, acoustic and vestibular systems sum to elicit the startle reflex. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 1–11. doi: 10.1016/S0149-7634(01)00057-4
- Zhou, J., Nannapaneni, N., and Shore, S. (2007). Vesicular glutamate transporters 1 and 2 are differentially associated with auditory nerve and spinal trigeminal inputs to the cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 500, 777–787. doi: 10.1002/cne.21208

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 01 March 2014; accepted: 03 July 2014; published online: 25 July 2014.

Citation: Gómez-Nieto R, Horta-Júnior JAC, Castellano O, Millian-Morell L, Rubio ME and López DE (2014) Origin and function of short-latency inputs to the neural substrates underlying the acoustic startle reflex. *Front. Neurosci.* 8:216. doi: 10.3389/fnins.2014.00216

This article was submitted to *Auditory Cognitive Neuroscience*, a section of the journal *Frontiers in Neuroscience*.

Copyright © 2014 Gómez-Nieto, Horta-Júnior, Castellano, Millian-Morell, Rubio and López. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Original Research Article

Speech in Alzheimer's Disease: Can Temporal and Acoustic Parameters Discriminate Dementia?

© For permitted use only.
ANY FURTHER DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE REQUIRES WRITTEN PERMISSION FROM S. KARGER AG BASEL AND MAY BE SUBJECT TO A PERMISSION FEE

Juan José G. Meilán^a Francisco Martínez-Sánchez^b Juan Carro^a
Dolores E. López^a Lymarie Millian-Morell^a José M. Arana^a

^aInstitute of Neurosciences of Castilla y León, University of Salamanca, Salamanca, and

^bUniversity of Murcia, Murcia, Spain

Key Words

Alzheimer's disease · Acoustic measures · Discriminant analysis · Speech measures

Abstract

Aims: The study explores how speech measures may be linked to language profiles in participants with Alzheimer's disease (AD) and how these profiles could distinguish AD from changes associated with normal aging. **Methods:** We analysed simple sentences spoken by older adults with and without AD. Spectrographic analysis of temporal and acoustic characteristics was carried out using the Praat software. **Results:** We found that measures of speech, such as variations in the percentage of voice breaks, number of periods of voice, number of voice breaks, shimmer (amplitude perturbation quotient), and noise-to-harmonics ratio, characterise people with AD with an accuracy of 84.8%. **Discussion:** These measures offer a sensitive method of assessing spontaneous speech output in AD, and they discriminate well between people with AD and healthy older adults. This method of evaluation is a promising tool for AD diagnosis and prognosis, and it could be used as a dependent measure in clinical trials.

© 2014 S. Karger AG, Basel

As early as 1907, Aloisius Alzheimer clinically described the patients with Alzheimer's disease (AD) as presenting with paraphasia, pauses in speech, and impairments in comprehension, in reading as well as in writing [1]. Indeed, he established that memory impairments in persons with AD were quantitatively different from those in other forms of pathological aging; in contrast, language impairments were qualitatively different, but still clearly characterised the disease [2]. Previously, language deficits were frequently noted in the lexico-

Juan J.G. Meilán
Department of Psychology, Institute of Neuroscience of Castilla y León
University of Salamanca, C/ Pintor Fernando Gallego, 1
ES–37007 Salamanca (Spain)
E-Mail meilan@usal.es

semantic and pragmatic domains of language [3], while the articulatory, phonological and syntactic aspects of language production were often reported to be relatively well preserved until the severe stages of AD [4].

However, the likelihood that alterations occur in spontaneous language production has been highlighted by a classic study indicating reductions in semantic skills and sophistication of vocabulary in Iris Murdoch's last novel, published a year before her diagnosis of AD [5]. Clinical studies typically adopted a profile of early speech symptomatology in AD [6]: a lack of initiative, slowness, articulatory apraxias, excessive length of phrases and sentences, paraphasia, anomia, lack of informative content due to the use of vague and imprecise phrasing, low melodic level, and low rhythm. In recent years, more in-depth studies have been carried out of the speech disorders associated with the evolution of AD [7, 8]. Kemper et al. [9] claimed that AD is often the most common cause of logopenic progressive aphasia, which is characterised by a reduced or fluctuating rate of language output, phonological errors, and frequent word-finding pauses. The patients are still able to produce speech, but their speech rate may be significantly slowed down due to word retrieval difficulty. Logopenic progressive aphasia mostly occurs in the early stages of AD, especially in cases of early-onset AD and AD with a more rapid progression in patients with a family history of dementia [10, 11].

Some experimental studies have examined spontaneous speech in free conversations recorded from patients with AD to appraise their conversational speech. In mild AD, phonological and articulatory impairments and phonological paraphasias have been found [12], as well as slow speech [13]; the ratio between perseverative and anticipatory speech errors (anticipatory proportion) was significantly lower [14], more empty language and shorter conversational turns were observed [15], as well as higher hesitation ratios [16], and more phonological errors [17]. Tosto et al. [18] found prosodic impairment in AD: features of speech such as emphasis placed on certain syllables, changes in tempo or timing, and differences in pitch and intonation. In short, if the impairments in speech in individuals with AD differ qualitatively from those caused by normal aging or other pathologies, such impairments may be thought to serve as objective, early, subtle, clear and isolated symptoms for the early diagnosis of AD [19].

Speech processing techniques are often applied to assist in extracting information from unstructured speech. They are methods for automatically measuring speech characteristics and examine the utility of these measures for discriminating between clinically defined groups [20]. Some studies have examined spoken language samples recorded from patients with AD and mild cognitive impairment. Subtle speech alterations were revealed in a recent study indicating the difficulties in expression (e.g. percentage of voiceless segments) shown by patients with AD in the early stages of the disease [21, 22] and the difficulties in speech duration (e.g. mean duration of pauses, standardized phonation time, and verbal rate) observed in patients with mild cognitive impairment [23].

As we have seen, the most prominent speech characteristics affected by early AD are those related to prosody, temporal and acoustic measures, which includes the alterations in rhythm (reduced or fluctuating rate of language output, frequent word-finding pauses, a lack of initiative, and slowness), loudness, phonological errors, and articulatory apraxias [24]. These characteristic alterations could be detected by analysis of temporal and primary acoustic parameters: for example, temporal aspects of the speech sample and interruption of sound for alterations in rhythm; analysis of the fundamental frequency (F_0), periods of voice, and fluctuation in frequency for slowness, phonological errors and articulatory apraxias, and fluctuation in amplitude for loudness. In this study, our objectives were to identify the speech parameters in AD, to analyse the difficulties in expression shown by patients with AD in the early stages of the disease, and to study the speech profile of patients with AD.

Our first specific aim was to take a direct and objective measure of the speech of individuals through temporal and acoustic analysis. Our hypothesis was that there are qualitative differences between the expressive language of patients with AD and that of other elderly persons with regard to prosody, voice quality, pitch, articulation, intensity, and the stability of voice. These differences would allow us to obtain a profile for AD that would enable the differential diagnosis of AD with respect to individuals without this pathology [25, 26]. We thus analysed the role of specific temporal and acoustic measures as potential early markers for the onset, progression, and severity of AD. With this goal in mind, specific sentences spoken by patients with mild AD were recorded and compared to those spoken by elderly individuals without pathology. We analysed the intensity, fundamental frequency, and the temporal structure of this speech in its suprasegmental aspects. With these findings, we performed a discriminant analysis to classify participants into AD or control groups.

Methods

Participants

We collected audio recordings from 66 participants (in two groups, a normal control group and an AD group) aged over 60 years, with no history of drug or alcohol abuse, no symptoms of depression (Beck Depression Inventory score <10) and no co-existing degenerative neurological disease or hearing impairment that could affect speech and voice production. The AD group (n = 30; mean age = 78.66 years, SD = 9.38, range 60–95; men = 32%, woman = 68%; mean years of formal education = 6.27, SD = 2.5, range 3–14) comprised patients from a National Reference Centre for Alzheimer Disease with a diagnosis of probable AD (NINCDS-ADRDA) and with a score of 4 on Reisberg's Global Deterioration Scale (patients show evidence of mild memory deficit during intensive clinical interview; MMSE corrected mean score = 18.07, SD = 3.86, range 12–23). We excluded patients with a diagnosis of mixed dementia. The MMSE score in the AD group was heterogeneous, but was controlled by the clinical aspects assessed. Our patients were in the Program for Integral Cognitive Activation in Dementias at the National Reference Centre for Alzheimer Disease, and therefore maintained a communication system, the reading ability, and the ability to follow instructions. The participants were able to do the reading task. They invariably knew their own name and the name of their spouse and children, and they could still remember significant details about themselves and their family.

