



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y  
NEUROCIENCIAS**

**La sobreexpresión de la Neurturina por transfección  
mediante el NTS-poliplex en las neuronas  
dopaminérgicas induce cambios pre-sinápticos y post-  
sinápticos en ratas crónicamente lesionadas con 6-  
OHDA**

**T E S I S**

Que presenta

**M. en C. David Reyes Corona**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE**

**NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Director de la Tesis:

**Dr. Daniel Martínez-Fong**

Ciudad de México

Julio, 2018

## ***DEDICATORIA***

Este trabajo es una parte importante de mi vida, parte de mi crecimiento profesional, años de duro esfuerzo, sin embargo considero que no pude realizarlo sin el apoyo de las personas que siempre estuvieron ahí conmigo en las buenas y en las malas.

A mi madre, la *Sra. Cristina Corona Sandoval*, por brindarme la existencia y brindarme muchas de las enseñanzas que nunca olvidaré y que me han sido muy útiles. Gracias Mamá.

A mi esposa, *Psic. Yang-Tze del Rosario Pérez Rico*, por aguantarme tanto tiempo, en los buenos y en los malos momentos, en los momentos de locura; y aun seguir conmigo en este duro camino de la vida, la enfrentaremos juntos de frente y sin bajar la mirada. Muchas gracias Yan.

A mi hijo, *David Gabriel Reyes Pérez*, hijo mío te dedico este trabajo, ha sido un enorme placer conocerte, saber que posiblemente en un futuro leas esto y puedas seguir mis pasos (aunque tú mamá diga que no, puedo verlo y sentirlo en ti), me motiva a seguir esforzándome mucho más para ti, estaré contigo siempre, sea donde sea. Muchas gracias por todas esas madrugadas de desvelo que pasamos juntos. Ha valido la pena hijo. Te amo.

A todos los amigos por su apoyo, realmente estoy en deuda con ustedes, *José Ayala, Mario Moreno, Arturo Balandra, Alan Baranda*, muchas gracias. A veces cuando más creía que sería imposible siempre estuvieron ahí con las palabras correctas y alentadoras, algunas presionando y motivando, pero siempre ahí. Muchas gracias a todos ustedes.

A todos aquellos que tal vez en estos momentos se me escapan de la memoria pero que estuvieron presentes apoyándome. Muchas gracias.

## ***AGRADECIMIENTOS***

Agradezco a mi tutor, el *Dr. Daniel Martínez Fong* por brindarme su apoyo y oportunidad de seguir creciendo en su laboratorio. Por confiar en mí y en guiarme en este proceso de crecimiento profesional.

Agradezco a los auxiliares del laboratorio *Biol. José Ayala* y *Biol. Lourdes Escobedo* por su gran apoyo y aportación para con este trabajo.

Agradezco al *CONACYT* por brindarme la beca para la obtención del grado de Doctor en Ciencias.

A todos los que participaron de manera directa o indirecta en este trabajo con sus aportaciones, ideas, sugerencias y amistad.

Especial agradecimiento a todos los animales de experimentación, muchas gracias.

# 1 Tabla de Contenido

2	Índice de Figuras .....	4
3	Índice de Tablas .....	6
4	Lista de Abreviaturas .....	7
5	Resumen .....	9
1.	Introducción.....	13
1.1.	Familias de factores neurotróficos.....	14
1.2.	Familia de ligandos del GDNF .....	15
1.3.	La Neurturina (NRTN).....	17
1.4.	Resultados de estudios con la NRTN <i>in vivo</i> .....	21
1.5.	Utilidad del modelo de lesión con 6-OHDA en estudios de regeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal .....	21
1.6.	El nanovector NTS-poliplex: herramienta para el envío dirigido de genes a neuronas dopaminérgicas lesionadas .....	24
2.	Planteamiento del problema.....	26
3.	Hipótesis .....	28
4.	Objetivos.....	29
4.1.	Objetivo General. ....	29
4.2.	Objetivos Específicos .....	29
5.	Materiales y Métodos .....	30
5.1.	Plásmidos.....	30
5.1.1	Plásmido pTracer-mNRTN-His.....	30
5.1.2	Plásmido pGreenLantern-1 .....	33
5.1.3	Transformación, Amplificación y Purificación del pTracerEF-NRTN-V5-His .....	34
5.2	Ensamble de las nanopartículas NTS-poliplex con el plásmido pTracer-mNRTN-His o pGreenLantern-1 .....	37
5.2.1	Síntesis del vector-NTS.....	37
5.2.2	Ensamblaje de las nanopartículas NTS-poliplex .....	42
5.3	Análisis de las nanopartículas de NTS-poliplex por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.....	43
5.4	Transfección del plásmido pTracer-mNRTN-His <i>in vitro</i> .....	44
5.5	Animales.....	44

5.6	Modelo de Lesión con 6-OHDA.....	45
5.7	Inyección de las nanopartículas de NTS-polyplex en la <i>substantia nigra</i> .....	47
5.8	Conducta rotacional inducida agonistas dopaminérgicos .....	48
5.9	Prueba de asimetría del uso de extremidades ("cilindro") .....	48
5.10	Prueba de colocación de la extremidad anterior evocada por vibrisas.....	49
5.11	Reacción en Cadena de la Polimerasa por Transcriptasa Reversa (RT-PCR) .....	49
5.12	Cuantificación de NRTN-His por Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) ...	51
5.13	Inmunotinciones .....	52
5.13.1	Ensayos de Inmunofluorescencia.....	53
5.13.2	Ensayo de inmunohistoquímica.....	54
5.14	Conteo neuronal y análisis densitométrico .....	55
5.15	Cuantificación del contenido de dopamina .....	55
5.16	Evaluación de las espinas dendríticas en el núcleo estriado .....	57
5.17	Análisis estadístico .....	58
6.	Resultados.....	58
6.1.	Construcción correcta del plásmido pTracer-mNRTN-His.....	58
6.2.	La interacción electrostática de los componentes del NTS-poliplex a la relación molar óptima forma nanopartículas .....	62
6.3.	Actividad transcripcional del pTracer-mNRTN-His in vitro.....	64
6.4.	Determinación del sitio de lesión en el estriado y de la transfección en la <i>substantia nigra</i> .....	67
6.5.	Expresión de NRTN-His en las neuronas dopaminérgicas de la <i>substantia nigra</i> .....	68
6.6.	Restauración del fenotipo dopaminérgico en el sistema nigroestriatal .....	72
6.7.	Restauración del fenotipo no dopaminérgico en el sistema nigroestriatal.....	77
6.8.	Restauración del citoesqueleto de las neuronas dopaminérgicas.....	83
6.9.	Recuperación del contenido de dopamina en el sistema nigroestriatal.....	85
6.10.	Recuperación de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del estriado ...	86
6.11.	Disminución de las asimetrías motoras activadas por drogas y espontáneas .....	89
7.	Discusión .....	93
8.	Conclusión .....	99
9.	Perspectivas.....	99
10.	Referencias .....	101

## 2 Índice de Figuras

	<b>Página</b>
Figura 1. Receptores de los ligandos de la familia del GDNF.	17
Figura 2. Estructura tridimensional del homodímero de la NRTN humana y su interacción con su receptor GFR $\alpha$ 2.	19
Figura 3. Mecanismo de la transferencia de genes a través de la internalización del receptor a neurotensina tipo 1 (NTSR1).	25
Figura 4. Capacidad del nanovector NTS-poliplex para transfectar células que expresan NTSR1.	25
Figura 5. Mapa de Restricción simplificado del plásmido pTracer EF-V5-His.	33
Figura 6. Mapa de restricción simplificado del plásmido pGreenLantern-1.	34
Figura 7. Mapas de restricción para verificar la orientación correcta de la secuencia codificante de la NRTN en el plásmido pTracer-mNRTN-V5-His.	35
Figura 8. Plásmido pTracer-mNRTN-His.	36
Figura 9. Sitio de la inyección de 6-OHDA para la generación del modelo de lesión crónica.	46
Figura 10. Sitio de la inyección de las nanopartículas del NTS-poliplex en la substantia nigra.	47
Figura 11. Ensayo de restricción para verificar la orientación correcta de la mNRTN-His en el pTracer-mNRTN-His.	59
Figura 12. Resultados de la secuenciación del pTracer-mNRTN-His por el protocolo BigDye®.	62
Figura 13. Geles de retardo y retención.	63
Figura 14. Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM).	64
Figura 15. Co-expresión de NRTN-His y GFP en células N1E-115 transfectadas con el plásmido pTracer-mNRTN-V5-His.	66
Figura 16. Sitios de la microinyección de sustancias por cirugía estereotáxica.	68
Figura 17. Expresión del mRNA para la NRTN-His en la substantia nigra con lesión crónica y transfectada con el plásmido pTracer-mNRTN-His.	69

Figura 18. Expresión transgénica en las neuronas dopaminérgicas de la SNc de ratas con lesión crónica después de la transfección del plásmido pTracer-mNRTN-His.	70
Figura 19. Conteo del número de neuronas que expresan NRTN-His y GFP posterior a la transfección intranigral del plásmido pTracer-mNRTN-His.	71
Figura 20. La transfección del gen NRTN-His incrementó el número de células TH+ y sus ramificaciones en la substantia nigra con lesión crónica por 6-OHDA.	74
Figura 21. La transfección con las nanopartículas terapéuticas de NRTN incrementa las fibras TH+ en el núcleo estriado de ratas con lesión crónica con 6-OHDA.	76
Figura 22. La transfección con el transgén de NRTN-His incrementa los niveles del NTSR1 en la substantia nigra de ratas con lesión crónica.	80
Figura 23. La transfección con el transgén de NRTN-His incrementa los niveles del NTSR1 en el núcleo estriado de ratas con lesión crónica.	82
Figura 24. Organización de las terminales nigroestriatales llegando al cuerpo estriado después de la transfección del plásmido pTracer-NRTN-His.	83
Figura 25. Restauración del citoesqueleto neuronal en la substantia nigra posterior a la transfección del plásmido pTracer-NRTN-His.	84
Figura 26. La transfección con el transgén de la NRTN recupera los niveles de dopamina en la nigroestriatal con lesión crónica por 6-OHDA.	86
Figura 27. La transfección del transgén NRTN-His incrementa en la densidad de espinas y el árbol dendrítico en neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado.	88
Figura 28. Efecto de la transfección del transgén NRTN-His sobre la conducta de giro en ratas con lesión crónica por 6-OHDA.	91
Figura 29. Prueba de colocación de extremidad anterior evocada por vibrisas y prueba de asimetría del uso de extremidades.	92

### 3 Índice de Tablas

	<b>Página</b>
Tabla 1. Concentraciones óptimas de los componentes que conforman las nanopartículas del NTS-poliplex.	62
Tabla 2. Coordenadas estereotáxicas para la administración de 6-OHDA en el núcleo estriado y de las nanopartículas de NTS-poliplex en la substantia nigra.	67
Tabla 3. Niveles NRTN-His medidos con ELISA en ratas lesionadas crónicamente y transfectadas con el pTracer-mNRTN-His.	72
Tabla 4. Densidad proporcional de los diferentes tipos de espinas en las NEM en los cuatro grupos experimentales	89

## 4 Lista de Abreviaturas

µg: microgramos

µL: microlitro

µm: micrómetros

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

AP: Anteroposterior

ARTN: Artemina

BDNF: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro

CMV: Citomegalovirus

DA: Dopamina

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Medio de Cultivo Modificado Eagle Dulbecco

DNA: Ácido Desoxiribonucleico.

DV: Dorsoventral

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EF $\alpha$ 1: Factor de Elongación alfa 1

ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.

EP: Enfermedad de Parkinson

GDNF: Factor Neurotrófico Derivado de la Glía

GFL's: Familia de ligandos del GDNF

GFP: Proteína Verde Fluorescente

GFR $\alpha$ 's: Receptor alfa para los GFL's

GPI: Glicosil-fosfatil-inositol

HPLC: Cromatografía Líquida de Alto Desempeño

i.m.: intramuscular

i.p.: intraperitoneal

kg: kilogramo

Lys: Lisina

mg: miligramo

min: minuto

ML: Mediolateral

mL: mililitro



mm: milimetro  
nM: Nano-molar.  
NRTN/ mNRTN/ hNRTN: Neurturina/ Neurturina de ratón/ Neurturina humana  
ns = No significativo  
NT: No transfectado  
NT-PF-PLL: Poliplex Fusogénico de Neurotensina  
NTS: Neurotensina  
NTSR1: Receptor de alta afinidad para Neurotensina  
pb: pares de bases  
PCR/RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa/Retro-transcripción por reacción en cadena de la polimerasa.  
PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa  
pDNA: Ácido Desoxiribonucleico plásmidico  
PF: Péptido Fusogénico  
pg: picogramos  
PC: Péptido Cariofílico  
PSNP: Persefina  
pTracer®: plásmido comercial con capacidad de expresión del transgén y de la GFP  
RNA: Ácido Ribonucleico.  
SFB: Suero Fetal Bovino  
SL: Semana de lesión  
SNC: Sistema Nervioso Central  
SNpc: Substantia negra pars compacta.  
SPDP: N-succinimidil-6-[3-(2-piridildithio)propionamido]hexanoato  
ST: Semana de transfección/Núcleo Estriado  
TH+: Tirosina hidroxilasa positiva (o inmunopositiva a tirosina hidroxilasa)

## 5 Resumen

Aún se desconoce si la Neurturina (NRTN) puede restaurar el sistema dopaminérgico nigroestriatal lesionado. Sólo se sabe que la NRTN incrementa el fenotipo dopaminérgico y disminuye las alteraciones motoras en modelos de la Enfermedad de Parkinson. Las neuronas dopaminérgicas nigrales supervivientes (10 a 20%) a la inyección estriatal de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) representan un buen modelo de lesión crónica para explorar la acción neurotrófica de la NRTN. Esta tesis pretende demostrar que la sobreexpresión de la NRTN en las neuronas dopaminérgicas supervivientes a la lesión crónica de 6-OHDA induce cambios presinápticos y postsinápticos. A la semana 12 post-lesión, transfectamos los plásmidos pTracer-mNRTN-His (codifica para NRTN-His murina) o pGreenLantern-1 (codifica para la proteína verde fluorescente; GFP) mediante las nanopartículas NTS-poliplex. Demostramos que la expresión transgénica en las neuronas dopaminérgicas permanece hasta el final del estudio (12 semanas). Sólo los animales que expresaron la NRTN-His incrementaron el número de células tirosina hidroxilasa positivas (TH+;  $28 \pm 2\%$ ), la densidad neurítica ( $32 \pm 2\%$ ) y la tubulina  $\beta$ -III (marcador del citoesqueleto neuronal) en la substantia nigra, así como las fibras TH+ estriatales ( $52 \pm 3\%$ ), comparados con la condición sana. También se incrementó significativamente la densidad del receptor a neurotensina tipo 1 y el contenido de dopamina ( $70 \pm 4\%$  en el estriado y totalmente en la substantia nigra). En el cuerpo estriado, se incrementó significativamente la densidad de las espinas dendríticas, específicamente las de tipo hongo y anchas, con respecto a los controles con lesión sin transfección o transfectados con el plásmido irrelevante, sin alcanzar la condición sana. Se redujeron las asimetrías motoras inducidas por fármacos ( $73 \pm 2\%$  con metanfetamina y  $89 \pm 1\%$  con apomorfina) y las asimetrías espontáneas. Nuestros resultados muestran que la NRTN puede restaurar estructuras presinápticas y postsinápticas

del sistema dopaminérgico nigroestriatal lesionado. Sin embargo, estas mejoras no alcanzaron la condición sana, sugiriendo que la NRTN sea menos potente que el GDNF o el BDNF tal vez por su limitada difusión extracelular.

## Abstract

Whether neurturin (NRTN) can restore or not the injured nigrostriatal dopamine system is still unknown. Only NRTN is known to increase the dopaminergic phenotype and decrease motor alterations in models of Parkinson's disease. The surviving nigral dopaminergic neurons (10 to 20%) to striatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) represent a good model of chronic injury to explore the neurotrophic action of NRTN. This thesis aims at demonstrating that the overexpression of NRTN in the dopaminergic neurons surviving a chronic 6-OHDA injury induces presynaptic and postsynaptic changes. At week 12 post-injury, we transfected the plasmids pTracer-mNRTN-His (encodes mouse NRTN-His) or pGreenLantern-1 (encodes the green fluorescent protein; GFP) by NTS-polyplex nanoparticles. We demonstrated that the transgenic expression in the dopaminergic neurons remains until the end of the study (12 weeks). Only the animals that expressed NRTN-His increased the number of positive tyrosine hydroxylase cells (TH +,  $28 \pm 2\%$ ), the neuritic density ( $32 \pm 2\%$ ) and the tubulin  $\beta$ -III (marker of the neuronal cytoskeleton) in the substantia nigra, as well as striatal TH + fibers ( $52 \pm 3\%$ ), as compared with the healthy condition. The density of receptor to neurotensin type 1 and the content of dopamine ( $70 \pm 4\%$  in the striatum and entirely in the substantia nigra) were also significantly increased. In the nucleus striatum, the density of dendritic spines, specifically those of the fungus type, increased significantly concerning the controls with lesion without transfection or with transfection of the irrelevant plasmid, without reaching the healthy condition. The motor asymmetries induced by drugs ( $73 \pm 2\%$  with methamphetamine and  $89 \pm 1\%$  with apomorphine) and the natural ones were also reduced. Our results show that NRTN can restore presynaptic and postsynaptic structures of the nigrostriatal dopaminergic system with a chronic

lesion. However, these improvements did not reach the healthy condition, suggesting that the NRTN is less potent than GDNF or BDNF, perhaps due to its limited extracellular diffusion.

## 1. Introducción

Los factores neurotróficos son un grupo importante de proteínas secretadas que regulan la vida y la muerte de las neuronas durante el neurodesarrollo, mientras que en la edad adulta mantienen la supervivencia neuronal [1]. Además de estas funciones neurotróficas, ahora se sabe que también participan en la neurotransmisión pues se coliberan con el neurotransmisor para modificar la actividad eléctrica en las neuronas postsinápticas [2,3]. La acción de los factores neurotróficos se ejerce en conjuntos específicos de subpoblaciones neuronales a través de receptores afines en su superficie que señalizan por diferentes vías intracelulares para activar programas de transcripción apropiados [1]. Estas funciones están bien caracterizadas durante el desarrollo del sistema nervioso, sin embargo en el sistema nervioso adulto aún no son claras debido a la dificultad de poder sobre-expresar transgenes neurotróficos o eliminar la expresión del gen natural en subpoblaciones de neuronas maduras.

Está bien establecido que los factores neurotróficos regulan la neurogénesis, la diferenciación y la maduración de los precursores neuronales posmitóticos y promueven su migración a núcleos específicos durante el desarrollo del sistema nervioso central y periférico [4]. Sin embargo, estos fenómenos sólo se han identificado recientemente en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular de los ventrículos laterales (llamada zona ventricular durante el desarrollo) del cerebro adulto de mamíferos [5,6]. Fuera de estas zonas, la neurogénesis y los procesos de maduración neuronal subsecuentes hasta el alojamiento de las nuevas neuronas en un núcleo lesionado del cerebro adulto con fines de reparación aún son temas controversiales [6]. Más polémico es el hecho de cómo se realiza la reconexión sináptica precisa de las terminales de esas nuevas neuronas con sus blancos de inervación en el cerebro adulto, cuando ya desaparecieron las instrucciones para el direccionamiento axonal y

conectividad sináptica que suceden durante el desarrollo. El advenimiento reciente de sistemas poderosos y específicos de transferencia de genes para factores neurotróficos ha permitido explorar esas posibilidades en diferentes modelos de lesión en el cerebro adulto de mamíferos.

### **1.1. Familias de factores neurotróficos**

Hasta hoy se han identificado tres familias de factores neurotróficos:

1) Las neurotrofinas que incluye el factor neurotrófico neuronal (NGF), el factor neurotrófico neuronal derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) y NT-4 [1,7]. Los miembros de estas familias señalizan a través de receptores transmembrana tirosina cinasas [8].

