



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**BASES MOLECULARES Y CELULARES Y
MODELOS DE ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD
DE PARKINSON**

**MOLECULAR AND CELLULAR BASIS AND
STUDY MODELS FOR PARKINSON'S DISEASE**

Autora: Virginia Sestelo Prado

Tutora: María Carmen Marín Vieira

Cotutora: Laura Maeso Alonso

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Septiembre, 2022

ÍNDICE	
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	2
MATERIALES Y MÉTODOS	3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	3
1. Etapas clínicas de la Enfermedad de Parkinson	3
2. Bases moleculares y celulares de la Enfermedad de Parkinson	4
2.1 Principales alteraciones celulares en la Enfermedad de Parkinson	6
2.2 Base genética	11
3. Tratamientos de la Enfermedad de Parkinson	13
4. Modelos de estudio de la Enfermedad de Parkinson	14
4.1 Modelos <i>in vivo</i>	15
4.1.1 Modelos animales inducidos mediante una neurotoxina	16
4.1.2 Modelos animales modificados genéticamente	18
4.1.3 Ventajas y desventajas de los modelos <i>in vivo</i>	20
4.2 Modelos <i>in vitro</i>	20
4.2.1 Modelos <i>in vitro</i> en 2D	21
4.2.2 Modelos <i>in vitro</i> en 3D	24
4.2.3 Ventajas y desventajas de los modelos <i>in vitro</i>	27
CONCLUSIONES	27
REFERENCIAS	28

RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson un trastorno neurodegenerativo, caracterizado por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra. Es una enfermedad multifactorial y compleja en la que influyen el envejecimiento, factores genéticos y factores ambientales. La acción combinada de estos factores provoca múltiples alteraciones celulares que desembocan en la degeneración neuronal causando alteraciones en la función motora. Actualmente, sólo existen tratamientos paliativos. Esto se debe, al menos en parte, a que tradicionalmente el estudio y la búsqueda de tratamientos se ha basado en la utilización de modelos que logran, solo en cierta medida, recrear las características de la enfermedad de Parkinson. Por ello, mi hipótesis es que el desarrollo de nuevos modelos celulares que recapitulen fielmente los procesos fundamentales de la enfermedad de Parkinson es esencial para la búsqueda de nuevos fármacos efectivos contra este trastorno. Recientemente se han desarrollado cultivos en tres dimensiones, denominados organoides cerebrales, que dada su similitud morfológica y fisiológica al órgano *in vivo*, presentan un gran potencial como modelos del Parkinson. El objetivo general de este trabajo es realizar un estudio bibliográfico de los mecanismos patológicos de esta enfermedad y un análisis comparativo de los modelos que se han utilizado para su estudio.

Palabras clave: “Parkinson”, “genético”, “molecular”, “modelos”, “cultivo”, “organoide”.

ABSTRACT

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder, characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra. It is a multifactorial and complex disease influenced by aging, genetic and environmental factors. The combined action of these factors causes multiple cellular alterations that lead to neuronal degeneration causing alterations in motor function. Currently, there are only palliative treatments. This is due, at least in part, to the fact that traditionally the study and search for treatments has been based on the use of models that manage, only to a certain extent, to recreate the characteristics of Parkinson's disease. Therefore, my hypothesis is that the development of new cellular models that accurately recapitulate the fundamental processes of Parkinson's disease is essential for the search for new effective drugs against this disorder. Recently cultures in three dimensions, called cerebral organoids, have been developed, which given their morphological and physiological similarity to the organ *in vivo*, present a great potential as models of Parkinson's. The general objective of this work is to carry out a bibliographic study of the pathological mechanisms of this disease and a comparative analysis of the models that have been used for its study.

Keywords: "Parkinson", "genetic", "molecular", "models", "culture", "organoid".

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo crónico caracterizado por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas que provoca alteraciones en la función motora: movimientos lentos y/o involuntarios, temblor durante el reposo, rigidez muscular e inestabilidad postural (Chia *et al.*, 2020). Recibe su nombre del médico inglés James Parkinson, quien describió por primera vez la EP en su monografía “*An Essay on the shaking palsy*”, publicada en 1817 (Cacabelos, 2017).

En 2016, más de 6,1 millones de personas padecían Parkinson en todo el mundo (Ray Dorsey *et al.*, 2018) y más de 300.000 en España (García-Ramos *et al.*, 2016). Se trata de la segunda enfermedad neurodegenerativa más común tras la enfermedad de Alzheimer, afectando especialmente a personas mayores de 65 años. La prevalencia global de la EP es del 0,24%, sin embargo, en el grupo de edad de 70 a 79 años aumenta hasta el 1,1% y en mayores de 80 años hasta el 1,9%. Además, es mayor el número de varones que padecen este trastorno que el de mujeres y se reportan más casos en determinadas áreas geográficas como Europa, Norteamérica y Australia (Pringsheim *et al.*, 2014).

El incremento significativo de la prevalencia con la edad indica que uno de los principales factores de riesgo de sufrir esta enfermedad es la edad avanzada. El envejecimiento conlleva la pérdida de neuronas, en especial de neuronas dopaminérgicas, disfunción mitocondrial y disminución de la actividad de los sistemas de degradación de proteínas, factores que contribuyen en gran medida al desarrollo de la EP (Reeve *et al.*, 2014). Dado que la esperanza de vida aumenta cada vez más mundialmente, se estima que en unos 40 años la prevalencia de la EP podría duplicarse (Savica *et al.*, 2018).

Sin embargo, existe otro tipo de EP de aparición temprana, denominada EP familiar, que depende de factores hereditarios o genéticos. Mutaciones puntuales en genes específicos pueden provocar la aparición de esta enfermedad. Se estima que los casos de EP temprana suponen tan solo un 5-10% de los casos totales (Poewe *et al.*, 2017).

Además, determinados factores ambientales incrementan el riesgo de sufrir la EP: la exposición a contaminantes como pesticidas, metales y solventes químicos (Ray Dorsey *et al.*, 2018), el consumo de ciertos fármacos y el daño cerebral debido a un traumatismo. Por otro lado, el tabaco y la cafeína reducen el riesgo de padecer EP (Poewe *et al.*, 2017).

La EP no es tan solo un gran problema sanitario, sino también económico, debido al elevado coste que supone el tratamiento y cuidado de los pacientes. En España, se estima que cada caso de EP conlleva un coste económico de unos 17.000 euros (García-Ramos *et al.*, 2016). Este problema se agravará cada vez más a medida que pase el tiempo.

Hasta el momento no se ha descubierto ningún tratamiento capaz de curar o frenar el progreso la EP, posiblemente debido a que los mecanismos patológicos de la enfermedad son todavía bastante desconocidos y no existen modelos celulares que reproduzcan la EP adecuadamente. Tan sólo existen algunos tratamientos para aliviar los síntomas con el objetivo de mejorar la calidad de vida del enfermo. Sin embargo, estos tratamientos conllevan graves efectos secundarios (Armstrong and Okun, 2020).

Por estos motivos, urge encontrar nuevos tratamientos contra esta enfermedad. Para ello es imprescindible el estudio de los mecanismos patológicos de la EP y el desarrollo de nuevos modelos de estudio celulares y animales. El objetivo de los modelos celulares es recrear el proceso que ocurre *in vivo*, el metabolismo y las interacciones celulares, en un contexto regulado y reproducible, mientras que el de los modelos animales es generar la enfermedad lo más parecida a la que tiene lugar en humanos. Gracias al desarrollo de nuevos modelos, en las últimas décadas se han logrado entender los mecanismos patológicos de numerosas enfermedades (Egsten and Herwald, 2021). Asimismo, la generación de modelos *in vivo* e *in vitro* que reproduzcan fielmente el proceso patológico de la EP permitirá comprender mejor sus bases moleculares y celulares y servirán como base para la búsqueda de fármacos y terapias celulares efectivos contra la enfermedad, que incluso puedan llegar a curarla.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Mi hipótesis de trabajo es que **el desarrollo de modelos celulares que recapitulen los procesos fundamentales de la enfermedad de Parkinson es esencial para el estudio de la misma** y la búsqueda y estudio de fármacos con interés biomédico. Debido a la complejidad de la enfermedad, es difícil identificar un modelo único que englobe todos los eventos que tienen lugar en la EP, por ello, el objetivo general de este trabajo es realizar un estudio bibliográfico en profundidad de los mecanismos patológicos de esta enfermedad y una análisis comparativo de los distintos modelos que se han desarrollado para su estudio, tanto *in vivo* como *in vitro*, con especial énfasis en los nuevos modelos en tres dimensiones que emplean células troncales.

Objetivos:

1. Llevar a cabo un estudio de los mecanismos patológicos de la EP, describiendo sus bases moleculares y celulares.
2. Realizar un compendio de los principales modelos de estudio de la EP *in vivo* e *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la búsqueda de bibliografía se emplearon el buscador Google Scholar y las bases de datos de PubMed y Science Direct. Se optó por una estrategia de búsqueda adaptada a las bases de datos utilizando varias palabras clave unidas por los operadores booleanos AND y OR. Se introdujeron en el buscador palabras clave tales como “Parkinson”, “genetic”, “models”, “molecular”, “culture”, u “organoid”. Los criterios de inclusión que se utilizaron fueron los siguientes: artículos publicados en inglés a partir del 2010 y que respondiesen a los objetivos planteados. Se excluyeron los artículos que no cumplieron estos requisitos (salvo excepciones de artículos de especial relevancia en el campo).

Para la elaboración de los esquemas se empleó la herramienta online “BioRender.com”.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Etapas clínicas de la Enfermedad de Parkinson

En general, la evolución de la EP se puede dividir en tres etapas: la etapa preclínica, la etapa prodromal y la etapa clínica. La etapa preclínica es el periodo de tiempo en el que los futuros pacientes aún no presentan síntomas, pero se asume que el proceso patológico en la vía nigroestriada ya ha comenzado, mientras que la etapa prodromal es aquella en la que el futuro paciente ya presenta algunos síntomas leves y el proceso neurodegenerativo afecta a zonas externas a la vía nigroestriada, como la región inferior del tronco encefálico, el bulbo olfatorio y el sistema nervioso autónomo periférico. Una vez que la EP es diagnosticada, da comienzo la etapa clínica, que a su vez se divide en la etapa temprana y la etapa tardía (Tolosa *et al.*, 2021).

El diagnóstico de la EP es complicado debido a que muchos de los síntomas son comunes a otros trastornos neurodegenerativos, y en las etapas más tempranas las pruebas y los marcadores moleculares no permiten un diagnóstico definitivo. Sin embargo, se pueden definir una serie de síntomas motores y no motores característicos de cada etapa (Tabla 1). Los síntomas motores

de la EP son movimientos lentos (bradicinesia) y/o involuntarios (discinesia), temblor durante el reposo, rigidez muscular e inestabilidad postural (Tolosa *et al.*, 2021):

Tabla 1: Principales síntomas motores y no motores de EP observados en las etapas prodromal, clínica temprana y clínica tardía.

Etapa	Prodromal	Clínica	
		Temprana	Tardía
Síntomas motores	<ul style="list-style-type: none"> Disminución de la movilidad facial Cambios en la voz Pérdida de la destreza en los dedos Disminución del balanceo de los brazos Postura encorvada 	<ul style="list-style-type: none"> Bradicinesia Discinesia Rigidez muscular Temblor Alteraciones al caminar 	<ul style="list-style-type: none"> Alteraciones de la postura Detenimiento al andar Alteraciones del equilibrio Dificultad en el habla Dificultad al tragar
Síntomas no motores	<ul style="list-style-type: none"> Estreñimiento Pérdida de olfato Movimiento rápido de los ojos durante el sueño Urgencia urinaria Disfunción sexual Depresión, ansiedad Hipotensión 	<ul style="list-style-type: none"> Trastorno del sueño Apatía, ansiedad, depresión Disfunción del sistema autónomo Leves fallos cognitivos Dolor, quemazón 	<ul style="list-style-type: none"> Se agravan los síntomas de la fase temprana Demencia

2. Bases moleculares y celulares de la Enfermedad de Parkinson

Las neuronas dopaminérgicas (ND) son un grupo heterogéneo de células que sintetizan un importante neurotransmisor denominado dopamina. Esta molécula está implicada en numerosos procesos del comportamiento motor y emocional (motivación, recompensa, etc.).

