



# PROYECTO DE FIN DE GRADO

AUTOR:

PABLO ROJO REVERT

Alumno de 4º Curso de Grado en Enfermería.

TUTOR:

DOMINGO DAVID AFONSO ORAMAS

Doctor por la Universidad de La Laguna y Profesor Contratado Doctor de la Universidad  
de La Laguna

TITULACIÓN: GRADO EN ENFERMERÍA

Tenerife

CURSO 2015-2016



Facultad de Ciencias de la Salud: Sección Enfermería y Fisioterapia

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA



## **AUTORIZACIÓN DEL TUTOR PARA LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE GRADO**

Grado en Enfermería. Universidad de La Laguna

Título:

**Estudio epigenético del transportador de dopamina y su  
relación con la enfermedad de Parkinson**

Autor/a:

**PABLO ROJO REVERT**

Tutor/a:

**DOMINGO DAVID AFONSO ORAMAS**

Firma Alumno:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Pablo Rojo Revert'.

Firma tutor:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Domingo David Afonso Oramas'.

La Laguna a 3 de Junio de 2016

**Resumen:**

La enfermedad de Parkinson (EP), es una enfermedad neurodegenerativa de origen idiopático que afecta al 2% de la población mayor de 60 años, siendo la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor incidencia por detrás de la enfermedad de Alzheimer. Este trabajo de fin de grado consiste en la realización de un proyecto de investigación, en el que proponemos, el estudio de los diferentes factores epigenéticos que pueden estar relacionados con las diferencias de expresión del transportador de dopamina (DAT) en las distintas regiones del mesencéfalo ventral. Se conoce a partir de estudios anteriores que en la EP existe una degeneración de neuronas dopaminérgicas, la cual es mayor en la sustancia negra lateral (SNI) que en el área tegmental ventral (ATV), coincidiendo con una mayor expresión del DAT en la SNI. Los estudios se realizarían comparando los niveles de modificaciones epigenéticas a partir de métodos específicos como MS-QPCR y MS-SSCA para las metilaciones del ADN o la ChIP en el caso de las histonas, tales estudios serían realizados tanto en muestras animales (controles y lesionados) como en cerebros humanos (controles y pacientes con Parkinson). Dado que nos quedaremos en el diseño, sin llevar a cabo la fase experimental de la investigación, los resultados que esperaríamos obtener tratan de una hipometilación en el ADN del DAT en la SN lateral de las muestras extraídas en animales lesionados y cerebros de pacientes con Parkinson, así como, una menor compactación de la cromatina de la proteína del DAT en la SN lateral en la EP.

**Palabras Clave:** Enfermedad de Parkinson; Epigenética; Sustancia Negra; Transportador activo de dopamina; Vulnerabilidad diferencial.

**Abstract:**

Parkinson's disease (PD), is a neurodegenerative disease of idiopathic origin which affects 2% of the population over 60 years old, being the second neurodegenerative disease with the higher incidence behind Alzheimer's disease. This individual study is presented as a research project, in which we propose the study of different epigenetic factors that might be related with different expressions of the dopamine transporter (DAT) in several regions of the ventral midbrain. Previous studies have revealed the existence of a degeneration in dopaminergic neurones in Parkinson's disease, which is greater in the substantianigralateralis (SNI) than in the ventral tegmental area (VTA), matching with a greater expression of DAT and SNI. The analysis would be performed comparing the levels of epigenetic modifications from scientific methods including/such as MS-QPCR and MS-SSCA for DNA methylations or ChIP in the case of histones. Such analysis would be done in animal samples (controls and cases) as well as human brains (controls and Parkinson's disease). Considering we will stick to the design, without conducting the experimental phase of the research, the results we would hope to obtain are a hipormethylation of DAT-DNA in the SN lateralis of the samples taken from animals and patients with Parkinson, as well as, a minor compaction of DAT protein's chromatin in the SN in Parkinson's disease.

**Keywords:** Parkinson's disease; Epigenetic; SustantiaNigra; Dopamine active transporter; Differential vulnerability.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN AL TRABAJO FIN DE GRADO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Enfermedad de Parkinson .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Epigenética .....</b>	<b>3</b>
1.2.1. <i>Metilación del ADN.....</i>	<i>3</i>
1.2.2. <i>Modificaciones de las histonas.....</i>	<i>4</i>
1.2.2.1. Acetilación de histonas .....	4
1.2.2.2. Metilación de histonas .....	4
1.2.3. <i>microARNs .....</i>	<i>5</i>
<b>1.3. Dopamina y Transportador de Dopamina.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Vulnerabilidad diferencial .....</b>	<b>7</b>
<b>2. SIMULACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL .....</b>	<b>8</b>
2.1.1. <b>Metilación de ADN en enfermedad de Parkinson.....</b>	<b>9</b>
2.1.2. <b>Remodelación de la cromatina en enfermedad de Parkinson .....</b>	<b>9</b>
2.1.3. <b>ARNs no-codificantes .....</b>	<b>10</b>
2.1.4. <b>Estrategias de tratamiento basadas en la epigenética en</b>	
<b>la enfermedad de Parkinson .....</b>	<b>11</b>
2.1.4.1. <i>Relacionadas con la metilación del ADN.....</i>	<i>11</i>
2.1.4.2. <i>Relacionadas con la remodelación de la cromatina .....</i>	<i>12</i>
<b>2.2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.3.1. <b>Principales .....</b>	<b>13</b>
2.3.2. <b>Específicos .....</b>	<b>13</b>
<b>2.4. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>15</b>
2.4.1. <b>Equipamiento disponible.....</b>	<b>15</b>
2.4.2. <b>Modelos.....</b>	<b>15</b>
2.4.2.1. <i>Humanos .....</i>	<i>15</i>
2.4.2.2. <i>Animales.....</i>	<i>16</i>
2.4.3. <b>Obtención de muestras .....</b>	<b>16</b>
2.4.3.1. <i>Humanos .....</i>	<i>16</i>
2.4.3.2. <i>Animales.....</i>	<i>16</i>

<b>2.4.4. Técnicas empleadas</b> .....	<b>17</b>
2.4.4.1. <i>Metilación del ADN</i> .....	17
2.4.4.1.1. MethylSpecific PCR (MSP).....	17
2.4.4.1.2. Methylationsensitive; PCR cuantitativa (MS-QPCR) .....	18
2.4.4.1.3. Methylationsensitive; Análisis conformacional de una hebra específica (MS-SSCA) .....	18
2.4.4.2. <i>Modificación de histonas</i> .....	19
2.4.4.2.1. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) .....	19
<b>2.4.5. Fase experimental</b> .....	<b>20</b>
2.4.5.1. <i>Experimentos 1</i> .....	20
2.4.5.2. <i>Experimentos 2</i> .....	21
<b>2.4.6. Estudio estadístico</b> .....	<b>21</b>
<b>2.5. IMPACTO ESPERADO DE LOS RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>23</b>
<b>2.7. ANEXOS</b> .....	<b>31</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo invalidante que se caracteriza clínicamente por temblor de reposo, rigidez y bradicinesia. Desde el punto de vista anatomopatológico y neuroquímico está caracterizado por la degeneración neuronal que tiene lugar en diferentes núcleos nerviosos, entre los que se encuentran las células dopaminérgicas mesoestriales, con el consiguiente descenso de los niveles de dopamina (DA) en el estriado<sup>1</sup> y por la presencia de inclusiones intraneuronales, llamadas cuerpos de Lewy, en diferentes centros cerebrales<sup>2</sup>. Aparte de las células dopaminérgicas mesoestriales nombradas anteriormente, entre los núcleos que degeneran también encontramos el locus coeruleus, el núcleo dorsal del vago, el hipotálamo, el núcleo basal de Meynert, el bulbo olfatorio y los sistemas entéricos y periféricos, aunque no todos muestran la misma susceptibilidad a la degeneración y al impacto clínico<sup>3</sup>. Existen formas juveniles y familiares de la enfermedad en las que se ha identificado una base genética, pero la etiología de su forma esporádica, presentada a partir de la sexta década de la vida y que constituye más del 90% de los casos, continúa siendo una incógnita<sup>4</sup>. Se trata de la segunda enfermedad neurodegenerativa más común tras la enfermedad de Alzheimer, con un 0,3% de prevalencia (1% si se habla de población mayor de 60 años) y una incidencia de entre 8-18 afectados por 1000 habitantes y año. Por lo tanto es la segunda causa de incapacidad y mortalidad de la población mundial mayor de 65 años por enfermedad neurodegenerativa. La edad y las diferencias interculturales, asociadas a factores ambientales, destacan entre los factores influyentes en la prevalencia. Existen evidencias de una mayor proporción de personas afectadas por esta patología en países industrializados o vías de desarrollo, así como, una mayor prevalencia e incidencia en hombres, posiblemente relacionada con el papel neuroreceptor de los estrógenos. Numerosos estudios realizados en las últimas décadas coinciden en que el estrés oxidativo juega un papel fundamental en la patogenia de la EP<sup>5</sup>, pero lo cierto es que en la actualidad no sabemos por qué degeneran las neuronas DAérgicas. También existen estudios que apoyan la idea de que factores como la disfunción mitocondrial, la incapacidad de la célula para degradar proteínas, la inflamación, la excitotoxicidad y los aspectos metabólicos y funcionales de las células DAérgicas, participan en el proceso degenerativo. Por último se ha sugerido la implicación de diferentes factores genéticos y epigenéticos sobre los que se centrará este proyecto.

