

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Efecto neuroanatómico y conductual de la terapia génica
con BDNF en ratas hemiparkinsonianas”**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. SILVIA REFUGIO ZAPATA MONDRAGÓN

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Directora de la tesis:

Dra. Claudia Pérez Cruz

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por su apoyo financiero en la realización de este proyecto con la beca número 355726.

A la **Dra. Claudia Pérez Cruz**, titular del laboratorio de Neuroplasticidad y neurodegeneración por recibirme en su equipo de trabajo y apoyarme en la realización de este proyecto.

Al **Dr. Daniel Martínez Fong**, titular de los laboratorios 39 y 59 deo departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, por brindarme el material y el apoyo necesario para llevar a cabo este proyecto.

A la **Dra. Jacqueline Ivette Acosta García**, auxiliar del laboratorio de Neuroplasticidad y neurodegeneración, por su valioso apoyo en la estandarización e implementación de técnicas y en la realización de los experimentos, así como sus enseñanzas para el trabajo de laboratorio durante el desarrollo del presente proyecto.

A la **M. en C. Yazmín Monserrat Flores Martínez** por su apoyo y su tiempo invertido en la generación de grupos experimentales y pruebas conductuales, además de las experiencias compartidas.

Al **Sr. Eduardo García Osornio**, técnico del laboratorio de Neuroplasticidad y neurodegeneración, por su ayuda en el desarrollo de este proyecto.

A **Ernesto Moreno, Theresa Gresch y Julia Boek**, porque a pesar del corto tiempo de su estancia en el laboratorio, sus manos fueron de gran ayuda para terminar con éxito este proyecto.

A **Daniel y Luis**, compañeros de laboratorio y amigos, que con su gran ayuda y buen humor, hicieron de mi estancia en el laboratorio, un tiempo ameno y agradable.

A **mis padres Guillermo y Leticia** por creer en mí y apoyarme en cada proyecto que me he planteado en la vida, sin importar cuán descabellado sea.

Resumen

La enfermedad de Parkinson es un padecimiento crónico neurodegenerativo que afecta aproximadamente entre el 1 y 2% de la población mundial mayor de 60 años de edad. Esta patología es caracterizada por la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra *pars compacta* (SNpc) y tiene como consecuencia un déficit en las funciones motoras que causan los signos clínicos característicos de esta enfermedad, como la bradicinesia, inestabilidad postural y rigidez muscular. Los factores tróficos son proteínas que promueven la supervivencia y protección de diversas poblaciones celulares. Dentro de esta familia de proteínas se encuentra el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). En la enfermedad de Parkinson se ha mostrado que promueve la supervivencia y protección de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la terapia génica NTS-Poliplex-BDNF en la regeneración de neuronas DA de la SNpc, así como la recuperación de la innervación dopaminérgica axonal en estriado. Ratas Wistar recibieron una inyección unilateral de 6-OHDA (20 µg) en la emergencia de las fibras nigro-estriatales dopaminérgicas. Una semana después, se realizó la prueba de giro inducida por amfetamina para evaluar la efectividad de la lesión. Al día siguiente los animales fueron transfectados con NTS-Poliplex-BDNF o con vehículo y sacrificados 21 días después. El tejido cerebral se procesó para inmunofluorescencia contra la enzima tirosina hidroxilasa y la proteína de densidad post-sináptica PSD-95. Se obtuvieron imágenes por microscopía confocal del estriado y de SNpc y se utilizó el software Image J para analizarlas. Nuestros resultados muestran que las ratas tratadas con NTS-Poliplex-BDNF presentaron una recuperación motora, demostrado por una disminución en la conducta de giro inducida por amfetamina, acompañado por ligero aumento en el número de dendritas dopaminérgicas en la SNpc. En los tiempos establecidos del presente protocolo no se logró encontrar un efecto significativo de la terapia génica con NTS-Poliplex-BDNF a nivel de entidades sinápticas. Se propone que estudios posteriores evalúen el efecto de esta innovadora terapia a intervalos mayores, para poder detectar recuperación sináptica en las regiones aquí descritas. El uso de esta terapia podría ofrecer una alternativa médica para los pacientes con la enfermedad de Parkinson.

Abstract

Parkinson's disease is a neurodegenerative chronic disorder affecting around 1-2% of ageing population. It is characterized by the selective loss of dopaminergic neurons of the Substantia Nigra *pars compacta* (SNpc), driving to an impairment of motor function such as bradykinesia, rest tremor and rigidity.

Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is a protein that promotes the survival and provides protection to the mesencephalic dopaminergic neurons. The aim of this study was to evaluate the effect of NTP-Poliplex-BDNF gene-therapy over the dopaminergic neurons in SNpc and the recovery of the axonal sprouting in striatum. Wistar rats were unilaterally injected with 6-hydroxi-dopamine in the emergence of nigral dopaminergic fibers to the striatum. One week later, motor impairment was evaluated using the amphetamine-induced turning behavior. Following the evaluation, animals were transfected with NTS-Poliplex-BDNF or vehicle, and 21 days post-transfection brain tissue was removed. We performed immunofluorescence against tyrosine-hydroxylase and postsynaptic density protein PSD-95. Confocal images were obtained to quantify the dopaminergic cell number in SNpc and TH-positive fiber in the striatum. Image analysis was performed using ImageJ software. Our results show a recovery in BDNF-NTS-Poliplex treated rats in the amphetamine-induced turning behavior. In addition, we found a slight recovery of number of dopaminergic neurons and striatal-axonal density on the BDNF-treated rats, however, it was non-significant. We believe that the time interval used in this protocol was not enough to observe synaptic effects by the gene-therapy. Further studies using longer intervals are necessary to obtain conclusive data about the synaptic recovery in hemiparkinsonian rats treated with NTS-Polilex-BDNF. This innovative therapy can be a promising treatment for patients with Parkinson's Disease.

Contenido

Lista de abreviaturas.....	1
Introducción.....	3
1. Generalidades.....	3
2. Herramientas preclínicas en enfermedad de Parkinson.....	13
2.1 Modelo con la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina	13
.....	14
2.2 Modelo de la EP con 6-Hidroxidopamina.	14
2.3 Conducta de giro inducida por anfetamina.....	16
3. Cambios morfológicos de la vía nigro-estriatal en modelos animales de la enfermedad de Parkinson.....	6
3.1 Sustancia Nigra pars compacta	6
3.2 Estriado.....	6
4. Factores neurotróficos y su enfoque terapéutico en EP.....	9
4.1 Factor neurotrófico derivado de la glía.....	9
4.2 Neurturina.....	10
4.3 Factor neurotrófico derivado del cerebro.....	10
4.4 Estrategias para la administración de factores tróficos.....	11
Antecedentes.....	18
Justificación.....	20
Hipótesis	21
Objetivos.....	21
1. Objetivo general.....	21
2. Objetivos particulares	21
Material y métodos.....	22
1. Animales	22
2. Diseño experimental	22
3. Lesión con 6-OHDA.....	23
4. Formación del NTS-POLIPLEX.....	23
5. Prueba de giro inducida por anfetamina.....	24
6. Obtención de tejido.....	24
7. Inmunofluorescencia.....	25
7.1 Tirosina hidroxilasa (TH).....	25
7.2 Proteína de densidad post-sináptica (PSD-95).....	25

[Escriba aquí]

8. Obtención de imágenes	26
9. Análisis de datos	27
9.1 <i>Tirosina hidroxilasa en SNpc.</i>	27
9.2 <i>Tirosina hidroxilasa en el núcleo estriado.</i>	27
9.3 <i>Proteína de densidad post-sináptica 95 en el núcleo estriado.</i>	27
Resultados	29
1. Conducta de giro inducida por amfetamina	29
2. Modificaciones morfológicas después de la terapia génica con NTS-Poliplex-BDNF. 30	
Discusión	36
Perspectivas.....	41
Referencias	43

Lista de abreviaturas

μm	Micrómetros
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AP	Anteroposterior
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
BSA	Albumina de suero bovino
DAérgicas	Dopaminérgicas
DAPI	4',6-Diamino-2-Fenilindol
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOPAC	Ácido dihidroxifenil-acético
DV	Dorso-ventral
EP	Enfermedad de Parkinson
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
g	Gramos
GABA	Ácido Gamma Amino Butírico
GDNF	Factor Neurotrófico Derivado de la Glia
GFRα1	Receptor alfa-1 de la Familia de GDNF
h	Horas
kDa	Kilodaltons
Kg	Kilogramos
M	Molar
ML	Medio-lateral
ml	Mililitros
MSN	Neuronas espinosas medianas
MPPP	1-metil-4-fenil-4-propionpiperidina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NRTN	Neurturina
NTS	Neurotensina
PBS	Buffer Fosfato Salino
PK	Péptido cariofílico
PSD-95	Proteína de densidad post-sináptica
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SNpc	Sustancia Nigra <i>pars compacta</i>
SNpr	Sustancia Nigra <i>pars reticulata</i>
TBS	Tris-Buffer Salino
TH	Tirosina Hidroxilasa
TrkB	Receptor de Quinasa relacionado a la Tropomiosina de tipo B.
UPDRS	Escala Unificada para la Evaluación de la Enfermedad de Parkinson

Introducción

1. Generalidades

Entre los padecimientos que afectan a las personas de edad avanzada, el desorden neurodegenerativo más común después de la enfermedad de Alzheimer es la enfermedad de Parkinson (EP)¹. La primera descripción formal de la patología fue hecha por James Parkinson en 1817, donde registró los síntomas motores cardinales de la enfermedad, los cuales incluyen bradicinesia, rigidez, temblor en reposo e inestabilidad postural¹.

Se ha estimado que esta patología afecta al 1% de la población mayor a 65 años de edad². En México, existe aproximadamente una prevalencia de entre 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes por año y se espera que esta cifra aumente conforme aumenta la tasa de vida del país³.

La etiología de la enfermedad aún no está bien esclarecida, pero se sabe que participan factores genéticos y ambientales. El 90% de los casos reportados ocurren de manera esporádica⁴, mientras que en el 5-10% de los pacientes, el origen se debe a factores genéticos².

El hallazgo patológico asociado con los síntomas motores de la EP es la degeneración y muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) de la Sustancia Nigra pars compacta (SNpc); estas células envían sus proyecciones al estriado. La dopamina (DA) ejerce un efecto modulador en las vías activadoras e inhibitoras del movimiento. La falta de este neurotransmisor en el estriado produce un desequilibrio en ambas vías, produciendo sobre activación de la vía inhibitoria del movimiento⁵. Los síntomas motores comienzan a observarse cuando se reduce el contenido de dopamina en el estriado en alrededor del 80% y la pérdida de neuronas DAérgicas de la SNpc es del 50 al 60 %¹.

Desde que se identificó el déficit de dopamina estriatal y su relación con la sintomatología motora, se propuso corregir la falta de este neurotransmisor como tratamiento para la EP. El primer tratamiento propuesto, y que hasta ahora se sigue

utilizando como estándar de oro para la EP es la Levodopa. El mecanismo de acción de este fármaco consiste en restaurar los niveles de dopamina en el estriado, pero no detiene la muerte neuronal. Más aún, el tratamiento a largo plazo con este fármaco, desemboca en la aparición de complicaciones motoras⁶.

Debido a la complejidad de la enfermedad, y la aparición de efectos secundarios tras el tratamiento farmacológico con Levodopa, se han explorado distintas estrategias terapéuticas para la EP. La farmacoterapia incluye agentes que actúan sobre el sistema dopaminérgico, y otros con diferente mecanismo de acción, no dopaminérgicos.

Dentro de los fármacos que actúan directamente sobre la modulación de la neurotransmisión dopaminérgica, además de la Levodopa, tenemos a los inhibidores de enzimas metabolizadoras de dopamina. A nivel periférico, los inhibidores de la Catecol-O-metiltransferasa (COMT), prologan la duración del efecto central de la levodopa. Mientras que en el cerebro, los inhibidores de la Monoaminoxidasa-B (MAO), favorecen la acción de la dopamina endógena y exógena al prolongar la vida media de esta⁶. También están disponibles como tratamiento, agonistas de los receptores a dopamina, como el pramipexol y el ropinirol; que a diferencia de la bromocriptina y la pergolida, agonistas tradicionalmente usados, no son derivados de la ergolina⁷.

La terapia no dopaminérgica para el tratamiento de la EP incluye a fármacos anticolinérgicos, antagonistas de receptores A2A de adenosina, antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato, moduladores del sistema noradrenérgico y serotoninérgico⁶. El tratamiento con estos fármacos generalmente se da en combinación con terapia dopaminérgica, o cuando algunos síntomas no mejoran después del reemplazo dopaminérgico. Pese a la implementación de diferentes estrategias farmacológicas, la aparición de efectos secundarios motores y no motores es ineludible.