La biosíntesis de dopamina tiene lugar en el citosol y se produce en dos pasos: primero, la tirosina hidroxilasa (TH) convierte la tirosina en levodopa (L-DOPA); segundo, la L-aminoácido descarboxilasa (DCAA) cataliza la conversión de L-DOPA a dopamina (Figura 1). La dopamina es transportada

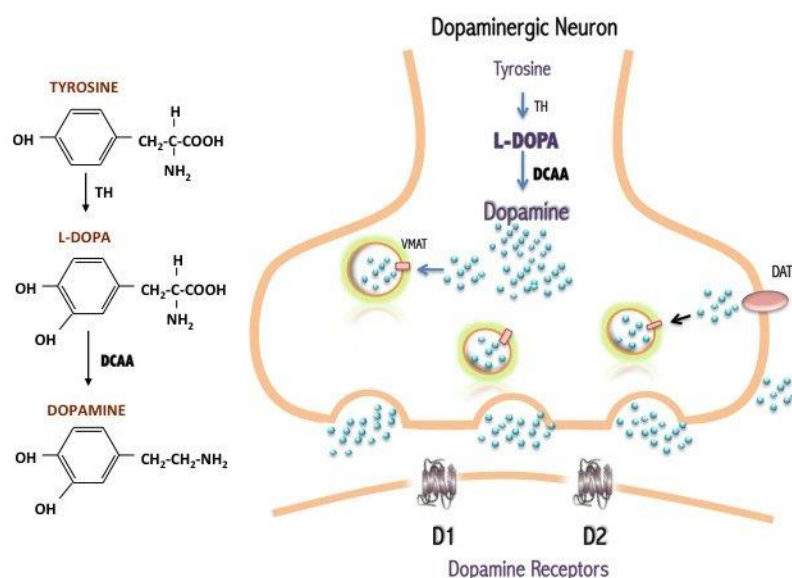


Figura 1: Representación esquemática del proceso de síntesis de la dopamina. DAT: Transportador de Dopamina (Albarran *et al.*, 2012).

desde el citosol al interior de vesículas sinápticas a través de un transportador vesicular de monoamina (VMAT), donde es almacenada hasta su liberación al espacio sináptico durante la sinapsis neuronal. Posteriormente, la dopamina interacciona con sus receptores en la neurona postsináptica (D1, D2)(Klein *et al.*, 2019).

La EP se caracteriza por la neurodegeneración de las ND. Estas neuronas se encuentran mayoritariamente en la región ventral del mesencéfalo y, en menor medida, en el diencefalo y en el bulbo olfatorio. La vía dopaminérgica mesencefálica se subdivide en cuatro vías: mesolímbica (Figura 2, rosa), mesocortical (azul), nigroestriada (amarilla) y tuberoinfundibular (verde). La más afectada por la EP

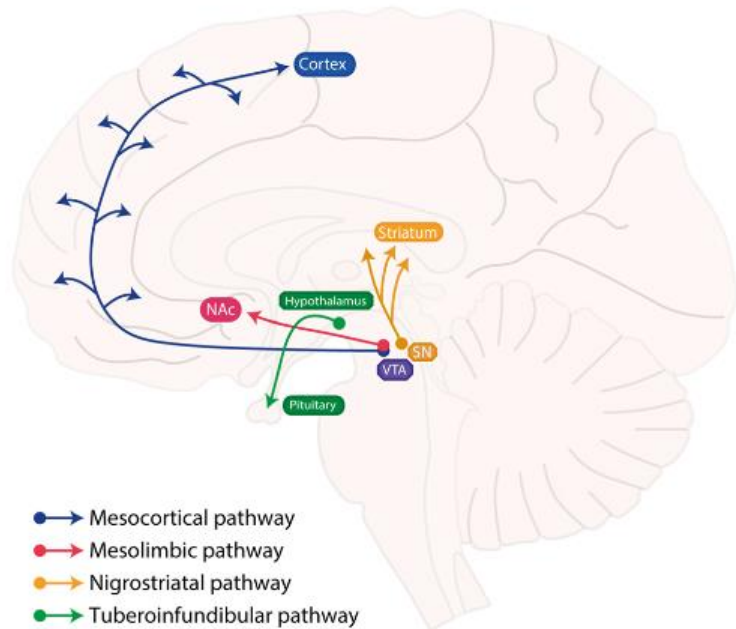


Figura 2: Esquema de los diferentes tipos de vías que conforman la vía dopaminérgica (Klein *et al.*, 2019).

es la vía nigroestriada que se encarga de transportar la dopamina desde la zona compacta de la sustancia negra hasta el núcleo caudado y el putamen (Chinta and Andersen, 2005).

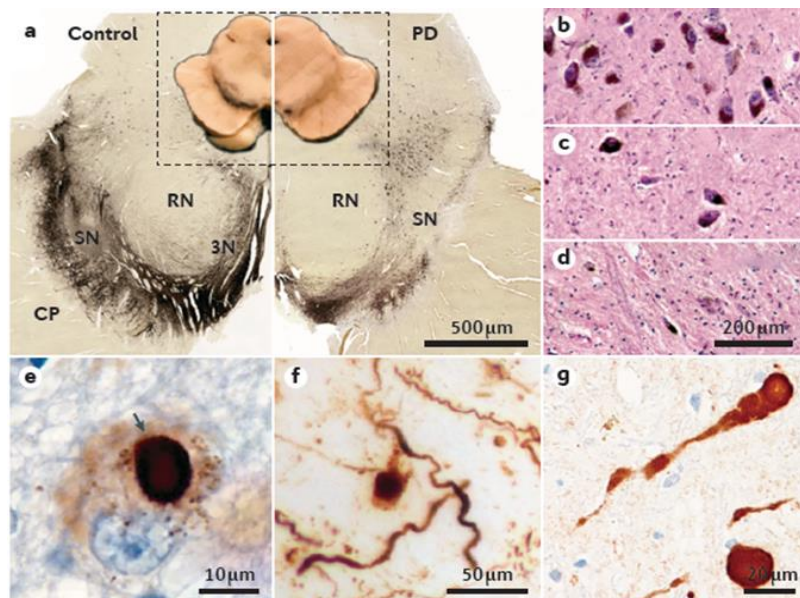


Figura 3: (a) Despigmentación de la sustancia negra (SN) característica de la EP (lado derecho) en comparación con el control (lado izquierdo). En el centro, una sección transversal del mesencéfalo con una tinción inmunohistoquímica para TH. 3N: Fibras del 3^{er} nervio. CP: Pedúnculo cerebral. RN: Núcleo rojo. (b-d) Tinción hematoxilina-eosina de la región ventrolateral de la SN en una muestra control (b), en una muestra de EP moderada (c) y de EP severa (d). (e-g) Tinción inmunohistoquímica de la alfa-sinucleína que muestra la formación de cuerpos de Lewy (e) y agregados de esta proteína (f-g) (Poewe *et al.*, 2017).

En la etapa temprana de la enfermedad, la pérdida neuronal se limita a la región ventral de la sustancia negra (Figura 3 a-d), mientras que en la etapa tardía la pérdida se expande a regiones periféricas (Poewe *et al.*, 2017). La vía nigroestriada posee un papel fundamental en el control del movimiento voluntario, es por ello por lo que el deterioro de esta vía provoca la aparición de los síntomas motores de la EP, mientras que los síntomas no-motores se cree que son causados por la degeneración del sistema nervioso autónomo periférico (Tolosa *et al.*, 2021).

2.1 Principales alteraciones celulares en la Enfermedad de Parkinson

A pesar de que se han descubierto multitud de mutaciones asociadas a la EP, como las descritas más adelante, la mayoría desencadenan alteraciones similares. Las más importantes, consideradas las causantes de la neurodegeneración, son el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial, estrés del retículo endoplasmático, fallos en la autofagia y la neuroinflamación (Zeng *et al.*, 2018).

- Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo

Una de las alteraciones más estudiadas es la acumulación patológica de la proteína alfa-sinucleína (α -syn) (Figura 3 e-g). La EP se considera por ello una sinucleinopatía, un grupo de enfermedades neurodegenerativas que se definen por la presencia de agregados anómalos de α -syn intraneuronales (cuerpos de Lewy) o gliales. La α -syn es una proteína intracelular de 140 aminoácidos bastante abundante en el cerebro (Poewe *et al.*, 2017). En condiciones fisiológicas, α -syn funciona como monómero en los terminales presinápticos en la transmisión sináptica, teniendo un papel importante en la sinapsis axonal, en el transporte y endocitosis de las vesículas sinápticas y se cree que actúa como chaperona molecular (Miraglia *et al.*, 2018).

En condiciones patológicas, puede producirse un proceso en el cual se pliega incorrectamente formando oligómeros y más tarde fibrillas insolubles que generan los cuerpos de Lewy, sobre todo en la región del axón (Burré *et al.*, 2018).

Inicialmente, estos se generan en las neuronas monoaminérgicas, colinérgicas y del sistema olfativo y, a medida que progresa la enfermedad, en el sistema límbico y neocortical (Poewe *et al.*, 2017), por lo que contribuyen a la aparición de los síntomas de la EP. Estos son masas esféricas de agregados intraneuronales anormales de proteínas, resistentes a la degradación proteolítica cuyo componente estructural primario es la alfa α -syn, junto con otras proteínas como la parkina, ubiquitina y neurofilamentos. Los factores que inducen la agregación de la α -syn se desconocen, pero se sabe que la formación de las fibrillas de α -syn es una reacción de

nucleación en la cual los monómeros solubles de α -syn pasan a tener estructura en forma de hoja plegada- β insoluble que forman oligómeros. El apilamiento apretado de estos oligómeros dará lugar a las protofibrillas, fibrillas y finalmente la agregación de estas dando lugar a los cuerpos de Lewy (Miraglia *et al.*, 2018).

Actualmente se hipotetiza que son las especies prefibrilares oligoméricas, y no los grandes agregados, las formas tóxicas de la α -syn. A nivel intracelular, se ha observado que la acumulación de la conformación protofibrilar de los oligómeros de α -syn causa diversos fenotipos de disfunción mitocondrial en modelos animales y celulares (Figura 4). Las protofibrillas son capaces de unirse a la membrana mitocondrial, dañándola y permeabilizándola, lo que provoca cambios en el potencial de membrana. Por otra parte, las protofibrillas impiden el correcto funcionamiento del complejo I, reduciendo los niveles de fosforilación oxidativa e incrementando la concentración de Ca^{+2} mitocondrial, que causan también la alteración del potencial de membrana. Cambios en este potencial inducen la liberación de citocromo c al citoplasma y la consecuente activación de la cascada de caspasas, provocando la apoptosis de la neurona (Schapira, 2011).

Las ND de la sustancia negra son especialmente sensibles al estrés metabólico y oxidativo por diversos motivos. Primero, poseen axones largos y muy ramificados donde tienen lugar un gran número de sinapsis que requieren un gran gasto energético. Segundo, las ND actúan como un marcapasos celular autónomo mediante la introducción y la expulsión de Ca^{+2} citosólico a través de canales de Ca^{+2} , lo que también conlleva un gasto energético. La reducción de la producción de energía celular altera la sinapsis neuronal y la homeostasis de Ca^{+2} , lo que resulta en la degeneración de las ND (Poewe *et al.*, 2017). Tercero, la dopamina es capaz de autooxidarse espontáneamente. El estrés oxidativo mitocondrial induce la acumulación de dopamina oxidada y resulta en la reducción de la actividad de la glucocerebrosidasa, disfunción lisosomal y la acumulación de alfa-sinucleína, lo que eventualmente causa neurodegeneración (Zeng *et al.*, 2018).