The normal control group participants were healthy elderly individuals (n = 36; mean age = 74.06 years, SD = 9.74, range 60–98; men = 20%, woman = 80%; mean years of formal education = 7.30, SD = 3.1, range 4–14) recruited through education courses for the elderly at the university. They were fluent in language with no history of head injury, neurological disease, major affective or psychotic disorders, seizures, or substance abuse, and they were within normal limits on age- and education-matched cognitive tests (MMSE corrected mean score = 27.97, SD = 1.15, range 26–30).

Men and women were grouped by gender to conduct the analyses, but no significant differences were found between the two groups [$\chi^2(1) = 1.247$] with regard to age ($t_{64} = 1.923$) or mean years of formal education ($t_{64} = -1.422$). However, significant differences were observed between the two groups in MMSE mean score ($t_{64} = -13.254$; $p < 0.001$).

Materials

Audio recordings were obtained using a professional Fostex FR-2 LE recording equipment, with 24-byte resolution, a sampling rate of 48 kHz, and an AKG D3700S cardioid microphone. The microphone was placed on a stand 8 cm from the participant at an angle of 45° to the patient's mouth to decrease aerodynamic noise from the mouth. The sampling frequency rate and volume were controlled so that there was consistency among the participants. Acoustic parameters were evaluated with automated scripts written for the Praat software (version 5.1.42) [27] to extract estimates of the relevant acoustic measures from the recordings.

Procedure

All participants gave informed consent for the assessment in line with the ethical conventions of the institution. All subjects underwent a comprehensive neuropsychological assessment including measures of speech, the biographical information test, and the corrected MMSE. The speech task consisted of the partici-

pants reading a series of familiar sentences presented on a screen, in 48-point font size and multiple lines to facilitate reading. The reading task should be easy because the participants already know the phrases to be read. They were asked to read the sentences appearing on the screen and to try to speak loudly and clearly. The acoustic analyses were done on the same segments for all of them: the participants were asked to read two well-known sentences in Spanish from *Don Quixote de la Mancha* by Miguel de Cervantes. They are the popular first sentences of the book: 'In a village of La Mancha, the name of which I have no desire to call to mind, there lived not long since one of those gentlemen that keep a lance in the lance-rack, an old buckler, a lean hack, and a greyhound for coursing. An olla of rather more beef than mutton, a salad on most nights, scraps on Saturdays, lentils on Fridays, and a pigeon or so extra on Sundays, made away with three-quarters of his income' (English translation of *Don Quixote* by John Ormsby, 1885).

Analyses focused on common acoustic measures of speech, including temporal aspects of the speech sample, pitch (F_0), volume (intensity), and voice quality. To characterise the temporal aspects of the speech sample, we computed the duration of the voice sample used (total duration of the paragraph from *Don Quixote*, the phonation time, and the reading and articulation speed), the interruption of sound (proportion and number of pauses of voice, percentage of the recording without voice, and number and percentage of voice breaks), and the periods of voice (number of pulses analysed as voice, and mean number of periods of voice). To characterise the pitch or fundamental frequency (F_0), we analysed the fundamental frequency (mean F_0 , maximum and minimum values of F_0 , high and low global pitch and autocorrelation measures), and fluctuations in the frequency of sound [jitter (short-term, cycle-to-cycle, perturbation in the fundamental frequency of the voice): local jitter, local absolute jitter, relative average perturbation jitter, and quotient 5 jitter]. To characterise the fluctuations in the amplitude of sound, we computed the intensity (in dB) of voiced and unvoiced signals, and measures of phonatory stability [period perturbation shimmer (short-term, cycle-to-cycle, perturbation in the amplitude of the voice): local shimmer, amplitude perturbation quotient (apq) 3 shimmer, apq5 shimmer, and apq11 shimmer]. Finally, we computed measures of the speaker's voice quality. Two spectral noise measures were calculated: the harmonics-to-noise ratio and the noise-to-harmonics ratio.

Data Analysis

The spectrographic measures used in this study were subjected to linear discriminant analysis by a step-by-step procedure described elsewhere, using diagnosis (1 = AD; 2 = control) as the dependent variable. The stepwise statistical method of linear discriminant analysis enables a subject to be assigned to a previously classified group (criterion or dependent variable) according to the scores in different independent variables, which are then linearly combined via a 'discriminant function' [28]. The objective of this technique is to select from a set of independent variables those that best discriminate between the two groups of the dependent variable, thus satisfying the criterion of parsimony and obtaining the greatest diagnostic accuracy with the minimum number of variables. The procedure of including the variables in the equation also enables the calculation of the net contribution of each variable alone. A cross-validation by resubstitution (SPSS Inc., v18) [29] was also performed.

Results

Speech Analysis

Table 1 shows the speech parameters that were measured and the descriptive data. Linear discriminant analysis results make it possible to obtain a highly significant discriminant function (percentage of variance explained = 100%; eigenvalue = 1.095, canonical correlation = 0.723; Wilks' lambda = 0.477, $\chi^2 = 45.488$, d.f. = 5, $p < 0.001$) containing 5 factors (table 2). The discriminant function, in standardised coefficients, took the following parameters into account: the total number of voice periods (SC = 0.874), breaks in voice [calculated both as a percentage of voice breaks (SC = 0.787) and voice break number (SC = -0.683)], fluctuation of the amplitude of sound as shimmer apq3 (SC = 1.381), and, finally, noise-to-harmonics ratio (SC = -1.127). Table 2 shows Wilks' lambda and Fisher coefficients of the structure matrix for each variable. The non-standardised centroids for AD are 1.129 and for the control group -0.941.

Table 1. Measured speech parameters and descriptive data

Group	Parameters	Control (mean ± SD)	AD (mean ± SD)
Temporal aspects of the speech sample	Total duration, s	44.39±18.32	82.19±53.05
	Phonation time, s	34.30±13.21	46.72±19.86
	Speech rate, syllable/s	3.59±0.67	2.55±0.63
	Articulation rate, syllable/s	4.34±0.43	4.05±0.43
Analysis of fundamental frequency (F ₀)	Mean F ₀ , Hz	161.27±24.48	179.08±29.05
	Minimum F ₀ , Hz	68.46±4.00	67.66±3.78
	Maximum F ₀ , Hz	542.85±124.91	596.63±68.76
	Autocorrelation, Hz	0.89±0.04	0.90±0.05
	High global pitch, Hz	478.12	571.25
	Low global pitch, Hz	76.82	82.50
Analysis of periods of voice	Pulses, n	4,221±1,834	6,520±2,872
	Periods, n	4,126±1,804	6,379±2,830
	Mean periods, n	6.38±1.05	5.76±0.88
Interruption of sound	Without voice, %	35.66±7.40	47.83±12.28
	Voice breaks, n	84.05±29.95	118.93±68.27
	Voice breaks, %	39.62±6.85	51.27±12.03
	Proportion of pauses of voice	28.67±12.887	51.76±13.55
	Pauses of voice, n	14.33±9.3	34.5±27.04
Fluctuation in frequency	Jitter (loc), %	2.83±0.61	2.80±0.95
	Jitter (loc, abs), %	182.71±54.65	165.22±75.41
	Jitter (rap), %	1.33±0.34	1.34±0.54
	Jitter (ppq5), %	1.52±0.46	1.54±0.61
Fluctuations in the amplitude of sound (intensity of sound)	Shimmer (loc), %	12.94±4.09	13.28±4.71
	Shimmer (loc), dB	1.58±0.44	1.60±0.51
	Shimmer (apq3), %	5.29±2.19	6.01±2.74
	Shimmer (apq5), %	7.77±3.07	7.92±3.43
	Shimmer (apq11), %	14.04±4.57	12.66±4.58
	Intensity of unvoiced, dB	56.62±4.38	53.27±5.15
	Intensity of voiced, dB	71.10±3.98	70.35±2.74
Harmonics/noise ratio	Noise-to-harmonics ratio, dB	0.17±0.65	0.15±0.07
	Harmonics-to-noise ratio, dB	12.43±2.86	12.72±2.64

loc = Local; loc, abs = local absolute; rap = relative average perturbation; ppq5 = 5-point period perturbation quotient.

Table 2. Wilks' lambda and Fisher coefficient structure matrix for each introduced variable

Parameters	Wilks' lambda	Structure matrix: function
Percentage of voice breaks	25.717**	0.654
Number of periods	17.940**	0.471
Number of voice breaks	14.886**	0.330
Shimmer (apq3)	13.162**	0.131
Noise-to-harmonics ratio	13.142**	-0.138

** p < 0.001.

Once the discriminant function was obtained, the participants in the sample were classified according to the scores. Fifty-six of the 66 patients were correctly classified by this procedure, thus providing 84.8% sensitivity for classification. Only 6 participants in the AD group and 4 in the control group were classified incorrectly. In the cross-validation study, 55 of the 66 participants were correctly classified by this procedure, thus providing 83.3% sensitivity for classification. Seven participants in the AD group and 4 in the normal control group were classified incorrectly.