2) Ligandos de la familia del factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF) que incluye GDNF, neurturina (NRTN), artemina (ARTN) y persefina (PSPN) [8,9]. Los miembros de estas familias señalizan a través del co-receptor RET que interactúa con sus receptores afines [8].

3) Citocinas neuropoyéticas (también denominadas familia de interleucina 6 (IL-6)) [10]. Esta familia engloba también otros factores tróficos y de crecimiento; por ejemplo, miembros del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento insulínico (IGF) y familias del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) [11,12]. También en esta familia se agrupan provisionalmente proteínas con actividades neurotróficas recién descubiertas que no guardan relación con la estructura de las otras familias como es el caso de Meteorin, proteína conservada evolutivamente [13,14].

4) La nueva familia de proteínas conservadas evolutivamente con actividad neurotrófica que por el momento incluye al factor neurotrófico conservado de dopamina (CDNF) y al factor

neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos (MANF) [15-21]. Aún se desconocen sus receptores afines.

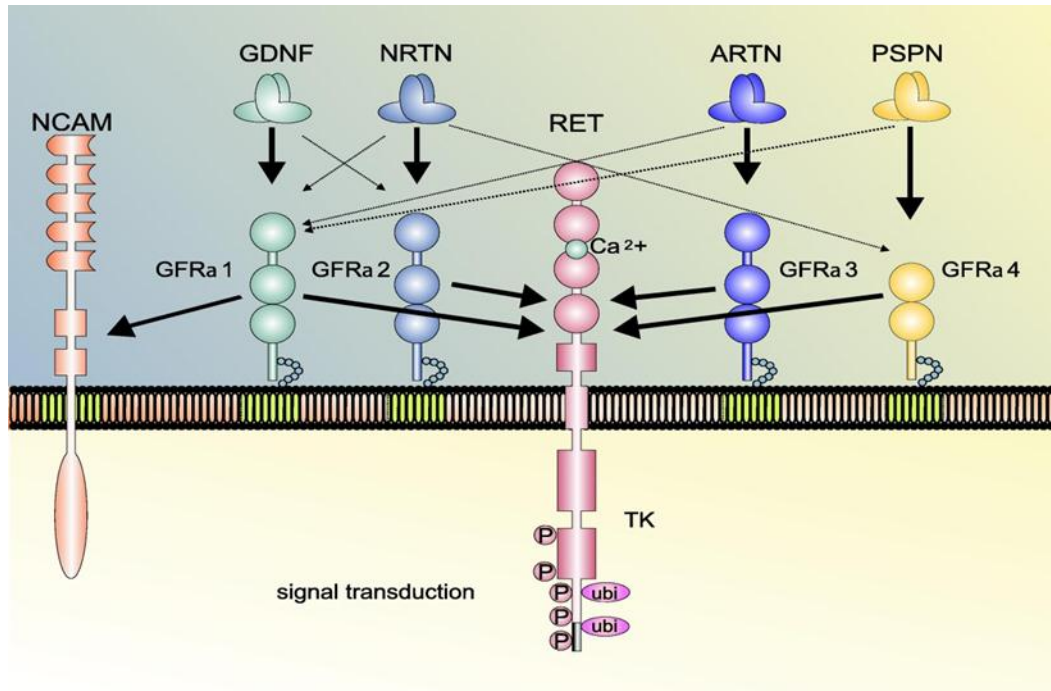
## 1.2. Familia de ligandos del GDNF

La familia de ligandos de GDNF se encuentra relacionada a la superfamilia del TGF- $\beta$  y juega un papel crucial en un gran número de procesos biológicos incluyendo la sobrevivencia celular, el crecimiento neurítico, la diferenciación y el crecimiento celular de ciertas poblaciones neuronales, pueden regular también el proceso de conexiones sinápticas [22]. Los receptores de la familia de ligandos de GDNF se conocen como GFR $\alpha$ , comparten características estructurales y funcionales comunes, y cada miembro de la familia se une con alta afinidad a un receptor propio, GFR $\alpha$ 1 para GDNF, GFR $\alpha$ 2 para NRTN y GFR $\alpha$ 3 para ARTN o el GFR $\alpha$ 4 para PSPN (Figura 1). Esos receptores están anclados a la membrana celular por un residuo de glicosilfosfatidilinositol (GPI), carecen de un dominio intracelular y son incapaces de señalizar por ellos mismos, por lo que utilizan al proto-oncogén RET para activar múltiples vías de señalización [9,23]. Si bien, cada receptor GFR $\alpha$  une con alta afinidad a un ligando específico también puede ser activados con menor afinidad o por promiscuidad de los receptores por otros miembros de la familia de ligandos GDNF (Figura 1) [24]. Esta promiscuidad entre los receptores GFR $\alpha$ s y los ligandos de GDNF es importante tenerla en cuenta para entender los efectos de NRTN sobre las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* ya que carecen de GFR $\alpha$ 2 pero expresan el GFR $\alpha$ 1, aunque hay que considerar que existen vías no canónicas de señalización de los receptores GFR $\alpha$ s independientes de RET [25-27].

El GDNF fue el primer factor neurotrófico identificado con acción en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra compacta* [28] después de que se demostró su potente acción neurotrófica en las neuronas espinales motoras, las neuronas noradrenérgicas del locus



coeruleus y otras poblaciones celulares del sistema nervioso central [9,29-31]. En cultivo primario de neuronas de la *substantia nigra*, el GDNF es mucho más potente que las neurotrofinas como BDNF para promover la supervivencia celular y estimular el crecimiento neurítico como sucede en cultivos celulares de otras estirpes neuronales [32]. A pesar de esas diferencias, la evidencia actual apunta a que se requiere la presencia simultánea de al menos GDNF y BDNF para promover la supervivencia de neuronas dopaminérgicas en cultivo [33]. La otra sugerencia importante de ese trabajo indica que se requiere un factor neurotrófico de una fuente celular externa a las neuronas dopaminérgicas tal como el GDNF y otro de la fuente celular interna o sea de las mismas neuronas dopaminérgica como el BDNF, para promover una efectiva acción neurotrófica al menos en cultivo primario de esas neuronas [33]. Esta sugerencia es importante porque hasta ahora todos los estudios en el cerebro adulto se han realizado con factores neurotróficos individuales [8,9,22,24,34,35]. El otro tema interesante es que los estudios con factores neurotróficos en el cerebro adulto no intentan resolver si en realidad esas proteínas ejercen verdaderamente acciones tróficas como neurogénesis, neuritogénesis y plasticidad sináptica, ni mucho menos identificar sus mecanismos moleculares. El enfoque actual para el caso de los miembros de la familia de los ligandos de GDNF, es la emulación del efecto trófico del GDNF sobre el fenotipo dopaminérgico y las alteraciones motoras en diferentes modelos de lesión del sistema dopaminérgico nigroestriatal. En esta tesis doctoral se aborda, por primera vez, la pregunta de si la NRTN es capaz de regenerar el sistema dopaminérgico nigroestriatal adulto cuando hay un remanente del 10 a 15% de neuronas supervivientes a la lesión crónica con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) que permanece constante toda la vida de la rata.



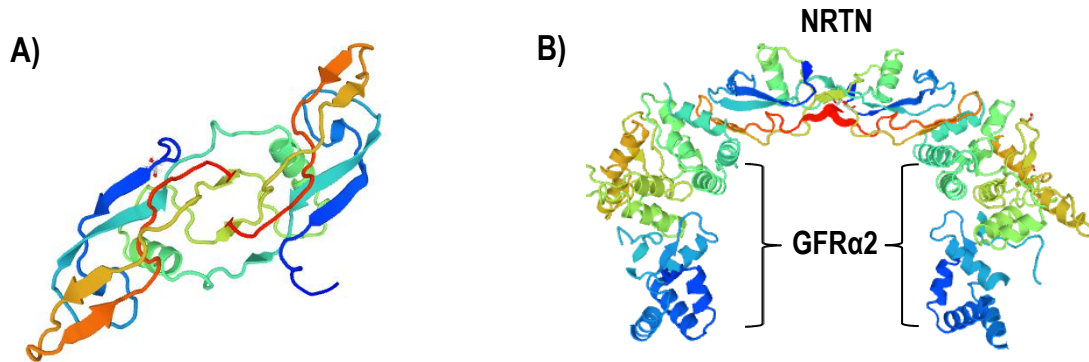
**Figura 1. Receptores de los ligandos de la familia del GDNF.** La NRTN se une a su receptor de alta afinidad GFRα2 aunque también se puede unir con menor afinidad con GFRα1 y GFRα4. La unión de los homodímeros de los ligandos de GDNF se unen a la proteína transmembranal tirosina-cinasa RET y la homodimeriza, lo que ocasiona la autofosforilación de residuos de tirosina y la activación de diferentes vías de señalización intracelular. Imagen tomada de Kramer and Liss, FEBS Letters. 589 (2015) 3760-3772.

### 1.3. La Neurturina (NRTN)

La NRTN es el segundo miembro de la familia de GDNF que se expresa como una pre-proteína de 195 aminoácidos en las especies *Mus musculus* (NCBI Reference Sequence: NP\_032764.1) y *Rattus norvegicus* (GenBank: AAO27768.1); y de 197 aminoácidos en la especie *Homo sapiens* (NCBI Reference Sequence: NP\_004549.1). La proteína madura de la NRTN consiste en un homodímero unido por enlaces disulfuro (Figura 2), de 102 aminoácidos (humana) y con un peso aproximado de 25 KDa [36,37]. Cada monómero tendría entonces una masa

aproximada de 12.5 KDa [36]. La NRTN humana comparte una alta homología (91%) con la NRTN de ratón y la homología entre la NRTN y el GDNF es del 42% [36]. La NRTN fue originalmente aislada de células ováricas de Hámster Chino (CHO) e identificada como factor neurotrófico por su capacidad para aumentar la sobrevivencia de neuronas simpáticas en cultivo [36]. Por esta característica, la NRTN al igual que el GDNF fueron propuestos como proteínas con utilidad potencial para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas desde los estudios pioneros en cultivos celulares [36].

La NRTN se une con alta afinidad a GFR $\alpha$ 2, pero también puede unirse a GFR $\alpha$ 1 para activar a RET [38,39] y promover la supervivencia, la diferenciación y el mantenimiento en muchas poblaciones neuronales, incluyendo las neuronas dopaminérgicas [40]. Sin embargo, aún se desconocen las vías de señalización intracelular que activa la NRTN en las neuronas dopaminérgicas *in vitro* e *in vivo*. Solamente se sabe que en cultivos primarios del ganglio cervical superior de la rata, la NRTN, a través de RET, activa las rutas de señalización MAPK y PI3K [38]. Otros dos estudios *in vitro* con células BE (2)-C de neuroblastoma humano y células PC12 de feocromocitoma de médula suprarrenal de rata [41] han mostraron que la señalización de AMP cíclico, PKA y ERK1/2 están implicada en el crecimiento de neuritas inducidas por NRTN a través de los receptores GFR $\alpha$ 2a y GFR $\alpha$ 2c [41].



**Figura 2. Estructura tridimensional del homodímero de la NRTN humana y su interacción con su receptor GFRα2. A)** La estructura del homodímero de la NRTN incluye dos monómeros idénticos conformados por dos regiones β-plegadas denominadas “dedos” y una estructura α-helice denominada “talón”. **B)** Estructura tridimensional de la NRTN unida a su receptor de alta afinidad GFRα2. Los modelos fueron obtenidos de Swiss-Model, Método de Difracción Rayos-X 1.60 Å, Swiss Institute of Bioinformatics, 2018.

El papel neurotrófico de la NRTN en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* durante la ontogenia y la edad adulta ha sido menos explorado que el del GDNF. Los estudios realizados con la NRTN en estos campos han sido siempre en comparación con el GDNF. Si aceptamos que sus efectos neurotróficos pudieran ser similares sobre las neuronas dopaminérgicas, entonces la NRTN parece actuar después del GDNF como lo sugiere el patrón de expresión diferencial de ambos factores neurotróficos durante el desarrollo postnatal del mesencéfalo de la rata [26,27,40]. Sin embargo, también se han mostrado diferencias en la expresión de GDNF y NRTN en el cuerpo estriado y en la *substantia nigra*. Mientras que el GDNF se expresa en el estriado en las neuronas GABAérgicas parvalbumina-positivas, y no por las neuronas espinosas medianas [42], tampoco se expresa en el mesencéfalo [43]. Por el

contrario, la NRTN se expresa en ambos núcleos, en la *substantia nigra* y en el cuerpo estriado, por células aún no identificadas [27,44]. En la etapa adulta, los niveles de mRNA de la NRTN son el doble de los niveles en el estriado, pero los niveles de proteína NTRN en ambos núcleos permanecen tan bajo como otros factores neurotróficos, sugiriendo que sólo contribuye al mantenimiento del sistema nigroestriatal [44]. El efecto de la NRTN sobre la sobrevivencia, la neuritogénesis y la regeneración de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro adulto aún es controversial. Experimentos en cultivos celulares del mesencéfalo ventral o de neuronas dopaminérgicas embrionarias [27] han mostrado que la NRTN ejerce un potente efecto de supervivencia comparable con el GDNF [40] y que la NRTN promueve la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en desarrollo y maduras [27]. Por el contrario, otros estudios han mostrado relativamente bajos niveles de expresión de la NRTN en el estriado y ningún patrón de regulación de desarrollo en la *substantia nigra* [44], sugiriendo que la NRTN no regula la muerte natural en las neuronas dopaminérgicas [44]. Además, estudios realizados en neuronas dopaminérgicas en desarrollo *in vitro* han demostrado que la NRTN carece de la actividad neuritogénica e hipertrófica del GDNF [40]. Más aún, estudios en ratones “*knockout*” de NRTN o de su receptor GFR $\alpha$ 2 han reportado un número normal de neuronas dopaminérgicas mostrando que la NRTN endógena no es un factor de supervivencia para estas neuronas [45,46], aunque estos animales exhiben anomalías en neuronas entéricas, parasimpáticas y sensoriales [45,47,48]. Puesto que una reducción substancial en el receptor GFR $\alpha$ 2 también ocurre en ratones “*knockout*” de NRTN y considerando la conservación de la población dopaminérgica en los ratones “*knockout*” de NRTN o de GFR $\alpha$ 2 [45,46], podemos deducir entonces que el GDNF puede sustituir la función de la NRTN [45]. Esta sugerencia está apoyada por el hallazgo de que la ausencia de RET, el receptor que traduce la señal para

GFR $\alpha$ 1 y GFR $\alpha$ 2 [49], causa una degeneración tardía y progresiva de las neuronas dopaminérgicas nigrales [50]. En contraste, el efecto neuritogénico de la NRTN se encuentra bien documentado en las neuronas noradrenérgicas centrales durante el desarrollo y la edad adulta [51].

#### **1.4. Resultados de estudios con la NRTN *in vivo***

La capacidad de la NRTN para prevenir o revertir la neurodegeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal *in vivo* se ha explorado utilizando la transferencia del gen para la NRTN. Hasta la fecha, los estudios preventivos y restaurativos en modelos animales lesionados del sistema nigroestriatal [52-60] y los ensayos clínicos en pacientes parkinsonianos [61-63] se han centrado en demostrar la recuperación del fenotipo enzimático (tirosina hidroxilasa; TH) y la disminución de las alteraciones motoras. Todos estos estudios *in vivo* solamente sugieren que la NRTN podría estimular la elongación axonal y la ramificación dendrítica en el sistema nigroestriatal dopaminérgico. Sin embargo, la evidencia experimental aún no se ha obtenido en este tema.

#### **1.5. Utilidad del modelo de lesión con 6-OHDA en estudios de regeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal**

La 6-OHDA es un análogo hidroxilado de la dopamina, inestable a la luz y a la temperatura por su alto grado de oxidación, es por esta propiedad que se comporta como un potente neurotóxico de las neuronas dopaminérgicas en la rata [64,65]. El compuesto sintético es ampliamente utilizado para generar modelos de lesión en roedores, pero es posible que la 6-OHDA sea producida de manera natural por la oxidación de la dopamina y pudiera también participar en la neurodegeneración que conlleva a la enfermedad de Parkinson como lo

sugieren los altos niveles detectados en la orina de pacientes parkinsonianos [66]. En animales de experimentación, la 6-OHDA desarrolla varias características similares a la neurodegeneración observadas en tejidos humanos “*post-mortem*” de pacientes parkinsonianos. Estas características incluyen inhibición del proteosoma, acumulación de proteínas oxidadas y nitrosiladas, incremento de ubiquitinación, reducción en la actividad de la glutatona-peroxidasa y la catalasa, junto con concentraciones disminuidas de glutatión reducido y acumulación citoplasmática de proteínas de señalización apoptótica como caspasa-3 activa, y al parecer también agregados de  $\alpha$ -sinucleína [67]. Los mecanismos por los cuales la 6-OHDA ejerce sus efectos neurotóxicos todavía no están completamente comprendidos, pero el consenso es que está involucrada primariamente en el estrés oxidativo [68], en cuyo proceso se generan una serie de especies reactivas de oxígeno a pH fisiológico, incluyendo el peróxido de hidrógeno, paraquinona, iones superóxido y radicales hidroxilo [64]. Debido al potencial apoptótico del estrés oxidativo, se ha sugerido que la 6-OHDA induce apoptosis en las neuronas dopaminérgicas [67]. Diversas evidencias *in vitro* e *in vivo* apoyan esta idea. Se ha descubierto que la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B contribuye a la toxicidad de la 6-OHDA [69]. Así mismo se ha sugerido que la disfunción mitocondrial está involucrada en la toxicidad de la 6-OHDA [70]. La neurotoxicidad de la 6-OHDA sucede muy rápidamente. Por ejemplo, se reduce el transporte axonal de las vesículas sinápticas dentro de los primeros 30 min de interacción del neurotóxico con la neurona dopaminérgica, afecta la trayectoria de los microtúbulos en los axones desde las 6 a 9 horas después de la interrupción del transporte axonal, e induce la muerte neuronal 48 horas después de su aplicación [71]. La 6-OHDA causa la formación de autofagosomas después de las 9 h de tratamiento [71]. Todos estos datos demuestran que la 6-OHDA realmente induce la muerte en las neuronas dopaminérgicas y no

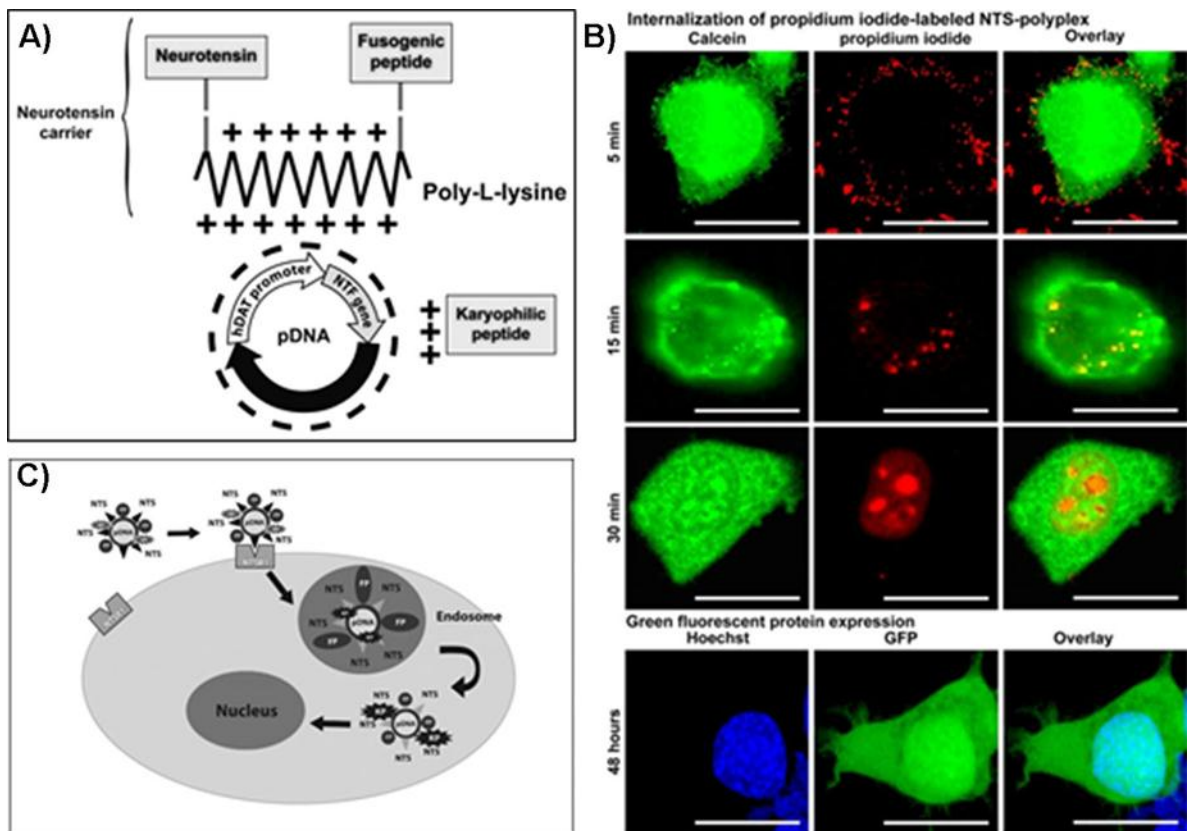
solamente reduce el fenotipo dopaminérgico. La certeza de la muerte de las neuronas dopaminérgicas ocasionada por la 6-OHDA es la base de la demostración de la acción regeneradora de la NRTN en el sistema nigroestriatal en esta tesis doctoral. Por esta razón, utilizamos el modelo de lesión crónica del sistema nigroestriatal inducida por la inyección de una sola dosis de 6-OHDA en la emergencia del haz medial del cerebro anterior en el cuerpo estriado.

