



Expresión de DAT, VMAT2, TH y DDC en el sistema mesoestriatal de ratón

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Universidad de La Laguna
Facultad de Ciencias de la Salud
Grado en Medicina

Curso 2022-2023

Autoras

Anastasiya Mayorova

Laura Ortiz Martín

Tutores

Dr. Domingo David Afonso Oramas

Dr. Pedro Javier Barroso Chinae

Área de Anatomía y Embriología Humana

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

Abstract

The alterations in the synthesis and transport of dopamine (DA) that are triggered by the degeneration of dopaminergic neurons in the midbrain cause the motor symptoms associated with Parkinson's disease (EP).

Key proteins involved in dopaminergic activity include tyrosine hydroxylase (TH) and dopa-decarboxylase (DDC), which are involved in DA biosynthesis, and vesicular monoamine transporter (VMAT) and DA transporter (DAT), which are involved in intraneuronal transport and dopaminergic transmission and reuptake.

Therefore, the study of the variability of expression of the genes of these proteins in the dopaminergic nuclei of the central nervous system, as well as the epigenetic mechanisms that regulate mentioned expression, offers the possibility of determining if there are differences in the expression of these proteins between dopaminergic areas, and if these correlate with the differences in the patterns of degeneration observed in them.

In this work, the expression patterns of TH, DDC, VMAT, and DAT in the mesostriatal system will be studied, in order to try to clarify what mechanisms are involved in the non-uniform degeneration of the dopaminergic system.

Keywords: Parkinson, dopamine, TH, DDC, VMAT, DAT, epigenetics

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

Resumen

Las alteraciones en la síntesis y transporte de dopamina (DA) que se desencadenan a consecuencia de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas que se encuentran en el mesencéfalo provocan la sintomatología motora asociada a la Enfermedad de Parkinson (EP).

Entre las proteínas fundamentales implicadas en la actividad dopaminérgica se encuentran la tirosina hidroxilasa (TH) y la dopa-descarboxilasa (DDC), que intervienen en la biosíntesis de la DA, y el transportador vesicular de monoaminas (VMAT) y el transportador de DA (DAT), que están involucrados en el transporte intraneuronal y la transmisión y recaptación dopaminérgica.

Por tanto, el estudio de la variabilidad de expresión de los genes de estas proteínas en los núcleos dopaminérgicos del sistema nervioso central, así como los mecanismos epigenéticos que regulan dicha expresión, ofrece la posibilidad de determinar si existen diferencias en la expresión de estas proteínas entre las distintas áreas dopaminérgicas, y si estas se correlacionan con las diferencias en los patrones de degeneración observados en las mismas.

En este trabajo se estudiarán los patrones de expresión de TH, DDC, VMAT, y DAT en el sistema mesoestriatal, con el fin de tratar de esclarecer qué mecanismos incurren en la degeneración no uniforme del sistema dopaminérgico.

Palabras clave: Parkinson, dopamina, TH, DDC, VMAT, DAT, epigenética

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enfermedad de Parkinson	1
1.1.1 Fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson	2
1.1.2 Síntomas.....	2
1.1.3 Tratamiento.....	3
1.2 Sistema dopaminérgico	4
1.2.1. Dopamina.....	6
1.2.2. Síntesis de la dopamina.....	6
1.2.3. Transportadores de DA (VMAT y DAT)	7
1.3 Epigenética y Enfermedad de Parkinson	8
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
2.1 Hipótesis	10
2.2 Objetivos	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1 Inmunohistoquímica	11
3.2 RT-PCR.....	11
3.3 Análisis estadístico	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1 Inmunohistoquímica de TH en sustancia negra de humano	13
4.1 Expresión diferencial del ARNm de TH, DDC y DAT en el sistema mesoestriatal de ratón	14
5. CONCLUSIONES	16
6. ¿QUÉ HEMOS APRENDIDO REALIZANDO NUESTRO TFG?	17
7. BIBLIOGRAFÍA	18

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad de Parkinson

La EP es un trastorno neurodegenerativo que afecta al sistema nervioso de manera crónica y progresiva. Se caracteriza por la degeneración, entre otros núcleos, de las neuronas de la sustancia negra (SN), lo que provoca una falta de dopamina (DA) en el sistema nigroestriatal. La falta de DA hace que el control del movimiento se vea alterado, dando lugar a los síntomas motores típicos, como el temblor en reposo o la rigidez.

A día de hoy no se conoce la causa de la EP. Sin embargo, se considera que podría deberse a una combinación de factores genéticos, medioambientales y los derivados del propio envejecimiento del organismo [1].

Es el segundo trastorno neurodegenerativo relacionado con la edad más importante en las sociedades desarrolladas, después de la enfermedad de Alzheimer. Su prevalencia oscila entre 35,8 por 100.000 y 12.500 por 100.000, y se estima una incidencia anual que oscila entre 1,5 por 100.000 y 346 por 100.000 en diferentes países [2–4].

La prevalencia y la incidencia de la EP varían ampliamente a lo largo del mundo. En general, en Europa y Estados Unidos, la prevalencia es más alta que en el resto de países y es relativamente uniforme, y oscila en un rango no muy llamativo. En los países asiáticos, Latinoamérica y África es inferior, especialmente en este último continente. Estas diferencias podrían deberse en parte a factores propios de la población estudiada (es decir, mayor mortalidad por menores recursos económicos). Teniendo en cuenta que tanto el envejecimiento como el sexo (masculino) son los factores que más influyen en el incremento del riesgo de la EP, otros, como los pesticidas, se han establecido como posibles factores de riesgo en los últimos años. [5].

En España, la EP tiene una incidencia y prevalencia similar al resto de Europa. Con la estimación de población actual se obtiene que debe haber en España al menos 300.000 pacientes con enfermedad de EP, y a al menos un nuevo caso por 10.000 habitantes al año. [6]

La incidencia en Canarias resulta preocupante en los últimos años. En Tenerife, las cifras de afectados han ascendido a unos 4000. [7]

1

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

1.1.1. Fisiopatología

Un síndrome parkinsoniano típico se caracteriza por la pérdida de células dopaminérgicas en la sustancia negra y anomalías llamativas en la actividad espontánea y las respuestas sensoriomotoras de las neuronas en los ganglios basales. [13]

Los síntomas de la EP son debidos a la depleción dopaminérgica que genera alteraciones neurofisiológicas de la actividad de los ganglios basales. Cuando se pierde la estimulación dopaminérgica se produce una potenciación de la llamada vía indirecta o “inhibidora” de la selección del programa motor sobre la directa o “facilitadora” de movimiento.

