

# EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LA PROTEÍNA RIBOSOMAL S6 EN EL SISTEMA MESOESTRIATAL DOPAMINÉRGICO EN ROEDORES: PAPEL NEUROPROTECTOR Y ENFERMEDAD DE PARKINSON



**Autora:**

Valentina Pedota Ramos

**Co-tutores:**

Domingo David Afonso Oramas

Pedro Javier Barroso Chinaa

**Departamento Ciencias Médicas Básicas  
(Área de Anatomía y Embriología Humana)**

# ÍNDICE

1	1.- INTRODUCCIÓN
1	1.1 Definición
1	1.2 Epidemiología
2	1.3 Etiología
2	1.4 Clínica
3	1.5 Diagnóstico
4	1.6 Anatomía patológica
5	1.7 Factores implicados en la vulnerabilidad celular
9	1.8 Proteína S6 ribosomal
11	2.- HIPÓTESIS 3.- OBJETIVOS
12	4.- MATERIAL Y MÉTODOS
13	4.1 Técnicas morfológicas
15	4.2 Técnicas de biología molecular
16	4.3 Análisis estadístico
16	5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN
20	6.- CONCLUSIÓN
20	7.- ¿QUÉ HE APRENDIDO EN ESTE TFG?

## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo crónico y progresivo que se caracteriza principalmente por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra (SNc), que conduce a una depleción dopaminérgica estriatal severa, siendo responsable de las principales alteraciones motoras en la enfermedad. La causa de la enfermedad es desconocida. Sin embargo, existen evidencias que sugieren múltiples factores medioambientales y genéticos. Numerosos hallazgos indican que el estrés oxidativo y el déficit mitocondrial podrían jugar un papel importante en la patogenia de la enfermedad. Por otro lado, sabemos que en la EP, las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas son las que muestran una susceptibilidad particular a la degeneración. Dentro de las mesencefálicas, las del grupo A9 (correspondientes a la SNc) son más vulnerables que las del grupo A8 y éstas, más que las del A10. Esto indica que existen diferentes grados de vulnerabilidad entre los grupos neuronales e incluso entre subpoblaciones de un mismo grupo (región rostromedial, caudo-ventral y lateral de la SNc). La identificación de los rasgos fenotípicos diferenciales que determinan que las neuronas dopaminérgicas sean particularmente susceptibles o resistentes al estrés oxidativo es esencial para el tratamiento de estos enfermos. En este trabajo, pensamos que la proteína ribosomal S6, una quinasa intracelular con un papel importante en la neuroprotección, presenta una distribución diferencial en las diferentes subpoblaciones que componen A9. Para ello, realizamos un estudio morfológico y molecular para caracterizar el fenotipo neuroquímico de esta quinasa S6 en la SNc de roedores sanos.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a chronic and progressive neurodegenerative disorder characterized mainly by degeneration of dopaminergic neurons in the compact part of the substantia nigra (SNc), leading to severe striatal dopaminergic depletion, being responsible for the main motor disturbances in the disease. The cause of the disease is unknown. However, there is evidence suggesting multiple environmental and genetic factors. Numerous findings indicate that oxidative stress and mitochondrial deficit may play an important role in the pathogenesis of the disease. On the other hand, we know that in PD, mesencephalic dopaminergic neurons show a particular susceptibility to degeneration. Within the mesencephalic neurons, those of the A9 group

(corresponding to the SNc) are more vulnerable than those of the A8 group and these more than those of the A10 group. This indicates that there are different degrees of vulnerability between neuronal groups and even between subpopulations of the same group (rostromedial, caudo-ventral and lateral regions of the SNc). The identification of the differential phenotypic traits that make dopaminergic neurons particularly susceptible or resistant to oxidative stress is essential for the treatment of these patients. In this work, we believe that the ribosomal protein S6, an intracellular kinase with an important role in neuroprotection, presents a differential distribution in the different subpopulations that compose A9. For this purpose, we performed a morphological and molecular study to characterize the neurochemical phenotype of this S6 kinase in healthy rodents SNc.

**PALABRAS CLAVE:** proteína ribosomal s6, enfermedad de Parkinson, dopamina, degeneración, vulnerabilidad celular.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 DEFINICIÓN

La Enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más prevalente en la actualidad cuya causa es desconocida. Se produce una degeneración en las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta (SNpc) (1).

Hoy en día, definimos a la EP primaria como un trastorno neurodegenerativo crónico y progresivo con una sintomatología motora caracterizada por temblor, rigidez, hipocinesia, e inestabilidad postural, debido principalmente a la degeneración de neuronas dopaminérgicas de la pars compacta de la sustancia negra, que conduce a una depleción dopaminérgica estriatal severa, siendo la responsable de las principales alteraciones motoras en la enfermedad (2).

## 1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Las estimaciones de prevalencia e incidencia de la enfermedad de Parkinson en todo el mundo varían en los diferentes estudios, debido principalmente a diferencias metodológicas pero también a diferencias genéticas y ambientales en las diferentes poblaciones estudiadas.

En una revisión sistemática, se concluye que de todos los estudios de incidencia realizados en el mundo hasta diciembre del 2001, se puede considerar una incidencia anual extraída de los estudios con metodología comparable y mejor diseñada de 17/100.000 habitantes y año, con un pico de incidencia máxima entre los 70-79 años (3).

En España son dos los estudios de **incidencia** realizados encontrando una incidencia anual es de 8,2/100.000 habitantes. Se observa una incidencia superior en varones (10,2 por 105 habitantes/año) respecto a las mujeres (4,02 por 105 habitantes/año). La mayor incidencia en los hombres es entre los 70-74 años y en las mujeres en cambio aumenta progresivamente hasta los 85 años.

En cuanto a la **prevalencia**, los estudios más cercanos a la realidad probablemente son los puerta a puerta con examen clínica posterior de los casos sospechosos. En estos la prevalencia mundial varía entre 167-5,703 por 100.000 habitantes.

En los estudios españoles la prevalencia aumenta claramente a partir de los 70 años y desciende conforme avanza la edad probablemente por la mortalidad de los pacientes (3).

En Canarias, exactamente en Tenerife, han ascendido las cifras de afectados a unos 4000, según los últimos datos del centro Neurológico Antonio Alayón (4).

### 1.3 ETIOLOGÍA

La EP parece ser el resultado de una interacción entre factores genéticos, tóxicos, infecciosos o ambientales que afectan numerosos procesos celulares. Sin embargo, se ha observado que hay una pérdida característica de células entre las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, independientemente de la causa subyacente de la enfermedad. Esto sugiere que la vulnerabilidad diferencial de estas neuronas no depende del factor desencadenante de la enfermedad en sí misma, sino de las propiedades intrínsecas de estos grupos celulares específicos.

El envejecimiento constituye el factor no modificable más importante para padecer EP. Existen semejanzas en la neurodegeneración entre la enfermedad de Parkinson (EP) y el proceso de envejecimiento. Ambos procesos podrían ser causados por una variedad de factores que incluyen alteraciones en astrocitos y microglía, mal funcionamiento de proteínas específicas, problemas en las mitocondrias, problemas en la eliminación de las células defectuosas, y daño celular causado por estrés oxidativo. De hecho, algunas proteínas como  $\alpha$ -syn, PINK1 o DJ-1, que están relacionadas con la EP, también juegan un papel en el proceso de envejecimiento (1).

### 1.4 CLÍNICA

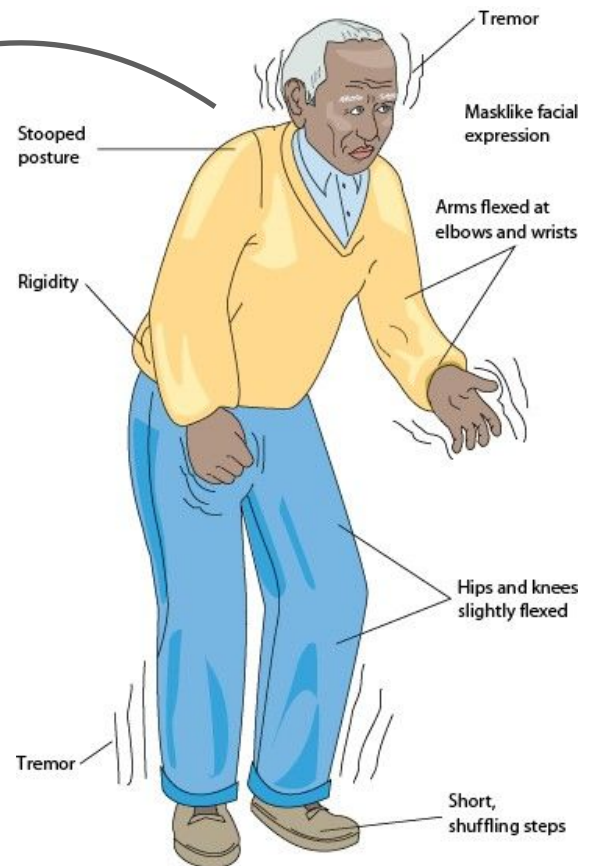
La clínica de la EP, en ocasiones, puede tener una sintomatología muy inespecífica siendo incapaz de predecir con exactitud la aparición de la enfermedad en un futuro.

