



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

BIOMARCADORES DE PARKINSON EN HUMOR ACUOSO Y REGULACIÓN DE LA MICROGLÍA EN LA NEUROINFLAMACIÓN

Marc González Subías

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

Tutor académico: Neus Martínez Micaelo, Profesora asociada a la Universitat Rovira i Virgili,
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, neus.martinez@urv.cat

En cooperación con: Universitat de Barcelona – Grupo Neurobiología

Supervisor: Rafael Franco, Departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular,
rfranco@ub.edu

7, Junio 2023

Yo, Marc González Subías, con DNI 48273137R, soy conocedor de la guía de prevención del plagio a la extranet Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en julio 2017) ([Plagi | Suport a l'aprenentatge i a la docència | Serveis | Centre de Recursos per a l'Aprenentatge i la Investigació \(CRAI\) | Universitat Rovira i Virgili \(urv.cat\)](#)) y afirmo que este TFG no constituyen ninguna de las conductas consideradas como a plagio por la extranet.

Tarragona, de 7 de Junio de 2023

(firma)

Padre fundador de la biología de sistemas, describió elocuentemente:

Las células son residentes de un vasto 'paisaje' de estados posibles, sobre los cuales viajan durante el desarrollo y en la enfermedad.

Conrad H. Waddington

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a lo largo de todo este proceso. Primeramente, a mi supervisor Dr. Rafael Franco, por haberme permitido acceder a su grupo de investigación en Neurobiología en la Universitat de Barcelona, donde me he podido nutrir de una gran cantidad de conocimientos nuevos gracias a mi gran compañero Joan Serrano Marín. Agradezco a Ana Cristina Delgado Chávez por la ayuda y soporte durante todo este periodo. También, quiero remarcar la buena hospitalidad, recibimiento y el increíble ambiente que hay en el grupo diariamente, pues se refleja en el excelente trabajo científico y divulgativo de éste.

Para mi tutora, Neus Martínez Micaelo, quiero expresar mi más inmensa gratitud por el apoyo, soporte, dedicación y esfuerzo que ha mantenido durante estos meses. Por ayudarme a estructurar el trabajo y por los consejos a la hora de mejorar la comprensión de los contenidos explicados.

Quiero dar las gracias a todos mis familiares y amigos que han estado apoyándome y dándome ánimos para seguir adelante sin importar las circunstancias.

Índice

1	Introducción.....	1
1.1	Parkinson.....	1
1.2	Neuroinflamación y Neurodegeneración.....	3
1.3	Inflamación crónica.....	4
1.4	Microglía.....	4
1.5	Neurofarmacología y GPCR.....	5
2	Hipótesis.....	8
3	Objetivos.....	8
4	Métodos.....	8
4.1	Metabolómica a partir de muestras de humor acuoso.....	8
4.1.1	Participantes.....	8
4.1.2	Espectrometría de masa.....	9
4.2	RNAseq de microglía proveniente de cultivos primarios.....	10
4.2.1	Reactivos.....	10
4.2.2	Aislamiento y activación de la microglía.....	10
4.2.3	Procesamiento de datos RNAseq.....	11
4.2.4	Análisis de expresión diferencial.....	11
4.2.5	Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes.....	12
4.3	RNAseq Parkinson.....	12
4.3.1	Análisis de las ontologías.....	13
4.4	Correlaciones al comparar datos entre RNAseq microglía y RNAseq Parkinson.....	13
4.5	Análisis interómico.....	13
4.6	Análisis estadístico.....	14
5	Resultados.....	15
5.1	Metabolómica en muestras de humor acuoso.....	15
5.2	RNAseq de microglía proveniente de cultivos primarios.....	22
5.3	RNAseq Parkinson.....	25
5.4	Correlaciones al comparar datos entre RNAseq microglía y RNAseq Parkinson.....	27
5.5	Análisis interómico.....	29
6	Discusión.....	31
7	Conclusión.....	35
8	Bibliografía.....	36
9	Autoevaluación.....	40
10	Anexos.....	41

Datos del centro

El contenido de este TFG ha sido realizado en su totalidad en este grupo de investigación en la siguiente institución pública:

Departamento de Bioquímica y Biomedicina molecular

Universidad de Barcelona. Facultad de Biología. Departamento de Bioquímica y Biomedicina

Molecular. Avda. Diagonal 643, 08028 Barcelona

934021208

El grupo en Neurobiología dirigido por Rafael Franco, con la colaboración del grupo de Neurofarmacología situado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, es pionero en Europa en el estudio de los aspectos moleculares de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Empezando por los receptores de adenosina y denominándose "Laboratorio de Receptores", ahora se centran en el estudio de receptores de diferentes neurotransmisores y, también, se focalizan en el sistema nervioso central y las enfermedades neurodegenerativas, ya sea Parkinson, Alzheimer y Esclerosis Múltiple entre otros. Estos últimos años, el laboratorio ha abierto otra rama de estudio que consiste en el estudio transcriptómico, genético y metabólico de diferentes tipos celulares, especialmente en microglía.

Abstract

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease in people over 65 years of age, although 30% of those diagnosed are younger. Globally, the prevalence of Parkinson's has doubled in the last 25 years, from 2.5 million to 6.1 million. The most common clinical symptoms are resting tremor, cognitive problems, memory loss and visual dysfunction, among others. This fact highlights the need to study this disease. The diagnosis and detection in patients are essential for a less marked neuronal degeneration. In this work a metabolomic analysis of aqueous humor samples is performed by mass spectrometry. This method is essential to determine differentially represented metabolites in parkinsonian patients. The data obtained show several metabolic pathways involved in neuroinflammation and neurodegeneration of neuronal tissue, especially in dopaminergic neurons of the central nervous system, such as glutathione and arginine metabolism. The search for compounds that interfere with neurodegenerative processes aims to regulate, control, potentiate, attenuate, or block the action of neuroinflammatory pathways. Currently, therapy is symptomatic, i.e., it focuses on palliating symptoms, but does not slow down the progress of the disease. A promising approach that focuses on treating etiopathological processes is the reduction of neuroinflammation orchestrated by microglia, e.g., by treatment with A_{2A} receptor antagonists and CB₂ receptor agonists. The transcriptomic effects that these compounds had on inflamed microglia

were studied. The results were relevant in the reversion of microglial activation from a proinflammatory (M1) to an anti-inflammatory (M2) state, inducing neuroprotective processes.

Castellano

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en personas mayores de 65 años, aunque el 30 % de los diagnosticados tienen una edad menor. A nivel global, la prevalencia de Parkinson se ha duplicado en los últimos 25 años, pasando de 2,5 millones a 6,1 millones. Los síntomas clínicos más habituales son el temblor en reposo, problemas cognitivos, pérdida de memoria y disfunción visual, entre otros. Este hecho evidencia la necesidad de estudio de esta enfermedad. El diagnóstico y detección en pacientes es primordial para una degeneración neuronal menos marcada. En este trabajo se realiza un análisis metabólico de muestras de humor acuoso a partir de espectrometría de masas. Este método es esencial para determinar metabolitos diferencialmente representados en pacientes parkinsonianos. Los datos obtenidos muestran diversas rutas metabólicas implicadas en la neuroinflamación y la neurodegeneración del tejido neuronal, especialmente en las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso central, como el metabolismo del glutatión y de la arginina. La búsqueda de compuestos que interfieran con los procesos neurodegenerativos tiene como objetivo poder regular, controlar, potenciar, atenuar o bloquear la acción de vías neuroinflamatorias. Actualmente, la terapia es sintomática, es decir, se centra en paliar los síntomas, sin embargo, no frenan el progreso de la enfermedad. Una aproximación prometedora que se centra en tratar los procesos etiopatológicos, es la disminución de la neuroinflamación orquestada por la microglía, por ejemplo, mediante el tratamiento con antagonistas del receptor A_{2A} y agonistas del receptor CB_2 . Se estudiaron los efectos transcriptómicos que estos compuestos tenían sobre la microglía inflamada. Los resultados fueron relevantes en la reversión de la activación microglial de un estado proinflamatorio (M1) a uno antiinflamatorio (M2), induciendo procesos de neuroprotección.

Catalán

La malaltia de Parkinson és la segona patologia neurodegenerativa més comuna en persones majors de 65 anys, encara que el 30% dels diagnosticats tenen una edat menor. A nivell global, la prevalença de Parkinson s'ha duplicat en els últims 25 anys, passant de 2,5 milions a 6,1 milions. Els símptomes clínic més habituals són el tremolor en repòs, problemes cognitius, pèrdua de memòria i disfunció visual, entre altres. Aquest fet evidencia la necessitat d'estudi d'aquesta malaltia. El diagnòstic i detecció en pacients és primordial per a una degeneració neuronal menys marcada. En aquest treball es realitza una anàlisi metabolòmic de mostres d'humor aquós a partir d'espectrometria de masses. Estigui mètode és essencial per a determinar metabòlits diferencialment representats en pacients parkinsonians. Les dades obtingudes mostren diverses rutes metabòliques implicades en la neuroinflamació i la neurodegeneració del teixit neuronal,

especialment en les neurones dopaminèrgiques del sistema nerviós central, com el metabolisme del glutatió i de l'arginina. La cerca de compostos que interfereixin amb els processos neurodegeneratius té com a objectiu poder regular, controlar, potenciar, atenuar o bloquejar l'acció de vies neuroinflamatòries. Actualment, la teràpia és simptomàtica, és a dir, se centra en pal·liar els símptomes, no obstant això, no frenen el progrés de la malaltia. Una aproximació prometedora que se centra en tractar els processos etiopatològics, és la disminució de la neuroinflamació orquestrada per la micròglia, per exemple, mitjançant el tractament amb antagonistes del receptor A_{2A} i agonistes del receptor CB_2 . Es van estudiar els efectes transcriptòmics que aquests compostos tenien sobre la micròglia inflamada. Els resultats van ser rellevants en la reversió de l'activació microglial d'un estat proinflamatori (M1) a un antiinflamatori (M2), induint processos de neuroprotecció.

Palabras clave: Transcriptómica, Metabolómica, Parkinson, RNAseq, Espectrometría de masas, Neuroinflamación, Neurodegeneración, Neuronas dopaminérgicas, Humor acuoso, Retina.

Abreviaciones y acrónimos

α -Syn: α -sinucleína; **2-Cl-IB-MECA:** 2-chloro- N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyl-carboxamide; **A₁:** receptor de adenosina A₁; **A_{2A}:** receptor adenosina A₂; **A₃:** receptor de adenosina A₃; **AD:** enfermedad de Alzheimer; **cAMP:** AMP cíclico; **CB₁:** receptor cannabinoide CB₁; **CB₂:** receptor cannabinoide CB₂; **CBD:** cannabidiol; **D2R:** receptor de dopamina D2; **DEGs:** genes diferencialmente expresados; **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium; **PD:** enfermedad de Parkinson; **FBS:** suero fetal bovino; **FC:** Fold Change; **FDR:** tasa de falsos descubrimientos; **FPKM:** fragmentos por kilobase millón; **GPCR:** receptores transmembrana acoplados a proteína G; **IFN- γ :** interferón gamma; **LPS:** lipoproteína; **MEM:** solución de aminoácidos no esenciales; **NO:** óxido nítrico; **NK:** natural killer; **PCA:** análisis de componentes principales; **PCR:** técnica de la reacción en cadena de la polimerasa; **RNS:** especies reactivas del nitrógeno; **ROS:** especies reactivas del oxígeno; **RPKM:** lecturas por kilobase millón; **SCH 58261 (2270):** 2-(2-Furanyl)-7-(2-phenylethyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine; **SNC:** sistema nervioso central; **TGF- α :** factor de crecimiento transformante beta; **TNF:** factor de necrosis tumoral; **TPM:** transcripciones por kilobase millón.

RNAseq Parkinson



Selección de 2 estudios

- Datos normalizados a RPKM
- Datos obtenidos de muestras humanas del SNC (control y parkinsonianos)
- Experimento realizado con Expression profiling by high throughput sequencing

Creación código optimizado

Análisis estadístico

Selección de genes DEGs

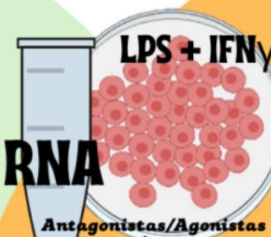
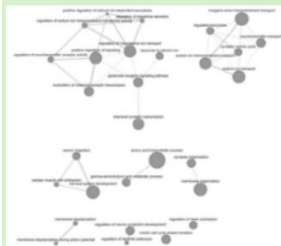
$pvalue < 0,05$
 $FC > |1,5|$

Upregulate
Downregulate
Seleccionar los genes coincidentes entre los dos estudios

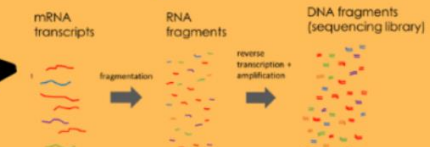
Resultados

- Observación de los genes implicados más relevantes o significativos dentro de la enfermedad
- Realización de ontologías, para visualizar los procesos biológicos implicados en la patología
- Determinación de un patrón génico común entre el Parkinson y Alzheimer

Ontologías



RNAseq microglía



Análisis estadístico

- 1 Normalización de los datos
- 2 Eliminación de outliers p missing values
- 3 Test de normalidad y homocedasticidad
- 4 Selección de DEGs $pvalue < 0,05$ $FC > |1,5|$



Reads

SAGACATCCAGCAGCTTGTGA
GAGAAAGACAGCTCTTAGAC
GCGGAGATCCCTGTAGACAA
GAGAGATCTGTAGAGAGAGC
CTACTACTAGTAGAGAGAGC
CATCTACATGAGCTGGTGT
GCGGAGCTTGTAGAGAGAGC
GAGACATCTTAGACTAGAAC
GAGATAGTCTTAGACTAGAAC
GCTTAGAGTGTGTGTGTGAC

Parkinson-Microglía

Para cada condición/fármaco (x4)

Genes coincidentes Down en microglía y up en Parkinson
Genes coincidentes Up en microglía y down en Parkinson

Ontología

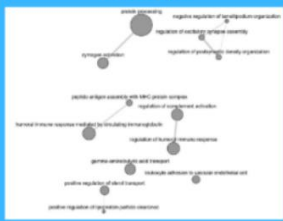


Diagrama de barras

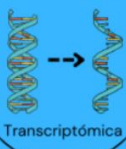


Ontología



ADN

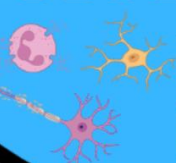
ARN



- Acil-carnitina (C0, C2, C3, C5)
ADMA SDMA Total DMA
DOPA Tirosina Fenilalanina

Metabolómica

Apoptosis



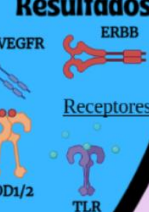
Transductores de señales



IL17R



Resultados

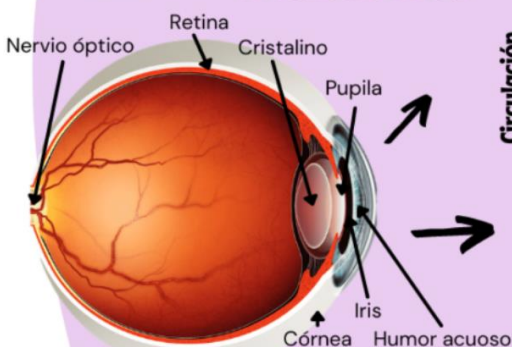


Receptores

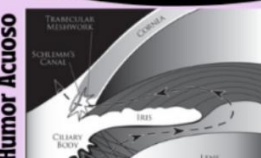
Anomalías oculares en Parkinson

- Disminución de la agudeza visual
- La sensibilidad anormal al contraste de espacial
- Defectos en la visión del color

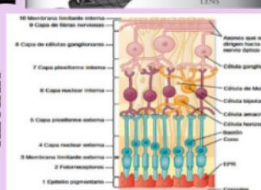
Metabolómica



Circulación Humor Acuoso

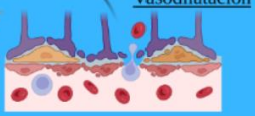


RETINA



Interómicas

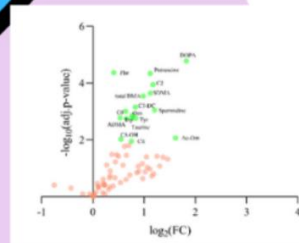
Vasodilatación



Inflamación



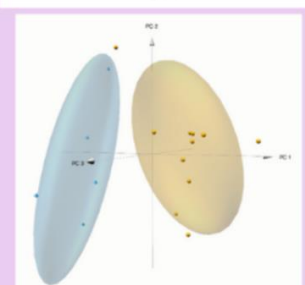
Resultados



11 control 6 EP
17 muestras
Análisis estadístico



Mass spectrometry



1 Introducción

1.1 Parkinson

La enfermedad del Parkinson está causada por una neurodegeneración de neuronas de la sustancia nigra del cerebro que cursa con inflamación crónica (Weintraub et al., 2022). Las neuronas que degeneran y mueren son dopaminérgicas, y los trastornos motores son el primer síntoma de la falta de dopamina. Los síntomas clínicos más habituales son el temblor en reposo, la rigidez, problemas al iniciar movimientos, una inestabilidad corporal general y una postura encorvada (Braak et al., 2004; Tolosa et al., 2021). Además, la mayoría de los pacientes presentan anomalías oculares (80% de los casos (L. Guo et al., 2018)) incluso en etapas iniciales de la enfermedad; disminuye la agudeza visual, hay sensibilidad anormal al contraste de espacios o defectos en la percepción del color (Postuma et al., 2012). A nivel cognitivo, puede conllevar demencia, pérdida de memoria, alteraciones del sueño y depresión. Actualmente, el 3% de las personas entre 75-84 años padece Parkinson. La edad de inicio habitual es a los 55 años y se presenta más en varones con un 55%.

La sustancia negra contiene la “pars compacta” y la “pars reticulata”. Estas dos regiones están de forma bilateral en los dos hemisferios del cerebro (dentro del mesencéfalo). La pars compacta es la que a través de las neuronas dopaminérgicas envía señales al cuerpo estriado. Esta vía se llama vía nigroestriada y es la más afectada en la patología.

Las neuronas dopaminérgicas generan cuerpos de Lewy, que son agregados intracelulares anormales que contienen varias proteínas como la alfa-sinucleína fosforilada en (pSer¹²⁹- α -Syn (α -sinucleína)) y ubiquitina que afectan gravemente el funcionamiento de las neuronas. Las zonas del cerebro donde se han encontrado agregados de α -sinucleína son el mesencéfalo, diencéfalo, bulbo olfatorio y sistema ocular (ojo/retina) que es, en principio, el más rápido en afectarse por las fibrillas (Choudhry & Perlmutter, 2017). Estos agregados se asocian a una disfunción neuronal que se correlaciona con disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, aumento en las concentraciones de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS), presencia de proteínas proapoptóticas, e inhibición a la acetilación de histonas; la consiguiente desregulación en el transporte de vesículas (causado por la disfunción del aparato de Golgi y el retículo endoplasmático) conduce a alteraciones a nivel sináptico (Wong & Krainc, 2017).

Se han identificado agregados α -Syn en la retina de pacientes con EP, más concretamente, en neuronas dopaminérgicas (Beach et al., 2014; Marrocco et al., 2020; Ortuño-Lizarán et al., 2018). Estos agregados se relacionan con la muerte neuronal, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, respuesta inmune alterada por parte de células de Müller (gliales) y la excitotoxicidad (Oueslati,

2016). En particular, las fibrillas están en las capas internas de la retina, donde se ubican las neuronas ganglionares, bipolares y amacrinas.

Por un lado, se ha demostrado una reducción en el grosor de la capa peripapilar de fibras nerviosas de la retina en la mácula (Inzelberg et al., 2004). Por otro lado, en etapas tempranas de la enfermedad, se ha reportado la reducción de las señales transmitidas por las células fotópicas (conos) y escotópicas (bastones) y, por tanto, la disminución de los niveles dopaminérgicos neuronales (Gottlob et al., 1987; Nguyen-Legros, 1988).

En estudios in vivo con ratones tratados con un pesticida, se pudo observar como las anomalías oculares surgieron pasados los 20 días de la administración del tóxico. En cambio, la afección y cambios en las poblaciones de células dopaminérgicas en el mesencéfalo y en el núcleo estriado, putamen y amígdala, no fueron relevantes hasta 60 días después. Por tanto, se sugiere que los sucesos que ocurren pueden resultar en alteraciones de la concentración de moléculas que podrían ser biomarcadores de la enfermedad de Parkinson (Esteve-Rudd et al., 2011; Normando et al., 2016).

Estas anomalías a nivel ocular se reflejan e identifican en muestras cuantificables. Un ejemplo cercano es el humor acuoso. Este líquido es producido por el epitelio ciliar, más concretamente, por las células epiteliales no pigmentadas a partir de un transporte activo. El epitelio ciliar no pigmentado representa la continuación de la retina y, el pigmentado, la continuación de la retina pigmentada que está en contacto con la coroides. Por tanto, hay presencia de fibras neuronales que pueden provenir de la retina, de los ganglios cervicales, del plexo carotídeo o del ganglio trigémino a través del nervio oftálmico (Goel et al., 2010). La circulación de este líquido ocular ligeramente alcalino ayuda a formar las cámaras posterior y anterior del ojo. El líquido acuoso facilita la nutrición, la eliminación de residuos, el transporta neurotransmisores y, por tanto, es un vehículo imprescindible para alcanzar la homeostasis.

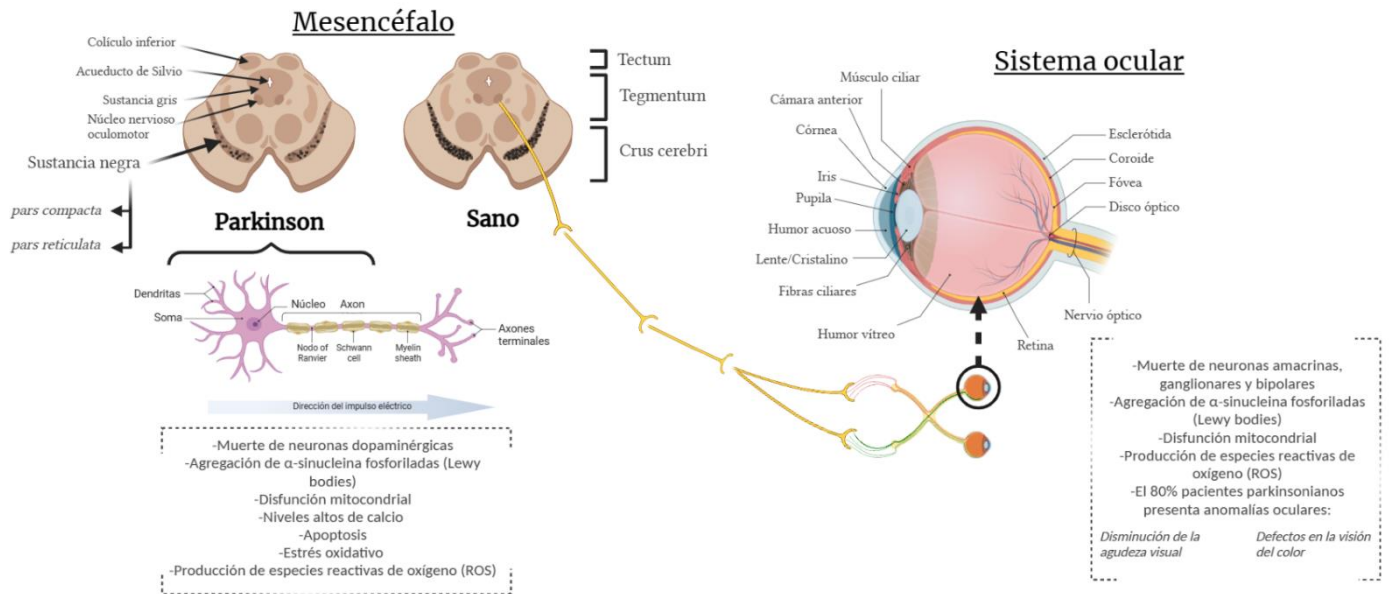


Figura 1. Esquema representativo sobre la enfermedad de Parkinson, en donde se visualizan las interconexiones que se establecen entre el SNC y el sistema ocular. También, se muestran las anomalías principales y características de los pacientes parkinsonianos.

1.2 Neuroinflamación y Neurodegeneración

La neurodegeneración es la destrucción y daño tisular cerebral, donde se alteran diversos tipos celulares presentes en el cerebro, incluyendo neuronas y microglía. Fruto del incremento de la esperanza de vida en los países avanzados, los casos de patologías neurodegenerativas han incrementado. Efectivamente, el principal factor de riesgo de estas enfermedades es la edad. Algunos ejemplos de enfermedades que cursan con neuroinflamación son la enfermedad de Parkinson (PD), la enfermedad de Alzheimer (AD), el Huntington o la esclerosis múltiple (Teleanu et al., 2022). La patofisiología de la neurodegeneración estriba en dos ejes principales: el estrés oxidativo y la neuroinflamación.

En lo relacionado con las especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) pueden originarse tanto por medios exógenos (radiación ionizante, químicos ambientales) como endógenos (p. ej., enzimas mitocondriales). El complejo I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, son los enzimas que más ROS producen (Teleanu et al., 2022). Las ROS causan, entre otros eventos, peroxidación lipídica, oxidación del ADN y agregados citotóxicos derivados de la modificación de la estructura de las proteínas. La consideración de los ROS es relevante en pacientes parkinsonianos, pues se ha reportado una disminución de la actividad del complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) a causa de mutaciones en su gen. Estas deficiencias pueden provocar un aumento de glutamato, provocando excitotoxicidad neuronal y dando lugar a muerte neuronal y neuroinflamación (Pathak & Davey, 2008).

Por otra parte, la neuroinflamación se da en el sistema nervioso en situaciones en la que la homeostasis se ve alterada y se induce una activación del sistema inmunitario residente, el cual es orquestado por las células microgliales. La neuroinflamación está en estrecho balance con la producción de ROS, pues cuando hay un desequilibrio redox, se genera una activación de la respuesta inflamatoria generando ROS. La sobreproducción de ROS y el desequilibrio redox juegan un papel importante en la respuesta inmunológica. En el caso inflamatorio, la principal enzima productora de ROS es la NOX2 oxidasa NADPH dependiente.

1.3 Inflamación crónica

En todo proceso de daño y regeneración tisular, es necesario el proceso inflamatorio en etapas iniciales, ya que ayuda a combatir el estímulo citotóxico, elimina residuos celulares, generación de grandes cantidades de citocinas y quimiocinas que ayudan al reclutamiento y activación de células inmunes. Sin embargo, cuando la inflamación se mantiene en el tiempo ocasiona diversos procesos patológicos, provocando disfunción celular y apoptosis/necrosis. La inflamación crónica es una forma lenta, constante y sostenida de la respuesta inmune ocasionando oxidación, disfunción mitocondrial, aparición de productos de glicación, entre otros (Tu et al., 2019). Este fenómeno puede ser generado por muchos factores, donde los más relevantes son exposición a toxinas, envejecimiento (se observa un aumento de citoquinas inflamatorias y ROS a causa de la disfunción mitocondrial), alimentación inflamatoria, alteración del sueño, mutaciones genéticas en ciertos genes (SNCA, PINK1, PARK4, DNAJC13 en Parkinson).