Aparte de la EP genuina, existen otros trastornos neurológicos que cursan con manifestaciones motoras similares a la EP (temblor de reposo, rigidez o bradicinesia). Entre ellas están las que denominamos síndromes “Parkinson plus” que incluyen la parálisis supranuclear progresiva, la atrofia multisistémica, la demencia con cuerpos de Lewy, etc.; los “parkinsonismos heredodegenerativos” en los que se incluye la distonía-parkinsonismo juvenil hereditario (mutación Parkin autosómica recesiva), la distonía con respuesta a la Levodopa, la enfermedad de Huntington, etc., y los “parkinsonismos secundarios a fármacos”.

En la actualidad, las pautas terapéuticas en la EP están dirigidas a mantener los niveles de DA en el estriado y a controlar las manifestaciones debidas a alteraciones secundarias en otros centros de los ganglios basales (GB), con lo que se consigue una mejoría sintomática, pero no revertir ni detener la progresión de la enfermedad. Se investiga en terapias que consigan detener el curso de la enfermedad basadas en la administración de factores tróficos, terapia génica y transplantes celulares. Aunque algunos resultados son esperanzadores, aún presentan defectos importantes, por lo tanto en este proyecto nosotros vamos a sugerir un acercamiento a posibles dianas epigenéticas que puedan ayudar a la mejora de los pacientes de esta enfermedad.

## 1.2 Epigenética

En 1942, Conrad Waddington, acuñó el término epigenética para ofrecer una solución conceptual a un fenómeno que surge como una consideración fundamental de la biología del desarrollo. Explicó, que pese a que todas las células del organismo tienen la misma secuencia de nucleótidos de ADN y por lo tanto el mismo genotipo, estas no desarrollan las mismas funciones. Esto muestra la influencia de modificaciones externas a la secuencia del ADN, las cuales modifican el genotipo a un fenotipo particular.

Actualmente se define como, “estudio de los cambios heredables en la función de los genes, que no conllevan una alteración en la secuencia del ADN”<sup>6</sup>.

En el sistema nervioso central, muchas funciones neurobiológicas y cognitivas, desde el desarrollo del cerebro y neurogénesis hasta el aprendizaje y la plasticidad sináptica, están reguladas por procesos epigenéticos. Las principales modificaciones epigenéticas incluyen metilación del ADN, modificaciones post-transcripcionales de histonas y cambios en ARN no codificantes de expresión génica.<sup>7</sup>

Se cree firmemente que existen señales a nivel epigenético capaces de regular el destino de las células madre. Aunque todas las células de nuestro cuerpo contienen la misma composición genética, dichos genes no están activos en todo momento, sino que se expresan en los momentos en los que sea necesario. Esta expresión génica regulada en nuestro cuerpo se rige por la epigenética<sup>8</sup>.

Los principales mecanismos epigenéticos son los siguientes:

### 1.2.1. Metilación del ADN

Se trata de la adición de un grupo metilo al quinto carbono del residuo de citosina dando lugar al 5-metilcitosina. Dicha adhesión está mediada por las enzimas DNA metiltransferasas (DNMTs)<sup>7</sup>.

La metilación de islas CpG (citosina-guanina enlazados por un fosfato, principales promotores de la transcripción génica) puede inducir modificaciones conformacionales de cromatina e inhibir el acceso de maquinaria transcripcional a las regiones promotoras de genes. Es decir, alterando los niveles de la expresión génica<sup>9</sup>.

De esto se extrae que, una hipermetilación está comúnmente relacionada con el silenciamiento de genes debido a que al añadir un grupo metilo se produce un cambio en la estructura del ADN impidiendo que los factores transcripcionales lo reconozcan causando la represión de la transcripción<sup>1</sup>. Por el contrario, una hipometilación está ligada a una mayor expresión de los genes<sup>9</sup>.

### *1.2.2. Modificaciones de las histonas*

En ellas se incluyen la metilación, acetilación, ubiquinación, sumoilación y otras modificaciones post-transcripcionales de las histonas.

Se trata de la modificación de aminoácidos produciendo residuos tales como la lisina, arginina y serina entre otros. Dichos residuos están relacionados con el silenciamiento y la activación de genes transcripcionales dependiendo del sitio donde se produzca la modificación, sugiriendo un código de histonas.

Esta hipótesis propone que modificaciones específicas inducen a la interacción con las proteínas asociadas a la cromatina, lo cual produce una diferencia en la regulación y respuesta de la expresión génica<sup>6</sup>.

#### *1.2.2.1 Acetilación de histonas*

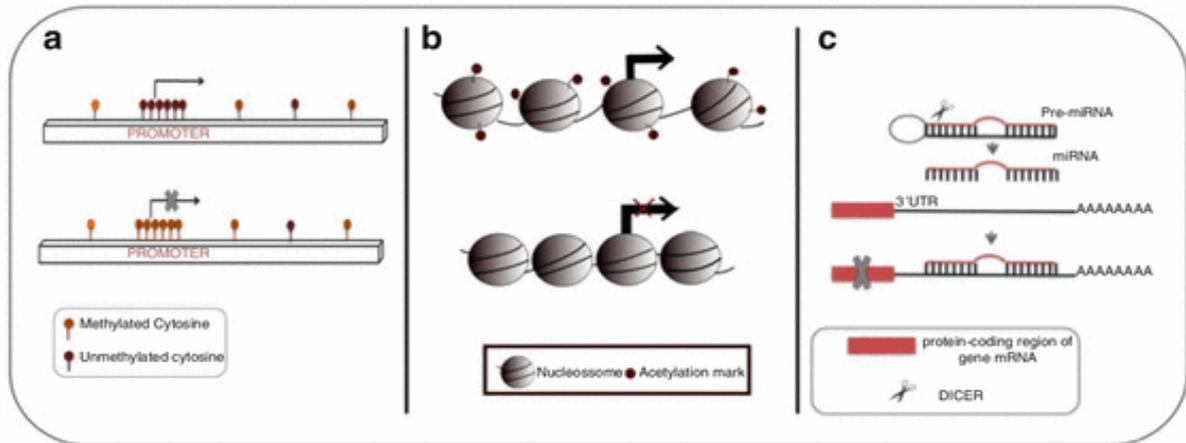
Es una modificación asociada con la actividad transcripcional, influyendo sobre el acceso de la maquinaria transcripcional a los genes y mecanismos activos. Se trata de la adición de un grupo acetilo (  $-O-CH_3$  ) a un residuo amino terminal<sup>6</sup>.

#### *1.2.2.2 Metilación de histonas*

Está ligada a la represión o activación de la transcripción dependiendo del residuo de aminoácido modificado. Especialmente en lisina y arginina, los cuales pueden verse metilados en múltiples ocasiones, dando señales diferentes dependiendo de cuántas veces haya sido metilado el residuo<sup>6</sup>.

### 1.2.3. *microARNs*

Los miRNAs representan un grupo de 21-24 nucleótidos de RNAs no codificados que se unen a la región 3' no traducida (3' UTR) del ARN diana mediante la regulación post-transcripcional. Esto conduce ya sea a la degradación o inhibición de la traducción, dependiendo del grado de secuencia complementaria<sup>7,9</sup>.