Éstos síntomas se caracterizan por: malestar general, cansancio rápido, cambios sutiles de personalidad, dolor, síntomas urinarios, alteración del sueño, pérdida del olfato y alteraciones afectivas como depresión y ansiedad.

Sin embargo, **los síntomas más característicos** de la EP son los síntomas motores, que afectan a un lado del cuerpo, y se hacen bilaterales con la progresión de la enfermedad. A esto se le pueden añadir otras manifestaciones que afectan a la memoria, lenguaje, alteración de los sentidos, entre otras (5).

1. **Bradicinesia o lentitud de movimientos.**
2. **Rigidez muscular por aumento del tono muscular.**
3. **Temblor en reposo**
4. **Inestabilidad postural.**

**Figura 1.** Signos y síntomas clínicos que representan a la Enfermedad de Parkinson.



Además de los síntomas principales, también pueden asociarse **otros síntomas secundarios no motores** como:

- Síntomas psíquicos como ansiedad
- Depresión, apatía, fatiga
- Alteración de la libido
- Trastornos del sueño, entre otros síntomas

## 1.5 DIAGNÓSTICO

A pesar de los avances en neurogenética y neuroimagen funcional, la clínica sigue siendo la principal herramienta para el diagnóstico de la EP. El gold standard diagnóstico histórico, ha sido el hallazgo patológico de cuerpos de Lewy en la autopsia (6).

Las técnicas de neuroimagen ayudan al diagnóstico diferencial con otros parkinsonismos. **Estas técnicas comprenden:**

- **PET (18Fdopa) y SPECT del transportador de la dopamina (DAT  $\beta$ CIT).**
- **La ecografía transcraneal.**

Sin embargo, como bien se ha comentado anteriormente, el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson es fundamentalmente clínico y se basan en varios parámetros aceptados por la UK Parkinson Disease Society - Brain Bank (7). De esta forma podemos excluir a pacientes con parkinsonismos secundarios o asociados a otras enfermedades neurológicas o a consumo de fármacos.

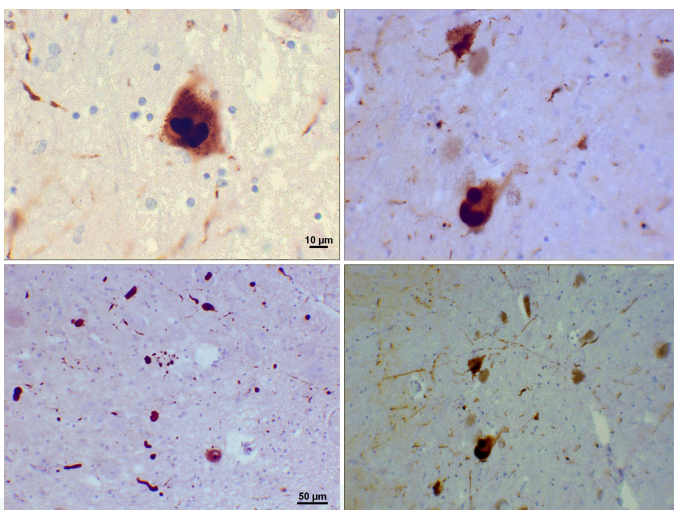
De todos los datos clínicos, son la asimetría y la respuesta a levodopa los más discriminativos para el diagnóstico diferencial entre la EP y otros parkinsonismos.

## 1.6 ANATOMÍA PATOLÓGICA

Desde el punto de vista anatomopatológico y neuroquímico, la enfermedad se caracteriza por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. En este sentido, el neuropatólogo debe alcanzar la mayor correlación clinicopatológica, puesto que el diagnóstico definitivo es histopatológico, es decir, post mortem. Otra característica de esta enfermedad es la formación de los cuerpos de Lewy (depósitos proteicos intracelulares formados por componentes del citoesqueleto que se acumulan desde el estado pre-sintomático de la enfermedad) en el citoplasma de las neuronas que sobreviven, así como por los acúmulos de proteínas como la ubiquitina y la  $\alpha$ -sinucleína (8) y por el descenso de los niveles de dopamina en el estriado.

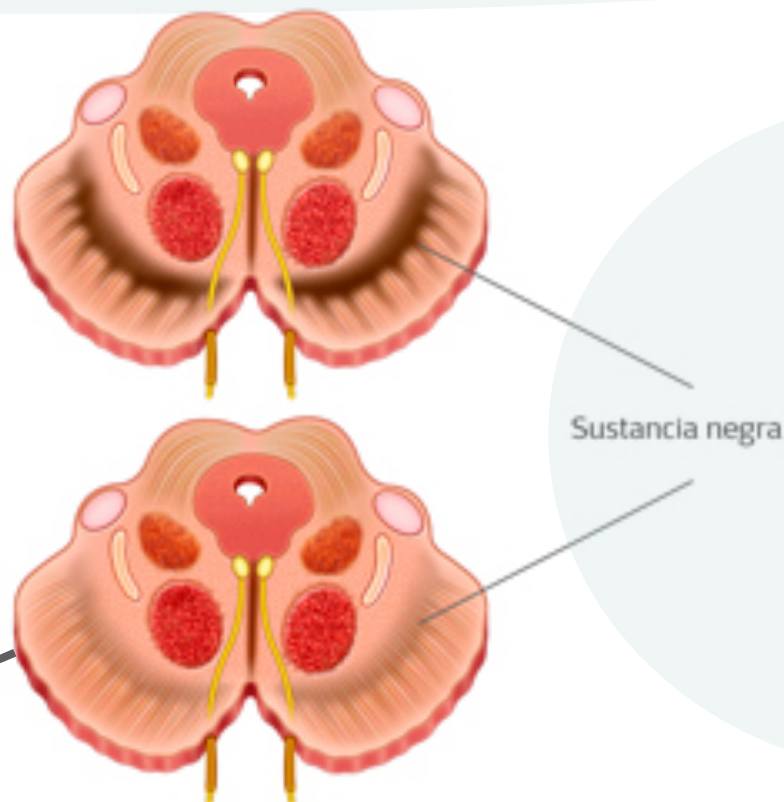
Se ha sugerido que para que la degeneración de las neuronas nigroestriatales de la SNc produzca síntomas parkinsonianos es preciso que el número de células se reduzcan al menos en un 80% (9). Con una pérdida neuronal inferior los mecanismos compensadores tendrían entidad suficiente para evitar la aparición de deficiencias funcionales.

Sólo en el momento en el que la compensación resultara insuficiente comenzarían a aparecer los primeros síntomas de la enfermedad. Actualmente, se sabe que la neurodegeneración en la EP no sólo afecta a la SNc. Idénticas lesiones aparecen en otros núcleos pigmentados y no pigmentados del sistema nervioso, como los núcleos dopaminérgicos hipotalámicos, sistema noradrenérgico (neuronas ceruleocorticolímbicas), sistema serotoninérgico (proyección ascendente de los núcleos de rafe) y sistema colinérgico (neuronas septo-hipocámpicas y de proyección del núcleo basal de Meynert). Los cuerpos de Lewy y la degeneración neuronal pueden localizarse también en la corteza cerebral, asta intermedio lateral simpática y ganglios simpáticos. No hay lesiones estriatales ni palidales, es decir, se trata de un parkinsonismo por lesión dopaminérgica presináptica.



**Figura 2.** Fotomicrografías de regiones de la sustancia negra en paciente con EP. Imágenes superiores: inclusiones intraneuronales de alfa-sinucleína agregadas formando cuerpos de Lewy. Las imágenes inferiores: cuerpos de Lewy en forma de filamentos y cuerpos de Lewy redondeados de varios tamaños.

**Figura 3.** Mesencéfalo de humano donde se observa en ambos hemisferios la sustancia negra en cerebro normal (arriba) vs. sustancia negra con neuronas dopaminérgicas degeneradas (abajo).



