



Universidad
de La Laguna

Facultad de Ciencias de la Salud

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Medicina

Curso 2023-2024

**Estudio de la expresión diferencial
de los receptores dopaminérgicos
D2/D3 en el sistema mesoestriatal en
la Enfermedad de Parkinson**

Autor:

Julián Cruz Funes

Tutores:

Domingo David Afonso Oramas

Pedro Javier Barroso Chinaa

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 DEFINICIÓN	1
1.2 EPIDEMIOLOGÍA	1
1.3 CLÍNICA	2
1.4 FISIOPATOLOGÍA	2
1.5 ETIOLOGÍA	3
1.6 DIAGNÓSTICO	4
1.7 ANATOMÍA PATOLÓGICA	5
1.8 TRATAMIENTO	5
1.8.1 Farmacológico.....	5
1.8.2 No farmacológico.....	6
1.9 DOPAMINA	6
1.10 RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS	8
1.10.1. Clasificación.....	8
1.10.2. D1like vs D2like	8
1.10.3. ¿Qué se sabe del receptor D3?	8
1.10.4. Transportador de dopamina (DAT).....	9
1.10.5. D2R-D3R: localización y distribución	9
1.10.5. D2R-D3R y neurodegeneración / neuroprotección	10
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS	14
3.1. Principal:	14
3.2 Secundarios:	14
4.MATERIAL Y MÉTODOS	14
4.1. Inmunohistoquímica	14
4.2. RT-PCR	15
4.3. Análisis estadístico	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. Expresión la proteína de TH en sustancia negra de humano	16
5.2. Expresión diferencial del ARNm de D2 y D3 en el sistema mesoestriatal de ratón	16
6. CONCLUSIONES	18
7. LO QUE HE APRENDIDO EN ESTE TFG	19
8. AGRADECIMIENTOS:	19
BIBLIOGRAFÍA:	20

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa, con incidencia en aumento y etiología desconocida, que se caracteriza por la destrucción de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (SN). El papel de la dopamina resulta esencial para la fisiopatología de esta enfermedad, entre otras, debido a su participación en los circuitos de la actividad motora, memoria, motivación, recompensa, y sus conexiones con ganglios basales, corteza prefrontal y otras áreas del sistema límbico. Para ello, interacciona con receptores dopaminérgicos, agrupados en 2 familias, D1like y D2like, teniendo especial relevancia para el estudio la segunda, y más concretamente, los receptores D2 y D3, que, a pesar de pertenecer al mismo grupo, presentan diferencias demostradas entre sí en cuanto a mecanismo de acción y conexiones. El objetivo de este trabajo es estudiar la expresión de los receptores D2 y D3 en las diferentes regiones que componen el sistema mesoestriatal atendiendo a sus diferencias en relación con su patrón de vulnerabilidad. Usando la técnica de RT-PCR se observó una subida significativa ($p < 0,05$) de la expresión del ARNm del receptor D3 en la sustancia negra compacta lateral (SNcL) frente a la sustancia negra compacta rostromedial (SNcr), mientras que en el caso de la expresión del receptor D2 no se encontraron diferencias significativas. En el caso del estudio en el estriado se observó una mayor expresión del receptor D2 que de D3. Estos resultados ofrecen una posibilidad de realizar un abordaje epigenético para explicar las diferencias de expresión encontradas durante este trabajo.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, Dopamina, Sistema Mesoestriatal, Receptores D2 y D3.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease, with increasing incidence and unknown etiology, characterized by the destruction of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN). The role of dopamine is essential for the pathophysiology of this disease, among others, due to its participation in the circuits of motor activity, memory, motivation, reward, and its connections with basal ganglia, prefrontal cortex and other areas of the limbic system. For this purpose, it interacts with dopaminergic receptors, grouped in 2 families, D1like and D2like, having special relevance for the study the second one, and more specifically, the D2 and D3 receptors, which, in spite of belonging to the same group, present demonstrated differences between them in terms of mechanism of action and connections. The aim of this work is to study the expression of D2 and D3 receptors in the different regions that compose the mesostriatal system attending to their differences in relation to their vulnerability pattern. Using the RT-PCR technique, a significant increase ($p < 0.05$) of D3 receptor mRNA expression was observed in the lateral substantia nigra pars compacta (SNcL) versus the rostromedial substantia nigra compacta (SNcrm), while in the case of D2 receptor expression no significant differences were found. In the case of the study in the striatum, a higher expression of the D2 receptor compared to D3 was observed. These results offer the possibility of an epigenetic approach to explain the differences in expression found during this work.

Key words: Parkinson's disease, Dopamine, Mesostriatal System, D2 and D3 receptors.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DEFINICIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) una enfermedad de etiología desconocida que ocupa el segundo lugar entre las enfermedades neurodegenerativas solo superada por la enfermedad de Alzheimer (1).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia es aproximadamente de un 0,3% en la población general, aumentando con la edad (llega al 2% en mayores de 60 años y es superior al 4 % en mayores de 80), con una incidencia de 8-18/100.000 personas/año. Se calcula que el número de personas con EP en las naciones más pobladas del mundo era de 4 millones en 2005 y se espera que para 2030 esa cifra haya crecido más del doble, a 9 millones, debido al envejecimiento de la población. Algunos estudios señalan mayor prevalencia en varones y otras posibles diferencias entre razas, aunque estos datos están pendientes de confirmar. Otro aspecto de interés son los factores genéticos, sobre todo en aquellos que debutan con la enfermedad por debajo de los 45 años y que presentan historia familiar (2).

En España, la EP afecta a unas 120.000-150.000 personas, con una incidencia de 10.000 casos nuevos al año, siendo la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente, solo superada por la Enfermedad de Alzheimer. El 70% de las personas diagnosticadas de Parkinson en España tienen más de 65 años, pero el 15% son menores de 50 años. Los pacientes tardan una media de entre 1 y 3 años en obtener un diagnóstico. La depresión puede ser la primera manifestación del Parkinson y, junto con el estreñimiento, alteración del olfato o trastorno de conducta del sueño REM, entre otros síntomas no motores, pueden ser marcadores precoces de la enfermedad. Entre el 20 y el 25% de los pacientes afectados por la EP requieren un ingreso hospitalario anual. En la *Figura 1* se puede observar cómo ha aumentado a lo largo de los años el número de habitantes con EP (2).

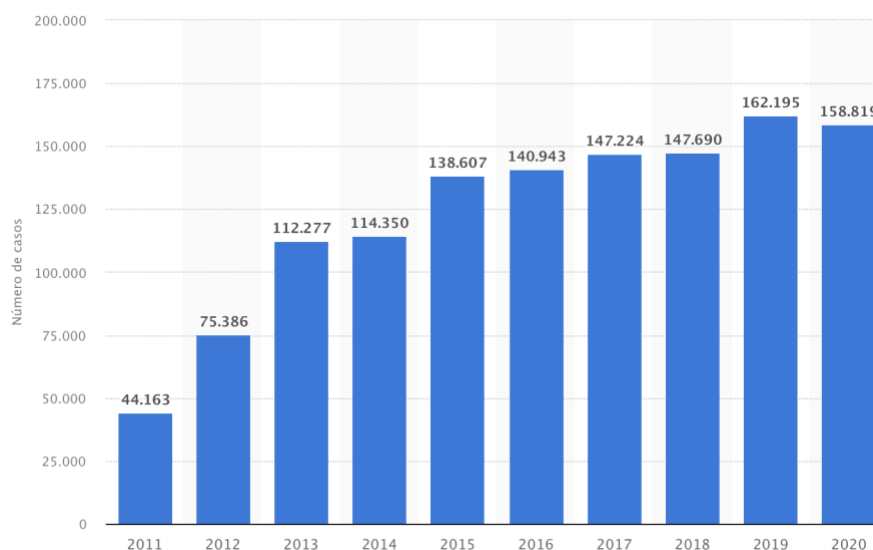


Figura 1: número de casos de EP en España entre 2011 y 2020. Statista Research Department, 2022.