Discussion

This study reports on the ability of speech analysis to discriminate between patients with mild AD and healthy older adults. We examine a large set of temporal and acoustic measures and demonstrate that they can be useful for discriminating between healthy and AD groups. The findings suggest that speech measures may indeed be valuable for the detection of AD. The two groups performed qualitatively differently in the speech task, and the participants were divided into the disease group and the control group based upon only 5 factors: percentage of voice breaks, number of periods of voice, number of voice breaks, shimmer (apq3), and noise-to-harmonics ratio. Thus, the temporal and acoustic values analysed allow us to define the profile of individuals with AD in a valuable way.

The variables were interpreted using Fisher coefficients of the matrix structure (table 2). In our analysis of voice periods, we found that speech of the AD participants was characterised by an overall higher number of periods of sound. A period is the time it takes to complete one cycle. The number of periods is the length of time for the interval of cycles selected to analyse. This higher number of periods implied that the voice vibrated at fewer cycles per second, presenting in the AD group as a deeper voice, slower speech, and a slower rate of speed or rhythm of the glottal pulses. This gives rise to a monotone voice. Also, Horley et al. [30] found that in speech, objective acoustic measurements revealed significantly less pitch modulation by the AD group. For the interruptions of the voice, we found that the speech of the participants with AD was characterised by a higher proportion and number of voice breaks. Voice breaks are the interruptions or variations taking place along the melodic curve, not perceptible to the human ear because of their short duration. The number of voice breaks is the number of distances between consecutive pulses that are longer than 1.25 divided by the pitch floor. Voice breaks are a voice disorder wherein the pitch of the voice changes suddenly. AD speech is contaminated by these voice breaks, and characteristic noises like bubbles or tremors in the voice start to appear. Noise and voice break parameters give information regarding the amount of noise in the voice signal. In our analysis of fluctuations in the amplitude of sound, participants with AD had a higher apq. The shimmer index refers to period-to-period amplitude variation in the voice signal. It serves to quantify the small intervals of instability in the voice signal by means of a relative evaluation of the fluctuation in amplitude from one period to another (from peak to peak). Shimmer is the apq, between the amplitude of a period and the average of the amplitudes of its neighbours, divided by the average amplitude. The group with AD showed greater variations in the intensity of the successive waves produced continuously, especially in the variation of the amplitudes of their two closest neighbours (shimmer apq3). Patients with AD had a tremulous voice, with less intensity and less control of airflow than the control group.

As noted, the voice alterations that discriminate in the analysis between the two groups are related to acoustic changes characteristic of the voice of patients with AD. Because the differences between the two groups can be justified by changes in the production of phonemes or sequences of sounds, this allows us to generalise the discriminant analysis to languages

other than English. However, these results contrast with other studies in which the emphasis is on the temporal and prosodic aspects of speech. These seem to also be altered due to disease as reported by ourselves and other authors using different methodology [13, 21, 24]. Recently, Meilán et al. [22] have found that an increase in the percentage of voiceless segments in AD patients' speech explains more than 34% of the variance in the scores in a specific language and memory test. Roark et al. [23], in a task where the participants were asked to re-tell a story (Wechsler Logical Memory Scale) immediately after it had been told to them, found that the standardised pause rate, phonation rate, and many linguistic complexity measures were useful in discriminating between healthy elderly participants and participants with mild cognitive impairment. However, Singh et al. [13] reported that the mean duration of pauses, standardised phonation time, and verbal rate were useful in discriminating between healthy elderly participants and patients with AD. The differences in the significance of speech-based markers between the authors may be due to the large number of differences between the studies, including the number of participants, inclusion criteria for the participants, test material, and measurement tools.

Our results may be a consequence of using a familiar phrase of *Don Quixote*, which allows participants to keep the prosody of the language more appropriate and consistent, highlighting that the test used altered acoustic features compared to prosodic features. The prosodic features would not discriminate when taking into account familiar prayers, but rather in tasks that use memory to search the right words. In this case, there is a difference between reading a known text and reading an unknown text that has been read only once. To conclude, it is well documented that AD patients often manifest deficits in language processing very early in the course of the disease, and a review of the performance of AD individuals in language tasks is timely and will contribute to the goal of identifying early markers of cognitive impairment in AD [31, 32]. Authors like Roark et al. [23] indicate that using multiple, complementary spoken language measures can help in the automatic detection of mild cognitive impairment. They demonstrate that effective automation of measure extraction is possible when given a transcript and audio recordings, so that significant differences in feature means between healthy and mild cognitive impairment groups are preserved.

We designed a direct method for automatically measuring language production by an objective and ecological task, which can be applied in a very short period of time. It is a method for automatically measuring the speech characteristics of spoken language samples. We have examined the usefulness of this method for discriminating between patients with early AD and controls and for obtaining a precise diagnosis of AD. These speech measures may indeed be valuable in the detection of AD. Spoken language examination is a relatively inexpensive and simple measure, and it has the additional advantage of minimal discomfort for the patient. The use of spectral analysis tools yields an objective description of the voice output, which will allow specialists to unify concepts. Cognitive processes involving both executive and lexical-semantic memory access determine the characteristics of speech. Future research should address both sources of speech failure in AD patients.

Acknowledgements

There is a contract for research collaboration between the Institute of Neurosciences of Castilla y León and The National Reference Centre of Alzheimer Disease (CRE Alzheimer's Salamanca-IMSERSO; Government of Spain). We would like to express gratitude to the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN, No. BFU2010-17754) and Junta de Castilla and Leon (BIO/SA84/13) for their financial support.