El modelo de lesión crónica por la inyección estriatal de la 6-OHDA en la rata ofrece varias ventajas para explorar el efecto neurotrófico de la NRTN [72-74]. Una ventaja es que el curso temporal de la muerte apoptótica de las neuronas dopaminérgicas nigrales está bien caracterizado; dura 4 semanas después de la inyección del neurotóxico y presenta un pico máximo entre los días 3 y 21 después de la lesión [75]. En este modelo de lesión, la disminución máxima en los marcadores de fenotipo (TH y tubulina  $\beta$ -III) se alcanza en la semana 4 después de la lesión y a partir de entonces permanece un remanente de 10-20% de las células TH (+) inalteradas a lo largo de toda la vida de la rata [75]. La inervación de fibras TH (+) en el estriado sigue también el mismo curso temporal de la apoptosis neuronal en la substantia nigra y no presenta regeneración espontánea [75]. Por lo tanto, este modelo de lesión estriatal es el idóneo para explorar si la sobreexpresión de NRTN en neuronas dopaminérgicas nigrales remanentes en la lesión crónica puede causar la restauración presináptica y postsináptica del sistema dopaminérgico nigroestriatal.

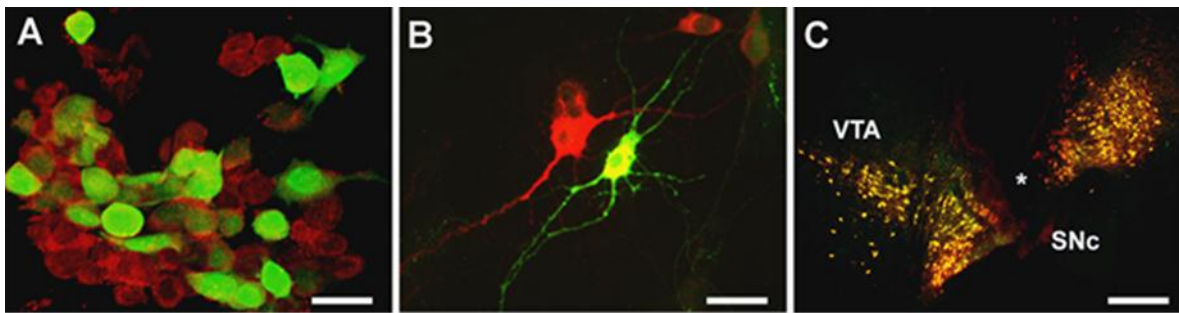


## 1.6. El nanovector NTS-poliplex: herramienta para el envío dirigido de genes a neuronas dopaminérgicas lesionadas

El nanovector neurotensina (NTS)-poliplex es un sistema sintético de transferencia de genes a través de la internalización del receptor a NTS tipo 1 (NTSR1), el cual se encuentra altamente enriquecido en la membrana plasmática de las neuronas dopaminérgicas (Figura 3) [76-80]. En esta tesis utilizamos el nanovector NTS-poliplex para transferir la secuencia codificante de la NRTN de ratón (mNRTN) por su capacidad para transfectar las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra in vitro* [76] e *in vivo* [77,78,81,82] (Figura 4).



**Figura 3. Mecanismo de la transferencia de genes a través de la internalización del receptor a neurotensina tipo 1 (NTSR1).** **A)** Estructura del nanovector NTS-poliplex. **B)** Resultados de los pasos sucesivos en la transfección del transgén GFP (proteína verde fluorescente) marcado con yoduro de propidio en las células N1E-115. **C)** Propuesta del mecanismo de transfección. Imágenes tomadas y modificadas de Martínez-Fong et al., Nanomedicine, 2012.



**Figura 4. Capacidad del nanovector NTS-poliplex para transfectar células que expresan NTSR1.** Líneas celular N1E-115 de neuroblastoma murino **(A)**, neuronas dopaminérgicas de ratón en cultivo primario **(B)**, neuronas dopaminérgicas de rata *in vivo* **(C)**. Se utilizó el plásmido pEGFP que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) en los ensayos de transfección en **(A)** y **(C)** y el plásmido pDsRed que codifica la proteína roja fluorescente para transfectar neuronas dopaminérgicas de un ratón transgénico que expresan establemente la GFP. Las imágenes fueron publicadas en Mol. Brain Res. [83,84], BBA [78] y PlosOne [76]. La contratinción roja fue realizada con yoduro de propidio **(A)** o con inmunofluorescencia contra tirosina hidroxilasa-TRIC **(C)**. VTA = área ventral tegmental. SNc = substantia nigra compacta. Barras de calibración = 50  $\mu$ m **(A y B)** y 300  $\mu$ m **(C)**.

El nanovector NTS-poliplex puede contener elementos de regulación transcripcional como el promotor tejido específico hDAT que regula la expresión del transportador de dopamina humano o el promotor eucariótico del factor de elongación alfa 1 (EF $\alpha$ 1) que incrementa el tiempo de expresión transgénica [78,81,84,85] con altos niveles de seguridad [86,87]. También puede contener los elementos reguladores del sistema Avanzado pTet-On para iniciar la expresión transgénica por la administración de doxiciclina y terminarla por la suspensión del fármaco [86]. Este nuevo elemento regulador en el nanovector NTS-poliplex tiene la posibilidad de proveer los niveles necesarios de GDNF para producir el efecto neurotrófico sin riesgos de efectos secundarios [86].

Todas estas ventajas han permitido utilizar al NTS-poliplex como una herramienta experimental para demostrar que la deficiencia de vitamina B12 produce parkinsonismo en la rata [88]. Este trabajo pionero ha dado pie a estudios moleculares y epigenéticos sobre la deficiencia de la vitamina B12 en células neuronales [89,90].

De manera relevante para esta tesis, el nanovector NTS-poliplex es un sistema de transferencia génica eficaz y específico para expresar genes de factores neurotróficos como GDNF, BDNF y CDNF en neuronas dopaminérgicas con lesión aguda [81,82,91] o crónica [85] por 6-OHDA. En esta tesis, utilizamos el nanovector NTS-poliplex en las transfecciones del transgén de la mNRTN-His bajo el control transcripcional del promotor EF $\alpha$ 1.

## **2. Planteamiento del problema**

Desde las primeras observaciones de los efectos neurotróficos en cultivo de neuronas dopaminérgicas o en animales de experimentación obtenidos con la administración de las proteínas, surgió la idea de utilizar los factores neurotróficos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas [7]. Sin embargo, resultaba muy poco práctico la administración continua

de proteínas neurotróficas como el GDNF o NRTN directamente al cerebro [92-94]. Aun así, se han realizados estudios en diferentes fases clínicas con la infusión de GDNF al núcleo caudoputámen en enfermos parkinsonianos con resultados poco alentadores [95,96]. El éxito de la transferencia del gen neurotrófico de interés a la substantia nigra o al cuerpo estriado ya sea con vectores virales [53-58] o nanovectores [97-101] en modelos animales de neurodegeneración nigroestriatal reactivó el interés de utilizar en la clínica ahora el gen neurotrófico, preferentemente en la enfermedad de Parkinson [52,102-105]. El único protocolo en ensayos clínicos fase 2 se ha realizado con la transferencia al núcleo putamen del gen para la NRTN por el vector viral adenoasociado serotipo II llamado CERE-120 [52,102-104]. Los resultados de estos estudios clínicos fueron desalentadores como reportaron los propios autores [102,105], y a pesar de esto, realizaron ensayos clínicos en fase I con la administración directa de CERE-120 en la substantia nigra de pacientes parkinsonianos [63,103]. El escaso éxito lo atribuyen a que la administración del CERE-120 se hizo en el núcleo blanco de inervación de las neuronas dopaminérgicas, donde sus terminales nerviosas son muy escasas en los pacientes parkinsonianos e insuficientes para transportar retrógradamente a la NRTN hasta el cuerpo neuronal donde se requiere para la supervivencia neuronal [62,106]. La otra posibilidad que recientemente se ha manejado es la pobre difusión de la NRTN a través del parénquima cerebral debido a su fuerte unión con sulfatos de heparán de la matriz extracelular [107]. Pero también cabe la posibilidad de que no haya tales efectos neurotróficos; esto es, que no haya regeneración o restauración estructural del sistema dopaminérgico nigroestriatal. Por esto es importante nuestra tesis que aborda este problema.

El problema fundamental que subyace a todos los estudios en animales de experimentación con el sistema nigroestriatal lesionado es que todos se han enfocado a demostrar solamente la

recuperación del fenotipo dopaminérgico (TH y dopamina) y la disminución de las alteraciones de la conducta motora, pero ninguno de ellos ha aportado evidencias claras de restauración de la vía nigroestriatal. De aquí que la principal crítica para la terapia con genes para factores neurotróficos es que la mayoría de los estudios se han hecho en animales lesionados con 6-OHDA, que para algunos investigadores, sólo disminuye el fenotipo de las neuronas, pero no las mata.

Nuestro grupo demostró en el año 2013 que la inyección de la 6-OHDA en el estriado causa la muerte por apoptosis de las neuronas dopaminérgicas en un periodo de 4 semanas, a partir del cual permanece un remanente de neuronas (10-20%) durante toda la vida del animal [75]. Por esto, planteamos transfectar esas neuronas remanentes con el gen de la NRTN para que la proteína sintetizada sea liberada por el cuerpo neuronal y sus dendritas a nivel de la *substantia nigra* y por las terminales supervivientes a nivel del cuerpo estriado como se ha demostrado para el GDNF [81] y CDNF [91]. Esta acción simultánea del factor neurotrófico en la *substantia nigra* y en el estriado la ofrece la transfección del gen neurotrófico por el nanovector NTS-poliplex en las neuronas dopaminérgicas [108]. Sobre esta base formulamos las siguientes hipótesis de trabajo.

### **3. Hipótesis**

**3.1.** La transferencia del plásmido pTracer-mNRTN-His por las nanopartículas del NTS-poliplex a las neuronas dopaminérgicas nigrales supervivientes a la lesión crónica de la 6-OHDA conducirá a la expresión de la NRTN-His.

**3.2.** La sobreexpresión de la NRTN-His en las neuronas dopaminérgicas nigrales supervivientes corregirá las alteraciones estructurales, bioquímicas y funcionales del sistema dopaminérgico nigroestriatal causadas por la lesión crónica de la 6-OHDA.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo General.**

Demostrar que la NRTN-His puede inducir plasticidad neuronal en el sistema dopaminérgico nigroestriatal con lesión crónica por 6-OHDA.

### **4.2. Objetivos Específicos**

1. Construcción del plásmido pTracer-mNRTN-His.
2. Ensamblaje de las nanopartículas de NTS-poliplex con del plásmido pTracer-mNRTN-His
3. Demostrar la expresión de la NRTN-His en células N1E-115 transfectadas con el plásmido pTracer-mNRTN-His mediante las nanopartículas de NTS- poliplex.
4. Demostrar la expresión de la NRTN-His en las neuronas dopaminérgicas de ratas transfectadas con el plásmido pTracer-mNRTN-His mediante las nanopartículas de NTS- poliplex.
5. Demostrar que la expresión de la NRTN-His corrige las alteraciones estructurales y funcionales del sistema dopaminérgico nigroestriatal en el modelo de lesión crónica por la 6-OHDA.

#### **5.1. Evaluación presináptica:**

- 5.1.1. Del fenotipo dopaminérgico (TH y DA).

5.1.2. Del fenotipo no dopaminérgico (citoesqueleto neuronal y NTSR1).

5.2. Evaluación postsináptica:

5.2.1. Espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del núcleo estriado.

5.3. Demostrar la corrección de las asimetrías motoras inducidas por fármacos y las asimetrías motoras espontáneas.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1. Plásmidos

#### 5.1.1 Plásmido pTracer-mNRTN-His

La secuencia codificante para la NRTN (587 pb) de ratón (NM\_008738.2, GenBank) contenida en el plásmido pcDNA3-mNRTN, amablemente donado por los Drs. Mart Saarma y Runeberg-Roos (Instituto de Biotecnología, Universidad de Helsinki, Helsinki, Finlandia), fue amplificada por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando los siguientes cebadores:

Cebador sentido:

<b>EcoRI</b> <b>Kozak</b> <b>Codón de inicio</b>
GTAG <b>GAATTC</b> GC <b>ACC</b> ATGGAGGCGCTGGAAGGCA

Cebador antisentido:

<b>EcoRI</b>
ATT <b>GAATTC</b> CACGCACGCGCACTCCCG

Así la secuencia codificante de la mNRTN fue flanqueada con el sitio de restricción de la enzima EcoRI, y se le agregó la secuencia Kozak, para incrementar la eficiencia de traducción. El cebador antisentido se diseñó para eliminar el codón de paro y así generar la mNRTN en fusión con las etiquetas de reconocimiento V5 y 6xHis (6 histidinas).

La PCR se llevó a cabo en un volumen de 50  $\mu$ L del Buffer de PCR 1X, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's), 10 mM de cada uno de los cebadores sentido y antisentido, 2 unidades de la Polimerasa "*Expand High Fidelity PCR System*" (Roche Hoffmann-La Roche Ltd), 100 ng del plásmido pcDNA3-mNRTN y 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO). Los parámetros de amplificación del termociclador consistieron en una primera desnaturalización a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 30 s), alineamiento (55°C por 30 s) y extensión (72°C por 50 s). El último ciclo de extensión a 72°C por 7 min.

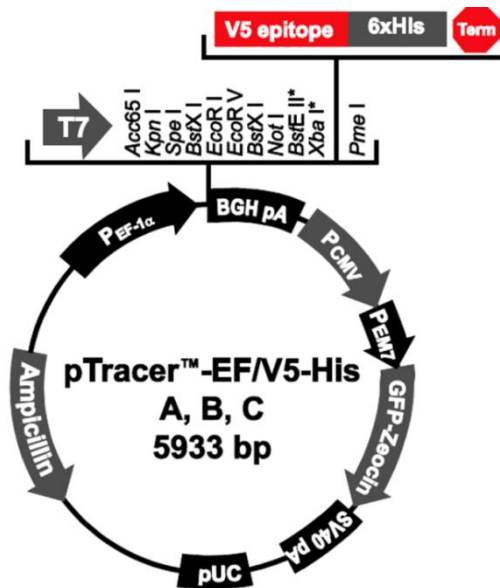
El producto de la PCR fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% para separar el amplicón de NRTN, el cual se purificó del gel de agarosa con el kit QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Posteriormente el amplicón de NRTN y el pTracer™-EF/V5-His A (Invitrogen Corp; Carlsbad, CA, USA) fueron sometidos a una reacción de restricción con la enzima EcoRI para la generación de extremos cohesivos. La ligación del amplicón de NRTN con el pTracer™-EF/V5-His A se llevó a cabo en una relación de 3:1 (amplicón : plásmido) empleando el kit Rapid DNA Ligation (Fermentas, Hanover, MD, USA) y 100 ng de plásmido siguiendo las instrucciones del fabricante.

Seleccionamos el pTracer™-EF/V5-His de 5.9 kpb como un vector de expresión debido a que ofrece la posibilidad de detectar no solo la expresión del transgén de interés, por una detección directa por la etiqueta His o V5, sino que puede emplearse la detección indirecta a través de la



expresión de la GFP. El vector produce un alto nivel de expresión del transgén de interés en células de mamífero y puede ser usado en estudios de expresión transitoria o estable. El pTracer<sup>TM</sup>-EF/V5-His es suministrado en 3 marcos de lectura (A, B y C) para facilitar la clonación con la detección en el extremo C terminal y purificación opcional empleando la etiqueta His o V5 (Figura 5). Las ventajas de este vector de clonación y expresión son:

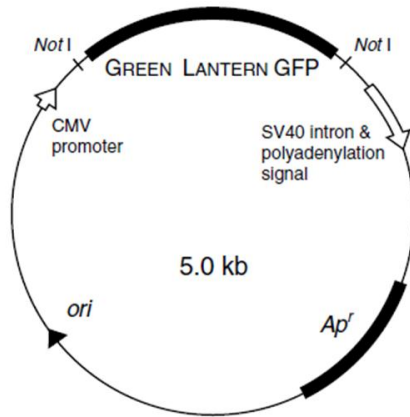
- Contiene el gen mejorado de la GFP para su detección *in vivo*. La GFP se encuentra fusionada a un gen de resistencia a Zeocina.
- Gen de resistencia de Zeocina para selección tanto en *E. coli* y células de mamífero.
- Contiene el promotor inmediato-temprano del citomegalovirus humano (CMV) que conduce la expresión de los 3 ciclos del gen de fusión de resistencia GFP-Zeocina en células de mamífero.
- Contiene el promotor del Factor de Elongación Humano 1 $\alpha$  (hEF-1 $\alpha$ ) que permite la sobre-expresión de la proteína de interés recombinante en un amplio rango de tipos de células de mamífero [109,110].
- El péptido C-terminal conteniendo los epítopes V5 y His que servirán para la detección de la proteína de interés o su purificación mediante el uso de anticuerpos o por resinas tipo metal-quelante



**Figura 5. Mapa de Restricción simplificado del plásmido pTracer EF-V5-His.** Se denota el sitio múltiple de clonación para el transgén de interés con los epítopes V5 y 6xHis. Imagen tomada del manual *pTracer™ – EF/V5-His A, B, C User guide Invitrogen by Life Technologies, Publication part number 25-0260.*

### 5.1.2 Plásmido pGreenLantern-1

El plásmido pGreenLantern-1 de 5.030 kpb (Figura 6) que codifica para la GFP bajo el control del promotor CMV (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) fue utilizado como un control positivo de la transfección del pTracer-mNRTN-His y como un control negativo (plásmido irrelevante) del efecto neurotrófico de la expresión de NRTN-His.