Estrechando el cerco sobre Canarias, según los datos registrados en la Historia Clínica Electrónica, la prevalencia de la enfermedad de Parkinson ha crecido 11,55 por ciento entre 2019 y 2022. En total, en el archipiélago hay 14.039 personas diagnosticadas de Parkinson, a 31 de diciembre de 2022, con especial incidencia en la isla de Tenerife, donde, según la Asociación del Parkinson de Tenerife, unas 4000 personas padecen la enfermedad. De esos pacientes, más de un 40% necesitan la ayuda de cuidadores de forma precoz, mientras que a los 10 años del diagnóstico se estima que esa cifra pueda crecer al 73% (3).

1.3 CLÍNICA

La EP se caracteriza por temblor de reposo, rigidez, acinesia/bradicinesia y trastorno de la marcha con inestabilidad postural. Como síntomas adicionales destacan dificultad para hablar, deglución alterada, trastornos autonómicos y una serie de manifestaciones no motoras que incluyen alteraciones sensitivas, trastornos del estado de ánimo, disfunción del sueño, deterioro cognitivo y demencia. Las alteraciones motoras siguen siendo los síntomas cardinales, y, por tanto, los síntomas guía para el diagnóstico de la EP (1).



Figura 2: clínica de la EP (Sergio Escrivá García, Webconsultas, 2022)

1.4 FISIOPATOLOGÍA

Se trata de un proceso crónico y progresivo provocado por la degeneración neuronal en la pars compacta de la sustancia negra (SN), lo que conlleva una disminución en los niveles de dopamina y la consiguiente aparición de síntomas motores junto con la aparición de inclusiones intranucleares llamadas cuerpos de Lewy. En la Figura 3 se observa la pérdida de neuronas

dopaminérgicas en la sustancia negra. Dichas inclusiones también afectan a las neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert, al Locus Cerúleo, a núcleos dorsales del rafe...en definitiva se ven implicados un número considerable de neurotransmisores además de la dopamina, situándose este hecho como una posible causa de la mencionada clínica no motora. Se ha sido puesto de relieve que la neurodegeneración comienza antes de que se manifiesten tales síntomas motores, adquiriendo especial relieve el conocimiento sobre las manifestaciones no motoras de la enfermedad debido a una afectación multisistema tanto a nivel cerebral como extracerebral (2).

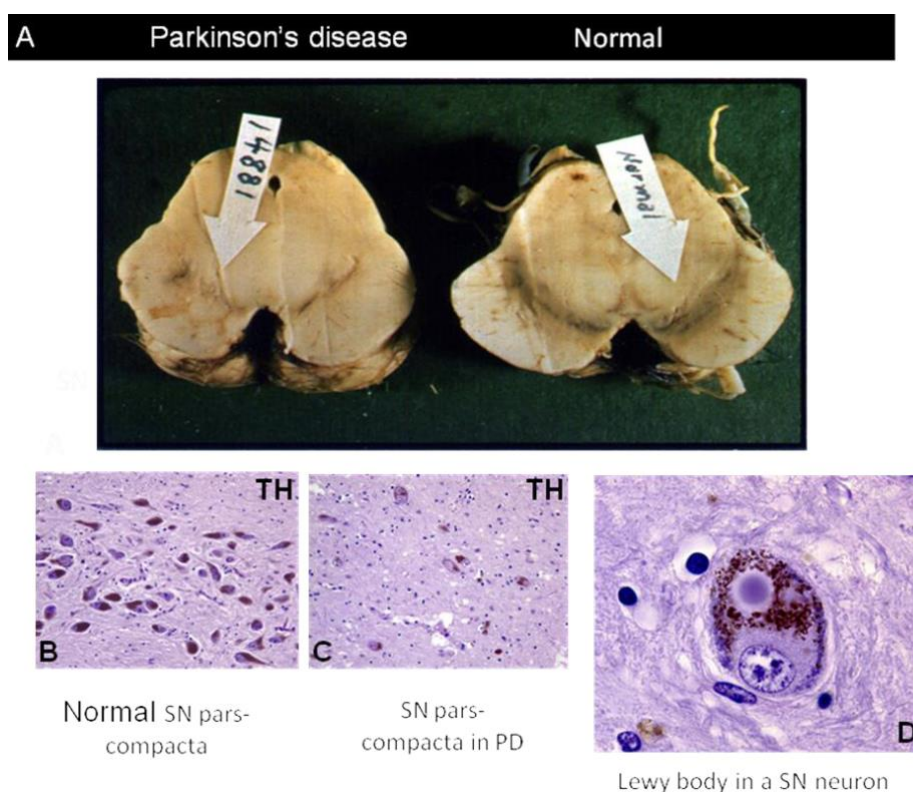


Figura 3: Comparación macroscópica y microscópica de la sustancia negra normal y en un paciente con EP. Mandel et al, 2009.

1.5 ETIOLOGÍA

Casi todos los casos de EP son de tipo esporádico (85-90%) y se desconoce su etiología. Las únicas causas conocidas son las mutaciones génicas. Han pasado 20 años desde la descripción de la primera mutación genética relacionada con la enfermedad (alfa-sinucleína); desde entonces han sido descritas 22 mutaciones asociadas a la EP que pueden explicar hasta un 30 % de las formas familiares y un 5 % de las formas esporádicas (2).

La información epidemiológica sugiere que hay un mayor riesgo después de exposición a plaguicidas, vivir en zonas rurales y beber agua de pozos y también se han descrito factores protectores como el consumo de tabaco, cafeína, AINEs, bloqueantes de los canales de calcio...Sin embargo, se han descrito en estudios individuales pero los resultados han sido inconsistentes y hasta ahora no se ha confirmado que un factor ambiental sea la causa o que contribuya a causar la EP (2).

Hay varias teorías sobre el origen de la EP esporádica: la dopamina se oxida resultando en 5,6-indolequinona, quinona dopamina y aminocromo. Los dos primeros son productos altamente inestables que se degradan espontáneamente. Sin embargo, el aminocromo tiene como principal función la formación y unas proto-fibras tóxicas de la proteína alfa-sinucleína, una de las primeras proteínas que se identificaron como responsables de la EP. Además, produce estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y degradación de proteínas mediante activación del sistema lisosomal y proteasoma. Es decir, el propio metabolismo de la dopamina podría estar causando la muerte de las neuronas dopaminérgicas (2).

Por otro lado, estudios llevados a cabo tanto en animales como en humanos han puesto en evidencia a la disfunción lisosomal como uno de los principales factores implicados en la patogénesis de la EP. Un estudio de *Abeliovich et al* afirma que, dentro de los genes lisosomales implicados, el que tiene un mayor impacto en un aumento del riesgo para el desarrollo de la enfermedad es el GBA1, que codifica una enzima, la glucosilceramidasa, que cataliza el paso de glucosilceramida en glucosa y ceramida. Una mutación en el GBA1 resultaría en un déficit de la enzima, lo que llevaría a un acúmulo de glucosilceramida y glucosilesfingosina, entre otros, produciendo toxicidad e inflamación, aumentando no solo el riesgo de padecer la enfermedad, sino su gravedad, probabilidad de sufrir demencia asociada y aparición temprana. Aunque se están llevando a cabo estudios sobre su eficacia en humanos, se ha experimentado en ratas un tratamiento con PR001, un vector diseñado para liberar el GBA1 en el cerebro, puede retrasar o incluso detener la progresión de la EP en pacientes con mutaciones en dicho gen (4).

1.6 DIAGNÓSTICO

A pesar de los avances en el conocimiento de distintos aspectos de la EP, actualmente su diagnóstico sigue siendo fundamentalmente clínico, aunque hay pruebas complementarias como el estudio del déficit olfatorio, la gammagrafía cardiaca con 123I-MIBG y los estudios con neuroimagen funcional de la vía dopaminérgica presináptica con PET o SPECT o DATSCAN, que pueden realizarse de forma ocasional con objeto de resolver casos dudosos (2).

Los criterios clínicos para el diagnóstico incluyen presencia de bradicinesia acompañada de, al menos, uno de los siguientes: rigidez muscular, temblor de reposo de 4-6 Hz o inestabilidad postural no causada por disfunción visual primaria, vestibular, propioceptiva o cerebelosa (1).