También se ha propuesto el uso de neurocirugía para implantar electrodos de estimulación cerebral profunda en diferentes núcleos como el núcleo subtalámico y

el globo pálido interno. El uso de la cirugía se ha indicado cuando los síntomas motores no mejoran con la terapia farmacológica⁷.

Por otra parte, en un esfuerzo por detener la progresión de la degeneración y restaurar la función neuronal, se han intentado estrategias como el trasplante de células madre⁸, y el uso de la terapia génica⁶. A pesar de los avances en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad y el desarrollo de las alternativas terapéuticas, no existe aún la cura para la EP.

2. Cambios morfológicos de la vía nigro-estriatal en enfermedad de Parkinson.

2.1 Sustancia Nigra pars compacta

Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc son las células principales de proveer de dopamina a los ganglios basales. Como ya se mencionó anteriormente, la degeneración progresiva de estas neuronas lleva a la aparición de los síntomas característicos de la EP.

La pérdida más severa de neuronas dopaminérgicas ocurre en la región ventro-lateral de la SNpc en pacientes con EP²⁴. Al inicio de la sintomatología, a este nivel, se ha perdido aproximadamente el 68% de las neuronas, y en general un 48% en la parte caudal de la SNpc²⁵. En modelos animales, inyecciones de 6-OHDA en estriado llevan a la degeneración retrógrada de las neuronas de la SNpc, y dependiendo de la lesión existe de un 30 hasta un 90% de muerte neuronal en función del tiempo^{16,26}.

2.2 Estriado

En condiciones normales, las neuronas de la SNpc envían proyecciones axonales hacia la zona dorsolateral del estriado, siendo que la liberación de dopamina tiene actividad moduladora en este núcleo; Por un lado, facilita la vía directa a través del receptor D1, e inhibe a la vía indirecta mediante activación de receptores D2, esto permite la correcta ejecución de movimientos voluntarios^{12,27}. Es importante mencionar que la transmisión dopaminérgica en el estriado es de tipo parasináptica o por volumen, es decir, el neurotransmisor puede ejercer su efecto aunque se encuentre distante de la hendidura sináptica²⁸.

El estriado es el núcleo de entrada principal de ganglios basales y juega un papel muy importante en la ejecución de movimientos voluntarios, entre otras funciones^{29,12}. El 95% de las células estriatales son las Neuronas Espinosas Medianas, (MSN por sus siglas en inglés)³⁰. Estas neuronas como su nombre lo indica, son de tamaño medio y contienen abundantes espinas dendríticas. Las MSN reciben entrada glutamatérgica proveniente de la corteza y del tálamo. Además, este núcleo, se encuentra densamente innervado por axones dopaminérgicos provenientes de la

SNpc (en el estriado dorsolateral) y del Área Tegmental Ventral (en la región ventral del estriado)^{31,32}.

La principal entidad sináptica estriatal son las espinas dendríticas de las neuronas MSN, en éstas convergen entradas glutamatérgicas y dopaminérgicas. La transmisión excitatoria glutamatérgica activa receptores ionotrópicos post-sinápticos localizados en la cabeza de la espina, mientras que la dopamina, proveniente de neuronas mesencefálicas, activa a receptores metabotrópicos localizados en el cuello^{32,30}. A esta formación se le conoce como triada sináptica estriatal. Alrededor del 40% de las varicosidades dopaminérgicas presentes en el estriado están formando parte de la triada sináptica^{31,33,34}. La transmisión dopaminérgica juega un papel muy importante en esta triada, ya que además de ser un neurotransmisor modulador, participa en conservar la morfología de las espinas, una vez que estas alcanzan la forma madura (tipo hongo), además de promover la formación de nuevas espinas³⁵. Estudios *in vitro* han demostrado que, después de 5 o 10 días de la presencia de neuronas dopaminérgicas en cultivos celulares de MSN, hay un aumento en el número de espinas inmaduras tipo filopodio, además en monocultivos de MSN pero con activación de receptores D1 y D2 por medio de agonistas (SKF38393 y quinpirol respectivamente), también se observó un aumento en el número de espinas dendríticas en este tipo neuronal, respecto a las condiciones control (4.43 ± 0.29 vs 6.83 ± 0.28 protrusiones en $50\mu\text{m}$ de dendritas primarias)³⁶. Esto sugiere que la presencia de dopamina y mediante la activación de sus receptores post-sinápticos, está involucrado en la espinogénesis de las MSN.

Por otra parte, la participación de los receptores NMDA de glutamato en las terminales post-sinápticas es muy importante en la plasticidad neuronal del estriado. Se ha demostrado que para la maduración de espinas es necesaria la presencia de terminales glutamatérgicas corticales³⁷. Los receptores a glutamato se anclan a proteínas asociadas a sinapsis (SAP) como SAP97 y PSD-95 (proteína de densidad post-sináptica 95), las cuales controlan la interacción con el medio intracelular, es decir, proteínas de señalización y enzimas³⁸.

Se ha observado, en tejido post-mortem de pacientes con EP, así como en modelos animales de 6-OHDA, que la pérdida de la innervación dopaminérgica en el estriado

produce una serie de cambios distróficos en las MSN; estos incluyen disminución en el número de espinas dendríticas, así como en el largo y número de ramificaciones de la arborización dendrítica neuronal^{39,40}.

La disminución de dopamina estriatal lleva a una menor activación de receptores pre-sinápticos D2 corticoestriatales, aumentando la transmisión glutamatérgica y produciendo excitotoxicidad neuronal³⁵. A nivel post-sináptico, la falta de activación de este familia de receptores, ocasiona desinhibición de canales de calcio regulados por voltaje, esto tiene como consecuencia mayor influjo de calcio y pérdida de espinas dendríticas^{29,41}. También se ha observado una disminución de niveles de PSD-95 en la membrana celular en estriados denervados de dopamina, además de una aparente redistribución de la proteína a compartimentos vesiculares³⁸.

3. Factores neurotróficos y su enfoque terapéutico en EP.

Los factores tróficos son proteínas de gran importancia para el desarrollo y supervivencia de poblaciones neuronales del sistema nervioso central en mamíferos. Además se han propuesto como moléculas de señalización que juegan un papel muy importante en la plasticidad sináptica^{42,43}.

Debido a las funciones de los factores neurotróficos y a su gran potencial terapéutico, la investigación en este campo ha ido creciendo rápidamente. Es posible que la disrupción de factores tróficos específicos, sus receptores y las cascadas de señalización, aunada a un desequilibrio de citocinas inflamatorias, sea la causa de muerte celular y enfermedades neurodegenerativas^{44,45}. Las neurotrofinas más estudiadas en desordenes del sistema nervioso central son el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF)^{46,47,45}. Aquí incluiremos también a la Neurturina (NRTN) por los efectos tróficos que ejerce sobre las neuronas dopaminérgicas.

3.1 Factor neurotrófico derivado de la glía.

El factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) tiene gran importancia en el desarrollo y supervivencia post-natal de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Está presente en estriado en las MSN que reciben innervación de la SNpc. Este interactúa con su receptor GFR α 1, el cual se encuentra expresado en neuronas mesencefálicas^{45,48,49}.

No hay evidencia de que la pérdida de GDNF esté relacionada con la EP. Sin embargo, debido a su actividad protectora en las neuronas dopaminérgicas, se ha propuesto como una posible terapia para tratar esta patología.

El GDNF, inyectado directamente en la SNpc o en estriado de roedores, protege a las neuronas dopaminérgicas de daño por neurotoxinas⁵⁰. Y aunque también hay evidencia de que restaura la función de las células después de la administración de toxinas, el efecto es menor, comparado con su actividad neuroprotectora^{51,52}.

Estudios en primates con parkinsonismo inducido por MPTP y tratados con GDNF muestran que hay un aumento en el tamaño y número de las neuronas dopaminérgicas, así como un aumento en los niveles de dopamina en estriado^{50, 53,22}.

Sin embargo las pruebas en la clínica no han sido muy exitosas. Se ha intentado la administración intraputamina e intracerebroventricular del factor neurotrófico sin mejoría relevante de los pacientes y con un gran número de efectos adversos. Esto puede deberse a que la proteína no difunde correctamente^{54,55}.

3.2 Neurturina.

La neurturina (NRTN) es un análogo estructural y funcional del GDNF. De igual manera se une a los receptores GFR α 1 y GFR α 2. Se expresa en la vía nigroestriatal durante el desarrollo y la etapa adulta. Esta neurotrofina ha mostrado potenciar la supervivencia de neuronas DA *in vitro* y en modelos animales de EP^{56, 57}. Posee efecto restaurativo en neuronas DAérgicas de roedor dañadas con 6-OHDA pero no se ha observado recuperación en estriado. También se ha observado restauración en neuronas con pérdida de fenotipo relacionada a la edad en monos viejos. Sin embargo, la evidencia de la función restaurativa es limitada comparada con la existente para GDNF^{45, 58}.

En pruebas clínicas, y administrada de forma intraputamina a través de terapia génica, la NTRN no ha mostrado mejoría de los síntomas motores, comparada con animales sometidos a una falsa cirugía en puntajes de la escala unificada para la enfermedad de Parkinson (UPDRS)⁵⁷.

3.3 Factor neurotrófico derivado del cerebro.

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es una proteína de 14 kDa⁵⁹, ha mostrado ser uno de los más potentes moduladores de la transmisión y plasticidad sináptica en el sistema nervioso central^{47,46}. Es requerido para el desarrollo y supervivencia de neuronas dopaminérgicas, colinérgicas, GABAérgicas y serotoninérgicas^{60,61}. Las neuronas dopaminérgicas son capaces de sintetizar y almacenar factores tróficos, como el BDNF. Además se ha mostrado que el receptor de alta afinidad para esta proteína (TrkB) se expresa en las células dopaminérgicas

mesencefálicas^{62,63}, esto significa que la proteína tiene un efecto autócrino y ejerce un efecto directo sobre las mismas neuronas, a diferencia de lo que ocurre con otras proteínas como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), cuyo efecto está mediado por células gliales⁶⁴. Se ha demostrado que el BDNF radiomarcado e inyectado en el estriado, es capturado específicamente y transportado de manera retrógrada por las neuronas de la SNpc⁶⁵.

Se ha visto que el BDNF aumenta la supervivencia de neuronas dopaminérgicas en cultivo, promueve el crecimiento de neuritas, aumenta la recaptura de dopamina y la actividad de la enzima tirosina-hidroxilasa (TH). Además protege a las neuronas de los efectos tóxicos de la 6-OHDA^{45,66,67}. Estudios *in vitro* e *in vivo* que involucran el trasplante de células liberadoras de BDNF, en SNpc como en estriado, muestran un cambio en la morfología neuronal en SNpc pero no en el núcleo estriado. Además se ha visto que este tratamiento disminuye los giros inducidos por anfetamina^{68,69}.

En EP las neuronas afectadas permanecen disfuncionales por largos periodos de tiempo hasta que se pierden de manera irreversible. Si el BDNF es administrado antes de la pérdida total de las neuronas, puede haber recuperación del fenotipo y alivio de los síntomas motores causados por el déficit de dopamina²². Este factor también se ha propuesto como un tratamiento para la EP, ya que la patología está asociada con niveles reducidos BDNF⁴⁴.

3.4 Estrategias para la administración de factores tróficos.

Debido al gran potencial neuroprotector y neuro-regenerativo de los factores neurotróficos, se han intentado diferentes estrategias para la administración de estos, infusión directa, implantes de células modificadas para la liberación de factores tróficos y terapia génica. Cada protocolo de administración se ha encontrado con limitaciones y no todos han podido llevarse a la práctica clínica.

Se ha probado la seguridad y eficacia en pruebas de fase I, de la infusión intraputamina de GDNF humano recombinante, en pacientes con EP en un estadio avanzado (estado III o IV según la escala de Hoehn y Yahr). Veinticuatro semanas de infusión de la proteína a dosis escaladas, mostraron mejora del parkinsonismo

bilateral, esto reflejado en la escala UPDRS y mejora en el balance y la marcha del paciente. Las mejoras permanecieron después de 5 meses de haber discontinuado la administración del tratamiento⁵⁵. A pesar del efecto benéfico de esta terapia, tiene la desventaja de ser un procedimiento invasivo, ya que involucra el implante de un catéter y la administración de un volumen diario de GDNF, debido a esto, es necesario la optimización de los métodos de administración para poder abarcar una mayor población con EP.