## 1.7 FACTORES IMPLICADOS EN LA VULNERABILIDAD CELULAR

Aunque la enfermedad de Parkinson se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, no todas las neuronas de este tipo degeneran en esta enfermedad. Esto indica que ciertos factores específicos hacen que algunas subpoblaciones de neuronas dopaminérgicas sean más propensas a sufrir la enfermedad. Se ha demostrado que las neuronas más vulnerables son particularmente susceptibles al estrés oxidativo y el mal funcionamiento de las mitocondrias. Estos dos eventos parecen ocurrir en la EP y podrían explicar por qué algunas neuronas dopaminérgicas degeneran mientras que otras no.

Existen evidencias que sugieren que, en la sustancia negra existen el doble de carbonil-proteínas (marcador de oxidación proteica) que en otras regiones del cerebro. Y que, característicamente en la EP, los valores de dicha carbonil-proteínas y otros productos de oxidación aumentan hasta 10 veces los valores normales. Ésto quiere decir que las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra son especialmente susceptibles al estrés oxidativo (10).

A su vez, dentro de las mesencefálicas, las del grupo A9 (correspondientes a la sustancia negra) son más vulnerables que las del grupo A8 (RRF, campo retrorrúbico) y éstas más que las del

A10 (constituído por el área tegmental ventral (ATV), núcleo parabraquial pigmentado (PBP), núcleo paranigral (PN), núcleo rostral (RLi) y caudal (CLi) lineal y núcleo interfascicular (IF)). Además, dentro del grupo A9, las situadas en la región caudal, lateral y ventral degeneran más precozmente que las situadas rostral, medial y dorsalmente (11). Esto indica que existen diferentes grados de vulnerabilidad entre los grupos neuronales e incluso entre subpoblaciones de un mismo grupo. La identificación de los rasgos fenotípicos diferenciales que determinan que las neuronas dopaminérgicas sean particularmente susceptibles o resistentes al estrés oxidativo es esencial en el futuro del tratamiento de estos enfermos.

Considerando la literatura actual sobre la EP, obtenidos tanto de cerebros parkinsonianos como de modelos experimentales, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas es debida a la interacción de diferentes factores que podemos clasificar de la siguiente forma:

- **Intrínsecos:**

Dependientes del fenotipo de las neuronas dopaminérgicas, como posibles diferencias en su actividad metabólica, metabolismo y manejo de la dopamina, coexpresión de proteínas fijadoras de calcio intracelular, cotransmisores, defensas antioxidantes (expresión de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa), presencia de receptores de glutamato y citoquinas, etc, que pueden desencadenar o aumentar el estrés oxidativo (12).

- **Extrínsecos locales:**

Dependientes de las células del entorno, tanto otras poblaciones neuronales (GABAérgicas, glutamatérgicas, noradrenergicas) como de células gliales (astroglía y microglía) que bien por exceso (liberación de glutamato, óxido nítrico, interleuquinas, factor de necrosis tumoral, etc.) o por defecto (reducción en la producción de neurotrofinas) contribuyen a la degeneración dopaminérgica. Hay evidencias que sugieren que el estrés oxidativo puede originarse primero en células gliales antes que en neuronas, y una alteración de la función glial puede contribuir al proceso patológico que ocurre en la EP (13).

- **Extrínsecos distantes:**

Dependientes de proyecciones desde otros centros de carácter glutamatérgico, GABAérgico, colinérgico, aminérgico, etc. Entre ellas, las aferencias excitatorias glutamatérgicas ocupan un papel relevante. Diferentes trastornos neurológicos incluyendo la EP se han relacionado con la



excitotoxicidad (14). La excitotoxicidad del glutamato está mediada por la activación excesiva de sus receptores. El mayor protagonismo en la excitotoxicidad se ha atribuido a los receptores ionotropos tipo NMDA.

Teniendo en cuenta ésto, a continuación vamos a exponer los diversos **factores que intervienen en la vulnerabilidad celular de las poblaciones dopaminérgicas:**

### 1. Alfa-sinucleína ( $\alpha$ -syn):

Es una proteína pequeña y soluble que se encuentra en los extremos de las neuronas y ayuda a regular la liberación de vesículas presinápticas. Las mutaciones que afectan a la  $\alpha$ -sinucleína son las más estudiadas en relación a la EP. Sin embargo, no se sabe exactamente cómo estas variantes genéticas contribuyen a la acumulación de ésta proteína formando los cuerpos de lewy y en consecuencia produciendo la EP. Aparentemente, ésta **acumulación** puede producir muerte neuronal, pero también, el **mal plegamiento** de la alfa sinucleína acumulada, puede influir tanto en la función autofágica como en la mitocondrial.

En el cerebro, la  $\alpha$ -sinucleína existe en formas monoméricas, oligoméricas y más agregadas, como las fibrillas.

### 2. Dopamina y estrés oxidativo:

La dopamina es sintetizada a partir de la tirosina por la actividad de la tirosin-hidroxilasa (enzima limitante de la síntesis de dopamina) que mantiene los niveles de dopamina en el citosol y, posteriormente, es metabolizada por la MAO (monoamino-oxidasa) que es la principal responsable de la inactivación de DA. Ambas vías metabólicas (enzimática y autoxidación) pueden ser las responsables del estrés oxidativo, puesto que, pueden dar lugar a radicales libres que, en condiciones normales deben ser manejados por los sistemas antioxidantes celulares. En la EP, para compensar la caída dopaminérgica, aumentan su síntesis pudiendo dar lugar a un exceso de compuestos oxidados que sobrepasan la capacidad de los sistemas de protección.

Por otro lado, sabemos que los niveles de dopamina intracelular dependen de su recaptación en el espacio extracelular. De ésta función se encargan: el transportador de membrana de dopamina (DAT) cuya función es recaptar la dopamina desde el espacio sináptico hacia el citosol. En cambio, el transportador vesicular de monoaminas (VMAT2) se encarga de introducirlo en las vesículas a nivel de los terminales dopaminérgicos, reduciendo los niveles de dopamina intracelular, lo que se

traduce *a priori* en un mecanismo neuroprotector al disminuir la oxidación de la dopamina. Por lo tanto, al aumentar los niveles de dopamina o tóxicos en el citosol, DAT tendrá un papel lesivo, mientras que VMAT2, al almacenarlos en las vesículas y reducir sus niveles en el citosol, éste tendría un papel neuroprotector (15).

En conclusión, el delicado equilibrio entre la protección oxidativa y la capacidad de mitofagia en diferentes regiones del cerebro podría contribuir a los patrones patológicos específicos de la región del cerebro en la EP (16).

### 3. Receptores glutamatérgicos:

El glutamato es un neurotransmisor excitatorio más importante a la vez que un potente neurotóxico. La excitotoxicidad del glutamato está mediada por la activación de sus receptores. Existen dos clases de receptores glutamatérgicos: ionotópicos (unidos a canales iónicos) y metabotópicos (unidos a proteínas G). Según el tipo de agonista al que son sensibles, los receptores ionotópicos se han clasificado en tres tipos: N-metil-D-aspartato (NMDA), alfa amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) y cainato. El mayor protagonismo en la excitotoxicidad se ha atribuido a los receptores NMDA. Diferentes trastornos neurológicos incluyendo la EP se han relacionado con la excitotoxicidad (14).

El efecto dañino del glutamato en la EP puede ejercerse en diferentes frentes. Por un lado, participando en el propio proceso degenerativo ya que trastornos en la cadena respiratoria mitocondrial inducen toxicidad del glutamato a concentraciones más bajas de lo habitual debido a la liberación del bloqueo del Mg en los canales de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup> del receptor NMDA, con la consiguiente entrada de estos iones en la neurona. El exceso de Ca<sup>++</sup> intracelular puede inducir la producción de radicales libres, activación de diferentes enzimas (fosfolipasas, proteasas, endonucleasas, óxido nítrico sintasa, etc.), mayor deterioro de la cadena respiratoria mitocondrial y activación de los mecanismos de muerte neuronal (17). La SN recibe aferencias glutamatérgicas de la corteza cerebral, del núcleo pedúnculo pontino tegmental (PPTg) y, sobre todo, del subtálamo. La denervación dopaminérgica del STR produce una desinhibición y sobreactivación del subtálamo, y éste un influjo excitatorio excesivo sobre las neuronas dopaminérgicas de la SN, haciéndolas descargar en ráfagas (18).

La existencia de receptores glutamatérgicos en las neuronas dopaminérgicas es crítica para que se produzcan estos efectos.



#### 4. Relación entre los pesticidas y la enfermedad de Parkinson:

Se ha investigado la posible relación entre la exposición a pesticidas y el desarrollo de la EP. Los estudios sugieren que la exposición a ciertos pesticidas pueden aumentar el riesgo de desarrollar la EP. Se piensa que los pesticidas acceden al cuerpo mediante inhalación y, posteriormente, iniciarán la patogenia en el bulbo olfatorio, extendiéndose con el tiempo hacia la sustancia negra, contribuyendo a la formación de cuerpos de lewy. Por otro lado, los pesticidas en el cerebro pueden causar estrés oxidativo y daño celular, lo que contribuye al desarrollo de EP (19).