La vía indirecta normalmente es inhibida por la liberación de DA en los receptores dopaminérgicos D2 de las neuronas estriatales (núcleo caudado y putamen), esta inhibición se pierde en la EP por la deficiencia de DA. La falta de DA se traduce en una hiperactividad del núcleo subtalámico y del complejo globo pálido interno / sustancia negra pars reticulata y por lo tanto una inhibición tálamo-cortical.

Por otra parte, la vía directa normalmente es excitada por la liberación de DA sobre los receptores dopaminérgicos D1 de las neuronas estriatales, la falta de DA en este caso produce la inhibición de las neuronas estriatales y como consecuencia una tendencia de las neuronas en los ganglios basales a descargar de manera oscilatoria en lugar de la activación tónica fisiológica. [13,14]

1.1.2. Síntomas

La EP es un trastorno neurodegenerativo complejo y de presentación heterogénea. Se manifiesta por un amplio espectro de características motoras y no motoras. Hay cuatro síntomas principales: Temblor en reposo, rigidez, acinesia (o bradicinesia) e inestabilidad postural. Además, la postura flexionada y la congelación (bloqueos motores) se han incluido entre las características clásicas del parkinsonismo, siendo la EP la forma más común. [15]

Los síntomas no motores incluyen síntomas muy variados como apatía o depresión, alteraciones del sueño, disfunción autonómica o síntomas sensitivos.

Algunos síntomas pueden preceder en varios años a las manifestaciones motoras clásicas y por lo tanto al diagnóstico de la enfermedad, estos síntomas son: la hiposmia, el estreñimiento, la depresión, y el trastorno de conducta de sueño REM. [16] La progresión de

2

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

la EP, así como la severidad de los signos y síntomas parkinsonianos, difieren ampliamente entre los pacientes. Cabe destacar que en la EP la demencia ocurre en el 83% de los pacientes tras 20 años de enfermedad [13].

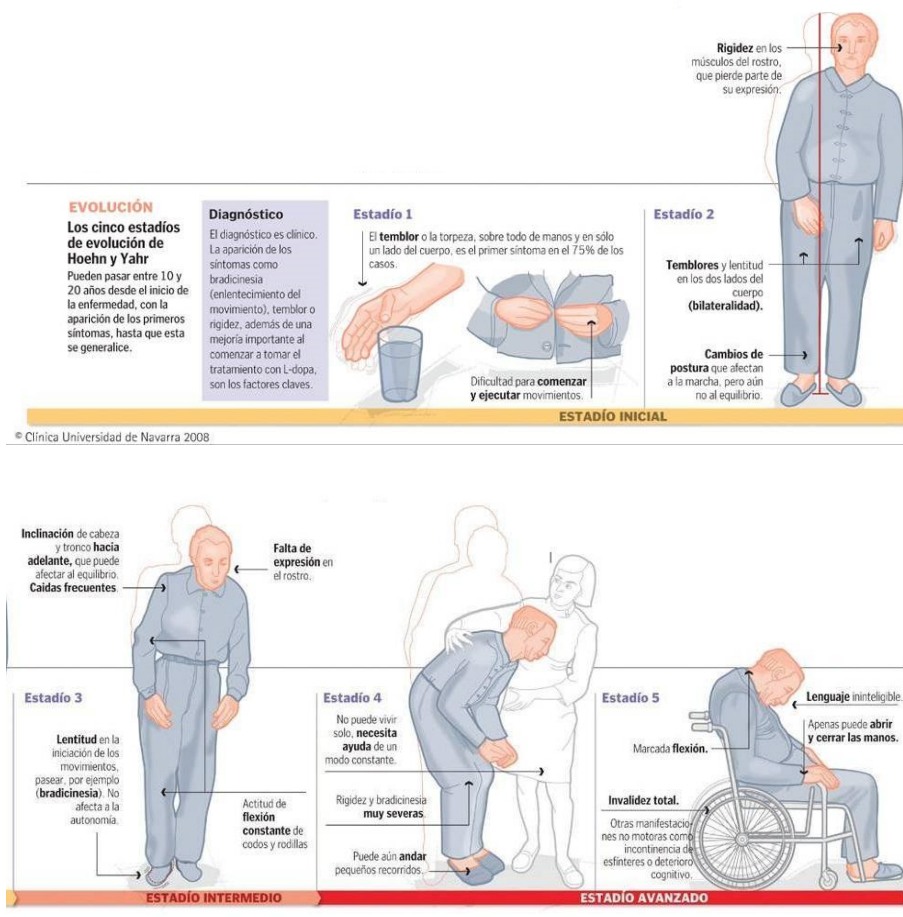


Figura 1 - Clínica de Enfermedad de Parkinson. Infografías de la Clínica Universidad de Navarra, 2008.

1.1.3. Tratamiento

El tratamiento de la EP ha estado basado durante décadas en un abordaje farmacológico. El fármaco por excelencia es la levodopa, un precursor de la DA. Dado que la DA no puede administrarse de una manera en la que atravesase la barrera hematoencefálica, el objetivo en este caso se basa en garantizar el aporte del precursor principal de la misma para que la síntesis

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 21/05/2023 16:48:40

LAURA ORTIZ MARTÍN
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

21/05/2023 16:49:03

Domingo David Afonso Oramas
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

21/05/2023 17:31:16

pueda llevarse a cabo. La levodopa es el fármaco que mejor controla los síntomas motores, y por tanto, es el más utilizado. Sin embargo, conforme avanza la enfermedad, es común que aparezca resistencia, lo que limita su efectividad a largo plazo.