References

- 1 Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR: An English translation of Alzheimer's 1907 paper, 'Über eine eigenartige Erkrankung (sic) der Hirnrinde'. *Clin Anat* 1995;8:429–431.
- 2 Alzheimer A, Forstl H, Levy R: On certain peculiar diseases of old age. *Hist Psychiatry* 1991;2:71–101.
- 3 Hodges JR, Salmon DP, Butters N: Semantic memory impairment in Alzheimer's disease. Failure of access or degraded knowledge? *Neuropsychologia* 1992;30:301–314.
- 4 Caramelli P, Mansur LL, Nitrini R: Language and communication disorders in dementia of the Alzheimer type; in Stemmer B, Whitaker HA (eds): *Handbook of Neurolinguistics*. San Diego, Academic Press, 1998, pp 463–473.
- 5 Garrard P, Maloney LM, Hodges JR, Patterson K: The effects of very early Alzheimer's disease on the characteristics of writing by a renowned author. *Brain* 2005;128:250–260.
- 6 Forbes KE, Venneri A: Detecting subtle spontaneous language decline in early Alzheimer's disease with a picture description task. *Neurol Sci* 2005;26:243–254.
- 7 Lam LCW, Ho P, Lui VWC, Tam CWC: Reduced semantic fluency as an additional screening tool for subjects with questionable dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006;22:159–164.
- 8 Mesulam M, Wicklund A, Johnson N, Rogalski E, Léger GC, Rademaker A: Alzheimer and frontotemporal pathology in subsets of primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 2008;63:709–719.
- 9 Kemper S, Marquis J, Thompson M: Longitudinal change in language production: effects of aging and dementia on grammatical complexity and propositional content. *Psychol Aging* 2001;16:600–614.
- 10 Romero B, Kurz A: Deterioration of spontaneous speech in AD patients during a 1-year follow-up: homogeneity of profiles and factors associated with progression. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1996;7:35–40.
- 11 Josephs KA, Whitwell JL, Duffy JR, Vanvoorst WA, Strand EA, Hu WT: Progressive aphasia secondary to Alzheimer disease versus FTLN pathology. *Neurology* 2008;70:25–34.
- 12 Croot K, Hodges JR, Xuereb J, Patterson K: Phonological and articulatory impairment in Alzheimer's disease: a case series. *Brain Lang* 2000;75:277–309.
- 13 Singh S, Bucks RS, Cuerden JM: Evaluation of an objective technique for analysing temporal variables in DAT spontaneous speech. *Aphasiology* 2001;15:571–583.
- 14 Wutzler A, Becker R, Lämmler G, Haverkamp W, Steinhagen-Thiessen E: The anticipatory proportion as an indicator of language impairment in early-stage cognitive disorder in the elderly. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2013;36:300–309.
- 15 Ripich DN: Functional communication with AD patients: a caregiver training program. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1994;8:95–109.
- 16 Hoffmann I, Nemeth D, Dye CD, Pakaski M, Irinyi T, Kalma J: Temporal parameters of spontaneous speech in Alzheimer's disease. *Int J Speech Lang Pathol* 2010;12:29–34.
- 17 Forbes KE, Venneri A, Shanks MF: Distinct patterns of spontaneous speech deterioration: a mild predictor of Alzheimer's disease. *Brain Cogn* 2002;48:356–361.
- 18 Tosto G, Gasparini M, Lenzi GL, Bruno G: Prosodic impairment in Alzheimer's disease: assessment and clinical relevance. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2011;23:E21–E23.
- 19 Venneri A, Forbes-McKay KE, Shanks MF: Impoverishment of spontaneous language and the prediction of Alzheimer's disease. *Brain* 2005;128:E27.
- 20 Gabani K, Sherman M, Solorio T, Liu Y, Bedore L, Na EP: A corpus-based approach for the prediction of language impairment in monolingual English and Spanish-English bilingual children. *Proc Human Lang Technol Conf Meet North Am Chap ACL (HLTNAACL)*, Boulder, 2009, pp 46–55.
- 21 Martínez-Sánchez F, Meilán JGG, García-Sevilla J, Carro J, Arana JM: Oral reading fluency analysis in patients with Alzheimer disease and asymptomatic control subjects. *Neurologia* 2013;28:325–331.
- 22 Meilán JGG, Martínez-Sánchez F, Carro J, Sánchez JA, Pérez E: Acoustic markers associated with impairment in language processing in Alzheimer's disease. *Span J Psychol* 2012;15:487–494.
- 23 Roark B, Mitchell M, Hosom JP, Hollingshead K, Kaye J: Spoken language derived measures for detecting mild cognitive impairment. *IEEE Trans Audio Speech Lang Processing* 2011;19:2081–2090.
- 24 Taler V, Baum SR, Chertkow H, Saumier D: Comprehension of grammatical and emotional prosody is impaired in Alzheimer's disease. *Neuropsychology* 2008;22:188–195.
- 25 Martínez-Sánchez F, Meilán JGG, Pérez E, Carro J, Arana JM: Expressive prosodic patterns in individuals with Alzheimer's disease. *Psicothema* 2012;2:16–21.
- 26 Parsa V, Jamieson DG: Interactions between speech coders and disordered speech. *J Speech Commun* 2003;40:365–385.
- 27 Boersma P, Weenink D: Praat: doing phonetics by computer (version 5.1.29). 2010. <http://www.praat.org/>.
- 28 Tatsuoka M: *Multiple Analysis: Techniques for Educational and Psychological Research*. New York, Wiley, 1971.
- 29 Fisher RA: The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Ann Eugen* 1936;7:179–188.
- 30 Horley K, Reid A, Burnham D: Emotional prosody perception and production in dementia of the Alzheimer's type. *J Speech Lang Hear Res* 2010;53:1132–1146.
- 31 Taler V, Phillips NA: Language performance in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a comparative review. *J Clin Exp Neuropsychol* 2007;1:1–56.
- 32 Kemper S, Greiner LH, Marquis JG, Prenovos K, Mitzner TL: Language decline across the life span: findings from the Nun Study. *Psychol Aging* 2001;16:227–239.

" Acoustic startle reflex modulations and voice analysis contribute to Parkinson disease diagnosis "

Word count; 5,698

Running title: Startle and speech disorders in Parkinson

Keywords: Prepulse facilitation; Prepulse inhibition; Sensorimotor gating; Speech measures.

Abbreviations:

Parkinson's disease (PD)

Acoustic startle reflex (ASR)

Prepulse inhibition (PPI)

Prepulse facilitation (PPF)

Substantia nigra (SN)

Electromyographic (EMG)

Fundamental frequency (F0),

Local shimmer (shimmer loc)

Shimmer amplitude perturbation quotient 3 (shimmer apq3)

Noise-to harmonics ratio (NHR)

Abstract

Background: Motor alterations observed in Parkinson's disease (PD) reflect anatomophysiological changes caused by dopamine depletion. We aim to assess early motor disturbances in PD using the acoustic startle reflex modulations and temporal patterns of speech. We correlate the modulations of the acoustic startle reflex measure through the prepulse inhibition and prepulse facilitation, and temporal patterns of speech.

Methods: 52 Patients diagnosed with PD and 36 controls took part of the study. After obtaining written informed consent, the acoustic startle reflex and their prepulse inhibition, and prepulse facilitation were evaluated using the SRH-Lab system (San

Diego, CA). Voice recordings were register of a specific text given to the subjects with a professional recorder and temporal patterns of speech were analyzed using the program Praat 5.1.42. Statistical analyses were performed using the SPSS program.

Results: Comparisons conducted in this study suggest differences in prepulse inhibition and prepulse facilitation in patients with PD relative to controls. In addition, discriminative parameters of voice abnormalities were seen in PD patients related to control subjects.

Conclusions: Parkinson's disease presents alterations in sensorimotor filter mechanisms and speech disorders, and there is a relationship between these events. The correlation between the startle modulations with an alteration of the voice in PD patients could give us a clue for the mechanism underlying neurophysiological alterations in both processes. Overall, simple and non-invasive tests such as startle modulations and voice analysis may identify early stages of PD.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) belongs to a group of conditions called motor system disorders, which results from the damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta [1]. PD is difficult to diagnose accurately as early symptoms occur gradually and differ among patients that experience motor problems after 50% of dopaminergic cell death [2]. Motor abnormalities leads to the diagnostic criteria that include bradykinesia, rigidity, resting tremor or postural instability. Importantly, these motor dysfunctions reflect a loss of dopaminergic neurons within the nigrostriatal system that might be traceable to extranigral impairment of the motor system [1,3-5].

In addition to the hallmark symptoms of PD [6,7], a significant and progressive deficit in the phonatory system is often experienced by PD patients [7]. Phonetics involves speech motor activities, transmission through air and speech perception [8]. The speech and voice deterioration can be explained through a sensory processing deficit related to speech [9, 10]. Patients are often described as having a high-pitched, monotone, and monoloud voice with a restricted range pitch when compared with normal subjects [11, 12]. Vocal impairment may be amongst the earliest PD symptoms, detectable up to five years prior clinical diagnosis [13,14]. The loss of dopaminergic input to the striatum and subsequent deregulation of the basal ganglia produce motor deficits that adversely affect all the subsystems related to speech motor control. Any alteration in one of these systems affects the voice and the proper coordination of speech [15]. Neuroimaging

studies have demonstrated the involvement of the striatum in speech initiation and production [16].

It has been suggested that speech motor deficits in speakers with PD could contribute to hypokinetic dysarthria [17, 18] that is an integral part of the motor changes in PD. Disturbances of prosody, articulation and mobility, correlate with the disease severity and these disturbances are secondary to the degree of patient's rigidity and hypokinesia. The decrease in expiratory volume with a consequent alteration of the velopalatal resonance and a decrease in vocal intensity cause the disturbances in the prosody. Abnormalities described in patients with PD, as disruptions in prosody, differences in the rate of speech, voice inflection, hesitations, pauses, monotonous voice and a decrease in the intensity variations of the voice, has been observed during the reading task [19].

Sensorimotor filtering is also affected by anatomical and physiological changes observed in PD. Studies that evidence the involvement of the sensory system in the pathophysiology of certain movement disorders, makes it essential to consider the potential contribution of changes in sensorimotor integration in motor execution [20]. Disturbances in motor control can be measured through the analysis of muscle electromyographic activity [21]. The acoustic startle reflex (ASR) is a rapid muscle contraction evoked by a sudden and intense acoustic stimulus. It is a simple test that serves as a tool for assessment of behavioral plasticity mechanisms of sensorimotor response [22]. ASR reflects a protective behavior against the injury and the magnitude of this answer can be modulated by external and internal conditions [23]. Prepulse inhibition (PPI) is the reduction of the magnitude of ASR when the startle-eliciting stimulus (pulse) is preceded 30-500 ms by a weak non-startling stimulus (prepulse) [24]. PPI is an operational measure of sensorimotor gating and reflects a protector mechanism where the information carried by the prepulse is analyzed early avoiding the interference of other stimuli, which limits the ingress of trivial stimuli to cognitive centers or motor output pathways [25]. When the prepulse-to-pulse intervals are longer than 500 ms, the phenomenon is known as prepulse facilitation (PPF)[26], and reflects sensory enhancement and selective attention [27,28].