### 1.8 PROTEÍNA S6 RIBOSOMAL Y NEUROPROTECCIÓN

Los ribosomas de las células eucariotas están compuestos por dos subunidades: 40S (pequeñas) y 60S (grandes). La proteína ribosomal S6 (S6 o S6K) es una de las 33 proteínas que junto con una molécula de 18S rRNA comprenden la subunidad ribosomal 40S. La proteína S6 está implicada en la transducción de señales relacionadas con el crecimiento y la proliferación celular (20). Este proceso requiere la fosforilación en la serina 235 y 236 de la S6 que puede ser llevado a cabo por PI3K/AKT y/o MAPK/ERK (21).

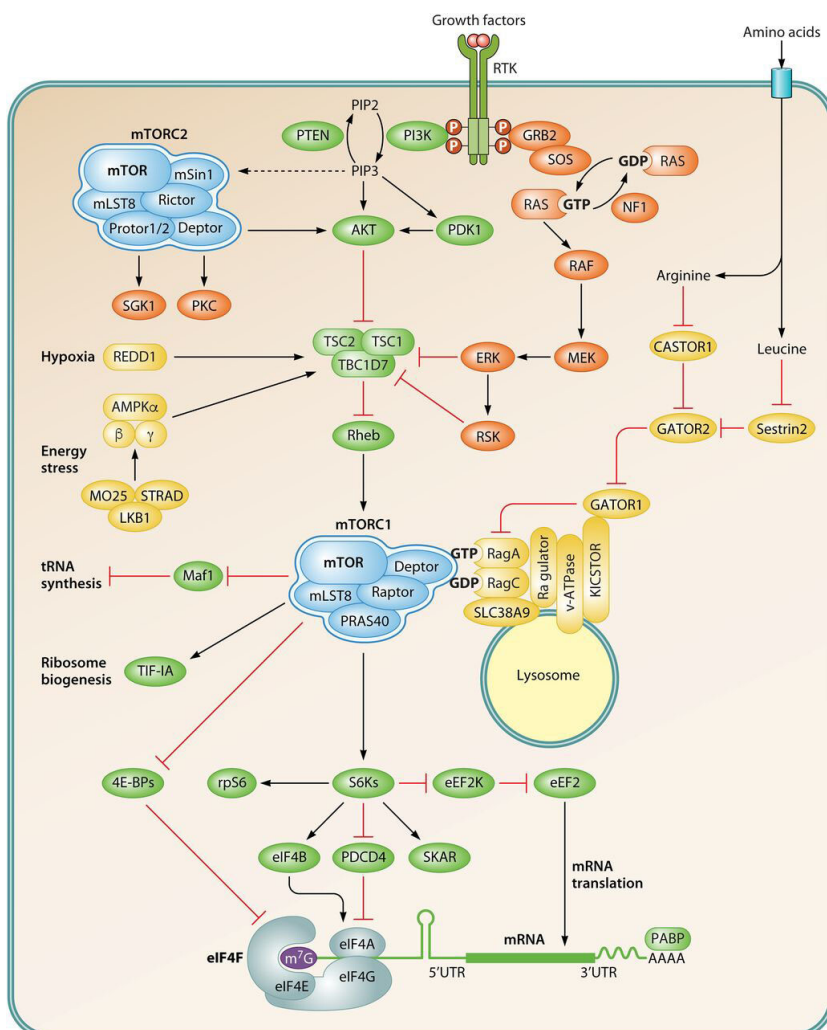
Estudios realizados “*in vitro*” demuestran que S6 puede ser regulado a través de MAPK/ERK que se encarga de fosforilar el complejo p90 S6 quinasa, independientemente del complejo mTOR (21, 22). Sin embargo, otros autores sugieren que la regulación de S6 puede ser a través del complejo p70 S6 quinasa mediado por PI3/AKT/mTOR (20). El aumento de S6 fosforilado en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas se relaciona con una mayor resistencia a la degeneración y puede ser una diana terapéutica potencial para tratar enfermedades neurodegenerativas (23). Por el contrario, la desregulación de estas cascada de señalización intracelular puede llevar a cabo una traducción errónea que puede llevar a múltiples enfermedades y entre ellas la EP.

Hasta la fecha, el papel neuroprotector de la proteína ribosomal S6 en la EP sigue siendo un tema de investigación clave y actualmente no se comprende completamente. Sin embargo, algunos estudios sugieren que la activación de la vía de señalización de la proteína ribosomal S6 podría tener efectos beneficiosos en la prevención de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, que se pierden en la EP, ya que aunque es una proteína ubicua en todo el sistema nervioso, se expresa ampliamente en dichas neuronas dopaminérgica mesoestriatales. Sin embargo, no sabemos si se expresa, de igual forma en todas las subpoblaciones neuronales de la SNc (SNcrn, SNcv, SNcL, ATV) o por el contrario, existe una expresión diferencial entre ellos, lo que explicaría en parte, la

degeneración diferencial encontrada entre las diferentes poblaciones neuronales que componen la SNc en pacientes con Parkinson.

Actualmente, se ha demostrado que la activación de la proteína ribosomal S6 puede aumentar la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en modelos animales de la EP (24) y que la administración de agentes, entre ellos, factores trófico como GDNF o BDNF e incluso la activación de receptores dopaminérgicos, tales como D2 y D3 (25), pueden activar o fosforilar la proteína ribosomal S6, lo que mejora la función motora en estos modelos. La proteína S6, puede proteger a las neuronas dopaminérgicas de la muerte celular inducida por diferentes factores estresantes, como la exposición a toxinas o la falta de nutrientes (26).

En conclusión, podemos indicar que la proteína S6 ribosomal es un mediador clave en la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, y su activación se ha relacionado con la supervivencia neuronal y la prevención de la muerte celular. Además, la proteína ribosomal S6 tiene la capacidad para regular la homeostasis proteica, así como intervenir en procesos celulares que son importantes para mantener la salud neuronal y prevenir la acumulación de proteínas anormales que pueden ser tóxicas para las células (27)



**Figura 4.** Esquema que representa las vías de señalización PI3K/AKT y ERK1/2 capaces de modular mTOR, así como, genes de neuroprotección, tales como la proteína ribosomal S6.

## 2. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestra **hipótesis** de trabajo es que:

- ➔ La vulnerabilidad diferencial que encontramos en la sustancia negra en pacientes con Parkinson se debe a múltiples factores, tanto externos como internos. Dentro de los factores internos, sabemos que la proteína S6 juega un papel importante en la neuroprotección de las neuronas dopaminérgicas mesoestriatales en la EP, ya que existen evidencias que así lo avalan, destacando su papel en la señalización celular y en la regulación del crecimiento y de la supervivencia celular.
- ➔ Por otro lado, sabemos que la disfunción de S6 puede contribuir a la aparición de diversas enfermedades neurodegenerativas.

Nuestra principal hipótesis es que existe un patrón diferencial de la expresión de S6 (proteína y ARN mensajero) entre las diferentes subpoblaciones neuronales que componen la sustancia negra y que además coincide con el patrón de degeneración que caracteriza la EP (ATV>SNcrn>SNcvL). Estas diferencias pueden producirse a nivel post-transcripcional e incluso a nivel post-traduccional. Para ello, estudiaremos principalmente los “*sitios de autofosforilación*” ya que determinan su *activación funcional*, tales como la *serina 235/236*, y paralelamente analizaremos los niveles del ARNm de S6. Para confirmar esta hipótesis, hemos realizado un estudio morfológico y molecular de la proteína ribosomal S6 (proteína y ARN mensajero) en la sustancia negra en roedores sanos (rata y ratón).

## 3. OBJETIVOS

- ➔ Estudiar la expresión basal de la proteína ribosomal S6 y su autofosforilación en Ser 235/236 en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra en rata sana, mediante el uso de técnicas morfológicas.
- ➔ Estudiar la expresión del ARN mensajero de S6 en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra en ratón sano, mediante el uso de técnicas de biología molecular (PCR).
- ➔ Estudiar si estas posibles diferencias de expresión están mediadas por mecanismos epigenéticos. Este último desafío, simplemente es un planteamiento futuro, que será abordado por el equipo de investigación con el que hemos realizado este trabajo de TFG, debido a la

complejidad de las técnicas a desarrollar. La línea de investigación se centrará en hacer un estudio profundo sobre el estado actual de la epigenética y la EP, teniendo en cuenta las posibilidades que ofrece este campo a la hora de buscar nuevas soluciones para enfrentarnos a esta patología.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

- **Muestras de roedores:**

En este estudio usamos ratas Sprague-Dawley (n= 5), machos con un peso comprendido entre 250-300 gramos y ratones C57BL/6J (n=5), machos con un peso comprendido entre 18- 25 gramos. Los animales se mantuvieron en grupos de 2-3 por jaula, en condiciones óptimas de temperatura, ciclos de luz/oscuridad y acceso a alimentos. El uso de animales para este estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de La Laguna (CEIBA2013-0083) y por consiguiente cumple con la normativa de la directiva del Consejo de la Comunidad Europea del 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE) con respecto al cuidado y uso de animales para fines científicos.