Otros fármacos como los inhibidores de la monoamino oxidasa tipo B (IMAO-B), agonistas dopaminérgicos, inhibidores de la catecol-o-metiltransferasa, y anticolinérgicos, pueden ser utilizados en casos en los que los síntomas son leves, en pacientes menores de 60 años, o en combinación con la levodopa. En caso de que se desarrollen complicaciones motoras o trastornos del control de impulsos relacionadas con el tratamiento, se modificará la dosis para llegar a una pauta adecuada para cada paciente. [18]

Respecto a otros enfoques terapéuticos, existen procedimientos quirúrgicos que se emplean para limitar los síntomas de la EP que suelen estar destinados a pacientes con resistencia al tratamiento farmacológico o con discinesias graves derivadas del mismo. El más común es la estimulación cerebral profunda (deep brain stimulation, DBS), que consiste en implantar un dispositivo con electrodos en el cerebro que actúa sobre los ganglios basales utilizando una corriente eléctrica continua de alta frecuencia. Los objetivos principales de la DBS son el NST y el GPi, los cuales han demostrado proporcionar los mejores resultados. Pese a que se desconoce el mecanismo exacto por el que este tratamiento es efectivo, se teoriza que se debe a la estimulación neuronal. [19]

Otras técnicas invasivas son la radiofrecuencia y la radiocirugía, que suelen reservarse para pacientes no candidatos a DBS. El objetivo de ambas es lesionar el NST, el tálamo, o el GPi, siendo este último el procedimiento más común (palidotomía), que se traducirá en un mejor control de los síntomas parkinsonianos motores. [20, 21]

Finalmente, existe una técnica de reciente aparición denominada ultrasonido focalizado de alta intensidad (High-Intensity Focused Ultrasound, HIFU). En esencia, este procedimiento tiene el mismo objetivo que las ablaciones por medios invasivos, pero llevándose a cabo de manera mínimamente invasiva con ultrasonido

1.2. Sistema dopaminérgico

Son numerosas las zonas del SNC donde se pueden hallar neuronas dopaminérgicas. Las dos áreas principales son la SN y el área tegmental ventral (ATV).

4

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

La SN concentra los somas de las neuronas dopaminérgicas A9 cuyo axón proyecta al núcleo estriado, conformando el sistema nigroestriatal, involucrado en la función motora. Esta área es la de mayor interés para el estudio de la EP, pues el déficit en estas neuronas dopaminérgicas es el principal mecanismo fisiopatológico implicado en su aparición.

Por otra parte, el ATV está integrado por neuronas dopaminérgicas A10 que proyectan hacia el sistema límbico y la corteza cerebral. Este sistema integra el sistema de recompensa e interviene en numerosos procesos conductuales.

Además de estas, existen otros grupos neuronales dopaminérgicos, como el sistema tuberohipofisario, relacionado con la regulación de la secreción de prolactina, y el incerto-hipotalámico posterior, cuyos axones viajan a la médula y están involucrados en el procesamiento de la sensación dolorosa. [9]

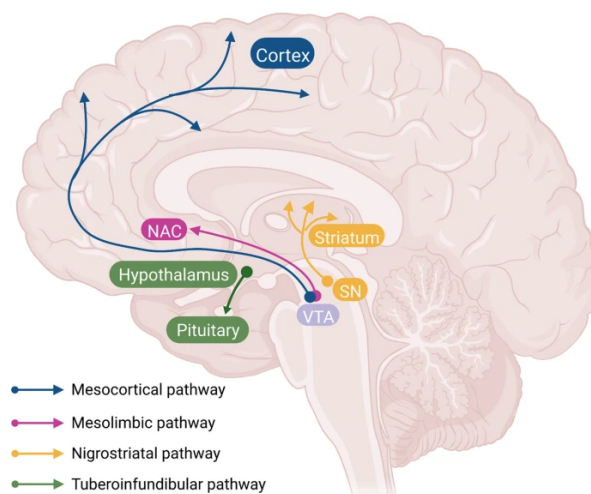


Figura 2 - Vías dopaminérgicas

Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. *Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases*. Cell Mol Neurobiol. 2019;39:31–59.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

1.2.1. DA

La DA es un neurotransmisor que pertenece a la familia de las catecolaminas, por lo que desempeña funciones tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en tejidos periféricos al pasar a la circulación sistémica, tratándose entonces de una neurohormona. [8]

Este neurotransmisor es fundamental en la regulación de diversos procesos en el SNC, desde los más básicos como el movimiento, el ciclo sueño-vigilia, la modulación de la agresividad, del humor, y de la conducta sexual, el apetito, la termorregulación, y la respuesta a estresores, hasta funciones correspondientes a una actividad cognitiva superior, como la atención, el aprendizaje, y el sistema de recompensa. Asimismo, participa en la liberación de hormonas hipofisarias. [8]

1.2.2. Síntesis de DA

La DA es una monoamina que se sintetiza a partir del aminoácido tirosina. Su biosíntesis está a cargo de dos enzimas fundamentales: la tirosina hidroxilasa (TH), y la dopa-descarboxilasa (DDC).

El primer paso es la hidroxilación de los aminoácidos L-tirosina a L-DOPA por medio de la TH. El proceso se desarrolla en los terminales axónicos, en el botón presináptico, donde se encuentra la TH. Esta enzima es exclusiva de las neuronas catecolaminérgicas, y será el paso limitante fundamental de la síntesis de catecolaminas, ya que se encuentra en concentraciones muy bajas. La TH puede encontrarse en el citosol en forma soluble, o de forma particulada vinculada a vesículas sinápticas. Su actividad dependerá de si se halla en estado fosforilado (activa) o desfosforilado (inactiva).

A continuación, la L-DOPA sufre una descarboxilación por la DDC, convirtiéndose en una molécula de DA. Ya completo, el neurotransmisor se almacena entonces en vesículas sinápticas, y en menor medida en el citosol presináptico, y que se liberará al espacio sináptico dependiendo de la llegada de potenciales de acción a la neurona. [10]

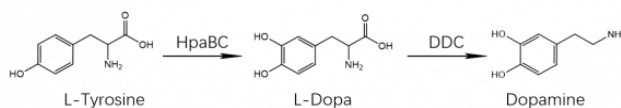


Figura 3 - Síntesis dopaminérgica

A. Das, A. Verma and K. Mukherjee, "Synthesis of dopamine in *E. coli* using plasmid-based expression system and its marked effect on host growth profiles", *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, vol. 47, no. 8, pp. 754-760, 2017. Available: 10.1080/10826068.2017.1320291.