Existe una relación entre la disfunción mitocondrial debida a factores ambientales y la debida a factores genéticos. Las neurotoxinas 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), Paraquat y rotenona reducen la fosforilación oxidativa, concretamente del complejo I, reduciendo la producción de ATP y generando estrés oxidativo (Zeng *et al.*, 2018). El 1-metil-4-fenilpiridino (MPP⁺), el mayor metabolito activo de la MPTP es captado por la mitocondria, en donde se acumula e inhibe la oxidación de sustratos unidos al NADH de la mitocondria

causando una disminución del ATP. Esto sugiere que la toxicidad del MPP⁺ puede atribuirse a la inhibición de las funciones de la mitocondria.

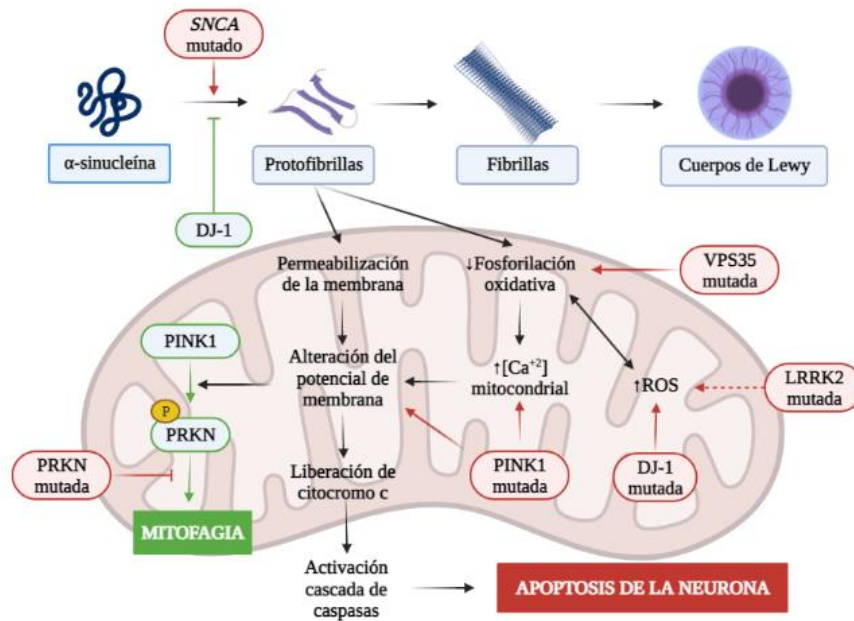


Figura 4: Esquema de los mecanismos causantes de la apoptosis neuronal asociada a la disfunción mitocondrial, provocada por la agregación de α -syn y las proteínas mutadas LRRK2, PINK1, PRKN, DJ-1 y VPS35. Adaptado de (Schapira, 2011).

La inyección una dosis pequeña de MPTP que no es tóxica, incrementa la neurotoxicidad causada por la mutación en el gen *SNCA* (*Alfa-sinucleína*), ya que el aumento de la concentración de Ca²⁺ y de la oxidación mitocondrial causada por la acumulación de la α -syn, favorece el incremento de la dopamina y Ca²⁺ citosólicos inducidos por MPP⁺, generando un mayor grado de neurotoxicidad (Zeng *et al.*, 2018). Por otro lado, aumenta la vulnerabilidad de las ND, debido a, posiblemente, la reducción de la expresión del gen *PARK7* (*Deglicasa asociada al parkinsonismo*). La proteína codificada por este gen, DJ-1 (Deglicasa-1) ejerce un efecto neuroprotector contra el estrés oxidativo. Funciona como una chaperona, ayudando en el correcto plegamiento de las proteínas, dirige las proteínas marcadas al proteasoma y también participa en el proceso de síntesis y regulación del ARN (Selvaraj and Piramanayagam, 2019)

- Estrés del retículo endoplasmático

La acumulación de proteínas plegadas incorrectamente, como la α -syn, causa estrés en el retículo endoplasmático. Niveles altos de estrés del retículo endoplasmático normalmente resultan en apoptosis y muerte celular (Zeng *et al.*, 2018). La acumulación de los agregados de α -syn inicia la respuesta a proteínas desplegadas mediante la activación de proteínas transmembrana (Figura 5): la quinasa del retículo endoplasmático similar a la RNA protein-

quinasa (PERK), el activador del factor de transcripción (ATF6 α) y la proteína que requiere inositol (IRE1 α). PERK activa al factor de iniciación eucariótico (eIF2 α) que inhibe la transcripción e incrementa los niveles de factor de transcripción activador 4 (ATF4) que, a niveles altos de estrés, induce la apoptosis. ATF6 α es fragmentado en el aparato de Golgi y actúa como factor de transcripción que induce la apoptosis. Por último, IRE1 α también induce la apoptosis mediante diversos mecanismos: fosforilación de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), incrementando la respuesta inflamatoria, activando la proteína de unión a la caja X (XBP1s) (Jin, 2020).

Asimismo, la acumulación de agregados de α -syn inhibe la vía neuroprotectora BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro)/TrkB (Receptor kinasa tipo B relacionado con la tropomiosina) reduciendo la expresión de TrkB. Esto es causado por la interacción de la α -syn con TrkB, que induce su ubiquitinación y degradación por el proteasoma. La inhibición de esta vía causa un mayor estrés en el retículo endoplasmático y acumulación de la α -syn (Jin, 2020).

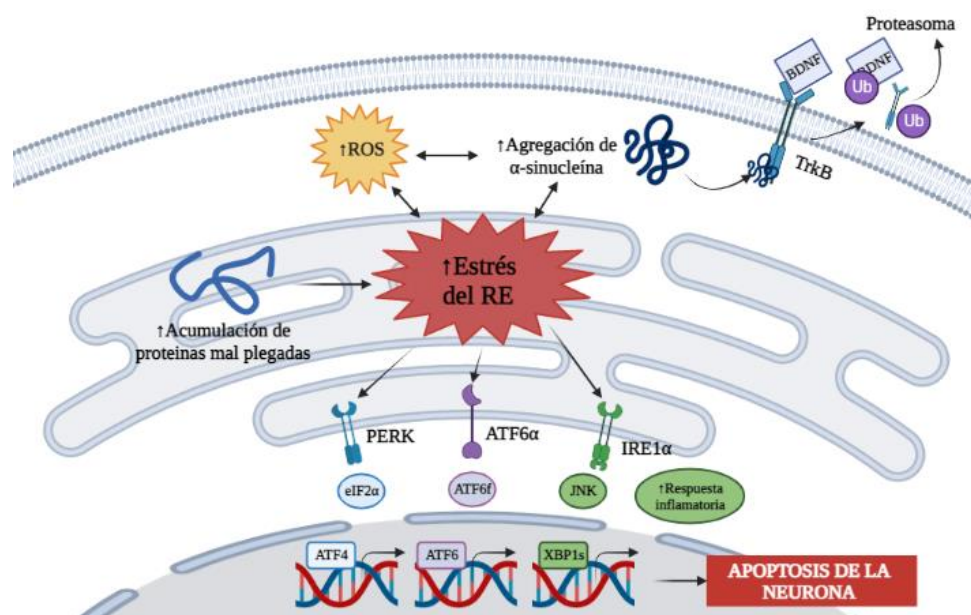


Figura 5: Esquema de los mecanismos causantes del aumento del estrés del retículo endoplasmático (RE), que inicia la respuesta a proteínas desplegadas mediada por los receptores transmembrana PERK, ATF6 α e IRE1 α , resultando en la apoptosis de la neurona. ROS: Especies Reactivas de Oxígeno. Adaptado de (Jin, 2020).

- Defectos en la autofagia

En la mayoría de casos de EP, la autofagia está inhibida o presenta defectos. La autofagia es un mecanismo necesario para la degradación de orgánulos dañados y la eliminación de los agregados de proteínas mal plegadas. Cuando las mitocondrias están dañadas, da comienzo la vía PINK1(Quinasa inducida por PTEN1)/PRKN (Ligasa de la proteína ubiquitina E3 RBR parkin). PINK1 se acumula en la membrana de las mitocondrias disfuncionales y fosforila a

PRKN, reclutándola y activándola. PRKN transfiere un grupo ubiquitina a las mitocondrias, señalándolas para ser degradadas por el proteasoma. Las mutaciones en los genes *PINK1* y *PRKN* inhiben la mitofagia, por lo que se acumulan las mitocondrias dañadas debido al estrés oxidativo, contribuyendo a la muerte neuronal (Zeng *et al.*, 2018). Se ha observado que los ratones con el gen *Prkn* mutado son más sensibles a la neurotoxicidad causada por rotenona (Pang *et al.*, 2019).

En ratones transgénicos con el gen *SNCA* mutado los niveles de autofagia en las ND se encuentran reducidos, favoreciendo la liberación y la transferencia α -syn entre células mediante vesículas extracelulares y la propagación de la patología a otras ND. La α -syn mutada puede unirse a los receptores de la membrana lisosomal e inhibir la autofagia mediada por chaperonas, que provoca la acumulación de esta proteína y la generación de los cuerpos de Lewy, resultando en la neurodegeneración de las ND (Pupyshev *et al.*, 2018).

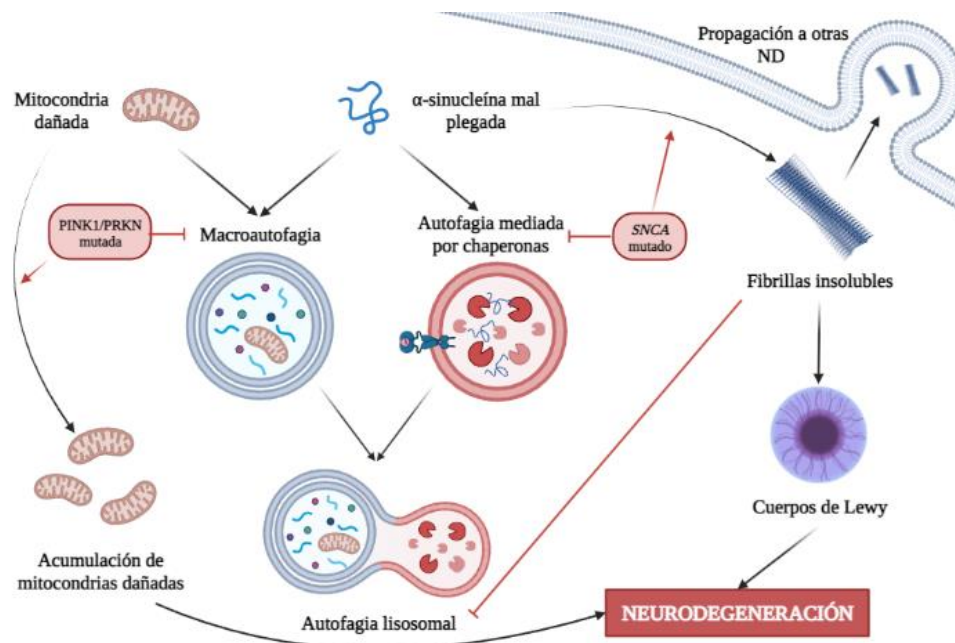


Figura 6: Esquema de los mecanismos causantes de los defectos en diferentes tipos de autofagia: macroautofagia, mediada por chaperonas y lisosomal, que inducen la formación de agregados de α -syn y la degeneración de la ND.

- Neuroinflamación

El sistema inmune tiene un papel importante en la EP. En diversos estudios se ha observado que las citoquinas proinflamatorias como la interleucina 1 beta (IL-1 β), la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el interferón gamma (INF- γ) se encuentran sobreexpresadas en tejidos cerebrales post-mortem de pacientes de EP y que en modelos animales las células de la microglía se activan. Modelos que sobreexpresan α -syn también han demostrado la activación de la microglía y sobreexpresión de las citoquinas proinflamatorias.

La neuroinflamación, a su vez, promueve el plegamiento incorrecto de la α -syn, por lo que agrava la sinucleinopatía (Figura 7) (Zeng *et al.*, 2018).