**Fig. 1.1.1. Expresión de genes regulada por la epigenética.** (a) Metilación del ADN. La adición de grupos metilos en dinucleótido, que cuando se agrupan en islas CpG alrededor de los promotores, reprimen la transcripción. (b) Acetilación de histonas. Un tipo de modificación de histona que promueve la apertura de la cromatina alrededor de genes, impidiendo el acceso de la maquinaria transcripcional. (c) miARNes extraído de un precursor de una horquilla de RNA para formar un miRNA maduro, el cual se adiere a la región 3' sin traducir (3' UTR) de un ARN mensajeros del gen diana y apague su actividad. (Imagen extraída de *Epigenetic in Alzheimer and Parkinson diseases*. Chapter 22.S. Marquez and T.F. Outerio)

### 1.3 Dopamina y Transportador de Dopamina

La DA es un neurotransmisor perteneciente a la familia de las catecolaminas, encargada de mediar funciones cerebrales esenciales incluyendo la cognición, memoria, comportamiento, coordinación motora y modulación neuroendocrina<sup>10</sup>. Se encuentran principalmente en el mesencéfalo y proyectan desde la sustancia nigra (SN) y área tegmental ventral (VTA) hacia el estriado (caudado y putamen) formando las vías nigroestriatal y mesolímbica<sup>11</sup>.

La desregulación en la transmisión de la DA está asociada con una serie de enfermedades y desórdenes neurológicos y ello es debido a su importancia<sup>10</sup>. La DA es almacenada en vesículas dentro de la neurona, las cuales la protegen de la oxidación por parte de la monoamino oxidasa. Una vez recibida la señal adecuada de la neurona presináptica, la dopamina se libera en la hendidura sináptica, donde interactúa con los receptores de dopamina en la neurona estriatal postsináptica. Para regular sus niveles y permitir una respuesta a la siguiente señal, la DA extracelular es bombeada de vuelta a la neurona presináptica por el transportador de dopamina (DAT) en la superficie celular, donde puede ser almacenada en vesículas o catabolizada en productos de degradación<sup>11</sup>.

La neurotransmisión DAérgica está estrechamente relacionada con el DAT, un transportador de membrana Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> dependiente<sup>12</sup>, responsable de la recaptación de DA del espacio extracelular hacia el citosol de la neurona presináptica. Se trata de una glicoproteína con una masa molecular de ~80 KDa, 12 dominios transmembrana conectados por lazos extra- e intracelulares alternativamente y con sus extremos N- y C-terminales localizados en el citosol<sup>13</sup>. Presenta tres sitios de glicosilación en el segundo lazo extracelular. El tratamiento de la proteína con glicanasa y neuroaminidasa reduce su peso molecular a 50 KDa, su expresión en la membrana plasmática y su capacidad de captación de DA<sup>14</sup>. La actividad DAT depende de sus niveles de expresión en la membrana plasmática y de su estado de fosforilación y glicosilación. Por lo tanto ha sido también identificada como una fosfoproteína con múltiples sitios de fosforilación en sus dominios transmembrana. La fosforilación del transportador por protein-quinasa C (PKC) provoca su internalización y reducción de su actividad<sup>15</sup>. Estudios in vitro indican que el receptor D<sub>2</sub> modula el DAT por interacción física directa<sup>16</sup> y por mecanismos proteína-G dependientes<sup>17</sup>, aumentando en ambos casos la expresión de DAT en la membrana y el uptake/recaptación de DA<sup>18</sup>. El DAT también interacciona físicamente con diferentes proteínas presinápticas (PicK1, Hic5, Rack1, α-sinucleína, etc.)<sup>19</sup> siendo la α-sinucleína (SNCA) la más conocida por su relevancia en la EP.

#### 1.4 Vulnerabilidad diferencial

Un hecho interesante en la EP es que no todas las neuronas DAérgicas mesencefálicas muestran la misma susceptibilidad a la degeneración. Las neuronas localizadas en la SN (grupo DAérgico A9) son más vulnerables que aquellas que se encuentran en el VTA (grupo DAérgico A10)<sup>20</sup>. Dentro de la SN, las neuronas que pertenecen a las regiones ventrolateral y caudal (SNcv) son más vulnerables que las presentes en las regiones rostromedial y dorsal (SNrm)<sup>21</sup>.

El hallazgo de unos niveles más altos de ARN mensajero (ARNm) de DAT en las neuronas DAérgicas de la SN que en las de VTA ha sugerido una relación entre los niveles de ARNm de DAT y la vulnerabilidad<sup>22</sup>. Más recientemente, se ha encontrado que las neuronas mesencefálicas DAérgicas con niveles similares de ARNm de DAT, muestran diferencias en la expresión de la proteína de DAT, existiendo células que contienen niveles altos de ARNm de DAT y niveles bajos de proteína. Dichos resultados también revelan que el patrón topográfico de la degeneración coincide con la expresión de la proteína de DAT más que con la expresión del ARNm, sugiriendo que las diferencias en su regulación post-transcripcional pueden estar relacionadas en la vulnerabilidad diferencial de las células DAérgicas mesencefálicas<sup>23</sup>. Se sabe que la glicosilación en general, y la N-glicosilación en particular, juegan un papel determinante en el plegamiento, tráfico y expresión en superficie de proteínas de membrana<sup>24</sup>. Estudios in vitro muestran que la actividad de DAT depende de su estado de glicosilación, con la forma glicosilada de DAT transportando DA más eficientemente que la forma no glicosilada<sup>25</sup>. Relacionado con lo anterior, se ha visto que la expresión de DAT glicosilado y su actividad, es mayor en las terminales de la vía nigroestriatal que en la vía mesolímbica, sugiriendo que la glicosilación de DAT está relacionada con la vulnerabilidad diferencial de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en la EP<sup>26</sup>.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la realización de este TFG ha consistido en la simulación de un proyecto de investigación basado en el estudio de los factores epigenéticos que puedan estar relacionados con la expresión del DAT. Considero que los resultados que se puedan obtener en este sentido podrían ayudar a comprender mejor la patogenia de la EP y podría abrir un camino a nuevas terapias en dicha enfermedad.

## **2. SIMULACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

### **2.1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA**

La EP es una enfermedad neurodegenerativa invalidante, de origen desconocido, que se sitúa en el segundo lugar de incidencia de enfermedades neurodegenerativas después del Alzheimer, afectando al 2% de la población mayor de 60 años. Esta enfermedad afecta a diferentes centros nerviosos, pero es la degeneración del sistema motor extrapiramidal el que da las manifestaciones clínicas, debido a una pérdida de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

En la EP existen una serie de genes considerados de riesgo como son: la SNCA con un papel cardinal en la patogenia de la EP, MATP, PARK16, kinasa 2 de repetición rica en leucina (LRRK2) y, como nosotros creemos, el DAT. Además, se ha visto que el desarrollo de EP esporádica puede estar ligado a la exposición de toxinas entre las que se encuentra 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), el herbicida Paraquat o el pesticida Rotenona<sup>27</sup>.

Una relación de la EP con la epigenética ha sido menos estudiada que en otras enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo el Alzheimer. Por lo tanto, merece la pena profundizar más y realizar un esfuerzo en entender la importancia que puedan tener los procesos epigenéticos en esta enfermedad.

El abordaje epigenético para el tratamiento de diferentes enfermedades como el cáncer, las cardiopatías o aquellas de tipo neuronal, está siendo considerado como una alternativa a otros tipos de tratamiento, ya que los efectos secundarios son mucho más leves que en aquellos basados en el uso de sustancias químicas más agresivas.

Los mecanismos epigenéticos más estudiados son la metilación del ADN, la regulación de la estructura de la cromatina vía modificaciones de las histonas y los ARN no codificantes (ej. microARN, siARN...). Entender dichos mecanismos en patologías relacionadas con el sistema nervioso central ayudaría a descubrir, por ejemplo, nuevos biomarcadores para el diagnóstico precoz de la enfermedad y a crear terapias más eficaces que palien o curen dichas enfermedades tan devastadoras para la sociedad actual.

Teniendo en cuenta como base, la revisión realizada por Lardenoije et al. en 2015<sup>27</sup>, los antecedentes de los estudios sobre la relación entre epigenética y EP los resumimos a continuación:

### **2.1.1. Metilación de ADN en la enfermedad de Parkinson**

Se han estudiado diferentes patrones de metilación de ADN relacionados con la EP:

- Se ha observado un mejor rendimiento cognitivo de pacientes con EP, en aquellos con un mayor potencial (representado por el ratio S-adenosinmetionina(SAM)/S-adenosinhomocisteína(SAH)) de metilación del ADN<sup>28</sup>.
- Se ha identificado una correlación negativa entre la metilación del intrón 1 de SNCA y la expresión de SNCA, y que, dicha metilación SNCA disminuye en la SN, putamen y corteza de pacientes con EP<sup>29</sup>.
- En otros genes como el PARK16, la glicoproteína transmembrana NMB (GPNMB) y syntaxin 1B (STX1B) se ha encontrado un patrón de metilación diferente en la EP<sup>30</sup>.