Asimismo se ha intentado la administración de factores neurotróficos con terapia génica pero sin resultados significativamente benéficos⁶. Un estudio realizado con un vector recombinante de virus Adeno-Asociado tipo-2 (AAV-2) portando el gen de la proteína Neurturina y se inyectó por cirugía estereotáxica directamente en putamen. Se mostró que el vector es seguro y bien tolerado por humanos, además de proveer la expresión de la proteína terapéutica por un largo periodo de tiempo. Este tipo de terapia no mostró ninguna ventaja sobre los pacientes con cirugía sham⁵⁷.

Otra estrategia de administración de factores neurotróficos es el implante de células genéticamente modificadas. Sin embargo este tipo de trabajos no ha logrado trascender a la aplicación clínica. En el trabajo realizado por Kang y colaboradores, utilizan un modelo de lesión con 6-OHDA en ratas. En el estriado de estos animales, implantan fibroblastos genéticamente modificados para producir BDNF, estos fueron implantados en dos sitios diferentes del estriado a las 2 semanas posteriores a la lesión con 6-OHDA y encontraron que hay prevención parcial en la pérdida de fibras dopaminérgicas en el estriado y protección completa contra la muerte de cuerpos celulares en la SNpc⁷⁰. No obstante, esta terapia tiene la desventaja de que las células pueden migrar hacia otras zonas diferentes al blanco primario, lo cual puede poner en duda la seguridad y eficacia de la terapia⁶.

4. Herramientas preclínicas en enfermedad de Parkinson.

Generar modelos animales mediante el uso de toxinas, ha sido una herramienta muy valiosa para el entendimiento de la fisiopatología de EP, así como para el desarrollo de terapias que ayuden a aliviar los síntomas motores⁹.

El objetivo principal de los modelos animales de la EP es reproducir la degeneración neuronal por estrés oxidativo e inflamación que ocurre en la EP. No obstante, cada uno tiene sus propias características dependiendo de la toxina, y los datos generados gracias a estas características han podido ser extrapolados a la clínica. Los modelos con las toxinas 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) han sido usados ampliamente por reproducir en los animales los síntomas cardinales de la EP y la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas¹⁰.

4.1 Modelo con la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

En la búsqueda de la etiología de la EP, se encontró que existen factores ambientales capaces de producir parkinsonismo. Langston en 1983 publicó un trabajo en el cual, jóvenes que utilizaban drogas ilícitas desarrollaban síndrome parkinsonico¹¹. Se encontró que durante la síntesis del compuesto 1-metil-4-fenil-4-propionpiperidina (MPPP), un análogo del opioide meperidina, se producía también el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), siendo este último el responsable de los síntomas motores.

El MPTP es convertido en el cerebro, a través de la enzima monoamino oxidasa (MAO), a la toxina MPP+, que es capturada de manera selectiva por las neuronas nigroestriatales¹². Mientras que las ratas son resistentes a la inducción de parkinsonismo por MPTP, en humanos y primates no humanos, se produce de modo irreversible, y las características bioquímicas y patológicas de este modelo se asemejan en gran medida a lo que sucede clínicamente en la EP¹⁰.

Este modelo también ha sido usado para explorar los mecanismos moleculares involucrados en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas cuando la toxina es administrada de forma intraperitoneal o subcutánea en ratones¹³.

Según la especie utilizada y el régimen de administración de la toxina, se pueden obtener diferentes datos, dependiendo de qué se quiere obtener en particular. La tabla 1 muestra la diferencia de algunos modelos animales con MPTP.

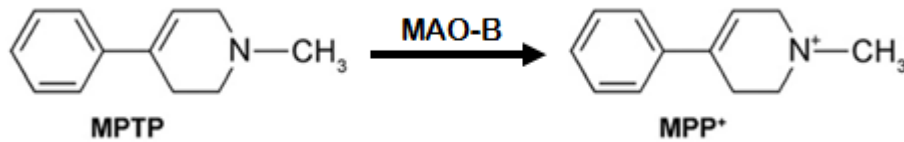


Figura 1. Estructura química de la toxina MPTP y de su metabolito MPP+.

4.2 Modelo de la EP con 6-Hidroxidopamina.

El modelo de EP con 6-OHDA ha sido ampliamente usado después que Ungerstedt en 1968 describiera la neurodegeneración ocasionada sobre neuronas monoaminérgicas del sistema nervioso central¹⁴. La neurotoxina tiene una estructura química similar a la dopamina (figura 2), y posee alta afinidad por los transportadores de catecolaminas, dañando a neuronas noradrenérgicas y dopaminérgicas. No es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, así que la administración de ésta es por inyección estereotáxica, ya sea directamente en la SNpc, en el haz medial prosencefálico, o estriado^{15 13,16}.

La administración de la 6-OHDA directamente en la SNpc o en el haz medial prosencefálico, produce una rápida muerte neuronal que comienza dentro de las primeras 24 horas debido a la recaptura por las neuronas dopaminérgicas. Aproximadamente a las 5 semanas después de la lesión, se han perdido más del 90% de las células en la SNpc¹⁷, mientras que en el estriado, la pérdida completa del contenido dopaminérgico se ocurre dentro de las 3 semanas después de la inyección de la 6-OHDA¹⁸. Cuando este modelo es utilizado, la toxina debe ser administrada con un inhibidor selectivo de la recaptura de noradrenalina, por ejemplo, la desimipramina, para evitar la muerte de estas neuronas monoaminérgicas¹³. La desventaja de este modelo es que, cuando se realiza de forma bilateral, la depleción de dopamina ocurre de manera extensa afectando a otros núcleos que reciben innervación dopaminérgica como la corteza prefrontal, el bulbo olfatorio y núcleo

acumbens, lo que lleva a la aparición de otros efectos en los animales, como acinesia severa, adipsia o afagia y causando una alta tasa de mortalidad^{19,20}.

Otra forma de lesión es inyectar unilateralmente la 6-OHDA en estriado, la degeneración ocurre de manera progresiva y se evita el daño mecánico en la sustancia nigra. En este modelo, la toxina afecta primeramente a los axones dopaminérgicos que se encuentran alrededor del sitio de inyección, después el daño se extiende hacia el cuerpo neuronal por medio de transporte retrógrado axonal¹³. En 1998, Kirik y colaboradores, caracterizaron distintos puntos de lesión en el estriado lateral y observaron un mayor déficit motor en ratas que recibieron 3 o 4 inyecciones de 6-OHDA a lo largo (rostro-caudal) del estriado lateral. Al realizar el análisis histológico encontraron que una reducción del 60-70% de fibras dopaminérgicas (positivas a tirosina hidroxilasa) en el estriado lateral y la pérdida de aproximadamente 50-60% de neuronas TH positivas en la sustancia nigra¹⁶. Otros modelos han mostrado que con una sola dosis de 6-OHDA en el neostriado, hay pérdida de alrededor del 25% de neuronas TH positivas y que esta degeneración progresa hasta alcanzar el 90% de pérdida neuronal a los 30 días después de la lesión²¹. Esta forma menos severa de inducir la muerte neuronal nos da la ventaja de poner a prueba nuevos fármacos para tratar la EP, además de la evaluación de trasplantes celulares y los beneficios de la terapia génica sobre la degeneración de la vía nigro-estriatal^{10,22}.

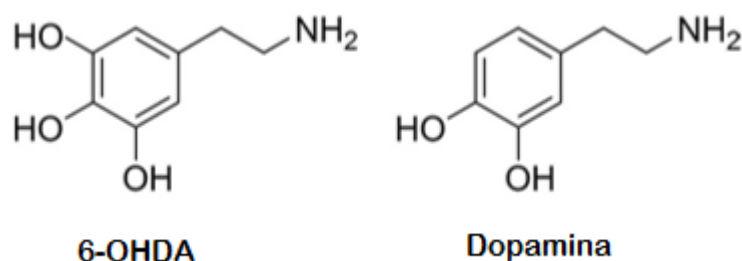


Figura 2. Similitud estructural de la dopamina con la 6-OHDA.

4.3 Conducta de giro inducida por anfetamina

Para probar la existencia de la lesión unilateral con la toxina 6-OHDA y el grado de depleción de dopamina, la prueba de conducta de giro es bien aceptada. Se basa en el uso de fármacos que actúen sobre el sistema dopaminérgico, principalmente la apomorfina y la D-anfetamina^{23,9}. La apomorfina es un agonista de receptores dopaminérgicos, teniendo mayor afinidad por receptores de tipo D4 y D2. Estos se encuentran hiper-sensibilizados en el lado lesionado debido a un mecanismo compensatorio, cuando la pérdida de aferentes dopaminérgicos es mayor al 90%. En esta condición, la apomorfina causa giros contralaterales a la lesión y estos se relacionan a la depleción máxima de dopamina en la vía nigro-estriatal⁹.

La anfetamina, en cambio, produce la liberación de dopamina e inhibe su recaptura en las terminales dopaminérgicas intactas. En animales lesionados unilateralmente con 6-OHDA, hay un desbalance en el sistema dopaminérgico, ya que el lado sin lesión es capaz de liberar mayor cantidad de dopamina que el lado lesionado. Lo anterior ocasiona giros ipsilaterales, es decir, hacia el lado de la lesión²³. Esta conducta comienza a observarse cuando hay una pérdida del 30-50% de células en la SNpc y aproximadamente una disminución del 40-50% de innervación estriatal dopaminérgica¹⁶. Es posible relacionar el número de giros tras la inyección de anfetamina, con la actividad dopaminérgica remanente, siendo así una herramienta útil cuando se hacen lesiones parciales, como en el modelo de lesión estriatal^{9,13}.

Tabla 1. Principales modelos animales de Enfermedad de Parkinson, daño neuronal producido y usos. *Modificación de Bové J. y Perier C. 2012¹³.

<i>Modelo animal de EP</i>	<i>Daño nigro-estriatal</i>	<i>Usos del modelo</i>
<i>Inyección unilateral de 6-OHDA en el Haz medial proencefálico de roedor</i>	Pérdida masiva de neuronas dopaminérgicas (>90%). La pérdida de dopamina estriatal es dosis-dependente	Prueba de terapias sintomáticas. Estudio de las consecuencias de la denervación dopaminérgica en el circuito de los ganglios basales.
<i>Inyección unilateral de 6-OHDA en el estriado de roedor</i>	Pérdida parcial y menos súbita de neuronas dopaminérgicas (30-75%). LA pérdida de innervación estriatal está delimitada al sitio de inyección.	Prueba de terapias sintomáticas. Estudio de los mecanismos de muerte celular.
<i>Administración aguda de MPTP en ratones</i>	Pérdida masiva de neuronas dopaminérgicas (70%). Niveles de dopamina reducidos en estriado.	Prueba de estrategias de neuroprotección. Estudio de mecanismos de neuroinflamación.
<i>Administración crónica de MPTP en ratones</i>	Pérdida parcial de neuronas dopaminérgicas (30-50%). Reducción de innervación dopaminérgica en estriado.	Prueba de estrategias de neuroprotección. Estudio de mecanismos de muerte celular.
<i>Administración de MPTP en primates no-humanos</i>	Dependiendo de la vía de administración y del régimen, pérdida del 60-90% de neuronas DAérgicas. Reducción de innervación dopaminérgica en estriado.	Prueba de terapias sintomáticas. Estudio de las consecuencias de la denervación dopaminérgica en el circuito de los ganglios basales

Antecedentes

Como ya se ha mencionado antes, uno de los objetivos del tratamiento de la EP con neurotrofinas, es detener la progresión de la enfermedad y lograr un efecto reparador a nivel anatómico. Se han experimentado diferentes formas de administración de las proteínas, entre ellas la terapia génica. Este es un método con el potencial de liberar continuamente el factor neurotrófico, producido de manera biológica, en un área determinada del cerebro.

Las nanopartículas de Neurotensina-Poliplex (NTS-Poliplex) funcionan vector de transfección de genes de tipo no viral, dirigido específicamente a neuronas dopaminérgicas⁷¹. Este sistema es dirigido ya que consiste en acoplar un plásmido con el gen de la proteína a expresar, a una molécula que pueda ser reconocida e internalizada por la célula blanco, en este caso, el NTS-Poliplex utiliza como medio de entrada la endocitosis de la neurotensina, después de la unión a su receptor de alta afinidad (NTSR1)^{71,72}, el cual está densamente expresado por neuronas dopaminérgicas mesencefálicas⁷³.

Se ha probado la capacidad de este complejo para transferir genes *in vitro* e *in vivo* específicamente en neuronas dopaminérgicas. El NTS-Poliplex con BDNF-flag fue inyectado en SNpc y estriado de ratas sin parkinsonismo inducido. Se comprobó la transfección mediante inmunofluorescencia y un gran número de neuronas positivas a tirosina hidroxilasa (TH) expresaron el transgen, mientras que en neuronas estriatales no se observó inmunoreactividad contra el BDNF-flag⁷³.