En estudios recientes se ha observado que, en los casos de EP, los linfocitos T citotóxicos reconocen a las ND que presentan α -syn, las destruyen y generan neuroinflamación, lo que contribuye a la degeneración de las ND. Este proceso comienza hasta 10 años antes de que se diagnostique la enfermedad, por lo que puede suponer una nueva forma de diagnóstico temprano de la EP (Arlehamn *et al.*, 2020).

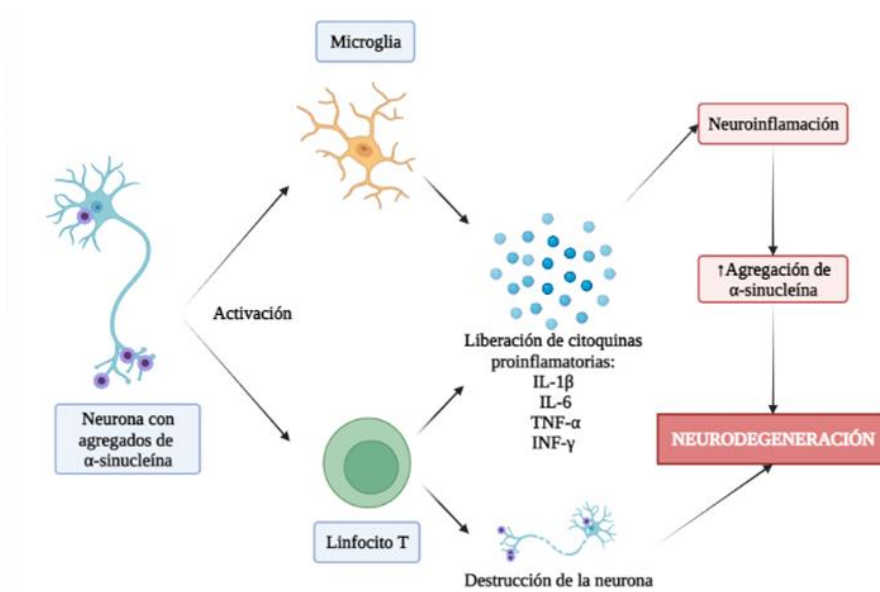


Figura 7: Esquema de los mecanismos causantes de la neuroinflamación en el mesencéfalo, que induce la degeneración de las ND.

2.2 Base genética

En los últimos años se han descubierto numerosas mutaciones en genes asociadas a la EP. Son responsables de más del 50% de los casos de EP familiar y del 2-3% de los casos de EP tardía (EP esporádica). Mutaciones en más de 20 genes han sido identificadas como causantes de la EP temprana y más de 90 loci mutados que pueden incrementar el riesgo de sufrir EP esporádica (Tolosa *et al.*, 2021). A continuación, se describen las más importantes.

- Alfa-sinucleína: SNCA

Es el gen que codifica la α -syn. Como se explicó anteriormente, el plegamiento incorrecto de esta proteína contribuye a la aparición de los síntomas de la EP. Una de las causas del plegamiento incorrecto de la α -syn es la mutación del gen SNCA. Puede presentar dos tipos de

mutaciones: mutaciones con cambio de sentido y multiplicaciones del gen entero, incluyendo duplicaciones y triplicaciones, que provocan la sobreexpresión de la α -syn (Corti *et al.*, 2011).

La mutación más común, A53T, puede dar lugar a EP esporádica o a EP familiar (Corti *et al.*, 2011). Estudios en ratones transgénicos demostraron que esta mutación es capaz de inhibir la autofagia en el cerebro, induciendo la formación de agregados de α -syn. Además, provoca fallos en el metabolismo mitocondrial y en la vía de apoptosis mediada por el estrés del retículo endoplasmático (Zeng *et al.*, 2018).

La sobreexpresión de *SNCA* provoca fallos en el sistema de degradación del proteasoma, lo que, a su vez, incrementa la formación de agregados de α -syn. Esta proteína se une a los receptores TrkB e inhibe la vía de señalización BDNF/TrkB que protege a las ND del daño causado por las neurotoxinas (Zeng *et al.*, 2018).

- Quinasa con repeticiones ricas en leucina 2: *LRRK2*

Se trata del gen que codifica la quinasa con repeticiones ricas en leucina 2 (*LRRK2*), una gran proteína con múltiples dominios. Destacan el dominio Rab GTPasa y el dominio quinasa (Corti *et al.*, 2011). Está implicada en la dinámica del citoesqueleto, el transporte vesicular, la autofagia y en la interacción proteína-proteína (Selvaraj and Piramanayagam, 2019). Se cree que *LRRK2* fosforila de forma específica a la α -syn en residuo S129 (Pang *et al.*, 2019).

Mutaciones en *LRRK2* están asociadas a la EP esporádica y también son responsables de un 40% de los casos de EP familiar. Provocan defectos en la sinapsis, como una reducción de la endocitosis de las vesículas y una alteración de la liberación, consumo y señalización de la dopamina. Estas mutaciones reducen la actividad lisosomal y la eliminación de los agregados de α -syn mediante autofagia mediada por chaperonas (Pang *et al.*, 2019) y aumenta la fosforilación de la α -syn, promoviendo su plegamiento incorrecto. Asimismo, se unen a la proteína similar a Dynamin-1 (*DLP1*) que regula la fisión mitocondrial, aumentando la concentración de *DLP1* en las mitocondrias, lo que causa toxicidad neuronal y disfunción mitocondrial (Zeng *et al.*, 2018).

- Clasificación de proteínas vacuolares 35: *VPS35*

Es el gen que codifica la proteína de clasificación de proteínas vacuolares 35 (*VPS35*) que regula el proceso de clasificación de proteínas transmembrana entre los endosomas y el aparato de Golgi. La mutación D620N provoca la disminución de la actividad de los complejos mitocondriales I y II, lo que reduce la producción de ATP y resulta en la degeneración de las ND. Asimismo, esta mutación impide que *VPS35* induzca la transferencia desde el endosoma

al aparato de Golgi de la proteína de membrana asociada a lisosomas 2 (LAMP2A), lo que reduce los niveles de degradación de la α -syn mediante autofagia (Zeng *et al.*, 2018).

- Glucocerebrosidasa: *GBA1*

El gen *GBA1* codifica la glucocerebrosidasa 1, una enzima que convierte el glucolípido glucocerebrosido en ceramida y glucosa en los lisosomas. Las mutaciones en este gen son frecuentes, se encuentran en un 10-25% de los pacientes de EP, siendo L444P y N370S las más comunes. La inactivación de *GBA1* inhibe la autofagia, promoviendo el aumento de los niveles de α -syn. Además, la mutación N370S bloquea el transporte de la glucocerebrosidasa 1 desde el retículo endoplasmático a los lisosomas, generando estrés del retículo endoplasmático y la fragmentación del aparato de Golgi (Zeng *et al.*, 2018).

- Quinasa inducida por PTEN1: *PINK1*

El gen quinasa inducida por PTEN 1 (*PINK1*) codifica una proteína quinasa mitocondrial que participa en la eliminación de las mitocondrias disfuncionales (Selvaraj and Piramanayagam, 2019). El gen *PINK1* mutado provoca la desregulación de los niveles de Ca^{+2} mitocondrial y la acumulación de mitocondrias disfuncionales (Zeng *et al.*, 2018).

- Ligasa de la proteína ubiquitina E3 RBR parkin: *PRKN*

El gen *PRKN* codifica una ubiquitina E3 ligasa que puede ser activada por PINK1 y es necesaria para el sistema de degradación ubiquitina-proteasoma. Mutaciones en este gen están presentes en un 10-25% de los casos de EP familiar (Zeng *et al.*, 2018).

- Deglicasa asociada al parkinsonismo: *PARK7*

El gen *PARK7* expresa la proteína DJ-1. Mutaciones en este gen incrementan la sensibilidad de las células al estrés oxidativo, dado que inhiben el efecto neuroprotector contra las especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que resulta en la degeneración de las ND (Zeng *et al.*, 2018).

Todas estas mutaciones desencadenan patologías semejantes, como las descritas anteriormente. Además, en la mayoría de casos las mutaciones no causan la enfermedad por sí solas, sino que están implicados otros factores como el envejecimiento y el ambiente (Pang *et al.*, 2019).

3. Tratamientos de la Enfermedad de Parkinson

Actualmente no se dispone de una cura de la EP, tan sólo existen tratamientos para aliviar los principales síntomas. Para tratar los síntomas motores el método más empleado es la farmacoterapia, que se centra en restaurar los niveles normales de dopamina con el propósito

de mejorar los síntomas motores asociados a la escasez de esta molécula (Armstrong and Okun, 2020).

Para ello existen numerosos fármacos, entre ellos el más efectivo es la levodopa combinada con carbidopa. La levodopa se trata del precursor de la dopamina L-DOPA que es metabolizado en las ND y da lugar a la dopamina. La carbidopa es un inhibidor de la descarboxilasa periférica que evita que la levodopa sea convertida en dopamina antes de llegar al cerebro, incrementando la eficacia de la levodopa y reduciendo los efectos secundarios que conlleva el tratamiento con este medicamento. Otro tipo de fármacos muy empleados son los agonistas de la dopamina, que imitan la función de esta molécula activando los receptores dopaminérgicos y favorecen el efecto de la levodopa (Armstrong and Okun, 2020).

Sin embargo, el tratamiento continuado con uno o varios fármacos produce efectos secundarios perjudiciales debido al depósito de dopamina en regiones fuera de la diana terapéutica, variaciones en su absorción y tránsito por la barrera hematoencefálica y el efecto sobre los receptores dopaminérgicos (Stoker and Barker, 2020). Los efectos secundarios más comunes son discinesias, alucinaciones y el fenómeno conocido como “desaparición”, que se trata de la pérdida del efecto del fármaco y, en consecuencia, el empeoramiento de los síntomas antes de la siguiente dosis (Cacabelos, 2017).

Es por este motivo por el que se han desarrollado terapias más avanzadas como la estimulación cerebral profunda, que se trata de una intervención quirúrgica en la que se colocan unos cables unilaterales o bilaterales en la región del núcleo subtalámico o en la del globo pálido y se conectan a una batería en el pecho, similar a un marcapasos. Este tratamiento contrarresta los efectos de la “desaparición” (Armstrong and Okun, 2020). Sin embargo, existe el riesgo de que el paciente sufra una hemorragia intracraneal, una parálisis o dificultades en el habla provocadas por un error en la cirugía (Chen *et al.*, 2020).

Por ello, es de vital importancia la búsqueda de nuevos tratamientos que sean capaces de paliar los síntomas de la EP y frenar su progreso sin provocar ningún efecto secundario severo.

4. Modelos de estudio de la Enfermedad de Parkinson

El desarrollo de nuevas terapias para la EP requiere el conocimiento de los mecanismos patogénicos de la enfermedad y estudios en los que se prueben agentes químicos o terapias celulares que puedan tener un efecto beneficioso. Para ambos son necesarios los modelos de

estudio, ya que el uso de pacientes presenta ciertas limitaciones, como los diferentes efectos de la EP entre pacientes, una progresión lenta, complejidad de las técnicas y, obviamente, problemas éticos (Falkenburger *et al.*, 2016).

Los modelos actuales solo reproducen la enfermedad parcialmente, debido a que no se conoce en detalle la etiología de la EP esporádica y, por lo tanto, no es posible reproducirla completamente en un único modelo. Además, es necesario un modelo que desarrolle la EP de forma rápida y fiable, y que pueda ser analizado y manipulado fácilmente. Se han desarrollado tanto modelos *in vivo*, modelos animales, como *in vitro*, con células en cultivo, que reproducen determinados aspectos de la EP. El modelo de estudio se elige en base a la característica de la enfermedad que se quiera estudiar o del tipo de terapia que se quiera desarrollar (Falkenburger *et al.*, 2016).