6

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

1.2.3. Transportadores de DA (VMAT y DAT)

El transportador vesicular de monoaminas (*vesicular monoamine transporters* o VMAT) es una proteína presente en la vesícula sináptica que desempeña la función de introducir la DA desde el citoplasma a su interior (traslocación) para su almacenaje y posterior liberación.

Tiene una estructura de 12 dominios transmembrana (12TM), cuya estructura secundaria es alfa-helicoidal, bucles transmembrana intracelulares y extracelulares, y extremos carboxilo y amino en el lado intracelular.

Su funcionamiento es de tipo simportador, ya que introduce a la vez iones Na^+ y la molécula de monoamina. Este proceso es dependiente del gradiente de concentración a cargo de la Na^+/K^+ ATPasa.

Se halla en dos formas: VMAT-1 y VMAT-2, tanto en humanos como en roedores. La isoforma que interesa estudiar en este caso es la VMAT2, ya que es la que se expresa en las neuronas monoaminérgicas (dopaminérgicas, serotoninérgicas, y noradrenérgicas) del SNC y el sistema simpático. En el SNC se localiza principalmente en el estriado, la corteza cerebral, el tronco encefálico. A nivel neuronal, se presenta en los terminales axónicos. [11]

La importancia de esta proteína es doble. Dado que su mecanismo de acción disminuye la recaptación y degradación de DA, además de esta función en sí misma, desempeña un papel neuroprotector, ya que al secuestrar la DA al interior de las vesículas, evita la desaminación oxidativa en el citosol por parte de la MAO, que tiene como producto peróxido de hidrógeno, un conocido metabolito causante de daño oxidativo. En consecuencia, su déficit implicaría el aumento del daño oxidativo en las neuronas monoaminérgicas y la alteración de la transmisión dopaminérgica. [12]

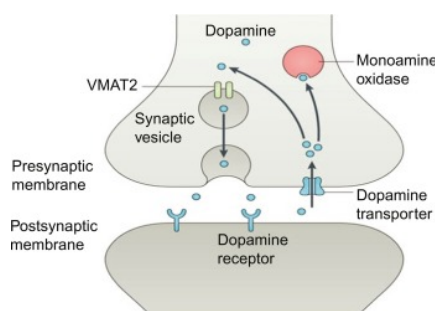


Figura 4 - Papel de VMAT2 en la transmisión dopaminérgica

Harriott ND, Williams JP, Smith EB, Bozigian HP, Grigoriadis DE. VMAT2 inhibitors and the path to ingreza (valbenazine). *Progress in Medicinal Chemistry*. 2018:87-111. doi:10.1016/bs.pmch.2017.12.002

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

Una vez se liberan las moléculas de DA tras el potencial de acción, estas pueden ser captadas por un receptor, degradadas, o recaptadas del espacio sináptico.

La recaptación se lleva a cabo por el transportador de DA (DAT), que se encuentra en la membrana presináptica. Se trata de una proteína transmembrana tipo 7TM, con un grupo amino y un grupo carboxilo en la cara intracelular. Su mecanismo se basa en la introducción de Na⁺ y Cl⁻ junto a la DA. Es muy selectivo y puede actuar de manera inversa, liberando el neurotransmisor al citosol tras recaptarlo.

La degradación de las moléculas de DA se lleva a cabo por dos enzimas: la monoaminoxidasa (MAO) y la catecol-o-metiltransferasa (COMT).

La DA intracelular es degradada por la MAO (asociada a las mitocondrias), la DA extracelular por la COMT (vinculada a la membrana celular). El resultado final es el ácido homovalínico, que pasa a la circulación general para ser excretado. [12]

1.3. Epigenética y EP

Aunque se han implicado varios genes y mecanismos celulares en el inicio y la progresión de la EP, los fundamentos moleculares precisos de la enfermedad siguen sin estar claros. En este contexto, la modulación epigenética de la expresión génica por factores ambientales está emergiendo como un mecanismo importante en la EP y en otros trastornos neurodegenerativos. [22]

El término epigenética se refiere a alteraciones en la expresión génica, generalmente reversibles, que pueden ser heredados, pero no están grabados en la secuencia de ADN. Estas modificaciones pueden implementarse a través de la metilación del ADN, modificaciones de histonas o microARN (miARN).[23]

El proceso de la metilación del ADN se basa en que se agrega un grupo metilo a la citosina adyacente a una guanina típicamente conocida como isla CpG, transformándola en 5-metilcitosina. Esta modula la expresión de un gen junto con la regulación de la diferenciación y el desarrollo celular. ADN metiltransferasas (DNMTs) son las enzimas responsables de la regulación de Metilación del ADN en dinucleótidos CpG y restricción de la factores de transcripción de la unión con el ADN, y en consecuencia a silenciar la expresión génica.[24] Análisis de metilación de ADN de todo el genoma en muestras de sangre y cerebro de personas

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

sanos individuos y pacientes con EP revelaron que muchos genes eran hipo o hipermetilado, incluidos los genes de riesgo de EP [25] Este proceso puede verse influenciado por el estilo de vida, los factores ambientales y la modificación de genes, lo que da como resultado cambios fenotípicos. Las modificaciones epigenéticas no solo afectan la expresión génica, sino que juegan un papel vital en el desarrollo, la regeneración y las enfermedades humanas. [23]

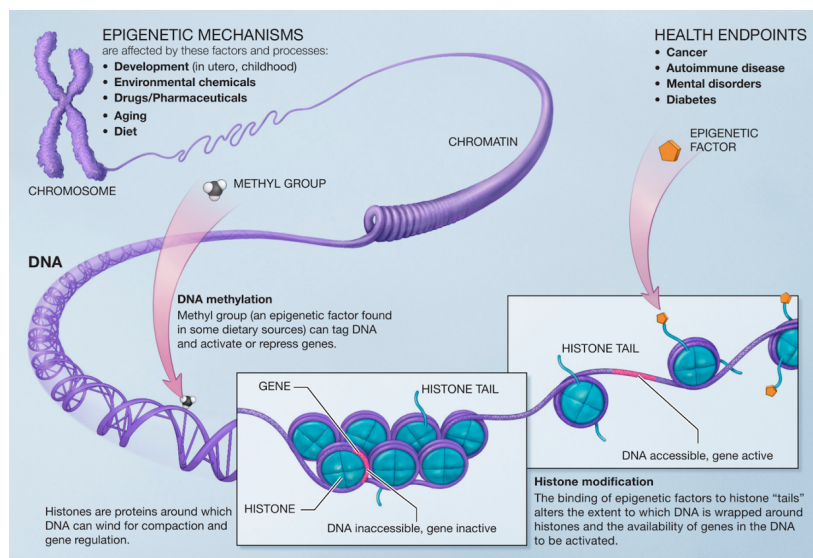


Figura 5 - Mecanismos epigenéticos. National Institute of Health, Maryland U.S. 2018.