La eficiencia de este sistema en modelos animales de EP también ha sido probada. Se transfectó NTS-Poliplex-hGDNF en la SNpc de ratas Wistar, una semana después de haber sido lesionadas con 6-OHDA en el estriado ventro-lateral. El tratamiento con el transgen produjo cambios bioquímicos, así como neuroanatómicos, además de recuperación de la conducta motora en los animales⁷¹. Experimentos posteriores, usando un protocolo similar de lesión y transfección, muestran el efecto de la transfección con BDNF-flag en la vía nigroestriatal a los 3 y 15 días después de la transfección. En ambos se observa recuperación motora e inmunoreactividad para

TH en estriado y SNpc, además de somas agrandados y neuritas dopaminérgicas hipertróficas. Cabe resaltar que se observó la expresión de BDNF-flag en neuronas dopaminérgicas^{74,74,75}. Por lo tanto, la transfección de factores tróficos como el BDNF, mediante la terapia génica no viral, se considera una herramienta con alto potencial terapéutico al ser dirigida a las neuronas dañadas en esta patología, y al no mostrar efectos secundarios debido a su alta selectividad.

Justificación

La transfección de GDNFh a través del vector NTS-Poliplex ha mostrado reversión del daño motor en ratas hemiparkinsonianas además de un aumento en el contenido de dopamina en SN y estriado⁷⁶. Actualmente se ha desafiado al NTS-Poliplex a transfectar el gen del BDNF en neuronas dopaminérgicas dañadas con el fin de reemplazar la pérdida de BDNF endógeno causada por la degeneración⁷⁴.

Recientemente se observó que quince días después de la transfección con NTS-Poliplex-BDNF o GDNF a las neuronas de la SNpc de ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) resulta en la recuperación de la inervación dopaminérgica en el núcleo estriado, robusta arborización de las fibras dopaminérgicas en la SNpc y restauración de los niveles de dopamina en el estriado^{76,77}. Además se observó una mejora conductual en los animales tratados, lo cual refleja directamente la recuperación de la funcionalidad de la población dopaminérgica⁷⁵⁻⁷⁷.

Este protocolo pretende evaluar el potencial neuro-regenerativo de la terapia génica con BDNF a nivel celular en neuronas de la SNpc, así como de las proyecciones hacia el estriado, la posible recuperación de contactos sinápticos y la recuperación de la conducta motora, podría poner al NTS-Poliplex-BDNF como una buena alternativa terapéutica para pacientes con EP, sin el uso de intervenciones repetidas y con un alto índice que recuperación sináptica y motora.

Hipótesis

En ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA y transfectadas con BDNF en la Sustancia Nigra pars compacta, se producirá una regeneración de dendritas en dicho núcleo, además recuperación de la transmisión dopaminérgica en estriado acompañado de mejoras conductuales, en comparación con ratas lesionadas y no tratadas.

Objetivos

1. Objetivo general

- Evaluar los cambios neuroanatómicos que pudieran estar ocurriendo en el núcleo estriado y SNpc a las cuatro semanas post-transfección del gen de BDNF en ratas con lesión unilateral con 6-OHDA.

2. Objetivos particulares

- Evaluar el grosor y número de dendritas de neuronas positivas TH en SNpc a las 3 semanas después de la transfección con BDNF.
- En la región dorsolateral del estriado, cuantificar la densidad de axones dopaminérgicos (positivos a TH).
- Evaluar la posible recuperación de contactos sinápticos mediante los niveles de la proteína PSD-95, marcada con inmunofluorescencia.
- Evaluar de manera indirecta la recuperación de los niveles de dopamina en ratas lesionadas y tratadas con la terapia génica mediante la prueba de giro inducida por anfetamina.

Material y métodos

1. Animales

Para este estudio, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de entre 220-250 g de peso al inicio del experimento. Los animales permanecieron en un cuarto con temperatura regulada entre los 21 ± 2 °C con ciclos de luz-oscuridad de 12-12 h con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos de manipulación y manejo de los animales fueron realizados de acuerdo a la legislación mexicana actual, NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA), basada en la Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio.

2. Diseño experimental



Los procedimientos quirúrgicos (lesión con 6-OHDA y transfección) y el manejo de animales (prueba de giro) fueron llevados a cabo en el laboratorio 39 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, el cual está a cargo del Dr. Daniel Martínez Fong, y aprobadas por el comité de ética de uso de animales (protocolo no. 109-02). Estas manipulaciones fueron realizadas por la M. en C. Yasmín Monserrat Flores Martínez.

Al inicio del experimento (día cero) se realizó la lesión con 6-OHDA mediante cirugía estereotáxica⁷⁵. Una semana después de la inyección de 6-OHDA o vehículo, los animales fueron evaluados mediante la prueba de giro inducida por amfetamina, se seleccionaron aquellos cuyo conteo fue de 1000 ± 200 giros ipsilaterales en 90 minutos²³. Un día después, se administró mediante cirugía estereotáxica, DMEM (vehículo del NTS-Poliplex) o NTS-Poliplex-BDNF. Dos semanas posteriores a la

transfección o falsa-transfección, se realizó nuevamente la prueba de giro y el número de estos fueron registrados. Con el fin de evitar alguna interferencia por cambios o alteraciones morfológicas producidas por la anfetamina administrada a las ratas, esperamos una semana para la extracción de tejido, esto es, tres semanas después de la transfección. El tejido fue almacenado para su procesamiento. Los detalles de los procedimientos se describen en breve.

3. Lesión con 6-OHDA

La cirugía estereotáxica fue conducida bajo anestesia intraperitoneal con una mezcla de ketamina (70 mg/kg)-xilacina (6 mg/kg), para ello las ratas fueron fijadas en el equipo estereotáxico (51600, Stoelting, Wood Dale, ILL, EU), colocando la barra del incisivo a 0-6 mm. La 6-OHDA (Sigma-Aldrich, H4381, St.Louis, MO, EU) fue disuelta en ácido ascórbico estéril al 0.2% (Sigma-Aldrich, A7506, St. Louis, MO, EU). Después de la trepanación, utilizando las siguientes coordenadas con respecto a la línea interaural: AP, +6.9 mm; ML, +4 mm y DV, -5 mm por arriba de la duramadre, se procedió a inyectar la solución de 6-OHDA (20 µg contenidos en 3 µL de ácido ascórbico) a un flujo de 12 µL/h y permitiendo 15 minutos de difusión antes de retirar la aguja de inyección.

Este procedimiento fue realizado en su totalidad por los colaboradores del Dr. Daniel Martínez Fong en el Departamento de Fisiología, Neurociencias y Biofísica del Cinvestav.

4. Preparación del NTS-POLIPLEX

El DNA plasmídico (pDNA) del BDNF, el péptido cariofílico (PK) y el acarreador de NTS se disolvieron individualmente en DMEM libre de suero. El NTS-poliplex se formó utilizando las siguientes proporciones: 3 partes de pDNA, 1 parte de PK y 2 del acarreador de NTS. Una vez determinadas las relaciones molares óptimas del pDNA-PK mediante geles de retardo, se llevó a cabo el acople electrostático del conjugado pDNA-PK-acarreador de NTS (NTS-poliplex). La mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos en agitación constante a 1000 rpm. Todos los procedimientos fueron

realizados a temperatura ambiente. Este procedimiento fue realizado en su totalidad por los colaboradores del Dr. Daniel Martínez Fong en el Departamento de Fisiología, Neurociencias y Biofísica del Cinvestav.

5. Prueba de giro inducida por anfetamina

La conducta de giro fue inducida por metanfetamina (10 mg/kg de peso corporal), disuelta en solución salina fisiológica (NaCl 0.9%, PISA laboratorios), e inyectada intraperitonealmente. Los animales se colocaron en cilindros adecuados para realizar esta prueba. Diez minutos después de inyectar la anfetamina, comenzaron a registrarse manualmente los giros ipsilaterales y contralaterales por minuto en un lapso de 90 minutos. Para seleccionar las ratas correctamente lesionadas con 6-OHDA se consideraron únicamente aquellas ratas que presentaron 1000 ± 200 giros ipsilaterales al hemisferio lesionado. En la fase post-transfección se contaron por minuto los giros inducidos en el mismo periodo de 90 minutos y se compararon con los giros post-lesión.

6. Obtención de tejido

Para la extracción de tejido, los animales fueron tratados con sobredosis de anestésico pentobarbital sódico (PISA laboratorios, 2ml/Kg), posteriormente se realizó perfusión intracardiaca con solución amortiguadora de fosfatos (PB 0.1M, pH 7.4), seguido de 4% de paraformaldehído en el mismo buffer. Los cerebros fueron removidos y post-fijados en la misma solución durante 2 horas. Se realizaron cortes coronales de 80 μm , utilizando un micrótopo vibratorio (VT1000S, Leica Microsystems Inc.), obteniendo 12 rebanadas que contenían del núcleo estriado y 12 de SNpc. El tejido fue almacenado a 4° C en PBS 0.1M hasta su procesamiento.

7. Inmunofluorescencia

7.1 Tirosina hidroxilasa (TH).

Secciones coronales conteniendo a la SNpc y secciones del núcleo estriado fueron marcadas con inmunofluorescencia contra TH. El tejido fue permeabilizado con una solución de Tritón 0.1% en buffer salino Tris (TBS) por 10 minutos. El bloqueo se hizo con suero de caballo (Vector laboratorios, USA) al 5% en TBS durante 10 minutos. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS y se agregó el anticuerpo primario anti-TH hecho en conejo (1:500, Merck Millipore, USA) en una solución de TBS y suero de caballo (Vector laboratorios, USA) al 5%. El tejido se dejó incubar toda la noche a 4°C con agitación constante. Después de lavar las secciones, se agregó el anticuerpo secundario marcado con Alexa 488 (1:500, Jackson ImmunoResearch, USA) y se incubó a temperatura ambiente cubierto de la luz por un periodo de 3 horas. El tejido fue lavado posteriormente utilizando TBS. Después el tejido se colocó en portaobjetos y se cubrió con medio de montaje Vectashield (Vector laboratories, USA).

7.2 Proteína de densidad post-sináptica (PSD-95).

La inmunofluorescencia para PSD-95 se realizó mediante libre flotación en secciones conteniendo el estriado. Se realizó la permeabilización del tejido con PBS (0.1M)-Tritón 0.3% durante 15 min. Después el tejido fue incubado en una solución de PBS con suero de caballo (Vector laboratorios, USA) al 10% y albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich, USA) al 5% durante 4 horas para bloquear sitios inespecíficos. El tejido fue lavado 4 veces durante 5 minutos con una solución de PBS-Tritón 0.1% y en seguida se agregó el anticuerpo primario anti-PSD-95 hecho en ratón (1:500, MyBioSource, USA) en una solución de PBS-Suero de caballo 10%-BSA 5%. Se incubó durante dos noches a 4°C con agitación constante. Finalizado el periodo de incubación, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS-Tritón 0.1% y se agregó el anticuerpo secundario, Alexa 488 anti-ratón (1:500, Jackson ImmunoResearch, USA), en una solución de PBS-Tritón 0.3%, y se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente y con agitación constante. Las secciones fueron lavadas de la misma

manera que las veces anteriores. Como medio de contratinción las secciones se incubaron con DAPI (1:500, Affymetrix, USB products, USA) durante 30 minutos. Seguido a esto, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y el tejido fue montado con Vectashield (Vector laboratories, USA).

8. Obtención de imágenes

El tejido procesado con inmunofluorescencia, secciones estriatales y de SNpc, fue analizado mediante la obtención de imágenes por microscopía confocal (Leica SP8, Alemania). Para cada marcaje se utilizaron diferentes ajustes captura.

Las imágenes de neuronas dopaminérgicas de la SNpc se obtuvieron usando el objetivo de 20x, zoom factor de 1 y cortes (steps) de 1 μ m. La potencia del láser 488 fue de 7 con ganancia ajustada entre 500-600, offset de -2.0%. Se obtuvieron “bloques” (stacks) de aproximadamente 20 cortes de cada rebanada de la SNpc.

La inmunofluorescencia en las secciones estriatales marcadas con TH se capturó con el objetivo de 40x. La potencia del láser, ganancia y off-set fueron ajustada de igual forma que en el procedimiento anterior debido a que los anticuerpos primario y secundario y las concentraciones utilizadas fueron las mismas. EL zoom factor fue de 1 y haciendo secciones ópticas (steps) de 1 μ m, se obtuvieron bloques (stacks) de aproximadamente 20 μ m por sección estriatal. De esa forma se capturaron tres campos en el estriado, la parte dorso-lateral, dorso-medial y ventro-lateral.