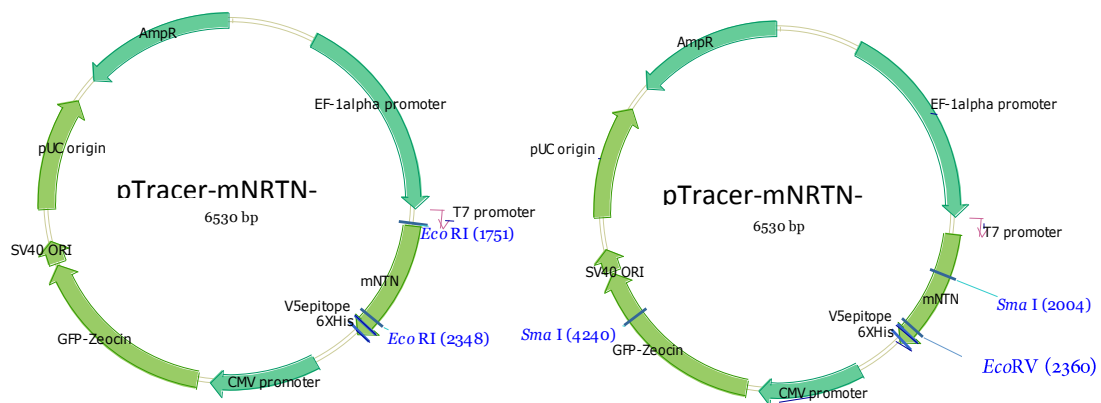
**Figura 6. Mapa de restricción simplificado del plásmido pGreenLantern-1.** Este plásmido es empleado como control positivo de transfección y como control negativo de la expresión de la NRTN. Imagen tomada de Krista Evans et al., 1996.

### 5.1.3 Transformación, Amplificación y Purificación del pTracerEF-NRTN-V5-His

Se transformaron 50  $\mu$ L de bacterias competentes de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. Coli* con 100 ng del plásmido pTracerEF-NRTN-V5-His. Las células se incubaron con el plásmido por 30 min en hielo posteriormente se aplicó un choque térmico durante 90 s a 42 °C, seguido de una incubación de 2 min en hielo, luego las bacterias se vierten a 950  $\mu$ L de medio LB (Luria Bertani) y se incuban a 37 °C por 1 h a 225 rpm. Finalmente se sembraron 50  $\mu$ L de las células transformadas en cajas Petri LB-agar con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se incubaron por 18 hrs a 37 °C. Una vez concluido el periodo de incubación, se eligieron 11 colonias ampicilina resistentes y se analizaron por el método de PCR de colonia con el cebador T7 sentido TAATACGACTCACTATAGGG y el cebador NRTN antisentido ATTGAATTCCACGCAC GCGCACTCCCG.

Los candidatos que presentaron el amplicón esperado en la PCR de colonia, se amplificaron y se purificaron con el kit EndoFree plasmid Purification Qiagen. La orientación correcta de la secuencia codificante de la NRTN en el plásmido pTracer-mNRTN-V5-His se verificó por medio

de ensayos de restricción con la enzima EcoRI o con el par de enzimas EcoRV y XmaI, considerando que esta última corta dentro de la secuencia codificante de la NRTN (Figura 7).

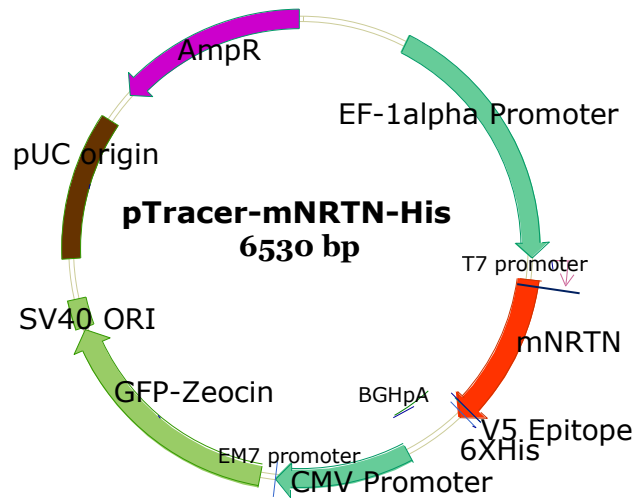


**Figura 7. Mapas de restricción para verificar la orientación correcta de la secuencia codificante de la NRTN en el plásmido pTracer-mNRTN-V5-His.** Se indican los sitios de corte de las enzimas de restricción de EcoRI, EcoRV y SmaI (en azul). Los mapas de restricción se generaron por análisis bioinformático empleando el software NTI-Vector, Thermo Fisher Scientific.

Una vez confirmada la clonación correcta de la secuencia codificante de la NRTN (Figura 8), se procedió a amplificar y purificar el plásmido pTracer-mNRTN-His en 4 L de medio LB suplementado con ampicilina (Maxiprep). Para este fin, se inoculó 1 mL de las bacterias transformadas con el plásmido pTracer-mNRTN-His (candidato verificado) en el Maxiprep y se incubó a 37 °C a 250 rpm durante toda la noche. Para la purificación del plásmido pTracer-mNRTN-His, las baterías crecidas en el Maxiprep fueron centrifugadas a 6,000 x g por 15 min a 4 °C en una centrífuga Beckmann J2-HS (Beckma Coulter, Inc.; Fullerton, CA USA) y las pastillas bacterianas fueron tratadas con el kit EndoFree Plasmid Purification (Qiagen inc, Valencia CA, USA) para el lisado de las bacterias y la purificación del plásmido siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente, el plásmido pTracer-mNRTN-His purificado fue

solubilizado en 3 mL de buffer TE (10 mM Tris-Cl, pH 7.5 y 1 mM EDTA), esterilizado por microfiltración, distribuido en alícuotas de 250  $\mu$ L en tubos Eppendorf estériles y almacenado a -20  $^{\circ}$ C hasta su uso. Se utilizó espectrofotometría para cuantificar la concentración del plásmido a 260 nm y determinar su pureza a 260 nm/280 nm.

Para la verificación del correcto orden de los nucleótidos en la secuencia de NRTN-His se realizó una secuenciación empleando los siguientes oligonucleótidos; 5'CAGCTCCCTGCTGTCTGTCTG3' (oligo sentido) y 5'CAACCCAGGGAGAAAGTTCTC3' (oligo antisentido).



**Figura 8. Plásmido pTracer-mNRTN-His.** Esquema del plásmido bistrónico que contiene la secuencia codificante de la mNRTN bajo el control del promotor EF1 $\alpha$ , y la secuencia codificante de la GFP bajo el control del promotor CMV. El mapa de restricción se generó por análisis bioinformático empleando el software NTI-Vector, Thermo Fisher Scientific.

## **5.2 Ensamble de las nanopartículas NTS-poliplex con el plásmido pTracer-mNRTN-His o pGreenLantern-1**

El ensamble de las nanopartículas del NTS-poliplex con los plásmidos utilizados se realiza en diferentes pasos que incluyen la síntesis del vector-NTS y la condensación del plásmido mediante dos reacciones electrostáticas sucesivas, primero con el péptido cariofílico (PC) y en seguida con el vector-NTS.

### **5.2.1 Síntesis del vector-NTS**

El vector-NTS es el conjugado de la NTS y el fusogénico (PF) con la poli-L-lisina (PLL) utilizando el entrecruzador bifuncional LC-SPDP (N-succinimidil 6-3[3-(2-piridilditiona) propionamida]-hexanoato) mediante 4 pasos secuenciales descritos previamente [84] que son:

- a) La formación del conjugado PLL-SPDP-SH
- b) La formación del conjugado NTS-SPDP
- c) La formación del conjugado PF-SPDP
- d) La formación del conjugado NTS-PF-PLL

#### **5.2.1.1 Formación del conjugado de PLL-SPDP-SH**

Se disolvieron 25 mg de PLL de 48 kDa (masa molecular promedio; Sigma St. Louis, MO, USA) en 2 mL en PBS para cromatografía (17.42 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.58 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, pH 7.2) y se mezcló con 7.5 mg de LC-SPDP; Pierce Chemical Co, Rockford IL, USA) previamente disuelto en 30 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) agitando rápida y vigorosamente para evitar la formación de precipitados. La mezcla fue incubada por 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad (el SPDP es sensible a la luz). Para purificar el conjugado

PLL-SPDP, la muestra se sometió a cromatografía líquida de exclusión molecular en resina Econo-Pac 10DG (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules CA, USA) equilibrado con PBS para cromatografía a temperatura ambiente y se colectaron 17 fracciones de 1 mL cada una. Se leyó la absorbancia de cada alícuota a 215 y 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific; Waltham MA, USA). Se obtuvo el cromatograma graficando la absorbancia contra el volumen de elución. Se mezclaron los eluados del primer pico, el cual contiene el conjugado PLL-SPDP, y se redujeron a un volumen final de 1 mL utilizando un concentrador al vacío por centrifugación (Hetovac VR-1, Heto Lab Equipment; Denmark). A esta fracción de 1 mL se añadieron 24 mg de ditioneitol (DTT) disueltos en 500  $\mu$ L de PBS para cromatografía para reducir la PLL-SPDP a PLL-SPDP-SH. La mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, una alícuota de la mezcla se diluyó a 1:400 y fue leída a 343 nm para cuantificar la pirimidina-2-tiona liberada en la reacción. La eficiencia de la reacción se determinó en base de la concentración de la piridina-2-tiona utilizando la siguiente ecuación:

$$C = \frac{Abs_{343\text{ nm}}}{E_{343\text{ nm}}} FD$$

Dónde:

C = Concentración de la piridina-2-tiona.

Abs<sub>343 nm</sub> = Absorbancia de la pirimidina-2-tiona a 343 nm.

E<sub>343 nm</sub> = Coeficiente de extinción molar a 343 nm (8.08 x 10<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>).

FD = Factor de dilución.

La eficiencia de la reacción fue determinada con la siguiente ecuación:

$$E = \frac{C}{[SPDP]_i} 100\%$$

Dónde:

E = Eficiencia de la reacción.

C = Concentración de la piridina-2-tiona.

[SPDP]<sub>i</sub> = Concentración inicial de SPDP.

La fracción del conjugado PLL-SPDP-SH se purificó y concentró a 1 mL con el mismo proceso utilizado para la fracción del conjugado PLL-SPDP.

#### **5.2.1.2 Formación del conjugado NTS-SPDP**

Se disolvieron 10 mg de NTS ( ELYENKPRRPYIL, Sigma; St. Louis MO, USA) en 2 mL de PBS para cromatografía. Posteriormente se le agregó de forma rápida 5 mg de LC-SPDP disueltos en 30 µL de DMSO, la mezcla se agitó vigorosamente durante 30 min a temperatura ambiente y en completa oscuridad para evitar la formación de precipitados. Finalizada esta incubación, el conjugado NTS-SPDP se purificó en una columna de Sephadex G10 (1.5 x 6 cm, Pharmacia Fine Chemicals AB; Uppsala, Suiza) utilizando PBS para cromatografía como fase móvil a temperatura ambiente y se recolectaron 120 fracciones de 100 µL. Se determinó la absorbancia a 280 nm en el instrumento Nanodrop ND-1000. Se obtuvo el cromatograma a partir de la absorbancia y el volumen de elución, se mezclaron las fracciones donde eluyó el primer pico del cromatograma y se redujo el volumen a 800 µL utilizando el microconcentrador a vacío por centrifugación ((Hetovac VR-1, Heto Lab Equipment, Denmark). Considerando que el primer pico del cromatograma contiene el conjugado NTS-SPDP.



### **5.2.1.3 Formación del conjugado PF-SPDP**

Se disolvieron 8 mg de PF con una pureza mayor al 90% (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCAKKK; RS Synthesis; Louisville, KY, USA) en 970  $\mu$ L de PBS para cromatografía. Posteriormente se agregaron rápidamente 2.55 mg de LC-SPDP disueltos en 30  $\mu$ L de DMSO, la mezcla se agitó vigorosamente durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad para evitar la formación de precipitados. Finalizado este periodo de incubación, la muestra se purificó por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G15 (1.5 x 6 cm, Pharmacia Fine Chemicals AB; Uppsala, Suiza) utilizando PBS para cromatografía como fase móvil, a temperatura ambiente y se recolectaron 120 fracciones de 100  $\mu$ L. A cada fracción se determinó la absorbancia a 280 nm empleando el instrumento Nanodrop ND-1000. Se obtuvo el cromatograma graficando la absorbancia contra el volumen de elución, se mezclaron los eluados del primer pico y se redujo el volumen a 800  $\mu$ L utilizando el microconcentrador a vacío por centrifugación ((Hetovac VR-1, Heto Lab Equipment, Denmark). Considerando que el primer pico del cromatograma contiene el conjugado PF-SPDP.

### **5.2.1.4 Formación del conjugado NTS-PF-PLL, el vector-NTS**

Se mezclaron los volúmenes de las fracciones de NTS-SPDP y PF-SPDP en un solo tubo, y a esta mezcla se le agregó un mililitro del conjugado obtenido de PLL-SPDP-SH bajo agitación vigorosa para evitar la formación de precipitados. Se continuó la agitación por un periodo de 12 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Al término de la incubación, una alícuota se diluyó 1:200 en PBS de cromatografía y se le midió la absorbancia a 343 nm para determinar la eficiencia de la reacción con base a la concentración de piridina-2-tiona liberada durante la conjugación utilizando las ecuaciones descritas en el numeral 5.2.1.1.

El conjugado NTS-PF-PLL fue purificado por cromatografía de exclusión molecular en Biogel A-1.5 m (1.5 x 45 cm, Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules CA, USA) utilizando un buffer de 2 M de guanidina en 10 mM Hepes, pH 7.4 como fase móvil. Se recolectaron 100 fracciones de 1 mL cada una. Un volumen de 100  $\mu$ L de cada fracción fueron diluidos con 200  $\mu$ L de PBS para cromatografía y se determinó la absorbancia simultáneamente a 215, 280 y 343 nm. Se obtuvo el cromatograma de purificación considerando las tres longitudes de onda. Se mezclaron las fracciones en las cuales eluyen los conjugados de peso molecular en un rango de 66,000 a 200,000 Da y se redujo el volumen a 1.3 mL empleando una cámara de ultrafiltración bajo atmósfera de nitrógeno con una membrana 25, PM 10 (Amicon Corp.; Lexington, MA USA). El producto que contiene el conjugado NTS-PF-PLL se dializó con 1 L de PBS para células (8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) durante 12 h. El proceso de diálisis se repitió 4 veces empleando en cada ocasión PBS para células fresco. Finalmente la solución que contiene al NTS-PF-PLL se esterilizó por filtración en membrana hidrofílica con poro de 0.22  $\mu$ m. Posteriormente el producto se distribuyó en alícuotas de 100  $\mu$ L en tubos Eppendorf estériles, los cuales se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$ . La concentración de PLL en el conjugado se obtuvo a partir de una curva de calibración de PLL (48,000 Da) graficando la absorbancia a 215 nm contra la concentración (0.1 – 1.0 mg/mL en PBS para células). Se determinó la absorbancia a 215 nm de las muestras diluidas del conjugado NTS-PF-PLL (1:20, 1:15 y 1:10). Los valores se extrapolaron en la curva estándar y se corrigieron empleando el factor de dilución para calcular la concentración de PLL en el conjugado. La concentración molar del conjugado se obtiene por la división de la concentración de PLL en el conjugado entre el peso molecular promedio del conjugado dado en mg/mL.

## **5.2.2 Ensamblaje de las nanopartículas NTS-poliplex**

Las nanopartículas NTS-poliplex resultan de la compactación del ADN plasmídico por la unión electrostática entre el PC y el vector-NTS. Se empleó el PC de 20 aminoácidos de la proteína de direccionamiento nuclear Vp1 del virus SV40 (PC; MAPTKRKGSCPGAAPNKPK; pureza > 90%; RS Synthesis; Louisville, KY, USA). Los tres componentes fueron individualmente disueltos en DMEM sin suero fetal bovino (SFB) empleando las siguientes proporciones: 1 parte de PC, 3 partes del pDNA y 2 partes del vector-NTS. Los procedimientos fueron realizados a temperatura ambiente como fue descritos previamente [84].

### **5.2.2.1 Acople electrostático entre el PC y el pDNA**

Los microensayos de retardo electroforético fueron empleados para determinar las relaciones molares óptimas para la formación del complejo PC-pDNA. Alícuotas de concentraciones crecientes del PC (0 – 24  $\mu$ M con una diferencia de 3  $\mu$ M) fueron agregadas a alícuotas de 6 nM de pDNA. Las mezclas obtenidas fueron incubadas por un periodo de 30 min con agitación constante, no mayor a 600 rpm. Al término de la incubación, los conjugados formados a cada relación molar fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, a 80 voltios por 1.5 h en buffer TAE (Tris-base 40 mM, ácido acético glacial 40 mM, EDTA 1 mM). Para la observación de la separación electroforética, el gel de agarosa fue teñido con una solución de bromuro de etidio, base intercalante para DNA, y fotografiado utilizando un fotodocumentador BioDoc-It Imaging System (UVP; Upland, Canada). Previamente se ha determinado empíricamente que la relación molar óptima de PC para la formación del conjugado PC-pDNA es aquella que retarda su corrimiento electroforético por encima del pDNA del control [84].

### **5.2.2.2 Acople electrostático del vector-NTS al complejo PC-pDNA**

De forma semejante al caso anterior, se emplearon los ensayos de retención para determinar las relaciones óptimas de la formación del NTS-poliplex con el vector-NTS y el PC-pDNA. De la relación molar óptima del conjugado PC-pDNA obtenido en la sección anterior, le fue añadido el vector-NTS en concentraciones crecientes (0 – 234 nM con una diferencia de 18 nM). La mezcla de reacción se incubó durante 30 min en agitación constante no mayor a 500 rpm. Al término de la incubación, el poliplex formado a cada relación molar fue sometido a las mismas condiciones de electroforesis indicadas en la sección previa. Previamente se ha determinado empíricamente que la relación molar óptima del vector-NTS la formación del NTS-poliplex es aquella que retiene la totalidad del complejo PC-pDNA en el pocillo del gel de agarosa [84].

### **5.3 Análisis de las nanopartículas de NTS-poliplex por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.**

Las muestras de las nanopartículas de NTS-poliplex conteniendo el plásmido pTracer-mNRTN-His o pGreenLantern-1 fueron preparadas de acuerdo a los puntos indicados en el numeral 5.2. Estas muestras fueron colocadas en un porta-muestras de una aleación aluminio-hierro empleando una cinta adhesiva de doble cara SPI-AB-Cu #5085. Posteriormente las muestras fueron secadas en una cámara de vacío (Secador<sup>TM</sup> 1.0; Bel-Art Products; Wayne, NJ, USA) por 24 h a temperatura ambiente. Las imágenes fueron tomadas en el Laboratorio Nacional de Nanoscopía Electrónica de Alta Resolución del CINVESTAV con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Zeiss Auriga-39-16) usando los siguientes parámetros: Voltaje de aceleración, 2 kV; distancia de trabajo, 3.8 nm; apertura 7.5  $\mu\text{m}$  y con un detector electrónico secundario.

#### **5.4 Transfección del plásmido pTracer-mNRTN-His *in vitro***

La primera verificación de la funcionalidad transcripcional del plásmido pTracer-mNRTN-His se hizo por ensayos de expresión transitoria de la NRTN-His en la línea celular de neuroblastoma murino N1E-115 (ATCC® CRL-2263™). Se emplearon cultivos celulares a una densidad celular del 70% - 80% para ser transfectados con Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific; Waltham MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó una relación de 1:1 (pDNA:Lipofectamina) en solución DMEM en ausencia de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos. Los ensayos con las nanopartículas de NTS-poliplex se llevaron a cabo a una confluencia de 50 a 60%. En ambos casos se substituyó el medio de transfección por medio fresco y después de 48 h de transfección las células se cosecharon para observar la expresión de GFP a través de su fluorescencia nativa y la de NRTN-His por inmunofluorescencia indirecta como se describe en la sección correspondiente.