1.4 Microglía

La microglía la constituyen células ubicadas en el sistema nervioso central (SNC) con función fagocitaria y de soporte. La microglía se define en el estado de reposo (M0) y en dos estados resultantes de su activación: proinflamatorio (M1) y neuroprotector (M2). Recientemente, se ha determinado que el fenotipo puede ser más complejo, pudiendo existir estados intermedios entre M1 y M2 que dependerían del origen de la inflamación y de su curso posterior (Franco & Fernández-Suárez, 2015). Cuando está presente en las etapas inflamatorias de una afección, la microglía elimina residuos por fagocitosis, pero también puede generar citotoxicidad, provocando daño tisular y secreción de citoquinas proinflamatorias. En cambio, cuando el tejido se desinflama se promueve una actividad de neurogénesis, angiogénesis, mielinización de las neuronas afectadas y una remodelación sináptica (Paolicelli et al., 2022).

La microglía en enfermedades cerebrales adopta una motilidad y función dinámica según la presencia de células apoptóticas (residuos celulares), proteínas tóxicas (amiloide, α -sinucleína) y alteraciones en las funciones neuronales.

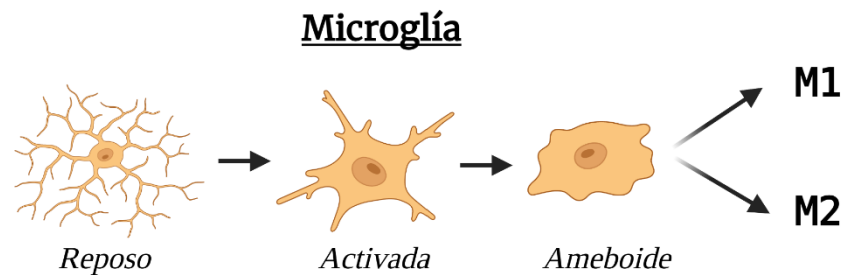


Figura 2. Descripción conceptual sobre los estados microgliales y sus morfologías. Los estados descritos siguen una línea cronológica, donde al final la microglía puede derivar en un estado M1 (proinflamatorio) o M2 (antiinflamatorio).

1.5 Neurofarmacología y GPCR

La búsqueda de compuestos que interfieran con los procesos neurodegenerativos tiene como objetivo poder regular, controlar, potenciar, atenuar o bloquear la acción de vías neuroinflamatorias. Hay dos tipos de aproximaciones. Una consiste en paliar o reducir la sintomatología de la patología, es decir, no se trataría de una terapia curativa. Un ejemplo representativo es la levodopa, compuesto utilizado para tratar la enfermedad del Parkinson. Su principal característica es que, al pasar la barrera hematoencefálica, se transforma en dopamina por reacciones enzimáticas. Como se ha mencionado anteriormente, la dopamina modula gran parte de la actividad motora, por tanto, al suplementar el encéfalo de este fármaco, se consigue paliar las bajas concentraciones de dopamina que producen las células dopaminérgicas del paciente enfermo. La otra aproximación consiste en la modulación de las funciones biológicas implicadas en la enfermedad y tratar de neutralizar la causa de la afección. La regulación de concentraciones de los neurotransmisores (acetilcolina, glutamato, GABA, dopamina) es una posibilidad atractiva que se puede conseguir con moléculas que actúan sobre receptores que modulan la síntesis, almacenamiento, liberación, catabolismo y recaptación en la sinapsis. Entre los que hay más esperanzas dado que ya son diana de muchos fármacos aprobados para uso humano son los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), de lo que hay más de 800 tipos (Milligan et al., 2019).

La oligomerización o dimerización de los receptores GPCR es un factor esencial para la comprensión de muchas vías de señalización en la célula. La oligomerización puede proporcionar el control de calidad del plegamiento y posicionamiento de los receptores en la membrana, es decir, el proceso llamado ontogénesis. Los homodímeros consisten en una estructura compuesta por dos GPCRs iguales. Los heterodímeros son complejos formados por dos GPCRs diferentes. Por último, los oligómeros complejos compuestos por más de dos GPCRs. Un dímero se considera una unidad

funcional; especialmente los heterómeros permiten potenciar, atenuar, etc. la respuesta a los neuroreguladores que interactúan con los GPCRs que constituyen dichos heterómeros.

Receptores de adenosina

Este grupo está formado por cuatro tipos: A₁ (receptor de adenosina A₁), A_{2A} (receptor de adenosina A_{2A}), A_{2B} (receptor de adenosina A_{2B}), y A₃ (receptor de adenosina A₃) y pertenecen a la familia de los GPCRs. Los cuatro tipos pueden llegar a expresarse en microglía por lo que participan en la regulación del inicio, extensión y terminación de la respuesta inflamatoria. La adenosina en condiciones estresantes está presente en concentración elevada (micromolar). Sin embargo, en un ambiente homeostático, está a niveles nanomolares (Jacobson et al., 2018). Utilizar agonistas/antagonistas de estos receptores en las neuronas pre/postsinápticas, potenciar la síntesis/inhibición del catabolismo de un neurotransmisor son mecanismos que se estudian a diario. Dos son los tipos que son objeto de estudio del presente proyecto: el A_{2A} y el A₃.

-A_{2A}: es un receptor que está en grandes cantidades en las células microgliales y astrocitos. Produce la estimulación de adenilato ciclasa, que aumenta los niveles de cAMP (AMP cíclico) intracelular y activa las vías de ERK1/2, MAPK, JNK y p38 MAPK que, como se sabe, están relacionadas con la diferenciación y la proliferación celular. También, regula la demanda de oxígeno, a partir de la modulación de la vasodilatación. Se ha descubierto que este receptor interactúa con el receptor de dopamina D2, disminuyendo la actividad de éstos.

Istradefilina: es un antagonista selectivo de A_{2A} que actúa contra los heterotetrámeros de D2R (receptor de dopamina D2) y A_{2A}. Es característico por su efecto modulador alostérico negativo contra A_{2A}, mejorando la locomoción y la funcionalidad del receptor de D2R. En condiciones fisiológicas, la adenosina cuando actúa sobre este complejo modula negativamente D2R, inhibiendo la transducción de señales inducidas por dopamina. Sin embargo, es un agonista endógeno de A_{2A}.

SCH-58261((2-(2-Furanyl)-7-(2-phenylethyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine)): antagonista del receptor de A_{2A}, tiene la característica de poder inhibir la acción del receptor y neutralizar la cascada de señalización en el flujo de calcio intracelular y el proceso de excitotoxicidad. Evita que las células microgliales modifiquen su morfología a un estado ameboide y que haya una migración/proliferación hacia la región dañada (Melani et al., 2006).

-A₃: compuesto por una sola cadena de 318 aminoácidos y está presente en baja concentración en el cerebro. Se acopla preferentemente a la proteína Gi para inhibir la acumulación de cAMP, o bien, pueden acoplarse a proteína Gq para mediar la activación de la fosfolipasa C (PLC), para aumentar las concentraciones de calcio y regular procesos de respuesta inflamatoria, apoptosis y necrosis. También, estimula la vía de las MAPK, promoviendo la migración celular.

2-Cl-IB-MECA (2-chloro- N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyl-carboxamide): es un agonista de A₃. En varios artículos se ha reportado que la activación de este receptor inhibe la reactividad de la microglía y, también, suprime la producción de TNF- α (factor de necrosis tumoral) (Ferreira-Silva et al., 2020). A nivel ocular, la activación de A₃ por este bloquea la muerte de las células neuronales de la retina y aumenta la expansión de neuritas y la regeneración axonal.

Receptores cannabinoides

Los endocannabinoides son caracterizados como agentes neuroprotectores. Los receptores GPCR que interaccionan con este tipo de compuestos son dos: CB₁ (receptor cannabinoide CB₁) y CB₂ (receptor cannabinoide CB₂). La activación de los receptores induce la inhibición del adenilato ciclasa y el bloqueo parcial de los niveles de AMPc. Se ha reportado que estos receptores están presentes en el SNC y en la microglía (Navarro et al., 2018). Por tanto, son unas dianas óptimas para poder neutralizar la activación glial y disminuir los efectos neuroinflamatorios.

-CB₁: son miembros de la familia de GPCR ligada a Gi/Go. Tienen la función de inhibir los canales de calcio y activar los canales de potasio rectificadores internos y la MAP quinasa (Mackie, 2006).

Un caso de dimerización es la interacción entre de A_{2A}-CB₂. El CB₂ se encuentra en las células inmunes principalmente, juega un papel esencial en la interacción con los cannabinoides y endocannabinoides. En ratones knock-out CB₂^{-/-} se reportó un aumento del reclutamiento de leucocitos, la producción de citoquinas proinflamatorias y daño tisular.

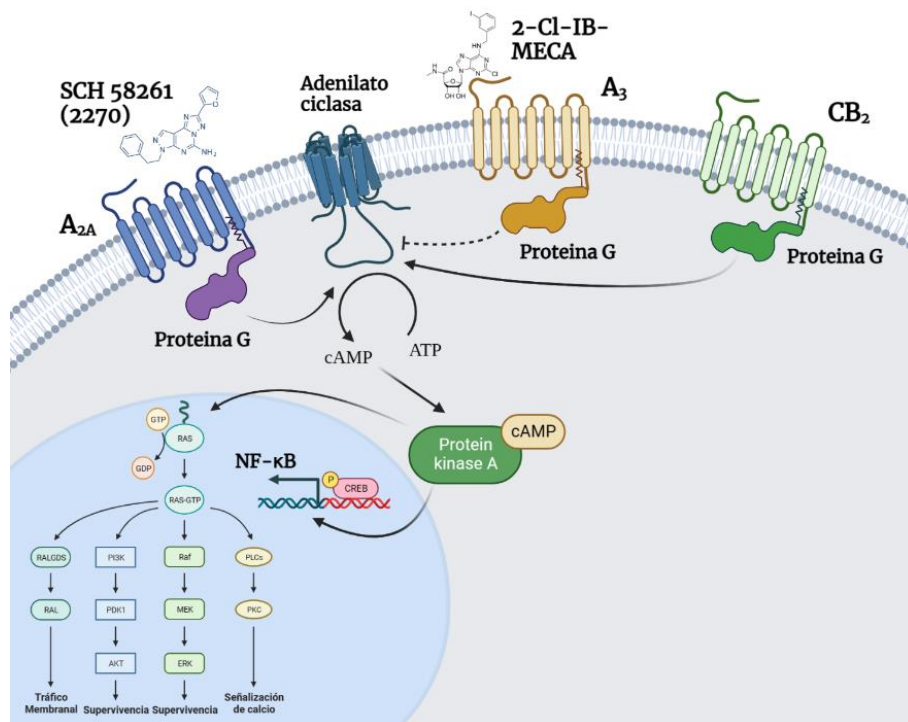


Figura 3. Representación funcional de los receptores GPCR (A_{2A}, A₃ y CB₂). En la parte superior se visualizan las interacciones de diversos agonistas y antagonistas de estos receptores GPCR. Por último, se muestra las diversas cascadas de señalización activadas o inhibidas por la activación de estos receptores.

2 Hipótesis

-El humor acuoso es útil para poder detectar biomarcadores en la enfermedad de Parkinson.

-Los siguientes compuestos (SCH 58261 (2270), antagonista de A_{2A} y CBD (cannabidiol), agonista de CB_2) sirven como represores y neutralizadores de la inflamación, actuando sobre microglía inflamada.

-El Parkinson se basa en la muerte de las células dopaminérgicas y en un ambiente neurodegenerativo.

-Los siguientes compuestos (SCH 58261 (2270), antagonista de A_{2A} y CBD, agonista de CB_2) tienen propiedades represoras de la neuroinflamación y características antiinflamatorias y de regeneración tisular en la enfermedad de Parkinson.

3 Objetivos

-Comprobar si es posible la detección de biomarcadores metabólicos en muestras de humor acuoso.

-Validar si los compuestos (SCH 58261 (2270), antagonista de A_{2A} y CBD, agonista de CB_2) actúan como represores y neutralizadores de la inflamación.

-Examinar si el Parkinson está involucrado en episodios de neurodegeneración de células dopaminérgicas e inflamación crónica.

-Validar si los compuestos (SCH 58261 (2270), antagonista de A_{2A} y CBD, agonista de CB_2) son útiles para tratar el Parkinson y reducir la neuroinflamación.

4 Métodos

4.1 Metabolómica a partir de muestras de humor acuoso

4.1.1 Participantes

Se recogieron un total de 16 muestras, 11 eran de controles sanos; 3 eran hombres y 8 mujeres, la edad promedio era 42,9 (intervalo 24–66), y 5 era de pacientes de Parkinson; 5 eran hombres y 0 mujeres, la edad promedio era de 72,4 (intervalo 69–79). Ninguno de los individuos había sufrido anteriormente cirugía ocular. Las comorbilidades en el grupo del paciente eran la hipertensión (n = 5), la hiperlipidemia (n = 3) y la función tiroidea alterada (n = 1). Los participantes fueron informados y, en términos de normas éticas, este estudio se adhirió a los principios de la declaración de Helsinki. El estudio ha sido evaluado por el Comité de Ética de la Investigación de las Islas Baleares

(CEI-IB) y aprobado bajo las condiciones de buenas prácticas del Servicio de Salud de las Islas Baleares en el uso de sistemas de información y en el tratamiento de datos personales (documento disponible a: (<https://www.ibsalut.es/docs/docs/ca/cbp;cat.pdf>; consultado el 3 de mayo de 2023). Todos los pacientes de PD fueron tratados farmacológicamente con la terapia estándar de oro. El humor acuoso se recogió a primeros de la intervención; tanto en el grupo PD como en el grupo de control había individuos con miopía o hiperopía pero sin cataratas o patologías oculares. La presión ocular de los controles y los pacientes se encontraba dentro del intervalo de referencia. La media de controles y pacientes era de 4,5 (rango de -2,5 a -7 dioptras). Los controles no fueron diagnosticados con ninguna patología. No se informa de ninguna cirugía anterior. Los individuos se sometieron a la implantación de la lente refractiva o lente implantable de colámero (sin eliminar la lente natural del ojo). Todas las cirugías fueron realizadas por el mismo cirujano en ayuno, y después de la dilatación y desinfección de la pupila con un 5% de povidona-iodina oftálmica, bajo anestesia tópica y protocolo preoperativo y operativo idéntico. El primer puerto lateral se hizo con una anchura de 1 mm bajo el microscopio en la sala de operaciones, y aspirado 100-150 µl con una aguja de 27G para evitar la profundización en la cámara anterior del ojo. Cada muestra fue transferida a un tubo Eppendorf de 0,5 ml y almacenado a -80° C hasta el análisis.

4.1.2 Espectrometría de masa

La técnica de espectrometría de masas fue seleccionada para determinar tantos metabolitos como fuera posible, también con el objetivo de determinar los compuestos el nivel de los cuales es difícil de evaluar a causa de cuestiones técnicas, por ejemplo, la medida de carnitinas que tienen cadenas de acil de un número diferente a carbonos. En consecuencia, se realizó una metabolómica dirigida utilizando el Kit AbsoluteIDQ™ p180 (Biocrates Life Sciences, Innsbruck, Austria). Este enfoque permite la cuantificación absoluta de hasta 188 metabolitos, incluyendo aminoácidos, aminos biogénicas, hexosas, acil-carnitinas, fosfo- y esfingolípidos. Se pueden encontrar los metabolitos individuales en www.biocrates.com/productes/research-products/absoluteidq-p180-kit. Hasta 30 µl de AH fue añadido en cada pozo. Se colocaron estándares, controles de calidad y estándares internos en la placa, que se procesó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se han analizado muestras derivatizadas en el espectrómetro de masas AB Sciex 6500 QTRAP MS/MS (AB Sciex LLC, Framingham, MI, EE. UU.) acoplado a un sistema UHPLC de Infinity Agilent 1290 (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones proporcionadas con el kit. El software Analyst y los paquetes de software MetIDQ™ se utilizaron para analizar los datos obtenidos y calcular las concentraciones de metabolitos. Las concentraciones finales se calcularon teniendo en cuenta el volumen que se colocó en cada pozo.

La buena selección de los metabolitos diferencialmente expresados en muestras de humor acuoso parkinsonianas es esencial para obtener resultados fiables. Por ello, se realizó un pretratamiento y análisis de datos explicado más adelante en la sección llamada 'Análisis estadístico'.

4.2 RNAseq de microglía proveniente de cultivos primarios

4.2.1 Reactivos

Trizol (Ambion Life Technologies, 15696026), cloroformo (Sigma_Aldrich, C2432-500ML), isopropanol (PanReac AppliChem, 131090.1211), lipopolisacárido (Sigma_Aldrich, L4391-1MG), interferón- γ humano (Sigma Aldrich; I3265-1MG), 2-cloro-N⁶-(3-yodobencil)-adenosina-5'-N-metiluronamida (2-Cl-IB-MECA; ToCris Bioscience; 1104). SCH58261 (2270) obtenidos en Tocris bioscience (Bristol, UK).

4.2.2 Aislamiento y activación de la microglía

Para preparar la microglía primaria, se extrajo el cerebro de ratones C57BL/6J de tipo salvaje en los días postnatales 2 a 4. Se aislaron células microgliales y se colocaron en placas con una confluencia de 40.000 células/0,32 cm². Brevemente, se diseccionó el tejido y, tras retirar cuidadosamente las meninges, las muestras cerebrales fueron digeridas con tripsina al 0,25% durante 20 minutos a 37 °C. La tripsinización se detuvo añadiendo un volumen igual de medio de cultivo (Dulbecco's modified Eagle medium-F-12 nutrient de Dulbecco, Invitrogen). Las células se llevaron a una mediante pipeteo repetido seguido del paso a través de un poro de 100 μ m. Las células granuladas (7 min, 200 g) se resuspendieron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado y se sembraron a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células/mL en placas de 6 pocillos. Veinticuatro horas después, el medio se sustituyó por medio de Dulbecco's modified Eagle modificado con 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina/estreptomicina, solución de aminoácidos no esenciales MEM (1/100) y suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10% (v/v) (todos los suplementos eran de Invitrogen, Paisley, Escocia, Reino Unido). Las células se mantuvieron en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ a 37 °C y se utilizaron para la extracción de ARN tras 15 días de cultivo. Las células se activaron durante 48 h con 0,01% (v/v) LPS (lipoproteína) y 0,002% (v/v) de IFN- γ (interferón gamma) en medio de Dulbecco's modified Eagle y, a las 24, 32 y 40 h, se añadió vehículo o SCH-58261, CBD, o la combinación a una concentración de 200 nM.

Después de esto, se procedió a la extracción del ARN total con el método basado en Trizol utilizando cloroformo e isopropanol para purificar el ARN. El control de calidad se evaluó midiendo la relación de absorción 280/260 y el RIN en los servicios de la Universidad de Barcelona (CCiTUB: Centros Científicos y Tecnológicos de la Universitat de Barcelona). La secuenciación se realizó en las de Novogene utilizando el siguiente protocolo: el ARN mensajero se purificó a partir del ARN total utilizando perlas magnéticas unidas a oligos poli-T. La calidad y pureza de la biblioteca se comprobó con Qubit y PCR (técnica de la reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real para la cuantificación y con Bioanalyzer para la detección de la distribución de tamaños. Las bibliotecas cuantificadas se agrupan y secuencian en plataformas Illumina, según la concentración efectiva y

la cantidad de datos. La plataforma fue Novogene NovaSeq 6000, pair-end 150 (PE150), la estrategia de secuenciación, y 151+8+8+151 los ciclos de secuenciación. El agrupamiento de las muestras codificadas por índices se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras la generación de clústeres, las bibliotecas preparadas se secuenciaron en una plataforma Illumina, y se generaron lecturas *paired-end*. Para el control de calidad, los datos crudos (raw reads) en formato "fastq" se procesaron en primer lugar mediante scripts Perl. En este paso se obtuvieron datos limpios (lecturas limpias) eliminando, de las lecturas que contenían adaptadores, las lecturas que contenían poli-N, y las lecturas de baja calidad. Al mismo tiempo, las puntuaciones de calidad Q20 y Q30, y el contenido de GC. Todos los análisis posteriores se efectuaron con los datos limpios. Para mapear las lecturas, se descargaron los archivos del genoma de referencia y la anotación genética se descargaron del buscador de genomas [Ensembl Biomart](#). Se utilizó Hisat2 v2.0.5 para la indexación y alineación de las lecturas con el genoma de referencia. Seleccionamos Hisat2 como herramienta de mapeo porque puede generar una base de datos base de datos de empalmes de empalme basada en el archivo del gen. Por lo tanto, proporciona mejores resultados de mapeo que otras herramientas de mapeo sin empalme.

4.2.3 Procesamiento de datos RNAseq

Se utilizó el software Feature counts v1.5.0-p3 para contar los números de lecturas asignadas a cada gen. A continuación, se calcularon los fragmentos por kilobase de cada gen y se calculó en función de la longitud del gen y el número de lecturas asignadas a este gen. El número de fragmentos por kilobase de la secuencia de transcripción por millones de pares de bases secuenciados (FPKM) considera el efecto de la profundidad de secuenciación y la longitud del gen para el recuento de lecturas al mismo tiempo y es actualmente el método más utilizado para estimar los niveles de expresión génica.

4.2.4 Análisis de expresión diferencial

Análisis de expresión diferencial de dos condiciones/grupos (tres réplicas biológicas por condición) se realizó con el paquete DESeq2R (1.20.0). DESeq2 con réplicas biológicas proporciona medios estadísticos para determinar la expresión génica mediante un modelo basado en la distribución binomial negativa. Los p-valores resultantes se ajustaron utilizando el enfoque de Benjamini y Hochberg para controlar la tasa de falsos descubrimientos. Antes del análisis de expresión génica diferencial, para cada biblioteca secuenciada se ajustaron con el paquete de programas edgeR mediante un factor normalizado de escala. El análisis de expresión diferencial de dos condiciones se ejecutó mediante el paquete "edgeR" R (versión 3.22.5). Únicamente se analizaron los genes cuya comparación de expresión falso descubrimiento (FDR) < 0.05, y un Fold Change menor a 0.67 o superior a 1.5 y se clasificaron en aquellos cuya expresión estaba regulada al alza o a la baja en cada tratamiento específico.

4.2.5 Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes

El siguiente procedimiento que se explica, fue realizado en las tres condiciones:

Posteriormente, se empleó [Enrichr-KG](#) para realizar el análisis de ontologías, uno para genes up y otro para genes down. Se priorizó que se incluyera los máximos términos posibles de la librería (GO Biological Process 2021), con un máximo de 50. Seguidamente, las ontologías con prefijo (GO:), fueron introducidas en [Reviqo](#), para agrupar las ontologías y poder extraer los procesos biológicos generales que estaban afectados.

4.3 RNAseq Parkinson

Se escogieron dos estudios con muestras de pacientes sanos y muestras de pacientes parkinsonianos durante el mes de marzo de 2023. Se inició la búsqueda en la base de datos [Gene Expression Omnibus](#) escribiendo en el buscador 'Parkinson' y, en el apartado de filtros, especificando que el organismo sea 'Homo Sapiens' y que el tipo de estudio sea 'Expression profiling by high throughput sequencing'. Seguidamente, se continuó la búsqueda en [PubMed](#). En el buscador se escribió '(Parkinson) AND (RNAseq)' y, en el apartado de filtros, se eligió la opción de 'Free full text'. La elección de los estudios se decidió sobre la base de que los datos proviniesen de muestras de SNC (mesencéfalo o sustancia nigra), tanto de participantes sanos como pacientes parkinsonianos. Por motivos de optimización y agilidad en el análisis, se eligieron estudios que utilizaran RNAseq de grupos neuronales y se descartaron los estudios scRNAseq (single-cell RNAseq). Se analizaron 13 estudios diferentes, 12 en GEO DataSets y uno en PubMed. Se escogieron dos de estos (disponibles en GEO DataSets con el identificador GSE68719, y en el material proporcionado en (Termine et al., 2022)). Los motivos de descarte de los otros restantes fueron por los siguientes motivos: los datos subidos en la web, no especificaba si estaban en formato 'count' o ya estaban normalizados a 'RPKM (lecturas por kilobase millón) /TPM (transcripciones por kilobase millón) /FPKM'. Otro motivo de descarte fue que, al realizar el análisis, se encontraron muy baja cantidad de DEGs (genes diferencialmente expresados). Se efectuó una comparación a partir de los Gene ID entre los DEGs de los dos estudios, generando dos listas según si los genes coincidentes están sobrerrepresentados o infrarrepresentados. Por último, para saber qué función biológica tenía cada gen, se utilizó [QuickGO](#). Se seleccionaron hasta 11 categorías más relevantes del Parkinson (neurogénesis, proliferación de fibroblastos, muerte neuronal, regulación positiva/negativa de la neuroinflamación, diferenciación microglial entre otros).

Para la discriminación y selección de los genes diferencialmente expresados, se realizó un procesamiento y análisis de datos explicado más adelante en el apartado de 'Análisis estadístico'.

4.3.1 Análisis de las ontologías

Posteriormente, se empleó [Enrichr-KG](#) para realizar el análisis de las ontologías genéticas, uno para genes sobrerrepresentados y otro para genes infrarrepresentados. Se priorizó que se incluyera los máximos términos posibles de la librería (GO Biological Process 2021), con un máximo de 50. Seguidamente, las ontologías con prefijo (GO:), fueron introducidas en [Revigo](#), para agrupar ontologías y poder extraer datos más concretos y entendibles.

4.4 Correlaciones al comparar datos entre RNAseq microglía y RNAseq Parkinson

Esta prueba se realizó exclusivamente con genes, no con metabolitos. Se efectuó una comparación entre la lista de genes coincidentes en Parkinson y las tres condiciones estudiadas en el RNAseq de transcriptómica a partir de cultivos primarios de microglía inflamada. Antes de iniciar la comparación se escogieron los genes DEGs de microglía de las tres condiciones y se transformaron los Gene Symbol de *Mus Musculus* a *Homo Sapiens* con la ayuda de [Ensembl Biomart](#). La base de datos utilizada es Ensembl Genes 109, Mouse Genes (GRCm39).

Seguidamente, se generó una matriz de datos donde se especificaba, por cada gen coincidente entre los dos experimentos, en qué condición se había encontrado y si el gen estaba inversa o directamente expresado igual en la microglía tratada con los compuestos que en la lista de genes de Parkinson.

4.5 Análisis interómico

Se escogieron los genes DEGs de Parkinson coincidentes en los dos estudios y se examinaron junto con los metabolitos diferencialmente expresados en pacientes parkinsonianos.

El análisis interómico entre los diferentes experimentos explicados anteriormente se realizó con [MetaboAnalyst](#). Dentro de las funciones dentro de la web, se escogió el tipo de input 'Annotated Features' y los módulos 'Joint-Pathway Analysis' y 'Network Analysis'. Los parámetros utilizados para cada análisis son: en el apartado de genes especificar el tipo de organismo 'Homo Sapiens', el tipo nomenclatura de los genes 'Official Gene Symbol'. En el apartado de metabolitos hay que especificar el tipo de nombre 'Compound Name'. También, se agregaron los valores logarítmicos en base 10 del Fold Change correspondientes a cada componente.

4.6 Análisis estadístico

Se desarrollaron una serie de códigos en Python 3.11 con el editor de texto 'Visual Studio Code', donde se mejoró el análisis y la calidad de datos, la reducción del tiempo de ejecución y la capacidad de poder automatizar procesos y extraer más resultados.