Para obtener las imágenes de PSD-95 en estriado se utilizó un objetivo de aumento 100x. El láser 488 fue 7 y se redujo el fondo ajustando la ganancia entre 730-780 y el off-set de -7.0%, además se hizo un promedio de 4 secciones ópticas para la imagen final (line average). El zoom factor de captura fue 1, y a diferencia de las imágenes anteriores, solo se obtuvo un corte óptico (single image). Se tomó un campo del estriado dorso-lateral, dorso-media y ventro-lateral.

Todas las imágenes fueron analizadas utilizando diferentes funciones del software Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.)

9. Análisis de datos

9.1 *Tirosina hidroxilasa en SNpc.*

Se seleccionaron cortes rostrales, mediales y caudales de la SN (ambos hemisferios) de cada animal con el fin caracterizar los cambios en todo el núcleo. Para el análisis morfológico de neuronas positivas a TH, se utilizó la proyección máxima de las imágenes capturadas mediante microscopía confocal. El conteo neuronal fue realizado manualmente cuantificando el número de cuerpos celulares positivos a TH y al mismo tiempo calculando el área de cada cuerpo celular con la función de “measure” del programa ImageJ. Eliminando los somas de cada imagen y convirtiendo la imagen tipo binario, se aplicó la función de análisis de partículas y se obtuvieron el número de neuritas y el área de estas. Para los datos compilados se realizó el análisis de varianza de una vía (One way-ANOVA) y prueba de Tukey como análisis post-hoc utilizando el software GraphPad Prism versión 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA, www.graphpad.com).

9.2 *Tirosina hidroxilasa en el núcleo estriado.*

De la misma manera que para la SNpc, se seleccionaron cortes de la parte rostral, medial y caudal del estriado. Además, se tomaron diferentes campos por corte, con el propósito de abarcar todo el estriado. Con la proyección máxima de la imagen se cuantificó densidad óptica utilizando la función “measure” de ImageJ. Debido a que todas las imágenes fueron capturadas de la misma forma, reduciendo al máximo el fondo desde su captura, no se hicieron modificaciones de brillo, contraste o umbral con el programa. Los valores obtenidos fueron normalizados y analizados mediante ANOVA de una vía y post-hoc de Tukey con la versión 5 del programa GraphPad para Windows.

9.3 *Proteína de densidad post-sináptica 95 en el núcleo estriado.*

Se obtuvieron imágenes de las diferentes secciones estriatales (rostral, medial y caudal) y de diferentes campos que abarcaran todo el núcleo. No se hicieron modificaciones posteriores a la imagen después de su captura. Se utilizó la función

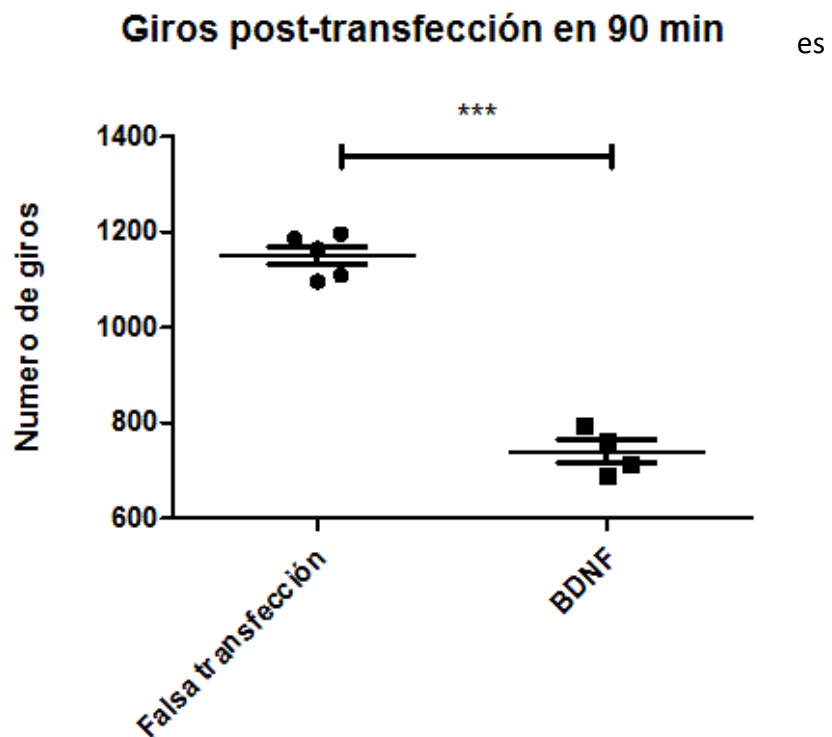
de medición “measure” del programa ImageJ para cuantificar la densidad óptica. Los datos recopilados se analizaron utilizando el programa Graphpad y un análisis de varianza de una vía con post-análisis de Tukey. Se graficaron los valores normalizados de densidad óptica.

Resultados

1. Conducta de giro inducida por amfetamina

Como ya mencionamos anteriormente, la conducta de giro inducida por amfetamina es un indicador de la actividad dopaminérgica que permanece después del daño, en ratas que han sido lesionadas unilateralmente con 6-OHDA. En este trabajo, la prueba fue utilizada como herramienta para evaluar la recuperación de la neurotransmisión dopaminérgica después de la transfección con el NTS-poliplex-BDNF.

Las ratas lesionadas con 6-OHDA y que fueron transfectadas con NTS-poliplex-BDNF mostraron mayor transmisión dopaminérgica, ya que presentan menor número de giros post- transfección cuando se comparan las ratas tratadas con vehículo. En la figura 3 se muestra el total de giros que obtuvo cada rata durante 90 minutos de prueba. La diferencia



estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre los grupos evaluados.

Fig. 3. Conducta de giro inducida por anfetamina a las dos semanas después de la transfección.

EL grupo tratado con NTS-poliplex-BDNF presenta una reducción en el número de giros a los 14 días después de haber sido transfectadas, esta reducción es estadísticamente significativa cuando se compara con el grupo de falsa transfección. BDNF n=4, Falsa transfección n=5, ***p=0.001.

2. Modificaciones morfológicas después de la terapia génica con NTS-Poliplex-BDNF.

2.1 Sustancia Nigra pars compacta

Siendo las neuronas dopaminérgicas de la SNpc las más afectadas en la EP, evaluamos la morfología de las neuronas reactivas a TH en este núcleo. Mediante la técnica de inmunofluorescencia, se analizó el número de dendritas y el área del soma de las neuronas positivas para TH. La figura 4 muestra imágenes representativas de la SNpc de cada grupo experimental. Cualitativamente observamos más inmunoreactividad para TH en la SNpc de animales lesionados y transfectados con NTS-Poliplex-BDNF, en comparación con la SNpc de ratas inyectadas solo con vehículo.

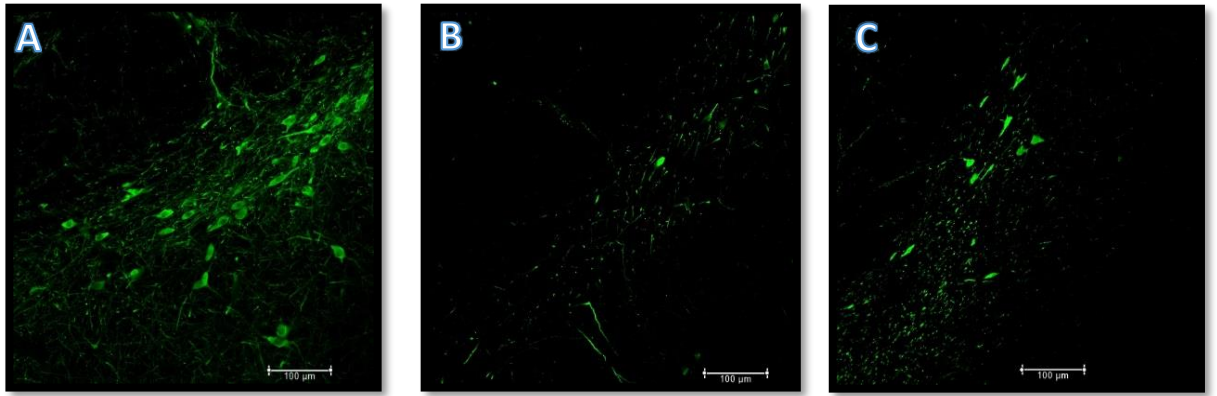


Fig. 4. Inmunoreactividad a TH en la SNpc. (A) Imagen representativa de la SNpc de una rata intacta. (B) Imagen representativa de la SNpc de una rata lesionada y falsamente transfecteda. (C) Imagen representativa de una rata lesionada y transfecteda con NTS-Poliplex-BDNF. Sustancia Nigra *pars reticulata* en la esquina inferior derecha de cada imagen. Barra de calibración 100µm.

Para evaluar si estos cambios en inmunoreactividad eran significativos, se realizó un estudio cuantitativo de células positivas para TH en diferentes cortes fronto-caudalmente. Sabemos que las neuronas positivas a TH presentan diferente tamaño y forma dependiendo del nivel en el que se encuentren en este núcleo⁷⁸, así que se seleccionaron cortes alturas iguales para esta evaluación y se hizo un promedio de las imágenes obtenidas. La figura 5A muestra la cantidad de neuronas positivas a TH, en donde el grupo con lesión y tratamiento con vehículo, 3 semanas después de la transfección presenta una pérdida aproximada del 88% de neuronas DAérgicas en comparación con el control (Figura 5, izquierda, $p > 0.001$). Se ha reportado que, después de 3 días de la lesión con 6-OHDA hay una pérdida del 25% de neuronas dopaminérgicas y que al día 30 esta pérdida aumenta hasta el 90%²¹. Esto es consistente con los datos aquí mostrados.

Al cuantificar el número total de células positivas para TH en SNpc en las ratas que recibieron NTS-poliplex-BDNF encontramos que no hubo mejorías en comparación con las ratas que fueron falsamente transfectadas (figura 5A).

Al analizar el área de los somas positivos para TH en este núcleo, observamos que los grupos con lesión presentan valores similares entre ellos siendo ambos significativamente menores en comparación con el área promedio de las neuronas de ratas intactas ($p \leq 0.01$) (figura 5B).

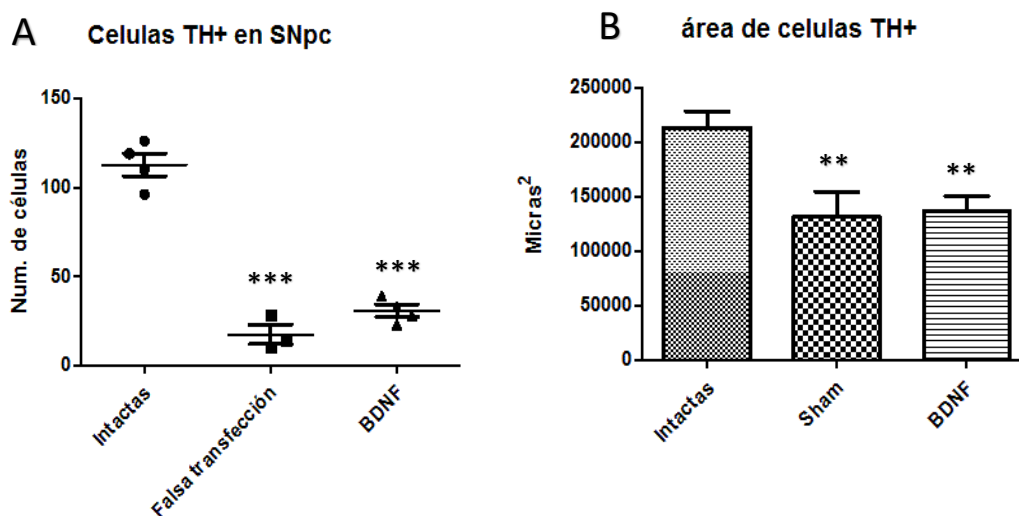


Fig. 5. Número de células TH+ en la SNpc. (A) Número total de células contadas por SNpc del hemisferio del lado lesionado. (B) Promedio del área de las células contadas en el núcleo del lado lesionado de cada animal. *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$. Grupos. Intactas $n=4$, Falsa transfección $n=3$, BDNF $n=4$.

La degeneración neuronal también involucra la pérdida de dendritas que proyectan hacia la SNpc y de los axones que se encuentran innervando al estriado. Por esta razón, se hizo la cuantificación de los procesos neuríticos (axones y dendritas) en la SNpc, además del área promedio de estos. En la figura 6A podemos observar que el número de procesos dendríticos positivos a TH disminuye en las ratas tratadas con falsa transfección ($p > 0.001$), y también en las ratas tratadas con terapia génica NTS-Poliplex-BDNF, sin embargo, mostró una ligera recuperación pero que no llegó a niveles control ($p > 0.01$) (Figura 6 A). Por otro lado, observamos que el área relativa que ocupan esos procesos dendríticos es significativamente mayor entre las ratas

falsas transfectadas y con NTP-Poliplex-BDNF en comparación con el grupo de ratas intactas ($p \leq 0.05$) (Figura 6B).