El modo en el que la metilación del ADN influye en la expresión génica y en última instancia en la patología de EP, permanece aún desconocido.

### **2.1.2. Remodelación de la cromatina en enfermedad de Parkinson**

Actualmente se cree que existe un desequilibrio patológico en la EP entre la acetilación y desacetilación de las histonas, encontrando por un lado que la acetilación de histonas debilita la unión de la histona al ADN, facilitando la accesibilidad de los factores de transcripción y formación de complejos con la RNA polimerasa II, y por otro, que una desacetilación produce la compactación de la cromatina incrementando el silenciamiento génico. El grado de acetilación de histonas es un proceso dinámico influenciado por las actividades enzimáticas antagonistas de la histona acetiltransferasa (HAT) y de las histonas desacetilasas(HDACs)<sup>31</sup>. Este mecanismo de adición/eliminación de grupos acetilo a las histonas de residuos de lisina es uno de los muchos procesos reguladores epigenéticos que controlan la expresión de genes, muchos de los cuales serán esenciales para la supervivencia neuronal<sup>32</sup>.

Los siguientes estudios relacionados con la remodelación de la cromatina son los más relevantes. En ellos se puede ver como se han centrado casi en su totalidad en la  $\alpha$ -sinucleína, por lo que el campo relacionado con el DAT permanece todavía inexplorado.

- Se ha observado que la toxicidad nuclear de la SNCA en EP puede ser resultado de la unión directa de SNCA a las histonas, reduciendo los niveles de acetilación de histona H3 y acetilación general en células cultivadas a través de la interacción con SIRT2<sup>33</sup>.
- A través de cultivos de células y moscas transgénicas, se ha demostrado que la toxicidad ya mencionada podría ser compensada a través de inhibidores de la HDACs (HDACIs)<sup>34,35</sup>.
- Se ha encontrado un dominio en la proteína EP300 como sitio potencial de interacción para proteínas mal plegadas, como por ejemplo la SNCA encontrada en los cuerpos de Lewy, que mejore su agregación<sup>36</sup>.
- Además, la interacción de la SNCA con EP300 puede tener una función neuroprotectora reduciendo la proapoptosis celular regulada por la proteinquinasa Cδ (PKCδ)<sup>37</sup>.
- Las modificaciones de las histonas, son la modalidad epigenética más afectada por las toxinas ambientales tales como pesticidas, herbicidas y agentes industriales<sup>38</sup> entre ellos:
  - Se ha mostrado que el MPTP, disminuye los niveles de H3K4m3 en el cuerpo estriado de ratones y primates no humanos<sup>39</sup>.
  - El herbicida paraquat y el insecticida dieldrin, están asociados con el desarrollo de EP. Esto se debe a un aumento de la acetilación de H3 y a la obstaculización de la actividad HDAC general producida por la exposición a paraquat y por un aumento de la acetilación de H3 y H4 en las células dopaminérgicas N27 debido a una exposición al dieldrin<sup>40</sup>.

### 2.1.3. ARNs no-codificantes

En este caso los estudios relacionados con los ARNs no codificantes también han tenido como foco central el estudio de la  $\alpha$ -sinucleína, pudiendo permitir en el futuro abrir un nuevo campo de investigación en torno al DAT como ya se ha mencionado en otros apartados.

De esta manera algunos micro ARNs han sido estudiados debido a su relación con la EP, como el miR-7, que regula negativamente la expresión de SNCA<sup>41</sup> o el miR-153, que reprime la expresión de SNCA tanto a nivel de ARNm como de proteína<sup>42</sup>.

Debido a que en este proyecto no estudiaremos las modificaciones relacionadas con los RNAs no-codificantes no profundizaremos más en este tema.

#### **2.1.4. Estrategias de tratamiento basadas en la epigenética en la EP**

Debido a que la mayoría de estrategias para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas sólo proporcionan una mejora de la sintomatología, se hace hincapié en la necesidad de desarrollar una terapia innovadora y realista capaz de modular eficazmente el proceso de la enfermedad. Dado que el factor principal de la enfermedad del Parkinson es su naturaleza neurodegenerativa, nos centramos en tratamientos que representen un efecto neuroprotector que pudiera ser potencialmente beneficioso. Entre los tratamientos, inhibidores de la DNMT y HDAC representan opciones interesantes para actuar sobre el mecanismo epigenético y actualmente se encuentran aprobados y disponibles para la investigación clínica.

##### *2.1.4.1. Relacionadas con la metilación del ADN*

Una estrategia eficaz para la reducción selectiva de genes que puedan estar relacionados con la patogenia de EP podría implicar el aumento de la metilación de las bases de citosina en la región promotora del ADN mediante un aumento de los niveles endógenos de SAM. Un aumento de la metilación del ADN interfiere con la unión de factores de transcripción y unos niveles altos de SAM, como mencionamos, podrían llevar a la unión de proteínas que reconocen las bases de C metiladas en las islas CpG y reclutar enzimas con actividad HDAC, lo que lleva a la compactación de cromatina como mecanismo alternativo de la represión de genes<sup>31,43</sup>. Una vía para aumentar los niveles de SAM es a través de la administración de metionina, colina, folatos o vitamina B12<sup>44</sup>.

Esto explica el interés en los factores inhibidores DNMT o agentes desmetilantes, entre ellos los más estudiados son los análogos de citidina 5-azacitidina (AZA) y decitabina (DAC), que se incorporan al ADN después de la activación por un resto trifosfato. Después de la formación de un complejo irreversible con DNMT1, se produce la degradación enzimática, lo que impide la metilación de las islas de CpG del ADN durante su replicación.

Otros inhibidores de DNMTs en temprana fase de desarrollo incluyen análogos de DAC, como SGI-110 y zebularina. Cuando se administran directamente en el tejido cerebral de ratones y ratas, estos y otros inhib. de DNMTs interrumpen la plasticidad sináptica del hipocampo, el aprendizaje o la memoria, y son potentes moduladores de comportamientos de recompensa y adicción<sup>31</sup>.

#### 2.1.4.2. *Relacionadas con remodelación de la cromatina*

La acetilación de histonas también ha sido estudiada por sus efectos neuroprotectores en distintos modelos de parkinsonismo. Los inhibidores de HDAC están divididos en cuatro familias: ácidos grasos de cadena corta (butirato de sodio, fenilbutirato y ácido valproico (VPA)), ácidos hidroxámicos (tricostatina A y ácido hidroxámicosuberoilánilida (SAHA)), los epoxyketones (trapoxina) y las benzamidas. En un importante estudio se demostró que la alpha-sinucleína en el núcleo podría ser rescatada por la administración de inhibidores HDAC, así como, se encontró una metilación del intrón 1 del ADN de SNCA y una desmetilación de islas CpC en el gen SNCA en el cerebro de pacientes con EP. Factores como el SAHA o butirato de sodio, mejoran la neurotoxicidad inducida por la SNCA. Otros inhibidores como el VPA, se han mostrado protectores contra MPTP y la toxicidad de la alpha-sinucleína en la EP. La acetilación de histonas y la metilación de ADN parecen influir en la regulación de la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), los cuales se sabe que juegan un papel crítico en el crecimiento, supervivencia y plasticidad sináptica de las neuronas. Otros inhibidores de HDAC como la urocortina y VPA inhiben la actividad de la glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (GSK3), que se correlaciona negativamente con la viabilidad neuronal<sup>31,43</sup>..

## **2.2. HIPOTESIS**

En la Enfermedad de Parkinson conocemos que en la sustancia nigra lateral se produce una mayor degeneración de las neuronas dopaminérgicas que en el área tegmental ventral, lo que a su vez coincide con una mayor expresión del DAT.

Nuestra hipótesis es que factores epigenéticos como la metilación del ADN o la modificación de histonas regulan dicha sobre-expresión de DAT en la sustancia nigra lateral y que esto servirá para comprender mejor la patogenia de la enfermedad de Parkinson.