La neuroimagen es útil para diferenciar la EP de otros parkinsonismos. Destaca la RMN craneal, que se utiliza para descartar causas de parkinsonismo secundario como hidrocefalia normopresiva o tumores, parkinsonismos plus como la parálisis supranuclear progresiva o la atrofia multisistémica. En la EP la RMN resulta completamente normal. Otras técnicas empleadas son la ecografía transcraneal o la neurosonografía, y como nuevas técnicas en desarrollo destaca la *RM 7 teslas*, que permite visualizar la anatomía del sistema nervioso. Con esta técnica se ha objetivado una hiperintensidad en secuencias T2 de la SN en sujetos normales, y su ausencia en pacientes con EP debido a una pérdida de neuronas con melanina (nigrosomas) en la parte reticulada de la SN, y mayor depósito de hierro (2).

Obtener una certeza diagnóstica completa en vida es imposible. En los estudios clinicopatológicos realizados en la década de los noventa se consiguió una confirmación diagnóstica por autopsia de entre el 75% y el 95% en pacientes diagnosticados de EP en vida. La precisión diagnóstica varía considerablemente según la duración de la enfermedad, la edad, la experiencia del médico y la evolución en nuestra comprensión de la EP (estudios más recientes muestran en general una mayor precisión) (2).

1.7 ANATOMÍA PATOLÓGICA

Se observa la existencia de cambios degenerativos en las neuronas de la pars compacta de la SN, asociada a una gliosis reactiva moderada y a una disminución de neuronas del locus ceruleus y del núcleo dorsal del vago, con afectación variable del núcleo basal de Meynert y de otros núcleos subcorticales. Macroscópicamente se objetiva una depigmentación de la SN. En esta enfermedad existe una selectividad lesional típica que la diferencia de otras entidades degenerativas, del envejecimiento y del efecto de los agentes tóxicos que, en general, lesionan más difusamente la SN (1).

El marcador histopatológico característico son los llamados cuerpos de Lewy (CL), que son inclusiones intracitoplasmáticas neuronales de causa desconocida de vital importancia para poder diagnosticar esta enfermedad, aunque no son patognomónicas, ya que también aparecen en otras patologías como en la enfermedad de Alzheimer, necropsias de sujetos ancianos sanos, demencia por cuerpos de Lewy, etc (1).

1.8 TRATAMIENTO

1.8.1 Farmacológico

La levodopa es el tratamiento clásico de la EP. Es un profármaco de dopamina que actúa a nivel central tras ser transportada en el intestino delgado con mecanismo activo. Es necesario evitar su transformación periférica por la enzima descarboxilasa (ubicua en múltiples tejidos) mediante carbidopa o benserazida. Alcanza la barrera hematoencefálica y es introducida por otro transportador de aminoácidos neutros al interior cerebral. Allí será convertida en dopamina por la descarboxilasa cerebral (1).

Además de su acción sintomática, la levodopa (y otros fármacos dopaminérgicos) es capaz de modificar la plasticidad del estriado denervado y estimular la liberación de factores tróficos en modelos experimentales. Por otra parte, no se ha confirmado la toxicidad del fármaco; de hecho, clínicamente parece que no es lesiva tras largos años de uso (2).

La levodopa es el fármaco antiparkinsoniano más eficaz disponible, aunque su uso en estadios iniciales influye en la presencia de complicaciones motoras, especialmente en la aparición de discinesias y fluctuaciones motoras, más comúnmente descritas en pacientes jóvenes. En cuanto a la comparación con otros fármacos antiparkinsonianos, la levodopa es sin duda el más potente (con la

posible excepción de la apomorfina) y el mejor tolerado, es claramente superior a los agonistas y al resto de fármacos auxiliares (2).

Otros fármacos: *agonistas dopaminérgicos* (uso actualmente restringido por riesgo cardiovascular, aunque los *no ergóticos* como pramipexol son eficaces en fase inicial en monoterapia y en fase avanzada asociados a levodopa), *iMAO* (rasagilina, selegilina), *iCOMT* (entacapona), *amantadina* (eficaz en la reducción de discinesias relacionadas con la levodopa), *safinamida* (eficaz en el control de síntomas motores asociada a la levodopa) y la *apomorfina* (agonista D1-D2) (1).

1.8.2 No farmacológico

Por otro lado, la actividad física se ha asociado, no solo a una disminución del riesgo de desarrollar una EP, sino a una mejora de determinados síntomas motores una vez establecida la enfermedad. Un estudio de *Ellis TD et al* afirma que el ejercicio aeróbico induce un aumento en la liberación de dopamina por parte de las células de la SN por resultados durante la experimentación en ratones, además de ralentizar el proceso de degeneración de dichas células mediante el aumento de los niveles de factores neurotróficos del cerebro (BDNF, GDNF...). En cuanto al entrenamiento anaeróbico, se encuentran menos estudios con respecto al aeróbico, pero la evidencia muestra una mejora de los síntomas relacionados con el movimiento (hipocinesia y bradicinesia) (5).

Además, se ha demostrado que otras formas de entrenamiento como equilibrio o mindfulness puede, no solo reducir el riesgo de caídas y el dolor, sino aliviar síntomas no motores como la depresión asociada. Sin embargo, en fases tempranas de la enfermedad, no está claro el beneficio de las actividades citadas, por lo que lo que se recomienda es ejercicios de comunidad como baile o tai-chi.

De momento, no se ha descrito una terapia bio-psico-social específica como parte del manejo del paciente con EP. No obstante, un estudio de *Gibson G et al* investiga si pudiera aplicarse un modelo usado, por ejemplo, en el abordaje de la demencia para la EP. Los resultados concluyeron que, si bien existen diferencias significativas en la clínica, fisiopatología y tratamiento entre la demencia y la EP, los pacientes con esta última podrían beneficiarse de la terapia bio-psico-social usada en la demencia, no de manera específica ni sustituyendo a otros tratamientos, pero sí que puede ayudar a tener una mayor claridad sobre las necesidades de los pacientes y usado como base para futuras terapias (6).

1.9 DOPAMINA

La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico que participa en 4 circuitos fundamentales para la dopamina: nigroestriatal, mesolímbico, mesocortical y tuberoinfundibular. Las principales funciones de la hormona son permitir el movimiento (conexión con los ganglios basales) y también intervienen en la función de recompensa (conexión con corteza prefrontal y núcleo accumbens), novedad, motivación, memoria, estado de alerta, inhibición de la producción de la prolactina... (7).

Se sintetiza a partir de L-Tirosina, que por medio de la tirosina hidroxilasa (TH) se degrada dando como resultado L-DOPA, y ésta, por medio de la DOPA descarboxilasa, pasará a formar

dopamina (Figura 4), que es ampliamente distribuida por el bulbo olfatorio, SN y mesencéfalo, hipotálamo, área tegmental ventral, retina, sustancia gris periacueductal, entre otras.

Desde un punto de vista funcional, las vías *dopaminérgicas* se pueden dividir en tres grupos:

- Motoras: (sistema nigro-estriatal, los axones parten de las neuronas dopaminérgica situadas en la sustancia negra compacta alcanzando el estriado).
- Conductuales (sistema *mesolímbico* y *mesocortical*).
- Endocrinas (desde el hipotálamo a la hipófisis) (7).

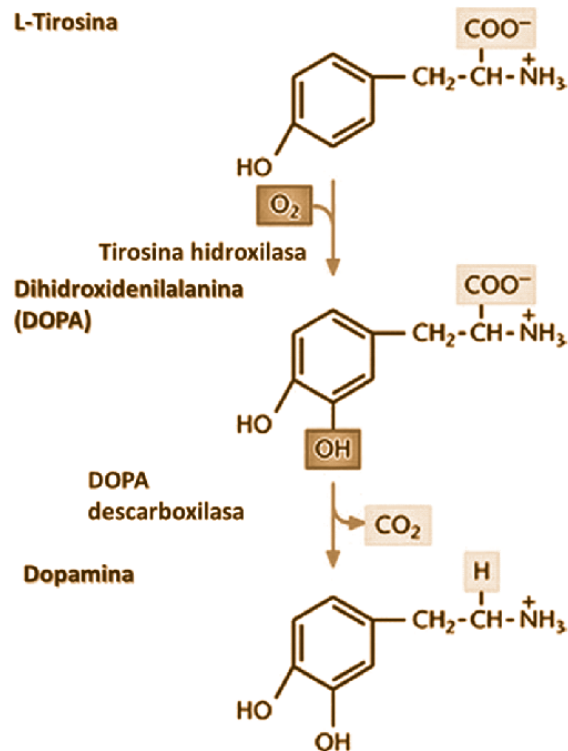


Figura 4: esquema de la síntesis de dopamina. Torres Carrillo et al, Aspectos Moleculares del Envejecimiento, 2012.