Los animales se anestesiaron profundamente con una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron transcardialmente con solución salina al 0,9% heparinizada y enfriada con hielo, seguida de paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato con pH 7,4. Los cerebros se extrajeron y almacenaron durante la noche en el mismo fijador a 4°C, se crioprotegieron en una serie graduada de soluciones de sacarosa-PBS y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Los cerebros se diseccionaron en múltiples bloques, considerando sólo las secciones con el mesencéfalo que contiene la sustancia negra. Se utilizó el atlas cerebral de rata y ratón de Paxino y Franklin en coordenadas estereotácticas como referencia para obtener los bloques. Los bloques de mesencéfalo se sumergieron durante la noche a 4 °C en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% en el mismo tampón. Se cortaron secciones coronales (20 µm) con un micrótopo de congelación, se recogieron en series paralelas de 8-10 y se procesaron para inmunohistoquímica de la TH (enzima limitante de la síntesis de dopamina y marcador específico de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en rata y ratón), y también para inmunofluorescencia doble de la TH en combinación con la proteína ribosomal S6 (Ser 235/236) en rata.

- **Muestras de humanos:**

También estudiamos 2 cerebros de humanos adultos (1 varón de 55 años y 1 mujer de 63 años de edad) procedentes de donaciones a nuestro Departamento de Anatomía, sin historia clínica ni hallazgos patológicos sugestivos de enfermedad neurológica o psiquiátrica. Se obtuvieron según las directrices nacionales en España y bajo la supervisión del Comité Ético de la Universidad de La Laguna, de acuerdo con la Declaración de Helsinki, 1975.

En este estudio se utilizaron secciones coronales de mesencéfalo que se extrajeron tras un periodo post-mortem de  $30,2 \pm 6,4$  horas. El análisis macroscópico reveló que cada bloque contenía la sustancia negra. Al igual que en el estudio morfológico de roedores, se utilizó un atlas de cerebro humano como referencia para obtener los bloques. Las piezas se lavaron brevemente en PBS y se sumergieron inmediatamente en paraformaldehído al 4% en PBS durante 5 días a 4°C. Se crioprotegieron mediante inmersión sucesiva en sacarosa al 10%, 20% y 30% en PBS (24 horas cada una) y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Los bloques se cortaron en secciones coronales de 50  $\mu\text{m}$  de grosor utilizando un micrótopo de congelación. Las secciones se dispusieron en ocho series consecutivas, que se procesaron para la inmunohistoquímica de la TH.

Para aumentar la relación señal-ruido en inmunohistoquímica, se incubaron las secciones flotantes en citrato sódico 10 mM, pH 8,5, a 80°C durante 30 minutos. Tras enfriarse a temperatura ambiente, las secciones se sumergieron en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 30 minutos para inactivar la peroxidasa endógena y se lavaron varias veces en PBS. En este caso, se realizó una inmunohistoquímica de TH para la detección de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

## 4.1 TÉCNICAS MORFOLÓGICAS

Teniendo en cuenta que la sustancia negra contiene otros tipos celulares (neuronas GABAérgicas), además de las neuronas dopaminérgicas, usamos la inmunohistoquímica simple para identificar las neuronas dopaminérgicas (TH+). Por otro lado, quisimos estudiar si existe co-expresión de TH con la proteína ribosomal S6, así como, si existen diferencias en los niveles de fosforilación en Ser 235/236 a lo largo de la sustancia negra de la rata. En este caso, usamos doble inmunofluorescencia con anticuerpos comerciales específicos para TH y S6.

- **Inmunohistoquímica simple para TH:**

Teniendo en cuenta que las secciones flotantes se sumergieron en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 30 minutos para inactivar la peroxidasa endógena, y se incubaron en suero normal de cabra al 4% (NGS, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) en PBS que contenía 0,05% de Triton X-100 (TX-100, Sigma) durante 60 minutos a RT, y luego se dejaron toda la noche en PBS que contenía 2% de NGS y un anticuerpo monoclonal anti-TH de ratón (1:5,000; Sigma). Tras varios aclarados, las secciones se incubaron durante 2 horas en antisuero anti-ratón de cabra biotinilado (1:1000, Jackson ImmunoResearch) y NGS 1:200 en PBS.

Las inmunorreacciones fueron visibles tras incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en ExtrAvidina-peroxidasa (1:5000, Sigma) en PBS, y tras 10 minutos en 0,005% de tetrahidrocloreuro de 3'-3'-diaminobencidina (DAB, Sigma), 0,05% de níquel amónico y 0,001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tampón cacodilato 0,05N pH 7,6. Tras varios lavados en PBS, las secciones se deshidrataron, se aclararon en xileno y se cubrieron con DPX (BDH Chemicals, Poole, Inglaterra). Las neuronas inmunoteñidas con TH eran visibles en todos los niveles rostral-caudal de la sustancia negra, tanto en humano como en rata y ratón.

- **Doble inmunofluorescencia:**

Para poder cumplir los objetivos planteados en este trabajo, realizamos una doble inmunofluorescencia en la sustancia negra para estudiar la co-expresión de S6 (Ser235/236) en las neuronas dopaminérgicas (TH+) y su patrón de expresión, utilizando diferentes anticuerpos comerciales.

Para la doble inmunofluorescencia, las secciones de mesencéfalo se permeabilizaron siguiendo el mismo procedimiento que para la inmunohistoquímica. Utilizando la misma solución tampón, las secciones se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios específicos: se combinó un anticuerpo monoclonal anti-TH de ratón (1:2,000; Sigma) con un anticuerpo policlonal anti-S6 (Ser 235/236) de conejo (S2211; Cell Signalling Technology; 1:2000) durante 24 horas a RT. Tras varios enjuagues en PBS, las secciones se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución de cóctel de anticuerpos conjugados con fluorocromos que contenía IgG anti-ratón de cabra conjugada con Alexa 546 para TH (1:200, Molecular Probes-Invitrogen) e IgG anti-conejo de cabra conjugada con Alexa 488 para S6 (1:200, Molecular Probes-Invitrogen). Tras

varios lavados en PBS, las secciones de mesencéfalo se montaron con Vectashield Mounting Medium que contenía DAPI (Southernbiotech, Birmingham, AL).

La inmunofluorescencia se examinó con un microscopio confocal de barrido láser utilizando los filtros adecuados (RRID: SC\_R\_0168840; Olympus FV1000, Hamburgo, Alemania). La intensidad del marcaje inmunofluorescente del S6 (Ser 235/236) se cuantificó utilizando el programa ImageJ 1.53c. Se seleccionaron al azar doce campos de 220  $\mu\text{m}$  x 220  $\mu\text{m}$  de células confluentes al 70-80% de, al menos, seis secciones de cada condición experimental y tres experimentos diferentes. Las imágenes se adquirieron a 60X (1024 x 1024 píxeles) y se analizaron áreas cuadradas de 3  $\mu\text{m}$  x 3  $\mu\text{m}$ , incluidos el soma y las neuritas, de al menos 10 células seleccionadas al azar por campo. La intensidad del marcaje fluorescente se expresa en pixels (densidad/  $\mu\text{m}$ ).

## 4.2 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

- **Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)**

Se realizaron estudios de PCR en mesencéfalos obtenidos de ratones machos intactos adultos, con pesos comprendidos entre 18-25 gramos (n=5). Los tejidos se disecaron en hielo usando un bloqueador cerebral. El ARN se extrajo utilizando el método de fenol ácido. Se transcribieron 2  $\mu\text{g}$  de ARN total después de la desnaturación térmica (5 min, 65°C) y el apareamiento de los cebadores oligo-dT para S6 (F: AAGGTGGAACCTCCCTTTAAGC y R: GGTATTCCACAGGGGTCTGAGG). Se utilizó la transcriptasa inversa AMV (Roche Diagnostics) para la síntesis de cDNA, bajo las condiciones recomendadas por el fabricante, en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . En la PCR, como control para la cantidad de cDNA sintetizado en diferentes muestras, se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:5 del cDNA como plantilla para la amplificación de PCR de GAPDH (F: TGGTGAAGCAGGCATCTGAG R: TGAAGTCGCAGGAGACAACC), un gen constitutivamente expresado.