4.1 Modelos *in vivo*

Los animales que se emplean normalmente como modelos de la EP se pueden clasificar en tres grupos: roedores, primates no humanos (PNH) y especies que no son mamíferos. Cada grupo presenta ciertas ventajas y desventajas que los hacen más apropiados como modelo para un tipo de estudio específico (Chia *et al.*, 2020).

Los roedores son los más empleados como modelos animales debido a que, por su tamaño, son fáciles de manejar y de cuidar en un laboratorio y a que se dispone de cepas de ratones transgénicos y de protocolos establecidos. Son buenos modelos de EP ya que en estos animales la degeneración de la vía nigroestriada está directamente relacionada con la aparición de los síntomas motores. Se pueden examinar estos síntomas de forma sencilla a través de pruebas físicas y los síntomas no motores mediante el análisis del comportamiento y actividad de los ratones (hambre, sed y sueño) (Sedelis *et al.*, 2001).

Los PNH son las especies más similares genética y fisiológicamente al ser humano, por lo que son un modelo muy representativo de los mecanismos patológicos que tienen lugar en la EP. Se inducen los síntomas mediante la inyección de una neurotoxina o de un vector viral que contiene genes mutados. Los PNH presentan síntomas similares a los humanos como la discinesia asociada al tratamiento con Levodopa, bradicinesia y rigidez muscular. Además, reproducen mejor que los roedores el patrón de sueño humano, por lo que son mejores modelos de estudio de los síntomas relacionados con el sueño y el comportamiento social. Sin embargo, son pocos los estudios que emplean estos animales debido a que conllevan un gran coste

económico y consideraciones éticas. Normalmente sólo se usan como modelos en los ensayos preclínicos (Emborg, 2007).

Fuera del grupo de los mamíferos, también se emplean como modelos animales otras especies como *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio* (pez cebra) y *Drosophila melanogaster* debido a que su comportamiento y neuropatología han sido muy estudiados, su ciclo de vida es corto, son fáciles de modificar genéticamente y el coste de su mantenimiento es reducido. Son especialmente útiles en estudios de fármacos a gran escala (Chia *et al.*, 2020).

C. elegans es una especie de nematodos que posee un sistema nervioso muy simple, pero que expresa genes ortólogos a los asociados a la EP en humanos como *PINK1* (*pink-1*), *PRKN* (*pdr-1*), *LRRK2* (*lrk-1*) y *PARK7* (*dnaj-1.1* y *dnaj-1.2*). La especie *D. rerio* es genéticamente similar a los humanos y presenta una región del cerebro homóloga a la sustancia negra denominada tubérculo posterior que está bien caracterizada. Al administrarle una neurotoxina, este animal muestra alteraciones de la función motora. Por último, *D. melanogaster* también es un buen modelo de estudio de la neurodegeneración en la EP ya que presenta una vía dopaminérgica similar a la humana (Chia *et al.*, 2020).

Como se ha mencionado anteriormente, en el desarrollo de la EP influyen el envejecimiento, factores genéticos y factores ambientales. Sin embargo, muy pocos modelos tienen en cuenta el envejecimiento como variable, posiblemente debido a la dificultad y el coste económico que supone mantener animales durante años (Pang *et al.*, 2019). Los modelos animales de EP más empleados se pueden clasificar en dos grupos, los modelos inducidos mediante la administración de una neurotoxina y los modelos inducidos mediante la mutación de un gen.

4.1.1 Modelos animales inducidos mediante una neurotoxina

- 6-hidroxidopamina: 6-OHDA

Fue descubierta en los años 50 y desde los años 70 ha sido empleada como neurotoxina para desarrollar tanto modelos *in vivo* como modelos *in vitro* de la EP (Rai and Singh, 2020). La 6-OHDA se introduce en el citoplasma de las ND a través de los transportadores dopaminérgicos donde se autooxida generando estrés oxidativo y, consecuentemente, causando la degeneración de la neurona. Se ha observado que la 6-OHDA interacciona con la α -syn, sin embargo, no induce la agregación de esta proteína ni genera cuerpos de Lewy. La 6-OHDA no es capaz de traspasar la barrera hematoencefálica por lo que es necesario inyectarla directamente en el cuerpo estriado. Normalmente se realiza una inyección unilateral, dado que la inyección

bilateral causa síntomas más graves y, en muchas ocasiones, la muerte del animal (Jackson-lewis *et al.*, 2012). La inyección unilateral provoca un comportamiento motor asimétrico, denominado Hemiparkinson (Rai and Singh, 2020).

Varios investigadores han conseguido reproducir los síntomas no motores de la EP como alteraciones emocionales y cognitivas en modelos animales empleando la 6-OHDA. La depresión, uno de los síntomas más comunes, es reproducida en modelos de rata inducidos mediante esta neurotoxina de forma muy similar a la humana. Además, causa estrés oxidativo y neurodegeneración en otros modelos animales como *D. rerio* y *C. elegans*, por lo que la 6-OHDA puede ser empleada en estudios a gran escala para generar un gran número de modelos de la EP (Rai and Singh, 2020).

- 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina: MPTP

La MPTP fue descubierta hace 30 años y actualmente es la neurotoxina más empleada para el desarrollo de modelos ya que es capaz de reproducir en animales la mayoría de los síntomas de la EP muy similares a los de los pacientes. La MPTP es una molécula lipofílica capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Como se mencionó anteriormente, el MPTP es convertido en el metabolito tóxico MPP⁺ en los astrocitos. Su estructura es similar a la de la dopamina, por lo que usa los transportadores de dopamina para introducirse en las ND y se acumula en las mitocondrias. Allí inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones causando estrés oxidativo y neurodegeneración (Rai and Singh, 2020). Por ello, esta neurotoxina es útil para el desarrollo de modelos animales para el estudio de la disfunción mitocondrial (Chia *et al.*, 2020).

Se ha demostrado que la MPTP es capaz de reproducir la mayoría de las patologías características de la EP en ratones, monos y otros mamíferos, pero no en ratas, ya que se ha descubierto que son resistentes a esta toxina. Algunos estudios consiguieron reproducir la formación de los cuerpos de Lewy en las ND empleando MPTP, aunque en condiciones y con dosis específicas (Jackson-lewis *et al.*, 2012).

- Paraquat

Paraquat es un herbicida con una estructura química similar a la de MPP⁺, pero no inhibe el complejo mitocondrial I, sino que bloquea los ciclos redox del glutatión y la tioredoxina que ejercen una función protectora contra el estrés oxidativo celular (Chia *et al.*, 2020). Esto genera alteraciones de la función motora, pero con menos eficiencia que MPTP. Es necesaria una dosis

alta de Paraquat, ya que varios estudios demostraron que a dosis bajas esta toxina no provoca ningún síntoma (Rai and Singh, 2020). Por otro lado, Paraquat sí induce el aumento de la concentración de α -syn y la formación de los cuerpos de Lewy en las ND, por lo que permite el estudio de esta patología (Jackson-lewis *et al.*, 2012).

En modelos de ratón, Paraquat produce una disminución significativa de las ND y de la dopamina en el cuerpo estriado y alteraciones progresivas del comportamiento neuronal. Además, presenta una vida media de 28 días en el cerebro de los ratones, por lo que puede ser empleado para generar modelos de EP crónica (Rai and Singh, 2020).

- Rotenona

La rotenona es un herbicida e insecticida que se encuentra de forma natural en algunas plantas. Como la MPTP, es lipofílica e inhibe el complejo mitocondrial I, pero su diana son las neuronas catecolaminérgicas (Chia *et al.*, 2020). Esta neurotoxina es capaz de replicar casi todas las patologías de la EP en animales, incluyendo la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la agregación de la α -syn y la formación de los cuerpos de Lewy, inflamación, alteraciones del comportamiento y problemas gastrointestinales (Jackson-lewis *et al.*, 2012). Sin embargo, los síntomas varían entre los modelos animales, por lo que presenta problemas de reproducibilidad. Esto limita el uso de la rotenona en la investigación (Raza *et al.*, 2019).

4.1.2 Modelos animales modificados genéticamente

- SNCA

Los primeros modelos transgénicos de la EP fueron ratones a los que se les sobreexpresó el gen humano *SNCA* en su forma silvestre o mutada. Se observó la formación progresiva de agregaciones proteicas en el hipocampo, la sustancia negra y en el neocórtex, pero no poseían la estructura fibrilar de los cuerpos de Lewy y no provocó la neurodegeneración de las ND de los ratones (Chia *et al.*, 2020).

Sin embargo, la sobreexpresión de *SNCA* empleando un vector de virus adenoasociado con un promotor neuroespecífico sí causó las patologías características de la EP, incluyendo la agregación de la α -syn y formación de los cuerpos de Lewy, pérdida de ND en la sustancia negra y alteraciones de la función motora. Paralelamente, la sobreexpresión de *SNCA* con la mutación A53T empleando un vector con un sistema de expresión inducible *Tet-On* y con un promotor específico para las ND, resultó en la aparición de síntomas de EP familiar entre los

que se incluye la disfunción mitocondrial que provocó la pérdida de ND. Por ello, los modelos de ratones transgénicos constituyen una herramienta importante en la investigación de sinucleopatías (Raza *et al.*, 2019).

- *LRRK2*

La transfección del gen *LRRK2* humano con la mutación G2019S en ratones empleando vectores virales como el del virus del herpes simple y de adenovirus provoca la degeneración de parte de las ND de la sustancia negra y la formación de agregados de α -syn (Konnova and Swanberg, 2018).

Por otro lado, la sobreexpresión de *LRRK2* en *Drosophila* y en *C. elegans* resulta en la pérdida de ND y de actividad motora. Sin embargo, estas especies no expresan α -syn, por lo que no pueden replicar la formación de agregados de esta proteína. Estos modelos son útiles únicamente para la búsqueda de terapias génicas o fármacos que detengan el proceso neurodegenerativo inducido por *LRRK2*, que posteriormente deben ser validados en especies más próximas a la humana (Dawson *et al.*, 2010).

- *PINK1* y *PRKN*

La inactivación del gen (“knockout”, KO) homólogo a *PINK1*, Pink-1, o del gen homólogo a *PRKN*, park, en *Drosophila* provoca la alteración de la morfología de las mitocondrias y la reducción de los niveles de ATP, de ADN y de proteínas mitocondriales. Esta degeneración de las mitocondrias resulta en la apoptosis de los músculos necesarios para volar, por lo que las moscas muestran alteraciones en el vuelo. Además, se observa una pequeña pero significativa disminución del número de ND. Sin embargo, los ratones *Pink1* KO o *Prkn* KO no muestran ninguna alteración sustancial, tan sólo déficits en la neurotransmisión de las ND y leves fallos mitocondriales que no inducen el fenotipo de la EP (Dawson *et al.*, 2010).

En cambio, la sobreexpresión del gen humano *PRKN* mutado tanto en *Drosophila* como en ratones provoca fallos en la función motora asociados con la degeneración progresiva de las ND (Dawson *et al.*, 2010; Raza *et al.*, 2019).

- *PARK7*

La reducción de la expresión del genes ortólogos a *PARK7*, DJ-1 α y dj-1 β , específicamente en las ND de *Drosophila* mediante un iARN transgénico provoca la degeneración de las ND asociada a la edad (Dawson *et al.*, 2010). De forma similar, ratones *Park7* KO presentan una

pérdida progresiva de ND en la sustancia negra y una leve disfunción motora a medida que envejecen. Estos modelos de ratones son especialmente sensibles a neurotoxinas como MPTP o rotenona. Por ello, podría ser un modelo de predicción en los estudios preclínicos para investigar la patología de la EP en las etapas tempranas (Raza *et al.*, 2019).

4.1.3 Ventajas y desventajas de los modelos *in vivo*

Tabla 2: Ventajas y desventajas de los modelos animales inducidos mediante una neurotoxina y los modificados genéticamente.