Knowing that neurophysiologic tests such as ASR, PPI and PPF provide quantifiable data, are not expensive, are safe and can be used without adverse effects to the patients, is possible to use these tests for the evaluation of the alterations in brainstem circuits and their neurotransmitters. Based on the anatomical connections between structures belonging to sensory filtering circuit, substantia nigra (SN) and basal ganglia, we

hypothesized that the dysfunction between these circuits affects the sensorimotor gating in PD, and is possible to assess the alteration in this sensorimotor filtering using the ASR and its modulation through the PPI and PPF.

Neuroimaging techniques have probed the speech control by the basal ganglia circuitry, and how structures, such as SN, participate in the basal ganglia vocal motor circuitry [29]. In this idea, changes in areas of the brain that play a critical role in speech may be assessed through their physiological correlate's that can be objectively measure [30], especially those parameters related to the neurodegeneration of dopaminergic nigrostriatal pathway and the basal ganglia. The reduction of dopamine leads to motor abnormalities leaving the region of the striatum overly active, causing a phonoarticulatory change that results in voice articulation and swallowing disorders [31]. Based on animal studies, the abnormal patterns of movement can result in the aberrant contractile properties and abnormal fibers of the muscles in the larynx, due to an alteration of the laryngeal somatosensory function; vocalization and swallowing. [32-36]. Thus, we will focus on the importance of the features of variability in the frequency formants and intensity of sound that affect the monotony in the frequency and intensity of speech. Furthermore, we analyze the parameters related to the tremor of the voice and its influence on prosody such as pauses, hoarseness and imprecision in both the articulation of phonemes and prosody of reading. With these in mind, the goal of this study is to correlate the changes in the sensory gating and speech impairment as a tool for an early diagnosis of PD.

2. Materials and methods

2.1 Participants

After obtaining permission of the local Ethics Committee, and written informed consent, the procedures were performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki. A total of 88 Spanish native speakers participated in the study. PD patients were clinically diagnosed according to the criteria of the Brain Bank of London [37]. They were outpatients from the Neurology Service of the University Hospital of Salamanca, who were seen by at least two senior neurologists experienced in movement disorders. PD patients include 52 patients (mean age, 68.44 ± 9.89), were clinically evaluated using Unified Parkinson's Disease Rating Scale [38] and Hoehn and Yahr scale [39]. The study was conducted at the time of their

medication's minimal effect. The control group was formed by 36 healthy controls, and recruited from the general community in recreational centers for elderly people (mean age, 73.74 ± 13.84). Exclusion criteria included: neurological disorders other than PD, head injury, hearing disorders, psychiatric disorder other than depression, and frequent use of illicit substances or alcohol consumption. Cognitive state of all subjects was evaluated with the MMSE [40] (control= 27.24; PD patients= 26.56).

2.2 Startle reflex and Prepulse Inhibition Measurement

The ASR and PPI/PPF were evaluated using the SRH-Lab system (San Diego, CA). The binaural auditory stimulation was provided through headphones (Sony MDR-V6) connected to the reflection measurement device (SRH-Lab trending system), and electromyographic (EMG) registration of the right orbicularis oculi was done using two small silver/silver chloride electrodes filled with conductive paste placed beneath the right pupil, and the ground electrode was placed in the right mastoid. EMG activity was recorded using a high pass filter at 30 Hz and a low pass filter at 1000 Hz and a notch filter at 50 Hz. The EMG data were converted, using the analytic program of this system (analogue-digit units 1unit=1.31 μ V) for amplitude and latency to response peak in milliseconds (ms). The latency was measured within a period of 120 ms after acoustic stimulus and was determined at the point where the maximal amplitude occurred.

Test is performed with subjects seated, and during the 15 minutes of the test, participants were not asked to selectively attend to auditory stimuli. Smoking was permitted 1 hour prior to the session to prevent any withdrawal effects on PPI. The test starts after a 4 min acclimation period of 70 dB background noises that continued throughout the session. ASR trigger pulses were 115dB white noise and 40 ms duration bursts. The prepulse consisted of 85dB white noise bursts and 20 ms duration. Inter trial intervals were randomized between 9 to 23 ms. The session had four blocks, with the initial and final block consisted of five pulses alone, and the second and third block containing 6 pulses alone and 9 of each prepulse-to-pulse intervals of 60, 120 and 1000ms.

Prepulse trials with a 1000 ms prepulse-to-pulse interval were expected to elicit PPF. The onset measurement is in ms, using the beginning of the maximum amplitude response (in microvolt's) that occurs within 18-120 ms after acoustic stimulus. PPI/PPF was calculated using the mathematic formula $PPI/PPF = 100 * (\text{amplitude ASR without prepulse amplitude ASR after prepulse} / \text{amplitude ASR without prepulse})$.

2.3 Voice Analysis

The speech task consisted of asking subjects to read on a screen (48-point font size and multiple lines to facilitate reading), the first paragraph of the novel “Don Quixote” by Miguel de Cervantes (405 syllables): “In a village of La Mancha, the name of which I have no desire to call to mind, there lived not long since one of those gentlemen that keep a lance in the lance-rack...” (English translation of *Don Quixote* by John Ormsby, 1885). This paragraph is well known by all Spanish speakers, like the famous passage “to be or not to be” of Shakespeare used in English equivalent tests. The recordings were made in a room quietly placing the microphone to 8 cm and an angle of 45 ° from the mouth to prevent aerodynamic noise. The recordings were obtained with a portable professional voice recorder (Sony PCM-M10), and the analyses were done according to the methodology described in previous studies [41]. Analysis focused on common acoustic measures of speech, including temporal aspects of the speech sample, pitch or fundamental frequency (F0), volume (intensity), and voice quality. To characterize the fluctuations in the amplitude of sound, we computed the intensity in dB of voice and unvoice signals, and measure phonatory stability shimmer period perturbation stability (short term, cycle to cycle, perturbation in the amplitude of the voice): local shimmer (shimmer loc) and shimmer amplitude perturbation quotient 3 (shimmer apq3). Prosodic patterns are quantified by automatic prosodic transcription of a recording, using the algorithms implemented by Mertens [42] on the Praat program [43]. To characterize the temporal aspects of the speech sample, we computed the duration of the voice sample used (total duration of the paragraph from *Don Quixote*, the phonation time, and the reading and articulation speed), the interruption of sound (proportion and number of pauses of voice, percentage of the recording without voice, and number and percentage of voice breaks), and the periods of voice (number of pulses analyzed as voice, and mean number of periods of voice). To characterize the F0, we analyzed the mean F0, maximum and minimum values of F0, high and low global pitch and autocorrelation measures. Detection range of 65-650 Hz for F0, on windows of 0.005 s duration; for automatic segmentation threshold intensity was used in the styling of the algorithm that determines the presence of a vowel ($G = 0.32/T2$ semitones / s., $DG = 30$, $dmin = 0.05$). While the standard psychoacoustic threshold for isolated voice is $G = 0.16/T2$, during natural speech voice flow is rarely linear, so that the value assigned is the better-

modeled prosodic voice variables. Finally, we computed measures of the speaker's voice quality, and one spectral noise measure, the noise-to harmonics ratio (NHR).

2.4 Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the IBM SPSS software, version 20.0 (SPSS Inc Chicago, IL, USA). The differences between groups were analyzed by analysis of variance (ANOVA) mixed or split-plot, followed by the Bonferroni-test for post-hoc comparison if appropriate. Differences were regarded as statistically significant if $p < 0.05$. For comparisons between two independent groups used the Student-T test with the Levene test for homogeneity of variances. The association between variables was calculated using Pearson's correlation coefficient maintaining the same level of significance.

3. Results

3.1. Acoustic Startle reflex, PPI and PPF in PD patients and healthy controls.

ASR amplitude in patients with PD was higher when comparing with control subjects, but there was not a significant difference (Table 1). ASR latency also was higher in PD patients as compared to control subjects. Previous studies have reported sex differences in ASR in normal subjects, with women exhibiting lower response than men [44]. Thus, we examined sex differences across groups and within each group. We found no significant gender differences in ASR, amplitude and latency, between patients and controls (Table 1). We examined the PPI and PPF (within-subjects factors) using ANOVA with repeated measures. There is significant effect on the PPI in PD group relative to controls (Figure 1), when the prepulse-to-pulse was 60ms (PD; 24.51 ± 3.47 ; Control Group 17.13 ± 4.22) and 120 ms $p < 0.005$ (PD; 42.08 ± 4.04 ; control group 23.53 ± 4.91). A significant main effect on PPF ($p < 0.000$) was also detected (PD; 45.85 ± 3.89 ; control group 23.23 ± 4.73), (Figure 1).