#### **5.5 Animales**

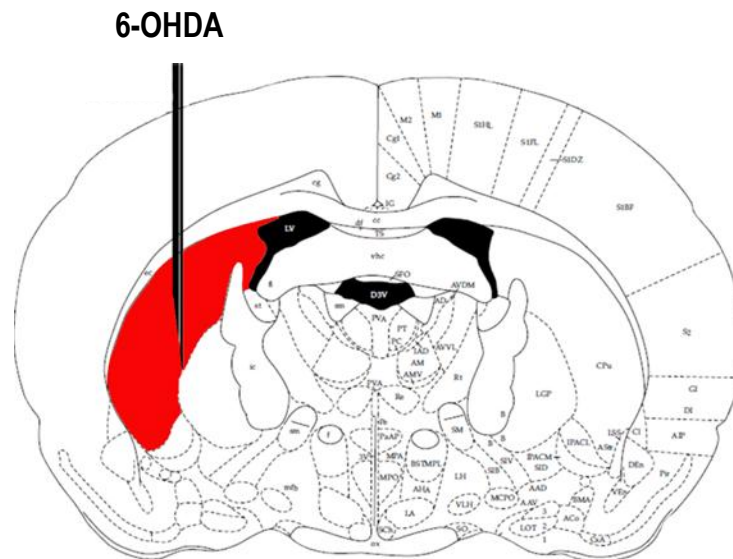
Todos los experimentos se realizaron en ratas Wistar macho adulto criadas y suministradas por la Unidad de Producción de Animales de Laboratorio (UPEAL). Al principio de los experimentos los animales se seleccionaron en un rango de peso de  $220 \pm 10$  g. El protocolo #162-15 fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Cinvestav-IPN (CICUAL), de conformidad con las normas mexicanas vigentes, la NOM-062-ZOO-1999 y NOM-087-ECOL-1995 (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; SAGARPA) y la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council (NRC)*. Se minimizó el sufrimiento (por el uso de anestésicos) y el número de animales. Las ratas fueron criadas en instalaciones específicas del Cinvestav y se mantuvieron en un ambiente de temperatura controlada ( $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) en

ciclos de luz: oscuridad (12:12 h) con comida y agua *ad libitum*. En todos los procedimientos quirúrgicos las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal (i.p.) de ketamina (120 mg / kg) y xilazina (9 mg / kg). Para el caso de los procedimientos donde el roedor tiene que ser sometido a eutanasia, este procedimiento fue realizado de forma bioética (bajo los principios de que el animal no debe experimentar dolor, miedo o cualquier otro tipo de estrés previo a su muerte). La eutanasia se llevó a cabo de acuerdo a la guía *American Veterinarian Medical Association (AVMA) Guidelines for Euthanasia (2013 edition)*, utilizando Pentobarbital Sódico (Pisa Agropecuaria S.A. de C.V.) a una concentración de 150 mg/kg vía intraperitoneal.

## **5.6 Modelo de Lesión con 6-OHDA**

En primer lugar se confirmaron las coordenadas estereotáxicas para la inyección estriatal de la 6-OHDA descritas previamente [77,78] y adaptadas del Atlas de Paxinos [111] utilizando el colorante azul de Evans al 4% en PBS 1X (8.1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4). Las ratas se colocaron en un aparato de cirugía estereotáxica para roedores (Modelo 51600, Stoelting; Wood Dale, IL, USA) con la barra de incisión colocada a una altura de 5.00 mm de la línea interaural. La trepanación se hizo empleando una fresa dental acoplada a un taladro de laboratorio en las siguientes coordenadas: anteroposterior (AP), 7.7 mm de la línea interaural; mediolateral (ML), + 4.0 mm de la sutura interparietal; dorsoventral (DV), -5.4 mm a partir de la duramadre (Figura 9). La denervación dopaminérgica unilateral se indujo mediante la inyección de 3 µL de 6-OHDA (6.67 µg de base libre/µL de PBS con 0.2% de ácido ascórbico) en la parte dorsolateral del cuerpo estriado izquierdo [75] a un flujo de 0.1 µL/min mantenido por una bomba de microperfusión (Stoelting; Wood Dale, IL, USA). Cuando la inyección hubo terminado, la aguja dental empleada (y acoplada al equipo estereotáxico) permaneció en el sitio de las coordenadas durante 10 min para permitir la difusión del

neurotóxico en el cuerpo estriado. Una vez concluido ese tiempo, la aguja fue retirada en pasos intermitentes de 1 mm/min para evitar reflujo de la 6-OHDA. En seguida se ocluyó el trepano con cera para hueso, se suturó la herida con hilo de nylon y se le esparció una mezcla de ketorolaco y gentamicina (en gel y/o crema) para el alivio del dolor y la prevención de infección local. Adicionalmente, todos los animales recibieron monohidrato de Cefalexina a una concentración de 10 mg/kg (i.m.) para prevenir una infección generalizada y fueron puestas en cajas individuales con termoterapia para su recuperación total. Los animales con lesión simulada recibieron 3  $\mu$ L de vehículo solamente. Posteriormente los animales fueron trasladados a la unidad de experimentación del UPEAL, donde reciben el cuidado adecuado por veterinarios especializados en el uso y cuidado de animales de laboratorio.



**Figura 9. Sitio de la inyección de 6-OHDA para la generación del modelo de lesión crónica.** El área roja limita el estriado dorsolateral del hemisferio izquierdo de la ratona donde penetra el haz medial del cerebro anterior que contiene las terminales dopaminérgicas nigroestriatales. Diagrama tomado y modificado del Atlas The Rat Brain, Paxinos & Watson [111] Academic Press 1998.

## 5.7 Inyección de las nanopartículas de NTS-polyplex en la *substantia nigra*

Puesto que la inyección de las nanopartículas de NTS-polyplex se realizó 3 meses después de la inyección de 6-OHDA, las coordenadas estereotáxicas se tuvieron que determinar para ratas de mayor peso (450 - 575 gr) utilizando el colorante azul de Evans a una concentración del 4% en PBS 1X. Las coordenadas para la transfección intranigral fueron: AP, + 2.7 mm de la línea interaural; ML, + 2,2 mm de la línea media; DV, - 6,8 mm a partir de la duramadre (Figura 10). Las nanopartículas de NTS-polyplex conteniendo los diferentes plásmidos utilizados fueron inyectadas en la *substantia nigra* del hemisferio izquierdo con un flujo de 0.1  $\mu\text{L}/\text{min}$  mediante una bomba de microperfusión (Stoelting; Wood Dale, IL, USA). Después de cada cirugía, el trepano y la herida quirúrgica fueron tratados con los procedimientos descritos en el apartado 5.6, al igual que los cuidados postquirúrgicos que recibieron los animales.

### NTS-polyplex-pTracer-mNRTN-His

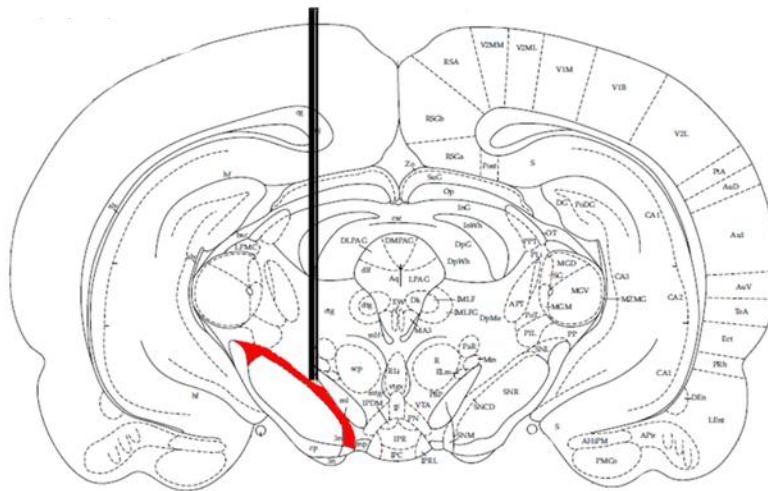


Figura 10. Sitio de la inyección de las nanopartículas del NTS-polyplex en la *substantia nigra*. El área roja limita la *substantia nigra pars compacta* donde radican las neuronas



dopaminérgicas supervivientes a la lesión de 6-OHDA. Diagrama tomado y modificado del Atlas The Rat Brain, Paxinos & Watson, Academic Press 1998.

## **5.8 Conducta rotacional inducida agonistas dopaminérgicos**

La conducta rotacional o de giro es una conducta motora asimétrica inducida por anfetamina (rotación ipsilateral a la lesión) o por apomorfina (rotación contralateral a la lesión) que se realizó tres días antes de la transfección para seleccionar a los animales lesionados y a diferentes tiempos post-transfección (4 y 12 semanas) para demostrar la reducción de las asimetrías motoras en comparación a los controles negativos. Dos días después de la prueba con metanfetamina se realizó la prueba con apomorfina. La dosis de HCl (+)-metanfetamina fue 8 mg/Kg, i.p. (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.) y de sulfato de R-(-) apomorfina fue 0.5 mg/kg, i.p. (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.). En todos los casos, el comportamiento de giro inducido se registró a intervalos de 1 min por un total de 180 min ((+HCl)-metanfetamina) y por 40 min (sulfato de R-(-) apomorfina) utilizando rotómetros automatizados de fabricación propia. El criterio para someter a los animales a transfección fue que exhibieran  $1300 \pm 100$  giros/180 min con HCl (+)-metanfetamina y  $90 \pm 10$  giros/40 min con sulfato de R-(-) apomorfina.

## **5.9 Prueba de asimetría del uso de extremidades ("cilindro")**

Las ratas controles y transfectadas fueron colocadas en un cilindro de acrílico (30 cm de alto por 20 cm de diámetro) transparente de fabricación propia. Los primeros 20 contactos con las patas ipsilaterales, contra-laterales o ambas simultáneamente fueron videograbados para su análisis posterior. El tiempo para generar el número de contactos requerido varía de animal a animal. La puntuación de la asimetría fue calculado como el número de contactos "ipsi" más  $\frac{1}{2}$

del número de contactos con ambas extremidades, dividido por el número total de observaciones (ipsi + contra + ambas), y el cociente multiplicado por 100. La prueba fue desarrollada sin acondicionamiento previo al videograbado. Las pruebas fueron realizadas entre las 10:00 h y las 12:00 h.

### **5.10 Prueba de colocación de la extremidad anterior evocada por vibrisas**

Esta prueba consiste en frotar las vibrisas izquierdas y derechas de la rata contra el borde de una mesa de trabajo para evocar la respuesta de colocación de la extremidad ipsilateral anterior sobre la mesa. El animal se suspende libremente de tal manera que sus extremidades y cola queden libres sin soportar el peso del animal. La respuesta motora normal evocada es un movimiento de alcance preciso y rápido de la extremidad ipsilateral a la vibrisas estimuladas que rápidamente termina cuando la superficie de la pata es colocada en la mesa de trabajo. Los resultados de la colocación de la extremidad en la superficie de la mesa en respuesta a la estimulación de las vibrisas fue expresado como porcentaje de colocación exitosa de diez intentos para cada extremidad (ipsilateral o contralateral) para cada rata, en ensayos marcados como "0", la extremidad no se mueva. La prueba de vibrisas se llevó a cabo sin acondicionamiento previo entre las 11:00 h y las 13:00 h.

### **5.11 Reacción en Cadena de la Polimerasa por Transcriptasa Reversa (RT-PCR)**

Se utilizó RT-PCR para evaluar la expresión de la NRTN-His en la substantia nigra. Las ratas fueron sometidas a eutanasia (ver numeral 5.6.) y el cerebro fue extraído lo más rápidamente posible y colocado en PBS frío. Utilizando un vibratomo Leica SM2010R (Leica Biosystems, Wetlar, Germany), se obtuvieron cortes del mesencéfalo de 100  $\mu\text{m}$  de espesor de donde se disecó la substantia nigra con ayuda de un microscopio estereoscópico Leica con platina de

aluminio adaptada para mantener hielo seco. El tejido disecado fue inmediatamente pasado a un tubo Eppendorf mantenido en hielo seco. Todo el material de laboratorio utilizado para la microdissección y la visualización del RNA (cámaras de electroforesis, bandejas, tubos Eppendorf, etc.) fue sometido previamente a inactivación de RNAsas ya sea por horneado (250 °C toda la noche para el material de vidrio y aquel cuyo punto de fusión sea superior a esta temperatura) y/o por el empleo de una solución inactivadora de RNAsas preparada con 0.1N NaOH/1mM EDTA y posteriormente con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0.05%. El RNA total fue extraído con 1 ml de Trizol (Invitrogen Corporation Carlsbad; CA, EE.UU.) empleando un minihomogenizador portátil y pistilos de tereftalato de polibutileno (VWR International Ltd; Lutterworth, England). Posterior a la adición del cloroformo y separación de las fases por centrifugación, los ácidos nucleicos fueron precipitados con isopropanol, lavados con metanol al 75% y cuantificados a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). Su integridad se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los RNAs obtenidos fueron tratados con DNAsa libre de RNAsas y sometidos a retrotranscripción utilizando 5 µg de RNA total con 200 U/µL de la enzima retrotranscriptasa del sistema SuperScript III® y 50 µM de oligo (dT)20 (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA, USA). Dos µL de cDNA fue amplificado en un termociclador Veriti PCR Thermal Cycler (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) empleando 10 µM de oligonucleótido sentido y anti-sentido (cebadores) y 2 U de Platinum® Taq DNA polimerasa High Fidelity (Invitrogen Life Technologies; San Diego, CA, USA) en un volumen total de 50 µL de reacción. Para la amplificación del fragmento de 176 pb de la NRTN-His (GenBank, NM\_008738.2) se emplearon los cebadores 5'-GCCTATGAGGACGAGGTGTC-3' Sentido y 5'-AGACCGAGGAGAGGGTTAGG-3' Anti-sentido. Para la amplificación de la β-actina, control

interno (GenBank, NM\_031144.3), los cebadores fueron 5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAA-3' Sentido y 5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3' Anti-sentido. Las condiciones del termociclado fueron: un paso de desnaturalización a 94 °C por 5 min y 40 ciclos para la amplificación del fragmento de la NRTN-His y 25 ciclos para  $\beta$ -actina. Cada ciclo consistió en un paso de desnaturalización (94 °C por 30 s), emparejamiento (50 °C para la NRTN-His y 60 °C para la  $\beta$ -actina, por 30 s) y un paso de extensión (72 °C por 30 s); al finalizar los ciclos se realizó un último paso de extensión (72 °C por 7 min). Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% empleando una cámara de electroforesis horizontal (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules CA, USA), buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) y un potencial de campo de 80 voltios. Al término de ésta, el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (BrEt, 0.5  $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA ) por 30 min, para la visualización de las bandas del producto del cDNA amplificado. Finalmente, se fotografió el gel utilizando un sistema fotodocumentador UVP BioDoc-It 220 Imaging system (Ultra-Violet Products Ltd, Upland, CA, USA) con transiluminador UV (302 nm) y filtro de emisión para BrEt (254 nm).

### **5.12 Cuantificación de NRTN-His por Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)**

La NRTN-His se cuantificó en el estriado y la substantia nigra utilizando el kit de ELISA competitivo para la detección de proteínas que contengan His en el extremo C o N (His Tag Protein ELISA kit AKR-130, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA). Las muestras de tejido obtenidas en frío se homogeneizaron con un minihomogenizador portátil y pistilos de tereftalato de polibutileno (VWR International Ltd; Lutterworth, England) en buffer RIPA conteniendo 1% NP40, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5% deoxicolato de sodio, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo y un coctel de inhibidores de proteasas

(Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany). Para normalizar la concentración de NRTN-His, el contenido de proteína total de las muestras de los núcleos aislados fue cuantificado usando el kit Pierce Microplate BCA Protein Assay y albumina sérica bovina (BSA) como estándar (Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL, USA). Para la cuantificación de NRTN-His y de proteínas se siguieron las instrucciones del fabricante del producto. Una vez completado el proceso del inmunoensayo, la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro para placas de multipozos con a la longitud de onda de 450 nm (lectura a punto final) y procesada por el software Microplate Manager 6 (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, CA, USA). La concentración de la NRTN-His se expresó en ng/mg.

### **5.13 Inmunotinciones**

Las ratas fueron anestesiadas con Pentobarbital Sódico (50 mg/kg i.p.) y perfundidas a través del ventrículo izquierdo ocluyendo la aorta descendente con 100 a 150 mL de PBS frío empleando una bomba peristáltica Manostat® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La correcta perfusión cerebral se corrobora por la palidez de las orejas y nariz del animal. Posteriormente se procede a perfundir 100 – 150 mL de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS evitando la generación de burbujas en el cambio de las soluciones en las mangueras del sistema de perfusión. Se extrae el cerebro y se mantiene en PFA al 4% durante 24 h a 4 °C y a continuación en una solución de sacarosa al 30% en PBS 1 a 4 °C durante 48-72 h en agitación lenta (hasta la completa precipitación de los cerebros en sus recipientes). Los cerebros fueron cortados con micrótopo de deslizamiento Leica SM2010R (Leica Biosystems; Wetzlar, Germany) en cortes coronales de 30 µm de espesor y colocados en pozos de cajas de 24 pozos, conteniendo PBS o PBS con 0.05% azida de sodio cuando se ameritaba largo tiempo de almacenamiento. Las rebanadas fueron permeabilizadas con 0.1% de Triton X-100 en PBS

durante 60 min a temperatura ambiente. Los sitios inespecíficos se bloquearon con suero de caballo al 10% disuelto en PBS con 0.1% de Triton X-100 durante 1 h a temperatura ambiente.

### **5.13.1 Ensayos de Inmunofluorescencia**

Se utilizó inmunofluorescencia triple para demostrar la expresión transgénica de la NRTN-His y la proteína GFP en las neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra transfectadas con el plásmido pTracer-mNRTN-V5-His. Se utilizó inmunofluorescencia doble para demostrar la colocalización del NTSR1 y  $\beta$ -III tubulina con la inmunorreactividad a TH en células y terminales nerviosas utilizando la técnica de incubación de los anticuerpos con las rebanadas en flotación (ya sea en las cajas de multipozos o en tubos cónicos de 2.0 mL). Después del bloqueo de los sitios inespecíficos, los cortes se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: (1) anti-TH policlonal hecho en cabra (1: 500; Abcam; Cambridge, MA, EE. UU.), (2) anti-GFP policlonal hecho conejo (1: 500; Chemicon; Temecula, CA, EE. UU.), (3) anti -His monoclonal hecho en ratón (1: 250; Invitrogen Molecular Probes; Eugene, Oregon, EE. UU.), (4) anti- $\beta$ -III-tubulina policlonal hecho en conejo (1: 300; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.), (5 ) anti-TH monoclonal hecho en ratón (1: 1000; SigmaAldrich; St. Louis, MO, EE. UU.), (6) anti-NTSR1 policlonal hecho en cabra (1:50; Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas TX, EE. UU.). Después de los lavados con PBS, los cortes se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios apropiados. Los anticuerpos secundarios fueron del isotipo IgG (1) anti-cabra Alexa-350 hecho en burro (1: 300; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) o (2) anti-cabra-AMCA hecho en burro (1:60;; Jackson ImmunoResearch; Palo Alto, CA, EUA), (3) anti-conejo FITC hecho en burro (1:60; Jackson ImmunoResearch, Palo Alto, CA, EUA), (4) anti-ratón Texas-Red hecho en caballo (1: 100; Vector Labs; Burlingame, CA , EE. UU.), (5) anti-conejo Texas-Red hecho en cabra (1: 100; Vector Labs; Burlingame, CA, EE.

UU.), (6) anti-ratón Alexa 488 hecho en pollo (1: 200; Invitrogen Molecular Probes; Eugene, Oregon, EE. UU.), (7) anti-cabra Alexa 488 hecho en burro (1: 400; Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.). Finalmente, las rebanadas se lavaron con PBS y se montaron en portaobjetos de vidrio utilizando el protector de fluorescencia VECTASHIELD (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA). La fluorescencia se observó con un microscopio Leica DMIRE2 con los objetivos de 5X, 20X y 40X, y los filtros K3 para FITC y AMCA, TX2 para Texas-Red, K3 para FITC y Alexa 488. Las imágenes fueron digitalizadas con una cámara Leica DC300F (Leica Microsystems; Wetzlar, Germany). Los controles negativos se obtuvieron mediante la omisión del anticuerpo primario y/o por sustitución de un anticuerpo irrelevante de la misma subclase IgG o usando el lado contralateral de la substantia nigra sin transfección.