	Ventajas	Desventajas
Modelos animales inducidos mediante una neurotoxina	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reproducen la mayoría de los procesos patológicos que tienen lugar en la EP. ▪ Logran reproducir algunos de los síntomas de la EP humanos. ▪ Se obtienen de forma más simple y económica que los modelos modificados genéticamente. ▪ Se pueden emplear en estudios a gran escala. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La 6-OHDA no induce la formación de agregados de α-syn y la MPTP sólo en condiciones específicas. ▪ Las neurotoxinas pueden provocar efectos no asociados a la EP. ▪ Requieren mucho más tiempo y dinero que los modelos celulares. ▪ Conllevan problemas éticos. ▪ Problemas de reproducibilidad.
Modelos animales modificados genéticamente	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aseguran que las alteraciones observadas son las que se producen “naturalmente” en la EP familiar. ▪ Los modelos de SNCA son importantes para el estudio de la agregación de la α-syn. ▪ Reproducibles. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La mayoría de los modelos no consiguen reproducir el fenotipo de la EP, o tan sólo un aspecto específico. ▪ Se obtienen empleando técnicas más complejas y costosas que los modelos por neurotoxina. ▪ Los casos de EP debidos a factores genéticos son sólo un 5-10%. ▪ Conllevan problemas éticos.

4.2 Modelos *in vitro*

Es muy difícil estudiar detalladamente los mecanismos moleculares y celulares que engloba la EP *in vivo*, dada la heterogeneidad y complejidad del cerebro. Por ello, es necesario desarrollar modelos *in vitro* que recapitulen las características celulares y moleculares de la EP para comprender en profundidad los mecanismos patológicos de esta enfermedad y para buscar posibles dianas terapéuticas (Raza *et al.*, 2019)

Los modelos *in vitro* más empleados son cultivos celulares en dos dimensiones (2D), aunque en los últimos años han ido cobrando más protagonismo los modelos en tres dimensiones (3D) (Rai and Singh, 2020).

4.2.1 Modelos *in vitro* en 2D

En los cultivos celulares adherentes en 2D las células crecen en monocapa, adheridas a la superficie de plástico de recipientes de cultivo celular. Los modelos celulares en 2D reproducen las dos principales alteraciones características de la EP: la pérdida de ND en la sustancia negra y la formación de agregados de α -syn (Falkenburger *et al.*, 2016).

- Modelos de degeneración de las ND

Los cultivos de neuronas primarias se asemejan más a las condiciones *in vivo* ya que las ND interaccionan con otro tipo de neuronas y otras células no-neuronales como las gliales, lo que es muy importante para el desarrollo de determinadas patologías de la EP, como la neuroinflamación. Es frecuente el empleo de neuronas primarias procedentes del mesencéfalo embrionario o postnatal temprano, normalmente de rata o ratón. Sin embargo, se trata de una mezcla de neuronas de diferentes tipos, de los cuales sólo un 5-10% son ND y no pueden mantenerse indefinidamente en cultivo (Falkenburger *et al.*, 2016).

Por ello se han generado modelos a partir de líneas celulares inmortales. Las neuronas que se obtienen en estos modelos son monocultivos de ND y pueden ser generadas a mayor escala. Las líneas celulares más empleadas para el estudio de la EP en el pasado y que aún se siguen usando son las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y las de feocromocitoma (tumor en las glándulas suprarrenales) de rata PC12. Llevando a cabo protocolos específicos de diferenciación celular se pueden obtener células que presentan un comportamiento similar al de las neuronas (“neuron-like cells”) (Rai and Singh, 2020).

Las células SH-SY5Y (Figura 8) presentan características morfológicas y bioquímicas comparables con neuronas y han sido ampliamente empleadas como modelo de estudio de enfermedades neurodegenerativas como la EP, ya que los análisis ómicos de estas células han revelado que la mayoría de las redes de señalización asociadas a la enfermedad se mantienen intactas (Krishna *et al.*, 2014). En estas células la introducción de modificaciones en los genes asociados a la EP permite reproducir algunas de las patologías de la EP. Por ejemplo, la cotransfección de *SNCA* y *LRRK2* mutados induce la agregación de la α -syn y estrés del retículo endoplasmático y la mutación de *PINK1* resulta en disfunción mitocondrial y aumento de ROS, que eventualmente dan lugar a la degeneración de las ND. Asimismo, la administración de neurotoxinas como MPTP o 6-OHDA consigue recrear determinadas patologías, como la disfunción mitocondrial y la generación de estrés oxidativo (Alberio *et al.*, 2012)

El empleo de estas células se debe a que se pueden mantener indefinidamente en cultivo, a diferencia de las neuronas primarias, pero el proceso de diferenciación puede ser difícil y, en ocasiones, incompleto. Estos modelos son especialmente útiles para estudios farmacológicos y estudios en los que son necesarias modificaciones genéticas mediante transducción viral o integración estable de vectores de expresión (Falkenburger *et al.*, 2016).

Las células mesencefálicas humanas de Lund (LUHMES) son otra de las líneas celulares inmortalizadas más empleadas actualmente. Se generaron mediante subclonación de la línea celular MESC2.10, que procede de un tejido mesencefálico ventral de un embrión humano de ocho semanas transfectado con un vector inducible *Tet-Off* que expresa el oncogen *MYC* bajo el control de tetraciclina. En ausencia de este agente, el gen *MYC* se expresa e induce la proliferación celular. Cuando se añade la tetraciclina, la expresión de *MYC* es inhibida y las células se diferencian a neuronas que no se dividen (Falkenburger *et al.*, 2016). La línea celular LUHMES presenta un fenotipo de ND más estables que las células MESC2.10. Las células LUHMES diferenciadas desarrollan procesos neuronales largos, características eléctricas y marcadores neuronales similares a las de las ND. Otras líneas celulares muy similares a LUHMES son las células progenitoras neuronales inmortalizadas de rata CSM14.1 y las células progenitoras neuronales inmortalizadas de ratón MN9D (Rai and Singh, 2020).

- Modelos de agregación de la α -syn

Pocas líneas celulares son capaces de formar agregados proteicos mediante la sobreexpresión de α -syn. Posiblemente está relacionado con el hecho de que la EP es progresiva y en la mayoría de los casos se desarrolla en varios años y que están implicados múltiples factores. Esto supone un gran impedimento a la hora de crear modelos celulares, ya que las neuronas pueden mantenerse en cultivo durante un máximo de 1 o 2 semanas (Falkenburger *et al.*, 2016).

Por ello, para generar agregados de α -syn es necesario un nivel de expresión de *SNCA* muy alto. En la línea celular HEK293 se puede conseguir mediante la transfección transitoria de vectores que contienen un promotor fuerte de citomegalovirus, que induce la expresión de grandes cantidades de α -syn (Falkenburger *et al.*, 2016).

De la misma forma, las neuronas primarias también se transfectan con vectores virales que contienen promotores fuertes dirigiendo la expresión de *SNCA*. Normalmente se emplea el gen con la mutación A53T para que la proteína mutada sea más propensa a formar agregados intracelulares. Otro método consiste en provocar estrés oxidativo y disfunción mitocondrial empleando hierro, induciendo el plegamiento incorrecto de la α -syn. Por último, el tratamiento

con MG132, un péptido sintético que inhibe el proteasoma, también puede inducir la formación de agregados de α -syn. Sin embargo, este no es un buen modelo de la EP ya que la inhibición del proteasoma puede provocar otras alteraciones no relacionadas con la enfermedad (Falkenburger *et al.*, 2016).

- Modelos generados a partir de células troncales

En los últimos años, las células troncales también han sido empleadas como modelos *in vitro* de la EP. Estas células poseen la capacidad de diferenciarse a otros tipos celulares y de dividirse indefinidamente. Pueden ser diferenciadas a ND que, posteriormente, podrán ser usadas en terapias neuroregenerativas y/o para generar sistemas de cribado para la búsqueda y estudio de fármacos contra el Parkinson. Las células troncales más usadas actualmente son las células troncales embrionarias (ESCs) y las células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs)(Figura 8) (Rai and Singh, 2020).

Las ESCs proceden del blastocisto embrionario antes de ser implantado, un conjunto de células que forman una estructura esférica que contiene una capa externa celular denominada trofoblasto, que da lugar a la placenta, al corion y al cordón umbilical, y la masa celular interna (IMC), de la cual derivan las ESCs. Las células de la IMC poseen la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo celular (pluripotencia), forman todos los tejidos corporales y dan lugar al embrión. Estas células pluripotentes existen *in vivo* de forma transitoria, pero pueden ser expandidas indefinidamente en cultivo en un estado indiferenciado. Las ESCs pueden ser diferenciadas a células procedentes de cualquiera de las tres capas germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo. Sin embargo, la investigación con ESCs humanas conlleva consideraciones éticas y políticas, lo que limita su uso como modelos celulares (Vazin and Freed, 2010).

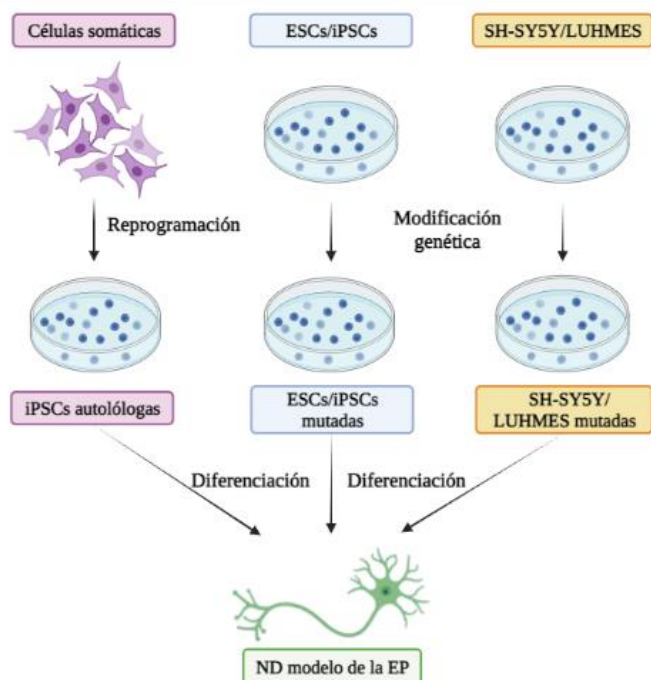


Figura 8: Esquema del proceso de generación de modelos celulares de la EP: iPSCs autólogas, ESCs/iPSCs mutadas y SH-SY5Y/LUHMES mutadas diferenciadas a neuronas dopaminérgicas (ND) que presentan el fenotipo de la EP.

Por otro lado, las iPSCs pueden proceder de células somáticas de un paciente o de un individuo sano. Estas células diferenciadas son sometidas a un proceso de reprogramación, por el cual recobran las características de células embrionarias troncales pluripotentes mediante la eliminación de sus marcas epigenéticas, como la metilación del ADN, y la adquisición de otras nuevas. La reprogramación celular puede ser inducida mediante la transfección y sobreexpresión de cuatro factores de transcripción: Oct3/4, c-myc, Sox2 y Klf4. Estos factores reactivan los genes endógenos que codifican los marcadores de pluripotencia de la célula Oct4, Sox 2 y Nanog, y las vías de señalización que mantienen la pluripotencia independientemente de los factores transgénicos (Takahashi and Yamanaka, 2006). Las iPSCs presentan una morfología, un perfil de expresión genético y un potencial de diferenciación semejantes a los de las ESCs humanas (hESCs) (Rai and Singh, 2020).

Se han diseñado diversos protocolos para diferenciar tanto las ESCs como las iPSCs a ND. En general, inicialmente las células son dirigidas hacia un destino celular neuroectodérmico mediante la inhibición de la proteína SMAD presente en las vías de la proteína morfogénica ósea (BMP) y del factor de crecimiento transformante beta (TGF β). También se modifican las vías de erizo Sonic (SHH), del factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8) y Wnt para dirigir la diferenciación celular hacia la generación de progenitores mesencefálicos que, más tarde, darán lugar a ND. Posteriormente, la adición de factores neurotróficos como el BDNF, el factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF) y Ácido Ascórbico permite que las células maduren, induciendo la expresión de factores de transcripción encargados de desencadenar la especificación y diferenciación de estas células progenitoras a ND mesencefálicas funcionales, que expresan el homeobox pituitario 3 (PITX3), el receptor nuclear asociado 1 (NURR1) y la TH, los principales marcadores de identidad de las ND (Galet *et al.*, 2020).