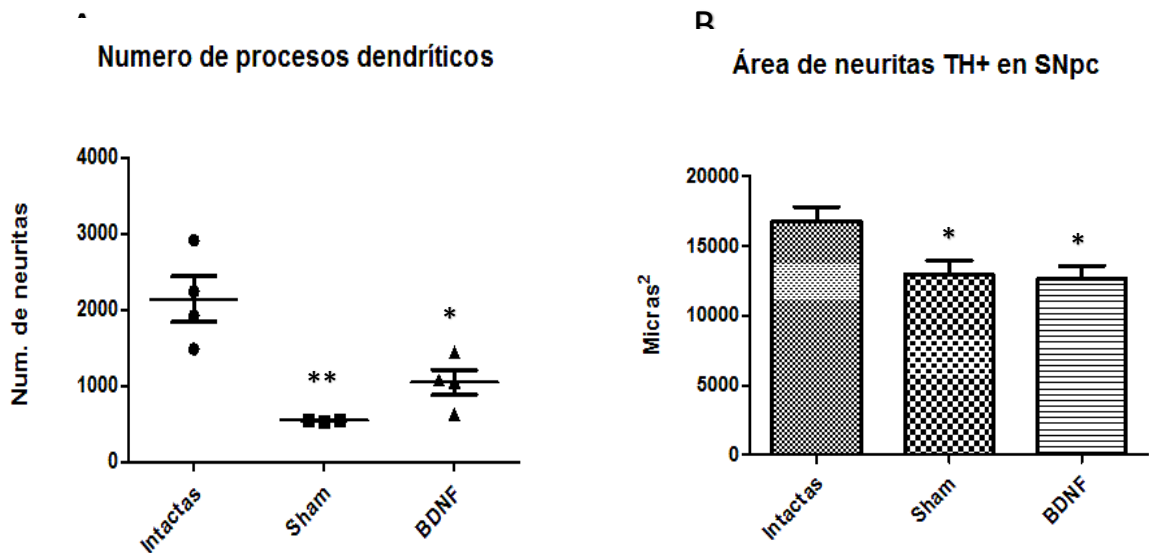


Fig. 6. Procesos dendríticos de células TH+ en la SNpc. (A) Número procesos dendríticos contados en cada SNpc del hemisferio del lado lesionado de cada rata. (B) Promedio del área de los procesos dendríticos contados por cada núcleo del lado lesionado de cada animal. ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$. Grupos. Intactas $n=4$, Falsa transfección $n=3$, BDNF $n=4$.

2.2 Núcleo Estriado.

Con el propósito de evaluar si el efecto de la terapia con NTS-Poliplex-BDNF produce recuperación también de las proyecciones axonales de la SNpc hacia el estriado, se cuantificó la densidad de axones dopaminérgicos en este núcleo. Dicha cuantificación se realizó por medio de la medición de densidad óptica de marca inmunofluorescente para TH en las imágenes obtenidas.

Podemos observar en la figura 7 los valores de densidad óptica de la innervación dopaminérgica en el estriado. Los grupos con falsa transfección y con NTS-Poliplex-BDNF presentan menor densidad óptica comparados con el grupo intacto, sin embargo los tres grupos no presentan diferencia significativa entre sí ($p > 0.05$).

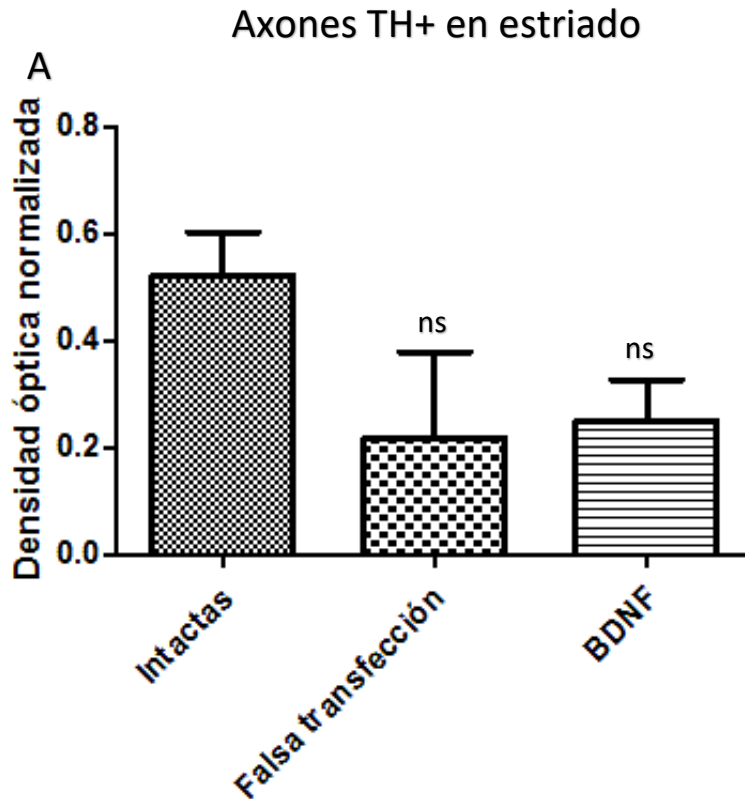


Fig. 7. Cuantificación de axones dopaminérgicos en el núcleo estriado. Los axones inmunoreactivos a TH fueron cuantificados por densidad óptica en tres diferentes secciones estriatales. El grupo de ratas intactas presenta mayor número de axones positivos a TH en comparación con los grupos transfectados ($P > 0.05$). Además, el grupo con NTS-Poliplex-BDNF presenta una mayor densidad óptica en comparación con el grupo de falsa transfección, no obstante la diferencia no es significativa. Grupos. Ratas intactas $n=4$, Falsa transfección $n=3$, NTS-Poliplex-BDNF $n=4$. Prueba ANOVA de una vía sin diferencia estadísticamente significativa. Se muestran los promedios \pm Error Estándar.

2.3 Posible recuperación de contactos sinápticos

Para poder correlacionar los cambios en la innervación dopaminérgica en el estriado con la cantidad de contactos sinápticos, se realizó inmunofluorescencia contra la proteína de densidad post-sináptica PSD-95. En nuestras manos y con los protocolos de inmunofluorescencia aquí descritos, no logramos encontrar diferencias significativas entre los diferentes grupos.

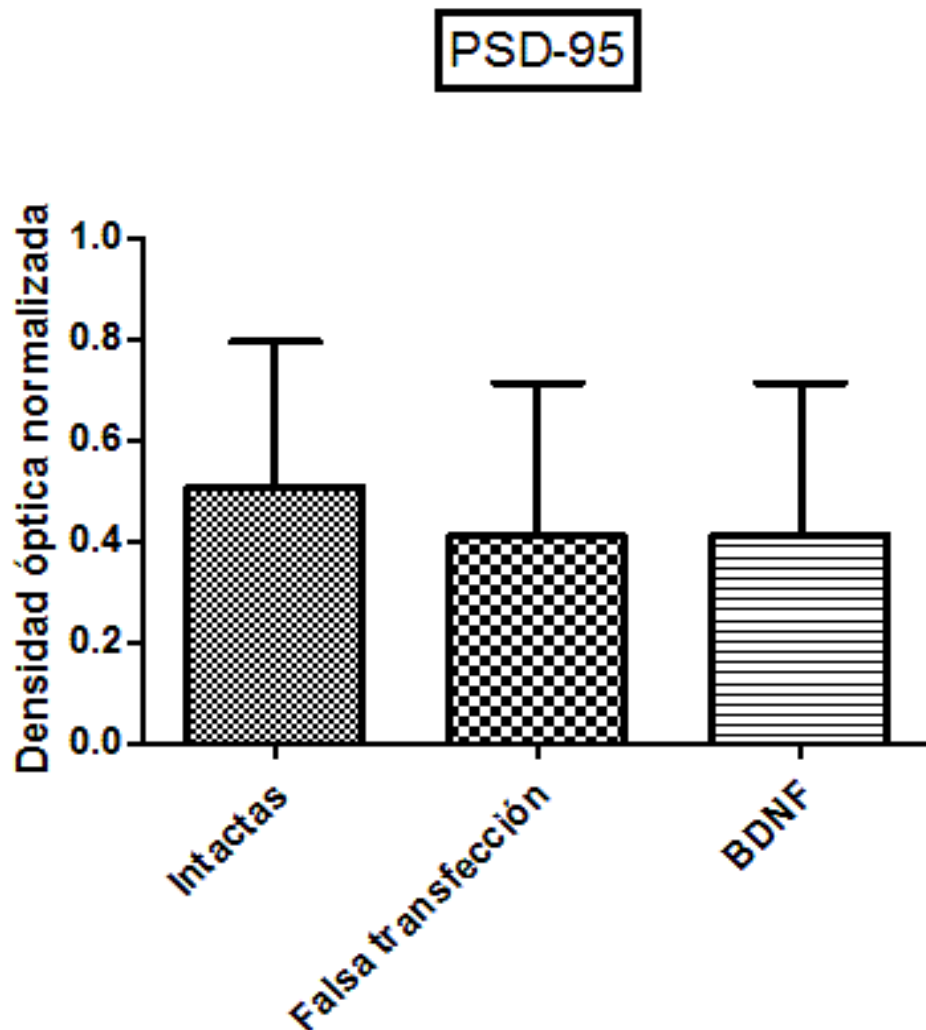


Fig. 7. Proteína PSD-95 en estriado. Se cuantificó a la proteína PSD-95 por densidad óptica y los valores fueron normalizados. No se observa diferencia significativa entre los grupos. Ratas intactas n=4, Falsa transfección n=3, NTS-Poliplex-BDNF n=4. Prueba ANOVA de una vía. Se muestran graficados los promedios ± Error Estándar.

Discusión

1. Efecto de la terapia génica en neuronas dopaminérgicas de SNpc y estriado.

En el presente proyecto se encontró que la terapia no viral con el vector NTS-Poliplex-BDNF en un modelo de ratas hemiparkinsonianas, logró mejorar el desempeño motor evaluado mediante la prueba de giro por anfetamina. Sin embargo, el correlato neuro-morfológico no pudo ser claramente correlacionado con esta mejora conductual. Hay que considerar que esta prueba no es contundente para hablar de recuperación de la innervación dopaminérgica. En algunas terapias de reemplazo de los niveles de dopamina con implantes de neuronas fetales dopaminérgicas en el estriado dorsal, los cuales restauran entre el 4 y 10% de los niveles totales de dopamina estriatal, se observa una completa abolición de la conducta de giro inducida por anfetamina^{79,80}.

Cualitativamente, se pudo observar una “mejora” en SNpc, al encontrar mayor inmunoreactividad para TH en las ratas transfectadas con NTS-Poliplex-BDNF en comparación con el grupo falso transfectado (DMEM, vehículo). Sin embargo, al cuantificar el número de las neuronas positivas a TH en la SNpc de ratas tratadas con vehículo y de ratas tratadas con NTS-Poliplex-BDNF estas no muestran diferencias significativas. Esto no concuerda con reportes previos donde, se observó que al tercer día después de la transfección con NTS-Poliplex-BDNF, las neuronas dopaminérgicas se encontraron hipertróficas⁷⁵. Puede ser que las condiciones de lesión y transfección en este trabajo hayan sido diferentes, y que por esta razón, los resultados sean diferentes.

En el trabajo realizado por Flores-Martínez, el criterio de selección de una correcta lesión con 6-OHDA se basó en la prueba de coordinación motora mediante rotarod. Esta prueba es de alta sensibilidad para detectar un déficit motor, implica un periodo de entrenamiento y un periodo de prueba, además de someter al animal a la inversión de su ciclo circadiano normal⁸¹. Esta manipulación puede hacer que la prueba sea subjetiva, haciendo difícil su reproducibilidad. En cambio la prueba de giro

inducida por anfetamina es altamente reproducible y con resultados objetivos, además de ser un buen indicador del grado de lesión en las neuronas dopaminérgicas⁹. Así, al tener un criterio de selección más preciso, podemos asegurar que la lesión con 6-OHDA causó una pérdida de aproximadamente 40-50% de dopamina estriatal en los animales usados, esto es según lo reportado para la prueba de giro con anfetamina⁵⁰. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la misma prueba se utilizó para evaluar recuperación post-transfección, mostrando resultados favorables. El uso de otra prueba conductual es mandatoria para este tipo de protocolos para poder evaluar el grado y tipo de “recuperación” y que este pueda correlacionarse con los cambios histológicos.