En cualquier ámbito profesional, es esencial compartir información y difundirlos entre la comunidad científica. Por tanto, se vio correcto subir los códigos a un repositorio específico utilizado internacionalmente, tanto a nivel personal como profesional/laboral, llamado GitHub: [Repositorio GitHub Marc](#). En este apartado de mi cuenta de GitHub, se ha explicado y resumido con sumo cuidado los pasos a seguir para ejecutar de forma sencilla y rápida cada código y obtener resultados de forma entendible. Se quiso distribuir el código en diversas fases separadas y bien ordenadas, para que cualquier persona que lo utilice pueda escoger el código en específico que necesita en cada momento. El proceso de uso es intuitivo, simplemente hay que importar los datos a Python, introducir la medida de la matriz de valores (definiendo entre muestras provenientes de pacientes sin la patología y muestras originarias de pacientes enfermos) y ejecutar el código. En todos los casos, el output será exportado a un Excel, donde se ven los resultados.

A continuación, se muestra un esquema con los contenidos para poder tratar y analizar datos originarios de RNAseq. En cualquier caso, parte del código se puede emplear para cualquier otro ámbito como, por ejemplo, en metabolómica, proteómica o genómica.

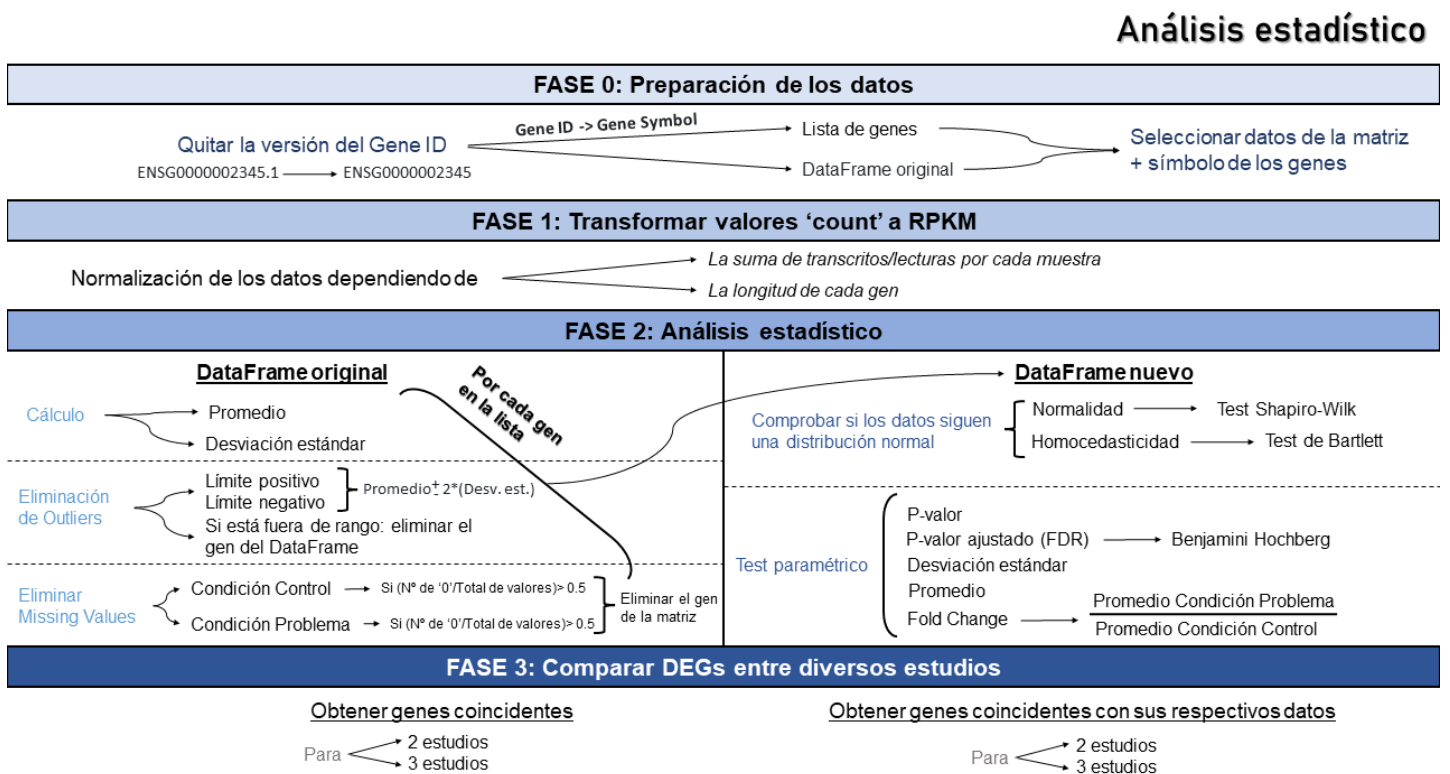


Figura 4. Diagrama en el que se muestran los diferentes pasos realizados durante la creación del código. El esquema está distribuido en diversas fases lineales. En cada una de ellas se muestra los procesos estadísticos que se han realizado con el código. En la fase 1, se normalizan los datos según dos criterios. En la fase 2, se transforma la matriz de datos original (contiene outliers y missing values) a un DataFrame optimizado y limpio, en donde se pueden realizar los análisis pertinentes. En la fase 3, se seleccionan los genes infra/sobrerrepresentados que coinciden entre los 2 o 3 estudios analizados.

El análisis estadístico para metabolómica consistió en realizar un pretratamiento de datos, eliminación de outliers/missing values y test de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (test de Bartlett). En el estudio se extrajeron los metabolitos diferencialmente representados entre las dos condiciones. Se seleccionaron aquellos metabolitos que tenían un p-valor ajustado (Benjamini-Hochberg) <0.05 y un $0.67 > FC > 1.5$.

El proceso utilizado para evaluar los datos de RNAseq de Parkinson se basó en realizar un pretratamiento de datos, normalización de los datos a RPKM, eliminación de outliers/missing values y test de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (test de Bartlett). En estos dos estudios se extrajeron los genes DEG (genes diferencialmente expresados), tanto sobrerrepresentados como infrarrepresentados. Los DEGs tenían un p-valor ajustado (Benjamini-Hochberg) <0.05 y un $0.67 > FC > 1.5$. Cuando se tuvieron estas 4 listas de genes (dos sobrerrepresentados y dos infrarrepresentados), se procedió a comparar qué genes coincidían. Se compararon, por una parte, las dos listas de DEGs sobrerrepresentados y, por otra parte, se compararon los DEGs infrarrepresentados. En Parkinson se obtuvieron 2373 DEGs sobrerrepresentados y 1390 DEGs infrarrepresentados.

5 Resultados

5.1 Metabolómica en muestras de humor acuoso

Se realizó estudio de metabolómica con muestras de humor acuoso de 11 controles sin patología neurológica (controles) y 5 pacientes de PD. Los datos se procesaron según se indica en Métodos y la concentración de cada metabolito se comparó entre los dos grupos, controles y PD. La Figura 5 muestra el “volcano plot” de los resultados.

Cada punto en el “volcano plot” corresponde a un metabolito que está distribuido dependiendo del valor de \log_2 FC (eje x) y \log_{10} p-valor ajustado (eje y). Los compuestos cuya diferencia entre grupos tenga de mayor significancia estadística son los que están más desplazados hacia la derecha. Entre ellos está la levodopa (DOPA) que es la medicación que toman los pacientes (hay una excepción; un paciente aún no ha empezado con la terapia de DOPA). Los metabolitos encontrados e indicados en verde son los de p-valor ajustado < 0.05 ; son principalmente: aminoácidos, aminas biogénicas y acilcarnitinas. El primer dato significativo es que, con muy pocas excepciones, la concentración de los compuestos es más elevada en el humor acuoso de pacientes que en el de controles. La lista de compuestos cuya concentración esta significativamente aumentada en muestras de pacientes y el “fold change” (FC) se indica en la Tabla 1. Un dato remarcable es que la acetilornitina aumentó más de 3 veces. Obviamente la concentración de DOPA, que es la medicación que toma la mayoría de los pacientes, también aumento más de 3 veces.

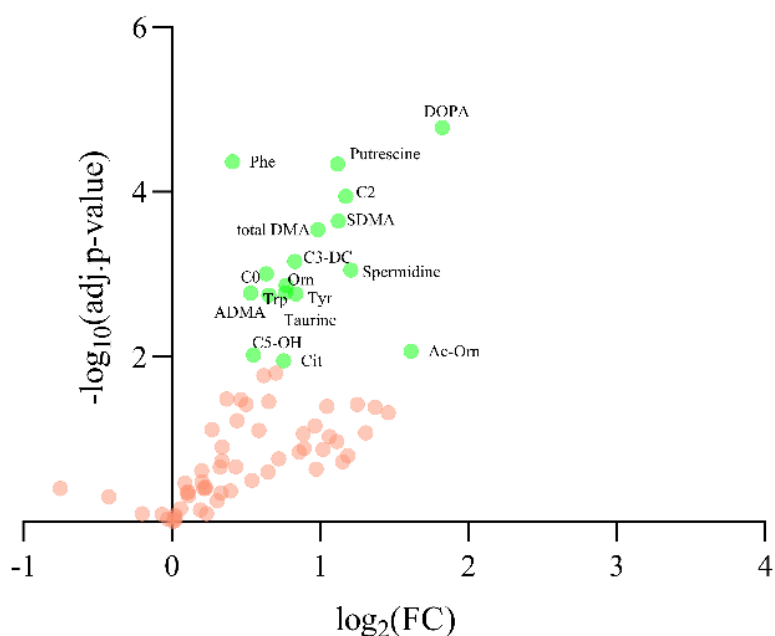


Figura 5. Volcano plot. En verde se muestran los metabolitos que se encuentran con un p-valor ajustado < 0.05 . El eje ‘y’ se representa el $-\log_{10}$ del p-valor ajustado. El eje ‘x’ se representa el \log_2 del Fold Change (FC).

Tabla 1. Lista de metabolitos cuya diferencia entre grupos tiene un p-valor ajustado < 0.05 . Se especifica el símbolo del compuesto, el nombre, a qué clase molecular pertenece, el p-valor ajustado y el “Fold Change” (FC) asociado. El FC se calcula dividiendo la concentración en la muestra de grupo PD entre la concentración en la muestra de grupo control.

SÍMBOLO	NOMBRE	CLASIFICACIÓN MOLECULAR	P-VALOR AJUSTADO	FC
C2	Acetylcarnitine	Acilcarnitina	0.002	2.25
C3-DC (C4-OH)	Hydroxybutyrylcarnitine (Malonylcarnitine)	Acilcarnitina	0.007	1.77
C5-OH (C3-DC-M)	Hydroxyvalerylcarnitine (Methylmalonylcarnitine)	Acilcarnitina	0.042	1.46
C0	Carnitine	Acilcarnitina	0.007	1.55
DOPA	Dihydroxyphenylalanine	Amina biogénica	0.001	3.54
PUTRESCINE	Putrescine	Amina biogénica	0.001	2.16
SDMA	Symmetric dimethylarginine	Amina biogénica	0.003	2.17

SPERMIDINE	Spermidine	Amina biogénica	0.007	2.30
ADMA	Asymmetric dimethylarginine	Amina biogénica	0.009	1.57
TAURINE	Taurine	Amina biogénica	0.009	1.78
AC-ORN	Acetylorntithine	Amina biogénica	0.041	3.06
TOTAL DMA	Total DMA	Amina biogénica	0.003	1.98
PHE	Fenilalanina	Aminoácido	0.001	1.32
ORN	Ornithine	Aminoácido	0.009	1.70
TRP	Tryptophan	Aminoácido	0.009	1.44
TYR	Tyrosine	Aminoácido	0.009	1.70
CIT	Citrulline	Aminoácido	0.047	1.68

La Figura 6A muestra una representación de cajas y bigotes, que permiten visualizar la dispersión de los datos, identificar los valores atípicos (outliers), la simetría respecto a la mediana y la diferencia entre grupos, PD y controles. En la Figura 6A se muestran los datos de los aminoácidos cuya concentración es significativamente diferente entre grupos. El triptófano muestra una gran diferencia entre los dos grupos, donde ningún bigote a caja queda solapado con otro bigote o caja del otro grupo. La condición problema presenta una mayor concentración de datos que el grupo control, con un menor nivel de valores atípicos y con una asimetría positiva, es decir, la mediana está más cerca del cuartil 1 y hay una mayor dispersión de los datos en la zona del cuartil 3. Los resultados de la tirosina son parecidos a los mencionados anteriormente. Se visualiza una distribución diferenciada entre los dos grupos, donde cada condición tiene una matriz de datos bastante concentrada, con poca dispersión. Sin embargo, se muestra un valor atípico en la condición problema y presenta una asimetría negativa, con un bigote menor más largo que el bigote superior. Los dos grupos de la fenilalanina tienen outliers en la zona superior al cuartil 3. Aun así, la dispersión de valores es muy baja y con una simetría bastante centralizada. En los tres diagramas de los siguientes metabolitos se sigue el mismo patrón: hay una gran diferencia de dispersiones entre las dos condiciones, donde el Parkinson presenta una alta difusión de los valores y se solapa parcialmente con el grupo control en el mismo rango de concentraciones. Tampoco hay simetría en

ningún diagrama de Parkinson; la acetilornitina y la ornitina tiene una asimetría positiva; la citrulina tiene una asimetría negativa.

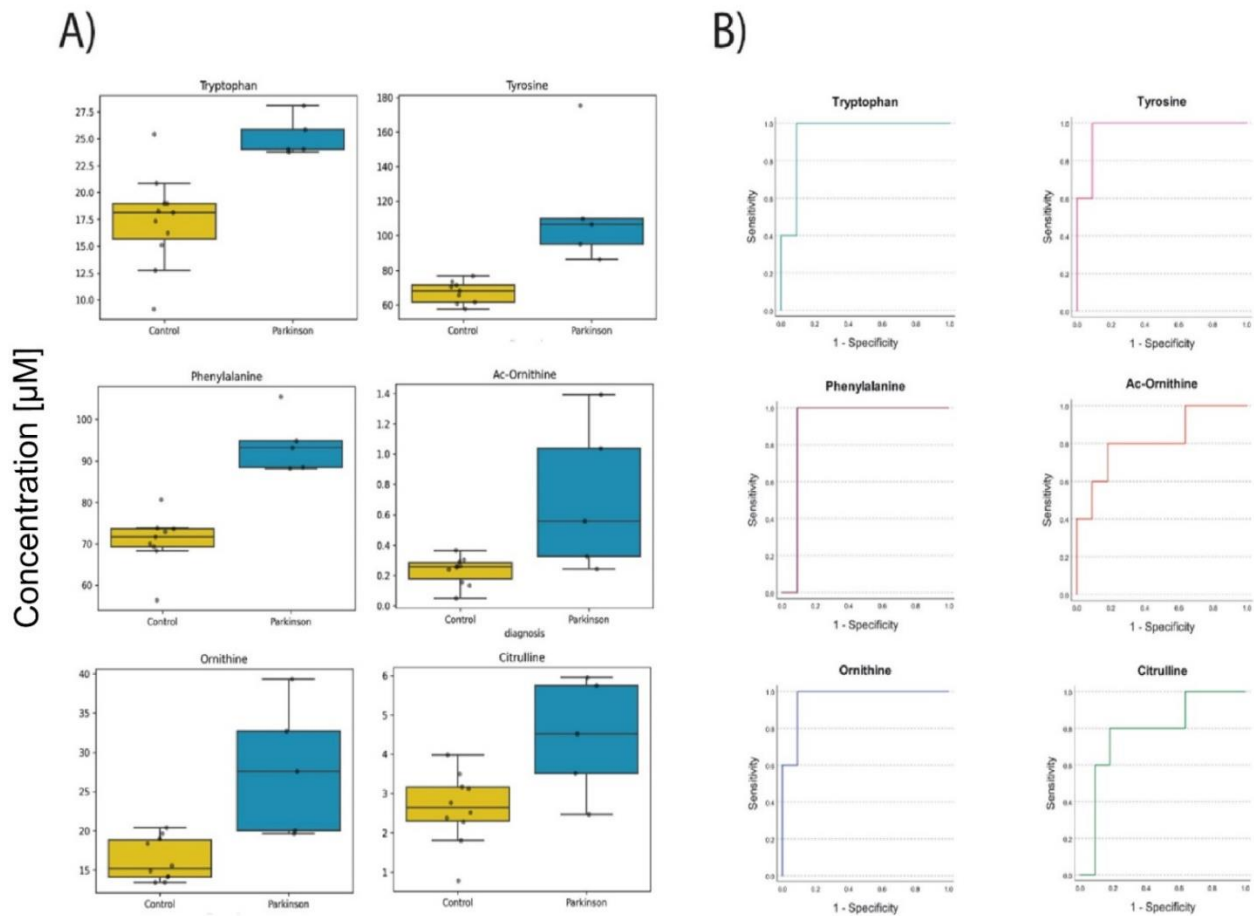


Figura 6. Análisis univariante de los aminoácidos sobrerrepresentados encontrados en el humor acuoso de pacientes con Parkinson. En el panel A, se muestran los diagramas de caja de cada aminoácido de los indicados en la tabla 1. En el panel B se muestra la curva ROC de cada metabolito.

En la Figura 6B se presentan las curvas ROC para cada metabolito de los indicados en la Figura 6A. Las curvas ROC se utilizan para evaluar la capacidad discriminadora de las pruebas diagnósticas. En la curva ROC se representa en el eje y la proporción de pacientes identificados con pacientes (sensibilidad) y en el eje x se representa la proporción de controles identificados, incorrectamente, como pacientes (1-especificidad). Los valores del área bajo la curva para cada uno de los metabolitos se muestran en la Tabla 2.

La curva ROC para cada una de las moléculas en la Figura 6A se muestra en la Figura 6B. Excepto para citrulina y Ac-ornitina, la sensibilidad para los aminoácidos que estaban diferencialmente elevados en el grupo PD fue de 1. La especificidad fue notable, 0,91, para Trp, Tyr, Phe y ornitina, con valores de corte relativamente altos, que oscilaron entre 19,7 μM en el caso de la ornitina y un notable 81,6 μM en el caso de la Tyr.

Tabla 2. Valores de sensibilidad, especificidad y área bajo la curva (AUC) para los compuestos cuya concentración está elevada de manera significativa en las muestras del grupo PD. Las curvas ROC están en los paneles B de las Figuras 6-8.

Metabolito	Sensibilidad	Especificidad	AUC ^a	Cutoff (μM)
C0	1	0.727	0.873	8.975
C2	1	0.909	0.909	1.664
C3DC	1	0.818	0.964	0.009
C5OH	1	0.545	0.809	0.018
Cit	0.8	0.818	0.782	3.507
Orn	1	0.909	0.964	19.658
Phe	1	0.909	0.909	84.417
Trp	1	0.909	0.945	22.308
Tyr	1	0.909	0.964	81.583
AcOrn	0.8	0.818	0.818	0.314
ADMA	1	0.818	0.945	0.244
DOPA	1	0.909	0.982	0.069
Putrescina	1	1	1.000	0.189
SDMA	1	0.909	0.927	0.375
Spermidina	1	0.818	0.945	0.140
Taurina	1	0.727	0.855	14.992
totalDMA	1	0.909	0.927	0.545

^aAUC, Area bajo la curva (*Area Under the Curve*).

En la Figura 7A se muestran los datos de las aminas biogénicas cuya concentración es significativamente diferente entre grupos. Los puntos que configuran la caja de DOPA muestran una mayor dispersión en pacientes y la caja es asimétrica, probablemente debido a que uno de los pacientes no toma DOPA. La espermidina muestra unos datos más concentrados, con un valor atípico en pacientes y una elevada asimetría. El metabolito con una dispersión mayor es la taurina, con una gran asimetría en la caja de controles y pacientes. Las cajas de putrescina, dimetilarginina asimétrica (ADMA) y dimetilarginina total (total DMA) no presentan solapamiento, no hay gran dispersión de valores y tienen elevada simetría.

La curva ROC para cada una de las moléculas en la Figura 7A se muestra en la Figura 7B. Debido a los estrictos criterios de selección de moléculas diferencialmente elevadas, los valores de sensibilidad y especificidad fueron altos para todas las aminas biogénicas. En cuanto a la putrescina, tanto la sensibilidad como la especificidad alcanzaron el valor más alto, 1, con un valor de corte de 0,189 μM . La sensibilidad también fue 1 para las aminas biogénicas restantes, cuya especificidad varió desde 0,73 para taurina hasta 0,91 para DOPA, SMDA y MDA total.

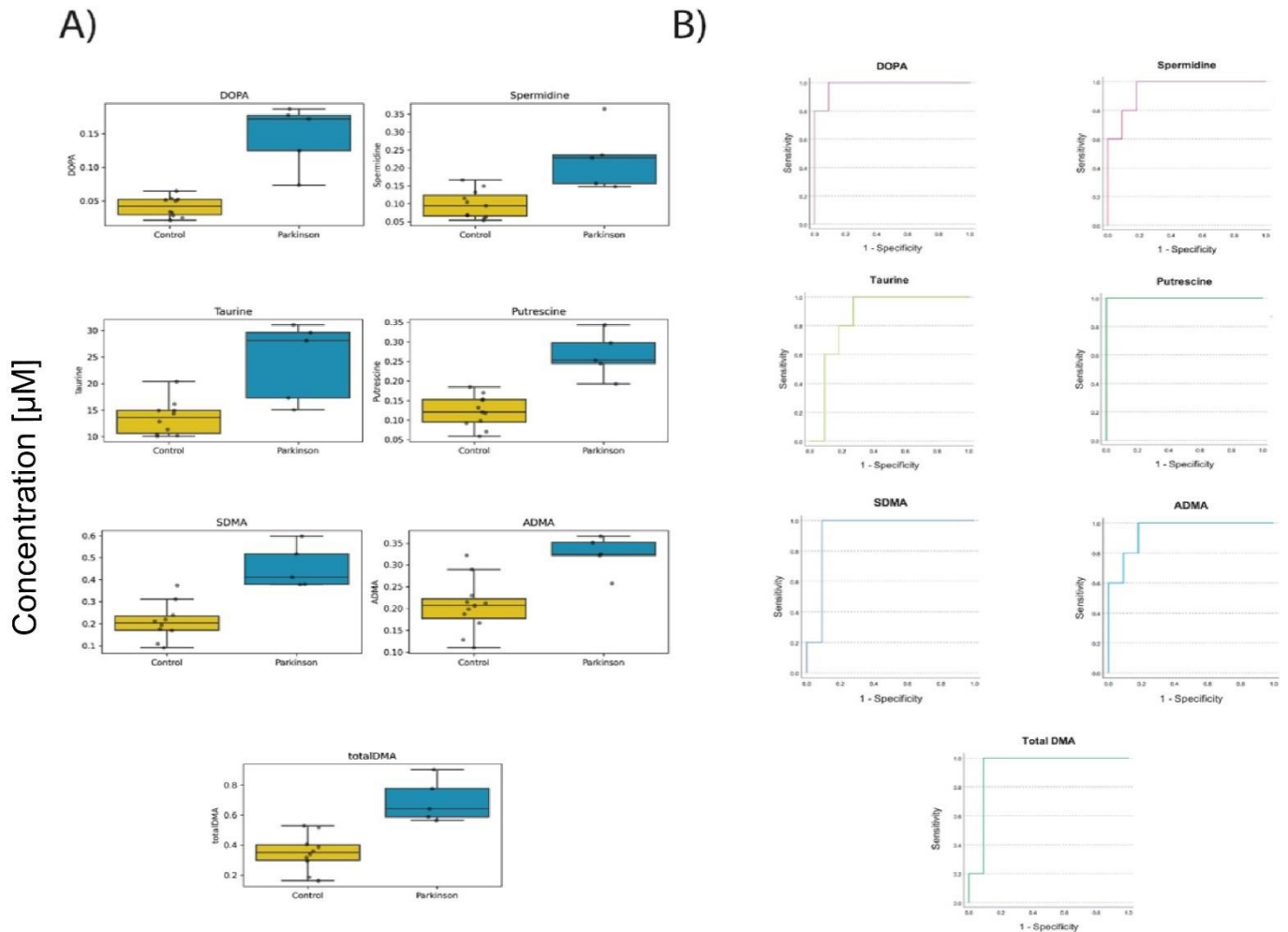


Figura 7. Análisis univariante de las aminas biogénicas sobrerrepresentadas encontradas en el humor acuoso de pacientes con Parkinson. En el panel A, se muestran los diagramas de caja de cada aminoácido de los indicados en la Tabla 1. En el panel B se muestra la curva ROC de cada metabolito.

En la Figura 8A se muestran los datos de las acilcarnitinas cuya concentración es significativamente diferente entre grupos. Hay asimetría en todas las cajas del grupo PD.

La curva ROC para cada una de las acilcarnitinas en la Figura 8A se muestra en la Figura 8B. En todos los casos la sensibilidad fue de 1 mientras que la especificidad varió desde un modesto 0,55 (C5OH) hasta un notable 0,91 (C2). C2 es la acilcarnitina que muestra un aumento significativo en el grupo PD combinado con un punto de corte en el rango micromolar, máxima sensibilidad y alta especificidad, lo que significa que esta acilcarnitina en combinación con un aminoácido de alto puntaje y/o una amina biogénica con puntajes altos podría utilizarse para detectar si un AH dado es de un paciente de Parkinson o de un control. De hecho, es posible distinguir entre un paciente y un control usando AH porque el análisis de componentes principales muestra una buena separación entre los grupos control y PD.

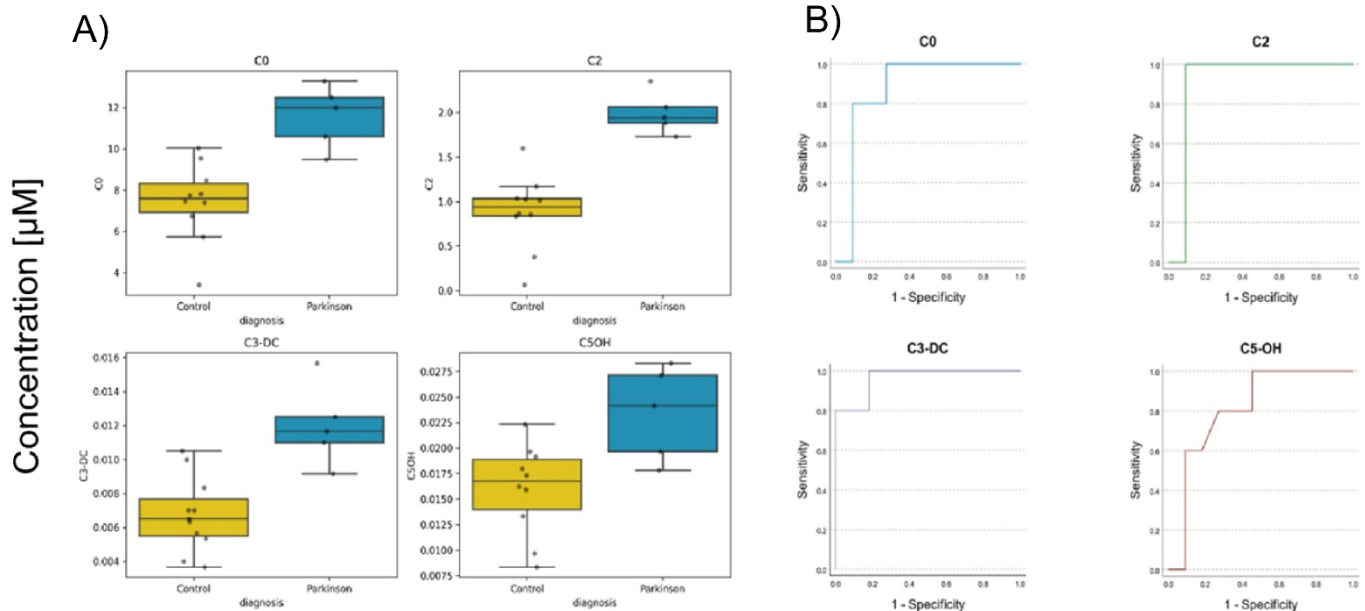


Figura 8. Análisis univariante de las acilcarnitinas sobrerrepresentadas encontradas en el humor acuoso de pacientes con Parkinson. En el panel A, se muestran los diagramas de caja de cada aminoácido de los indicados en la Tabla 1. En el panel B se muestra la curva ROC de cada metabolito.