## **2.3. OBJETIVOS**

### **2.3.1. O. Principal**

Estudiar las modificaciones epigenéticas sobre el transportador de dopamina en las distintas áreas de la sustancia negra en la Enfermedad de Parkinson.

### **2.3.2. O.Específicos**

*2.3.2.1. Estudiar las diferencias de niveles de modificaciones epigenéticas sobre el DAT en las distintas áreas de la sustancia negra en muestras control*

2.3.2.1.1. Estudiar diferencias de niveles de metilación del DAT muestras control

2.3.2.1.1.1. Estudiar niveles de metilación en animales

2.3.2.1.1.2. Estudiar niveles de metilación en humanos

2.3.2.1.2. Estudiar diferencias de niveles modificación de histonas del DAT en muestras control

2.3.2.1.2.1. Estudiar niveles modificación de histonas en animales

2.3.2.1.2.2. Estudiar niveles modificación de histonas en humanos

2.3.2.2. *Estudiar las diferencias de niveles de modificaciones epigenéticas sobre el DAT en la SN lateral de muestras lesionadas modelo de Parkinsonismo frente muestras control*

2.3.2.2.1. Estudiar niveles de metilación del DAT en SN de muestras modelo de parkinsonismo frente resultados control

2.3.2.2.1.1. Estudiar niveles de metilación del DAT en animales lesionados frente muestras control

2.3.2.2.1.2. Estudiar niveles de metilación del DAT en humanos enfermos de Parkinson frente muestras control

2.3.2.2.2. Estudiar niveles modificación de histonas en SN de muestras modelo de parkinsonismo frente resultados control

2.3.2.2.2.1. Estudiar niveles modificación de histonas en animales lesionados frente muestras control

2.3.2.2.2.2. Estudiar niveles modificación de histonas en humanos enfermos de Parkinson frente muestras control

## **2.4. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO**

### **2.4.1. Equipamiento disponible**

En los laboratorios del Campus de Ciencias de la Salud y de Ciencias Experimentales de la ULL contamos con las instalaciones e infraestructura necesarias para el desarrollo de este proyecto: Estabulario, quirófanos para animales, servicios de apoyo a la investigación (genómica, suministro de nitrógeno líquido, etc.), laboratorios de biología molecular equipados, termocicladores, documentadores, etc.

Nuestras necesidades se centran fundamentalmente en la ejecución (adquisición de pequeño equipamiento y material fungible, adquisición y mantenimiento de animales experimentales, mantenimiento de aparatos, pago del uso de servicios de apoyo)

### **2.4.2. Modelos**

Los experimentos se llevarán a cabo en pacientes parkinsonianos, en modelos de enfermedad de Parkinson (ratones y ratas) y en sus respectivos controles (humanos no parkinsonianos, ratones y ratas inyectados con vehículo). Los cerebros humanos se obtendrán del Departamento de Patología del Hospital Universitario de La Laguna y del Banco de Cerebros de Navarra (Hospital de Navarra, Servicio Navarro de Salud, CIMA y CIBERNED). Actualmente tenemos el consentimiento escrito para las autopsias y el estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de La Laguna. Los experimentos que se realizarán en ratones y ratas han sido aprobados por el Comité Ético de la Universidad de La Laguna siguiendo la normativa de la directiva del Consejo de la Comunidad Europea del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC).

#### **2.4.2.1. *Humanos***

Los cerebros humanos se obtendrán de personas que hayan fallecido sin antecedentes de abuso de drogas ni de enfermedades neurológicas o psiquiátricas, y de pacientes que fallecieran tras padecer EP idiopática. Los diagnósticos serán confirmados mediante estudios anatomopatológicos.

#### 2.4.2.2. *Animales*

Usaremos modelos animales de enfermedad de Parkinson en ratas Sprague-Dawley y en ratones C57BL/6J. Las ratas serán inyectadas en el tercer ventrículo con vehículo o con una dosis (150 µg) subletal de 6-hidroxydopamine hydrochloride (6-OHDA). Los ratones serán tratados con cuatro inyecciones intraperitoneales de salino o de MPTP a una dosis de 20 mg/Kg en intervalos de 2 horas.

#### 2.4.3. **Obtención de muestras**

##### 2.4.3.1. *Humanos*

Los cerebros se extraerán tras un periodo post-mortem no superior a 20 horas. Los bloques contendrán la formación dopaminérgica mesencefálica completa. Posteriormente se congelarán a -80 °C, para que en el momento de realizar las extracciones el tejido esté en las condiciones óptimas, obteniéndose las regiones que contengan la SN y VTA.

##### 2.4.3.2. *Animales*

Para la obtención de muestras las ratas serán anestesiadas con una sobredosis de hidrato de cloral y decapitadas. Los cerebros serán extraídos inmediatamente y se procederá a la disección de la formación DAérgica mesencefálica (mesencéfalo ventral). Primero con la ayuda de una matriz para disección de cerebros de rata adulta (Stoelting) y posteriormente sobre una placa de hielo con la ayuda de un microscopio quirúrgico (Leica MZ 9.5, Weztlar, Alemania). En el mesencéfalo ventral se obtendrá la región que contiene la SN y VTA.

Tanto para humanos como para animales el ARN y las proteínas totales se obtendrán mediante extracción fenólica o utilizando los Kits correspondientes.

## 2.4.4. Técnicas empleadas

Dentro de las modificaciones epigenéticas que conocemos, nos centraremos en el estudio de las metilaciones del ADN y las modificaciones de las histonas. Para ello, realizaremos una serie de técnicas específicas a cada modificación para un análisis tanto cualitativo como cuantitativo.

### 2.4.4.1. Metilación del ADN

Existen múltiples técnicas aplicables para el análisis de la hipermetilación de promotores o hipometilación general de ADN, basadas generalmente en diferentes métodos de electroforesis capilar de alta resolución o mediante el uso de estrategias enzimáticas y químicas.

#### 2.4.4.1.1. PCR específico a metilaciones (MSP)

Permite evaluar rápidamente el estado de metilación virtual de cualquier grupo de sitios CpG dentro de una isla CpG, sin necesidad del uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación. Es necesario modificar inicialmente el ADN con bisulfito de sodio, a partir de la cual, mediante la desaminación de las citosinas no metiladas se transforman en uracilo lo que deja las citosinas metiladas protegidas por el enlace 5-metilcitosina. El ADN alterado resultante es amplificado y secuenciado mediante RT-PCR con el uso de primers específicos para el ADN metilado y ADN no metilado, dándonos una información detallada del estado de metilación de todos los sitios CpG<sup>45</sup>.

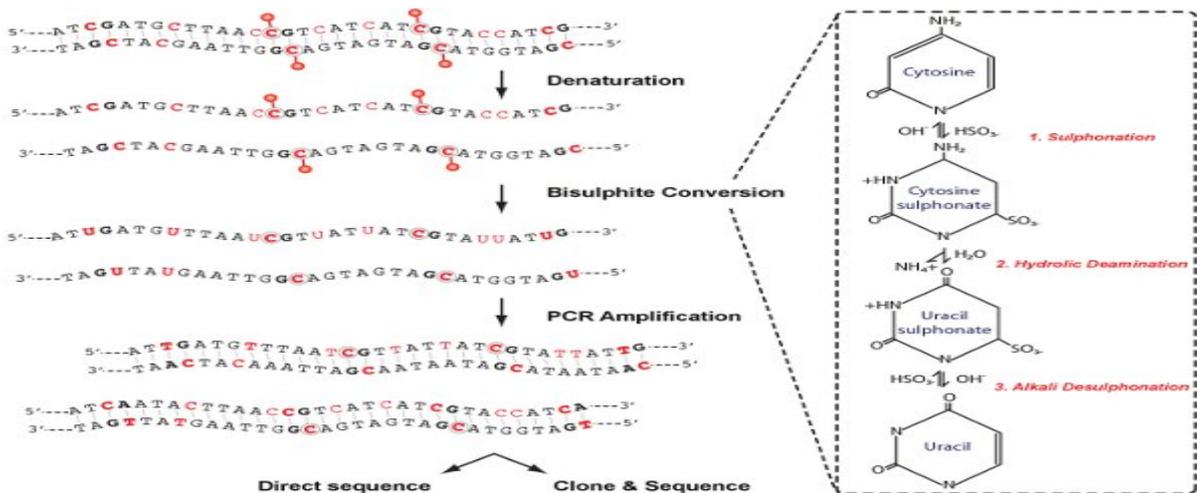


Fig. 2.4.1. Esquema químico conversión por bisulfito en MSP. El análisis de la metilación del ADN consta de cuatro etapas principales donde se muestran, la desnaturalización, la conversión de bisulfito, amplificación por PCR y su análisis. En el lado derecho de la imagen se observa las modificaciones que sufre la molécula de citosina durante la conversión por bisulfito de sodio. (Imagen extraída de *DNA methylation: Bisulfite modification and analysis*. K. Patterson, L. Molloy, W. Qu and S. Clark)

Dado que el MSP de manera aislada sólo nos proporcionaría un resultado cualitativo, es necesario complementarlo con otras técnicas que cuantifiquen dichos resultados.