La ventaja que poseen las iPSCs humanas (hiPSCs) es que, al proceder de células somáticas, su empleo como modelo de la EP no supone ningún problema ético, a diferencia de las ESCs. Además, pueden ser obtenidas directamente de pacientes de EP con mutaciones genéticas, lo que las convierte en excelentes modelos de esta enfermedad. Por ello, los estudios que emplean iPSCs derivadas de pacientes han sido de gran utilidad para estudiar los mecanismos moleculares de la EP y para identificar posibles dianas terapéuticas (Rai and Singh, 2020).

4.2.2 Modelos *in vitro* en 3D

A pesar de que los modelos celulares en 2D han sido una herramienta importante para el estudio de diversas enfermedades neurodegenerativas, estos no logran reproducir ciertos aspectos

relevantes del cerebro humano, como las interacciones célula-célula o la citoarquitectura de las mismas, ambas fundamentales para predecir el efecto y la eficacia de un compuesto químico o terapia contra una enfermedad como la EP. En las últimas décadas se ha logrado el desarrollo de un nuevo tipo de cultivo celular en 3D que se asemeja a las condiciones *in vivo*, denominados organoides, obtenidos gracias al avance en la investigación de las células troncales. Estas células poseen la capacidad de autoorganizarse, ensamblarse y diferenciarse formando estructuras específicas, similares a nivel molecular, celular y fisiológico a las de un órgano *in vivo* (Smits and Schwamborn, 2020).

En 2014, Tieng y su grupo de investigadores fueron los primeros en adaptar un protocolo de diferenciación de cultivos en 2D a un cultivo en 3D en suspensión para crear cuerpos embrionarios de tamaños similares que, tras crecer en un agitador orbital durante tres semanas, son transferidos y cultivados en una interfase aire-líquido. Demostraron que este método es capaz de generar ND progenitoras y algunas ND diferenciadas después de tres semanas (Tieng *et al.*, 2014). Durante el siguiente año, se publicaron otros tres protocolos que describen la generación y el cultivo de organoides de mesencéfalo (Figura 9) hasta cinco meses. Todos estos protocolos tienen en común el uso de morfógenos para inducir la diferenciación y el empleo de agitadores orbitales y, en algunos casos, hidrogeles para promover la orientación apico-basal y la proliferación de las células (Galet *et al.*, 2020).

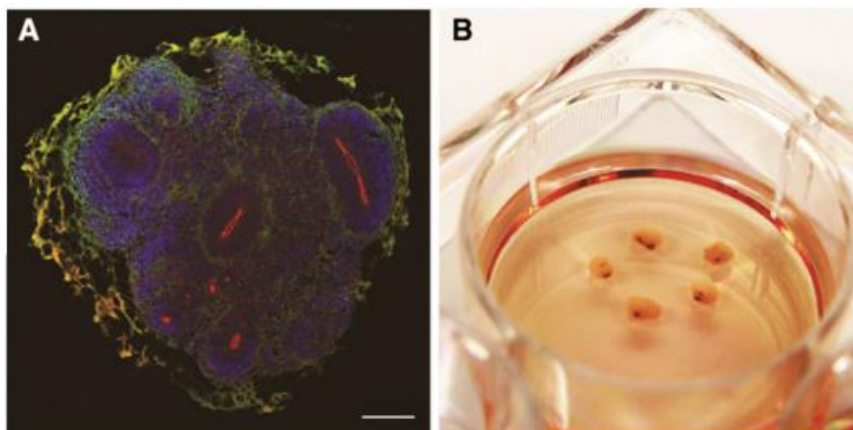


Figura 9: (A) Imagen al microscopio de fluorescencia de un modelo de organoide de mesencéfalo humano en desarrollo (35 días). El lado apical está marcado por la tinción en rojo de Proteína Quinasa Atípica C (aPKC) y el lado basal, con abundantes células neuronales, por la tinción en verde de la Proteína Asociada a Microtúbulos 2 (MAP2). Escala: 500 μm . (B) Imagen de un cultivo a largo plazo de organoides de mesencéfalo humanos. Se pueden observar unas zonas negras que se tratan de acumulaciones de neuromelanina (Sun *et al.*, 2018).

Los primeros dos estudios con organoides de mesencéfalo como modelos de la EP investigaron los efectos de la mutación del gen *LRRK2* G2019S. En el primero, Kim *et al.* emplearon la técnica de edición genética CRISPR-Cas9 para introducir la mutación en una línea de iPSCs humanas control (donantes sanos) (Kim *et al.*, 2019) y en el segundo, Smit *et al.* usaron iPSCs

derivadas de pacientes que presentaban dicha mutación (Smits *et al.*, 2019). En ambos estudios observaron una disminución del nivel de marcadores moleculares propios de las ND, como la TH y el transportador de dopamina, además de un aumento de la actividad de las caspasas. Estos hechos les sugirieron que lo observado reflejaba la pérdida de neuronas y propusieron que la mutación *LRRK2* G2019S induce la muerte de las ND. Asimismo, Kim *et al.* encontraron una elevada concentración de α -syn fosforilada, un marcador de la formación de agregados de esta proteína.

En un estudio más reciente, se investigaron los efectos causados por las mutaciones de los genes *PRKN* y *PARK7* introduciendo las mutaciones mediante técnicas de edición genética en una línea de iPSCs control. En los organoides formados por células que presentaban el gen *PRKN* mutado se observó una desregulación de la autofagia, un incremento del estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y una reducción del número de ND. Aquellos que presentaban la mutación de *PARK7* mostraron un incremento de ROS mitocondriales (Ahfeldt *et al.*, 2020).

Los resultados de todos estos estudios demostraron que los organoides de mesencéfalo humano son un buen modelo celular para estudiar los efectos de diversas mutaciones genéticas asociadas a la EP, especialmente a la EP familiar. Sin embargo, este tipo de cultivo en 3D también puede ser de gran utilidad para el estudio de la EP esporádica, teniendo en cuenta los factores ambientales (Galet *et al.*, 2020). Tan sólo se ha llevado a cabo un estudio en el que se obtuvieron iPSCs derivadas de pacientes de EP esporádica y se generaron organoides de mesencéfalo. Se observó la reducción del número de ND tras un mes de cultivo (Chlebanowska *et al.*, 2020). La EP esporádica también puede ser estudiada mediante la administración de neurotoxinas como la rotenona o MPTP (Galet *et al.*, 2020).

Así, se puede decir que los organoides humanos sirven para el estudio de procesos biológicos complejos, como es el desarrollo del cerebro humano, proporcionando un contexto fisiológico importante, como las interacciones entre neuronas y células de la glía en un entorno organizado espacialmente. Por todo ello, poseen un gran potencial como modelos de enfermedades neurológicas. (Smits and Schwamborn, 2020).

Sin embargo, el empleo de organoides como modelos celulares presenta ciertas limitaciones. Por ejemplo, son muy variables, debido posiblemente a las diferencias en los antecedentes genéticos de las líneas celulares de hiPSCs y a las variaciones en los protocolos y en los cultivos empleados. Esto limita en gran medida la reproducibilidad de los experimentos. Asimismo, estos modelos no tienen en cuenta el mayor factor de riesgo de la EP, el envejecimiento. Se

debe a que los organoides de mesencéfalo se generan a partir de células reprogramadas, lo que provoca el “rejuvenecimiento” de las mismas. Se han investigado diversas soluciones, por ejemplo, un estudio ha demostrado que acortar la longitud de los telómeros mediante la inhibición de la telomerasa provoca un aumento del estrés oxidativo y del ADN dañado asociados al envejecimiento en cultivos de iPSCs en 2D (Vera *et al.*, 2016). Otra posible solución es sobreexpresar la proteína progerina (responsable del envejecimiento prematuro en la enfermedad de Progeria), con la que se han obtenido resultados similares (Galet *et al.*, 2020).

4.2.3 Ventajas y desventajas de los modelos *in vitro*

Tabla 3: Ventajas y desventajas de los modelos celulares en 2D y los modelos celulares en 3D.

	Ventajas	Desventajas
Modelos en 2D	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Permiten el estudio en profundidad de los mecanismos patológicos de la EP. ▪ Desarrollan la enfermedad más rápido que los modelos animales. ▪ Menor coste. ▪ Más fáciles de monitorizar y manipular. ▪ Permiten estudios a mayor escala en un tiempo más corto. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ No recrean las interacciones con otros tipos celulares ni la citoarquitectura. ▪ Los resultados necesitan ser validados en modelos animales.
Modelos en 3D	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Permiten el estudio de procesos biológicos complejos. ▪ Recrean la morfología y la fisiología del mesencéfalo <i>in vivo</i>. ▪ Pueden ser generados a partir de células del paciente. ▪ No conllevan problemas éticos. ▪ En un futuro servirán como sustituto de los modelos animales. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ El proceso de reprogramación y diferenciación es complejo. ▪ Su mantenimiento es costoso. ▪ Alta variabilidad. ▪ No recrean el envejecimiento.

CONCLUSIONES

La EP supone un gran problema sanitario y económico que afecta a más de 6 millones de personas en todo el mundo y cada año esta cifra sigue aumentando exponencialmente. A pesar las numerosas investigaciones acerca de esta enfermedad, no se ha descubierto la forma de curarla, tan sólo de paliar sus síntomas. Esto se debe posiblemente a que la red de mecanismos causantes de la patología es muy compleja y todavía bastante desconocida, por lo que es extremadamente difícil identificar una única diana terapéutica que sea responsable de la neurodegeneración de las ND.

Los modelos de estudio de la EP, tanto animales como celulares, han posibilitado el descubrimiento de mutaciones en diversos genes que están asociados a disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, fallos en los sistemas de degradación, estrés en el retículo endoplasmático y neuroinflamación. Sin embargo, los casos de EP familiar son muy pocos en comparación con los de EP esporádica, por lo que otros factores como el envejecimiento y el ambiente juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Se sabe que el envejecimiento conlleva la pérdida de ND, fallos en el metabolismo mitocondrial y en la autofagia y generación de ROS. Por otro lado, las neurotoxinas pueden desregular la expresión de determinados genes y la mutación de estos genes puede agravar el efecto de la neurotoxina. Es necesario investigar en profundidad los papeles que desempeñan estos factores y la relación que existe entre ellos.

Para llevar a cabo esta investigación y la búsqueda de un tratamiento capaz de curar la EP, es imprescindible la generación de nuevos modelos de estudio que recapitulen las patologías características de esta enfermedad. Si bien los modelos tradicionales animales y celulares en 2D han sido y son una herramienta fundamental para el estudio de la base genética y los mecanismos patológicos causantes de la EP, los modelos celulares en 3D desarrollados en los últimos años podrían marcar el futuro de la investigación de este trastorno.

Los organoides de mesencéfalo derivados de iPSCs poseen un gran potencial como modelos de la EP, ya que pueden generarse a partir de las propias células somáticas del paciente. De esta forma se consigue recrear la patología de cada persona de forma muy similar a las condiciones *in vivo*, estudiar y tratar cada caso de forma personalizada y analizar las diferencias que presenta este trastorno en distintos pacientes. En un futuro, los organoides de mesencéfalo podrán ser de gran utilidad como método fiable de diagnóstico de la enfermedad antes de que aparezcan los síntomas, e incluso podrían predecir el desarrollo de la misma. Asimismo, dada la similitud fisiológica entre el organoide y el mesencéfalo humano, podrían ser usados en ensayos preclínicos con nuevos fármacos o terapias, facilitando el descubrimiento de un tratamiento efectivo contra la EP sin efectos secundarios graves.