El análisis de componentes principales (PCA) es un método para poder representar de manera visual y entendible un conjunto de datos no correlacionados entre ellos. Los datos son distribuidos según la dispersión que presentan en diferentes grupos llamados componentes principales (PC1, PC2...) en donde se intenta reducir la dimensionalidad de los datos sin perder la variación original. Como se puede observar en la (Fig. 9A), hay dos grupos bien diferenciados, control y Parkinson representados tridimensionalmente en tres ejes/componentes principales (PC1, PC2 y PC3). Los PC1, PC2 y PC3 explican, respectivamente, el 64,5%, el 10,5% y el 9,0% de la varianza entre grupos. Para comprender el nivel de afectación en un marco bioquímico, la Figura 9B muestra las vías metabólicas que se afectan de manera diferencial, teniendo en cuenta tanto el grado de participación como la proporción de enriquecimiento en cada vía. Como era de esperar para los compuestos cuya concentración está alterada, los datos de metabolómica presentados aquí indican una alteración en el metabolismo de los aminoácidos, incluida la biosíntesis de arginina y el metabolismo de β -alanina y prolina. Sorprendentemente, el análisis de enriquecimiento de vías metabólicas encuentra alteraciones en rutas tan relevantes como el metabolismo del glutatión, la biosíntesis de ubiquinona y la biosíntesis de aminoacil tRNA (Figura 9B).

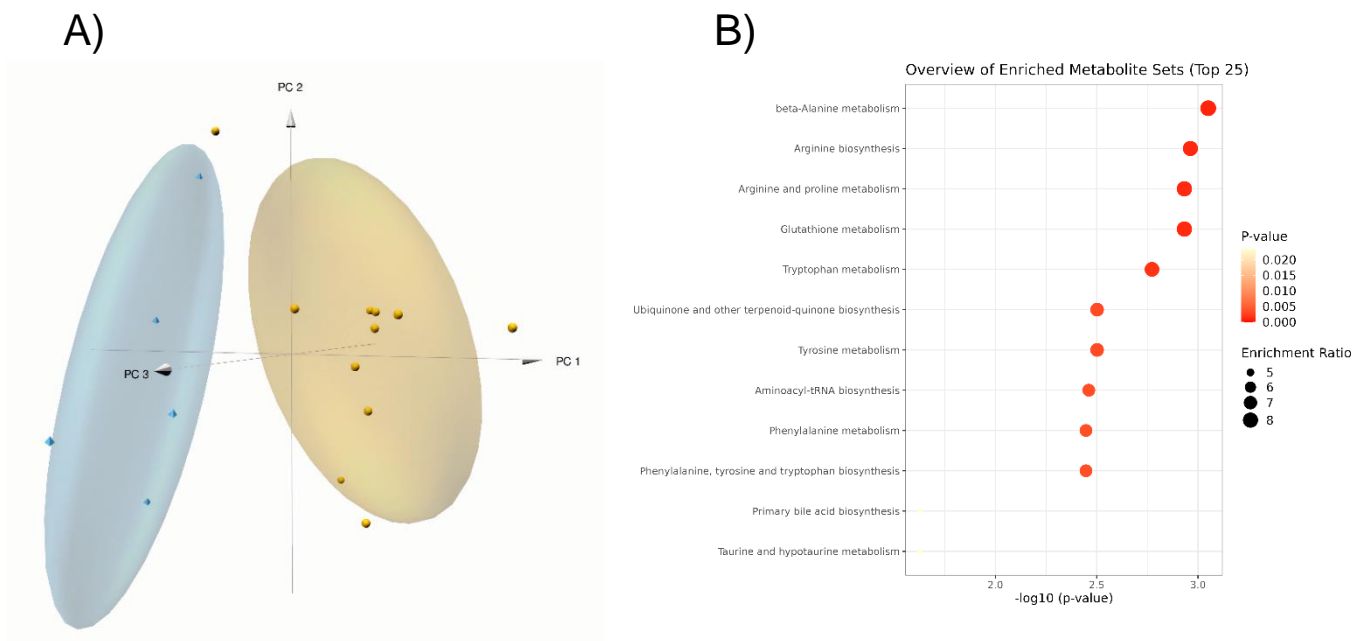


Figura 9. Diagrama de análisis de componentes principales. Vías sobrerrepresentadas en el humor acuoso del paciente de Parkinson. Panel A. El espacio y los datos para los controles están en amarillo y el espacio y los datos para los individuos con Parkinson están en azul. El componente principal (PC) 1, el PC2 y el PC3 explican el 63,53%, el 10,46% y el 9,01% de la varianza entre grupos, respectivamente.

5.2 RNAseq de microglía proveniente de cultivos primarios

Tras analizar los datos de expresión génica en microglía inflamada tratada con antagonistas del A_{2A}R y compararla con la microglía inflamada no tratada con ligandos adenosinérgicos/cannabinoides (control), encontramos que la proporción de genes regulados al alza/regulados a la baja fue cercana a 0,5. Por un lado, los genes que están sobrerrepresentados están involucrados en factores de crecimiento en fibroblastos/astrocitos/células de Schwann, incremento de la proliferación celular (mediadas por las vías MAPK y AKT) y la secreción de colágeno (FGF2, AREG, IL11). También, procesos involucrados en la polaridad y unión estrecha entre células epiteliales (MPP7). Por otro lado, los genes infrarrepresentados están relacionados con la hidrólisis de ATP para el transporte de aminofosfolípidos a la membrana plasmática (el traslado de vesículas transportadoras de hormonas) (ATP8B4), diferenciación de células madre y el reclutamiento de células inmunes efectoras en la inflamación (CXCL3, CCR1, CCL20, C1r/C1s, CXCL13) y estimular la vasodilatación, la relajación muscular y la disminución de la presión sanguínea (F2RL1) (ver Figura 10 panel A).

Cuando se trata la microglía con cannabidiol (CBD), los genes sobrerrepresentados muestran la activación de linfocitos T (TREML2, IL7R), la regulación osmótica en el transporte transmembranal de neurotransmisores (SLC6A12), la estimulación de vías proinflamatorias como MAPK, STAT, NF-kappa B, Rho y el aumento de los niveles de calcio intracelulares (F2RL1, SIRPB1, PROKR1). Los genes infrarrepresentados se vinculan a vías que están implicadas en las uniones entre células

'tight junctions' o canales GAP (CPXM1, GJB2), promueven el colapso y parálisis neuronal (SEMA3A), transportar aminoácidos catiónicos hacia el lisosoma y presente en fibroblastos, neuronas y tejido ocular/retina (SLC7A14), inhibición en la citotoxicidad de las Natural Killer (NK) (KLRB1), estimulador de adenilatos ciclasa que provocan un aumento de cAMP (PTGDR, LTB4R2, CXCL13) y reducción del estrés celular (FOXL2) (ver Figura 10 panel B).

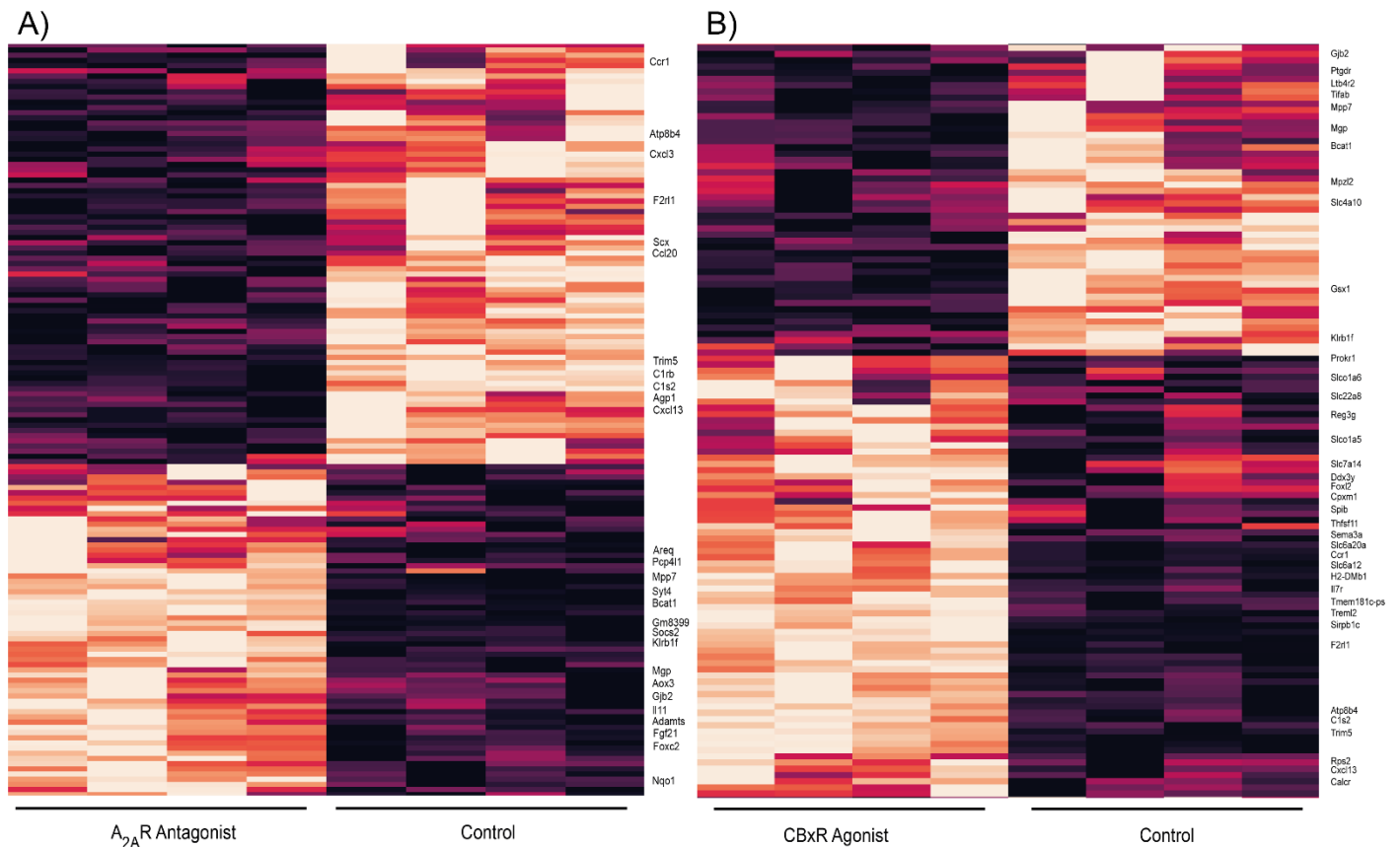


Figura 10. Heatmaps de los genes expresados diferencialmente en la microglía activada. Se representan solo aquellos genes que, al comparar el control y el tratamiento antagonista, cumplen los criterios: $FDR < 0.05$ y $0.67 > FC > 1.5$. Los colores más oscuros indican una menor expresión génica en la microglía tratada, mientras que los colores más claros indican una mayor expresión génica en la microglía tratada. **A)** Las columnas indican la muestra (cuadruplicados para cada condición: control en las 4 columnas de la derecha y tratado con el receptor A_{2A} Antagonista en las 4 columnas de la izquierda). Solo se muestra el nombre de los genes relacionados con el estrés oxidativo, la inflamación y las vías relacionadas con las citocinas. **B)** Las columnas indican la muestra (cuadruplica para cada condición: control en las 4 columnas de la derecha y tratado con el agonista del receptor CB_2 (CBD) en las 4 columnas de la izquierda). Solo se muestra el nombre de los genes relacionados con el estrés oxidativo, la inflamación y las vías relacionadas con las citocinas.

La minoría de los DEGs en presencia de los dos compuestos hay notablemente menos proporción de genes sobrerrepresentados, donde se estimula una regulación negativa de la exocitosis dependiente de calcio (GPR17) y la producción de hidroquinonas antioxidantes (NQO1). Los genes infrarrepresentados están relacionados con la regulación positiva en la migración de linfocitos T, la señalización mediada por quimiocinas y la agregación de plaquetas (CXCL12, IL7R, CCR1, ATP8B4, AQP1, PF4). También, se observa una regulación de procesos apoptóticos (NLRP1C-PS) (Figura 11).

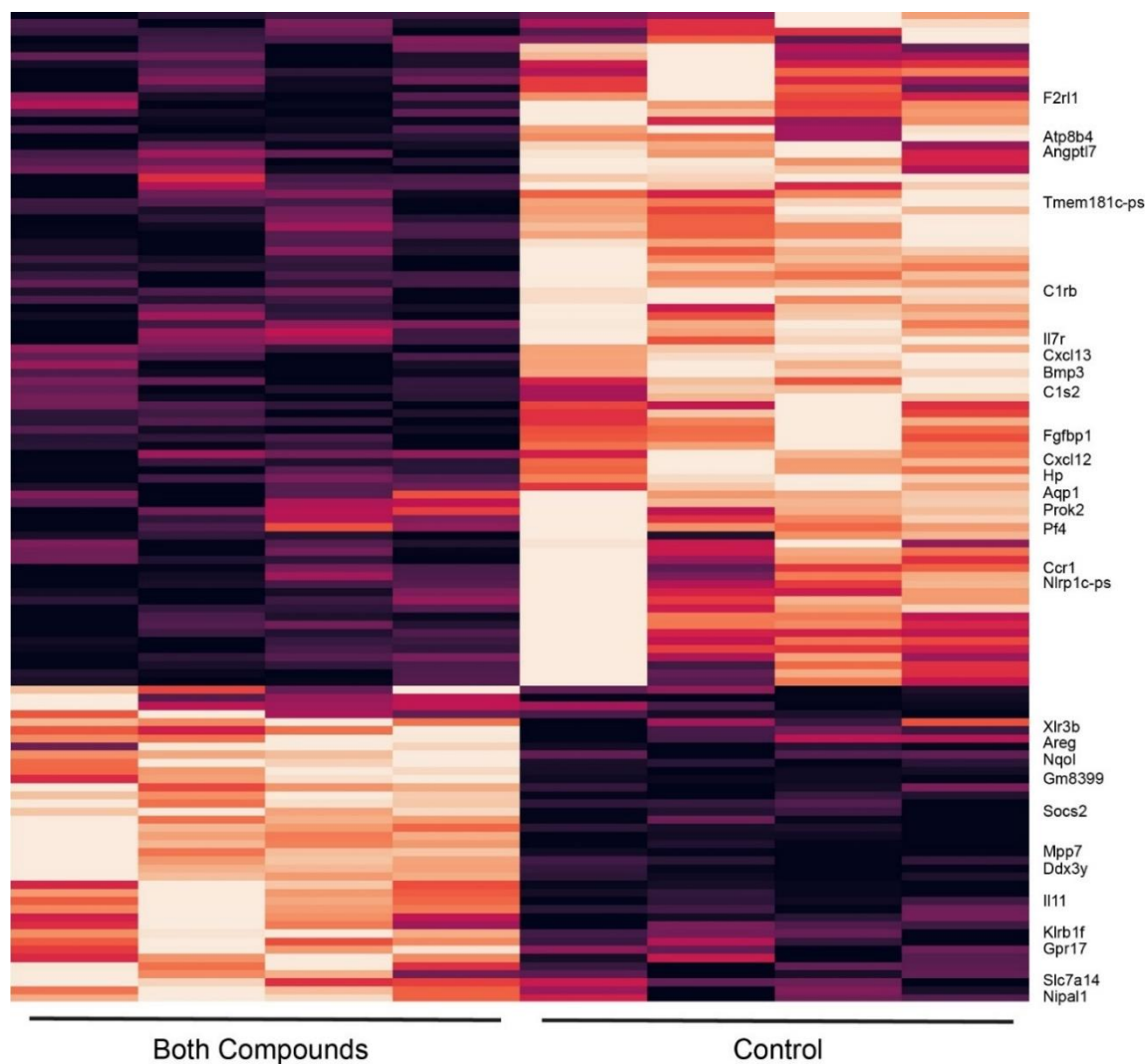


Figura 11. Heatmap de los genes expresados diferencialmente en la microglía activada tratada con ambos compuestos. Las columnas indican la muestra (cuadruplicados para cada condición: control en las 4 columnas de la derecha y tratado con el Antagonista del receptor A_{2A} y CBD en las 4 columnas de la izquierda). Solo se muestra el nombre de los genes relacionados con el estrés oxidativo, la inflamación y las vías relacionadas con las citocinas. El mapa de calor muestra solo aquellos genes que, al comparar el control y el tratamiento antagonista/agonista, cumplen los criterios: $FDR < 0,05$ y $0.67 > FC > 1.5$. Los colores más oscuros indican una expresión génica regulada a la baja en la microglía, mientras que los colores más claros indican una expresión génica regulada al alza.

En el análisis de ontologías realizado a partir de los DEGs sobrerrepresentados en las tres condiciones se ha observado la implicación en la regulación negativa de la respuesta inflamatoria. La diferenciación celular y la proliferación se ven afectadas. También, la producción y estimulación del estradiol disminuye las condiciones inflamatorias y, promueven un fenotipo M2 de la microglía (Figura suplementaria 7). Los genes infrarrepresentados en microglía tratada con el antagonista de $A_{2A}R$ están asociados a la activación de la respuesta inmunitaria (Fig. 12). Además, la implicación de estos genes en el reclutamiento/motilidad de leucocitos, mediado por quimiocinas, y la vasodilatación del epitelio es remarcable. Si se observa en la condición tratada con CBD, se infrarrepresentan los procesos de diferenciación a células inmunitarias y el transporte aniónico transmembranal. Por último, la microglía en presencia de los dos compuestos presenta una

citoquinas (GO:0001819), procesos apoptóticos (GO: 0042981, GO: 2001235, GO:0008630) y una regulación a la baja de la proliferación celular (GO: 0042127, GO: 0008284).

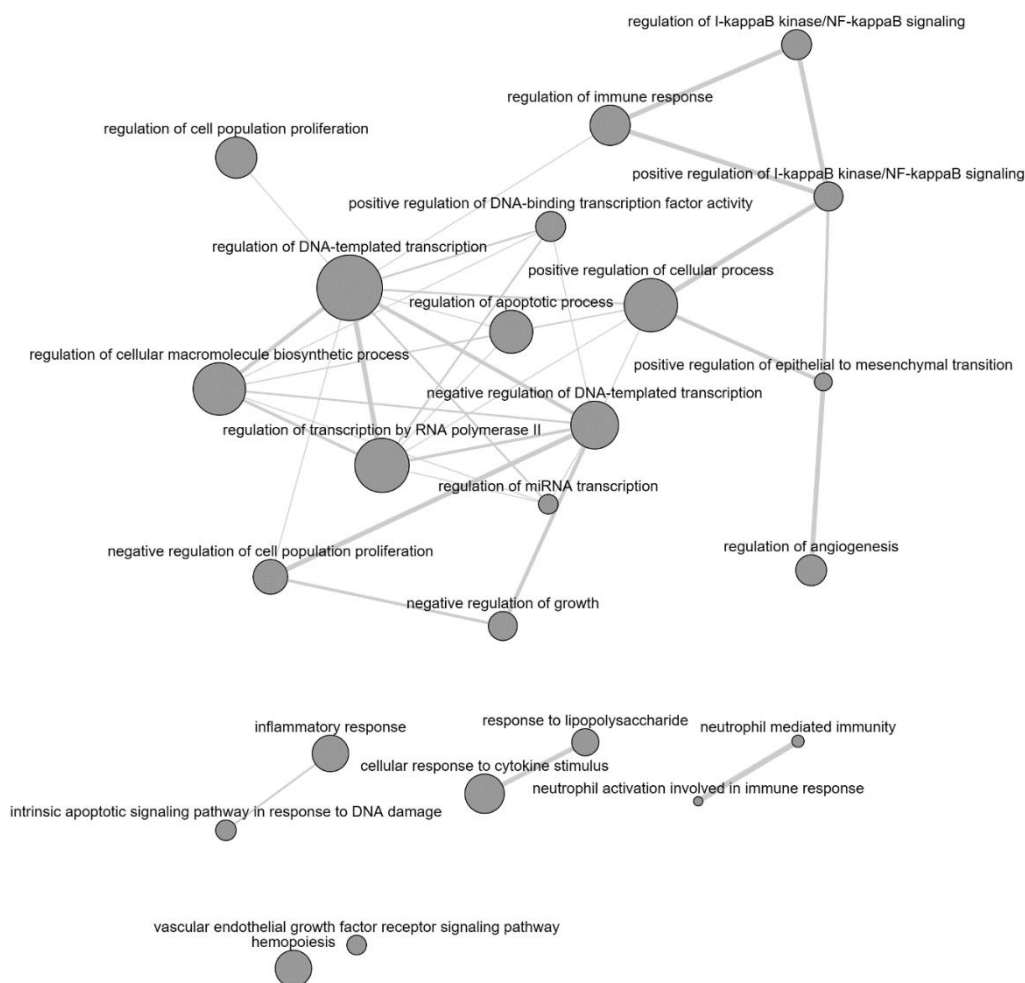


Figura 13. Mapa conceptual de los eventos más relevantes en la enfermedad de Parkinson. Eventos patológicos e inmunológicos encontrados en estudios con pacientes control y pacientes parkinsonianos. Los datos mostrados provienen de genes DEGs sobrerrepresentados en muestras de Parkinson analizados por RNAseq.

Respecto a los genes infraexpresados en ambos estudios, se encontraron 1390 DEGs coincidentes con niveles de expresión más bajos en pacientes parkinsonianos respecto el control, en los dos estudios. Al realizar el análisis de ontologías y el mapa conceptual representado en la (Fig. Suplementaria 11), se observa una asociación con la regulación negativa de la neurogénesis y cicatrización (GO:0010975), afectación en la interacción sináptica neuronal y el potencial de acción (GO:0007416, GO:2000649, GO:0071277), regulación a la baja de la producción de dopamina (GO:0007269), regulación de la señalización de los receptores de glutamato y glicina es anómala (GO:0051966) y el transporte anterógrado sináptico en el reciclaje de neurotransmisores (GO:0098916).

5.4 Correlaciones al comparar datos entre RNaseq microglía y RNaseq Parkinson

Se quiso saber si los genes obtenidos en microglía tratada con el antagonista de A_{2A}R y cannabidiol generaban una respuesta transcripcional que podría contrarrestar las alteraciones transcripcionales encontradas en las muestras de pacientes parkinsonianos.

En la (Tabla suplementaria 1) se muestran los genes inversamente expresados entre los dos conjuntos de datos (microglía tratada con antagonista del receptor A_{2A} y muestras de pacientes con Parkinson). Se detectó que la mayoría de los procesos biológicos están asociados con la neuroinflamación, la respuesta/migración inmunitaria, y la apoptosis.

En la Figura 14 se visualiza un gran grupo de nodos relacionados con señales proinflamatorias. Entre todos estos procesos, los más destacables son la producción y respuesta de ROS (GO:0019886, GO:0002495), la interacción entre los antígenos/péptidos que se unen a MHC (GO:2001188), la regulación de la respuesta inflamatoria (GO:0051092, GO:0070372, GO:0070374), la regulación de la muerte neuronal (GO:0010942, GO:0010941), entre otros. En conclusión, estos resultados sugieren que el tratamiento con antagonistas de A_{2A}R pueden revertir las modificaciones transcripcionales que se han reportado en enfermos de Parkinson.

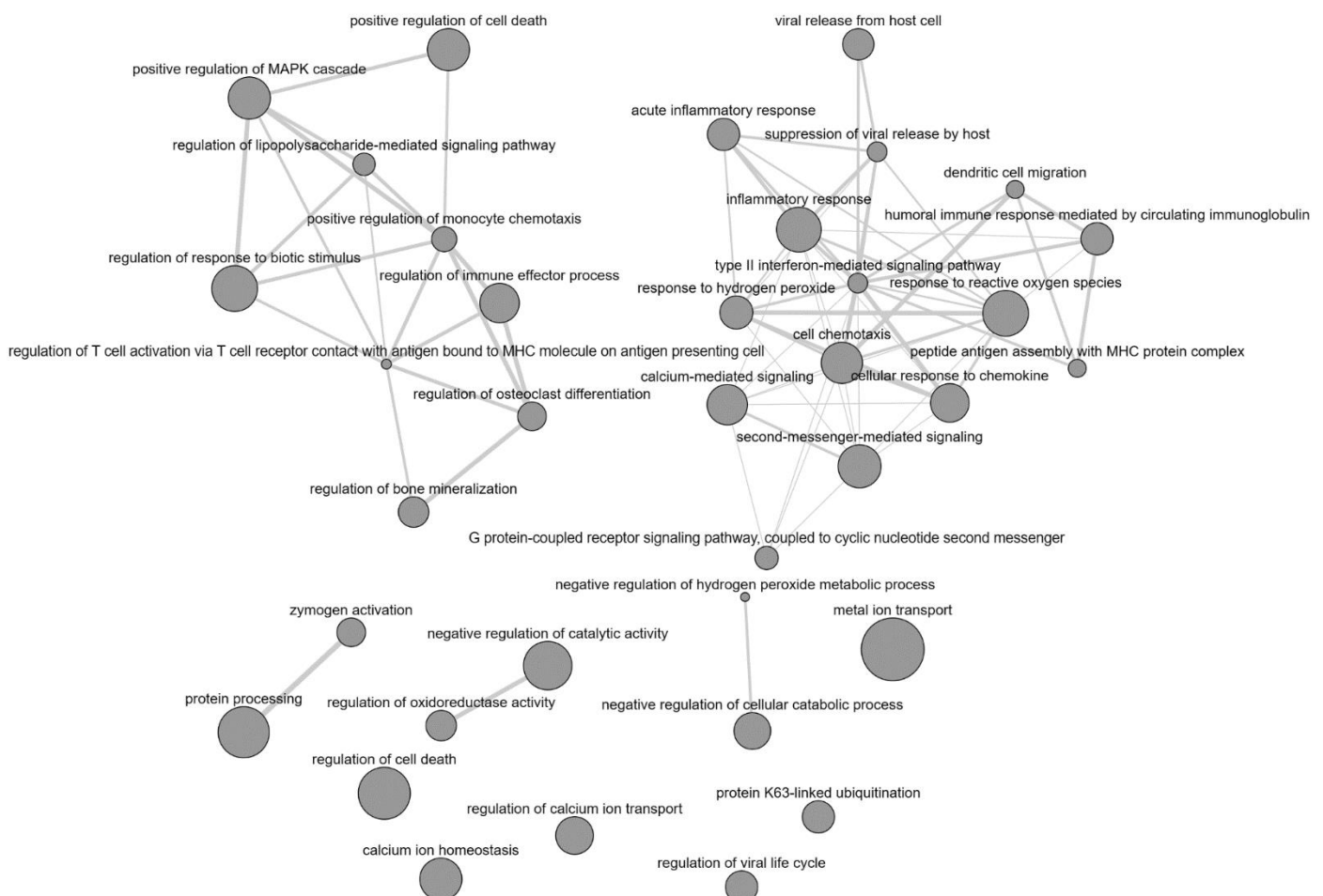


Figura 14. Mapa de redes donde se asocian diferentes procesos biológicos o nodos. Ontologías provenientes de genes coincidentes entre: los que están sobrerrepresentados en el RNAseq de muestras parkinsonianas y los que están infrarrepresentados en el RNAseq de microglía inflamada y tratada con el componente SCH 58261 (2270), antagonista de A_{2A}. Los nodos con mayor cercanía y con más interacciones, establecen más conexiones y comparten la misma identidad de clúster. Los nodos con un tamaño mayor son más relevantes dentro de los datos analizados.