La dopamina se metaboliza mediante dos enzimas: MAO (*Mono-Amino-Oxidasa*) de la que existen dos *isoenzimas* (A y B); y COMT (*Catecol-Orto-Metil-Transferasa*). Los metabolitos formados son DOPAC (*dihidroxifenil-acético*) y HVA (*ácido homovainílico*). Asimismo, la dopamina se hidroxila a Noradrenalina (NA) y esta, a su vez, se N-desmetila para sintetizar adrenalina (7).

Un derivado sintético de la dopamina (*6-hidroxi-dopamina*) destruye químicamente las terminales nerviosas *dopaminérgicas*. Se utiliza en investigaciones *farmacodinámicas* para causar la ablación farmacológica *dopaminérgica* (8).

El proceso de síntesis dopaminérgico y los metabolitos y productos que intervienen en él pueden resultar de gran importancia desde el punto de vista de la investigación del origen de determinadas enfermedades neurodegenerativas. En esta línea, existen evidencias realizadas que demuestran el efecto de la tetrahydrobiopterina (BH₄) sobre la liberación de L-DOPA en tejido estriatal incubado

in vitro. El BH4 es un cofactor esencial de la TH y se ha demostrado influir en la liberación de L-DOPA en un mecanismo dosis-dependiente (9).

Las anomalías en el sistema dopaminérgico y sus receptores son la base para el estudio, no solo de la EP, sino también de otras enfermedades como la esclerosis múltiple o la Corea de Huntington (7).

1.10 RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

1.10.1. Clasificación

Los receptores de dopamina pertenecen a la familia de proteínas G, comprenden de D1 a D5 y se clasifican según sus semejanzas en su composición molecular en D1 like (D1 y D5) y D2 like (D2, D3 y D4), siendo los que se encuentran en mayor cantidad los D1 y D2.

D1 es homólogo de D5 en un 50% (de ahí que se clasifiquen juntos). Su principal diferencia es la afinidad de la dopamina, mucho mayor por D5. El receptor D3 se encarga de la producción de neurotensina a partir de la dopamina y el D4 es homólogo en un 41% a D2 y en un 39% a D3 y se encuentra en corteza prefrontal e hipocampo. D1, D3 y D4 tienen especial afinidad por neurolepticos atípicos como la clozapina y los dos últimos han sido estudiados por mediar en la acción antipsicótica de los neurolepticos y estar restringidos únicamente al sistema límbico (10).

1.10.2. D1like vs D2like

Las funciones del receptor D2 son fundamentalmente regulación del estado de ánimo, control del movimiento voluntario conectando con los ganglios basales y estabilización de las emociones conectando con el sistema límbico, además de suponer el sitio de unión más importante para fármacos antipsicóticos (10)

Al contrario, se observó una baja afinidad de las butiferas como el haloperidol en los receptores D1, cuya principal implicación son determinadas funciones cognitivas como la memoria o la atención. Además, se encarga de la respuesta del SNC al consumo de cocaína, mientras que el D2 hace lo propio con las drogas de abuso en general (11).

Típicamente la familia del receptor D1like está positivamente asociada con la adenil-ciclasa (AC), induciendo la acumulación de AMPc y la activación de la PKC dependiente del mismo. Por el contrario, la familia D2like disminuye la acumulación de AMPc inhibiendo la PKC y el DARPP-23. Fármacos como los neurolepticos bloquean los receptores D2like, mientras que fármacos como la bromocriptina los activan (12, 13).

1.10.3. ¿Qué se sabe del receptor D3?

Como ya se ha comentado, pertenece a la familia D2-like. Se encuentra selectivamente en regiones del sistema límbico y tiene similitudes farmacológicas con el receptor D2. De hecho, los receptores D2 y D3 son homólogos en un 75% de sus regiones transmembrana.

Estas características hicieron que el receptor centrara mucha atención desde su descubrimiento como una potencial diana para el tratamiento de la EP. Varios estudios aseguran que, mediante el tratamiento con agonistas de este receptor, se puede no solo aliviar síntomas derivados de la enfermedad como discinesia, disfunción sensorial o síntomas psicóticos derivados del parkinsonismo, sino que se puede incluso tener un efecto de neuroprotección (12).

1.10.4. Transportador de dopamina (DAT)

El DAT (*Dopamine Active Transporter*) es una glicoproteína de membrana (12aa) que se encarga de reabsorber la dopamina del espacio intercelular interactuando con los receptores D2 y D3, se encuentra regulada por protein-quinasas como la alfa-sinucleína e interviene en la fisiopatología de la EP. Actúa como un simportador Na⁺/Cl⁻ y se encuentra ampliamente distribuido por en la SN, globo pálido, corteza cingulada, núcleo accumbens, área tegmental ventral, amígdala... Se ha asociado alteraciones funcionales del DAT en dichas regiones con determinadas patologías como la EP, TDAH o el trastorno bipolar (14).

La proteína quinasa C (PKC) interviene de manera directa en la ubiquitinación y endocitosis del DAT. Se ha demostrado que un activador de la PKC, la *N-fenetil methacrilamida* (PMA), potenciaba el proceso de ubiquitinación, y el tratamiento con inhibidores de la PKC como la bisindolmaleimida detenía el proceso de degradación de DAT mediada por PMA (15).

1.10.5. D2R-D3R: localización y distribución

En general, la familia D2like se concentra en el cuerpo estriado, globo pálido externo, amígdala, hipófisis, área tegmental ventral, hipocampo y corteza entorrinal, además de las neuronas dopaminérgicas de la SN. Sin embargo, no todos los receptores de dicha familia se encuentran distribuidos de la misma forma. Un estudio (*Bouthenet et al*) visualizó el ARNm del D3R en varias secciones de cerebro en ratones mediante hibridación in situ usando como marcador un ácido ribonucleico correspondiente al tercer bucle citoplasmático, un dominio presente en D2R y D3R con una homología discreta entre ambos. Para comparar, se observó también un ARNm específico del D2R en secciones adyacentes. La investigación dio como resultado que el D2R se expresaba en prácticamente la totalidad de regiones cerebrales importantes que recibían proyecciones dopaminérgicas, con un predominio en las regiones motoras, especialmente en el cuerpo estriado. Sin embargo, la expresión del D3R se encuentra más restringida, existiendo una mayor concentración en áreas del telencéfalo como el núcleo accumbens o las islas de Calleja y otras áreas del sistema límbico como el hipocampo y los cuerpos mamilares. En general, se observó que el D3R se concentraba con más abundancia en regiones dopaminérgicas implicadas en funciones cognitivas y de emociones (16).

Ambos receptores fueron detectados también a nivel de la sustancia negra, sugiriendo que no solo actúan como autorreceptores, sino como receptores post sinápticos (*Figura 5*) (16).