Otro punto a remarcar es que, en el trabajo de Flores-Martínez, la evaluación morfológica fue cualitativa. En nuestro trabajo, los cambios en la morfología neuronal se realizaron más detalladamente y de manera cuantitativa. El uso de microscopía confocal ha incrementado en los últimos años debido a las ventajas que ofrece, entre ellas, la obtención de imágenes de alta resolución en los tres diferentes ejes (X, Y y Z), controlar la profundidad de los campos, la reducción del ruido de fondo, la capacidad de capturar diferentes secciones ópticas de las muestras, y un análisis detallado de estas gracias a los diferentes programas disponibles para esto⁸². En nuestro análisis incluimos el número de células y área del soma de cada una de estas, abarcando gran parte de la SNpc. Por otro lado, realizamos la cuantificación de la innervación dopaminérgica en estriado a lo largo de su extensión rostro-caudal y en diferentes secciones (dorso-latera, dorso-medial y ventro-lateral), lo que puede resultar en un parámetro más estricto en la evaluación del efecto neuroanatómico de la terapia génica con NTS-Poliplex-BDNF.

Reportes previos sobre el efecto de terapias con BDNF han descrito los cambios morfológicos que ocurren en la vía nigro-estriatal. Yoshimoto et al., reporta que después de la implantación de astrocitos modificados capaces de producir BDNF en estriado, , en ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA, se observó un efecto benéfico sobre neuronas dopaminérgicas mesencefálicas ⁶⁸. Estos autores utilizaron la técnica inmunohistoquímica con el complejo Avidina-Biotina y anticuerpo anti-TH para identificar a las neuronas dopaminérgicas, además de tinción de Nissl para cuerpos

neuronales. Esta técnica permite evaluar el área ocupada por fibras TH positivas en SNpc y en estriado en un solo plano. Los cortes realizados fueron de 35 μ m y se tomaron solo 3 secciones de cada núcleo, esto podría hacer que se estén omitiendo regiones en las cuales pueden estar ocurriendo cambios importantes. Como se planteó en la hipótesis de nuestro trabajo y según los antecedentes existentes de la terapia con NTS-Poliplex-BDNF, esperábamos encontrar somas y neuritas con un área mayor. Mediante el uso de inmunofluorescencia se pueden analizar diversos planos en z de la tajada de imágenes por zona de interés, disminuyendo la inter-variabilidad de la marca. Confiamos en que el mismo protocolo, pero en intervalos de tiempo mayores, pueda mostrar un efecto benéfico sobre el área de los somas dopaminérgicos en este núcleo.

La técnica de impregnación de Golgi, desde su descubrimiento, ha sido ampliamente usada para estudiar a detalle la morfología neuronal. En un trabajo dirigido por Groves en 1977, se detallan los diferentes grupos neuronales de la Sustancia nigra, clasificándolos por su morfología, el tamaño del soma, el calibre dendrítico y la extensión de las dendritas⁸³. La técnica de Golgi les permite hacer estas diferenciaciones, sin embargo esta técnica es complicada de realizar, además de marcar de manera aleatoria, incluyendo otros elementos como vasos sanguíneos, glía y fibras de alrededor⁸⁴. En cambio, la inmunofluorescencia tiene la ventaja de que, al utilizar anticuerpos, estos se unen de manera específica al anticuerpo presente en estructuras que queremos identificar, a nivel celular o subcelular⁸².

Los factores neurotróficos pueden ejercer un efecto protector o de supervivencia neuronal, sin embargo, dependiendo del modelo experimental de EP y la forma de administración de la proteína neurotrófica, se pueden obtener diferentes efectos. El trabajo realizado por González-Barrios, en el cual se indujo hemiparkinsonismo en ratas por inyección unilateral de la toxina 6-OHDA, seguido de transfección del gen de la proteína trófica GDNF directamente sobre la SNpc, y evaluado a las 3 semanas de la transfección, se encontró recuperación de la innervación estriatal (aumento en la inmunoreactividad a TH en aproximadamente 85% comparado con un estriado solo con lesión) y aumento en los niveles de dopamina, observando una recuperación de los niveles del 90%. Además la pérdida de neuronas inmunoreactivas a TH fue menor

en el lado transfectado con GDNF (pérdida de 57% comparado 83% de un lado sin tratamiento)⁷⁶. En otro experimento, en donde transplantaron en la SNpc de ratas lesionadas con 6-OHDA células madre mesenquimales de humano genéticamente modificadas para producir BDNF, observaron también recuperación en la innervación estriatal, pero sin observar una diferencia en el número de células de la SNpc entre animales solo con lesión, y animales con transplante de células productoras de BDNF; Sin embargo encontraron que las células del lado transplantado se encontraron hipertróficas⁶⁹. Debido a que aún no son completamente conocidos los mecanismos por los cuales los factores neurotróficos promueven la supervivencia y regeneración neuronal⁴⁵, los resultados de las diferentes terapias con estas proteínas son variables y dependen de la forma y del momento en que estos sean administrados.

Por otra parte, ya que el tamaño de la muestra en este trabajo es relativamente pequeño (n=3), convendría realizar un análisis en grupos mayores para descartar las variabilidades individuales.

2. Efecto en el establecimiento de nuevos contactos sinápticos.

El propósito de cuantificar a la proteína PSD-95 fue evaluar la formación de nuevos contactos sinápticos gracias a la recuperación de la transmisión dopaminérgica de la SNpc hacia el estriado. Esta proteína está implicada en la morfología de las espinas dendríticas y se encuentra presente en la cabeza de espinas maduras (tipo hongo), anclando a receptores glutamatérgicos y dopaminérgicos⁸⁵. Después de la lesión con 6-OHDA hay una pérdida importante de espinas dendríticas en las neuronas estriatales³⁹ y acompañada de la disminución de PSD-95³⁸, además de sufrir redistribución en compartimentos vesiculares dentro de las células. Sin embargo se ha visto que con el reemplazo de dopamina en modelos experimentales de EP, los niveles de PSD-95 membranal regresan a su estado normal³⁸.

En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas entre los diferentes grupos, lo cual nos indica que lo más probable es que el protocolo aquí utilizado no logró detectar las alteraciones sinápticas ocasionadas por la lesión y aquellas que

podieran haber ocurrido después de la transfección. El ligero aumento de fibras TH positivas en estriado de ratas tratadas con NTS-Poliplex-BDNF debería poder correlacionarse con la cantidad de PSD-95, ya que la transmisión dopaminérgica es mayor que en el grupo de ratas falsamente transfectadas. Se ha observado en cultivos celulares de MSN, que la cantidad de espinas con PSD-95 en espinas dendríticas es mayor en presencia de neuronas dopaminérgicas, que cuando este tipo neuronal crece sin la presencia de éstas, esto fue observado después de 11 días *in vitro*³⁶.

Se sabe que el BDNF, a través de la activación de su receptor de alta afinidad TrkB y de desencadenar la cascada de señalización activando a PI3K, puede promover el tráfico de PSD-95 hacia la membrana plasmática⁸⁶. También se sabe que la activación de receptores glutamatérgicos de las neuronas dopaminérgicas, al ser activados por las terminaciones provenientes de la SNpr, aumentan la expresión genética de BDNF, así como su liberación. Cabe mencionar que la transmisión glutamatérgica de la SNpr es dependiente de la liberación de dopamina, ya que es mediada por la activación de receptores D1²⁸. Con lo anterior, podemos sugerir que en nuestro protocolo, a los tiempos utilizados, la terapia génica con BDNF no ha sido capaz de reestablecer la actividad de las neuronas dopaminérgicas remanentes, en lo que concierne a la liberación de dopamina y de BDNF en cantidades similares a las de una condición control.

También podemos decir que nuestro método de cuantificación de la proteína puede haber influido directamente en los resultados obtenidos. Esto puede ser debido a que la proteína PSD-95 es muy pequeña (95kDA) y su distribución en el cerebro es muy ubicua⁸⁷, otros grupos han empleado diferentes protocolos para su detección, por ejemplo el uso de técnicas de amplificación por microondas e inmunohistoquímica⁸⁷, Western blot, RT-PCR para cuantificar el mRNA de la proteína⁸⁸, lo cual permite una mejor cuantificación de la proteína en sitios específicos.

Perspectivas

En nuestro estudio no se encontraron los cambios anatómicos esperados tras la transfección con el vector no viral NTS-Poliplex-BDNF. Como ya se ha mencionado en la introducción, la transmisión dopaminérgica en el estriado es de tipo parasináptica. Esto podría sugerir que esta pequeña diferencia en el número de neuronas sea suficiente para recuperar los niveles de dopamina. Además se ha observado que, *per se*, el BDNF puede aumentar la transmisión dopaminérgica⁸⁹. Para corroborar que los resultados en la prueba conductual sean debido a esto, es necesario cuantificar los niveles de dopamina, o sus metabolitos como el ácido homovalínico o ácido dihidroxifenil-acético (DOPAC) en estriado y SNpc de ratas lesionadas y tratadas con el NTS-Poliplex-BDNF.

Es necesario también corroborar la expresión del trasgen en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc para poder conferir el efecto benéfico a éste y descartar que se deba a recuperación endógena.

Se propone también, para poder observar más a detalle el efecto del BDNF, se realice un análisis exhaustivo de ambos núcleos, estriado y SNpc. Sabemos que en este modelo de EP, la pérdida de las neuronas dopaminérgicas ocurre de la región rostral hacia lo caudal, y de la parte lateral hacia la parte medial del núcleo²¹, es necesario entonces, hacer un análisis regional, así como de secciones secuenciales, para poder abarcar la mayor parte del núcleo e identificar si existe alguna región específica donde comience a observarse el efecto.

De igual manera, es necesario caracterizar en estriado, a qué nivel, de lo rostral a lo caudal, ocurre la mayor pérdida de axones dopaminérgicos y dónde comienza a hacer efecto la terapia con NTS-Poliplex-BDNF.

Es importante conocer a qué tiempos comienza a expresarse el trasgen y a cuáles deja de hacerlo, para así saber el momento en que puede observarse el mayor efecto, y si este persiste a pesar de que no exista la expresión.

Como parte complementaria a este análisis, ese pretende colocalizar a PSD-95 con las MSN, específicamente en las espinas dendríticas, combinando la

inmunohistoquímica con otros marcadores como β -tubulina acoplada con faloidina, o con técnicas como el marcaje diolístico^{90,91}. Así podremos correlacionar de mejor manera el aumento o disminución de esta proteína con la pérdida o formación de contactos sinápticos.

Por último, es necesario complementar el estudio con una batería conductual más amplia que nos permita observar la recuperación motora en diferentes aspectos, como la actividad motora espontánea con la prueba de campo abierto, coordinación motora con la prueba de rotarod, entre otras.

Referencias

1. Wirdefeldt, K., Adami, H.-O., Cole, P., Trichopoulos, D. & Mandel, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur. J. Epidemiol.* **26 Suppl 1**, S1–58 (2011).
2. Belin, A. C. & Westerlund, M. Parkinson's disease: a genetic perspective. *FEBS J.* **275**, 1377–83 (2008).
3. General, C. de S. Enfermedad de Parkinson SSA. *Guía práctica clínica* 95 (2010).
4. Weintraub D, Comella CL, H. S. Parkinson's disease Part 1. Pathophysiology, symptoms, burden and assessment. *Am. J. Manag. Care* **14 (suppl.)**, 40–48 (2008).
5. Obeso, J. & Rodriguez-Oroz, M. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends ...* **1931**, (2000).
6. Smith, Y., Wichmann, T., Factor, S. a & DeLong, M. R. Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology* **37**, 213–46 (2012).
7. Caraceni, T., Geminiani, G. & Tamma, F. Current approaches in the treatment of Parkinson disease. *Recenti Prog. Med.* **80**, 686–91 (1989).
8. Giovanni, G. Di, Matteo, V. Di & Esposito, E. Birth, life and death of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *J. neural Transm. ...* (2008). at <<http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>>
9. Hudson, J. L. *et al.* Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res.* **626**, 167–74 (1993).
10. Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson ' s Disease : Mechanisms and Models. *Neuron* **39**, 889–909 (2003).
11. Langston, J., Ballard, P., Tetrud, J. & Irwin, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science (80-.)*. **219**, 979–980 (1983).
12. DeLong, M. R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* **13**, 281–5 (1990).
13. Bové, J. & Perier, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience* **211**, 51–76 (2012).
14. Ungerstedt, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 10401 (1968). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014299968901647>>
15. Torres, E. M. & Dunnett, S. B. 13 . 6-OHDA Lesion Models of Parkinson ' s Disease in the Rat 1 Introduction. 1–18 (2011).