	PD	Controls	PD		Controls	
			Men	Woman	Men	Woman

Startle Amplitude	74.70 ±8.82	63.02 ± 8.19	68.89 ± 9.34	81.72±10.09	68.05±11.98	58.53±11.33
Startle Latency	89.03 ±9.97	72.92 ±11.98	97.65±13.65	78.97±14.75	79.57±17.52	66.98 ± 16.57

Table 1. Mean response amplitude and latency (\pm standard error of Mean) in patients with Parkinson's disease and healthy controls.

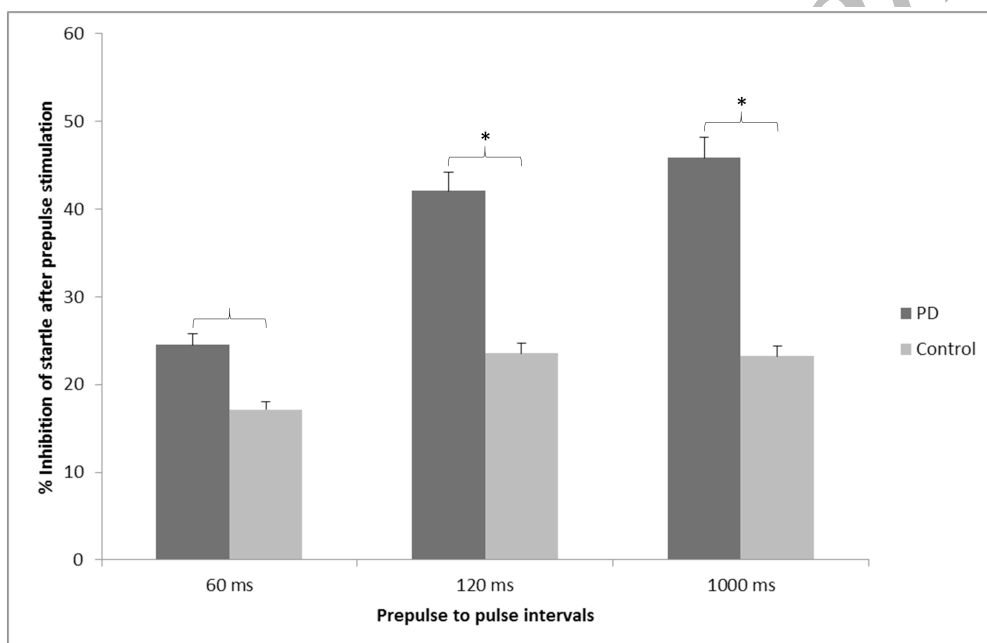


Figure 1. Mean PPI and PPF values of the experimental groups, control and Parkinson's disease (PD) group. Values represent the mean percentage of startle amplitude at different interstimulus intervals, 60 ms, 120 ms and PPF at 1000 ms. Bars represent mean values \pm S.E.M. There are significant differences (*) between groups ($p < 0.05$) when the prepulse was 120 ms and 1000 ms.

3.2. Acoustic parameters of voice PD patients and healthy controls

We analyzed the alteration in temporal speech parameters in patients with PD and healthy controls (Table 2). In the prosodic parameters analyzed, we found significant differences between control subjects and PD patients in the total duration ($p < 0.01$), phonation time ($p < 0.01$), voice pulse numbers ($p < 0.05$), voice period number ($p < 0.05$), voice break number ($p < 0.01$), and the number of pauses ($p < 0.05$). In the acoustic parameters, we found differences in the Minimum F0 between PD patients and control subjects ($p < 0.01$), and NHR ($p < 0.01$). As for the intensity of speech, we found

differences in the intensity of pronunciation (dB Voice) ($p < 0.05$) in Shimmer loc $p < (0.05)$ and Shimmer apq3 ($p < 0.05$).

In summary, prosody in Parkinson's patients is faster, less phonation time, less vowel pulses, less breaks, less breakage and less voice speech periods. There is less use of low frequencies, resulting in a lower voice vowel sound. The voice is more intense, but there is no change between pulses or voice prosody.

Group	Parameters	Control (Mean \pm SEM)	PD (Mean \pm SEM)
Temporal aspects of the speech sample	Total duration (s)*	56.60 \pm 4.84	41.78 \pm 2.39
	Phonation time (s)**	39.53 \pm 2.65	30.61 \pm 1.68
	Speech rate, syllable/s	3.43 \pm 0.22	3.22 \pm 0.11
	Articulation rate, syllables/s	4.46 \pm 0.14	4.15 \pm 0.08
Analysis of Fundamental frequency (F0)	Mean F0, (Hz)	156.74 \pm 5.25	153.09 \pm 5.51
	Minimum F0 (Hz)*	66.37 \pm 0.88	72.17 \pm 1.26
	Maximum F0, (Hz)	520.53 \pm 26.27	543.06 \pm 16.33
Acoustic Parameters	NHR**	0.21 \pm 0.02	0.13 \pm 0.10
Analysis of periods of voice	Pulses, (n)*	4791.69 \pm 319.29	3832.36 \pm 215.17
	Periods, (n)*	4684.50 \pm 314.08	3750.26 \pm 213.81
Voice intensity	Shimmer loc*	15.49 \pm .95	12.43 \pm .63
	Shimmer apqu3*	6.68 \pm .51	4.83 \pm .33
	Voice (dB) *	71.22 \pm .54	79.19 \pm 2.64
Interruption of Sound	Without voice, (%)	37.20 \pm 2.38	34.65 \pm 1.23
	Voice breaks, (n)*	95.46 \pm 6.54	70.58 \pm 3.45
	Pauses, (n)*	22.96 \pm 3.12	15.72 \pm 1.68

Table 2. Voice parameters measures PD patients and Controls. *Significant correlation level $p < 0.05$. ** Significant correlation level $p < 0.01$.

3.3. Relationship between sensorimotor gating scores and voice acoustic parameters

To determine the relationship between PPI and PPF scores and speech parameters, we performed a Pearson correlation between the ASR modulations and the temporal aspects of the speech sample, volume (intensity), and voice quality in patients with PD regarding the control group (see Table 3).

There is a significant correlation between total duration of voice, pauses numbers, unvoiced percentage and PPI and PPF in PD that is not present in controls. Thus, as linguistic prosody parameters, in PD there is a negative relationship between Total duration of Voice and PPI (prepulse-to-pulse interval 60 ms). A negative correlation was also found between unvoiced percentage and PPI (prepulse-to-pulse intervals 60 and 120 ms) and pauses number (prepulse-to-pulse interval 120 ms) in PD patients. Regarding the PPF, we found an inverse relationship between this paradigm and unvoiced percentage and number of pauses.

This pattern was not observed in healthy controls in which a positive relationship between the number of periods of voice, number of pulses, and the number of voice breaks was found at prepulse-to-pulse intervals of 120 ms. There was a positive correlation between PPF and period number of voice and pulses number.

Voice parameters	Control			PD patients		
	PPI 60	PPI120	PPF 1000	PPI 60	PPI 120	PPF 1000
Total Duration of Voice				-0.30*		
Periods number of Voice		0.41**	0.48**			
Pulses number		0.41**	0.47**			
Pauses number					-0.36**	-0.37**
Unvoiced percentage				-0.29*	-0.45**	-0.46**
Voice breaks number		0.41**				

Table 3. Correlation between PPI measurements and temporal parameters of voice (non-significance is shown as blank spaces). R-value. Pearson correlation. ** Significant correlation level 0.01 (bilateral). *Significant correlation level 0.05 (bilateral).

4. Discussion

Our results showed that the amplitude of the ASR was not significantly different between PD patients and control subjects while latencies of the ASR were slightly higher in PD patients than control, although no significant difference was found. There were changes in PPI between groups when the interval between prepulse-to-pulse was 120 ms. Our study, also showed a significant difference in PPF between patients and controls. The findings in voice analysis showed speech impairment in PD patients

compared to controls. The correlations conducted also suggest a relationship between modulations of startle and voice disorders.