En la Figura Suplementaria 12 se muestra un grafo con los GOs obtenidos al analizar los genes que están sobrerrepresentados en microglía tratada con A_{2A}R y que están infrarrepresentados en Parkinson. Se encontraron vías relacionadas con la neurogénesis (GO:1903859, GO:0045955), la extensión dendrítica (GO:1903859, GO:1903861), tráfico vesicular (GO:1903307, GO:0099518), entre otras.

Los genes que están infrarrepresentados en microglía tratada con cannabidiol y sobrerrepresentados en Parkinson representados en la (Fig. Suplementaria 14). Los resultados muestran rutas asociadas a la vasodilatación y diferenciación celular (GO:0150105, GO:2001214), oligopolimerización de filamentos de actina (GO:0008154, GO:0032970), la vía MAPK (GO:0070373, GO:0043409), la adhesión leucocitaria (GO:0051893, GO:0098742) y la regulación del ciclo celular entre las fases G1 y S (GO:2000134, GO:2000134).

Cuando se analizan los GOs que están infrarrepresentados en la microglía tratada con ambos compuestos y sobrerrepresentados en las muestras de pacientes con Parkinson (Fig. Suplementaria 16). En esta sección están implicadas las vías de plasminógeno y el procesamiento proteico (GO:0031638), interacciones entre péptido/MHC (GO:0002501, GO:0019886), la vía clásica del sistema del complemento (GO:0006958, GO:0042116, GO:0006954), la motilidad/proliferación/quimiotaxis/desgranulación de los leucocitos (GO:0060326, GO:0043312, GO:0002283) y la remodelación citoesquelética y la apoptosis (GO:0010941, GO:0032680).

Cuando se analizan los GOs que están sobrerrepresentados en la microglía tratada con ambos compuestos e infrarrepresentados en las muestras de pacientes con Parkinson. Los genes están representados en un mapa de redes en la Figura suplementaria 17. Los procesos biológicos afectados más relevantes son: la secreción de catecolaminas, como la dopamina y adrenalina (GO:0050433, GO:0014059), la extensión de las dendritas y el transporte de iones se muestra con niveles de expresión altos (GO:1903859), mejoría del tráfico vesicular/reciclaje de neurotransmisores (GO:0099518, GO:0043269), regulación del ciclo celular en las fases G1 y S (GO:0000082, GO:0044843), la extensión de las dendritas (GO:1903861) y la biosíntesis de aminoácidos (GO:0009083, GO:0009081).

5.5 Análisis interómico

Los procesos biológicos mostrados en la Tabla Suplementaria 4, un total de 91, son una selección de las rutas más relevantes e importantes que están asociadas con la enfermedad del Parkinson y el tejido cerebral/neuronal. Los resultados originales extraídos alcanzan la suma de 161 vías diferencialmente representadas. El descarte de los procesos se basa en que muchos de éstos no están relacionados directamente con patologías neurodegenerativas, sino que están vinculados con carcinomas, tumores, cáncer, leucemia e infecciones. Los resultados obtenidos se observan de forma conceptual, hay más vías relacionadas con la neuroinflamación que con la neurodegeneración y muerte neuronal. En la Tabla 3 se muestran los procesos más relevantes de la Tabla Suplementaria 4, ubicada en anexos.

Los resultados muestran la presencia de grandes cantidades de receptores de membrana como los de tipo Notch, los ErbB, los TLR/Dectin/Mincl (estimulados por las lectinas de tipo C), los TCR, los MHC, los receptores acoplados a proteínas JAK (activados por leptinas/ prolactina/ interferones/ interleucinas), el IL-17R (reconoce IL-17). También, las cascadas de señalización activadas a un mayor nivel son: MAPK, JAK, STAT, ERK1/2, MEK1/2, JNK, PPAR β/γ , AKT, Wnt/ β -Catenin, FOXO, mTOR, HIF-1 y PI3K. Por último, hay varios procesos biológicos sobrerrepresentados; los más relevantes están relacionados con la proliferación celular (MYC, DCT, BAX, AXL), la supervivencia/apoptosis (FOS, GLUL, CRH, CDK2) (Putrescina, Ornitina, Taurina, L-DOPA), la síntesis de ácidos grasos (GOT1), la citotoxicidad (SMOX) (Espermidina), la secreción de citocinas y ROS (MPO) (Taurina), la vasodilatación (NOS3, NOS2, ITGAM) (ADMA, Ornitina), la migración/motilidad (ADA) (Espermidina), el tráfico vesicular mediado por el sistema SNARE (GRIK1, SNCA), la sinapsis dopaminérgica (CALM1, ATP1A1, GAD1) (L-Tirosina, L-Fenilalanina) y la neuroinflamación (ADORA2A, SNCA, SMO, ITCAM1, IGF1).

Tabla 3. Procesos biológicos encontrados al realizar un análisis interómico entre los genes DEGs de Parkinson y los metabolitos significativamente expresados en el humor acuoso de pacientes parkinsonianos. En color naranja se indican las vías de transducción de señales. En color verde se muestran los procesos relacionados con el reclutamiento celular y la vasodilatación. En color azul se indican las rutas inflamatorias implicadas. En color violeta se observan los procesos apoptóticos y de muerte neuronal. En color rojo se visualiza las rutas asociadas a la enfermedad del Parkinson. Los procesos mostrados tienen un p-valor ajustado (FDR) < 0,05.

Procesos Biológicos	p-valor	FDR	Impacto
MAPK signaling pathway	4.99e-17	5.51e-15	1.16
Ras signaling pathway	5.29e-13	2.65e-11	1.22
PI3K-Akt signaling pathway	8.79e-13	3.64e-11	1.02
TNF signaling pathway	4.22e-09	4.99e-08	0.69
T cell receptor signaling pathway	5.49e-07	3.49e-06	1.5
mTOR signaling pathway	1.09e-06	6.56e-06	0.79
Toll-like receptor signaling pathway	1.53e-05	6.60e-05	1.35
JAK-STAT signaling pathway	8.05e-05	0.00029	2.38

VEGF signaling pathway	0.01	0.021	1.03
Tight junction	1.26e-07	9.33e-07	1.14
Cell adhesion molecules (CAMs)	9.79e-07	6.002e-06	0.46
Leukocyte transendothelial migration	1.30e-06	7.34e-06	1
B cell receptor signaling pathway	5.21e-10	8.62e-09	1.32
Th1 and Th2 cell differentiation	3.36e-09	4.12e-08	1.43
Regulation of actin cytoskeleton	2.10e-08	1.83e-07	1.40
Fc gamma R-mediated phagocytosis	2.72e-07	1.83e-06	1.42
Natural killer cell mediated cytotoxicity	0.0003	0.0009	1.32
Apoptosis	6.81e-11	1.67e-09	1.23
Cellular senescence	6.02e-10	9.49e-09	1.14
Synaptic vesicle cycle	1.29e-07	9.34e-07	0.44
Axon guidance	5.39e-11	1.48e-09	1.19
SNARE interactions in vesicular transport	0.0005	0.0016	0.36
Dopaminergic synapse	0.0009	0.0027	0.72
Growth hormone synthesis, secretion and action	0.002	0.0059	1.06
Protein processing in endoplasmic reticulum	0.002	0.0061	0.22
Prion diseases	0.005	0.013	0.15

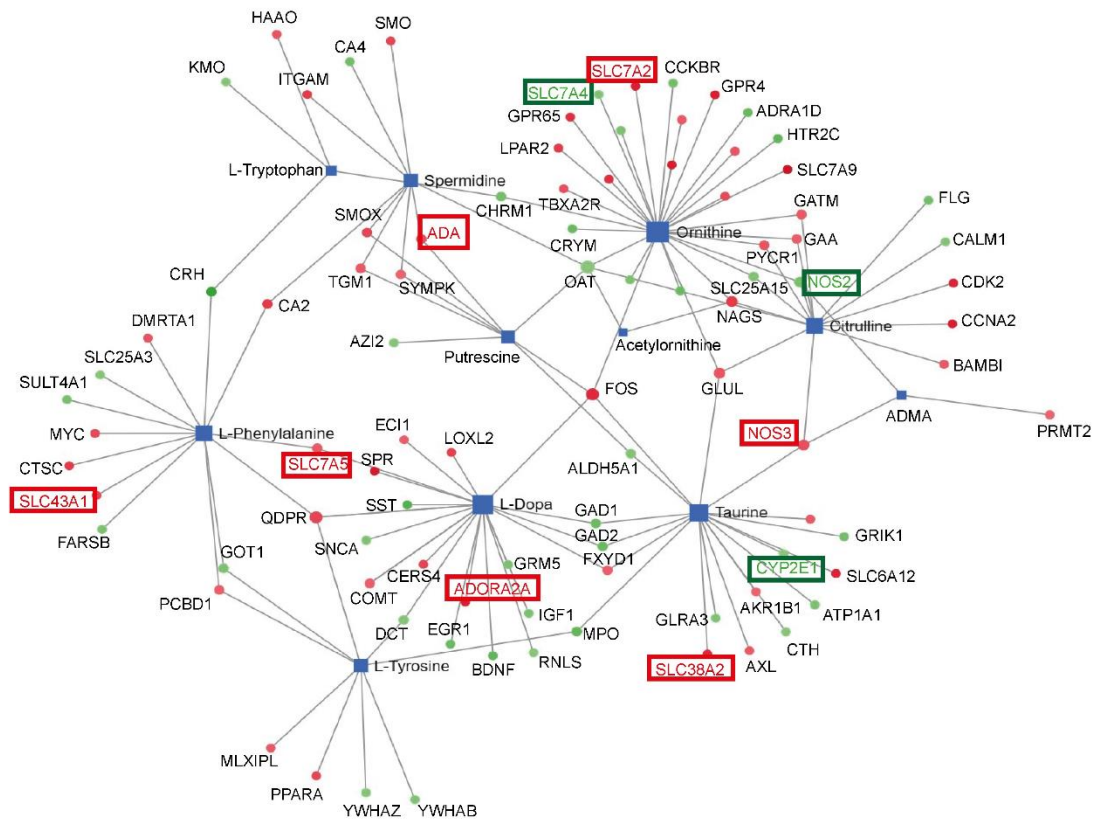


Figura 15. Mapa de redes donde se representa las relaciones genéticas y metabólicas. Los nodos cuadrados y de color azul indican los metabolitos diferencialmente expresados en pacientes parkinsonianos. Los nodos circulares de color rojo indican los genes que están sobrerrepresentados en muestras de pacientes con Parkinson. En cambio, los nodos circulares de color verde representan los genes infrarrepresentados. Los genes coloreados y remarcados con un rectángulo son los DEGs más relevantes en procesos neuroinflamatorios y neurodegenerativos.

6 Discusión

La medicina personalizada, también conocida como medicina de precisión o medicina individualizada, es un enfoque de la atención médica que considera las características únicas de un individuo, incluida su composición genética, estilo de vida, entorno y datos clínicos, para adaptar las decisiones médicas y los tratamientos específicamente para esa persona. Su objetivo es proporcionar intervenciones de atención médica más efectivas y específicas, que conduzcan a mejores resultados para los pacientes.

La medicina personalizada y la bioquímica clínica son campos entrelazados que trabajan juntos para optimizar la atención al paciente. El análisis de marcadores bioquímicos e información genética es esencial para que la medicina personalizada identifique características específicas de enfermedades, prediga la respuesta al tratamiento y controle los resultados del tratamiento.

La bioquímica clínica proporciona datos valiosos sobre biomarcadores que se pueden utilizar en la medicina personalizada, como identificar variantes genéticas específicas asociadas con el metabolismo de fármacos o evaluar los niveles de biomarcadores que indican la respuesta de un paciente a una terapia particular. Esta información ayuda a los proveedores de atención médica a tomar decisiones informadas sobre la selección del tratamiento, los ajustes de dosis y las estrategias de monitoreo adaptadas a cada paciente individual.

La metabolómica proporciona información relevante sobre el fenotipo metabólico de un individuo, lo que permite la identificación de biomarcadores, la predicción de las respuestas a los medicamentos y las intervenciones de estilo de vida personalizadas. La metabolómica si se combina con los datos proporcionados de otras ómicas desempeña un papel crucial en la medicina de precisión al proporcionar información crucial sobre el fenotipo metabólico de un individuo, que puede influir en la susceptibilidad a la enfermedad, la respuesta al tratamiento y el estado general de salud. Los datos de metabolómica presentados en este trabajo constituyen un ejemplo de cómo esta ómica puede contribuir a la identificación de biomarcadores específicos de PD. Estos biomarcadores, en último extremo deben ser útiles para la detección temprana, el diagnóstico, el pronóstico y/o la respuesta al tratamiento terapéutico.

A diferencia de lo reportado para el caso de diabetes de tipo 2, en el que solamente un metabolito de los presentes en el humor acuoso, N-acetilornitina, permite identificar a una muestra como de control o de paciente (Lillo et al., 2022), son varios los metabolitos que se deberían considerar para distinguir entre controles y pacientes de Parkinson. Uno de ellos podría ser la propia amina biogénica, N-acetilornitina, pero habría que considerar uno o dos más de los que no varíen en diabetes ni en controles. Los posibles candidatos podrían ser seleccionados en los otros grupos de metabolitos cuyo nivel está alterado en PD (recogidos en la Tabla 1): aminoácidos y acil-carnitinas. En conjunto, estos dos-tres biomarcadores pueden guiar las decisiones de tratamiento en medicina de precisión al indicar subtipos de enfermedades, predecir la respuesta al tratamiento y monitorear

la progresión de la enfermedad. El trabajo muestra que la aproximación metabolómica es útil, si bien hay que tener en cuenta la limitación de que, en la práctica, no será posible extraer humor acuoso de los pacientes para monitorear el curso de su enfermedad.

Los biomarcadores para enfermedades neurodegenerativas se han basado más en técnicas genómicas y proteómicas que en metabolómicas. La genómica ha permitido identificar genes que pueden explicar algunos de los casos de PD, aquellos que son heredables (Ferrazza et al., 2016; Madeo et al., 2012; Moore et al., 2005). Sin embargo, la mayoría de los casos son idiopáticos y, dado que tienen en común la presencia de agregados de α -sinucleína, se ha considerado que esta proteína podría ser un biomarcador. Por mecanismos no totalmente establecidos, pero que podrían incluir la transmisión por exosomas, la α -sinucleína puede aparecer en plasma y en fluido cerebroespinal (CSF). Por el momento no se considera que la determinación de la concentración de α -sinucleína en plasma o CSF sea un biomarcador único, es decir, que se requieren biomarcadores complementarios (M. Guo et al., 2020; Iranzo et al., 2021; Kwon et al., 2022).

Para que la metabolómica fuera una herramienta que permitiera la detección de biomarcadores realmente útiles, se requería de una nueva metodología que permitiese el análisis de muchos compuestos de manera simultánea y con pocos microlitros de muestra. La metodología desarrollada recientemente por Biocrates, usada en este TFG ha supuesto un cambio de paradigma porque resuelve ambos problemas. En humor acuoso se puede determinar la concentración de unas decenas de compuestos, mientras que en plasma ya se pueden determinar, de manera simultánea, la concentración de unos 400 compuestos. El uso de la metodología en plasma de controles y de pacientes de PD ha permitido sugerir que un panel de seis metabolitos podría ser útil para el seguimiento de la enfermedad (Klatt et al., 2021a). Como ocurre con nuestros datos en humor acuoso, la concentración de los seis compuestos aumenta en el plasma de pacientes. El modelo multivariable usando, para distinguir entre plasma de PD y de controles, los niveles de 3-hydroxy-L-kynurenine, aspártico, β -alanina, homoserina, ornitina y tirosina daría un área bajo la curva 0,905, con una fiabilidad (sensibilidad) del 86% (Klatt et al., 2021b). Los datos de área bajo la curva y de sensibilidad son mejores en el caso de emplear los metabolitos que se han identificado en el humor acuoso (ver en Figura 6), con la limitación, ya comentada, de que no es plausible el uso de dicho fluido para el seguimiento de pacientes de PD.

La metabolómica permite aportar información sobre qué rutas metabólicas están alteradas en PD. Los metabolitos encontrados están asociados a rutas metabólicas interconectadas entre sí (véase en Figura 16). Teniendo en cuenta los datos de humor acuoso resulta evidente, y era esperable, que hubiera alteración de los niveles de acilcarnitinas, puesto que las mitocondrias de las neuronas que degeneran están alteradas y las carnitinas son clave para el transporte de lípidos de través de las membranas mitocondriales (Franco et al., 2019; Franco & Serrano-Marín, 2022). Los datos de este trabajo y los reportados en plasma (Klatt et al., 2021c) coinciden en alteraciones en la ruta

triptófano/kinurenina y en el metabolismo de las poliaminas. Los datos de humor acuoso también apuntan a alteraciones importantes en el metabolismo de la arginina. Cinco son los metabolitos cuyos niveles se han encontrado alterados en el humor acuoso de pacientes y participan en el metabolismo de la arginina: citrulina, N-acetilornitina, ADMA, SDMA and DMA total (Figura 7).

Por otro lado, dado su potencial para estimular la hormona del crecimiento, la administración de arginina exógena se ha empleado para la diagnosis diferencial del PD (Pellecchia et al., 2006). Sin embargo, el metabolismo de la arginina no está directamente asociado con el de las catecolaminas en general y el de la dopamina en particular. Por tanto, no se ha prestado mucha atención a como la arginina y los productos de su metabolismo pueden verse afectados en PD y/o pueden impactar en los mecanismos de neurodegeneración. Una posibilidad que se debería explorar es si las alteraciones en los niveles de arginina tienen relación con alteraciones en la producción de óxido nítrico, que es producido a partir del aminoácido. En efecto hay evidencia de que la plasticidad derivada de neurodegeneración y de la medicación (L-DOPA en PD) es mediada, al menos en parte, por el óxido nítrico (revisiones recientes: (Liy et al., 2021; Shen et al., 2022)). Otro hecho a puntualizar es que tanto la vía metabólica de la taurina y la biosíntesis de la arginina están asociadas al metabolismo del glutatión (véase en Figura 16). Se ha reportado como el glutatión es un antioxidante que puede prevenir el daño neuronal (Aoyama, 2021), y se observó que la coadministración de L-DOPA y glutatión (antioxidante) evade la toxicidad inducida por L-DOPA en las neuronas del SNC (Muddapu et al., 2022).

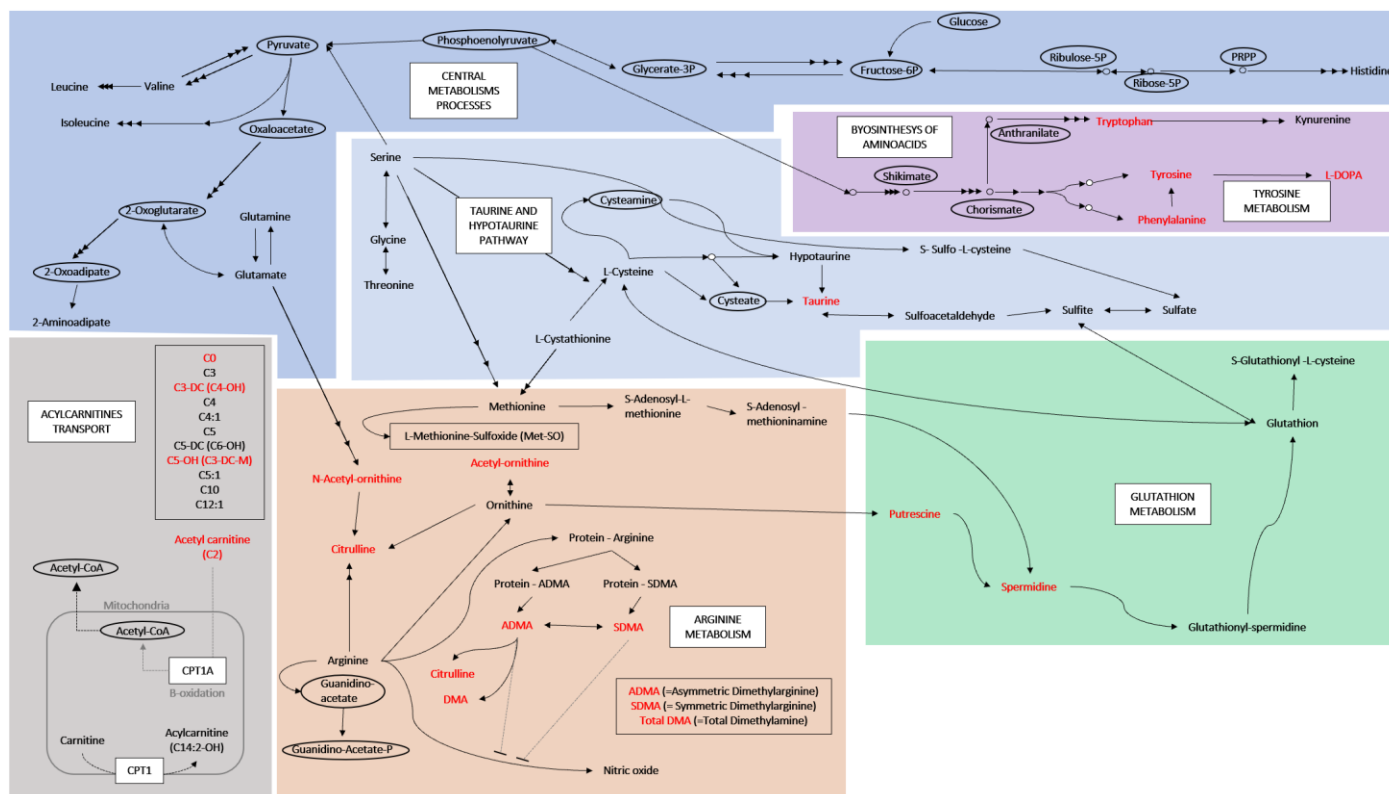


Figura 16. Diagrama metabólico donde se representan todas las rutas biológicas que están asociadas a los metabolitos diferencialmente representados en muestras de humor acuoso parkinsonianas. Los metabolitos resaltados en rojo están

sobrerrepresentados en muestras de humor acuoso parkinsonianas Los recuadros geométricos coloreados indican las diferentes secciones/procesos metabólicos presentes en el esquema.

La neuroprotección es un tema clave para encontrar terapias que enlentezcan el avance de las enfermedades neurodegenerativas. Clásicamente, los enfoques destinados a retrasar o prevenir la muerte neuronal se centraban en actuar directamente sobre las neuronas que sufrían. Un enfoque más nuevo que parece prometedor es apuntar a la microglía y la neurodegeneración a menudo provoca la activación de la microglía, la liberación de citocinas proinflamatorias y un aumento del estrés oxidativo. El entendimiento actual es que la neuroprotección podría lograrse sesgando la microglía proinflamatoria (M1) hacia el fenotipo neuroprotector (M2). En teoría, dicho fenotipo produciría factores neuroprotectores y reduciría el estrés oxidativo. Nos ha interesado saber si el potencial neuroprotector de los antagonistas de la adenosina $A_{2A}R$ y de un compuesto cannabinoide, el CBD, implicaría un cambio en la polarización microglial. Usando un enfoque de RNAseq, hemos abordado, en microglía activada, el efecto de los antagonistas de $A_{2A}R$ y/o de CBD en la expresión de genes que están relacionados con la homeostasis REDOX y con la neuroinflamación.

En modelos preclínicos y también in vitro, los ligandos de los receptores de adenosina son antiinflamatorios y proporcionan neuroprotección. Los resultados sugieren mecanismos por lo que los ligandos de receptores de adenosina y/o el CBD podrían brindar neuroprotección. Como ejemplo, el aumento de la expresión del gen NOS3 podría tener efectos antiinflamatorios directos (Lim et al., 2021; Yuste et al., 2015). En nuestra opinión, un hallazgo relevante es la mayor proporción de genes mitocondriales sobrerregulados en comparación con la de genes de codificación nuclear. Por otro lado, los ligandos de adenosina influyen en la expresión de genes mitocondriales. Además, el predominio de la regulación al alza sugiere que estos fármacos promueven la resiliencia mitocondrial en la microglía activada; al hacerlo, se puede especular que las mitocondrias están mejor preparadas para combatir el estrés oxidativo.

Los análisis de tipo GO permiten proponer que el tratamiento de la neuroinflamación con antagonistas de $A_{2A}R$ y/o CBD podría revertir las alteraciones que sufre la mitocondria en condiciones inflamatorias y aumentar la tasa de procesos metabólicos que permiten la producción de energía como la oxidación de ácidos grasos y el ciclo de Krebs. Los efectos sobre estos metabolismos podrían estar favoreciendo la supervivencia de las neuronas en un contexto neuroinflamatorio (Franco & Serrano-Marín, 2023; Wright, 2022; Yin et al., 2016).

Por último, es relevante considerar si es útil o no la correlación de carácter interómico aquí hecha entre los datos de RNAseq en microglía y los datos de RNAseq derivados de estudios en pacientes. Más esfuerzo experimental seguido de análisis bioinformático es necesario para confirmar la utilidad de esta aproximación. Nuestro análisis revela muchas coincidencias en cuanto a GOs que, alterados en pacientes, son regulables por tratamiento con antagonistas del receptor de adenosina

y/o por CBD. Los procesos biológicos indicados en la tabla 3 son muy relevantes y pueden ser modulados por CBD, al menos en microglía. Asimismo, el mapa de redes que representa las relaciones genéticas y metabolómicas (Figura 14) está centrado en unos pocos genes de relevancia en la fisiopatología de PD y en unos pocos metabolitos cuyos niveles se encuentran alterados en el humor acuoso de pacientes.

7 Conclusión

Durante el transcurso del trabajo se ha podido observar como la enfermedad de Parkinson está implicada en procesos neuroinflamatorios y neurodegenerativos, principalmente en la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Se ha reafirmado como hay un aumento de estrés oxidativo, producción anómala de ROS y citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ , IL-17), activación microglial, adhesión leucocitaria en la pared endotelial, vasodilatación, quimiotaxis y procesos apoptóticos. El conjunto de estos procesos induce a una inflamación crónica y muerte celular. La necesidad de paliar y neutralizar la problemática actual de esta patología conduce a un amplio abanico de investigaciones implicadas tanto a nivel de diagnóstico como de tratamiento.