También se usó 1  $\mu\text{L}$  de cDNA no diluido para amplificar S6 en tubos de 25  $\mu\text{L}$  de volumen final de reacción. Las reacciones de amplificación incluyeron 0,2 mM de dNTP, 0,5  $\mu\text{L}$  de cada cebador, 0,5 U de la polimerasa Taq de ADN (Promega) y 1X tampón de PCR pH 9.0, con 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  final. Se realizaron 30 ciclos de los perfiles de temperatura siguientes en un termociclador MJR: 94°C (1 min), 65°C (1 min), 72°C (1 min) para la amplificación de GAPDH, y 94°C (1 min), 58°C (1 min), 72°C (1 min) para la amplificación de S6. Quince microlitros del



producto de PCR se separaron en geles de acrilamida al 5%, se tiñeron con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio y se capturaron imágenes digitales bajo luz UV.

### 4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron con el programa Graph Pad Prism 5 (RRID: SCR\_002798; San Diego, CA) y se presentaron como media ± SEM. Brevemente, se realizó la prueba de Kolmogorv-Smirnov para evaluar si los cambios en la señal para la proteína S6 (Ser235/236) entre SNerm vs SNcL en ratas control (n=5) o ARNm en ratones control (N=5), seguían un patrón de normalidad. En los casos de distribución normal, se utilizó la T de Student para comparar las medias, y la U de Mann-Whitney para los datos no paramétricos. Se consideró un nivel de \*p<0,05 y \*\*p<0,01 crítico para asignar significación estadística.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

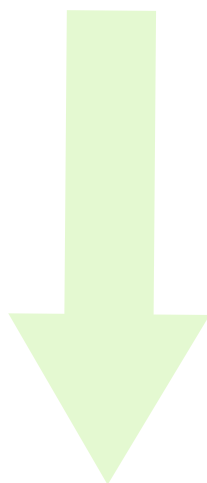
Teniendo en cuenta estos antecedentes, quisimos estudiar la expresión basal de la proteína ribosomal S6 (ARNm y proteína) en la sustancia negra en roedores, una quinasa que se le ha atribuido un papel neuroprotector en el sistema nervioso. La proteína ribosomal S6 puede ser modulada a través de receptores de membrana, como es el caso de los autorreceptores dopaminérgicos D2R/D3R, e incluso, por receptores tirosina quinasa (RET), ampliamente estudiado por su papel en la acción mediada por factores tróficos como es el caso de GDNF, capaz de proteger las neuronas dopaminérgicas en modelos animales de EP y llegar a restaurar el sistema mesostriatal.

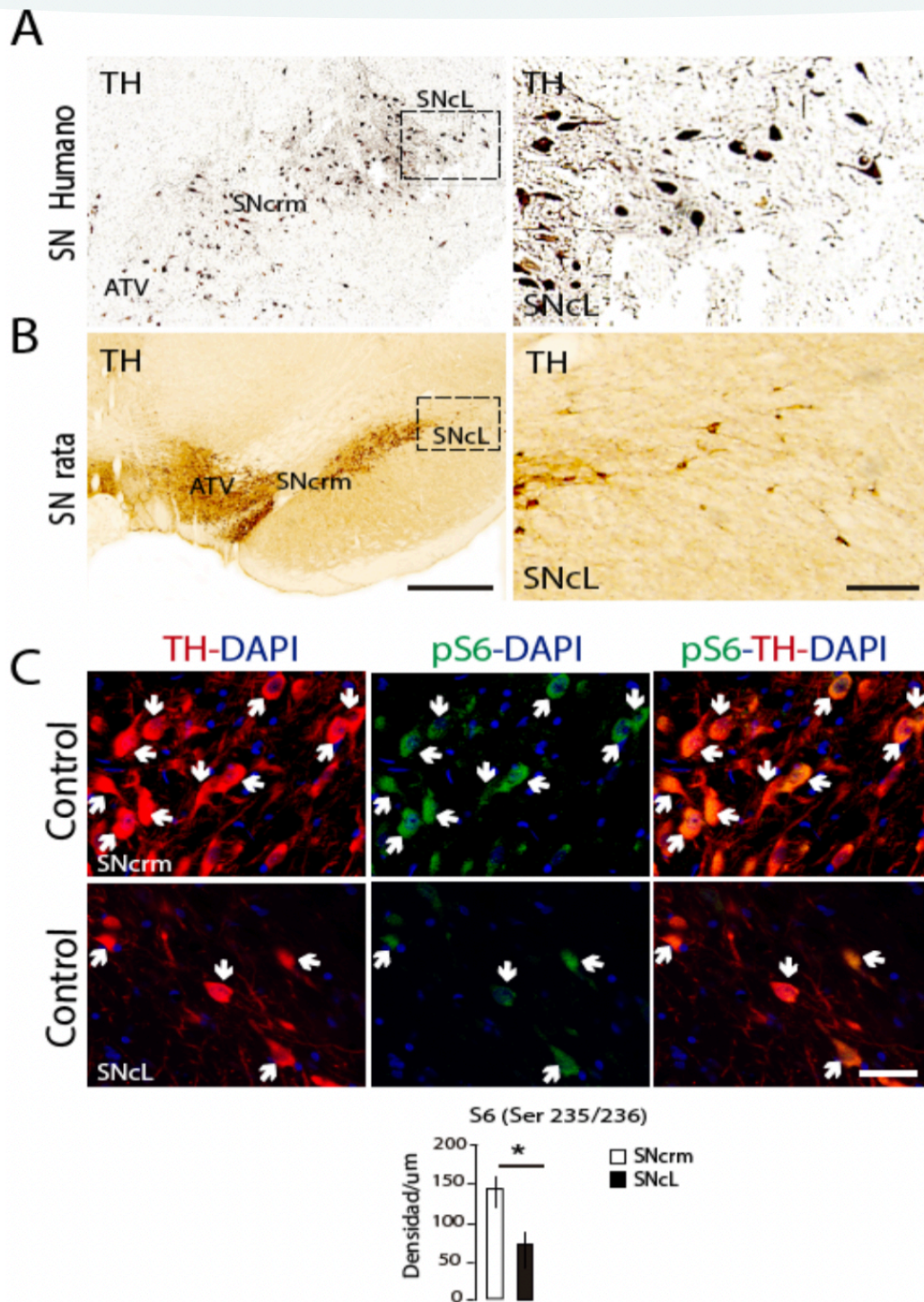
Lo primero que hicimos fue realizar una inmunohistoquímica para la TH en cortes coronales de mesencéfalo en humano y rata (**Fig. 5**), en un intento de que la estudiante Valentina Pedota se familiarizase con esta técnica morfológica y en segundo lugar, con la distribución y detección de la enzima en todo el mesencéfalo, ya que la TH es usada como marcador específico de las neuronas dopaminérgicas. Para ello, la estudiante Valentina Pedota se valió de un atlas de coordenadas de humano y roedores para poder identificar las diferentes poblaciones de neuronas dopaminérgicas a lo largo del mesencéfalo e incluso comprobar de primera mano que co-existían con acúmulos de neuromelalina, una característica anatómica de la sustancia negra de humano, cuyo marcador no aparece en roedores, porque carece de ella (**Fig. 5A y 5B**).



Una vez realizado este experimento, pasamos a realizar la detección de S6 (-p) en la sustancia negra de rata, mediante doble inmunofluorescencia, una técnica morfológica que nos permite estudiar el fenotipo neuroquímico de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. En este caso, hicimos doble inmunofluorescencia para TH (color rojo) y S6 (color verde) en su forma fosforilada Ser 2335/236 (*forma activa*) con anticuerpos específicos para cada marcador en cortes coronales de sustancia negra de rata sana (**Fig. 5C**). Los resultados obtenidos demuestran que la S6 fosforilada se encuentra en su mayor parte en neuronas TH+ (*ver flechas blancas*). Estos resultados se ven apoyados por estudios previos por otros autores realizados en humano (**28**) y por nuestro grupo en roedores (**24**). Además, lo más relevante de este estudio fue que S6 fosforilado presenta un patrón de expresión diferencial en dichas neuronas. Este patrón topográfico de fosforilación de S6 destaca por presentar altos niveles en las regiones más resistentes a la degeneración (SNcrm) en comparación a las regiones más vulnerables (SNcL) (**Fig. 5C**). Ésto fue confirmado tras realizar un análisis densitométrico de su señal ( $n= 50$  células), cuya expresión fue el doble en la SNcrm con respecto a la SNcL (**Fig. 5C;  $p<0.01$** ).