La comprensión de la contribución de los cambios epigenéticos a las enfermedades neurodegenerativas y del neurodesarrollo comunes, como la enfermedad de Alzheimer, la EP y otras, nos proporcionará mejores herramientas moleculares para mejorar el diagnóstico, el pronóstico y la terapia de estos pacientes en el futuro. [26]

Así, el objetivo de este trabajo es estudiar la expresión de los genes relacionados con la síntesis de la DA (TH y DDC) y con su transporte (VMAT y DAT), en las diferentes regiones de la SN en ratón. También se plantea conocer, 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. Aun así hemos realizado un acercamiento hacia el estado actual de la epigenética y la EP, teniendo en cuenta las

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

posibilidades que ofrece este campo a la hora de buscar nuevas soluciones para enfrentarnos a esta patología.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Teniendo en cuenta que:

- La sintomatología motora de los enfermos de EP se debe a la pérdida de las células dopaminérgicas de la SN y que no todas las neuronas de esa región tienen el mismo patrón de degeneración.
- Que las proteínas que intervienen en la síntesis y transporte de DA pueden tener una implicación directa en las diferencias de vulnerabilidad dentro del sistema mesoestriatal.

Nuestra HIPÓTESIS es que existen diferencias de expresión de TH, DDC, VMAT y DAT entre los diferentes núcleos dopaminérgicos mesencefálicos y que éstas se encuentran reguladas por fenómenos epigenéticos.

2.2. Objetivos

- Principal:

- Estudiar los patrones de expresión de TH, DDC, VMAT y DAT en el sistema mesoestriatal.

- Secundarios:

- Hacer una revisión sobre el estado actual de la EP.
- Conocer las bases fundamentales sobre la epigenética y su relación con la EP.

10

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se ha realizado en cerebros humanos donados para la investigación y la docencia al Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Los cerebros han sido obtenidos según las directrices nacionales españolas y bajo la supervisión del Comité Ético de la Universidad de La Laguna (CEIBA2022-3199), de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Los cerebros humanos proceden de 4 donantes (2 hombres y 2 mujeres; edad media $63,2 \pm 4,4$ años) fallecidos sin antecedentes de drogadicción ni enfermedades neurológicas o psiquiátricas. Los cerebros se extrajeron tras un periodo post mortem de $16,3 \pm 5,4$ h. Los bloques contenían toda la formación dopaminérgica del mesencéfalo (desde los cuerpos mamilares hasta la protuberancia). Las piezas se lavaron brevemente en PBS y se sumergieron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 72 h a 4 °C. A continuación, se crioprotegieron en una serie graduada de soluciones de sacarosa-PBS y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento.

Posteriormente se obtuvieron cortes coronales de 50 μm con un microtomo de congelación, se ordenaron en serie, y se procesaron para realizar la inmunohistoquímica de TH. Para el marcaje inmunohistoquímico único se sumergieron los cortes en H_2O_2 al 3% durante 30 minutos para desactivar las peroxidasas endógenas, y se dejó actuar a 1h a temperatura ambiente en PBS suero de cabra 4% normal (NGS; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) en el PBS, que contiene 0.05% Triton X-100 (TX-100; Sigma), y se dejaron durante toda la noche en PBS que contiene 2% NGS con el anticuerpo primario: TH (Sigma 1:2000).

Se lavó varias veces y se aplicó suero de cabra biotilado anti-conejo (1:1200; Jackson ImmunoResearch) and 1:200 NGS in PBS, y se dejó actuar 2h. La reacción se hizo visible tras incubarse 1h a temperatura ambiente en ExtrAvidin–peroxidasa (1:5000; Sigma) en PBS, y después de 10 minutos en 0.005% 3'-3'-diaminobenzidina tetrahydroclorida (DAB; Sigma) y 0.001% H_2O_2 en cacodylate buffer 0.05N pH 7.6.

3.2. RT-PCR

La RT-PCR se realizó usando tejido mesencefálico de cerebro de ratón (n=5). Los ratones fueron sacrificados por decapitación y se les extrajo rápidamente el cerebro. Los mesencéfalos ventrales que contienen la SN (entre 3,00 mm y 4,00 mm rostral al eje interaural)

11

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

se diseccionaron en hielo utilizando un bloque cerebral y se extrajo el ARN utilizando el método del fenol ácido.

Se realizó la transcripción inversa de dos microgramos de ARN total tras la termodesnaturalización (5 min, 65°C) y el tratamiento con cebadores oligo-dT. Para la síntesis de ADNc se utilizó la transcriptasa inversa AMV (Roche Diagnostics), en las condiciones recomendadas por el fabricante, en un volumen final de 20 µl. En la RT-PCR Como control de la cantidad de ADNc sintetizado en diferentes muestras, se utilizó 1 µl de una dilución 1:5 del ADNc como molde para la amplificación por PCR de GAPDH, un gen expresado constitutivamente. También se utilizó un microlitro de ADNc sin diluir para amplificar TH, DDC, VMAT y DAT en tubos de 25 µl de volumen de reacción final. Las reacciones de amplificación incluyeron 0,2 mm de dNTPs, 0,5 l de cada cebador, 0,5 U de Taq ADN polimerasa (Promega) y tampón 1-PCR pH 9,0, con 1,5 mM MgCl2 final. Se realizaron treinta ciclos de los siguientes perfiles de temperatura en un termociclador MJR: 94°C (1 min) 65°C (1 min) 72°C (1 min) para la amplificación de los diferentes genes. Quince microlitros del producto de la 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. La secuencia de los cebadores utilizados se muestra en la siguiente tabla (Tabla 1).