16. Kirik, D., Rosenblad, C. & Björklund, a. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp. Neurol.* **152**, 259–77 (1998).
17. Jeon, B., Jackson-Lewis, V. & Burke, R. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration* **6** (1995). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055833085700165>>
18. Faull, R. L. M. & Laverty, R. Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Exp. Neurol.* **23**, 332–340 (1969).
19. Ljungberg, T. & Ungerstedt, U. Sensory inattention produced by 6-hydroxydopamine-induced degeneration of ascending dopamine neurons in the brain. *Exp. Neurol.* **53**, 1976 (1976).
20. Zigmond, M. & Stricker, E. Recovery of feeding and drinking by rats after intraventricular 6-hydroxydopamine or lateral hypothalamic lesions. *Science (80-.)*. **6** (1973). at <<http://www.sciencemag.org/content/182/4113/717.short>>
21. Hernandez-Baltazar, D., Mendoza-Garrido, M. E. & Martinez-Fong, D. Activation of GSK-3 β and caspase-3 occurs in Nigral dopamine neurons during the development of apoptosis activated by a striatal injection of 6-hydroxydopamine. *PLoS One* **8**, e70951 (2013).
22. Björklund, a *et al.* Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res.* **886**, 82–98 (2000).
23. Ungerstedt, U. & Arbuthnott, G. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* **24**, 485–493 (1970).
24. Fearnley, J. & Lees, A. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 2283–2301 (1991). at <<http://brain.oxfordjournals.org/content/114/5/2283.short>>
25. Fearnley, J. & Lees, A. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 2283–2301 (1991).
26. Ingham, C. a. 6-hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway. *Exp. Brain Res.* 17–27 (1993).
27. Gerfen, C. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.* 285–320 (1992). at <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.ne.15.030192.001441>>
28. Bustos, G. *et al.* Functional interactions between somatodendritic dopamine release, glutamate receptors and brain-derived neurotrophic factor expression in mesencephalic structures of the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **47**, 126–44 (2004).

29. Bagetta, V., Ghiglieri, V., Sgobio, C., Calabresi, P. & Picconi, B. Synaptic dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 493–7 (2010).
30. Freund, T. F., Powell, J. F. & Smith, a D. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* **13**, 1189–215 (1984).
31. Bolam, J. P., Francis, C. M. & Henderson, Z. CHOLINERGIC INPUT TO DOPAMINERGIC IN THE SUBSTANTIA NIGRA : A DOUBLE IMMUNOCYTOCHEMICAL NEURONS. **41**, 483–494 (1991).
32. Smith, a J. & McGinty, J. F. Acute amphetamine or methamphetamine alters opioid peptide mRNA expression in rat striatum. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **21**, 359–62 (1994).
33. Freund, T. F., Powell, J. F. & Smith, a D. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* **13**, 1189–215 (1984).
34. Moore, R. & Bloom, F. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annu. Rev. Neurosci.* (1978). at <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.ne.01.030178.001021>>
35. Deutch, A. Y., Colbran, R. J. & Winder, D. J. Striatal plasticity and medium spiny neuron dendritic remodeling in parkinsonism. *Parkinsonism Relat. Disord.* **13 Suppl 3**, S251–8 (2007).
36. Fasano, C. *et al.* Dopamine facilitates dendritic spine formation by cultured striatal medium spiny neurons through both D1 and D2 dopamine receptors. *Neuropharmacology* **67**, 432–43 (2013).
37. Segal, M., Greenberger, V. & Korkotian, E. Formation of dendritic spines in cultured striatal neurons depends on excitatory afferent activity. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 2573–2585 (2003).
38. Nash, J. E. *et al.* Subcellular redistribution of the synapse-associated proteins PSD-95 and SAP97 in animal models of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. **25**, 1–25 (2005).
39. Solis, O., Limón, D., Flores-Hernández, J. & Flores, G. Alterations in dendritic morphology of the prefrontal cortical and striatum neurons in the unilateral 6-OHDA-rat model of Parkinson's disease. *Synapse* **458**, 450–458 (2007).
40. Ingham, C. a, Hood, S. H., Taggart, P. & Arbuthnott, G. W. 6-hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway. 17–27 (1993).
41. Ingham, C. a, Hood, S. H., Taggart, P. & Arbuthnott, G. W. Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J. Neurosci.* **18**, 4732–43 (1998).

42. Fox, K. & Zahs, K. Critical period control in sensory cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* (1994). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/095943889490040X>>
43. Snider, W. D. & Lichtman, J. W. Are neurotrophins synaptotrophins? *Mol. Cell. Neurosci.* **7**, 433–42 (1996).
44. Mogi, M. *et al.* Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **270**, 45–48 (1999).
45. Peterson, A. & Nutt, J. Treatment of Parkinson's disease with trophic factors. *Neurotherapeutics* **5**, 270–280 (2008).
46. Chappelle, C. & Carlo, M. The actions of BDNF on dendritic spine density and morphology in organotypic slice cultures depend on the presence of serum in culture media. *J. Neurosci. ...* **169**, 182–190 (2008).
47. Gómez-Palacio-Schjetnan, A. & Escobar, M. L. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* **15**, 117–36 (2013).
48. Lin, L., Doherty, D., Lile, J., Bektesh, S. & Collins, F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science (80-.)*. **260**, 1130–1132 (1993).
49. Granholm, A. & Reylund, M. Glial cell line-derived neurotrophic factor is essential for postnatal survival of midbrain dopamine neurons. *J. ...* **20**, 3182–3190 (2000).
50. Björklund, A., Rosenblad, C., Winkler, C. & Kirik, D. Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **200**, 186–200 (1997).
51. Tomac, A., Lindqvist, E., Lin, L. & Ögren, S. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Lett. to Nat.* (1995). at <<http://www.nature.com/nature/journal/v373/n6512/abs/373335a0.html>>
52. Kirik, D. Preservation of a functional nigrostriatal dopamine pathway by GDNF in the intrastriatal 6-OHDA lesion model depends on the site of administration of the trophic. *Eur. J. ...* **12**, 3871–3882 (2000).
53. Gash, D., Zhang, Z., Ovadia, A. & Cass, W. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. (1996).
54. Lang, A. E. *et al.* Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann. Neurol.* **59**, 459–66 (2006).
55. Slevin, J. T. *et al.* Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J. Neurosurg.* **102**, 216–22 (2005).
56. Horger, B. & Nishimura, M. Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. *J. ...* **18**, 4929–4937 (1998).

57. Marks, W. J. *et al.* Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol.* **9**, 1164–72 (2010).
58. Herzog, C., Dass, B. & Holden, J. Striatal delivery of CERE-120, an AAV2 vector encoding human neurturin, enhances activity of the dopaminergic nigrostriatal system in aged monkeys. *Mov. ...* **22**, 1124–32 (2007).
59. Cao, C. *et al.* Impairment of TrkB-PSD-95 signaling in Angelman syndrome. *PLoS Biol.* **11**, e1001478 (2013).
60. Pillai, A. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in the pathogenesis and novel pharmacotherapy of schizophrenia. *Neurosignals* **16**, 183–93 (2008).
61. Autry, A. E. & Monteggia, L. M. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol. Rev.* **64**, 238–58 (2012).
62. Zhang, H.-T. *et al.* Immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult rhesus monkey brains. *J. Histochem. Cytochem.* **55**, 1–19 (2007).
63. Gall, C., Gold, S., Isackson, P. & Seroogy, K. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs are expressed in ventral midbrain regions containing dopaminergic neurons. *Mol. Cell. ...* **3**, 56–63 (1992).
64. J., Engele, C.-B. M. The Neurotrophic Effects of Fibroblast Growth Factors on Dopaminergic Neurons in vitro Are Mediated by Mesencephalic Glia. *J. Neurosci.* **17**, (1991).
65. Chiocco, M. J., Harvey, B. K., Wang, Y. & Hoffer, B. J. Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **13 Suppl 3**, S321–8 (2007).
66. Shen, R. Y., Altar, C. a & Chiodo, L. a. Brain-derived neurotrophic factor increases the electrical activity of pars compacta dopamine neurons in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8920–4 (1994).
67. Hyman, C., Hofer, M. & Barde, Y. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* (1991). at <<http://www.nature.com/nature/journal/v350/n6315/abs/350230a0.html>>
68. Yoshimoto, Y. *et al.* Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicit behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* **691**, 25–36 (1995).
69. Somoza, R., Juri, C., Baes, M., Wyneken, U. & Rubio, F. J. Intranigral transplantation of epigenetically induced BDNF-secreting human mesenchymal stem cells: implications for cell-based therapies in Parkinson's disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **16**, 1530–40 (2010).
70. Jung, U., Division, M. D., Bruxelles, U. L. De, Erasme, H. & Sciences, P. Intraestriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce Brain-Derived Neurotrophic Factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **15**, (1995).

71. Gonzalez-Barrios, J. a *et al.* Neurotensin polyplex as an efficient carrier for delivering the human GDNF gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats. *Mol. Ther.* **14**, 857–65 (2006).
72. Martinez-Fong, D. & Bannon, M. NTS-Polyplex: a potential nanocarrier for neurotrophic therapy of Parkinson's disease. ... , *Biol. Med.* **8**, 1052–1069 (2012).
73. Arango-Rodriguez, M. L. *et al.* Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**, 1009–20 (2006).
74. Hernandez-chan, N., Zamudio, S., Escobedo L., De La Cruz, F., Gongora-Alfaro, J., Bannon M., M.-F. D. BDNF-Flag Gene Transfer by NT-Polyplex to Nigral Dopaminergic Neurons Causes Morphological and Functional Recovery from Hemiparkinsonism in the Rat. *Mol. Ther.* **16**, S363–S364 (2008).
75. Y., F.-M. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA EN EL SISTEMA DE NANOPARTÍCULAS NTS-POLIPLEX-BDNF PARA LA ENFERMEDAD DE PARKINSON. (2012).
76. Gonzalez-Barrios, J. a *et al.* Neurotensin polyplex as an efficient carrier for delivering the human GDNF gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats. *Mol. Ther.* **14**, 857–65 (2006).
77. Hernandez-Chan, N. G. Tesis doctoral. Fase final. 2012 (2012).
78. Fallon, J., Riley, J. & Moore, R. Substantia nigra dopamine neurons: separate populations project to neostriatum and allocortex. *Neurosci. Lett.* (1978). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030439407890160X>>
79. Björklund, A. & Stenevi, U. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. II. Survival and growth of nigral cell suspensions implanted in different brain sites. *Acta Physiol. ...* 6586058 (1982). at <<http://europepmc.org/abstract/MED/6586058>>
80. Schmidt, R. & Björklund, A. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. III. Activity of intrastriatal nigral suspension implants as assessed by measurements of dopamine synthesis and. *Acta Physiol. ...* 6326471 (1982). at <<http://europepmc.org/abstract/MED/6326471>>
81. Rozas, G., Guerra, M. . & Labandeira-García, J. . An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res. Protoc.* **2**, 75–84 (1997).
82. Spiga, S. *et al.* Simultaneous Golgi-Cox and immunofluorescence using confocal microscopy. *Brain Struct. Funct.* **216**, 171–82 (2011).
83. Juraska, J. The substantia nigra of the rat: a Golgi study. *J. Comp. ...* (1977). at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.901720403/full>>
84. Buhl, E. H. & Lübke, J. Intracellular lucifer yellow injection in fixed brain slices combined with retrograde tracing, light and electron microscopy. *Neuroscience* **28**, 3–16 (1989).

85. Yao, W., Spealman, R. & Zhang, J. Dopaminergic signaling in dendritic spines. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 2055–2069 (2008).
86. Yoshii, A. & Constantine-Paton, M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev. Neurobiol.* **70**, 304–22 (2010).
87. Leuba, G. *et al.* Postsynaptic density protein PSD-95 expression in Alzheimer's disease and okadaic acid induced neuritic retraction. *Neurobiol. Dis.* **30**, 408–19 (2008).
88. Yao, W.-D. *et al.* Identification of PSD-95 as a regulator of dopamine-mediated synaptic and behavioral plasticity. *Neuron* **41**, 625–38 (2004).
89. Altar, C. a *et al.* Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and nigrostriatal dopamine turnover in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 11347–51 (1992).
90. Seabold, G. K., Daunais, J. B., Rau, A., Grant, K. a & Alvarez, V. a. DiOLISTIC labeling of neurons from rodent and non-human primate brain slices. *J. Vis. Exp.* **4**, 36930 (2010).
91. Neely, M. D., Schmidt, D. E. & Deutch, a Y. Cortical regulation of dopamine depletion-induced dendritic spine loss in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* **149**, 457–64 (2007).