La metabolómica es un nuevo enfoque ómico que ha surgido en los últimos años y es complementario con análisis genéticos y transcripcionales, extrayendo resultados más robustos y fiables. Los resultados obtenidos muestran varios metabolitos que podrían ser útiles para el diagnóstico y detección en la enfermedad de Parkinson, es decir, utilizados como biomarcadores en el ámbito clínico. Algunos ejemplos pueden ser las carnitinas, la tirosina o la ornitina como objetos de estudio en futuras investigaciones. Como se ha mencionado anteriormente, es primordial el uso de diversos biomarcadores que presenten concentraciones diferencialmente expresadas en pacientes parkinsonianos respecto a pacientes sanos. Este trabajo es esencial para establecer una base orientativa de los compuestos orgánicos que se ven afectados en la enfermedad de Parkinson. También, cabe destacar que la elección de humor acuoso como muestra de estudio fue premeditada, ya que el sistema ocular presenta un privilegio inmunitario y muestra una relación directa con el encéfalo. Sin embargo, la forma de extracción del humor acuoso no es razonablemente ética para realizarse de manera habitual. Por tanto, es imprescindible explorar otras vías de extracción más sencillas y menos invasoras para el organismo.

La microglía es característica por estar ubicada únicamente en el encéfalo, más concretamente, en el SNC. Es esencial para la regulación y soporte neuronal, evitando afectaciones graves en el tejido y concediendo un sistema inmunológico privilegiado. El concepto de poder controlar la neuroinflamación a partir de estimular la movilización morfológica/celular de la microglía, de un estado M1 a M2 es objeto de estudio en la actualidad. En este TFG se ha querido confirmar la implicación de ciertos compuestos agonistas/antagonistas de receptores GPCR presentes en abundancia en la microglía y comprobar sus efectos neuroprotectores. Los resultados muestran

una mejoría sustancial en la reducción de la inflamación crónica y el paso a un estado de neurogénesis, remielización de los axones, cicatrización mediada por fibroblastos y angiogénesis.

La comparación de entre RNAseq de Parkinson y de microglía tenía como objetivo poder establecer una ruta traslacional evidente, donde se pudiera hipotetizar una posible aplicación terapéutica de modelos *invitro* a modelos *invivo* con animales y, en un futuro lejano, a seres humanos. Los resultados obtenidos han sido muy prometedores, dado que la presencia de genes coincidentes entre los dos experimentos ha sido considerablemente notable y los procesos biológicos encontrados muestran grandes implicaciones en la neuroinflamación y neurodegeneración. Este trabajo evidencia el necesario estudio de más compuestos y receptores implicados en procesos proinflamatorios.

8 Bibliografía

- Aoyama, K. (2021). Glutathione in the Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 22. <https://doi.org/10.3390/IJMS22095010>
- Beach, T. G., Carew, J., Serrano, G., Adler, C. H., Shill, H. A., Sue, L. I., Sabbagh, M. N., Akiyama, H., Cuenca, N., Caviness, J., Driver-Dunckley, E., Jacobson, S., Belden, C., & Davis, K. (2014). Phosphorylated α -synuclein-immunoreactive retinal neuronal elements in Parkinson's disease subjects. *Neuroscience Letters*, 571, 34–38. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2014.04.027>
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 121–134. <https://doi.org/10.1007/S00441-004-0956-9/FIGURES/7>
- Choudhry, H., & Perlmutter, L. C. (2017). Non-CNS pathogenic origin of Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, 264(9), 2027–2030. <https://doi.org/10.1007/S00415-017-8588-7/METRICS>
- Esteve-Rudd, J., Fernández-Sánchez, L., Lax, P., De Juan, E., Martín-Nieto, J., & Cuenca, N. (2011). Rotenone induces degeneration of photoreceptors and impairs the dopaminergic system in the rat retina. *Neurobiology of Disease*, 44(1), 102–115. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2011.06.009>
- Ferrazza, R., Cogo, S., Melrose, H., Bubacco, L., Greggio, E., Guella, G., Civiero, L., & Plotegher, N. (2016). LRRK2 deficiency impacts ceramide metabolism in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(3), 1141–1146. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.08.082>
- Ferreira-Silva, J., Aires, I. D., Boia, R., Ambrósio, A. F., & Santiago, A. R. (2020). Activation of Adenosine A3 Receptor Inhibits Microglia Reactivity Elicited by Elevated Pressure. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 7218, 21(19), 7218. <https://doi.org/10.3390/IJMS21197218>
- Franco, R., & Fernández-Suárez, D. (2015). Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 131, 65–86. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2015.05.003>
- Franco, R., Navarro, G., & Martínez-Pinilla, E. (2019). Lessons on Differential Neuronal-Death-Vulnerability from Familial Cases of Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *International*

- Franco, R., & Serrano-marín, J. (2022). Robustness of the Krebs Cycle under Physiological Conditions and in Cancer: New Clues for Evaluating Metabolism- Modifying Drug Therapies. *Biomedicines*, 10(5), 1199. <https://doi.org/10.3390/BIMEDICINES10051199/S1>
- Franco, R., & Serrano-Marín, J. (2023). Can chronic therapeutic drug use by the elderly affect Alzheimers disease risk and rate of progression? *Exploration of Neuroprotective Therapy*, 3(1), 8–23. <https://doi.org/10.37349/ENT.2023.00035>
- Goel, M., Picciani, R. G., Lee, R. K., & Bhattacharya, S. K. (2010). Aqueous Humor Dynamics: A Review. *The Open Ophthalmology Journal*, 4(1), 52. <https://doi.org/10.2174/1874364101004010052>
- Gottlob, I., Schneider, E., Heider, W., & Skrandies, W. (1987). Alteration of visual evoked potentials and electroretinograms in Parkinson's disease. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 66(4), 349–357. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(87\)90032-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(87)90032-0)
- Guo, L., Normando, E. M., Shah, P. A., De Groef, L., & Cordeiro, M. F. (2018). Oculo-visual abnormalities in Parkinson's disease: Possible value as biomarkers. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 33(9), 1390–1406. <https://doi.org/10.1002/MDS.27454>
- Guo, M., Wang, J., Zhao, Y., Feng, Y., Han, S., Dong, Q., Cui, M., & Tieu, K. (2020). Microglial exosomes facilitate α -synuclein transmission in Parkinson's disease. *Brain*, 143(5), 1476–1497. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAA090>
- Inzelberg, R., Ramirez, J. A., Nisipeanu, P., & Ophir, A. (2004). Retinal nerve fiber layer thinning in Parkinson disease. *Vision Research*, 44(24), 2793–2797. <https://doi.org/10.1016/J.VISRES.2004.06.009>
- Iranzo, A., Fairfoul, G., Ayudhaya, A. C. N., Serradell, M., Gelpi, E., Vilaseca, I., Sanchez-Valle, R., Gaig, C., Santamaria, J., Tolosa, E., Riha, R. L., & Green, A. J. E. (2021). Detection of α -synuclein in CSF by RT-QuIC in patients with isolated rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a longitudinal observational study. *The Lancet Neurology*, 20(3), 203–212. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30449-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30449-X)
- Jacobson, K. A., Merighi, S., Varani, K., Borea, P. A., Baraldi, S., Aghazadeh Tabrizi, M., Romagnoli, R., Baraldi, P. G., Ciancetta, A., Tosh, D. K., Gao, Z. G., & Gessi, S. (2018). A3 Adenosine Receptors as Modulators of Inflammation: From Medicinal Chemistry to Therapy. *Medicinal Research Reviews*, 38(4), 1031. <https://doi.org/10.1002/MED.21456>
- Klatt, S., Doecke, J. D., Roberts, A., Boughton, B. A., Masters, C. L., Horne, M., & Roberts, B. R. (2021a). A six-metabolite panel as potential blood-based biomarkers for Parkinson's disease. *Npj Parkinson's Disease* 2021 7:1, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00239-x>
- Klatt, S., Doecke, J. D., Roberts, A., Boughton, B. A., Masters, C. L., Horne, M., & Roberts, B. R. (2021b). A six-metabolite panel as potential blood-based biomarkers for Parkinson's disease. *NPJ Parkinson's Disease*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41531-021-00239-X>
- Kwon, E. H., Tennagels, S., Gold, R., Gerwert, K., Beyer, L., & Tönges, L. (2022). Update on CSF Biomarkers in Parkinson's Disease. *Biomolecules* 2022, Vol. 12, Page 329, 12(2), 329. <https://doi.org/10.3390/Biom12020329>
- Lillo, A., Marin, S., Serrano-Marín, J., Bernal-Casas, D., Binetti, N., Navarro, G., Cascante, M., Sánchez-Navés, J., & Franco, R. (2022). Biogenic Amine Levels Markedly Increase in the

- Aqueous Humor of Individuals with Controlled Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12752. <https://doi.org/10.3390/IJMS232112752/S1>
- Lim, D., Jeong, J. ho, & Song, J. (2021). Lipocalin 2 regulates iron homeostasis, neuroinflammation, and insulin resistance in the brains of patients with dementia: Evidence from the current literature. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 27(8), 883–894. <https://doi.org/10.1111/CNS.13653>
- Liy, P. M., Puzi, N. N. A., Jose, S., & Vidyadaran, S. (2021). Nitric oxide modulation in neuroinflammation and the role of mesenchymal stem cells. <https://doi.org/10.1177/1535370221997052>, 246(22), 2399–2406.
- Mackie, K. (2006). Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *International Journal of Obesity (2005)*, 30 Suppl 1, S19–S23. <https://doi.org/10.1038/SJ.IJO.0803273>
- Madeo, G., Martella, G., Schirinzi, T., Ponterio, G., Shen, J., Bonsi, P., & Pisani, A. (2012). Aberrant striatal synaptic plasticity in monogenic parkinsonisms. *Neuroscience*, 211, 126–135. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.07.065>
- Marrocco, E., Indrieri, A., Esposito, F., Tarallo, V., Carboncino, A., Alvino, F. G., De Falco, S., Franco, B., De Risi, M., & De Leonibus, E. (2020). α -synuclein overexpression in the retina leads to vision impairment and degeneration of dopaminergic amacrine cells. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66497-6>
- Melani, A., Gianfriddo, M., Vannucchi, M. G., Cipriani, S., Baraldi, P. G., Giovannini, M. G., & Pedata, F. (2006). The selective A2A receptor antagonist SCH 58261 protects from neurological deficit, brain damage and activation of p38 MAPK in rat focal cerebral ischemia. *Brain Research*, 1073–1074(1), 470–480. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2005.12.010>
- Milligan, G., Ward, R. J., & Marsango, S. (2019). GPCR homo-oligomerization. *Current Opinion in Cell Biology*, 57, 40. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2018.10.007>
- Moore, D. J., Zhang, L., Troncoso, J., Lee, M. K., Hattori, N., Mizuno, Y., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2005). Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Human Molecular Genetics*, 14(1), 71–84. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDI007>
- Muddapu, V. R. J., Vijayakumar, K., Ramakrishnan, K., & Chakravarthy, V. S. (2022). A Multi-Scale Computational Model of Levodopa-Induced Toxicity in Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2022.797127/FULL>
- Navarro, G., Borroto-Escuela, D., Angelats, E., Etayo, Í., Reyes-Resina, I., Pulido-Salgado, M., Rodríguez-Pérez, A. I., Canela, E. I., Saura, J., Lanciego, J. L., Labandeira-García, J. L., Saura, C. A., Fuxe, K., & Franco, R. (2018). Receptor-heteromer mediated regulation of endocannabinoid signaling in activated microglia. Role of CB1 and CB2 receptors and relevance for Alzheimer's disease and levodopa-induced dyskinesia. *Brain, Behavior, and Immunity*, 67, 139–151. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2017.08.015>
- Nguyen-Legros, J. (1988). Functional neuroarchitecture of the retina: hypothesis on the dysfunction of retinal dopaminergic circuitry in Parkinson's disease. *Surgical and Radiologic Anatomy: SRA*, 10(2), 137–144. <https://doi.org/10.1007/BF02307822>
- Normando, E. M., Davis, B. M., De Groef, L., Nizari, S., Turner, L. A., Ravindran, N., Pahlitzsch, M., Brenton, J., Malaguarnera, G., Guo, L., Somavarapu, S., & Cordeiro, M. F. (2016). The retina as an early biomarker of neurodegeneration in a rotenone-induced model of Parkinson's

- disease: evidence for a neuroprotective effect of rosiglitazone in the eye and brain. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/S40478-016-0346-Z>
- Ortuño-Lizarán, I., Beach, T. G., Serrano, G. E., Walker, D. G., Adler, C. H., & Cuenca, N. (2018). Phosphorylated α -synuclein in the retina is a biomarker of Parkinson's disease pathology severity. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 33(8), 1315–1324. <https://doi.org/10.1002/MDS.27392>
- Oueslati, A. (2016). Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? *Journal of Parkinson's Disease*, 6(1), 39–51. <https://doi.org/10.3233/JPD-160779>
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M. E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Brône, B., Brown, G. C., ... Wyss-Coray, T. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, 110(21), 3458. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2022.10.020>
- Pathak, R. U., & Davey, G. P. (2008). Complex I and energy thresholds in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(7–8), 777–782. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2008.05.443>
- Pellecchia, M. T., Pivonello, R., Colao, A., & Barone, P. (2006). Growth Hormone Stimulation Tests in the Differential Diagnosis of Parkinson's Disease. *Clinical Medicine & Research*, 4(4), 322–325. <https://doi.org/10.3121/CMR.4.4.322>
- Postuma, R. B., Aarsland, D., Barone, P., Burn, D. J., Hawkes, C. H., Oertel, W., & Ziemssen, T. (2012). Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 27(5), 617–626. <https://doi.org/10.1002/MDS.24996>
- Shen, W., Zhai, S., & Surmeier, D. J. (2022). Striatal synaptic adaptations in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 167, 105686. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2022.105686>
- Teleanu, D. M., Niculescu, A. G., Lungu, I. I., Radu, C. I., Vladâncenco, O., Roza, E., Costăchescu, B., Grumezescu, A. M., & Teleanu, R. I. (2022). An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/IJMS23115938>
- Termine, A., Fabrizio, C., Strafella, C., Caputo, V., Petrosini, L., Caltagirone, C., Cascella, R., & Giardina, E. (2022). A Hybrid Machine Learning and Network Analysis Approach Reveals Two Parkinson's Disease Subtypes from 115 RNA-Seq Post-Mortem Brain Samples. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/IJMS23052557/S1>
- Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., & Poewe, W. (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, 20(5), 385. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2)
- Tu, D., Gao, Y., Yang, R., Guan, T., Hong, J. S., & Gao, H. M. (2019). The pentose phosphate pathway regulates chronic neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12974-019-1659-1>
- Weintraub, D., Aarsland, D., Chaudhuri, K. R., Dobkin, R. D., Leentjens, A. F., Rodriguez-Violante, M., & Schrag, A. (2022). The neuropsychiatry of Parkinson's disease: advances and challenges. *The Lancet. Neurology*, 21(1), 89. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00330-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00330-6)

- Wong, Y. C., & Krainc, D. (2017). α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nature Medicine*, 23(2), 1–13. <https://doi.org/10.1038/NM.4269>
- Wright, R. (2022). Mitochondrial dysfunction and Parkinson's disease. *Nature Neuroscience* 2022 25:1, 25(1), 2–2. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00989-0>
- Yin, F., Sancheti, H., Patil, I., & Cadenas, E. (2016). Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 108–122. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.04.200>
- Yuste, J. E., Tarragon, E., Campuzano, C. M., & Ros-Bernal, F. (2015). Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(AUGUST). <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2015.00322/BIBTEX>

9 Autoevaluación

Durante este último curso, he realizado las prácticas externas y el trabajo de final de grado. Estos dos proyectos los he podido realizar con éxito en este grupo de investigación en la siguiente institución pública:

Departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular

Universidad de Barcelona. Facultad de Biología. Departamento de Bioquímica y Biomedicina

Molecular. Avda. Diagonal 643, 08028 Barcelona

934021208

El grupo en Neurobiología dirigido por Rafael Franco, con la colaboración del grupo de Neurofarmacología situado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, me han ayudado a poder profundizar en el ámbito neuronal, farmacológico e inmunológico. En las prácticas externas pude realizar pruebas experimentales para la caracterización de receptores GPCR, situados en las membranas celulares y que hacen la función de transducir señales intracelulares para emitir una respuesta sobre ese estímulo o ligando reconocido por el receptor. Algunos experimentos consistían en cultivo in vitro y cambio de medio de las células, transfección de plásmidos con poli cationes, extracción de DNA y proteína GPCR y Western Plot. Durante las prácticas pude experimentar el trabajo más manual/experimental y el ambiente/organización dentro de un grupo de investigación. También, gracias a mi tutor Joan Serrano Marín, aprendí conceptos esenciales y específicos sobre las ciencias ómicas, bioinformática y bioestadística. Por un lado, en el grupo de investigación se colabora con otras muchas instituciones médicas y bioquímicas obteniendo muestras de todo tipo como el humor acuoso y, por otro lado, se realizan estudios in vitro e in vivo con células microgliales, involucradas en las respuestas pro/antiinflamatorias y que están distribuidas por todo el SNC, tratadas con compuestos endo/fitocannabinoides entre otros. Sobre estos cultivos y muestras se realizan estudios transcriptómicos (RNAseq) y metabolómicos, en los que he podido ejecutar un pretratamiento de los datos, un análisis estadístico riguroso y una interpretación de éstos. Por tanto,

obteniendo una visión multiómica del ambiente característico que sucede en varias enfermedades neuroinflamatorias i sistémicas como: Parkinson, Alzheimer, Esclerosis Múltiple, Glaucoma, Diabetes y Obesidad. Incluso he podido aprender y aplicar conocimientos de programación con Python y R, donde he optimizado y automatizado los procesos en el análisis estadístico e interpretación de éstos con un rendimiento y efectividad muy notoria, reduciendo el tiempo de ejecución y con resultados más claros y precisos.

En conclusión, mis expectativas al llegar al grupo de investigación han sido superadas por todo lo alto, ya que me he podido enriquecer de un enorme aprendizaje en el ámbito experimental, pero sobre todo en el bioinformático/estadístico.

10 Anexos

Metabolómica en muestras de humor acuoso

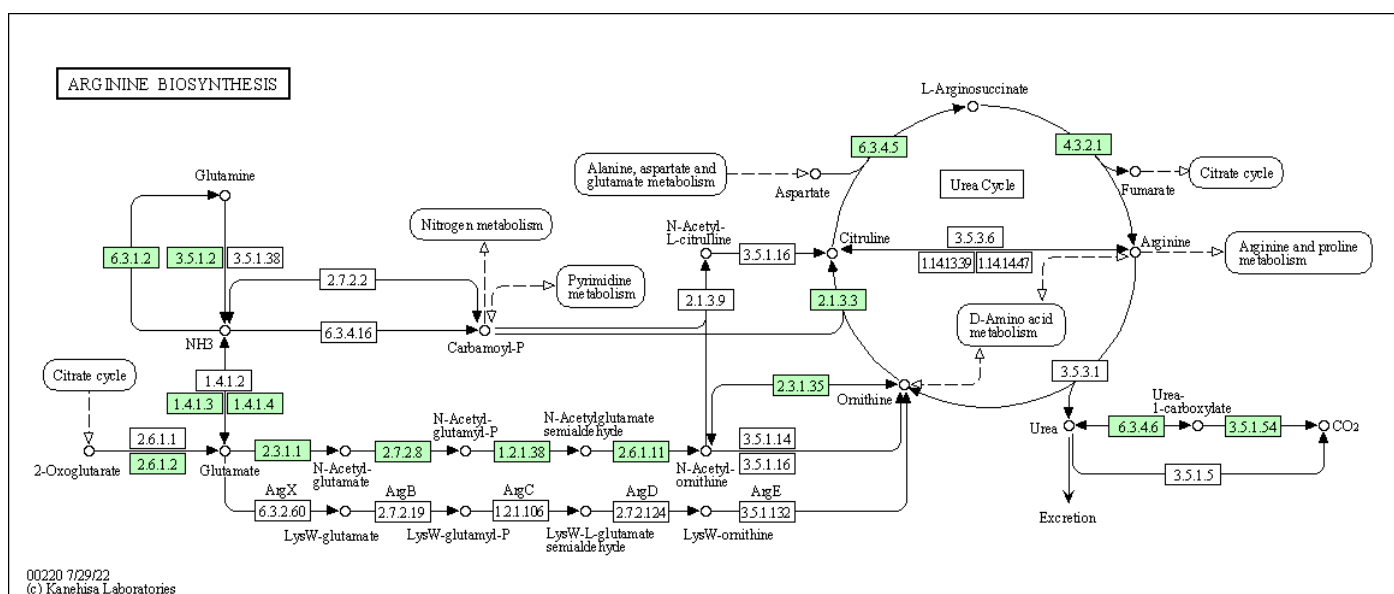


Figura Suplementaria 1. Ruta metabólica de la biosíntesis de la arginina. Los metabolitos indicados en rojo tienen una concentración más alta en pacientes parkinsonianos, en comparación con los valores encontrados en los controles sanos. Los metabolitos marcados en naranja son metabolitos asociados a interconexiones metabólicas entre los diferentes procesos. Imagen obtenida de KEGG.

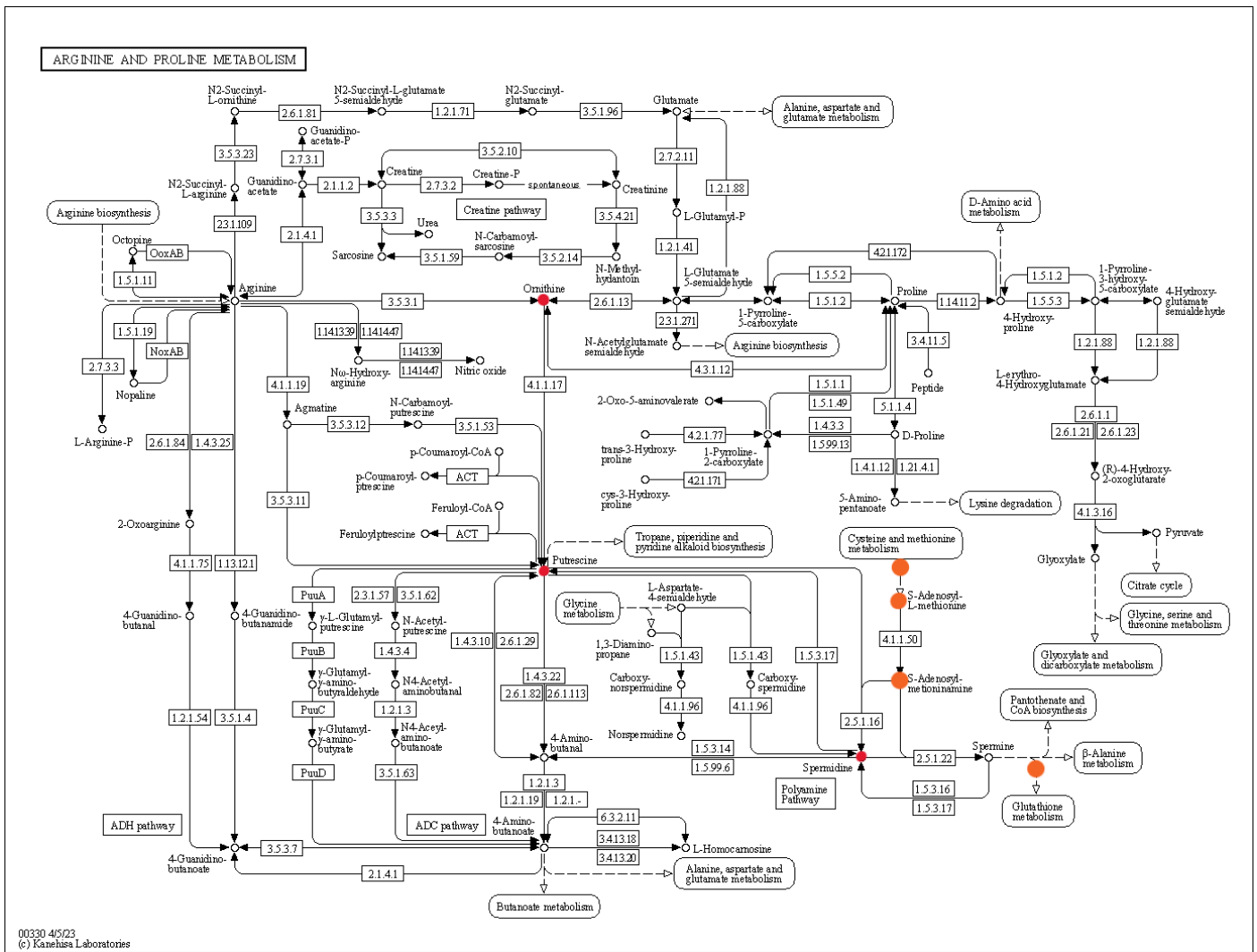


Figura Suplementaria 2. Ruta metabólica de la arginina y la prolina. Los metabolitos indicados en rojo tienen una concentración más alta en pacientes parkinsonianos, en comparación con los valores encontrados en los controles sanos. Los metabolitos marcados en naranja son metabolitos asociados a interconexiones metabólicas entre los diferentes procesos. Imagen obtenida de KEGG.

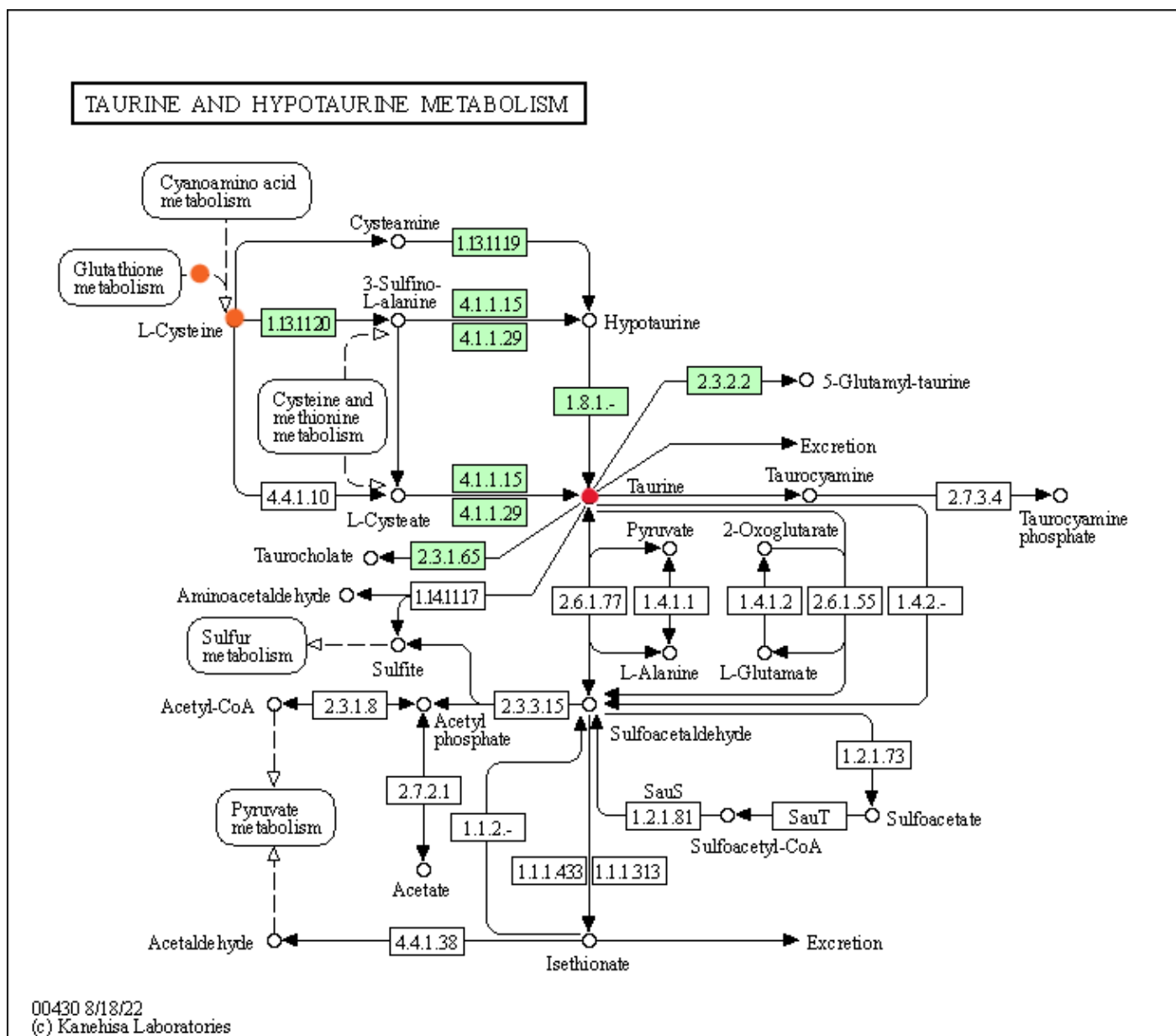


Figura Suplementaria 4. Ruta metabólica de la taurina y la hipotaurina. Los metabolitos indicados en rojo tienen una concentración más alta en pacientes parkinsonianos, en comparación con los valores encontrados en los controles sanos. Los metabolitos marcados en naranja son metabolitos asociados a interconexiones metabólicas entre los diferentes procesos. Imagen obtenida de [KEGG](https://www.ebi.ac.uk/kegg/).