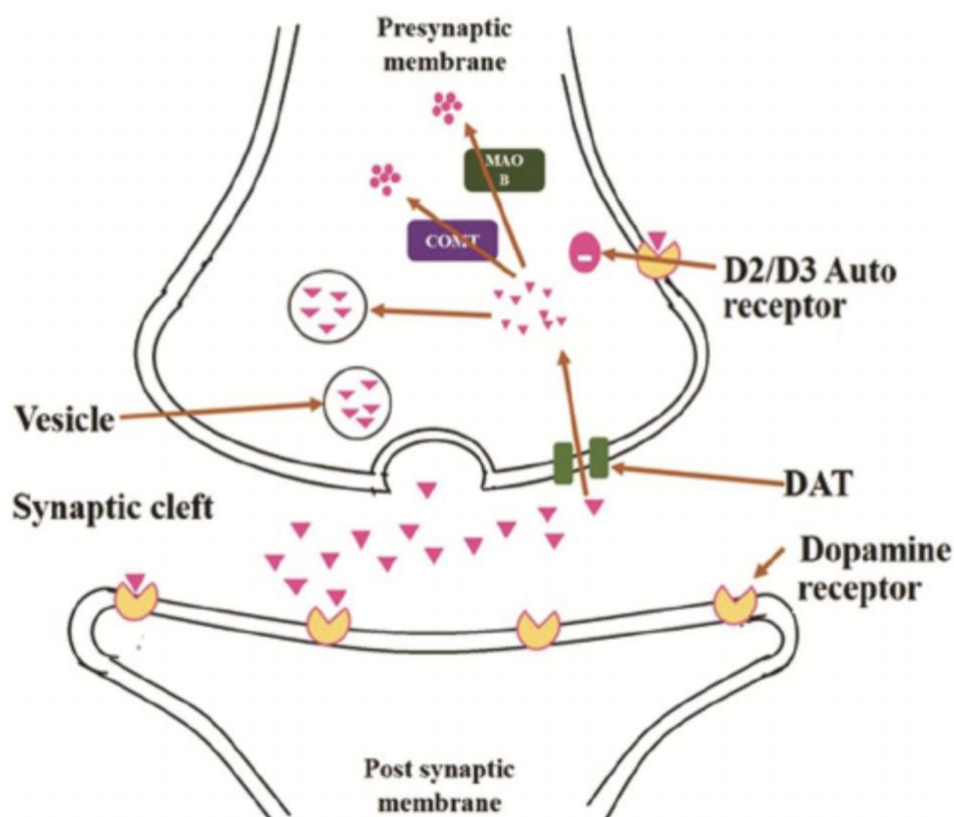


Figura 5: ruta de la dopamina desde la neurona pre-sináptica (Tasneem et al, 2020).

1.10.5. D2R-D3R y neurodegeneración / neuroprotección

Como se ha comentado, los receptores D2like inhiben la AC (Figura 6). Sin embargo, se han observado diferencias significativas entre los distintos receptores de esa familia en cuanto a la respuesta funcional y la activación de cascadas de señalización, siendo especialmente destacada en los receptores D3R. Se ha observado que se produce el efecto inhibitorio con la interacción entre los D3R y la isoforma V de la AC (ACV), pero dicho efecto ha sido bajo o inexistente con la isoforma VI. La ventaja es que la ACV se encuentra ampliamente distribuida en regiones con actividad dopaminérgica, especialmente en el estriado, teniendo un rol importante no solo en la EP, sino también en la regulación de trastornos de ansiedad, síndrome de abstinencia o la discinesia inducida por L-3,4-DOPA. Ocurre algo similar con la activación de la vía MAPK/ERK, posible mediante la interacción con el D2R o el D4R, si la interacción se produce con el D3R, la activación solo se produce si existe una coexpresión de la proteína $G\alpha_0$ y no de $G\alpha_i$ (12, 17).

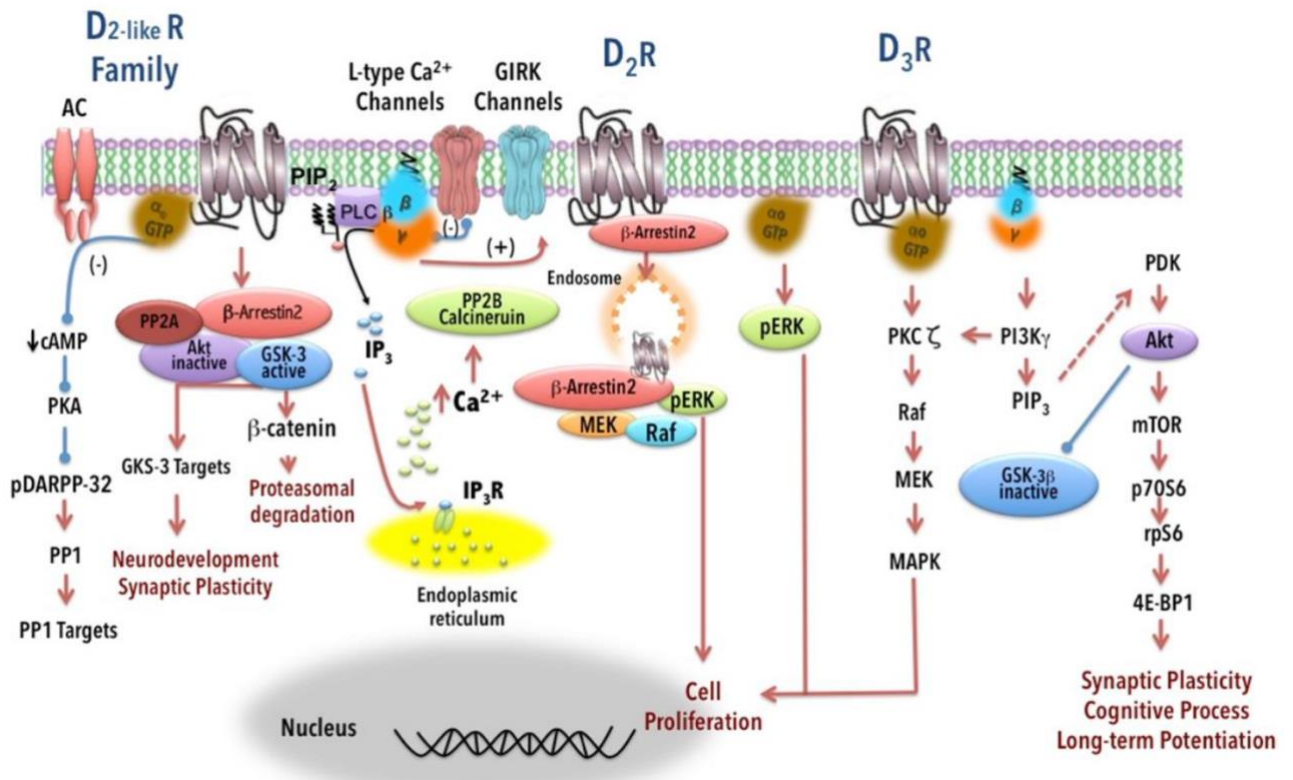


Figura 6: cascada de señalización de la familia D2like (Rangel-Barajas et al, 2015)

Los receptores D2 también modulan canales GIRK (canales de K rectificadores de proteínas G), los cuales modulan la actividad eléctrica cerebral, mientras que existe una menor afinidad para los receptores D3 según se ha demostrado mediante experimentación en ratones (12).

Algunos estudios concluyeron mediante experimentación con ratas que la administración prolongada de pramipexol (0,1mg/kg/día entre 6 y 21 días) disminuye la reabsorción de dopamina en el estriado, desplazando al DAT al tener mayor afinidad por los receptores D2 y D3, siendo especialmente notable en D3. De hecho, el efecto del pramipexol estuvo ausente en ratones a los que experimentalmente se les eliminó el receptor D3, pero no se vio afectado en ratones genéticamente privados del receptor D2, lo cual indica que son dependientes del receptor D3. Si bien la señalización de D2 estimula la actividad de DAT, algunos datos sugieren que el D3 tiene un efecto bifásico (Figura 7). (18, 19).

En resumen, los resultados indican que la activación de D3R a largo plazo promueve la regulación negativa de DAT, un efecto que puede ser la base de las acciones neuroprotectoras y antidepresivas descritas para algunos agonistas de D2R/D3R. Sin embargo, a pesar del amplio uso terapéutico de estos agonistas en trastornos neuropsiquiátricos, este fenómeno ha sido poco estudiado (19).

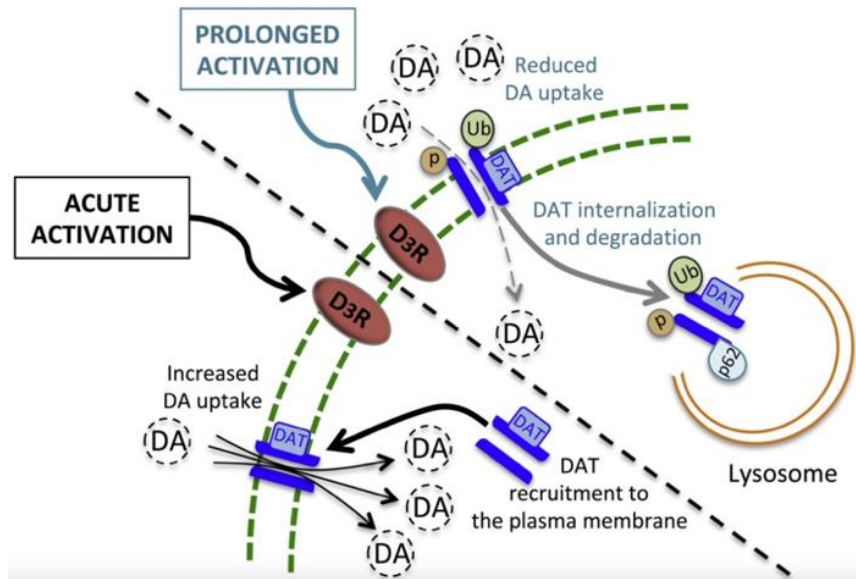


Figura 7: efectos de la activación aguda y prolongada del D3R sobre el DAT (Afonso-Oramas et al, 2021).