#### 2.4.4.1.2. PCR cuantitativo específico a metilaciones (MS-QPCR)

Se trata de la realización de MSP con una PCR cuantitativa o “a tiempo real”. MS-QPCR tiene un funcionamiento idéntico a la MSP con la particularidad de que el producto de PCR se somete a un gradiente creciente de temperatura a la vez que se detecta la fluorescencia emitida (curva de temperatura de fusión). Para esto se emplean sondas marcadas con fluorocromos en ambos extremos que tienen una secuencia complementaria a parte del fragmento de ADN que se quiere amplificar. Uno de los fluorocromos actúa como donador de fluorescencia en el extremo 5' y el otro como aceptor de esta fluorescencia en el extremo 3'. La ADN polimerasa se desplaza sobre la cadena de ADN sintetizando la cadena complementaria a partir de un fragmento de ADN que sirve de molde (cebador). Según incrementa la temperatura, el producto de PCR se desnaturaliza, el fluorocromo se libera y deja de emitir fluorescencia. El cambio de secuencia dará lugar a una diferente temperatura de fusión, siendo mayor en el ADN metilado que en el no metilado<sup>46</sup>.

#### 2.4.4.1.3. Análisis conformacional de una hebra específica específico a metilaciones (MS-SSCA)

Al igual que en la técnica anterior, MS-SSCA está basada en la transformación previa del ADN previa por bisulfito de sodio y una amplificación por PCR del ADN tratado. Posteriormente, se realiza una desnaturalización del producto del PCR y este es incubado a 95°C 5 minutos. Por último, se realiza una electroforesis del ADN desnaturalizado en gel de agarosa. Una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácido nucleicos. Mediante un gradiente eléctrico, las moléculas de ADN son desplazadas de un polo negativo a otro positivo donde el gel de agarosa funciona como tamiz molecular. La distancia recorrida por cada fragmento de DNA es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante el uso de marcadores de tamaño conocido que nos permitan calcular los pesos moleculares de las muestras de ADN. Para el caso del gel de agarosa, se añade bromuro de etilo, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta<sup>47</sup>.

#### 2.4.4.2. *Modificaciones histonas*

##### 2.4.4.2.1. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Para la investigación de modificaciones de histonas, en la actualidad se están utilizando las técnicas de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y micromatrices. Ambas con un esquema principal para determinar las marcas de la cromatina<sup>48</sup>:

- El ADN y las proteínas de la cromatina se tratan con formaldehído y se entrecruzan, para que posteriormente la cromatina se fragmente en partes de 500-1500 pares de bases (pb).
- Dicha cromatina fragmentada se inmunoprecipita utilizando un anticuerpo que se une a la marca epigenética de interés donde el sobrenadante consistirá en porciones no marcadas que se desechan. Existen una cantidad relativamente grande de anticuerpos comerciales grado ChIP o incluso los propios investigadores pueden generar dichos anticuerpos a un precio razonable.
- El ADN es purificado a partir de cromatina.
- El ADN se etiqueta (con fluoróforos, etc.) y se hibrida en micromatrices de ADN.
- Generación de mapas epigenéticos de la cromatina dependiendo de las herramientas diagnósticas disponibles.

Finalmente, el análisis de la inmunoprecipitación para la modificación de histonas se realiza con anticuerpos dirigidos a residuos modificados en histonas, como por ejemplo la metilación de H4K9. Posteriormente, se realiza una amplificación con una PCR cuantitativa, como la explicada en el apartado anterior, de una región candidata para cuantificar los niveles de modificación de residuos de las histonas.

### 2.4.5. Fase experimental

En el apartado anterior nos hemos parado a explicar las técnicas que emplearemos por lo que, en esta parte del desarrollo experimental, haremos un breve resumen de los experimentos y los procesos que realizaremos.

Debido a los objetivos planteados hemos dividido el estudio en dos grupos de experimentos en función del objeto de estudio.

#### 2.4.5.1. Experimentos 1

Se estudiarán los niveles de modificaciones epigenéticas en el DAT en las distintas partes del mesencéfalo ventral (VTA y SNI) sobre sujetos control. De las técnicas explicadas anteriormente, usaremos la más apropiada según el tipo de modificación epigenética, siendo para el caso de las metilaciones del ADN las técnicas de MS-QPCR y MS-SSCA y a través de CHIP para las modificaciones de las histonas

La división temporal de estos experimentos será la siguiente:

- Durante los primeros nueve meses del proyecto estudiaremos los cambios en roedores, organizándolo de la siguiente manera:

##### 1. Estudio en ratones:

###### 1.1. Estudio de los niveles de metilación del ADN en el VTA y SNI

###### 1.2. Estudio niveles modificación de histonas en el VTA y SNI

##### 2. Estudio en ratas:

###### 1.1. Estudio de los niveles de metilación del ADN en el VTA y SNI

###### 1.2. Estudio niveles modificación de histonas en el VTA y SNI

- Durante los siguientes 9 meses estudiaremos los cambios en cerebros humanos sin antecedentes, según la siguiente organización:

###### 1. Estudio de los niveles de metilación del ADN en el VTA y SNI

###### 2. Estudio niveles modificación de histonas en el VTA y SNI

#### 2.4.5.2. Experimentos 2

En esta segunda fase, se estudiarán los diferentes niveles de modificaciones epigenéticas en las distintas partes del mesencéfalo ventral (VTA y SNI) sobre sujetos lesionados y enfermos de enfermedad de Parkinson para compararlos posteriormente con los resultados obtenidos en los sujetos control.

La división temporal de los experimentos será la siguiente:

- Durante los primeros nueve meses de esta segunda fase del proyecto estudiaremos los cambios en roedores lesionados, organizándolo de la siguiente manera:

##### 1. Estudio en ratones inyectados con MPTP:

###### 1.1. Estudio de los niveles de metilación del ADN en el VTA y SNI

###### 1.2. Estudio niveles modificación de histonas en el VTA y SNI

##### 2. Estudio en ratas inyectados con 6-OHDA:

###### 1.1. Estudio de los niveles de metilación del ADN en el VTA y SNI

###### 1.2. Estudio niveles modificación de histonas en el VTA y SNI

- Los siguientes 9 meses estudiaremos los cambios en cerebros humanos enfermos de Parkinson, según la siguiente organización:

##### 1. Estudio de los niveles de metilación del ADN en el VTA y SNI

##### 2. Estudio niveles modificación de histonas en el VTA y SNI

#### 2.4.6. Estudio estadístico

Los últimos 6 meses del proyecto se dedicarán a la recopilación de datos y al estudio estadístico pertinente en cada caso, pudiendo variar el estudio en cuestión dependiendo de los resultados obtenidos.

## **2.5. IMPACTO ESPERADO DE LOS RESULTADOS**

Actualmente no se dispone de ningún tratamiento capaz de detener la progresión de la enfermedad de Parkinson, únicamente existen métodos dirigidos al control de síntomas derivados de la pérdida y muerte neuronal. La L-Dopa, precursor de la dopamina, es el tratamiento más empleado y su uso se apoya en que en los pacientes con esta enfermedad existe un agotamiento de la dopamina estriatal, pero que las células dopaminérgicas de la sustancia nigra restantes son capaces de producir algo de dopamina captando su precursor.

La epigenética se muestra como campo emergente en el estudio de enfermedades neurodegenerativas y pese a que en la enfermedad de Parkinson no ha sido tan estudiado como en la enfermedad de Alzheimer, existen precedentes de hallazgos sobre la implicación de varios genes relacionados con su patogenia, entre los que la alpha-sinucleína es el más estudiado por ser el principal componente de los cuerpos de Lewy.