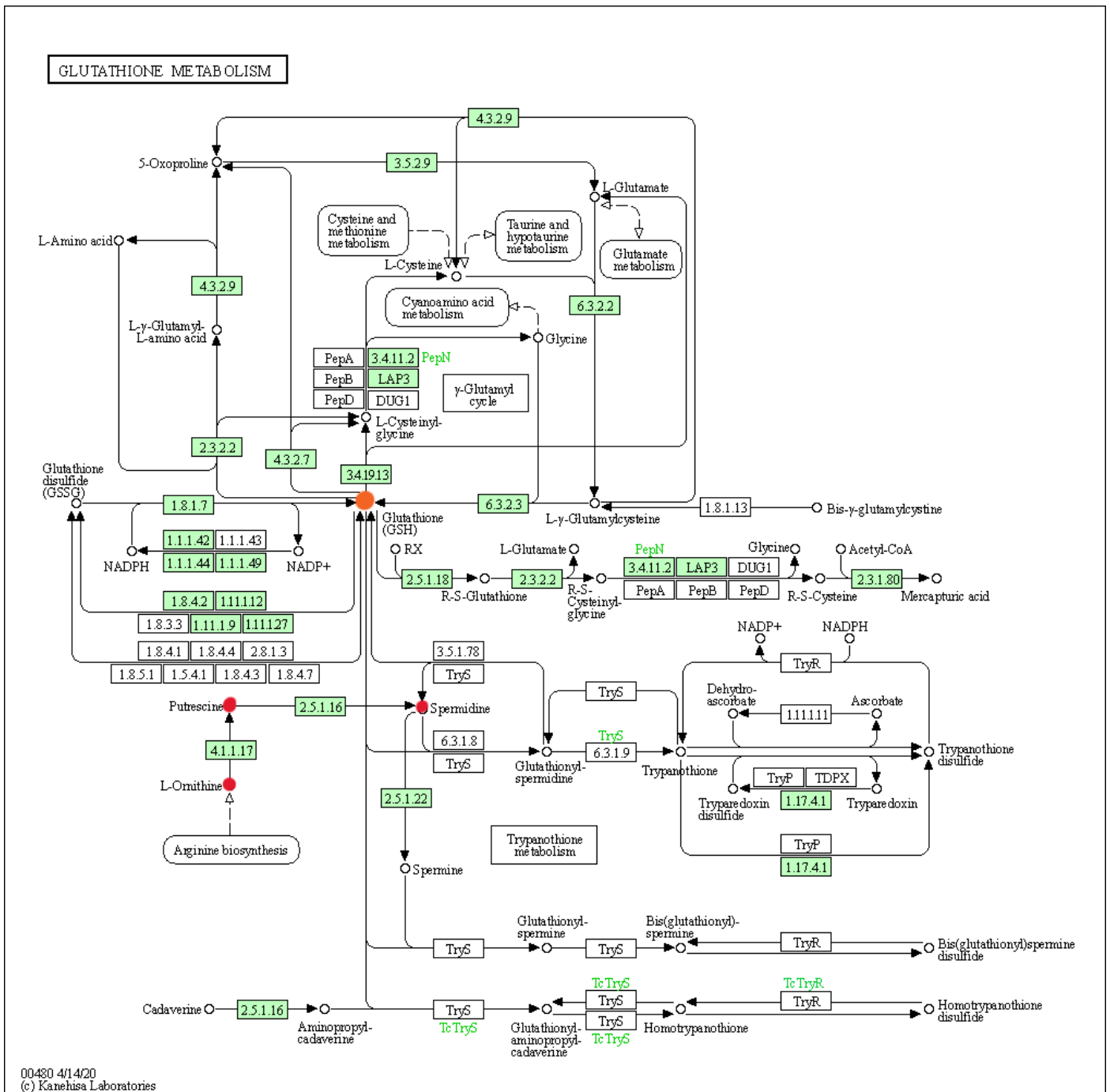


Figura Suplementaria 5. Ruta metabólica del glutatión. Los metabolitos indicados en rojo tienen una concentración más alta en pacientes parkinsonianos, en comparación con los valores encontrados en los controles sanos. Los metabolitos marcados en naranja son metabolitos asociados a interconexiones metabólicas entre los diferentes procesos. Imagen obtenida de [KEGG](http://KEGG.org).

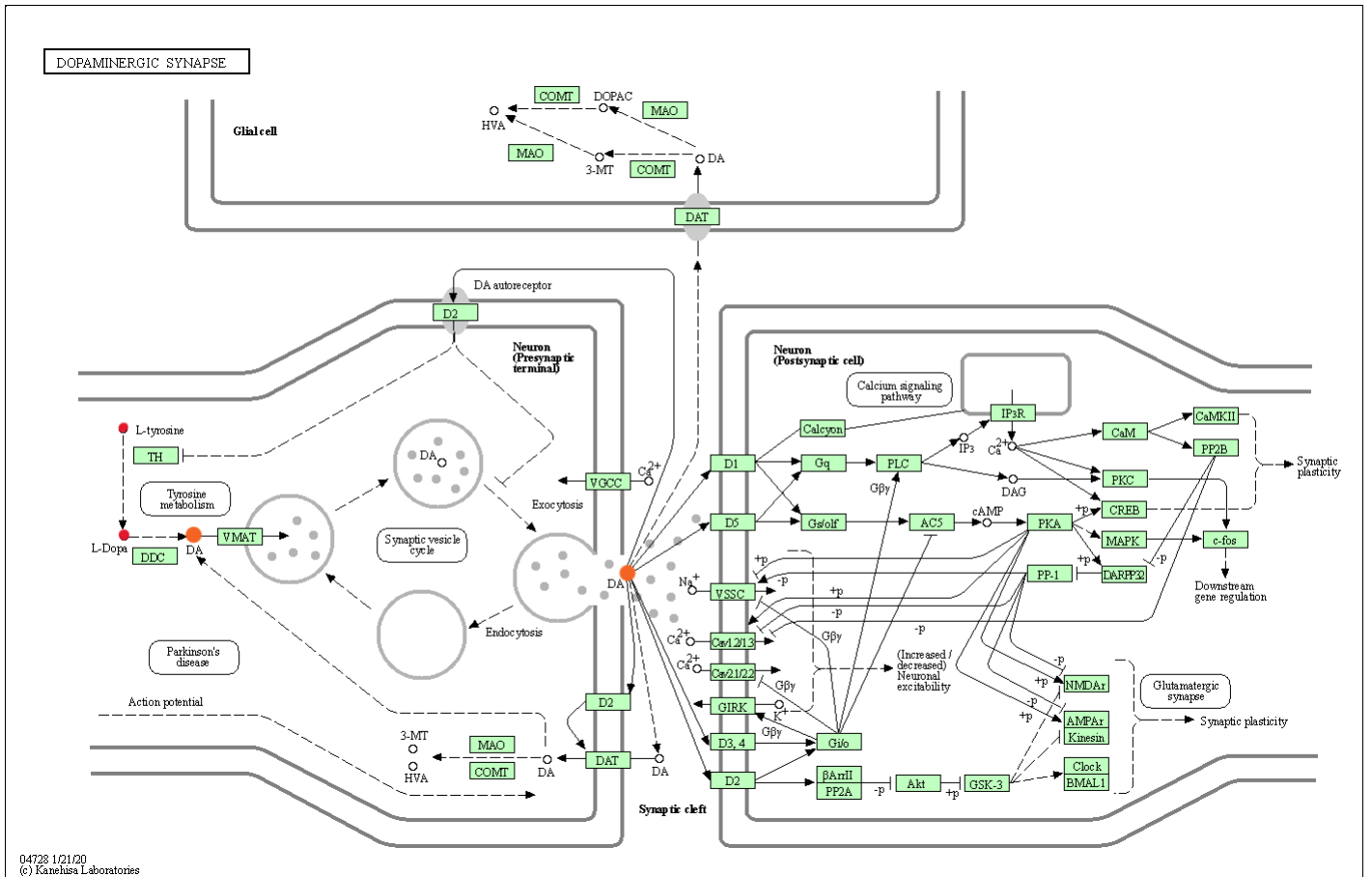


Figura Suplementaria 6. Ruta sináptica dopaminérgica. Los metabolitos indicados en rojo tienen una concentración más alta en pacientes parkinsonianos, en comparación con los valores encontrados en los controles sanos. Los metabolitos marcados en naranja son metabolitos asociados a interconexiones metabólicas entre los diferentes procesos. Imagen obtenida de [KEGG](https://www.kegg.jp/).

RNAseq microglía proveniente de cultivos primarios

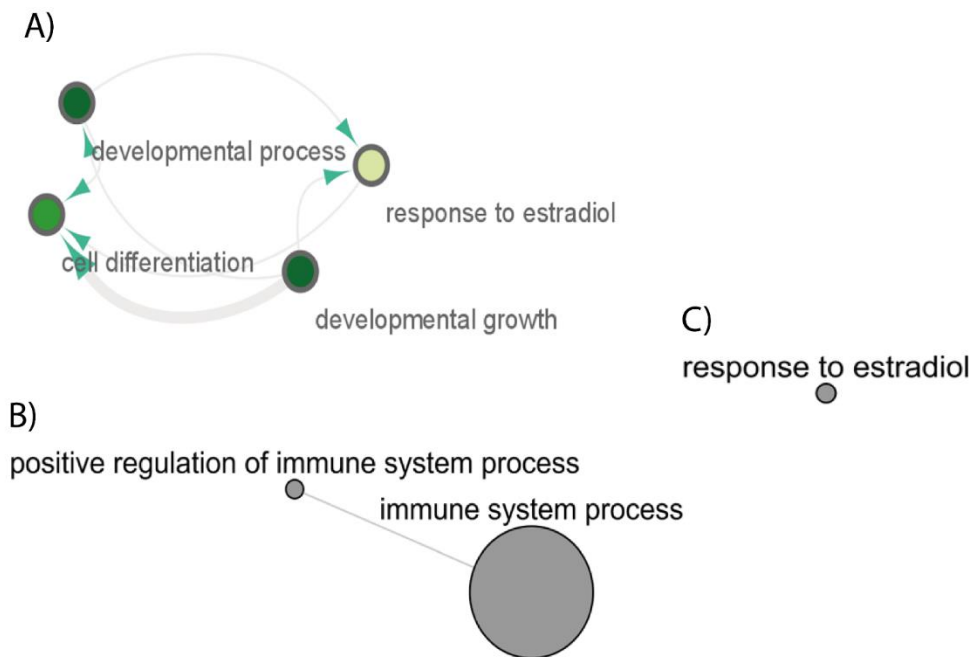


Figura Suplementaria 7. Mapas conceptuales de los eventos más relevantes encontrados en microglía tratada. Los datos mostrados provienen de genes DEGs sobrerrepresentados en microglía inflamada y tratada con diversos compuestos. **A)** Mapa de nodos correspondiente a la microglía tratada con SCH 58261 (2270). Los nodos circulares indican los procesos biológicos relevantes del análisis. Los nodos con el mismo color están asociados a una ruta biológica concreta. Las flechas y el grosor de éstas representan la importancia de un nodo en el mapa. **B)** Mapa de nodos asociado a la microglía tratada con el compuesto CBD. **C)** Mapa de nodos asociado a la microglía tratada con los dos compuestos, (CBD, SCH 58261 (2270)), agonista de CB₂, antagonista de A_{2A} respectivamente.

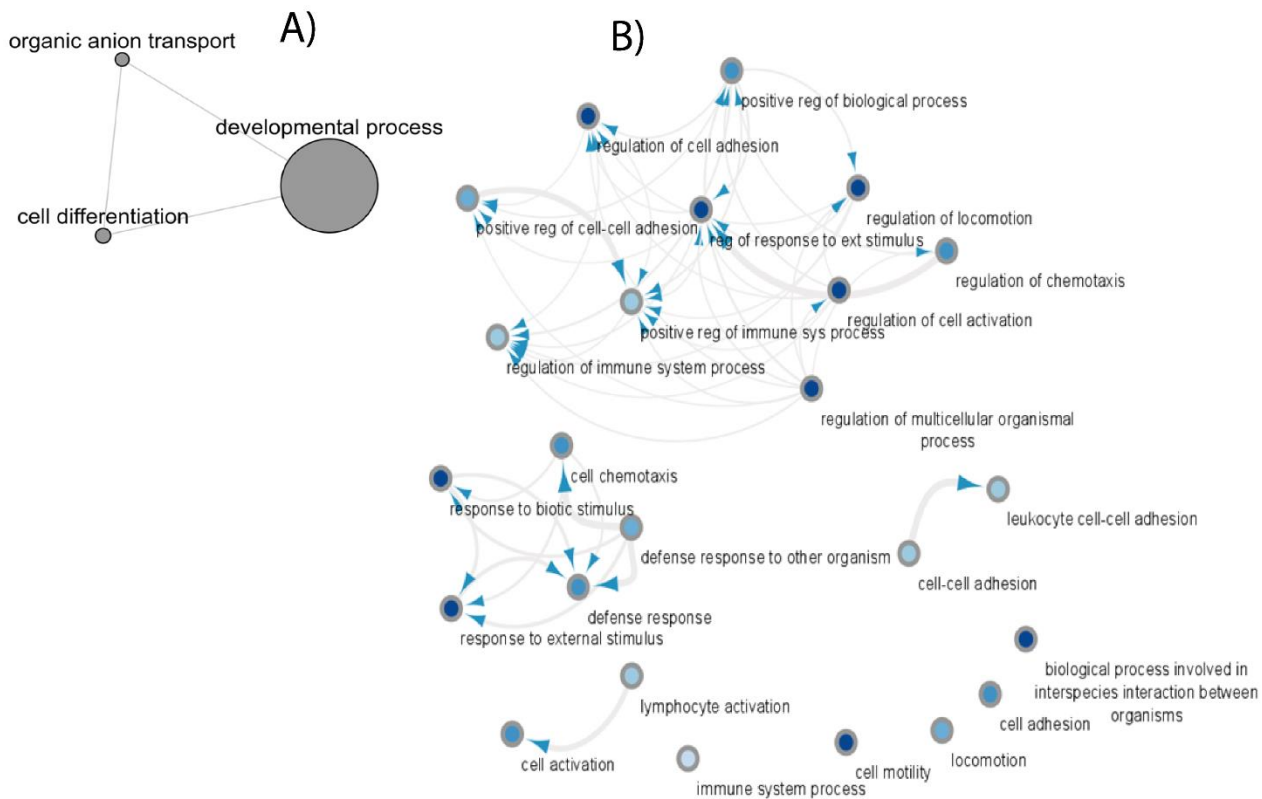


Figura Suplementaria 8. Mapas conceptuales de los eventos más relevantes encontrados en microglía tratada. Los datos mostrados provienen de genes DEGs infrarrepresentados en microglía inflamada y tratada con diversos compuestos. **A)** Mapa de nodos asociado a la microglía tratada con el compuesto CBD. **B)** Mapa de nodos asociado a la microglía tratada con los dos compuestos, (CBD, SCH 58261 (2270)), agonista de CB₂, antagonista de A_{2A} respectivamente. Los nodos circulares indican los procesos biológicos relevantes del análisis. Los nodos con el mismo color están asociados a una ruta biológica concreta. Las flechas y el grosor de éstas representan la importancia de un nodo en el mapa.

RNaseq Parkinson

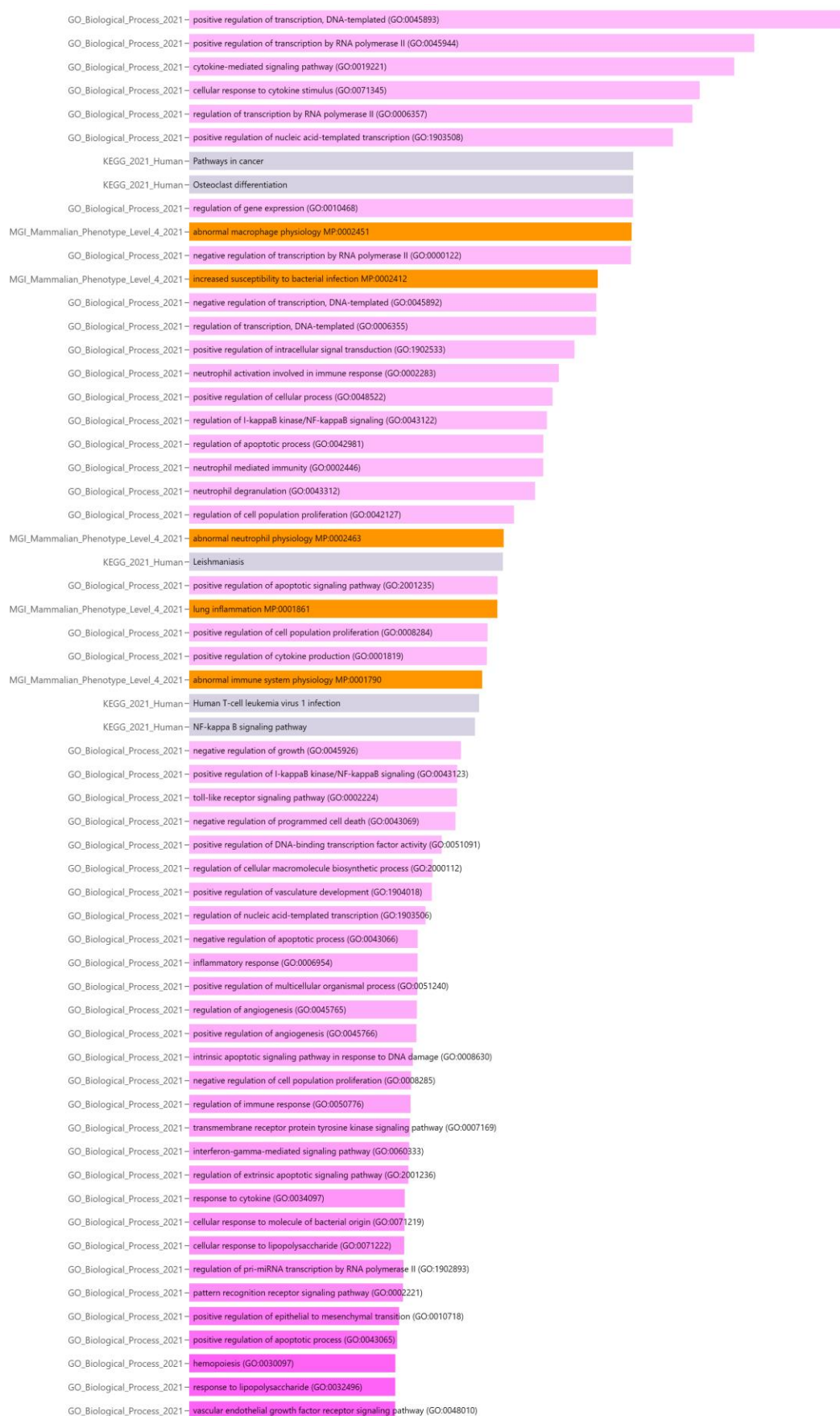


Figura Suplementaria 9. Ontologías encontradas con un p-valor ajustado < 0,05, donde se ordenan de la siguiente manera: las ontologías con un p-valor ajustado más bajo son las que se muestran al principio y tienen una barra coloreada más larga. Eventos patológicos e inmunológicos encontrados en estudios con pacientes control y pacientes parkinsonianos. Los datos mostrados provienen de genes DEGs sobrerrepresentados en muestras de Parkinson analizados por RNaseq.

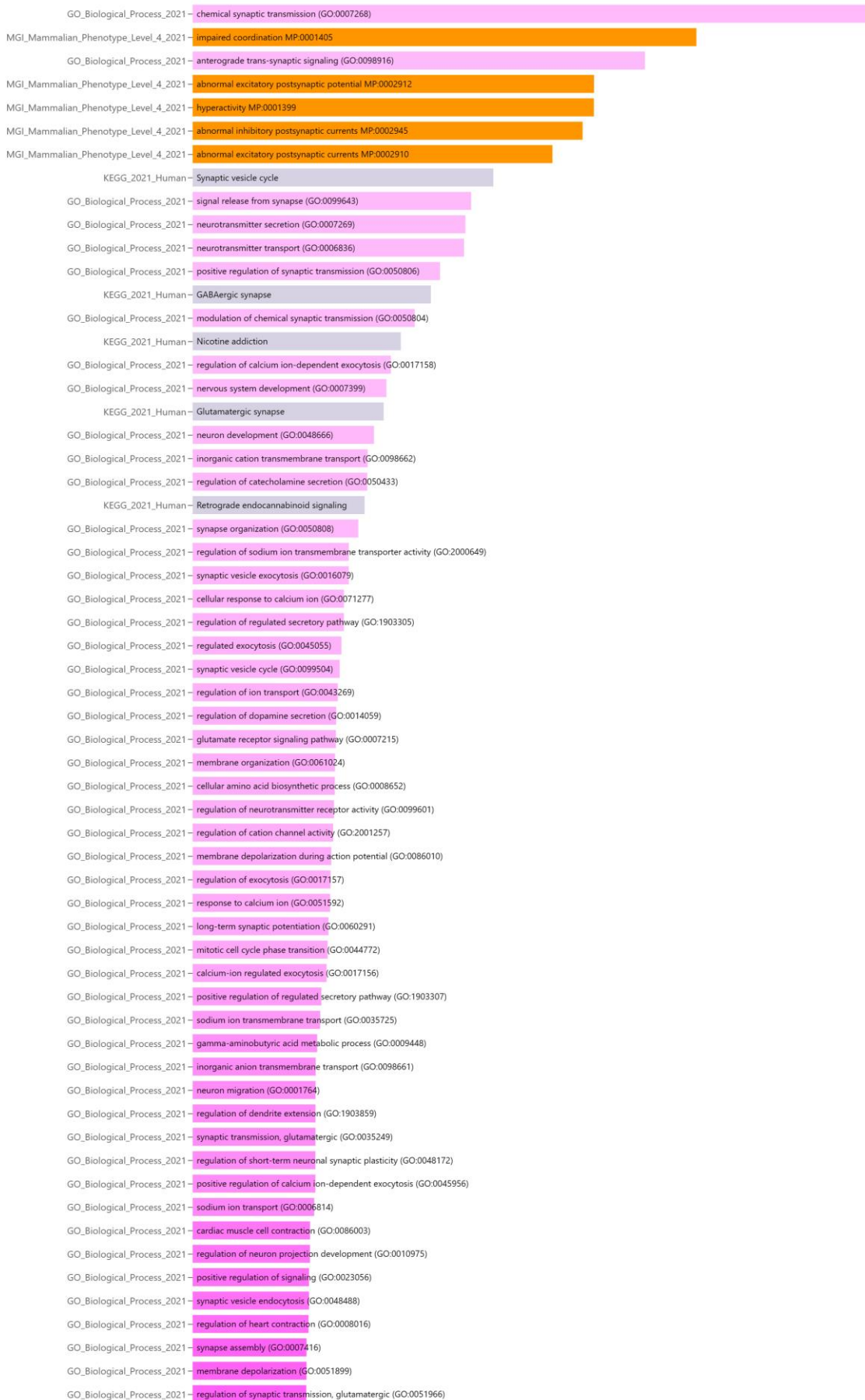


Figura Suplementaria 10. Ontologías encontradas con un p-valor ajustado < 0,05, donde se ordenan de la siguiente manera: las ontologías con un p-valor ajustado más bajo son las que se muestran al principio y tienen una barra coloreada más larga. Eventos patológicos e inmunológicos encontrados en estudios con pacientes control y pacientes parkinsonianos. Los datos mostrados provienen de genes DEGs infrarrepresentados en muestras de Parkinson analizados por RNAseq.

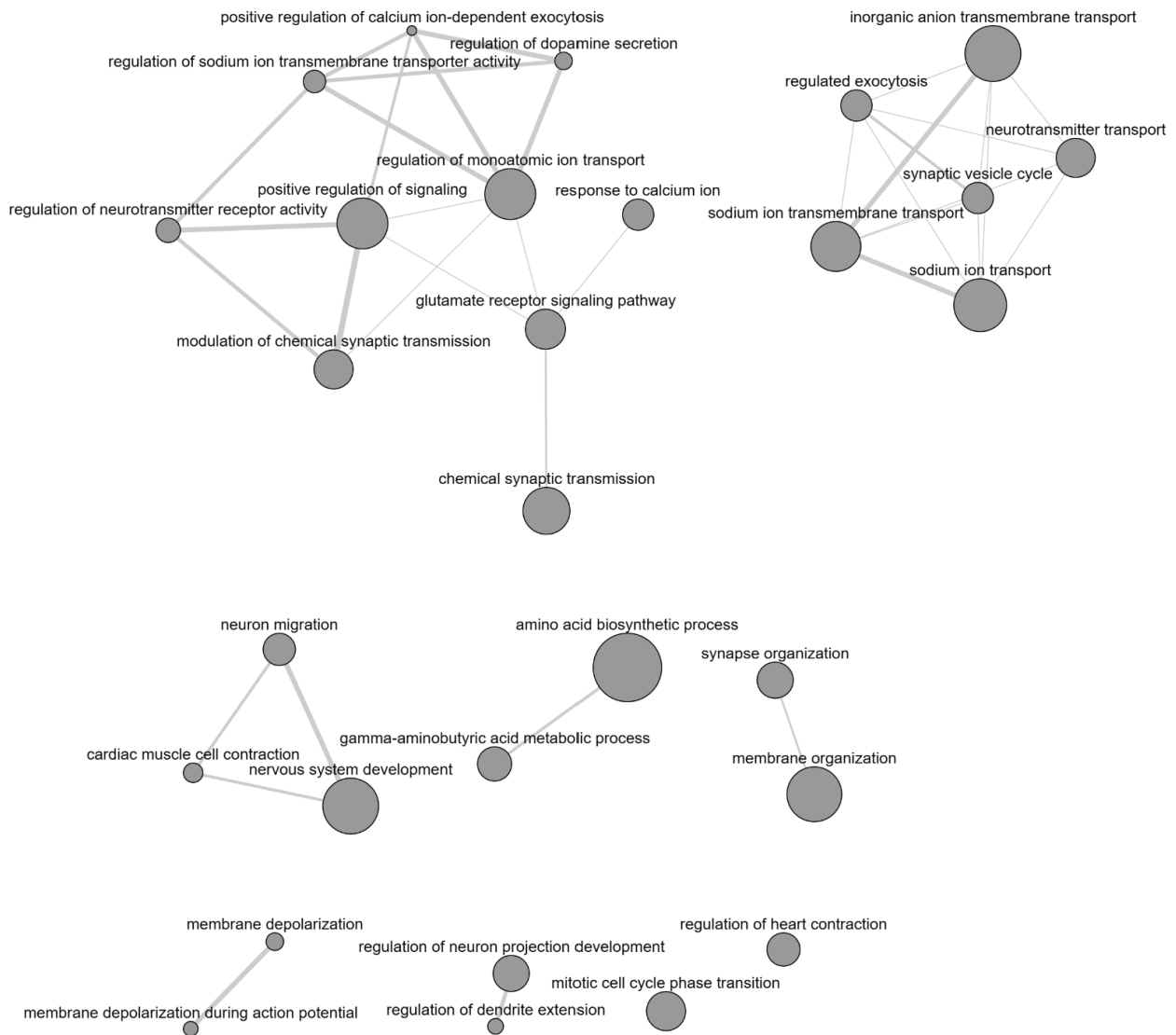


Figura Suplementaria 11. Mapa conceptual de los eventos más relevantes en la enfermedad del Parkinson. Eventos patológicos e inmunológicos encontrados en estudios con pacientes control y pacientes parkinsonianos. Los datos mostrados provienen de genes DEGs infrarrepresentados en muestras de Parkinson analizados por RNAseq.