El pramipexol, además de haber demostrado eficacia en el control de síntomas como alucinaciones o depresión, también existen ciertos datos que afirman que se trata de un modulador de la autofagia. Existe una evidencia creciente que afirma que la autofagia es deficiente en determinadas enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas, de esta forma, el uso de un inductor de la autofagia podría tener efectos beneficiosos en estas patologías. Sin embargo, no se recomienda la administración prolongada de dichos inductores debido a que comparten vías de señalización con procesos de muerte celular e interrumpen la síntesis proteica. La búsqueda de nuevos inductores autofágicos indica que el uso de ligandos de D2R y D3R puede también activar la autofagia, aunque se desconocen aspectos esenciales sobre su mecanismo de acción. Para aclararlo, en un estudio (Barroso-Chinea, 2020) se administró pramipexol a ratones con sobreexpresión de los genes de D2R y D3R y a otro grupo de ratones “knock-out” a los que se les habían suprimido dichos genes. El resultado fue que el pramipexol induce la autofagia por inhibición de MTOR mediante un mecanismo D3R dependiente, pero D2R independiente. Además, este proceso incluye inhibición de MTORC1 con preservación de la síntesis proteica, lo que contrasta con procesos de inhibición alostérica o catalítica de MTOR y abre la puerta a posibles terapias mediadas por ligandos de receptores acoplados a proteínas G para el futuro tratamiento eficaz de enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas (20).

. Esto es importante ya que existen una serie de estudios que afirman que una disrupción en la autofagia puede generar agregados proteicos que pueden causar muerte neuronal. Un estudio de Li y colaboradores demostró un aumento de vacuolas autofágicas en el cerebro de ratones tratados con pramipexol (19).

Otro estudio afirma que el uso de agonistas del D3R puede tener un efecto neuroprotector mediante la modulación de agregados aberrantes de la proteína comentada anteriormente alfa-sinucleína (Yang P et al) (Figura 8). Las alteraciones sensoriales como las gustativas y las olfatorias son comunes en enfermedades neurodegenerativas, entre las que se encuentra la EP, cuya

destrucción de neuronas dopaminérgicas afecta a regiones encargadas de los sentidos mencionados como la corteza orbitofrontal, ínsula o el núcleo del tracto solitario. A pesar del impacto de dichos síntomas sobre la calidad de vida de los pacientes, no existe, de momento, ningún tratamiento eficaz para estos síntomas no motores. Sin embargo, el ya mencionado pramipexol podría tener un efecto beneficioso sobre el alivio de estos síntomas, aunque se requiere de más estudios para poder tener suficiente evidencia. (21)

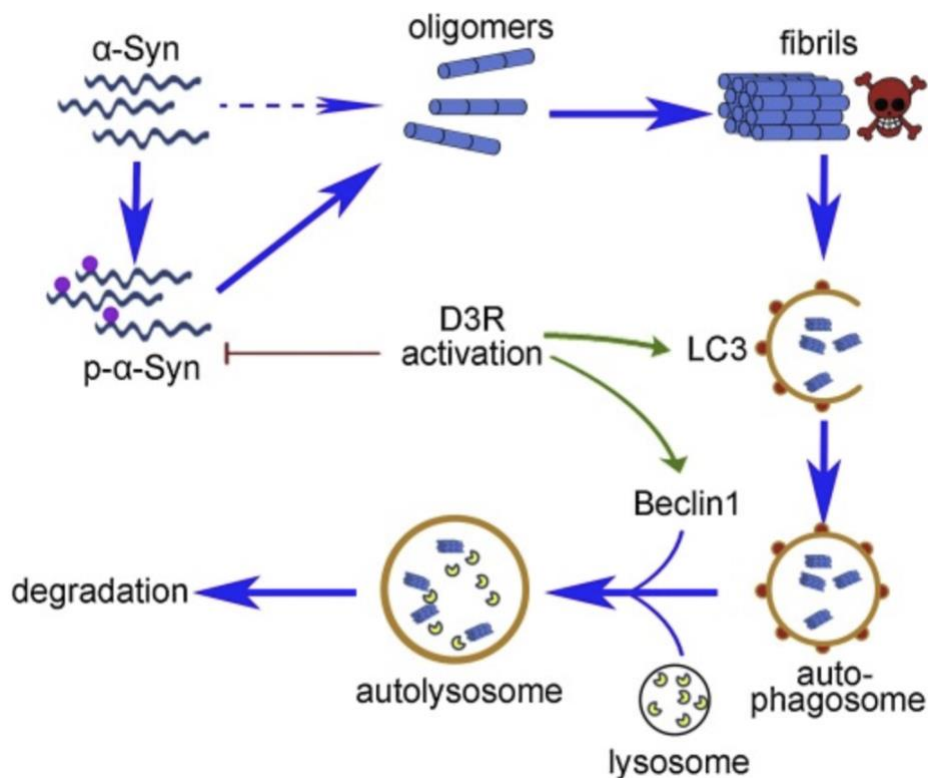


Figura 8: agonistas de D3R estimulan la degradación de la alfa-sinucleína (Yang P et al, 2020).

Otros fármacos que se valoran son agonistas parciales como la cariprazina (con gran afinidad por D2/D3), fármaco del que se han hecho análisis y estudios preclínicos demostrando tener una alta eficacia en el tratamiento del trastorno bipolar y la esquizofrenia. Además, un estudio (Gonda y Tarazi, 2021) destaca otro efecto importante, y es la mejora de síntomas parkinsonianos tanto síntomas no motores, como la depresión asociada actuando en el sistema mesolímbico, como motores, como el síndrome de las piernas inquietas. Sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción exacto por el que sucede esto (22).

2. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta que:

- Los receptores dopaminérgicos pueden tener una implicación directa en las diferencias de vulnerabilidad dentro del sistema mesoestriatal.
- La sintomatología motora de los enfermos de Parkinson 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.

Nuestra hipótesis es que existen diferencias de expresión de D2 y D3 entre los diferentes núcleos dopaminérgicos mesencefálicos y que éstas se encuentran reguladas por fenómenos epigenéticos.

3. OBJETIVOS

3.1. Principal:

- Estudiar los patrones de expresión de D2 y D3 en el sistema mesoestriatal.

3.2 Secundarios:

- Hacer una revisión sobre el estado actual de la EP.
- Hacer un abordaje bibliográfico profundo sobre los receptores de dopamina.

4.MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. 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 biotinilado 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% H2O2 en cacodylate buffer 0.05N pH 7.6.

4.2. 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) se disecaron 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 D2 y D3 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 0,5lg/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*). Todos los procedimientos realizados en animales están aprobados por el Comité Ético de la Universidad de La Laguna (CEIBA2022-3199).

Genes	Forward (5´-3´)	Reverse (5´-3´)
D2R	AGCTCAGGAGCTGGAAATGGAG	GCATGCCCATTTCTTTCTGGT
D3R	AGCTCAGGAGCTGGAAATGGAG	GGCATGCCCATTTCTTTCTGGT
GAPDH	TGGTGAAGCAGGCATCTGAG	TGAAGTCGCAGGAGACAACC

Tabla 1: secuencia de los primers usados

4.3. 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 \pm SEM. Un nivel de $*p < 0,05$ se consideró crítico para asignar significación estadística.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Expresión la proteína 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. X). 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 las regiones laterales de la SN compacta (SNcL) más vulnerables que las de las regiones rostromediales (SNcrm) (Damier, P et al, 1999, 23). Es interesante destacar que en la imagen relacionada con este apartado de resultados podemos observar un detalle de las neuronas de la SNrm (Fig. 9A) y de la SNcL (Fig. 9B).