Debemos indicar que se realizó en paralelo una doble IF para TH y S6 en su forma total, y no observamos diferencias entre regiones (*datos no mostrados*), lo que sugiere que su forma activa (Ser235/236) es clave en la búsqueda de terapias capaces de modular esta forma fosforilada, concretamente, en regiones más vulnerables, donde apenas se expresa, en un intento de incrementar su señal y así proteger a estas neuronas dopaminérgicas de la degeneración, consiguiendo con ello elevar o frenar el desarrollo de la EP. Éste efecto se podría conseguir a través de factores capaces de modular esta proteína como es el caso de factores tróficos (**24, 28, 29**)



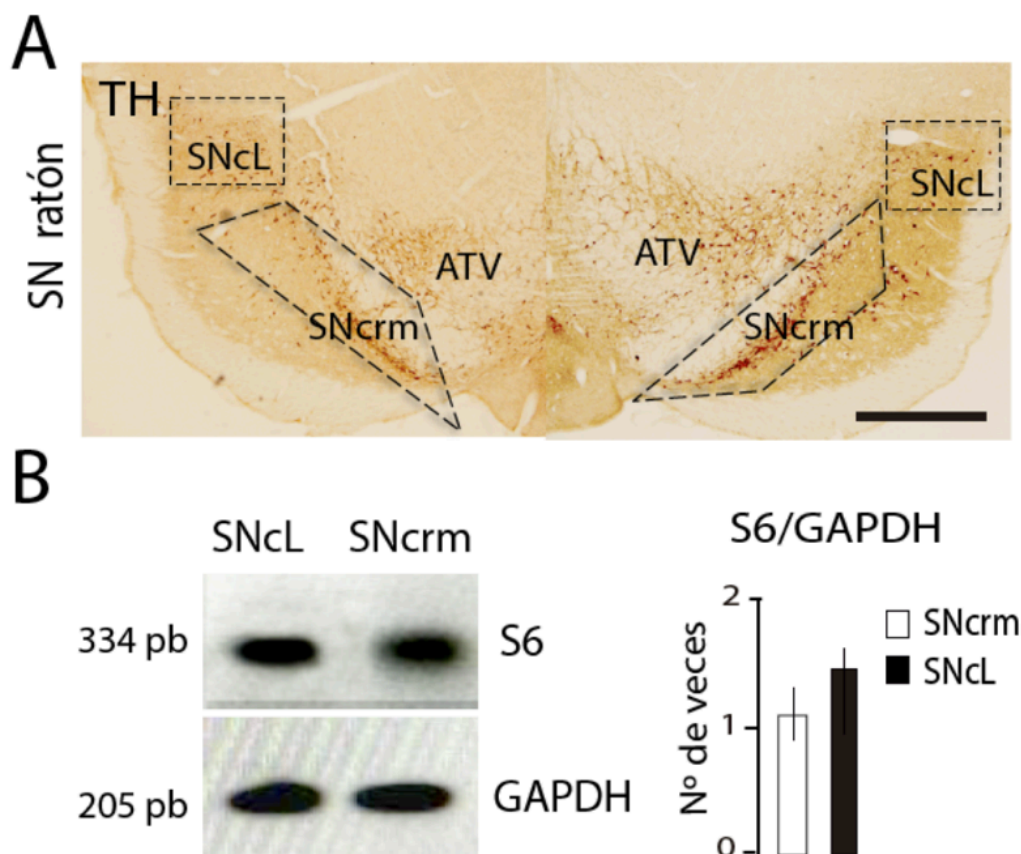


**Fig 5. (A).** Inmunohistoquímica de TH en la SN de humano sano, observe la co-expresión de TH con depósitos de neuromelalina en la mayoría de las neuronas dopaminérgicas de la SN. Además, vemos que la SN está compuesta por varias poblaciones neuronales, SNcrM, SNcL y ATV. **(B)**

Inmunohistoquímica de TH en la SN de rata sana, observe que las neuronas positivas para TH carecen de acúmulos de neuromelalina. **(C)** Doble inmunofluorescencia para TH y S6 fosforilada (Ser235/236; forma activa) en la SN de rata sana. Observe que la mayoría de las neuronas positivas para TH de la SN colocalizan con S6 (Ser235/236)(ver flechas de color blanco). Además, observamos un patrón diferencial en la expresión de S6 fosforilado, siendo mayor en la SNcrM con respecto a la SNcL, como así lo demuestra el análisis densitométrico de la señal fluorescente de S6 fosforilado.

Escala de la barra: 300  $\mu$ m y 50 $\mu$ m, respectivamente.

Una vez analizado la proteína de S6 (-p; forma fosforilada) a nivel basal en el sistema dopaminérgico mesencefálico en rata, quisimos estudiar su ARNm mediante la técnica RT-PCR con cebadores apropiados capaces de ampliar el ARNm de forma específica y poder detectarlo en las diferentes regiones de estudio de la sustancia negra en ratón (SNcrm vs SNcL; ver Fig. 6). En un futuro, se diseñarán cebadores de este mismo marcador para analizar la expresión de S6 ARNm en rata y en humano. En este caso, los resultados obtenidos con la RT-PCR para S6 ARNm en las regiones de estudio (Fig. 6A y B) demuestran que no existen diferencias entre regiones a nivel del ARNm (Fig. 2B), cuando se compara con genes endógenos que actúan como genes controles, tales como la GAPDH (ver Fig. 6B) o la propia actina (*datos no mostrados*). En esta ocasión, la figura 6 muestra además los productos de RTPCR, una inmunohistoquímica para TH realizada en sustancia negra de ratón para ver las regiones que se cogieron para analizar el ARNm de S6.



**Fig 6. (A).** Inmunohistoquímica de TH en la SN de ratón sano. Obsérvese que la SN está compuesta por varias poblaciones neuronales, SNcrm, SNcL y ATV. Las líneas discontinuas corresponden con las zonas de SN extraídas (SNcL y SNcrm) para el análisis del ARNm de S6. **(B)** RT-PCR para S6 ARNm en la SNcL y SNcrm de ratón sano. El análisis densitométricos de las bandas correspondientes a S6 en cada región mostró que no existen diferencias significativas entre SNcL y SNcrm de ratón. Escala de la barra: 300  $\mu$ m.

## 6. CONCLUSIONES

1. Existe un patrón topográfico diferencial de expresión de S6, en su forma activa (Ser235/236) en la sustancia negra en rata sana.
2. El patrón de expresión de S6 (Ser235/236) coincide con el patrón de neuroprotección encontrado en la sustancia negra de pacientes con Parkinson, es decir, A9 (SNcrn > SNcL).
3. El patrón de expresión diferencial de la forma activa de S6 en la sustancia negra sana podría estar relacionado, en parte, con la vulnerabilidad diferencial encontrada entre las diferentes poblaciones neuronales (SNcv > SNL > SNrm).
4. Las diferencias de expresión de S6, las encontramos únicamente a nivel de la proteína fosforilada y no en su forma total ni tampoco a nivel del ARNm. Estos resultados sugieren que S6 sufre cambios a nivel post-traduccional y no post-transcripcional.
5. La regulación al alza de la forma activa de S6 en regiones vulnerables de la sustancia negra podría elentecer o frenar el desarrollo de la EP.

## 7. ¿Qué he aprendido durante éste TFG?

En mi Trabajo de Fin de Grado (TFG) centrado en la enfermedad de Parkinson, he adquirido conocimientos significativos sobre los mecanismos que subyacen a esta afección neurodegenerativa. Durante mi búsqueda, he aprendido que las neuronas más vulnerables son particularmente sensibles al estrés oxidativo y al mal funcionamiento de las mitocondrias los cuales podrían ser responsables de la degeneración selectiva de algunas neuronas dopaminérgicas mientras otras se mantienen intactas. Por otro lado, también he aprendido que la proteína S6 ribosomal desempeña un papel crucial de neuroprotección, la cual tiene la capacidad de promover la supervivencia neuronal y prevenir la muerte celular.

Para poder demostrar la hipótesis planteada, realicé junto con mis tutores un estudio detallado, tanto morfológico como molecular, de la proteína S6 ribosomal en la sustancia negra de roedores sanos. A través de este estudio, pude comprender y comprobar que existen diferentes grados de vulnerabilidad entre los grupos neuronales e incluso entre subpoblaciones de un mismo grupo.