### **5.13.2 Ensayo de inmunohistoquímica**

La tinción inmunohistoquímica se llevó a cabo en cortes coronales por la técnica de flotación. Posterior a la permeabilización, los cortes fueron lavados en PBS y se incubaron en 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS durante 30 min para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. En seguida, los cortes fueron incubados con un anticuerpo monoclonal anti-TH hecho en ratón (dilución 1:1000; Chemicon; Temecula, CA, USA) durante 24 horas a 4 °C, después los cortes se lavaron durante 30 min con PBS conteniendo 0.1% de Triton X-100. En seguida, los cortes fueron incubados por 2 h a temperatura ambiente y en completa oscuridad con el anticuerpo secundario IgG biotinilado anti-ratón (dilución 1:200; Vector Labs; Burlingame, CA, USA). El color se desarrolló usando el kit ABC y la 3'3-diaminobenzidina (DAB) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Vector Laboratory; Burlingame, CA, EE. UU.). Las secciones se montaron en portaobjetos de vidrio usando Entellan (Merck KGaA; Darmstadt, Alemania). La tinción inmunohistoquímica se analizó en campo claro con un microscopio Leica DMIRE2 a

diferentes objetivos (1.6X, 5X y 20X) y las imágenes fueron digitalizadas con una cámara Leica DC300F (Nussloch, Alemania) con balance de blancos.

#### **5.14 conteo neuronal y análisis densitométrico**

El software ImageJ v.1.46r (National Institutes of Health; Bethesda, MD, USA) con los respectivos “plugins” fue utilizado para el conteo de neuronas TH+ y la determinación del área de densidad total de las fibras TH+ en las micrografías de la inmunohistoquímica en la *substantia nigra* y en el núcleo estriado. Toda la intensidad de fondo fue eliminada de la tinción inmunohistoquímica para solo cuantificar la inmunorreactividad a TH. También se utilizó el mismo software para el conteo de neuronas TH+ transfectadas que expresan NRTN-His y GFP en las microfotografías de inmunofluorescencia triple y la densidad de fluorescencia de TH y NTSR1 o  $\beta$ -III-tubulina en las microfotografías de inmunofluorescencia doble. Las cuantificaciones en todas las variables evaluadas se realizaron en cortes de al menos 5 niveles anatómicos de la *substantia nigra* y del núcleo estriado; se emplearon 3 animales por cada grupo o condición experimental.

#### **5.15 Cuantificación del contenido de dopamina**

Se utilizó cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) de fase reversa selectivamente iónica y detección electroquímica para cuantificar el contenido de dopamina en la *substantia nigra* y el cuerpo estriado como se describió previamente [82,112]. Los tejidos se homogeneizaron en 0.1 M de HClO<sub>4</sub> conteniendo 0.2 mM de ácido ascórbico y 50  $\mu$ g/mL de 3, 4-dihidroxibencilamina hidrobromada, como estándar interno, a una dilución peso:volumen 1:5 (*substantia nigra*) y 1:10 (cuerpo estriado). Los homogeneizados posteriormente fueron colocados en microtubos de polietileno con capacidad máxima de 175  $\mu$ L y ultracentrifugados en una centrífuga Airfuge



(Beckman Coulter, Inc.; Brea, CA, USA) a 15 PSI (~90,000 rpm) por 5 min. La homogenización y el manejo de los sobrenadantes se hicieron en frío. Los sobrenadantes fueron filtrados en membranas PVDF de 0.20  $\mu\text{m}$  tipo cartucho para microtubos de 2.0 mL (AMD Millipore, Fisher Scientific Ltd., Loughborough UK) por centrifugación en una centrifuga Biofuge Fresco (Heraeus Instruments;, Hanau, Germany) a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C. De los sobrenadantes obtenidos se inyectan 5  $\mu\text{L}$  con ayuda de un válvula Rheodyne (Modelo 7125) a una columna de fase reversa RP-18 Velosep (3  $\mu\text{m}$ , 100 x 3.2 mm; PerkinElmer; Waltham, MA, USA) calentada a 30.5 °C. Un litro de fase móvil fue formada por una parte iónica (25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 50 mM citrato de sodio, 0.03 mM EDTA, 10 mM dietilamina HCl, 2.2 mM de ácido octilsulfónico/sal de sodio; pH 3.2) y suplementada con 30 mL de metanol y 22 mL de dimetilacetamida. Se utilizó un sistema HPLC BAS PM-80 con sistema de desgasificador por vacío (Bioanalytical Systems; West Lafayette, IN, USA) para proveer la fase móvil en la modalidad isocrática a un flujo de 0.5 mL/min. El potencial de oxidación del electrodo carbón-vítreo fue ajustado por el detector electroquímico LC-4C a +75 V con respecto al electrodo de referencia de Ag/AgCl RE-6 (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA). Fueron empleados los software ChromGraph 2.34.00 para la obtención de los cromatogramas y el Report 2.30 para el análisis de los mismos (Bioanalytical Systems; West Lafayette, IN, USA). Las pastillas obtenidas de la ultracentrifugación fueron resuspendidas en 120  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 M para cuantificar el contenido total de proteína empleando el kit Coomassie Plus (Pierce Biotechnology; Rockford, IL, USA) y BSA como estándar siguiendo las instrucciones del fabricante. El contenido de dopamina fue expresado como pg DA/ $\mu\text{g}$  de proteína.

## 5.16 Evaluación de las espinas dendríticas en el núcleo estriado

Para determinar el efecto postsináptico de la expresión de la NRTN-His, se evaluó la arborización dendrítica de las MSNs mediante el análisis de Sholl así como la densidad y el tipo de espinas dendríticas en un segmento de 50  $\mu\text{m}$  de la dendrita primaria. Las ratas anestesiadas con una mezcla de ketamina (30 mg/kg, i.m.) y pentobarbital de sodio (50 mg/kg i.p.) fueron perfundidas vía intracardiaca con 200 mL de PBS (8.1 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM, NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4) conteniendo heparina sódica (1000 UI/L) como anticoagulante y procaína hidrociorada (1 g/L) como vasodilatador. Subsecuentemente se perfundieron 200 mL de la solución fijadora basada en paraformaldehído al 4% en PBS [113]. El flujo de perfusión fue 11.5 mL/min empleando una bomba peristáltica Manostat® (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). Los cerebros de las ratas fueron removidos y mantenidos por al menos 48 h en 100 mL de solución fijadora fresca. Posteriormente, el estriado dorsal bilateral se diseccionó e impregnó con una versión modificada de la técnica de Golgi [114]. Seis MSNs se analizaron por rata en cada grupo (n = 6 ratas independientes en cada condición experimental). La arborización dendrítica de los MSN se evaluó mediante el análisis de Sholl [115]. Esto refleja la complejidad del árbol dendrítico determinando el número de intersecciones de las dendritas enteras con círculos concéntricos comenzando desde el centro del soma de la célula. En nuestro análisis, establecimos la distancia entre los círculos de Sholl a 10  $\mu\text{m}$ . Además, las espinas dendríticas se contaron en un segmento de 50  $\mu\text{m}$  a partir de una dendrita primaria de cada una de las seis neuronas estudiadas por rata. La densidad y la proporción de espinas delgadas, hongo, cortas y anchas también se determinaron de acuerdo con criterios previamente establecidos [116-119]. El conteo se realizó por observación directa a 2,000x

utilizando un cambiador de aumento acoplado a un microscopio óptico con un objetivo 100x APO y un analizador de imágenes (LAS 4.0).

### **5.17 Análisis estadístico**

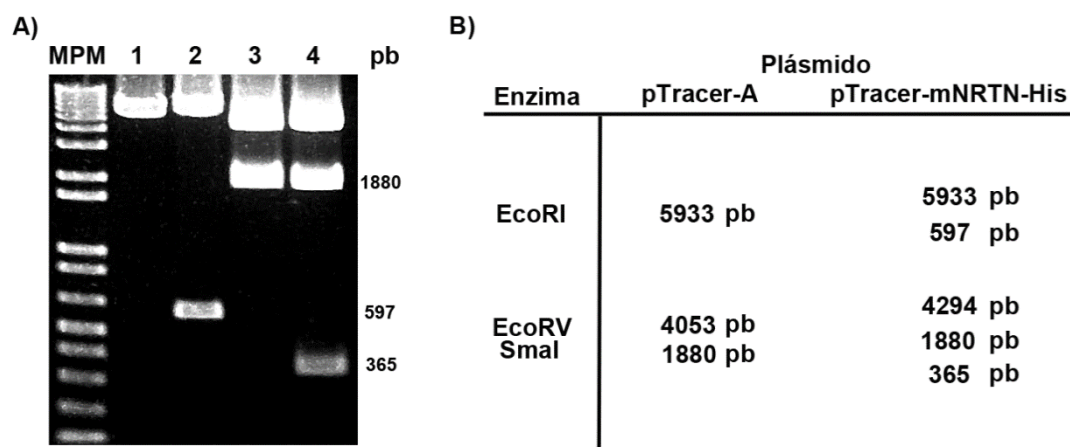
Todos los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (S.E.M), obtenidos en al menos 3 experimentos independientes ( $n = 3$ ). La diferencia entre los grupos fue analizada con un Análisis de Varianza (ANOVA unifactorial o una vía), con una corrección de Newman-Keuls o Tukey. El análisis ANOVA bifactorial (o de dos vías) y con corrección de Bonferroni fueron utilizadas para analizar las diferencias entre los grupos en los ensayos de doble Inmunofluorescencia para el receptor de alta afinidad de Neurotensina (NTSR1) y la enzima tirosina hidroxilasa (TH). La arborización dendrítica y la densidad de espinas fueron analizadas empleando una ANOVA unifactorial y una corrección de Tukey. La densidad relativa proporcional de cada tipo de espina fue promediada por rata y los promedios fueron analizados por grupo usando ANOVA unifactorial y una corrección de Bonferroni. Para todas las pruebas se estableció una significancia de  $P < 0.05$ . En todos los casos fue empleado el software Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA) para realizar los análisis estadísticos.

## **6. Resultados**

### **6.1. Construcción correcta del plásmido pTracer-mNRTN-His**

Nuestro primer objetivo fue incluir una etiqueta o bandera en el extremo carboxilo de la mNRTN (ratón) para distinguirla de la NRTN endógena (rata), para mantener la función biológica y para lograr una expresión eficiente y prolongada en neuronas supervivientes a la lesión. La subclonación de la secuencia codificante de mNRTN en el vector pTracer<sup>TM</sup>-EF/V5-His-A

permitió cumplir con ese objetivo. En este apartado demostramos la orientación correcta del transgén en el marco de lectura y la exactitud del orden de los nucleótidos en la secuencia de NRTN-His. Tal como lo predice el mapa de restricción (Figura 7), la digestión con la enzimas EcoRI originó un fragmento de 5,933 pb por la linealización del pTracer<sup>TM</sup>-EF/V5-His A vacío (Figura 11B) y dos fragmentos (597 y 5,933 pb) en el pTracer-mNRTN-His (Figura 11B). En tanto que la digestión con el par de enzimas EcoRV y SmaI produjo dos fragmentos en el pTracer<sup>TM</sup>-EF/V5-His-A vacío (1880 y 4053 pb) y tres fragmentos (365, 1880 y 4294 pb) en el pTracer<sup>TM</sup>-EF/V5-His A vacío (Figura 11A). Los tamaños de los fragmentos concuerdan con los pronosticados por el análisis bioinformático con el software NT-vector (Figura 11B).



**Figura 11. Ensayo de restricción para verificar la orientación correcta de la mNRTN-His en el pTracer-mNRTN-His. A)** Fotografía del gel de agarosa que muestra los fragmentos obtenidos de los plásmidos pTracer-A vacío (carriles 1 y 3) y pTracer-mNRTN-His (carriles 2 y 4) después de la digestión con las enzimas mencionadas arriba del gel. **B)** Tamaños de los fragmentos predichos por el análisis bioinformático con el software NT-Vector para ambos plásmidos.

El resultado de la secuenciación de pTracer-mNRTN-His utilizando el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mostró que la cantidad y el orden de los oligonucleótidos (Figura 12, secuencias en color verde y rosa) coinciden con la secuencia de ratón NP\_032764.1 reportada por el Centro Nacional para la Información (NCBI; por sus siglas en inglés), con excepción de una mutación en C por T en un codón GGC (Figura 12, codón subrayado). Esta mutación también lo encontramos en la secuencia original de mNRTN en el plásmido pcDNA3-mNRTN de donde partimos para su clonación en el plásmido pTracer-A. Sin embargo, el codón mutado GGT es homólogo y codifica para glicina (Gly) al igual que el codón natural GGC (Figura 12), por lo que la secuencia proteica es correcta y completa.



**Figura 12. Resultados de la secuenciación del pTracer-mNRTN-His por el protocolo BigDye®.** En la secuencia aparece el promotor hEF-1 $\alpha$ , el transgén completo y la fusión obtenida con el epítipo V5 y la etiqueta His. El codón mutado se presenta en rojo subrayado. Se empleó el software NT-Vector (Thermo Fisher Scientific).

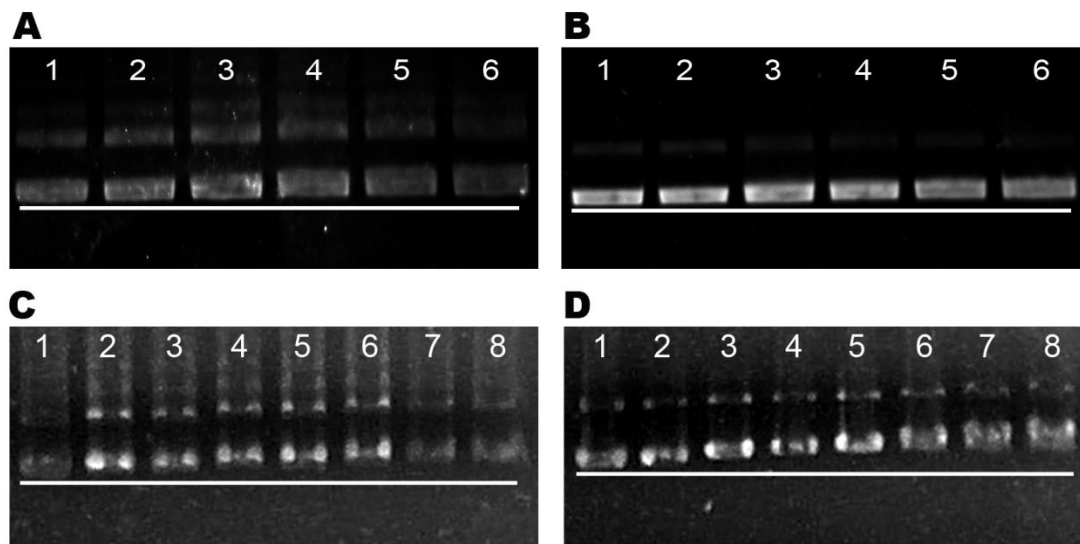
## **6.2. La interacción electrostática de los componentes del NTS-poliplex a la relación molar óptima forma nanopartículas**

Utilizamos el criterio de retardo y retención electroforética en gel de agarosa para calcular la relación molar óptima para el correcto ensamblaje de los componentes de NTS-poliplex en nanopartículas funcionales [78,84] con los plásmidos pTracer-mNRTN-His y pGreenLantern-1 (Tabla 1). Esta relación fue utilizada en los ensayos de transfección *in vitro*. Para la transfección *in vivo*, la relación utilizada fue 30 nM de pDNA: 30  $\mu$ M KP: 810 nM vector-NTS para los dos plásmidos. En esta relación molar, la concentración de NTS utilizada fue de 385.6 pmol/ $\mu$ L considerando las mediciones con 125I-NTS previamente publicadas [35, 37-39]. Las concentraciones de pTracer-mNRTN-His fue 129.01 ng/ $\mu$ L y 99.59 ng /  $\mu$ L de pGreenLantern-1.

**Tabla 1. Concentraciones óptimas de los componentes que conforman las nanopartículas del NTS-poliplex.**

Componente	Plásmidos	
	pTracer-mNRTN-His	pGreenLantern-1
pDNA	6 nM	6 nM
PC	6 $\mu$ M	6 $\mu$ M
Vector-NTS	162 nM	162 nM

pDNA = DNA plasmídico; PC = péptido carfiófilico; vector-NTS = conjugado de neurotensina y péptido fusogénico con poli-L-lisina.

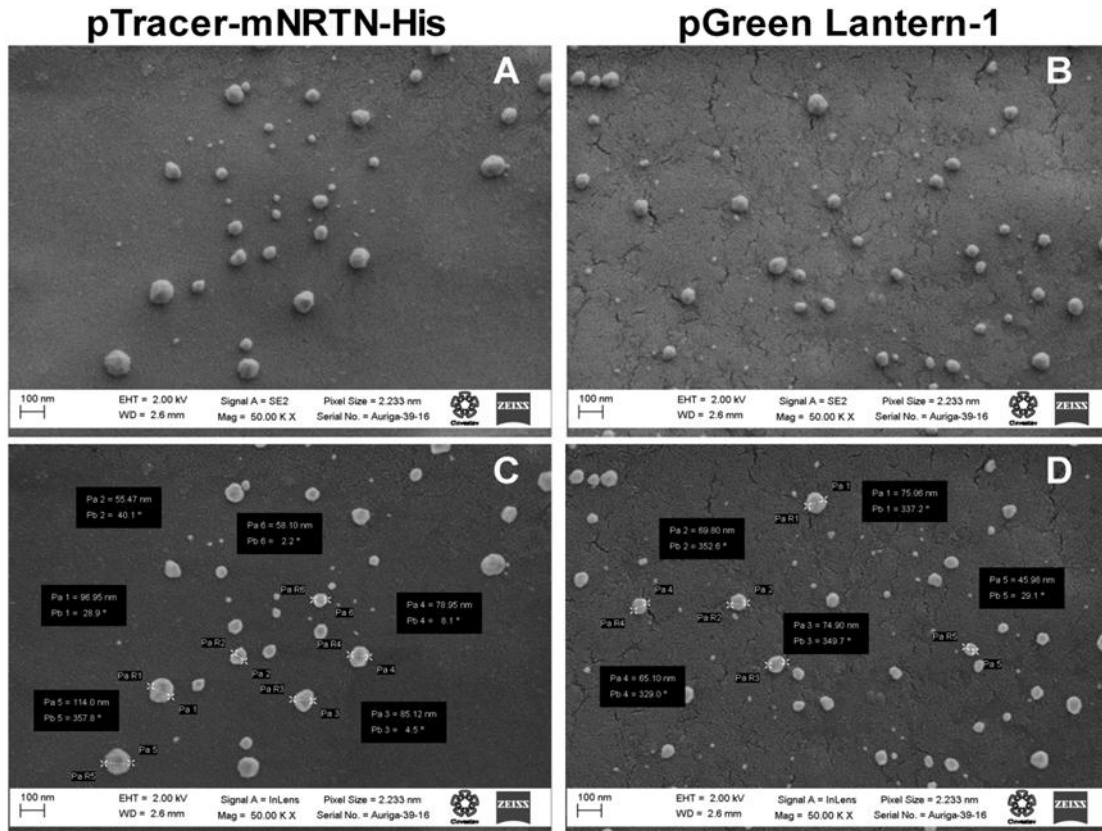


**Figura 13. Gel de retardo y retención. A)** Retardo del plásmido pGreen Lantern-1. **B)** Retardo del plásmido pTracer-mNRTN.His. **C)** Retención del plásmido pGreen Lantern-1. **D)** Retención del plásmido pTracer-mNRTN.His. Para **A** y **B** se empleó una concentración fija de 6 nM de pDNA y concentraciones crecientes de PC. Carril 1: pDNA, 2: 1  $\mu$ M, 3: 3  $\mu$ M, 4: 6  $\mu$ M, 5: 9  $\mu$ M, 6: 12  $\mu$ M. Para **C** y **D** se empleó una concentración fija de 6 nM de pDNA y 6  $\mu$ M de PC; y concentraciones crecientes del vector-NTS. Carril 1: pDNA, 2: 54 nM, 3: 72 nM, 4: 90 nM, 5: 108 nM, 6: 126 nM, 7: 144 nM, 8: 162 nM.

El análisis de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo mostró la formación de las nanopartículas como resultado de la compactación de los plásmidos pTracer-mNRTN-His y pGreen Lantern-1 por la interacción electrostática con el PC y el vector-NTS (Figura 14). Por esta técnica de observación las nanopartículas aparecen con forma esférica cuyo diámetro oscilan desde los 45 a los 114 nm (Figura 14). De acuerdo a reportes previos, este tamaño de



nanopartículas produce transfecciones eficientes en células que expresan el receptor NTSR1 [78,86,120,121].