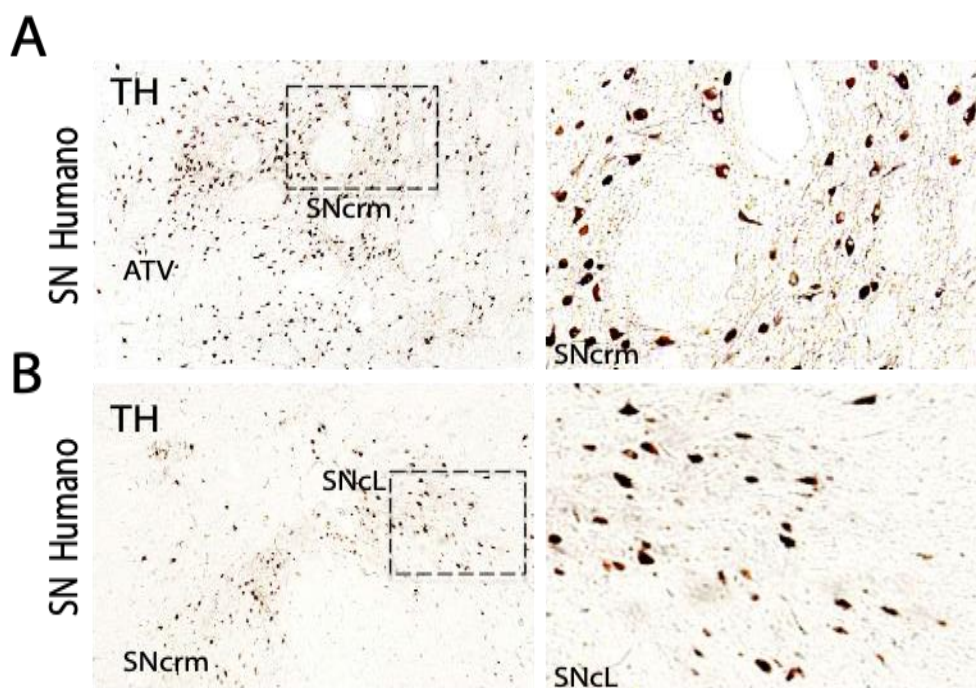


Figura 9: A, B.-Inmunohistoquímica de TH en tejido de mesencéfalo de humano. En la columna derecha se observa: A.-Detalle de SNcrm. B.-Detalle de SNcL. TH, Tirosina Hidroxilasa. SN, Sustancia Negra. ATV, Área Tegmental Ventral. SNcrm, Sustancia Negra Compacta Rostromedial. SNcL, Sustancia Negra Compacta Lateral.

5.2. Expresión diferencial del ARNm de D2 y D3 en el sistema mesoestriatal de ratón

Teniendo en cuenta el patrón de degeneración de las neuronas mesencefálicas en la EP explicado en el apartado 5.1. y en base a la importancia que tienen los receptores de dopamina D2 y

D3 en el correcto funcionamiento del sistema mesoestriatal, decidimos centrar el trabajo en medir las diferencias de expresión de estos receptores en las distintas regiones de dicho sistema (*Figura 10*).

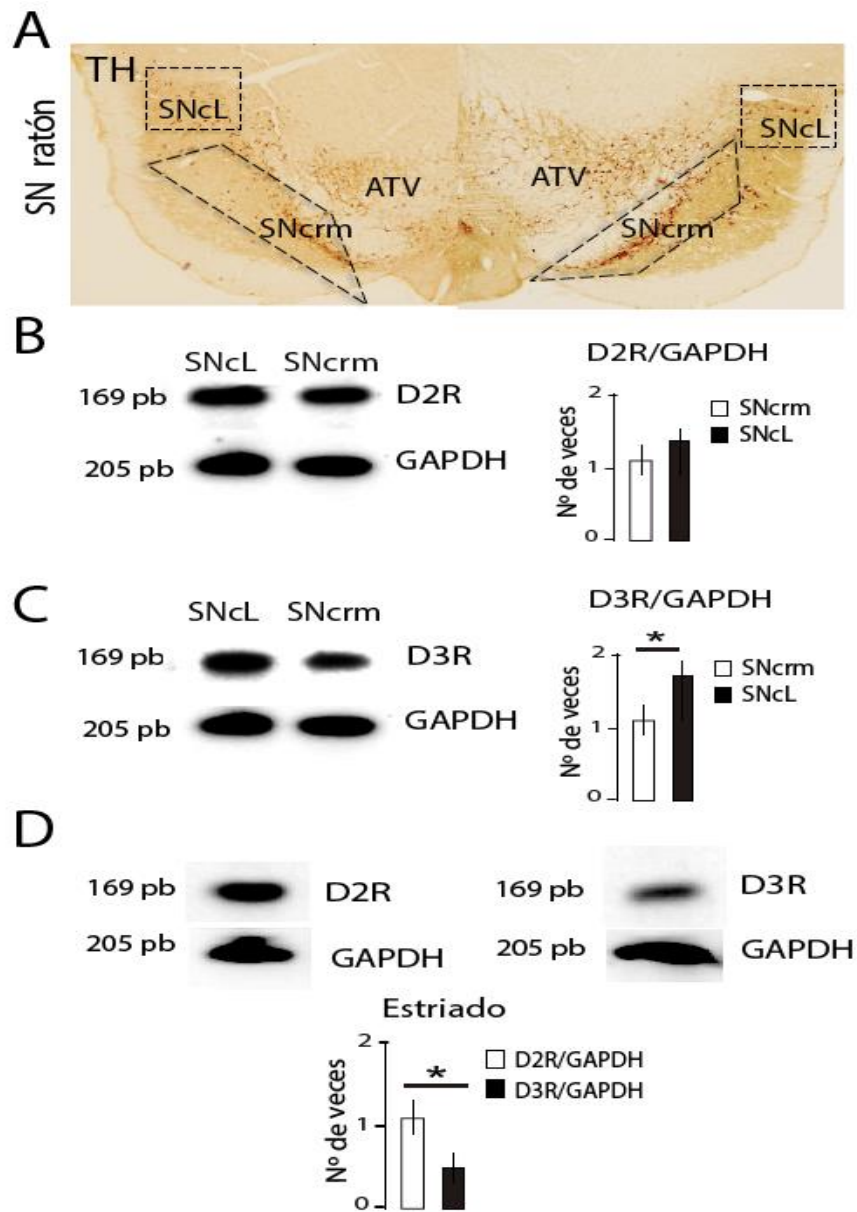


Figura 10: A.-Inmunohistoquímica de TH en tejido de mesencéfalo de ratón. En las cajas se pueden observar la SNcrml y la SNcL. B,C,D.-RT-PCR y cuantificación de la expresión en SN de ratón de D2R (B) y de D3R (C) y de D2R y D3R en estriado de ratón (D). TH, Tirosina Hidroxilasa. SN, Sustancia Negra. ATV, Área Tegmental Ventral. SNcrml, Sustancia Negra Compacta Rostromedial. SNcL, Sustancia Negra Compacta Lateral. D2R, Receptor D2. D3R, Receptor D3.

Para mostrar de una manera más clara cuales 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 SNcrml y la SNcL (*Fig. 10A*). Usando como referencia la imagen comentada se realizaron RT-PCRs de los receptores D2 y D3 en las regiones indicadas, observándose una subida significativa ($p < 0,05$) de la expresión del ARNm del receptor D3 en la SNcL, que es la zona que presenta una mayor vulnerabilidad en la EP (*Fig. 10C*). En el caso de

la expresión del receptor D2 no se encontraron diferencias significativas, pero si hay una tendencia a aumentar nuevamente en la SNcL (*Fig. 10B*). También podemos observar cómo los niveles de expresión de los receptores D2 en el estriado son mayores que los de D3 (*Fig. 10D*).

La finalidad de este trabajo es haberme iniciado en la dinámica de un laboratorio, 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 me 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 los receptores dopaminérgicos D2 y D3, 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 del receptor D3 (también del receptor D2, no siendo significativo en este caso) 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 (24).