REFERENCIAS

- Ahfeldt, T., Ordureau, A., Bell, C., Sarrafha, L., Sun, C., Piccinotti, S., Grass, T., Parfitt, G. M., Paulo, J. A., Yanagawa, F., Uozumi, T., Kiyota, Y., Harper, J. W. and Rubin, L. L. (2020) "Pathogenic Pathways in Early-Onset Autosomal Recessive Parkinson's Disease Discovered Using Isogenic Human Dopaminergic Neurons", *Stem Cell Reports*. Elsevier Company., 14(1), pp. 75–90. doi:10.1016/j.stemcr.2019.12.005.
- Alberio, T., Lopiano, L. and Fasano, M. (2012) "Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease", *FEBS Journal*, 279(7), pp. 1146–1155. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08516.x.

- Armstrong, M. J. and Okun, M. S. (2020) "Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review", *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(6), pp. 548–560. doi:10.1001/jama.2019.22360.
- Cacabelos, R. (2017) "Parkinson's disease: From pathogenesis to pharmacogenomics", *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). doi:10.3390/ijms18030551.
- Chen, Y., Shen, J., Ke, K. and Gu, X. (2020) "Clinical potential and current progress of mesenchymal stem cells for Parkinson's disease: a systematic review", *Neurological Sciences*. *Neurological Sciences*, 41(5), pp. 1051–1061. doi:10.1007/s10072-020-04240-9.
- Chia, S. J., Tan, E. K. and Chao, Y. X. (2020) "Historical perspective: Models of Parkinson's disease", *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), pp. 1–14. doi:10.3390/ijms21072464.
- Chinta, S. J. and Andersen, J. K. (2005) "Dopaminergic neurons", *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(5 SPEC. ISS.), pp. 942–946. doi:10.1016/j.biocel.2004.09.009.
- Chlebanowska, P., Tejchman, A., Sułkowski, M., Skrzypek, K. and Majka, M. (2020) "Use of 3D organoids as a model to study idiopathic form of parkinson's disease", *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). doi:10.3390/ijms21030694.
- Corti, O., Lesage, S. and Brice, A. (2011) "What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease", *Physiological Reviews*, 91(4), pp. 1161–1218. doi:10.1152/physrev.00022.2010.
- Dawson, T. M., Ko, H. S. and Dawson, V. L. (2010) "Genetic Animal Models of Parkinson's Disease", *Neuron*. Elsevier Inc., 66(5), pp. 646–661. doi:10.1016/j.neuron.2010.04.034.
- Egesten, A. and Herwald, H. (2021) "Modelers Modelling Models", pp. 61–62. doi:10.1159/000515202.
- Emborg, M. E. (2007) "Nonhuman primate models of Parkinson's disease", *ILAR Journal*. doi:10.1093/ilar.48.4.339.
- Falkenburger, B. H., Saridaki, T. and Dinter, E. (2016) "Cellular models for Parkinson's disease", *Journal of Neurochemistry*, pp. 121–130. doi:10.1111/jnc.13618.
- Galet, B., Cheval, H. and Ravassard, P. (2020) "Patient-Derived Midbrain Organoids to Explore the Molecular Basis of Parkinson's Disease", *Frontiers in Neurology*, 11(September). doi:10.3389/fneur.2020.01005.
- García-Ramos, R., López Valdés, E., Ballesteros, L., Jesús, S. and Mir, P. (2016) "The social impact of Parkinson's disease in Spain: Report by the Spanish Foundation for the Brain", *Neurologia*. SEGO, 31(6), pp. 401–413. doi:10.1016/j.nrl.2013.04.008.
- Jackson-lewis, V., Blesa, J. and Przedborski, S. (2012) "Parkinsonism and Related Disorders Animal models of Parkinson ' s disease", *Parkinsonism and related Disorders*. Elsevier Ltd, 18, pp. S183–S185. doi:10.1016/S1353-8020(11)70057-8.
- Jin, W. (2020) "Regulation of bdnf-trkb signaling and potential therapeutic strategies for parkinson's disease", *Journal of Clinical Medicine*. doi:10.3390/jcm9010257.
- Kim, H., Park, H. J., Choi, H., Chang, Y., Park, H., Shin, J., Kim, Junyeop, Lengner, C. J., Lee, Y. K. and Kim, Jongpil (2019) "Modeling G2019S-LRRK2 Sporadic Parkinson's Disease in 3D Midbrain Organoids", *Stem Cell Reports*. ElsevierCompany., 12(3), pp. 518–531. doi:10.1016/j.stemcr.2019.01.020.
- Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C. and Correa, R. G. (2019) "Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases", *Cellular and Molecular Neurobiology*. Springer US, 39(1), pp. 31–59. doi:10.1007/s10571-018-0632-3.
- Konnova, E. A. and Swanberg, M. (2018) "Animal models of Parkinson ' s disease Animal models of Parkinson ' s disease", *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*, pp. 83–106.
- Lindestam Arlehamn, C. S., Dhanwani, R., Pham, J., Kuan, R., Frazier, A., Rezende Dutra, J., Phillips, E., Mallal, S., Roederer, M., Marder, K. S., Amara, A. W., Standaert, D. G., Goldman, J. G., Litvan, I., Peters, B., Sulzer, D. and Sette, A. (2020) "α-Synuclein-specific T cell reactivity is associated with preclinical and early Parkinson's disease", *Nature Communications*, 11(1). doi:10.1038/s41467-020-15626-w.
- Miraglia, F., Ricci, A., Rota, L. and Colla, E. (2018) "Subcellular localization of alpha-synuclein aggregates and their interaction with membranes", *Neural Regeneration Research*, 13(7), pp. 1136–1144. doi:10.4103/1673-5374.235013.
- Pang, S. Y. Y., Ho, P. W. L., Liu, H. F., Leung, C. T., Li, L., Chang, E. E. S., Ramsden, D. B. and Ho, S. L. (2019) "The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease", *Translational Neurodegeneration*. *Translational Neurodegeneration*, 8(1), pp. 1–11. doi:10.1186/s40035-019-0165-9.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A. E. and Lang, A. E. (2017) "Parkinson disease", *Nature Reviews Disease Primers*, 3, pp. 1–21. doi:10.1038/nrdp.2017.13.
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A. and Steeves, T. D. L. (2014) "The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis", *Movement Disorders*, 29(13), pp. 1583–1590. doi:10.1002/mds.25945.
- Pupyshv, A. B., Korolenko, T. A., Akopyan, A. A., Amstislavskaya, T. G. and Tikhonova, M. A. (2018) "Suppression of autophagy in the brain of transgenic mice with overexpression of A53T-mutant α-synuclein as an early event at synucleinopathy progression", *Neuroscience Letters*. Elsevier, 672(November 2017), pp. 140–144. doi:10.1016/j.neulet.2017.12.001.

- Rai, S. N. and Singh, P. (2020) "Advancement in the modelling and therapeutics of Parkinson ' s disease", *Journal of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier, 104(September 2019), p. 101752. doi:10.1016/j.jchemneu.2020.101752.
- Ray Dorsey, E., Elbaz, A., Nichols, E., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Adsuar, J. C., Ansha, M. G., Brayne, C., Choi, J. Y. J., Collado-Mateo, D., Dahodwala, N., Do, H. P., Edessa, D., Endres, M., Fereshtehnejad, S. M., Foreman, K. J., Gankpe, F. G., Gupta, R., Hankey, G. J., Hay, S. I., Hegazy, M. I., Hibstu, D. T., Kasaeian, A., Khader, Y., Khalil, I., Khang, Y. H., Kim, Y. J., Kokubo, Y., Logroscino, G., Massano, J., Ibrahim, N. M., Mohammed, M. A., Mohammadi, A., Moradi-Lakeh, M., Naghavi, M., Nguyen, B. T., Nirayo, Y. L., Ogbo, F. A., Owolabi, M. O., Pereira, D. M., Postma, M. J., Qorbani, M., Rahman, M. A., Roba, K. T., Safari, H., Safiri, S., Satpathy, M., Sawhney, M., Shafieesabet, A., Shiferaw, M. S., Smith, M., Szoeki, C. E. I., Tabarés-Seisdedos, R., Truong, N. T., Ukwaja, K. N., Venketasubramanian, N., Villafaina, S., Weldegewergs, K. G., Westerman, R., Wijeratne, T., Winkler, A. S., Xuan, B. T., Yonemoto, N., Feigin, V. L., Vos, T. and Murray, C. J. L. (2018) "Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016", *The Lancet Neurology*, 17(11), pp. 939–953. doi:10.1016/S1474-4422(18)30295-3.
- Raza, C., Anjum, R. and Shakeel, A. (2019) "Parkinson ' s disease : Mechanisms , translational models and management strategies", *Life Sciences*. Elsevier, 226(March), pp. 77–90. doi:10.1016/j.lfs.2019.03.057.
- Reeve, A., Simcox, E. and Turnbull, D. (2014) "Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor?", *Ageing Research Reviews*. Elsevier B.V., 14(1), pp. 19–30. doi:10.1016/j.arr.2014.01.004.
- Savica, R., Grossardt, B. R., Rocca, W. A. and Bower, J. H. (2018) "Parkinson disease with and without Dementia: A prevalence study and future projections", *Movement Disorders*, 33(4), pp. 537–543. doi:10.1002/mds.27277.
- Schapira, A. H. V. (2011) "Mitochondrial pathology in Parkinson's disease", *Mount Sinai Journal of Medicine*. doi:10.1002/msj.20303.
- Sedelis, M., Schwarting, R. K. W. and Huston, J. P. (2001) "Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease", *Behavioural Brain Research*, 125(1–2), pp. 109–125. doi:10.1016/S0166-4328(01)00309-6.
- Selvaraj, S. and Piramanayagam, S. (2019) "Impact of gene mutation in the development of Parkinson's disease", *Genes and Diseases*. Elsevier Ltd, 6(2), pp. 120–128. doi:10.1016/j.gendis.2019.01.004.
- Smits, L. M., Reinhardt, L., Reinhardt, P., Glatza, M., Monzel, A. S., Stanslowsky, N., Rosato-Siri, M. D., Zanon, A., Antony, P. M., Bellmann, J., Nicklas, S. M., Hemmer, K., Qing, X., Berger, E., Kalmbach, N., Ehrlich, M., Bolognin, S., Hicks, A. A., Wegner, F., Sternecker, J. L. and Schwamborn, J. C. (2019) "Modeling Parkinson's disease in midbrain-like organoids", *npj Parkinson's Disease*. Springer US, 5(1). doi:10.1038/s41531-019-0078-4.
- Smits, L. M. and Schwamborn, J. C. (2020) "Midbrain Organoids: A New Tool to Investigate Parkinson's Disease", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(May), pp. 1–12. doi:10.3389/fcell.2020.00359.
- Sun, A. X., Ng, H. H. and Tan, E. K. (2018) "Translational potential of human brain organoids", *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 5(2), pp. 226–235. doi:10.1002/acn3.505.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors", *Cell*, 126(4), pp. 663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Tieng, V., Stoppini, L., Villy, S., Fathi, M., Dubois-Dauphin, M. and Krause, K. H. (2014) "Engineering of midbrain organoids containing long-lived dopaminergic neurons", *Stem Cells and Development*. doi:10.1089/scd.2013.0442.
- Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W. and Poewe, W. (2021) "Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease", *The Lancet Neurology*. Elsevier Ltd, 20(5), pp. 385–397. doi:10.1016/S1474-4422(21)00030-2.
- Vazin, T. and Freed, W. J. (2010) "Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review", *Restorative Neurology and Neuroscience*. doi:10.3233/RNN-2010-0543.
- Vera, E., Bosco, N. and Studer, L. (2016) "Generating Late-Onset Human iPSC-Based Disease Models by Inducing Neuronal Age-Related Phenotypes through Telomerase Manipulation", *Cell Reports*. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.062.
- Zeng, X. S., Geng, W. S., Jia, J. J., Chen, L. and Zhang, P. P. (2018) "Cellular and molecular basis of neurodegeneration in Parkinson disease", *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(APR), pp. 1–16.