gen	secuencia forward	secuencia reverse
TH	AGGGCTGCTGCTTCCTATG	CAGGGTGACGGGTCAAAC
DDC	CATTCTGGGTTGGTCTGCT	CCTCAGCACACTGCTTGCTA
DAT	TGAACTTTGGCCTAGCCTGTGT	ACATGGAGCCACTCAGCTCTGA
VMAT	TTTCTTCGAAGTCCACCTGCTAA	AACATTGGGCAACGTTAGAGGGG
GAPDH	TGGTGAAGCAGGCATCTGAG	TGAAGTCGCAGGAGACAACC

Tabla 1 - Secuencia de los cebadores utilizados en la RT-PCR

3.3. Análisis estadístico

El análisis matemático para la comparación de medias se realizó mediante la prueba t de Student. El análisis se realizó con el programa Statistica (Statsoft; Tulsa, EE.UU.). Los datos se expresan como media ± SEM. Un nivel de *p<0,05 y **p<0,01 se consideró crítico para asignar significación estadística.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Inmunohistoquímica de TH en sustancia negra de humano

En este apartado se muestra una inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo frente a TH, realizada en tejido de mesencéfalo de humano (Fig. 6). En ella se puede ver, tanto el marcaje del anticuerpo como la neuromelanina, un pigmento característico de estas neuronas. Esta técnica nos ha permitido observar las neuronas de una de las regiones del cerebro que degenera en la EP y que es la responsable de los síntomas motores de la misma. Relacionado con el patrón de vulnerabilidad que marca el grado de degeneración de las diferentes poblaciones de esta región, las neuronas localizadas en la SN son más sensibles a la degeneración que las localizadas en el ATV. También encontramos diferencias dentro de la SN en cuanto al grado de degeneración de estas células en la EP, siendo las de la región compacta lateral (SNcL) más vulnerables que las de la región compacta rostromedial (SNcrm) [27]. Es interesante destacar que en la imagen relacionada con este apartado de resultados podemos observar un detalle de las neuronas de la SNcrm (Fig. 6A) y de la SNcL (Fig. 6B).

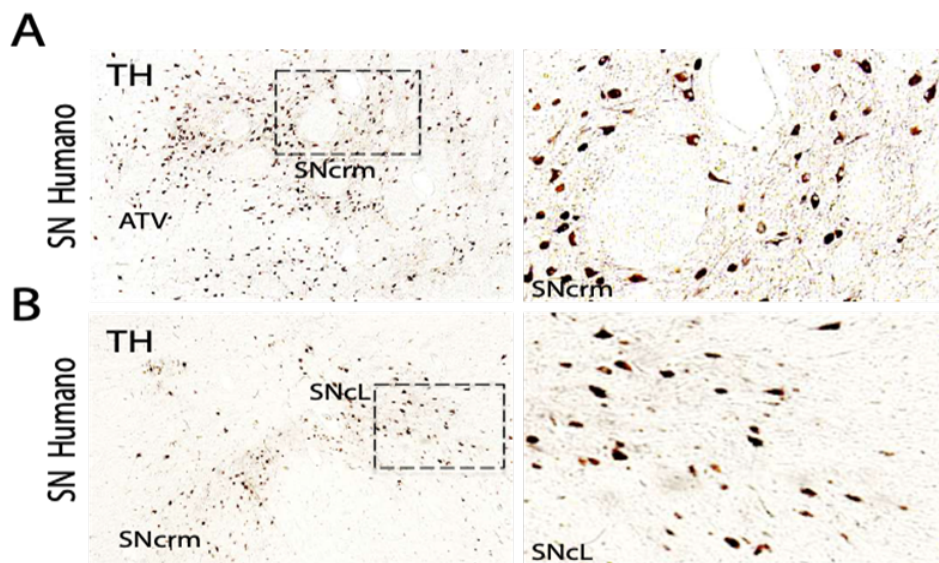


Figura 6: A,B.-Inmunohistoquímica de TH en tejido de mesencéfalo de humano. En la columna derecha se observa: A.-Detalle de SNcrm. B.-Detalle de SNcL. TH, Tirosina Hidroxilasa. SN, Sustancia Negra. ATV, Área Tegmental Ventral. SNcrm, Sustancia Negra Compacta Rostromedial. SNcL, Sustancia Negra Compacta Lateral.

13

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

4.2. Expresión diferencial del ARNm de TH, DDC y DAT en el sistema mesoestriatal de ratón

Teniendo en cuenta el patrón de degeneración de las neuronas mesencefálicas en la EP explicado en el apartado 4.1. y en base a la importancia que tienen las enzimas relacionadas con la síntesis de dopamina (TH y DDC) y los transportadores de la misma (DAT y VMAT) en el correcto funcionamiento del sistema mesoestriatal, decidimos centrar el trabajo en medir las diferencias de expresión de estas moléculas en las distintas regiones de dicho sistema (Fig. 7).