4.1 Prepulse inhibition and prepulse facilitation in PD:

In the present study, we found that PD patients and control subjects had ASR with similar amplitudes and longer onset latencies. Several authors [45-47] described longer latencies in *orbicularis oculi* muscle in PD, which was prolonged in ON states and in sitting positions. Our results are consistent with the literature [28, 48-50] that suggests that, with age there is less startle reaction and PPI, which would affect healthy subjects. The PPI demonstrates the control that the basal ganglia exert over the brainstem reflexes. In PD, there is an enhancement of the blink reflex, indicating an increased filtering of sensory information. PPI circuits are controlled through the pedunculo-pontine tegmental nucleus, which regulates the excitability of the startle related structures of the reticular formation [51]. When compare to controls, PD patients showed higher prepulse inhibition at 60 ms and 120 ms, confirming our hypothesis that PD have disturbances in sensorimotor gating. Periol and coworkers [52] reported a significant difference in PPI at 120 ms when compared to healthy controls. In their study they also compare patients with Alzheimer's disease and Dementia with Lewys bodies and their results suggest an involvement of the dopaminergic subcortico-thalamo-cortical networks in PPI regulation, and more severe disruption of these networks in Dementia with Lewys bodies than in PD [52]. Also Valls-Solé and coworkers [53] report results that indicated an increased prepulse inhibition in PD patients. Excessive sensory gating in PD may reflect impaired integration of sensory inputs, resulting in impaired goal-related movements [54]. Bradykinesia in PD affects the ability to initiate and coordinate a series of motor tasks [55]. This impaired ability to inhibit motor movements justified both slowing the onset of motor responses, as well as disruption of movements once they have been initiated [56]. The impairment of the sensorimotor regions (basal ganglia, cerebral cortex, and other associated regions) to receive accurate afferents input may account for errors in the initiation, timing and range of movement [54]. The fact that individuals with PD often show an abnormal increased in muscle tone and rigidity can reflect a tendency of the central nervous system to remain in a state of alert and movement preparation, while awaiting the arrival of the afferent signal, resulting in a delayed or aberrant transition to movement execution [54,57].

We also found that PD patients showed less PPF than control group. PPF is a less understood process associated with a later stage of generalized alerting or orienting [58] and specific selective attention process [59]. According with Graham [59], the PPF reflects a generalized orienting or attention automatically elicited (where there is not selective attention to specific stimuli). The study published by Wynn [60] about PPF in schizophrenic patients showed that these patients and their siblings had lower PPF than controls, imputing this finding to an orienting deficit. Bowen and Ison [61] reported that PPF has a more peripheral motor consequence of a non-specific alerting reaction, suggesting that the pathways of the PPF may not depend on the sensory-motor processing [61]. In order to explain our findings of less PPF in PD group a cognitive evaluation of patients and their corresponding control subjects should be necessary to evaluate any type of cognitive impairment or attention disorders.

4.2 Relationship between sensorimotor gating and voice deficits in PD patients

Control of specific frequencies is learned in childhood and requires coordination of the vocal structures adjusting acoustic resonances of the vocal tract [8, 62, 63], which is a process of motor coordination affected in PD.

An estimated 70%–90% of patients with PD also develop speech or voice disorders [64] specifically hypokinetic dysarthria, characterized by monopitch, monoloudness, under articulation, and hoarseness voice [65]. Our results were consistent with these and we have observed significant differences between controls and patients with Parkinson's. As reflected in the usual language studies in PD [11, 12, 66], we found that there were disruptions in temporal aspects of the speech sample like a breakage in the prosody, poorly controlled phonation time and fewer pauses and voice breaks. Our results reflect a sharper voice, less control of low frequencies, which prevents on the other hand the noises characteristic of elderly people in the voice. Finally, the lack of control increases the intensity of sound, with a substantial increase in decibels, but at the same time, the lack of emission control causes high monotone, barely accentual variations. The study of relations with PPI values confirms that the prosodic aspects of speech characteristic of PD patients are related to the inhibitory motor problems of these patients. Not so the acoustic aspects, showing no relationship with the data obtained in the inhibitory parameters.

An inhibitory deficit means more voice breaks, percentage of periods without voice emission and emission ratio of syllables per time lowest phonation. The pathways that follow the vocalization process consist primarily of three components laryngeal activity, respiratory movements and supralaryngeal. The most important is the extrapyramidal path that connects the motor cortex – putamen - substantia nigra - parvocellular reticular formation - phonatory motoneurons [32]. The loss of motor control that holds the function of the vocal folds could explain the fluctuations of voice frequency. The position of the reticular formation and ventral parabrachial regions suggests that this area plays a crucial role in vocal motor coordination. Among the hierarchically control of vocal behavior pathways, the phonatory motoneurons input are of two types. One for motor coordination, which comes from the motor cortex and basal ganglia via the pyramidal and extrapyramidal pathway and the other for the learned vocal patterns, that has a gating function, becomes from the periaqueductal grey and cingulate cortex, structures that represent different levels of gating control.

The damage of neuronal pathways due to neuronal loss in PD might explain the deficits in startle modulation and speech. There is a correlation between these two neurophysiologic measures that might be a functional approach to show disturbance in sensory filtering. Variations in sensory filtering discriminate PD, and the combination with a set of parameters that define speech disorders in PD could be use as biomarkers for this neurological disease.

5. Conclusions

In conclusion, the ASR in PD patients is normal but the response is delayed. In contrast, the modulation of the startle appears to be abnormal. It seems that we have more evidence that pre-stimulus shuts the gate of sensory input resulting in the reduction of startle response, and this inhibitory process is related to acoustic and prosodic parameters, such as control of the low frequencies of the voice and the emission ratio of vowel sounds.

References

- [1]. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur E N, Braak E, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24(2): 197-211.

- [2]. Stoessl AJ, Neuroimaging in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 2011; 8(1): 72-81.
- [3]. Albin RL, Young AB, Penney JB, The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 1989; 12(10): 366-375.
- [4]. Braak H, Braak E, Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol* 2000; 247 (2): 3-10.
- [5]. Braak H, Rüb U, Sandmann-Keil D, et al., Parkinson's disease: affection of brain stem nuclei controlling premotor and motor neurons of the somatomotor system. *Acta Neuropathol* 2000; 99(5): 489-495.
- [6]. Blumin JH, Pcolinsky De Fau - Atkins JP, Atkins JP, Laryngeal findings in advanced Parkinson's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004; 113(4): 253-258.
- [7]. Sewall GK, Jiang J, Ford CN, Clinical evaluation of Parkinson's-related dysphonia. *Laryngoscope* 2006; 116(10): 1740-1744.
- [8]. Saxena M, Behari M, Kumaran SS, Goyal V, Narang V. Assessing speech dysfunction using BOLD and acoustic analysis in parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014 (14) 177-181.
- [9]. Ho AK, Bradshaw JL, Ianssek R, Alfredson R, Speech volume regulation in Parkinson's disease: effects of implicit cues and explicit instructions. *Neuropsychologia*, 1999; 37(13): 1453-1460.
- [10]. Ramig LO, Fox C, Sapir S, Speech disorders in Parkinson's disease and the effects of pharmacological, surgical and speech treatment with emphasis on Lee Silverman voice treatment (LSVT(R)). *Handb Clin Neurol* 2007; 83:385-399.
- [11]. Canter GJ, Speech Characteristics of Patients with Parkinson's disease: I. Intensity, Pitch, and Duration. *J Speech Hear Disord* 1963; 28: 221-229.
- [12]. Griffiths C, Bough ID Jr, Neurologic Diseases and Their Effect on Voice. *Journal of Voice* 1989; 3(2): 148-156.
- [13]. Harel B, Cannizzaro M, Snyder PJ, Variability in fundamental frequency during speech in prodromal and incipient Parkinson's disease: a longitudinal case study. *Brain Cogn* 2004; 56(1): 24-29.
- [14]. Tsanas A, Little MA, McSharry PE, Spielman J, Ramig LO, Novel speech signal processing algorithms for high-accuracy classification of Parkinson's disease. *IEEE Trans Biomed Eng* 2012; 59(5): 1264-1271.
- [15]. Martínez-Sánchez F, Trastornos del habla y la voz en la enfermedad de Parkinson. *RevNeurol* 2010; 51(09): 542-550.