Este proyecto se realiza en base a la sospecha del papel que puede tener el transportador de dopamina a la hora de la degeneración dopaminérgica sufrida en la SN lateral y su proyección sobre el estriado. Se ha observado una expresión de la proteína en esta región mayor a la encontrada en el VTA donde no existe tal degeneración. Si dicha expresión está regulada por factores epigenéticos como queremos demostrar, nos lleva a pensar que controlando dichos factores a través de tratamientos basados en la epigenética como los ya explicados, podría controlarse dicha expresión, disminuyendo la misma, lo que podría suponer una mejora considerable en la calidad de vida de los enfermos de Parkinson.

## 2.6. BIBLIOGRAFÍA

1. Hughes A.J., Daniel S.E., Kilford L. and Lees A.J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clínico-pathological study of 100 cases. *Journal of neurology , neurosurgery and psychiatry* [online]. Marzo, 1992 [consultado Febrero, 2016]. Volumen 55, nº 3. Pp. 181-184. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1564476>
2. Burke R.E. Alpha-synuclein and parkin: coming together of pieces in puzzle of Parkinson's disease. *Lancet* [online]. Noviembre, 2001 [consultado Febrero, 2016]. Volumen 358, nº 9293. Pp. 1567-1568. Disponible en:  
[http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(01\)06668-5/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(01)06668-5/fulltext)
3. Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N. and Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging* [online]. Abril, 2003 [consultado Febrero, 2016]. Volumen 24, nº 2. Pp. 197-211. Disponible en:  
[http://www.neurobiologyofaging.org/article/S0197-4580\(02\)00065-9/abstract](http://www.neurobiologyofaging.org/article/S0197-4580(02)00065-9/abstract)
4. De Lau L.M., Breteler M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology* [online]. Junio, 2006 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 5, nº 6. Pp. 525-535. Disponible en:  
[http://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422\(06\)70471-9/abstract](http://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422(06)70471-9/abstract)
5. Blum D., Torch S., Lamberg N., Nissou M., Benabid A.L., Sadoul R. and Verna J.M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* [online]. Octubre, 2001 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 65, nº 2. Pp. 135-172. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030100820100003X>
6. J. Landgrave-Gómez, O. Mercado-Gómez y R. Guevara-Guzmán. Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience* [online]. Febrero, 27 de 2015 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 9, nº 58. Disponible en:  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2015.00058/full>

7. Ya Feng, Joseph Jankovic and Yun-Cheng Wu. Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* [online]. Febrero 15, 2015 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 349, nº 1-2. Pp. 3-9. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022510X14007825>
8. Bhairavi Srinageshwar, Panchanan Maiti, Gary L. Dumbar and Julien Rossignol. Role of Epigenetics in Stem Cell Proliferation and Differentiation: Implications for Treating Neurodegenerative Diseases. *International journal of molecular sciences* [online]. Febrero 2, 2016 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 17, nº 2. Pp. 199-214. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/2/199>
9. Fabio Ceppedè. Genetics and epigenetics of Parkinson's disease. *Scientific World Journal* [online]. Diciembre, 2011 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 2012. Pp.1-12. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/489830/>
10. Ashley L. Green, Muhammad M. Hossain, Siew C. Tee, Helmut Zarbl, Grace L. Guo and Jason R. Richardson. Epigenetic regulation of dopamine transporter mRNA expression in human neuroblastoma cells. *Neurochemical Research* [online]. Julio, 2015 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 40, nº 7. Pp. 1372-1378. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11064-015-1601-6>
11. Booth T.C., Nathan M., Waldman A.D., Quigley A.M., Schapira A.H. and Buscombe J. The role of functional dopamine-transporter SPECT imaging in parkinsonian syndromes, part 1. *AJNR American journal of neurocardiology* [online]. Febrero, 2015 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 36, nº 2. Pp. 229-235. Disponible en: <http://www.ajnr.org/content/36/2/229.long>
12. Horn A.S. Dopamine uptake: a review of progress in the last decade. *Progress in Neurobiology* [online]. Febrero, 1990 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 34, nº 5. Pp. 387-400. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/20964452\\_Horn\\_AS\\_Dopamine\\_uptake\\_a\\_review\\_of\\_progress\\_in\\_the\\_last\\_decade\\_Prog\\_Neurobiol\\_34\\_387-400](https://www.researchgate.net/publication/20964452_Horn_AS_Dopamine_uptake_a_review_of_progress_in_the_last_decade_Prog_Neurobiol_34_387-400)
13. Kilty J.E., Lorang D. and Amara S.G. Cloning and expression of cocaine-sensitive rat dopamine transporter. *Science* [online]. Octubre 25, 1991 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 254, nº 5031. Pp. 578-9. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/254/5031/578.long>

14. Vaughan R.A., Brown V.L., McCoy M.T. and Kuhar M.J. Species- and brain region-specific dopamine transporters: immunological and glycosylation characteristics. *Journal neurochemistry* [online]. Mayo, 1996 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 65, nº 5. Pp. 2146-2152. Disponible en:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1471-4159.1996.66052146.x/abstract>
15. Vaughan R.A., Huff R.A., Uhl G.R., Kuhar M.J. Protein kinase C-mediated phosphorylation and functional regulation of dopamine transporters in striatal synaptosomes. *The journal of biological chemistry* [online]. Junio 13, 2006 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 272, nº 24. Pp. 15541-6. Disponible en:  
<http://www.jbc.org/content/272/24/15541.long>
16. Lee F.J., Pei L., Moszcynska A., Vukusic B., Fletcher P.J. and Liu F. Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D2 receptor. *The EMBO journal* [online]. Abril 18, 2007 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 26, nº 8. Pp. 2127-2136. Disponible en:  
<http://emboj.embopress.org/content/26/8/2127.long>
17. Bolan E.A., Kivell B., Jaligam V., Oz M., Jayanthi L.D., Han Y. et al. D2 receptors regulate dopamine transporter function via an extracellular signal-regulated kinases 1 and 2-dependent and phosphoinositide 3 kinase-independent mechanism. *Molecular pharmacology* [online]. Mayo, 2007 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 71, nº 5. Pp. 1222-1232. Disponible en:  
<http://molpharm.aspetjournals.org/content/71/5/1222.long>
18. Wayne A. Cass and Greg A. Gerhardt. Direct in vivo evidence that D2 dopamine receptors can modulate dopamine uptake. *Neuroscience letters* [online]. Agosto 1, 1994 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 176, nº 2. Pp. 259-263. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304394094900965>
19. Torres G.E. The dopamine transporter proteome. *Journal Neurochemistry* [online]. Abril, 2006 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 97, suplemento S1. Pp. 3-10. Disponible en:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.2006.03719.x/full>

20. Annica Dahlström and Kjell Fuxe. A method for the demonstration of monoamine-containing nerve fibres in the central nervous system. *Acta Physiologica Scandinavica* [online]. Marzo, 1964 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 60, nº 3. Pp. 293-294. Disponible en:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-1716.1964.tb02891.x/abstract>
21. Damier P., Hirsch E.C., Agid Y. and Gabriel A.M. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain: a journal of neurology* [online]. Agosto 1, 1999 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 122. Pp. 1437-1448. Disponible en:  
<http://brain.oxfordjournals.org/content/122/8/1437.long>
22. Uhl G.R., Walther D., Mash D., Faucheux B. and Javoy-Agid F. Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons. *Annals of neurology* [online]. Abril, 1994 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 35, nº 4. pp. 494-498. Disponible en:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.410350421/abstract>
23. González Hernández T., Barroso China P. De la Cruz Muros I. and Del Mar Pérez Delgado M. Rodríguez M. Expression of dopamine and vesicular monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons. *The journal of comparative neurology* [online]. Noviembre 8, 2004 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 479, nº 2. Pp. 198-215.  
Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.20323/>
24. Kukuruzinska M.A. and Lennon K. Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. *Critical reviews in oral biology and medicine* [online]. 1998 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 9, nº 4. Pp. 415-448. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9825220>
25. Li L.B., Chen N., Ramamoorthy S., Chi L., Cui X.N., Wang L.C and Reith M.E. The role of N-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter. *The journal of biological chemistry* [online]. Mayo, 2004 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 279, nº 20. Pp. 21012-20. Disponible en:  
<http://www.jbc.org/content/279/20/21012.long>