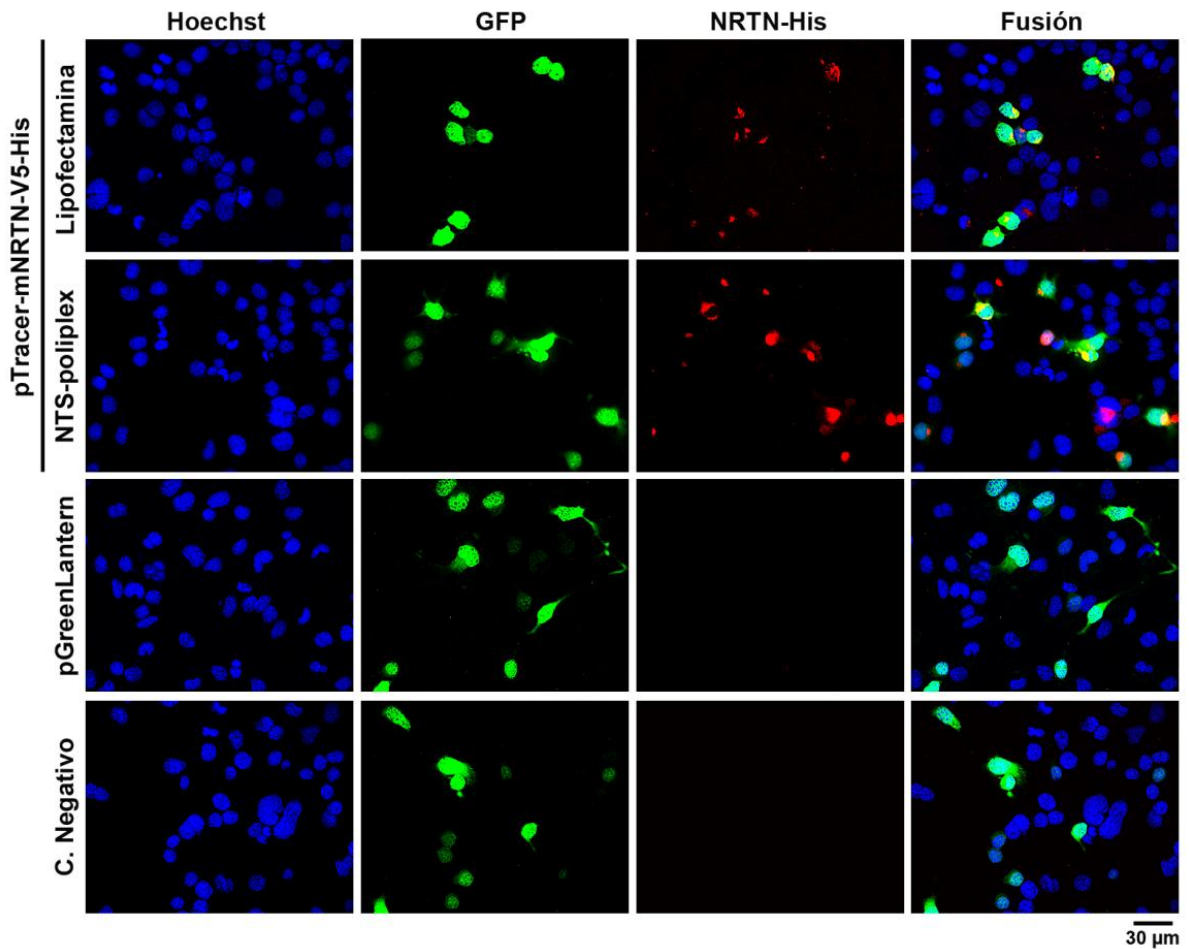


**Figura 14. Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM).** Fotografías de las nanopartículas de NTS-poliplex conteniendo el plásmido pTracer-mNRTN-His (A) y las nanopartículas control de NTS-poliplex con el plásmido pGreenLantern-1 (B) con una magnitud 50,000X. Análisis comparativo de los tamaños de las nanopartículas formadas con los plásmidos pTracer-mNRTN-His (C) y pGreenLantern-1 (D). Barra de calibración = 100 nm.

### 6.3. Actividad transcripcional del pTracer-mNRTN-His in vitro

La línea celular N1E-115 de neuroblastoma murino representa una herramienta invaluable para demostrar la funcionalidad de los transgenes transferidos por las nanopartículas de NTS-

poliplex por sobre-expresar el NTSR1 [78,80,83,84,86,122]. En consecuencia, la incubación de las células N1E-115 con las nanopartículas de NTS-poliplex con el pTracer-mNRTN-His ocasionó la expresión de GFP y NRTN-His (Figura 15). Aunque el patrón de expresión fue diferente, hubo un gran porcentaje de coincidencia de ambas proteínas en las células (Figura 15) demostrando que el plásmido construido es funcional para la expresión simultánea de la proteína reportera, GFP y el transgén de interés, NRTN-His. Resultados semejantes fueron obtenidos cuando el plásmido pTracer-mNRTN-His se transfectó con lipofectamia (Figura 15). Es posible que la marca intracelular de NRTN-His esté disminuida en comparación con la de GFP porque la NRTN pudiera estarse liberando. Como era de esperarse, sólo la expresión de la GFP se produjo con la transfección con lipofectamina del plásmido pGreenLantern-1, control positivo para GFP, y del plásmido pTracer-A vacío (sin el transgén mNRTN) (Figura 3).



**Figura 15. Co-expresión de NRTN-His y GFP en células N1E-115 transfectadas con el plásmido pTracer-mNRTN-V5-His.** La expresión de GFP fue observada a través de su fluorescencia natural. La expresión de NRTN-His se detectó por inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo monoclonal anti-His de ratón e IgG anti-ratón Texas-Red de caballo. pGreenLantern-1 es el control positivo para la expresión de GFP. C.Negativo = transfección con el plásmido comercial pTracer-A vacío, sin el transgén NRTN. Barra de calibración = 30  $\mu$ m (común para todas las micrografías).

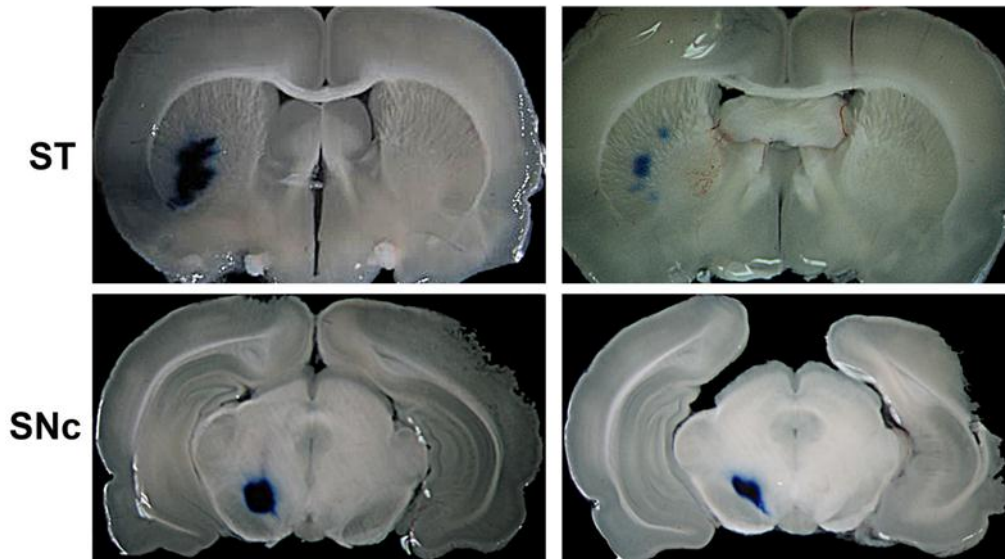
#### 6.4. Determinación del sitio de lesión en el estriado y de la transfección en la *substantia nigra*

La cirugía estereotáxica está estandarizada en nuestro laboratorio para microadministraciones de fármacos en el núcleo estriado y en la *substantia nigra* de ratas de  $220 \pm 10$  gr de peso corporal. Fue necesario confirmar el sitio de la microinyección de 6-OHDA en el estriado de ratas del peso mencionado y determinar las coordenadas de microinyección de las nanopartículas en la *substantia nigra* de ratas de mayor peso ( $450 \pm 50$  g) que tendrían a las 12 semanas después de la lesión. La administración de 2  $\mu$ L del colorante azul de metileno al 4% permitió determinar las coordenadas (Tabla 2) y el área de difusión en el núcleo de interés (Figura 16).

**Tabla 2. Coordenadas estereotáxicas para la administración de 6-OHDA en el núcleo estriado y de las nanopartículas de NTS-poliplex en la *substantia nigra*.**

	Peso corporal $220 \pm 10$ gr	Peso corporal $450 \pm 50$ gr
Coordenada	Cuerpo estriado	<i>Substantia nigra</i>
Anteroposterior (AP)	7.7 mm	+ 2.7 mm
Mediolateral (ML)	+ 4.0 mm	+ 2.2 mm
Dorsoventral (DV)	- 5.4 mm	- 6.8 mm

AP, a partir de la línea interaural; ML, a partir de la sutura interparietal; DV, a partir de la duramadre.

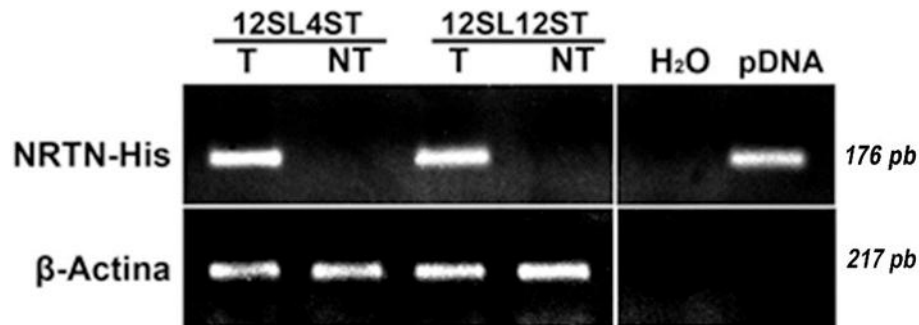


**Figura 16. Sitios de la microinyección de sustancias por cirugía estereotáxica.** Imágenes representativas de cortes coronales de 200  $\mu\text{m}$  de espesor del telencéfalo y mesencéfalo demostrando la localización del azul de metileno en el cuerpo estriado (ST) y la *substantia nigra* compacta (SNc). Las dos fotografías a diferente nivel muestran la difusión del colorante en el núcleo respectivo.

### **6.5. Expresión de NRTN-His en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra***

La transfección intranigral de las nanopartículas de NTS-poliplex conteniendo el plásmido pTracer-mNRTN-His en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* se demostró por tres técnicas independientes: RT-PCR, triple inmunofluorescencia indirecta y ELISA.

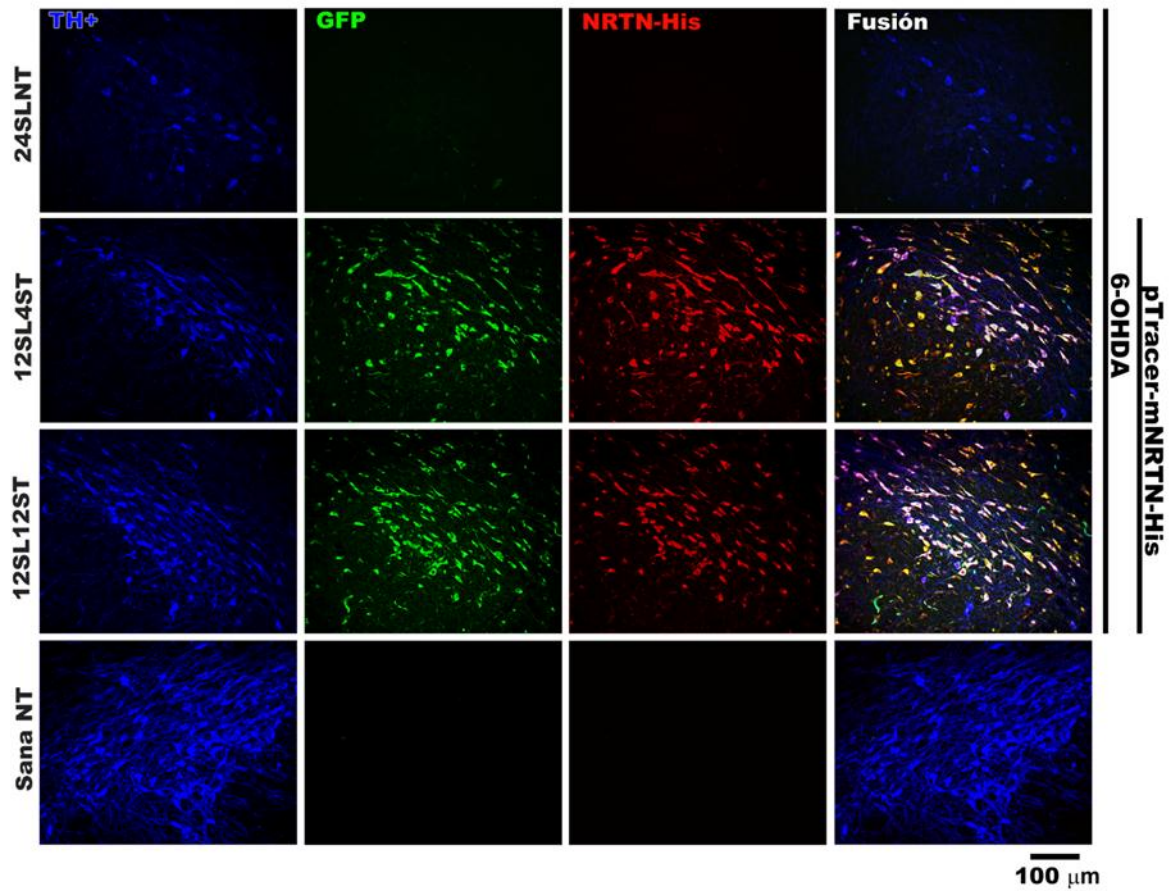
Los ensayos de RT-PCR detectaron el mRNA para NRTN-His en la *substantia nigra* a las 4 y 12 semanas después de la transfección del plásmido pTracer-mNRTN-His en ratas con lesión crónica, pero no en la *substantia nigra* contralateral no transfectada (Figura 17).



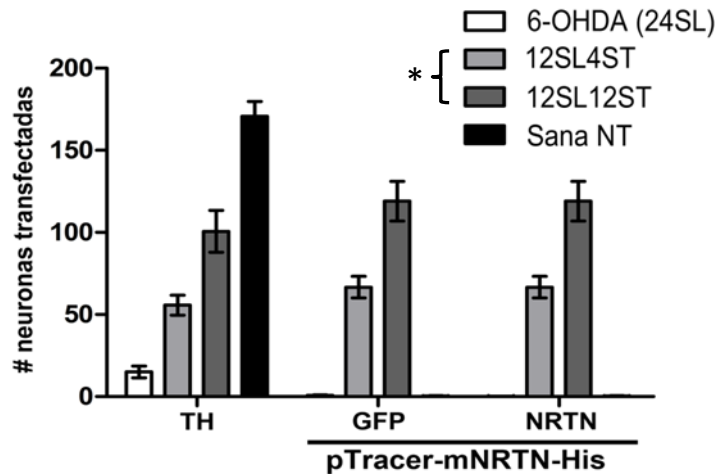
**Figura 17. Expresión del mRNA para la NRTN-His en la *substantia nigra* con lesión crónica y transfectada con el plásmido pTracer-mNRTN-His.** Fotografía representativa de un gel de agarosa que muestra los amplicones para NRTN-His y β-actina (control interno) después de un ensayo de RT-PCR. Los controles del procedimiento fueron ausencia (H<sub>2</sub>O) y en presencia de pTracer-mNRTN-His (pDNA). 12SL4ST =12 semanas de lesión y 4 semanas de transfección. 12SL12ST =12 semanas de lesión y 12 semanas de transfección. T = transfectado. NT =no transfectado.

Los ensayos de inmunofluorescencia triple mostraron la expresión de NRTN-His y GFP en células TH(+) de la *substantia nigra* después de la transfección de pTracer-mNRTN-His (Figura 18). No se observó inmunorreactividad de la NRTN-His y GFP en ratas no transfectadas tanto lesionadas como controles sanos (Figura 6). Los estudios de cuantificación mostraron un aumento en la expresión transgénica asociado a la recuperación del número de células TH(+) (Figura 19). Además, este análisis demuestra que al final del estudio persiste un 15% de neuronas al daño crónico con 6-OHDA (24SL), indicando que en este modelo de lesión crónica no acontece recuperación espontánea del sistema dopaminérgico nigroestriatal (Figura 19). Por lo tanto, podemos sugerir que el incremento de las células TH(+) es debido a la expresión de la

NRTN-His. Estos resultados demuestran, además, que las nanopartículas de NTS-políplex pueden transfectar a las neuronas dopaminérgicas residuales en el modelo crónico de 6-OHDA.



**Figura 18. Expresión transgénica en las neuronas dopaminérgicas de la SNc de ratas con lesión crónica después de la transfección del plásmido pTracer-mNRTN-His.** Micrografías representativas de ensayos de inmunofluorescencia triple contra TH, la enzima limitante en la síntesis de dopamina [123], proteína fluorescente verde (GFP) y el epítipo His (NRTN-His). 12SL12ST =12 semanas de lesión y 12 semanas de transfección. 24SL = 24 semanas de lesión. 6-OHDA = lesión con este neurotóxico. NT = no transfectado. Barra de calibración = 100 μm y es común para todas las micrografías.



**Figura 19. Conteo del número de neuronas que expresan NRTN-His y GFP posterior a la transfección intranigral del plásmido pTracer-mNRTN-His.** 12SL12ST =12 semanas de lesión y 12 semanas de transfección. 24SL = 24 semanas de lesión. 6-OHDA = lesión con este neurotóxico. NT = no transfectado. Todos los valores se representan como la media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM).  $n = 3$  ratas independientes para cada condición experimental. Para la identificación de diferencias significativas fue ejecutada una ANOVA bifactorial y un análisis Bonferroni como prueba *post hoc*. El análisis de los grupos transfectados 12SL4ST vs 12SL12ST,  $*P < 0.001$  para los 3 marcadores evaluados TH, GFP y NRTN.

Los ensayos de cuantificación mediante ELISA mostraron que la proteína NRTN-His estuvo presente tanto en la *substantia nigra* como en el cuerpo estriado, principal blanco de inervación de las neuronas dopaminérgicas nigrales. Los niveles de proteína en la *substantia nigra* fueron aproximadamente 1.5 veces mayor que en el cuerpo estriado cuando se compararon al mismo tiempo de transfección (Tabla 3). En ausencia de transfección o en la transfección del plásmido pGreenLantern-1, los niveles de proteína NRTN-His no se detectaron en los núcleos estudiados (Tabla 3).



**Tabla 3. Niveles NRTN-His medidos con ELISA en ratas lesionadas crónicamente y transfectadas con el pTracer-mNRTN-His.**

Experimento	NRTN-His (ng/mg proteína total)	
	Substantia nigra	Cuerpo estriado
6-OHDA 24SLNT	ND	ND
12SL4SNRTN	8.866 ± 1.962 §	4.566 ± 0.946
12SL12SNRTN	23.550 ± 4.125 *.§	16.274 ± 1.997 *
6-OHDA GFP	ND	ND
SANA	ND	ND

6-OHDA 24SLNT = Ratas sin transfectar con 24 semanas de lesión por 6-OHDA. 12SL4SNRTN = 12 semanas posterior a la lesión y 4 semanas posterior a la transfección con el plásmido pTracer-mNRTN-His. 12SL12SNRTN = 12 semanas posteriores a la lesión y 12 semanas posteriores a la transfección con el plásmido pTracer-mNRTN-His. 6-OHDA GFP = 12 semanas posterior a la lesión y 12 semanas posterior a la transfección con el plásmido control pGreenLantern-1. ND = No detectable. Todos los valores se representan como la media ± Error Estándar de la Media (SEM). n = 3 ratas independientes para cada condición experimental. \*P < 0.05 cuando fue comparado 12SL4SNRTN en el mismo núcleo. §P < 0.05 cuando fue comparado con el Estriado al mismo tiempo posterior a la transfección. Para la identificación de diferencias estadísticas se ejecutó un ANOVA unifactorial y un análisis de Tukey como prueba *post hoc*.