Correlaciones al comparar datos entre RNAseq microglía y RNAseq Parkinson

Tabla Suplementaria 1. Lista de genes coincidentes sobre/infrarrepresentados entre el RNAseq de muestras parkinsonianas y el RNAseq de microglía inflamada y tratada con el componente SCH 58261 (2270), antagonista de A_{2A}R. Se presentan los valores de Fold Change en magnitud (Log₂ FC).

A_{2A} vs Vehículo

Down en microglía y up en P	Log ₂ FC	Up en microglía y down en P	Log ₂ FC
HLA-DMB	-0.8587967	SYT4	1.16323828
C1S	-1.0309425	PCDH11Y	0.62585027
CCR1	-0.7078032		
TRIM5	-1.9022744		
C1R	-1.0057774		
HP	-0.6978669		
SPHKAP	-0.793269		

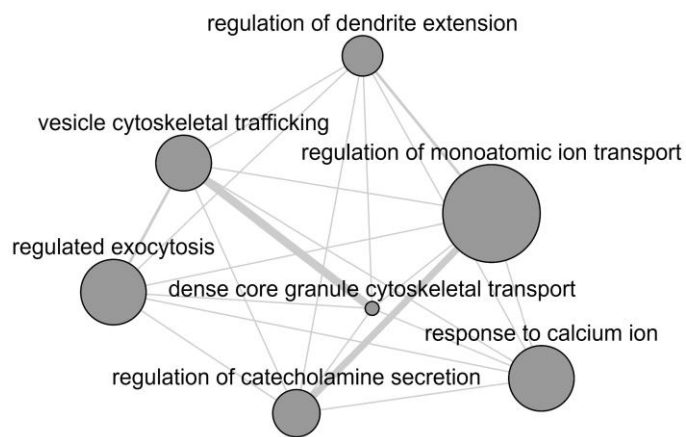


Figura Suplementaria 12. Mapa de redes donde se asocian diferentes procesos biológicos o nodos. Ontologías provenientes de genes coincidentes entre: los que están infrarrepresentados en el RNAseq de muestras parkinsonianas y los que están sobrerrepresentados en el RNAseq de microglía inflamada y tratada con el componente SCH 58261 (2270), antagonista de A_{2A}R. Los nodos con mayor cercanía y con más interacciones, establecen más conexiones y comparten la misma identidad de clúster. Los nodos con un tamaño mayor son más relevantes dentro de los datos analizados.

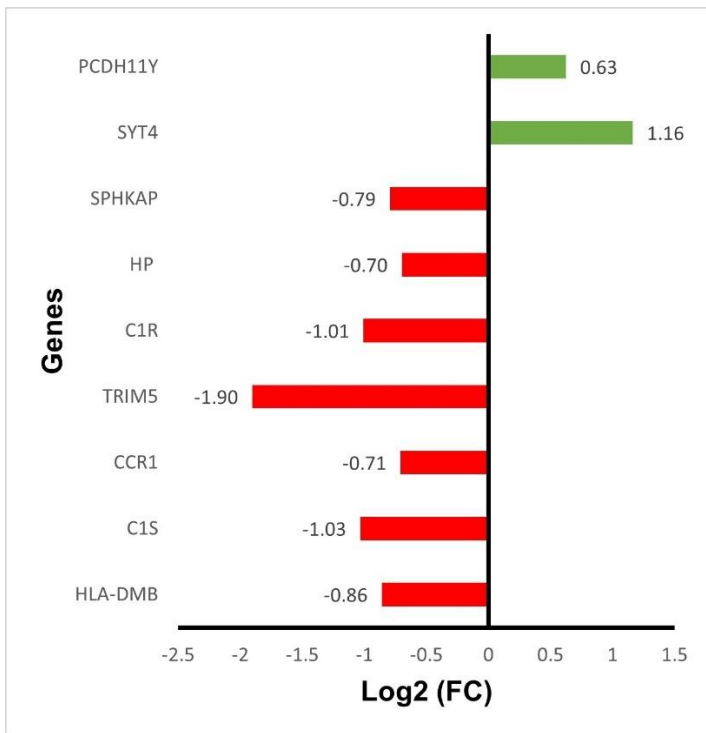


Figura Suplementaria 13. Representación gráfica donde se visualiza los genes coincidentes con su valor Log2 FC asociado. Los genes provienen de la lista de genes coincidentes sobre/infrarrepresentados entre el RNAseq de muestras parkinsonianas y el RNAseq de microglía inflamada y tratada con el componente SCH 58261 (2270), antagonista de A_{2A}R.

Tabla Suplementaria 2. Lista de genes coincidentes sobre/infrarrepresentados entre el RNAseq de muestras parkinsonianas y el RNAseq de microglía inflamada y tratada con el componente CBD, agonista de CB₂R. Se presentan los valores de Fold Change en magnitud (Log2 FC).

CB₂ vs Vehículo

Down en microglía y up en P	Log2FC
INMT	-0.6773383
MPZL2	-0.7196768
FBLN1	-0.7590594
FAM107A	-0.8628322
TMEM100	-0.6883986
LSR	-0.5913664

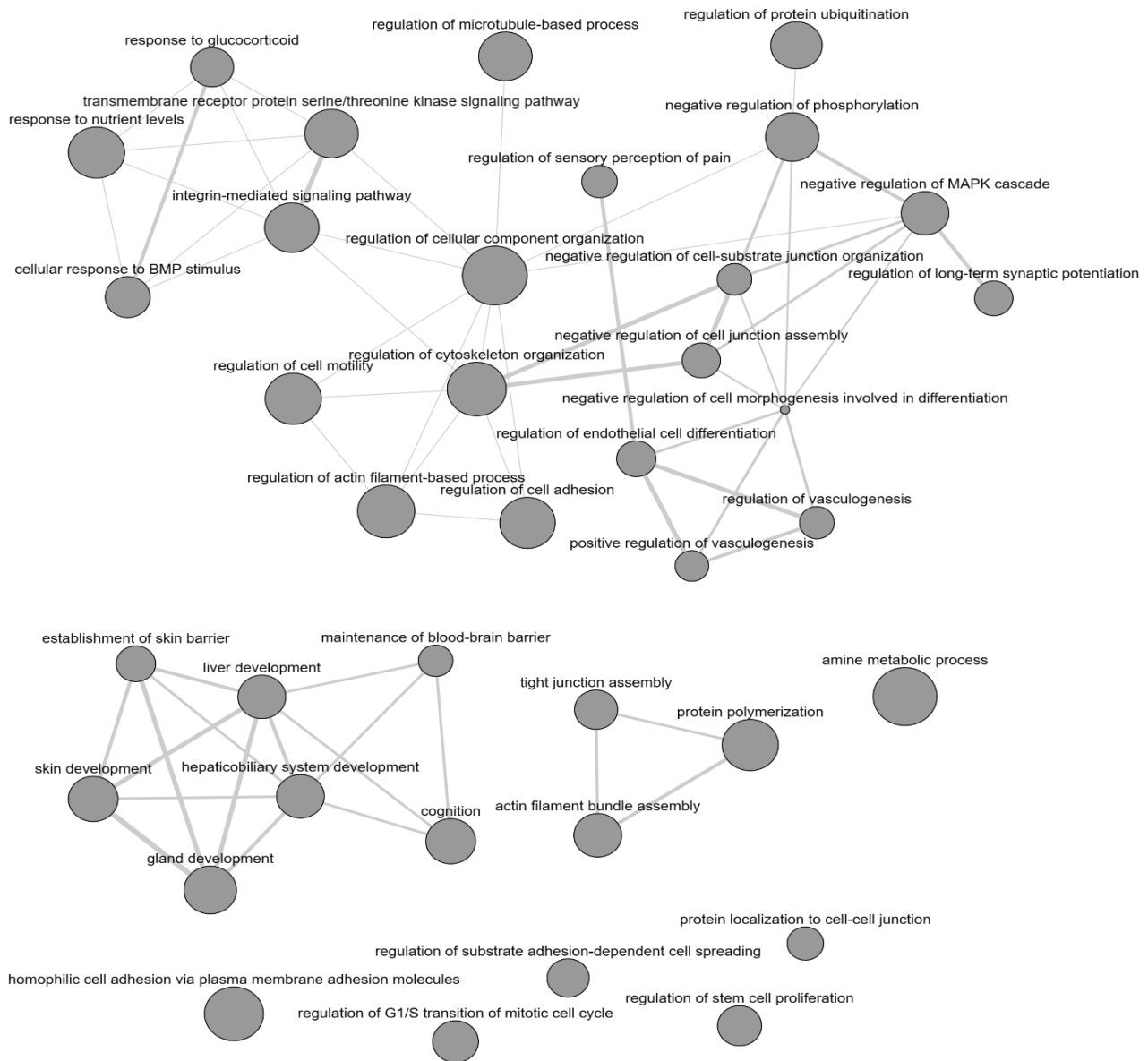


Figura Suplementaria 14. Mapa de redes donde se asocian diferentes procesos biológicos o nodos. Ontologías provenientes de genes coincidentes entre: los que están sobrerrepresentados en el RNAseq de muestras parkinsonianas y los que están infrarrepresentados en el RNAseq de microglía inflamada y tratada con el componente CBD, agonista de CB₂R. Los nodos con mayor cercanía y con más interacciones, establecen más conexiones y comparten la misma identidad de clúster. Los nodos con un tamaño mayor son más relevantes dentro de los datos analizados.

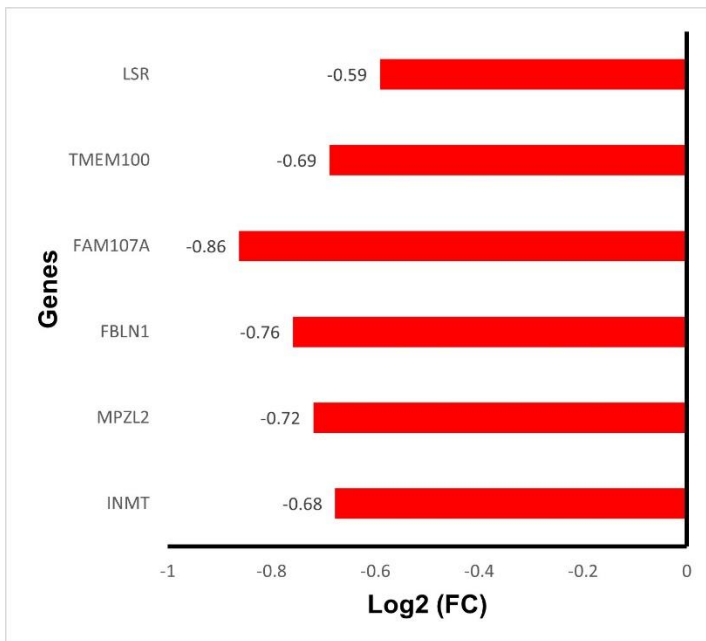


Figura Suplementaria 15. Representación gráfica donde se visualiza los genes coincidentes con su valor Log2 FC asociado. Los genes representados provienen de: los que están infrarrepresentados en el RNAseq de muestras parkinsonianas y los que están sobrerrepresentados en el RNAseq de microglía inflamada y tratada con el componente CBD, agonista de CB₂R.

Tabla Suplementaria 3. Lista de genes coincidentes sobre/infrarrepresentados entre el RNAseq de muestras parkinsonianas y el RNAseq de microglía inflamada y tratada con los componentes CBD y SCH 58261 (2270), agonista de CB₂R y antagonista de A_{2A}R respectivamente. Se presentan los valores de Fold Change en magnitud (Log2 FC).

CB₂-A_{2A} vs Vehículo

Down en microglía y up en P	Log2FC	Up en microglía y down en P	Log2FC
INMT	-0.948746	PCDH11Y	0.65697578
HLA-DMB	-0.828828	PCP4L1	0.70013988
C1R	-0.9406117	BCAT1	1.0298779
C1S	-0.9458144	SYT4	1.19845328
CCR1	-0.7758267		
TRIM5	-1.3050381		
HPR	-0.8483074		
SLC6A12	-0.9053822		
ABI3	-0.7865073		
ARHGEF15	-0.7931226		
CD93	-0.6986885		
LIPG	-0.6097786		
MRGPRF	-0.6149121		
PLIN4	-0.6956085		
SELL	-1.6785415		
SPN	-0.6093116		

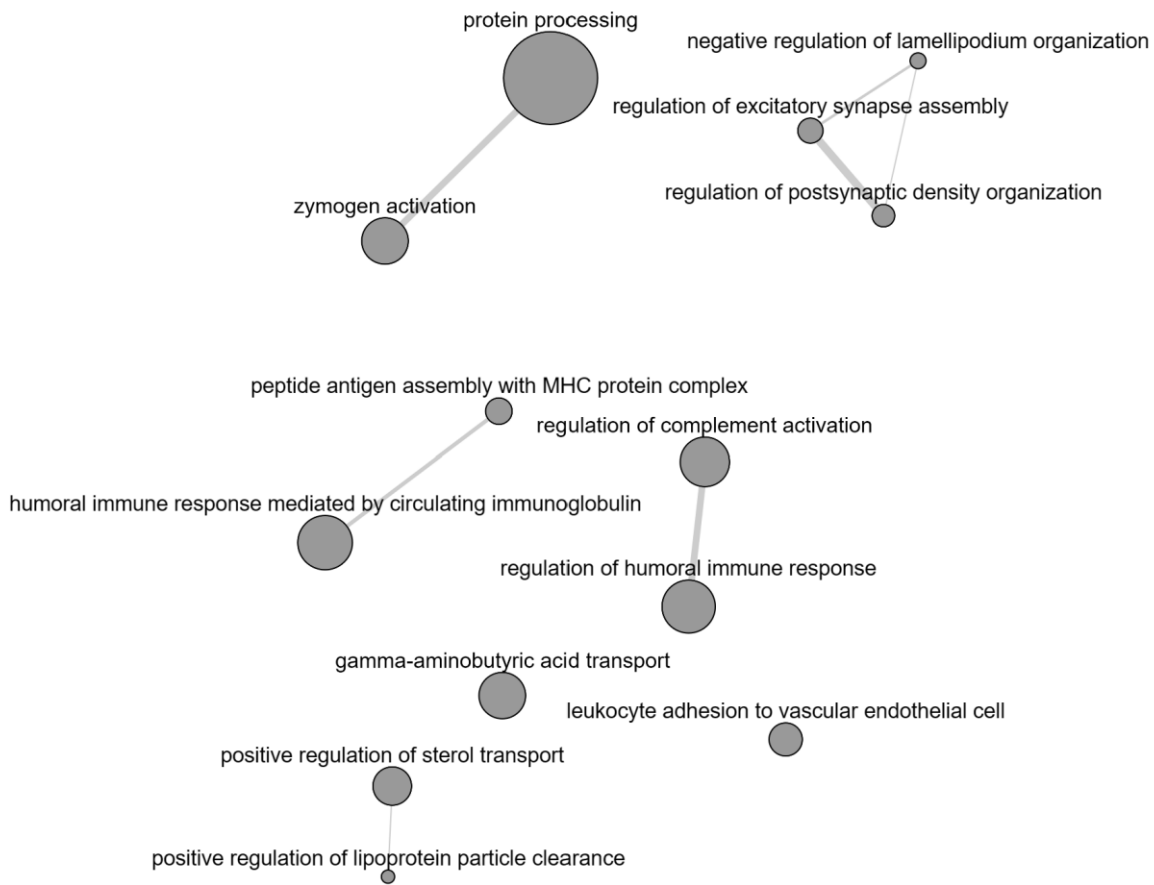


Figura Suplementaria 16. Mapa de redes donde se asocian diferentes procesos biológicos o nodos. Ontologías provenientes de genes coincidentes entre: los que están sobrerrepresentados en el RNAseq de muestras parkinsonianas y los que están infrarrepresentados en el RNAseq de microglía inflamada y tratada con el componente CBD y SCH 58261 (2270), agonista de CB₂R y antagonista de A_{2A}R respectivamente. Los nodos con mayor cercanía y con más interacciones, establecen más conexiones y comparten la misma identidad de clúster. Los nodos con un tamaño mayor son más relevantes dentro de los datos analizados.



Figura Suplementaria 17. Mapa de redes donde se asocian diferentes procesos biológicos o nodos. Ontologías provenientes de genes coincidentes entre: los que están infrarrepresentados en el RNAseq de muestras parkinsonianas y los que están sobrerrepresentados en el RNAseq de microglía inflamada y tratada con el componente CBD y SCH 58261 (2270), agonista de CB₂R y antagonista de A_{2A}R respectivamente. Los nodos con mayor cercanía y con más interacciones, establecen más conexiones y comparten la misma identidad de clúster. Los nodos con un tamaño mayor son más relevantes dentro de los datos analizados.

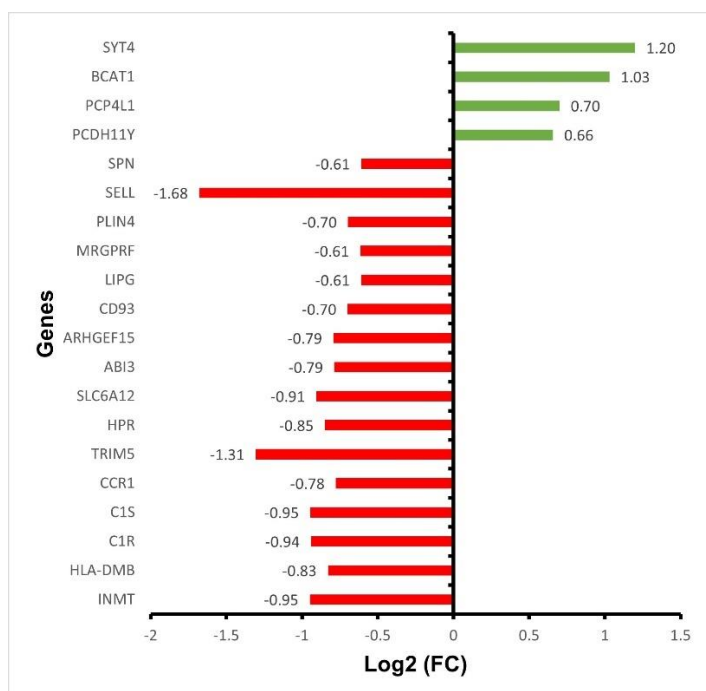


Figura Suplementaria 18. Representación gráfica donde se visualiza los genes coincidentes con su valor Log2 FC asociado. Los genes provienen de la lista de genes coincidentes sobre/infrarrepresentados entre el RNAseq de muestras parkinsonianas y el RNAseq de microglía inflamada y tratada con el componente CBD y SCH 58261 (2270), agonista de CB₂R y antagonista de A_{2A}R respectivamente.

Análisis interómico

Tabla Suplementaria 4. sobre los procesos biológicos encontrados al realizar un análisis interómico entre los genes DEGs de Parkinson y los metabolitos significativamente expresados en el humor acuoso de pacientes parkinsonianos. En color naranja se indican las vías de transducción de señales. En color verde se muestran los procesos relacionados con el reclutamiento celular y la vasodilatación. En color azul se indican las rutas inflamatorias implicadas. En color violeta se observan los procesos apoptóticos y de muerte neuronal. En color rojo se visualiza las rutas asociadas a la enfermedad del Parkinson. En color amarillo se ubican las vías relacionadas con otros sistemas tisulares involucrados en la inflamación. Los procesos mostrados tienen un p-valor ajustado (FDR) < 0,05.

Procesos Biológicos	Raw p	FDR	Impact
MAPK signaling pathway	4.9964e-17	5.5127e-15	1.1613
Ras signaling pathway	5.2919e-13	2.6559e-11	1.2292
PI3K-Akt signaling pathway	8.7976e-13	3.64e-11	1.0294
Rap1 signaling pathway	9.5055e-12	3.1463e-10	0.87234
TNF signaling pathway	4.2282e-09	4.9984e-08	0.69072
NF-kappa B signaling pathway	6.2548e-09	6.6785e-08	1.2025
Apelin signaling pathway	3.6534e-08	2.8792e-07	1.1067
FoxO signaling pathway	8.4098e-08	6.3265e-07	1.0714
Wnt signaling pathway	3.6336e-07	2.4054e-06	1.4024

T cell receptor signaling pathway	5.4935e-07	3.4968e-06	1.507
mTOR signaling pathway	1.0916e-06	6.5692e-06	0.79762
NOD-like receptor signaling pathway	1.3093e-06	7.3455e-06	0.79769
Calcium signaling pathway	3.6229e-06	1.8449e-05	0.82353
C-type lectin receptor signaling pathway	3.7033e-06	1.8573e-05	1.1526
Neurotrophin signaling pathway	7.5683e-06	3.5283e-05	1.2073
HIF-1 signaling pathway	7.5683e-06	3.5283e-05	1.2805
Toll-like receptor signaling pathway	1.5369e-05	6.6065e-05	1.3571
cGMP-PKG signaling pathway	1.5986e-05	6.7839e-05	0.76829
Chemokine signaling pathway	2.092e-05	8.5489e-05	1.5
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	2.3105e-05	9.3266e-05	2.1667
Relaxin signaling pathway	2.5129e-05	0.00010021	1.0444
Adipocytokine signaling pathway	3.7167e-05	0.00013823	1.3256
JAK-STAT signaling pathway	8.055e-05	0.00028981	2.3889
Notch signaling pathway	8.4888e-05	0.00029891	0.85185
Sphingolipid signaling pathway	0.00011711	0.00040803	0.86585
p53 signaling pathway	0.00012482	0.00043036	0.5303
ErbB signaling pathway	0.00024041	0.00078788	1.8261
TGF- β signaling pathway	0.00025002	0.00081133	0.875
Oxytocin signaling pathway	0.00026269	0.00084418	0.97368
cAMP signaling pathway	0.00028959	0.00092166	1.0164
Prolactin signaling pathway	0.00032583	0.001008	0.81538
IL-17 signaling pathway	0.0014299	0.0038795	0.11111
Fc epsilon RI signaling pathway	0.0033402	0.0086375	1.0556
Retrograde endocannabinoid signaling	0.0045143	0.01132	0.47619
GnRH signaling pathway	0.006414	0.015497	0.78723
Cytokine-cytokine receptor interaction	0.0073291	0.017233	0.45035
Estrogen signaling pathway	0.0092653	0.021216	0.76623
VEGF signaling pathway	0.009294	0.021216	1.0303
AMPK signaling pathway	0.012072	0.026639	0.71277
Thyroid hormone signaling pathway	0.017882	0.037462	0.5283
PPAR signaling pathway	0.02007	0.04152	2.2203
Focal adhesion	1.2287e-08	1.162e-07	1.8548
Complement and coagulation cascades	1.7972e-08	1.6077e-07	0.67164
Tight junction	1.2688e-07	9.3329e-07	1.1407
Cell adhesion molecules (CAMs)	9.792e-07	6.0021e-06	0.46792
Leukocyte transendothelial migration	1.3059e-06	7.3455e-06	1
Platelet activation	2.8022e-06	1.496e-05	1.0575
Adherens junction	3.1945e-05	0.00012295	0.56
Gap junction	0.006414	0.015497	1.1923
Neuroactive ligand-receptor interaction	0.003805	0.0096141	0.30337
B cell receptor signaling pathway	5.2126e-10	8.6268e-09	1.32
Th1 and Th2 cell differentiation	3.3628e-09	4.1225e-08	1.4366
Phagosome	7.6853e-09	7.9495e-08	0.16667
Regulation of actin cytoskeleton	2.1085e-08	1.8366e-07	1.4096
Fc gamma R-mediated phagocytosis	2.7209e-07	1.838e-06	1.4286
Inflammatory bowel disease (IBD)	1.5367e-06	8.3383e-06	0.53226
Th17 cell differentiation	3.3669e-06	1.769e-05	0.6
Lysosome	1.3809e-05	6.014e-05	0
Natural killer cell mediated cytotoxicity	0.00030608	0.00096488	1.3265
Amoebiasis	0.0003176	0.00099174	0.3
Autophagy - animal	0.012072	0.026639	0.825

Apoptosis	6.8104e-11	1.6723e-09	1.2389
Cell cycle	2.8991e-10	5.6448e-09	1.5273
Cellular senescence	6.0233e-10	9.4938e-09	1.1453
Synaptic vesicle cycle	1.2982e-07	9.3412e-07	0.44118
GABAergic synapse	1.2463e-06	7.237e-06	0.48214
PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	9.994e-06	4.5315e-05	1.15
Necroptosis	0.00065743	0.0019257	0.94681
Apoptosis - multiple species	0.0010765	0.0030197	0.60606
Circadian entrainment	0.0018857	0.0049934	1.1897
Axon guidance	5.3921e-11	1.4873e-09	1.1946
SNARE interactions in vesicular transport	0.00054067	0.0015979	0.36842
Dopaminergic synapse	0.00095891	0.00276	0.72222
Growth hormone synthesis, secretion and action	0.0022629	0.0059446	1.0635
Protein processing in endoplasmic reticulum	0.0023525	0.0061312	0.22642
Prion diseases	0.005622	0.013784	0.15625
Osteoclast differentiation	2.4504e-17	4.0554e-15	1.3158
Glutamatergic synapse	4.9846e-06	2.4625e-05	0.78571
Cholinergic synapse	1.9542e-05	8.1881e-05	0.77049
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	2.5635e-05	0.00010081	0.61224
Endocytosis	0.0002202	0.00074374	0.23358
Longevity regulating pathway - multiple species	0.00046743	0.0013939	1.0566
Mineral absorption	0.0010177	0.0028973	0.047059
Longevity regulating pathway	0.0010241	0.0028973	1.3519
Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption	0.0018415	0.0049157	0.30357
GnRH secretion	0.0065266	0.015654	0.55319
Gastric acid secretion	0.0069438	0.016535	0.5
DNA replication	0.010304	0.023361	0
Intestinal immune network for IgA production	0.011277	0.025391	0.11111
Serotonergic synapse	0.015456	0.032795	0.39744
Aldosterone-regulated sodium reabsorption	0.022867	0.047012	0.5