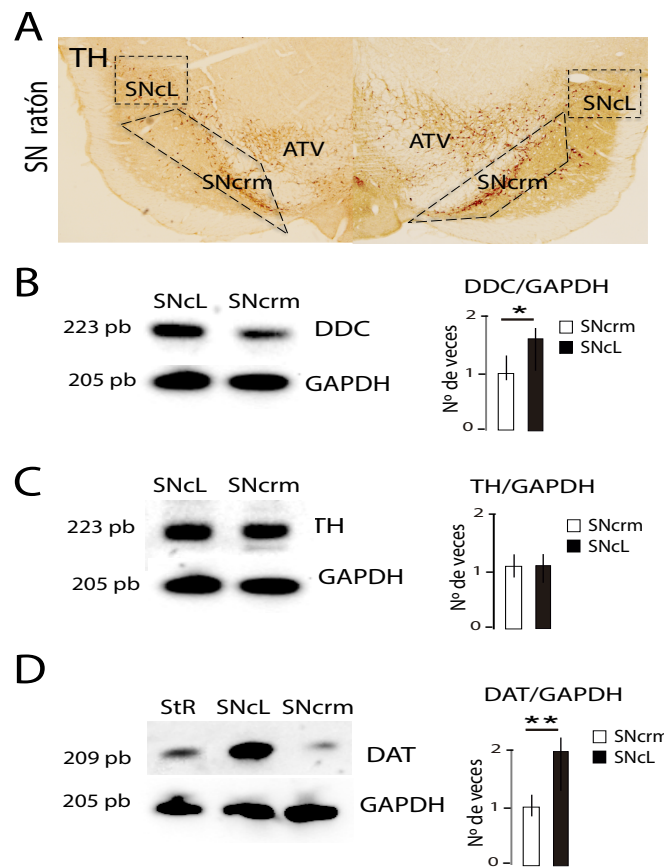


Figura 7: A.-Inmunohistoquímica de TH en tejido de mesencéfalo de ratón. En la imagen, en el interior de las líneas discontinuas, se pueden observar los límites de la SNcm y la SNr. B,C,D.-RT-PCR y cuantificación de la expresión en SN de ratón de DDC (B), de TH (C) y de DAT (D). TH, Tirosina Hidroxilasa. SN, Sustancia Negra. ATV, Área Tegmental Ventral. SNcm, Sustancia Negra Compacta Rostromedial. SNr, Sustancia Negra Compacta Lateral. DDC, Dopa Decarboxilasa. DAT, Transportador de Dopamina.

14

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

Para mostrar de una manera más clara cuáles fueron los núcleos objeto de estudio, se ha incluido la imagen de una inmunohistoquímica de mesencéfalo de ratón realizada previamente en el laboratorio, donde se muestran incluidas en cajas la SNcrm y la SNcL (Fig. 7A). Usando como referencia la imagen comentada se realizaron RT-PCRs de las moléculas objeto de estudio en las regiones indicadas, observándose una subida significativa de la expresión del ARNm de DDC ($p < 0,05$) y de DAT ($p < 0,01$) en la SNcL, que es la zona que presenta una mayor vulnerabilidad en la EP (Fig. 7B-D). En el caso de la expresión de la TH no se encontraron diferencias significativas en la expresión del ARNm entre la SNcL y la SNcrm (Fig. 7C). También podemos observar cómo los niveles de expresión del DAT en el estriado (debido al transporte anterógrado del RNAm) son menores que los de la SNcL (Fig. 7D). En el caso del VMAT continuamos poniendo a punto la técnica ya que no pudimos encontrar expresión con las condiciones usadas en este estudio.

La finalidad de este trabajo es habernos iniciado en la dinámica de un laboratorio de investigación, participando activamente de la realización de las técnicas que han quedado explicadas en el apartado de material y métodos y mostradas en este apartado de resultados y discusión. El haber realizado una inmunohistoquímica de TH en SN de humano nos ha permitido conocer de una manera más concreta las neuronas que degeneran en la EP y el poder visualizarlas ayuda a comprender un poco más como es el desarrollo de esta enfermedad. Por otro lado, el estudio más profundo de las moléculas relacionadas con el manejo de la dopamina usadas en este trabajo, debido a la importancia que tienen en el sistema mesoestriatal, suponen un reto dentro de la investigación en este campo. El haber encontrado un aumento significativo en la expresión del ARNm de la DDC y del DAT en la SNcL frente a la SNcrm, nos abre la posibilidad de estudiar más a fondo a que pueden ser debidas estas diferencias. La hipótesis con la que se seguirá en esta línea es que este aumento de expresión se debe a características epigenéticas diferenciales entre la SNcL y la SNcrm. La epigenética consiste en el estudio de las modificaciones reversibles y hereditarias que modulan la función de los genes, y que no afectan a la secuencia de nucleótidos del ADN. Estos cambios se producen debido al estilo de vida y a la interacción con el medio ambiente de los diferentes organismos [28]. La metilación del ADN, uno de los principales marcadores epigenéticos, juega un papel fundamental en diferentes enfermedades neurodegenerativas como la EP[29]. Debido a lo anteriormente descrito, el estudio de los niveles de metilación de los genes encargados de expresar la DDC y el DAT podría acercarnos a plantear terapias epigenéticas que puedan contribuir a aumentar la calidad de vida de los pacientes de EP.

15

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

5. CONCLUSIONES

- Las enzimas relacionadas con la síntesis de dopamina (TH y DDC) y los transportadores de la misma (DAT y VMAT) tienen una implicación directa en el correcto funcionamiento del sistema mesoestriatal.
- La expresión de la DDC y del DAT se encuentran significativamente aumentada en la SNcL frente a la SNcrn.
- La región donde se encuentran sobreexpresadas la DDC y el DAT, es decir la SNcL, es la zona de la SN más vulnerable a la degeneración en la EP.
- El ARNm de DAT también se encuentra en el estriado, debido probablemente al transporte anterógrado del mismo.
- El abordaje epigenético, para explicar las diferencias de expresión de estos genes, abre una posible respuesta a las variaciones encontradas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

6. QUÉ HEMOS APRENDIDO REALIZANDO NUESTRO TFG

Con respecto a la elaboración de este trabajo hemos aprendido a:

- Los procedimientos para llevar a cabo técnicas morfológicas (IHQ) y de biología molecular (RT-PCR)
- Elaborar una estrategia para un trabajo científico para así hacer la búsqueda y selección de artículos con información médica y biológica actual, reflexionar sobre la información encontrada y utilizarla para nuestra investigación.
- Usar las bases de datos de diferentes genes y sus expresiones para después comparar y analizar dentro del contexto de nuestro trabajo.
- Redactar la memoria del trabajo, citar correctamente los artículos científicos revisados y cómo ende hacer conclusiones y resumir los resultados del trabajo.
- Hablando del tema de este trabajo, hemos profundizado nuestros conocimientos en la patogénesis de la EP, enfocando nuestro estudio en las bases moleculares y genéticas. Fue un estudio extenso ya que hemos empezado a estudiar desde las bases recordando los conceptos de gen, su localización, vías de expresión y sus métodos de estudio. Después, hemos conocido el concepto e importancia de la epigenética, su implicación en la EP y posibles futuros descubrimientos relacionados con este tema.

Nos hemos sumergido en el previamente desconocido mundo de la investigación el cual nos ayudó a comprender como un estilo de vida junto con la alteración genética llega a provocar un conjunto de mecanismos que resultan en la expresión clínica de una enfermedad. Lo anterior nos ha supuesto una fascinante y enriquecedora experiencia la cual nos ha enseñado otros aspectos menos conocidos de la medicina.