- [16]. Price C J The anatomy of language: A review of 100 fMRI studies published in 2009. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010;1191:62–88).
- [17]. Ramig L, Fox C, Sapir S, Speech and Voice Disorders in Parkinson's disease. In: Olanow CW, Stocchi F, and Lang AE, Eds, *Parkinson's disease: Non-Motor and Non-Dopaminergic Features* First Edition. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. 2011; 31:346-360.
- [18]. Walsh B, Smith A, Basic parameters of articulatory movements and acoustics in individuals with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27(7): 843-850.
- [19]. Rusz J, Cmejla R, Ruzickova H, Ruzicka E, Quantitative acoustic measurements for characterization of speech and voice disorders in early untreated Parkinson's disease. *J. Acoust. Soc. Am.* 129, 350 (2011); <http://dx.doi.org/10.1121/1.3514381>
- [20]. Abbruzzese G, Berardelli A, Sensorimotor integration in movement disorders. *Mov Disord.* 2003; 18(3): 231-240.
- [21]. Valls-Sole J, Valldeoriola F, Neurophysiological correlate of clinical signs in Parkinson's disease. *Clin Neurophysiol* 2002; 113(6): 792-805.
- [22]. Koch M, The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* 1999; 59(2): 107-128.
- [23]. Walker DL, Davis M, Anxiogenic effects of high illumination levels assessed with the acoustic startle response in rats. *Biol Psychiatry* 1997; 42(6): 461-471.
- [24]. Hoffman HS, Ison JR, Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Rev* 1980; 87(2): 175-189.
- [25]. Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL, Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology* 2001; 156(2-3): 194-215.
- [26]. Graham F, Murray GM, Discordant effects of weak prestimulation on magnitude and latency of the reflex blink. *Physiological Psychology*, 1977; 5(1): 108-114.
- [27]. Anthony BJ, Graham FK, Blink reflex modification by selective attention: Evidence for the modulation of automatic processing. *Biological Psychology* 1985; 21(1): 43-59.
- [28]. Kumari V, Aasen I, Sharma T, Sex differences in prepulse inhibition deficits in chronic schizophrenia. *Schizophr Res* 2004; 69(2-3): 219-235.
- [29]. Simonyan K, Horwitz B, Jarvis ED. Dopamine regulation of human speech and bird song: a critical review. *Brain Lang* 2012;122(3):142-150.[doi: 10.1016/j.bandl.2011.12.009](https://doi.org/10.1016/j.bandl.2011.12.009).

- [30]. Midi I, Dogan M, Koseoglu M, Can G, Sehitoglu MA, Gunal DI. Voice abnormalities and their relation with motor dysfunction in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 2008; 117:26-34.
- [31]. Silva LF, Gama AC, Cardoso FE, Reis CA, Bassi IB. Idiopathic Parkinson's disease: vocal and quality of life analysis. *Arq Neuropsiquiatr*. 2012 ;70(9):674-9.
- [32]. Jürgens U. Neural pathways underlying vocal control. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2002; 26:235-236.
- [33]. Jürgens U, Kirzinger A. The laryngeal sensory pathway and its role in phonation: a brain lesioning study in the squirrel monkey. *Exp Br Res* 1985;59:118–124.
- [34]. McCulloch TM, Flint PW, Richardson MA, Bishop MJ. Lidocaine effects on the laryngeal chemoreflex, mechanoreflex, and afferent electrical stimulation reflex. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992;101:583– 589.
- [35]. Nagai H, Ota F, Connor NP. Effect of deficits in laryngeal sensation on laryngeal muscle biochemistry. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005;114:352–360.
- [36]. Hammer MJ, Barlow SM, Laryngeal somatosensory deficits in Parkinson's disease: implications for speech respiratory and phonatory control. *Exp Brain Res* 2010; 201(3): 401- 409.
- [37]. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. A clinico-pathological study of 100 cases. *JNNP* 1992;55:181-184.
- [38]. Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, et al., Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Scale presentation and clinimetric testing results. *Movement Disorders* 2008; 23(15): 2129-2170.
- [39]. Hoehn MM, Yahr MD, Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967; 17(5): 427-442.
- [40]. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-Mental State": A practical method for grading the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 1975; 12: 189-198.
- [41]. Meilán JJ, Martínez-Sánchez F, Carro J, López DE, Millian-Morell L, Arana JM. Speech in Alzheimer's disease: can temporal and acoustic parameters discriminate dementia? *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2014;37(5-6):327-334.
- [42]. Mertens P. Le prosogramme: une transcription semi-automatique de la prosodie. *Cahiers de l'Institut de Linguistique de Louvain* 2004; 30:7-25.

- [43]. Boersma P, Weenink D. Praat: doing phonetics by computer (versión 5.1.42). [Software] 2013. Available: <http://www.praat.org/>
- [44]. Swerdlow NR, Hartman PF, Auerbach PP, Changes in sensorimotor inhibition across the menstrual cycle: implications for neuropsychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 1997; 41(4): 452-460.
- [45]. Vidailhet M, Rothwell J C, Thompson PD, Lees A J, Marsden CD, The auditory startle response in the Steele-Richardson-Olszewski syndrome and Parkinson's disease. *Brain* 1992; 115 (4): 1181-1192.
- [46]. Kofler M, Müller J, Wenning GK, et al., The auditory startle reaction in parkinsonian disorders. *Mov Disord* 2001; 16(1): 62-71.
- [47]. Bowers D, Miller K, Mikos A, et al., Startling facts about emotion in Parkinson's disease: blunted reactivity to aversive stimuli. *Brain* 2006; 129(12): 3356-3365.
- [48]. Ellwanger J, Geyer MA, Braff DL, The relationship of age to prepulse inhibition and habituation of the acoustic startle response. *Biol Psychol* 2003; 62(3): 175-195.
- [49]. Ludewig K, Ludewig S, Seitz A, Obrist M, Geyer MA, Vollenweider FX, The acoustic startle reflex and its modulation: effects of age and gender in humans. *Biol Psychol* 2003; 63(3): 311-323.
- [50]. Kumari V, Aasen I, Papadopoulos A, et al., A comparison of prepulse inhibition in pre- and postmenopausal women and age-matched men. *Neuropsychopharmacology*, 2008; 33(11): 2610-2618.
- [51]. Braff DL, Geyer MA, Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies. *Arch Gen Psychiatry* 1990; 47(2): 181-188.
- [52]. Perriol M, Dujardin K, Derambure P, Marcq A, Bourriez JL, Laureau E, Pasquier F, Defebvre L, Destée A. Disturbance of sensory filtering in dementia with Lewy bodies: comparison with Parkinson's disease dementia and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005 Jan;76(1):106-8.
- [53]. Valls-Solé J, Muñoz JE, Valldeoriola F. Abnormalities of prepulse inhibition do not depend on blink reflex excitability: a study in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Clinical Neurophysiology* 2004;115:1527-1536.
- [54]. Bischoff-Grethe A, Crowley MG, Arbib MA, Movement Inhibition and Next Sensory State Prediction in the Basal Ganglia, In Graybiel A, DeLong M, Kitai ST Eds. *The Basal Ganglia VI Advances in Behavioral Biology* Springer US 2003; 54:267-277.
- [55]. Schindler JS, Kelly JH, Swallowing disorders in the elderly. *The Laryngoscope* 2002; 112(4): 589-602.

- [56]. Obeso I, Wilkinson L, Casabona E, et al., Deficits in inhibitory control and conflict resolution on cognitive and motor tasks in Parkinson's disease. *Exp Brain Res*. 2011; 212(3): 371-384.
- [57]. Farrell A, Theodoros D, Ward E, Hall B, Silburn P, Effects of neurosurgical management of Parkinson's disease on speech characteristics and oromotor function. *J Speech Lang Hear Res* 2005; 48(1): 5-20.
- [58]. Dawson ME, Schell AM, Beers JR, Kelly A, Allocation of cognitive processing capacity during human autonomic classical conditioning. *J Exp Psychol Gen* 1982; 111(3): 273-295.
- [59]. Graham FK, Presidential Address, 1974. The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology* 1975; 12(3): 238-48.
- [60]. Wynn JK, Dawson ME, Schell AM, McGee M, Salveson D, Green MF, Prepulse facilitation and prepulse inhibition in schizophrenia patients and their unaffected siblings. *Biol Psychiatry*, 2004; 55(5): 518-523.
- [61]. Bowen GP, Ison JR. Excision of visual cortex does not affect the facilitatory and inhibitory effects of a light flash prepulse on the acoustic startle reflex in the rat. *Behav Brain Res* 2006;168(1):114-119.
- [62]. Bunton K. Speech versus nonspeech: different tasks, different neural organization. *Semin Speech Lang* 2008;29(4):267e75.
- [63]. Wolfe J, Maëva G, John S. Vocal tract resonances in speech, singing, and playing musical instruments. *HFSP J* 2009;3(1):6e23.
- [64]. Darley FL, Aronson AE, Brown JR, Motor speech signs in neurologic disease. *Med Clin North Am*. 1968; 52(4): 835-844.
- [65]. Forrest K, Weismer G, Turner GS, Kinematic, acoustic, and perceptual analyses of connected speech produced by parkinsonian and normal geriatric adults. *J Acoust Soc Am* 1989; 85(6): 2608-2622.
- [66]. Cannizzaro M, Harel B, Reilly N, Chappell P, Snyder PJ, Voice acoustical measurement of the severity of major depression. *Brain Cogn* 2004; 56(1): 30-35.