26. D. Afonso Oramas, I. Cruz Muros, D. Álvarez de la Rosa, P. Abreu, T. Giráldez, J. Castro Hernández et al. Dopamine transporter glycosilation correlates with the vulnerability of midbrain dopaminergic cells in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* [online]. Septiembre 17, 2009 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 36, nº 3. Pp. 494-508. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996109002435>
27. Roy Lardenoije, Artemis Iatrou, Gunter Kenis, Konstantinos Kompotis, Harry W.M. Steinbusch, Diego Mastroeni et al. The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Progress in neurobiology* [online]. Junio 11, 2015 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 131, nº 2015. Pp. 21-64. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008215000416>
28. Rima Obeid, Achim Schadt, Ulrich Dillman, Panagiotis Kostopoulos, Klaus Fassbender and Wolfgang Hermann. Methylation status and neurodegenerative markers in Parkinson disease. *Clinical Chemistry* [online]. Agosto 13, 2009. [consultada Marzo, 2016]. Volumen 55. Pág.1852-1860. Disponible en: <http://www.clinchem.org/content/55/10/1852>
29. Ahmad Jowaed, Ina Schmitt, Oliver Kaut and Ullrich Wüllner. Methylation regulates Alpha-Synuclein expression and is decreases in Parkinson's disease patients' brains. *The Journal of Neuroscience* [online]. Mayo 5, 2010 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 30, nº 18. Pp. 6355-59. Disponible en: <http://www.jneurosci.org/content/30/18/6355.full>
30. V. Plagnol, M.A., Nalls, J.M., Bras, D.G., Hernandez, M., Sharma, U.M., Sheerin et al. A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease. *PLOS Genetics* [online]. Junio 7, 2011 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 7, nº 6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3128098/>
31. Zihui Xu, He Li and Peng Jin. Epigenetics-based therapeutics for Neurodegenerative disorders. *Current translational geriatrics and Experimental gerontology reports* [online]. Diciembre, 2012 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 1, nº 4. Pp. 229-236. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3601938/>

32. Harrison I.F. and Dexter DT. Epigenetic targeting of histone deacetylase: therapeutic potential in Parkinson's disease? *Pharmacology and Therapeutics* [online]. Octubre, 2013 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 140, nº1. Pp. 34-52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23711791>
33. Eirene Kontopoulos, Jeffrey D. Parvin and Mel B. Feany.  $\alpha$ -synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Human Molecular Genetics* [online]. Septiembre 7, 2006 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 15, nº 20. Pp. 3012-3023. Disponible en: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/15/20/3012.full>
34. T. Fleming Outeiro, E. Kontopoulos, S. M. Altmann. I. Kufareva, K. E. Strathearn, A. M. Amore, et al. *Science Magazine* [online]. Julio 27, 2007 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 317, Pp. 516-519. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/317/5837/516.full.pdf+html>
35. Robyn St. Lauren, Liam M. O'brien and S. Tariq Ahmad. *Neuroscience* [online]. Agosto 29, 2013 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 246. Pp. 382-390. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23623990>
36. Kirilyuk, A., Shimoji, M., Catania, J., Sahu, G., Pattabiraman, N., Giordano, A., et al. An intrinsically disordered region of the acetyltransferase p300 with similarity to prion-like domains plays a role in aggregation. *PLOS Genetics* [online]. Noviembre 1, 2012 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 7, nº 11. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0048243>
37. Jin, H., Kanthasamy, A., Ghosh, A., Yang, Y., Anantharam, V., Kanthasamy, A.G. Alpha-Synuclein negatively regulates protein kinase C $\delta$  expression to suppress apoptosis in dopaminergic neurons by reducing p300 histone acetyltransferase activity. *Journal Neuroscience* [online]. Febrero 9, 2011 [consultada Marzo, 2016]. Volumen 31, nº 6. Pp. 2035–2051. Disponible en: <http://www.jneurosci.org/content/31/6/2035>
38. Ammal Kaidery, N., Tarannum, S. and Thomas, B. Epigenetic landscape of Parkinson's disease: emerging role in disease mechanisms and therapeutic modalities. *Neurotherapeutics* [online]. Octubre, 2013 [consultada Mayo, 2016]. Volumen 10, nº 4. Pp. 698-708. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13311-013-0211-8>

39. Nicholas, A.P., Lubin, F.D., Hallett, P.J., Vattem, P., Ravenscroft, P., Bezard, E. et al. Striatal histone modifications in models of Levodopa-induced dyskinesia. *Journal Neurochemistry* [online]. Julio, 2008 [consultada Mayo, 2016]. Volumen 106, nº 1. Pp. 486-494. Disponible en:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.2008.05417.x/abstract;jsessionid=A171D3BB77407F9C004939B604C088A3.f03t03>
40. C. Song, A. Kanthasamy, H. Jin, V. Anantharam and A.G. Kanthasamy. Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration. *NeuroToxicology* [online]. Octubre, 2011 [consultada Mayo, 2016]. Volumen 32, nº 5. Pp. 586-595. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X11001112>
41. E. Junn, K.W. Lee, B.S. Jeong, T.W. Chan, J.Y. Im and M.M. Mouradian. Represion of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Agosto 4, 2009 [consultada Mayo, 2016]. Volumen 106, nº 31. Pp. 13052-13057. Disponible en:  
<http://www.pnas.org/content/106/31/13052>
42. Chunlian Liang, Hua Zhu, Yanfeng Xu, Lang Huang, Chunmei, Wei Deng et al. MicroRNA-153 negatively regulates the expression of amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2. *Brain Research* [online]. Mayo 21, 2012 [consultada Mayo, 2016]. Volumen 1455. Pp. 103-113. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000689931102004X>
43. Navneet Ammal Kaldery, Shaista Tarannum and Bobby Thomas. Epigenetic Landscape of Parkinson's Disease: Emerging Role in Disease Mechanisms and Therapeutic. *Neurotherapeutics* [online]. Septiembre 13, 2013 [consultada Mayo, 2016]. Volumen 10, nº 4. Pp. 698-708. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3805874/>
44. Zihui Xu, He Li and Peng Jin. Epigenetic- Based therapeutics for neurodegenerative disorders. *Current Translational Geriatrics and Experimental Gerontology Reports* [online]. Diciembre, 2012 [consultada Mayo, 2016]. Volumen 1, nº 4. Pp. 229-236. Disponible en:  
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13670-012-0027-0>

45. James G. Herman, Jeremy R. Graff, Sanna Myöhänen, Barry D. Nelkin and Stephen B. Baylin. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A [online]. Septiembre 3, 1996 [consultada Mayo, 2016]. Volumen 93, nº 18. Pp. 9821-9826. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC38513/>
46. Akanksha Mehta, Anna Mielnik, Peter N. Schlegel, Darius A. Paduch. Novel methylation specific real-time PCR test for the diagnosis of Klinefelter syndrome. Asian Journal of Andrology [online]. Octubre, 2014 [consultada Mayo, 2016]. Volumen 16, nº 5. Pp. 684-688. Disponible en: <http://www.ajandrology.com/article.asp?issn=1008-682X;year=2014;volume=16;issue=5;spage=684;epage=688;aui=Mehta>
47. Tina Bianco, Damian Hussey and Alexander Dobrovic. Methylation-sensitive, single-strand conformational analysis (MS-SSCA): A rapid method to screen for and analyze methylation. Human Mutation [online]. 1999 [consultada Mayo, 2016]. Volumen 14, nº 4. Pp. 289-293. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10502775>
48. Susana C. Hernández Reyes. Revisión teórica sobre la epigenética, su impacto en enfermedades complejas y componentes químicos con actividad remodeladora de la cromatina. Colección tesis digitales Universidad de las Americas Puebla [online]. Agosto 12, 2008 [consultada Mayo, 2016]. Capítulo 3, Técnicas de investigación epigenética. Disponible en: [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lcf/hernandez\\_r\\_sc/capitulo\\_3.html](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lcf/hernandez_r_sc/capitulo_3.html)

## 2.7. ANEXOS

### Anexo 1: Abreviaturas más empleadas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
DAT	Transportador activo de dopamina
DNMTs	ADN metiltransferasas
EP	Enfermedad de Parkinson
HDACs	Desacetilasas de histonas
HDACIs	Inhibidores de HDACs
MPTP	1-metil-4-fenil- 1,2,3,6-tetrahidropiridina
MS-QPCR	PCR cuantitativa específica para metilaciones
MS-SSCA	Análisis conformacional de una sola hebra específica para metilaciones
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
SAH	S-adenosin homocisteína
SAM	S-adenosin metionina
SN	Sustancia negra
SNCA	$\alpha$ -sinucleína
VTA	Área tegmental ventral
6-OHDA	6-hydroxidopamina