17

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Federación Española de Parkinson. Espacio Parkinson. *Conoce la enfermedad -I. ¿Qué es el párkinson? Causas, diagnóstico y evolución.* 2017
2. Von Campenhausen, S.; Bornschein, B.; Wick, R.; Bötzel, K.; Sampaio, C.; Poewe, W.; Oertel, W.; Siebert, U.; Berger, K.; Dodel, R. *Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe.* Eur. Neuropsychopharmacol. 2005, 15, 473–490. PubMed
3. Zou, Y.M.; Liu, J.; Tian, Z.Y.; Lu, D.; Zhou, Y.Y. *Systematic review of the prevalence and incidence of Parkinson's disease in the People's Republic of China.* Neuropsychiatr. Dis. Treat. 2015, 15, 1467–1472. PubMed
4. Muangpaisan, W.; Hori, H.; Brayne, C. *Systematic review of the prevalence and incidence of Parkinson's disease in Asia.* J. Epidemiol. 2009, 19, 281–293. PubMed
5. Benito-Leon J. *Epidemiología de la enfermedad de Parkinson en España y su contextualización mundial [Epidemiology of Parkinson's disease in Spain and its contextualisation in the world].* Rev Neurol. 2018;66(4):125-134.
6. García-Ramos R, López Valdés E, Ballesteros L, Jesús S, Mir P. *The social impact of Parkinson's disease in Spain: Report by the Spanish Foundation for the Brain. Informe de la Fundación del Cerebro sobre el impacto social de la enfermedad de Parkinson en España.* Neurología. 2016;31(6):401-413. doi:10.1016/j.nrl.2013.04.008
7. Martín M. “Aumentan los casos de la enfermedad del Párkinson en Canarias.” Periodismo ULL. April 28, 2022; 1(1).
8. Nestler, E.J. *et al.* (2020) *Molecular neuropharmacology: A foundation for clinical neuroscience.* New York: McGraw Hill.
9. Aliñanes, Gregorio (2010) *Desarrollo Funcional del Sistema córticoestriatal: Rol de las vías dopaminérgicas.*
10. Kaufman DM, Milstein MJ. *Neurotransmitters and drug abuse.* Kaufman's Clinical Neurology for Psychiatrists. 2013:501-525. doi:10.1016/b978-0-7234-3748-2.00021-9
11. Lorenzo Sanz G, Sánchez Herranz A. *Implicación del Transportador vesicular de monoaminas en el trastorno por déficit de Atención/Hiperactividad.* Revista de Neurología. 2011;52(S01). doi:10.33588/rn.52s01.2011058.
12. Aggarwal S, Mortensen OV. *Overview of monoamine transporters.* Current Protocols in Pharmacology. 2017;79(1). doi:10.1002/cpph.32.

18

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

13. Lang AE, Lozano AM. *Parkinson's disease. First of two parts.* N Engl J Med. 1998;339(15):1044-1053. doi:10.1056/NEJM199810083391506
- 14 Marín D, Carmona H, Ibarra M, Gámez M. *Enfermedad de Parkinson: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento.* Rev Univ Ind Santander Salud. 2018; 50(1): 79-92. doi:10.18273/revsal.v50n1-2018008
- 15 Rodríguez Pupo Jorge Michel, Díaz Rojas Yuna Viviana, Rojas Rodríguez Yesenia, Ricardo Rodríguez Yuniel, Aguilera Rodríguez Raúl. *Actualización en enfermedad de Parkinson idiopática.* CCM [Internet]. 2013 Jun [citado 2023 Ene 29]; 17(2): 163-177.
16. Jankovic J. *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis.* J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2008;79(4):368-376. doi:10.1136/jnnp.2007.131045
17. Fabbri M, Coelho M, Guedes LC, et al. *Response of non-motor symptoms to levodopa in late-stage Parkinson's disease: Results of a levodopa challenge test.* Parkinsonism Related Disorders. 2017;39:37-43. doi:10.1016/j.parkreldis.2017.02.007
18. Connolly BS, Lang AE. *Pharmacological treatment of parkinson disease.* JAMA. 2014;311(16):1670. doi:10.1001/jama.2014.3654.
19. *Deep Brain Stimulation (DBS): What it is, Purpose & procedure.* Cleveland Clinic.2023.
20. Llumiguano C, Dóczy T, Baths I. *Tratamiento de la enfermedad de Parkinson Con palidotomía y palido-talamotomía Estereotáctica Guiada por microelectrodos.* Neurocirugía. 2006;17(5). doi:10.4321/s1130-14732006000500002.
21. Lee DJ, Dallapiazza RF, De Vloo P, Lozano AM. *Current surgical treatments for parkinson's disease and potential therapeutic targets.* Neural Regeneration Research. 2018;13(8):1342. doi:10.4103/1673-5374.235220.
22. Pavlou MAS, Outeiro TF. *Epigenetics in Parkinson's Disease.* Adv Exp Med Biol. 2017;978:363-390. doi:10.1007/978-3-319-53889-1_19
23. Feng Y, Jankovic J, Wu YC. *Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease.* J Neurol Sci. 2015;349(1-2):3-9. doi:10.1016/j.jns.2014.12.017
24. Rathore AS, Birla H, Singh SS, et al. *Epigenetic Modulation in Parkinson's Disease and Potential Treatment Therapies.* Neurochem Res. 2021;46(7):1618-1626. doi:10.1007/s11064-021-03334-w

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16

25. Masliah E, Dumaop W, Galasko D, Desplats P. *Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes*. Epigenetics. 2013;8(10):1030-1038. doi:10.4161/epi.25865
26. Urduñigo RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. Lancet Neurol. 2009;8(11):1056-1072. doi:10.1016/S1474-4422(09)70262-5
27. Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. Brain. 1999;122 (Pt 8):1437-1448. doi:10.1093/brain/122.8.1437
28. Beyond the genome. Nature. 2015;518(7539):273. doi:10.1038/518273a
29. Younesian S, Yousefi AM, Momeny M, Ghaffari SH, Bashash D. The DNA Methylation in Neurological Diseases. Cells. 2022;11(21):3439.doi:10.3390/cells11213439

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 5427263 Código de verificación: J1NKJ7yV

Firmado por: Anastasiya Mayorova UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 21/05/2023 16:48:40
LAURA ORTIZ MARTÍN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 16:49:03
Domingo David Afonso Oramas UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/05/2023 17:31:16