La metilación del ADN, uno de los principales marcadores epigenéticos, juega un papel fundamental en diferentes enfermedades neurodegenerativas como la EP (Younesian S et al, 2022, 25). Debido a lo anteriormente descrito, el estudio de los niveles de metilación de los genes encargados de expresar los receptores D2 y D3 podría acercarnos a plantear terapias epigenéticas que puedan contribuir a aumentar la calidad de vida de los pacientes de EP.

6. CONCLUSIONES

- Los receptores dopaminérgicos D2 y D3 tienen una implicación directa en el correcto funcionamiento del sistema mesoestriatal.
- La expresión del receptor D3 se encuentra significativamente aumentada en la SNcL frente a la SNcrm. También encontramos aumentada la expresión del receptor D2, no siendo significativa en este caso.
- La región donde se encuentran sobreexpresado el receptor D3, es decir la SNcL, es la zona de la SN más vulnerable a la degeneración en la EP.
- El abordaje epigenético para explicar las diferencias de expresión del receptor D3 abre una posible respuesta a las variaciones encontradas.

7. LO QUE HE APRENDIDO EN ESTE TFG

Principalmente, considero que ha sido una buena experiencia como trabajo de investigación en lo que se refiere a la práctica en un laboratorio, no solo por familiarizarme con el material que se utiliza, sino también al ver cómo es el día a día y qué es lo que se debe tener a la hora de emprender una investigación, destacando, sobre todo, la paciencia y la curiosidad por descubrir nuevos conocimientos.

Además, he podido aplicar a la práctica el test de la t de Student como método estadístico realizado, tantas veces estudiado en la teoría.

Por último, siempre he sentido inquietud e interés por la rama de la neurología y neurofisiología, por lo que este TFG me ha permitido profundizar más en el sector de las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la dopamina, y más concretamente en la EP, desde el aspecto más funcional y clínico del neurotransmisor, repasando las funciones que desempeña dentro del organismo, hasta su mecanismo micromolecular, realizando un estudio detallado sobre los receptores con los que interacciona y el resto de reacciones explicadas durante el trabajo.

8. AGRADECIMIENTOS:

Quería agradecer en primer lugar a mis tutores, Domingo Afonso Oramas y Pedro Barroso China, por recibirme para la participación en esta investigación y por su guía para que saliera adelante lo mejor posible. También a Laura Santana por su colaboración y sus conocimientos ya que, al ser un campo completamente nuevo para mí el de la investigación y el trabajo en el laboratorio, ha puesto de su parte para que mi adaptación fuera la correcta y lo más cómoda posible.

Finalmente, quiero destacar el apoyo de mi familia, amigos y pareja, gracias a los cuales he podido llegar tan lejos.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Harrison: Principios de Medicina Interna, 20ª Edición. McGraw-Hill Interamericana de España 2019.
2. Guías diagnósticas y terapéuticas de la Sociedad Española de Neurología 2016. 4. Guía oficial de práctica clínica en la enfermedad de Parkinson 2016, Sociedad Española de Neurología.
3. Sanidad insiste en la importancia del diagnóstico precoz de la Enfermedad de Parkinson. Gobiernodecanarias.org. Disponible en: <https://www3.gobiernodecanarias.org/noticias/sanidad-insiste-en-la-importancia-del-diagnostico-precoz-del-parkinson-para-mejorar-la-calidad-de-vida-de-pacientes/>
4. Abeliovich A, Hefti F, Sevigny J. Gene therapy for Parkinson's disease associated with GBA1 mutations. J Parkinsons Dis. 2021; 11(s2): S183–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3233/JPD-212739>
5. Ellis TD, Colón-Semenza C, DeAngelis TR, Thomas CA, Hilaire M-HS, Earhart GM, et al. Evidence for early and regular physical therapy and exercise in Parkinson's disease. Semin Neurol. 2021 41(2):189–205. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0041-1725133>
6. Gibson G. What can the treatment of Parkinson's disease learn from dementia care; applying a bio-psycho-social approach to Parkinson's disease. Int J Older People Nurs. 2017;12(4): e12159. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28685944/>
7. Vías dopaminérgicas en el Sistema Nervioso Central - info-farmacia. Info-farmacia.com. Disponible en: <http://www.info-farmacia.com/bioquimica/vias-dopaminergicas-en-el-sistema-nervioso-central>
8. Rodríguez M, Barroso-Chinea P, Abdala P, Obeso J, González-Hernández T. Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in parkinson's disease. Exp Neurol. 2001;169(1):163–81. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488600976246>
9. Abreu-González P, González-Hernández T, Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Barroso-Chinea P, González MC. Tetrahydrobiopterin stimulates L-DOPA release from striatal tissue. Eur J Pharmacol. 2006;541(1–2):33–7. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299906004237>
10. Latif S, Jahangeer M, Maknoon Razia D, Ashiq M, Ghaffar A, Akram M, et al. Dopamine in Parkinson's disease. Clin Chim Acta. 2021; 522:114–26. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000989812100276X>
11. Eryilmaz IE, Erer S, Zarifoglu M, Egeli U, Karakus E, Yurdacan B, et al. Contribution of functional dopamine D2 and D3 receptor variants to motor and non-motor symptoms of early onset Parkinson's disease. Clin Neurol Neurosurg [Internet]. 2020;199(106257):106257. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303846720306004>
12. Rangel-Barajas C, Coronel I, Florán B. Dopamine receptors and neurodegeneration. Aging Dis. 2015;6(5):349–68. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.14336/AD.2015.0330>

13. Robertson HA. Synergistic interactions of D1- and D2-selective dopamine agonists in animal models for Parkinson's disease: sites of action and implications for the pathogenesis of dyskinesias. *Can J Neurol Sci.* 1992; 19(1 Suppl):147–52. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1349263/>
14. Overk CR, Mufson EJ. Dopamine Transporter: Aging and Parkinson's Disease. En: Kompoliti K, Metman LV, editores. *Encyclopedia of Movement Disorders*. San Diego, CA, Estados Unidos de América: Elsevier; 2010. p. 330–2.
15. Luis-Ravelo D, Fumagallo-Reading F, Castro-Hernandez J, Barroso-Chinea P, Afonso-Oramas D, Febles-Casquero A, et al. Prolonged dopamine D3 receptor stimulation promotes dopamine transporter ubiquitination and degradation through a PKC-dependent mechanism. *Pharmacol Res.* 2021; 165(105434):105434. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661821000177>
16. Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC. Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res.* 1991;564(2):203–19. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000689939191456B>
17. Gurevich EV. Location, location, location: The expression of D3 dopamine receptors in the nervous system. *Curr Top Behav Neurosci.* 2023;60:29–45. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/7854_2022_314
18. Joyce JN, Millan MJ. Dopamine D3 receptor agonists for protection and repair in Parkinson's disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7(1):100–5. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489206002013>
19. Castro-Hernández J, Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Salas-Hernández J, Barroso-Chinea P, Moratalla R, et al. Prolonged treatment with pramipexole promotes physical interaction of striatal dopamine D3 autoreceptors with dopamine transporters to reduce dopamine uptake. *Neurobiol Dis.* 2015; 74:325–35. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996114003787>
20. Barroso-Chinea P, Luis-Ravelo D, Fumagallo-Reading F, Castro-Hernandez J, Salas-Hernandez J, Rodriguez-Nuñez J, et al. DRD3 (dopamine receptor D3) but not DRD2 activates autophagy through MTORC1 inhibition preserving protein synthesis. *Autophagy.* 2020;16(7):1279–95. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2019.1668606>
21. Yang P, Perlmutter JS, Benzinger TLS, Morris JC, Xu J. Dopamine D3 receptor: A neglected participant in Parkinson Disease pathogenesis and treatment? *Ageing Res Rev.* 2020; 57(100994):100994. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31765822/>
22. Gonda X, Tarazi FI. Dopamine D3 receptors: From bench to bedside. *Neuropsychopharmacol Hung.* 2021; 23(2):272–80. Disponible en: <https://mppt.hu/magazin/pdf/vol23issue2/v23i2p272.pdf>
23. Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. *Brain.* 1999; 122(8):1437–48. Disponible en: <https://academic.oup.com/brain/article/122/8/1437/504337>
24. Beyond the genome. *Nature.* 2015;518(7539):273. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/518273a>

25. Younesian S, Yousefi A-M, Momeny M, Ghaffari SH, Bashash D. The DNA methylation in neurological diseases. *Cells*. 2022; 11(21):3439. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/21/3439>