Además, todo ésto proporciona una perspectiva más clara sobre esta variabilidad en la vulnerabilidad neuronal, lo cual ofrece perspectivas alentadoras para la creación de tratamientos más precisos y efectivos en el futuro.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Blesa J, Lanciego JL. Parkinson's disease: cell vulnerability and disease progression. *Front. Neuroanat.* 2015;9 | <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00125>
2. Jellinger KA. 1987. The pathology of parkinsonism. In: Marsden CD, Fahn S, eds. *Movement disorders 2*. London: Butterworths. 124-165. Doi: [10.1001/archneur.1987.00520190006003](https://doi.org/10.1001/archneur.1987.00520190006003)
3. García R, López E, et al. Informe de la fundación del cerebro sobre el impacto social de la enfermedad de Parkinson en España. *Feen.* 2013. <https://www.sen.es/attachments/article/728/Informe%20FdC%20Enfermedad%20de%20Parkinson.pdf>
4. Martín M. Aumentan los casos de la enfermedad del Parkinson en Canarias. *Ciencias de la Salud Ull.* 28 abril 2022. <https://periodismo.ull.es/aumentan-los-casos-de-la-enfermedad-del-parkinson-en-canarias/>
5. Ministerio de Sanidad e Insitituto Aragonés de Ciencias de la Salud. Guía sobre la enfermedad de Parkinson. España: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud; 2020. Guías de Práctica Clínica en el SNS. [https://portal.guiasalud.es/wp-content/uploads/2019/01/gpc\\_546\\_parkinson\\_iacs\\_paciente.pdf](https://portal.guiasalud.es/wp-content/uploads/2019/01/gpc_546_parkinson_iacs_paciente.pdf)
6. García Ruiz PJ, Martínez JC. Guía oficial de práctica clínica de la enfermedad de Parkinson. Grupo de Estudio de Trastornos del Movimiento. Sociedad Española de Neurología. Barcelona 2010. [https://www.sen.es/pdf/guias/Guia\\_oficial\\_de\\_practica\\_clinica\\_en\\_la\\_enfermedad\\_de\\_Parkinson\\_2010.pdf](https://www.sen.es/pdf/guias/Guia_oficial_de_practica_clinica_en_la_enfermedad_de_Parkinson_2010.pdf)
7. Clarke CE, Patel S, et al.; on behalf of the PD REHAB Collaborative Group. *Health Technology Assessment*, No. 20.63. Southampton (UK): *NIHR Journals Library*; 2016 Aug. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK379754/>
8. Guerrero MT, Macías MC, et al. Enfermedad de Parkinson. [https://www.segg.es/download.asp?file=/tratadogeriatria/PDF/S35-05%2049\\_III.pdf](https://www.segg.es/download.asp?file=/tratadogeriatria/PDF/S35-05%2049_III.pdf)



9. H Bernheimer, W Birkmayer, et al.; Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations 1987. *J Neurol Sci* 1973 Dec;20(4):415-55. doi: [10.1016/0022-510x\(73\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0022-510x(73)90175-5).
10. Dexter DT, Holley AE, et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Mov Disord.* 9: 92-97.
11. German DC, Dubach M, et al. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonian syndrome in *Macaca fascicularis*: which midbrain dopaminergic neurons are lost?. *Neuroscience.* 1988 24: 161-174.
12. Morrison BM, Patrick R, et al. Determinants of Neuronal Vulnerability in Neurodegenerative Diseases. 1998 *Annals Neurol.* 44: 32-44.
13. Jenner P, Olanow CW. 1998. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 44: 72- 84.
14. Difazio MC, Hollingsworth Z, Young AB, Penney JB Jr. 1992. Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains. *Neurology.* 42: 402-406.
15. Melissa J. Nirenberg, June Chan, Yongjian Liu, Robert H. Edwards and Virginia M. Pickel *Journal of Neuroscience* 1 July 1996, 16 (13) 4135-4145; DOI: <https://doi.org/10.1523>
16. Dr. Monzani E, Nicolis S, et al. Dopamine, Oxidative Stress and Protein–Quinone Modifications in Parkinson's and Other Neurodegenerative Diseases. Wylei Online Library 2018. <https://doi.org/10.1002/anie.201811122>.
17. Tornero D, Ceña V, et al. Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos. *Revisiones en neurociencia* 2002;35(4):354-361. [https://www.researchgate.net/profile/Daniel-Tornero/publication/11154283\\_The\\_role\\_of\\_the\\_mitochondrial\\_permeability\\_transition\\_pore\\_in\\_neurodegenerative\\_processes/links/5c6e6437299bf1e3a5b94799/The-role-of-the-mitochondrial-permeability-transition-pore-in-neurodegenerative-processes.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Daniel-Tornero/publication/11154283_The_role_of_the_mitochondrial_permeability_transition_pore_in_neurodegenerative_processes/links/5c6e6437299bf1e3a5b94799/The-role-of-the-mitochondrial-permeability-transition-pore-in-neurodegenerative-processes.pdf)
18. Rodriguez MC, Obeso JA, et al. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. 1998 *Ann Neurol.* 44: 175-188.
19. Honglei Chen, Beate Ritz. The Search for Environmental Causes of Parkinson's Disease: Moving Forward. National Library of Medicine. *J Parkinsons Dis.* 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6311360/>

20. Peterson, R. and Schreiber, S. (1998). Translation control: Connecting mitogens and the ribosome. *Current Biology*, 8(7), pp.248-50.
21. Meyuhas, O. Chapter 1: Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 268. Jeon, K. (2008). Burlington: Elsevier.
22. Roux, P., Shahbazian, D., et al. RAS/ERK Signaling Promotes Site-specific Ribosomal Protein S6 Phosphorylation via RSK and Stimulates Cap-dependent Translation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 2007 pp.14056-64.
23. Chtarto, A., Humbert-Claude, et al. A regulatable AAV vector mediating GDNF biological effects at clinically- approved sub-antimicrobial doxycycline doses. *Molecular Therapy-Methods (2016); Clinical Development*, 5, p.16027.
24. V. Mesa-Infante, D. Afonso-Oramas, et al. Long-term exposure to GDNF induces dephosphorylation of Ret, AKT, and ERK1/2, and is ineffective at protecting midbrain dopaminergic neurons in cellular models of Parkinson's disease . *Molecular and Cellular Neuroscience*, 118: 103684. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2021.103684>
25. Barroso-Chinea P, Luis-Ravelo D, et al. Dopamine D3 but not D2 receptor activates autophagy through mTORC1 inhibition preserving protein synthesis, *Autophagy*, (2020) 16:1279-1295. Doi: [10.1080/15548627.2019.1668606](https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1668606).
26. Gómez-Sánchez JC, Cepeda-Nieto AC, et al. Activation of mTOR Signaling Pathway in the Progression of Parkinson's Disease. *Frontiers in Neurology*, 10: 808(2019) doi: [10.3389/fneur.2019.00808](https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00808)
27. Almeida RD, Manadas BJ, et al. Neuroprotection by BDNF against Glutamate-Induced Apoptosis Is Mediated by ERK and PI3-Kinase Pathways. *Cell Death and Differentiation*, 2005-12(10): 1329-1343. doi: [10.1038/sj.cdd.4401658](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401658)
28. Chu, Y., Kordower, J.H., 2021. GDNF signaling in subjects with minimal motor deficits and Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 153, 105298 <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105298>.
29. Decressac, M, Kadkhodaei, B, Mattsson, B, Laguna, A, Perlmann, T and Björklund, A (2012).  $\alpha$ -Synuclein-induced down-regulation of Nurr1 disrupts GDNF signaling in nigral dopamine neurons. *Sci Transl Med* 4: 163ra156.

# FIGURAS

1. **Figura 1.** Clínica de la enfermedad de Parkinson: <https://pin.it/31OLkYn>
2. **Figura 2.** Cuerpos de Lewy: [https://es.wikipedia.org/wiki/Cuerpo\\_de\\_Lewy](https://es.wikipedia.org/wiki/Cuerpo_de_Lewy)
3. **Figura 3.** Mesencéfalo: [https://www.medicasur.com.mx/es/ms/ms\\_sal\\_em\\_nn\\_130\\_Enfermedad-de-Parkinson](https://www.medicasur.com.mx/es/ms/ms_sal_em_nn_130_Enfermedad-de-Parkinson)
4. **Figura 4.** Philippe P. Roux & Ivan Topisirovic. Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. 03 March 2023. Doi: <https://doi.org/10.1128/MCB.00070-18>
5. **Figura 5A.** Inmunohistoquímica de TH en la SN de humano sano; **5B.** Inmunohistoquímica de TH en la SN de rata intacta; **5C.** Doble inmunofluorescencia para TH y S6 fosforilada
6. **Figura 6A.** Inmunohistoquímica de TH en la SN de ratón intacto. **6B** RT-PCR para S6 ARNm en la SNcl y SNcrm de ratón intacto; **6C** Doble inmunofluorescencia para TH y S6 fosforilada en la SN de rata intacta