## **6.6. Restauración del fenotipo dopaminérgico en el sistema nigroestriatal**

La lesión crónica con el neurotóxico 6-OHDA ocasionó una pérdida de la población celular TH(+) (Figuras 20A y B) y de sus ramificaciones en la *substantia nigra* (Figuras 20A y C) que fue de 88% y 94%, respectivamente, al final del estudio (24 semanas de lesión). Efecto similar

ocurrió en la densidad de las fibras TH(+) en el cuerpo estriado (Figura 21A) donde la disminución fue del 92% (Figura 21B). La transfección del plásmido irrelevante pGreenLantern-1 no modificó la pérdida neuronal ni el decremento de sus ramificaciones en la *substantia nigra* y el cuerpo estriado (Figuras 20 y 21), aunque produjo una mayor inmuorreactividad de las ramificaciones en la *substantia nigra* (Figura 20A y C). Por el contrario, la transfección del plásmido pTracer-mNRTN-His aumentó el número de células TH(+) en un 157% y 460% la densidad de sus terminales en la *substantia nigra* al final del estudio, en comparación con el grupo lesionado sin transfección (Figura 20A y B). La recuperación alcanzó  $28 \pm 2\%$  de la población de células TH (+) y  $32 \pm 2\%$  de la densidad de las ramificaciones en comparación con la condición saludable al final del estudio (Figura 20). El efecto neurotrófico fue más pronunciado en el cuerpo estriado (Figura 21). El aumento en la densidad de las fibras TH(+) fue estadísticamente significativo en el primer mes después de la transfección en comparación con el cuerpo estriado con sólo lesión, alcanzando el  $52 \pm 3\%$  de la densidad de la condición saludable al final del estudio (Figura 21B). La recuperación de las células TH(+), de su ramificación en la *substantia nigra* (Figura 20A) y de sus terminales en el cuerpo estriado se produjo a lo largo de todo el núcleo correspondiente (Figura 21A).

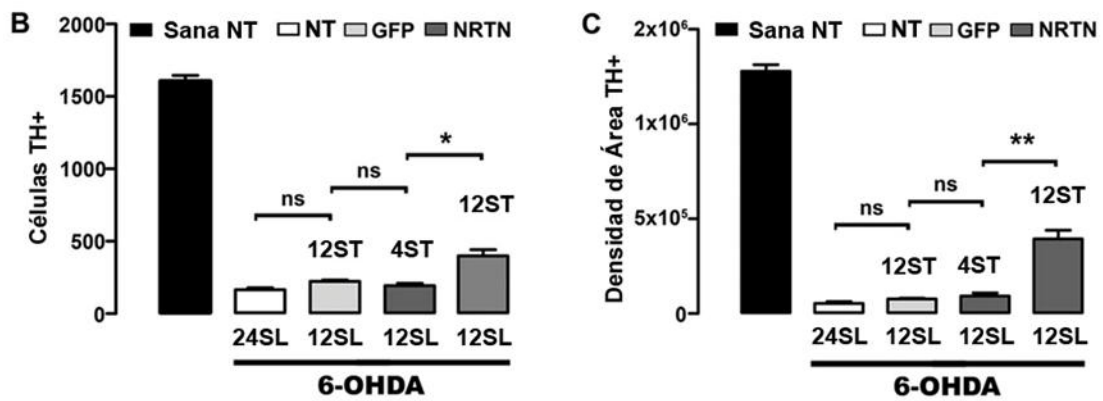
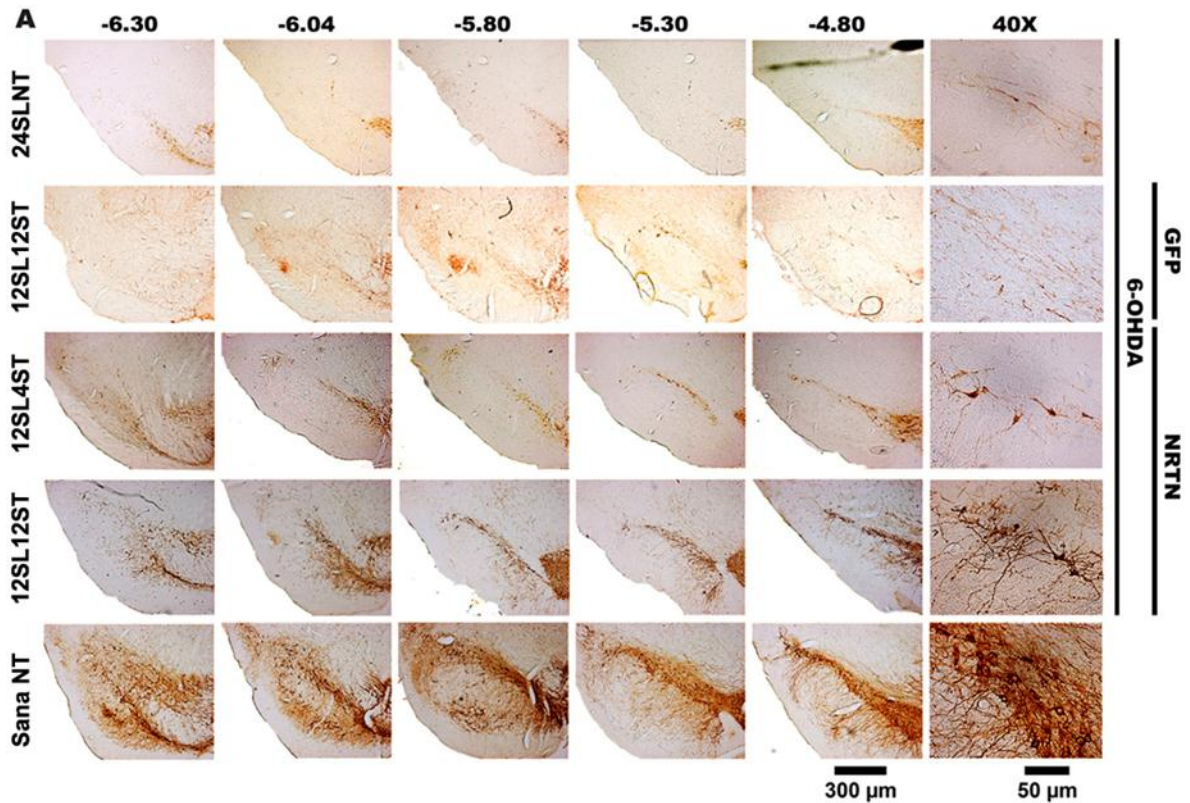


Figura 20. La transfección del gen NRTN-His incrementó el número de células TH+ y sus ramificaciones en la *substantia nigra* con lesión crónica por 6-OHDA. A) Micrografías representativas de la inmunohistoquímica para la TH. Los encabezados corresponden a las coordenadas del Atlas de Paxinos y Watson del cerebro de la rata [111]. 24SLNT = Ratas sin transfección con 24 semanas de lesión con 6-OHDA. 12SL4ST = 12 semanas de lesión y 4 semanas post-transfección, 12SL12ST = 12 semanas de lesión y 12 semanas post-

transfección. La barra de calibración de 300  $\mu\text{m}$  es común para todos los cortes a diferentes niveles y la de 50  $\mu\text{m}$  para las micrografías de acercamiento. **B)** Gráfica del conteo celular TH(+). **C)** Gráfica de la densitometría del área TH(+). NT = No Transfectado, SL = Semanas de Lesión, ST = Semanas de Transfección. Todos los valores son la media  $\pm$  SEM ( $n = 3$  ratas independientes para cada condición experimental). Las transfecciones con el pGreenLantern-1 (GFP) y el pTracer-mNRTN-His (NRTN) fueron realizadas a las 12 semanas posteriores a la lesión. El análisis estadístico se efectuó con ANOVA unifactorial y la post-prueba de Newman-Keuls. \* $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.0001$ . ns = no hay diferencia estadísticamente significativa,  $P > 0.05$ .

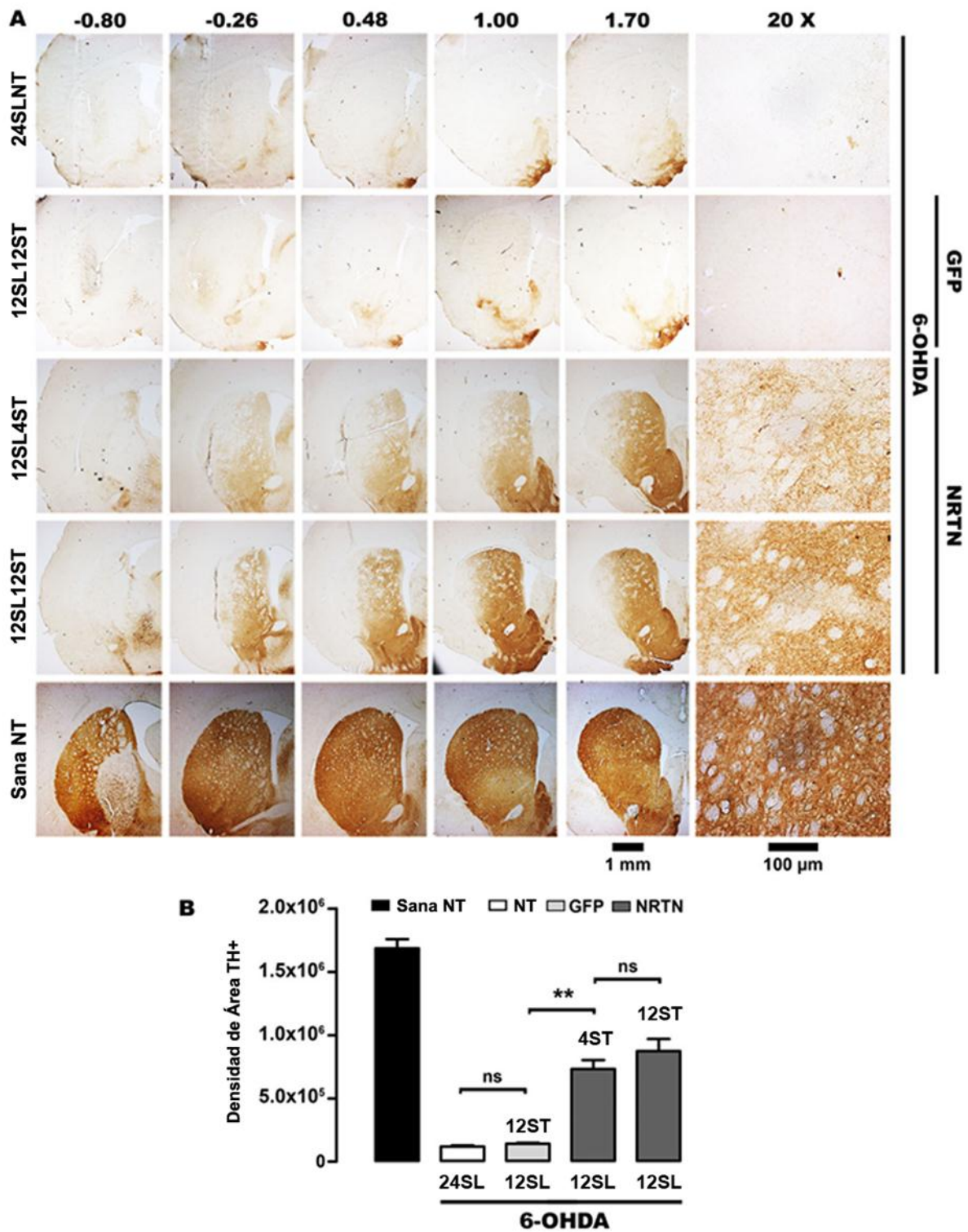


Figura 21. La transfección con las nanopartículas terapéuticas de NRTN incrementa las fibras TH+ en el núcleo estriado de ratas con lesión crónica con 6-OHDA. A) Micrografías

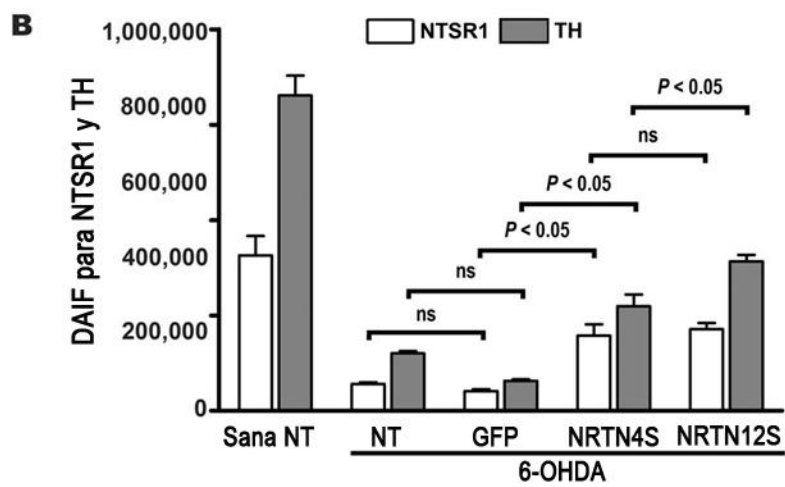
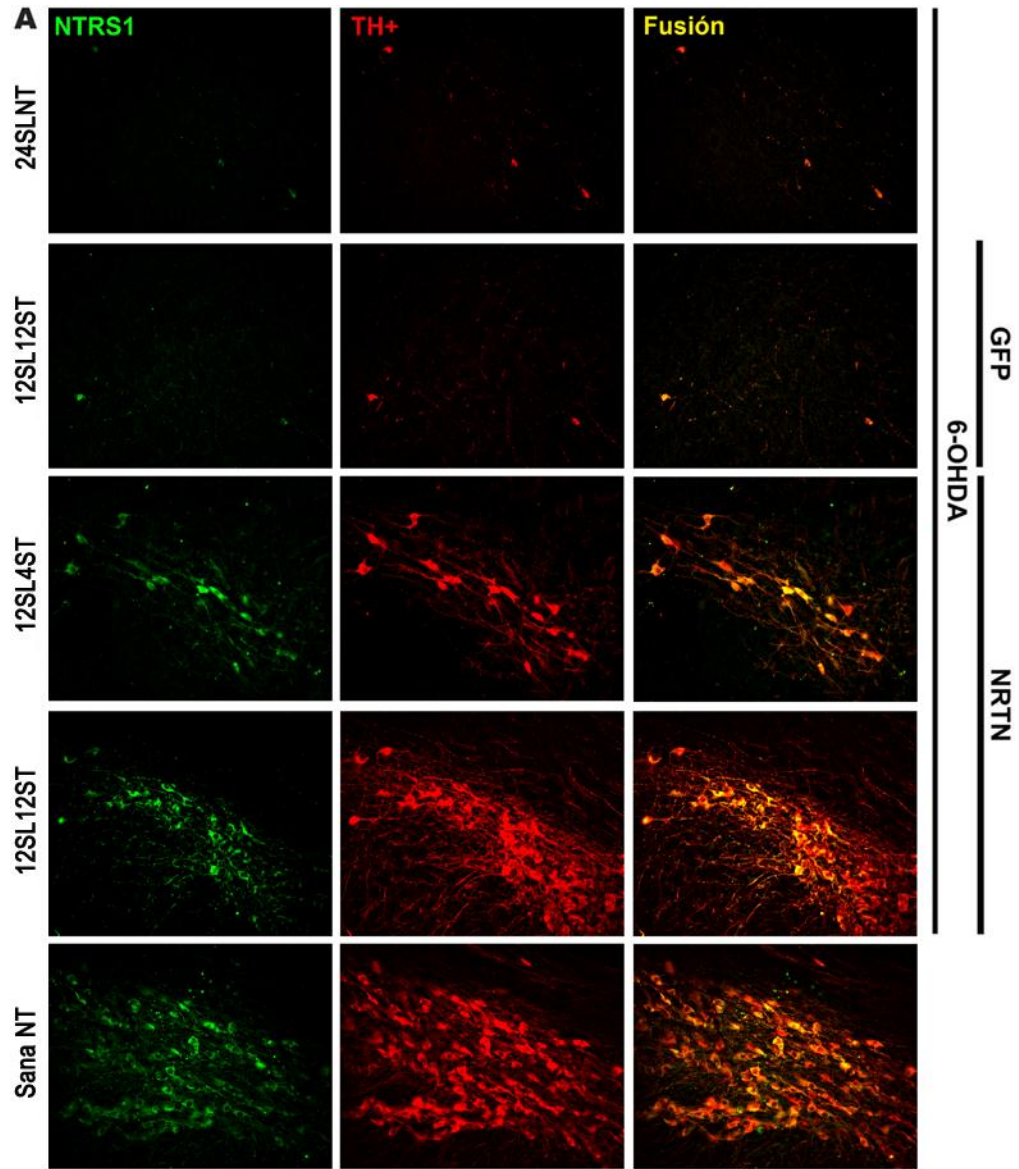
representativas de la inmunohistoquímica de TH. Números encabezados = Coordenadas Antero-posteriores del Atlas de Paxinos y Watson del cerebro de la rata [111]. 24SLNT = Ratas no transfectadas con 24 semanas de lesión con 6-OHDA. 12SL4ST = 12 semanas posteriores a la lesión y 4 semanas posteriores a la transfección, 12SL12ST = 12 semanas posterior a la lesión y 12 semanas posterior a la transfección. La barra de calibración de 1 mm es para todas las imágenes a los diferentes niveles y la de 100  $\mu\text{m}$  para los detalles indicados en los aumentos. **B)** Gráfica de la densitometría del área de TH+. Las transfecciones de los plásmidos pGreenLantern-1 (GFP) y el pTracer-mNRTN-His fueron realizadas a la semana 12 posterior a la lesión. El análisis estadístico se efectuó con ANOVA unifactorial y Newman-Keuls como post-prueba. \* $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.0001$ . ns = no hay diferencia estadísticamente significativa,  $P > 0.05$ .

### **6.7. Restauración del fenotipo no dopaminérgico en el sistema nigroestriatal**

Para responder a la crítica de que los factores neurotróficos recuperan sólo el fenotipo dopaminérgico en el sistema nigroestriatal lesionado pero no la estructura o proteínas membranales, evaluamos dos marcadores no dopaminérgicos, el NTSR1 y la tubulina Beta-III (marcador del citoesqueleto neuronal) [124].

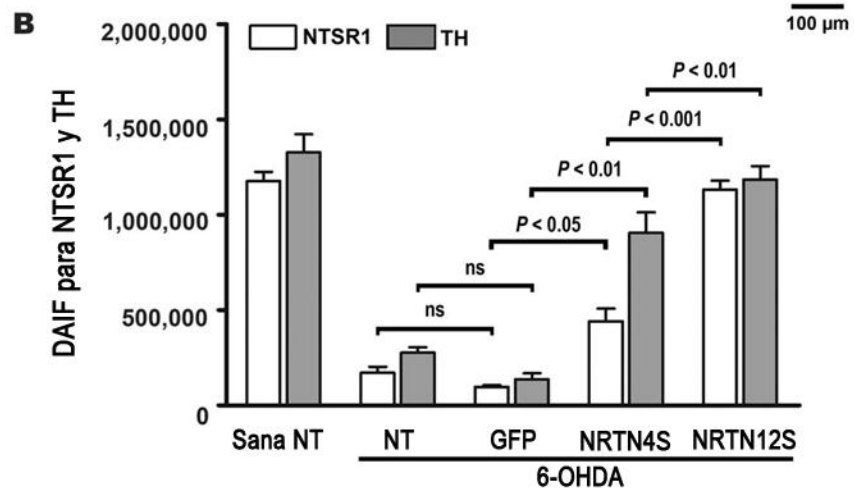
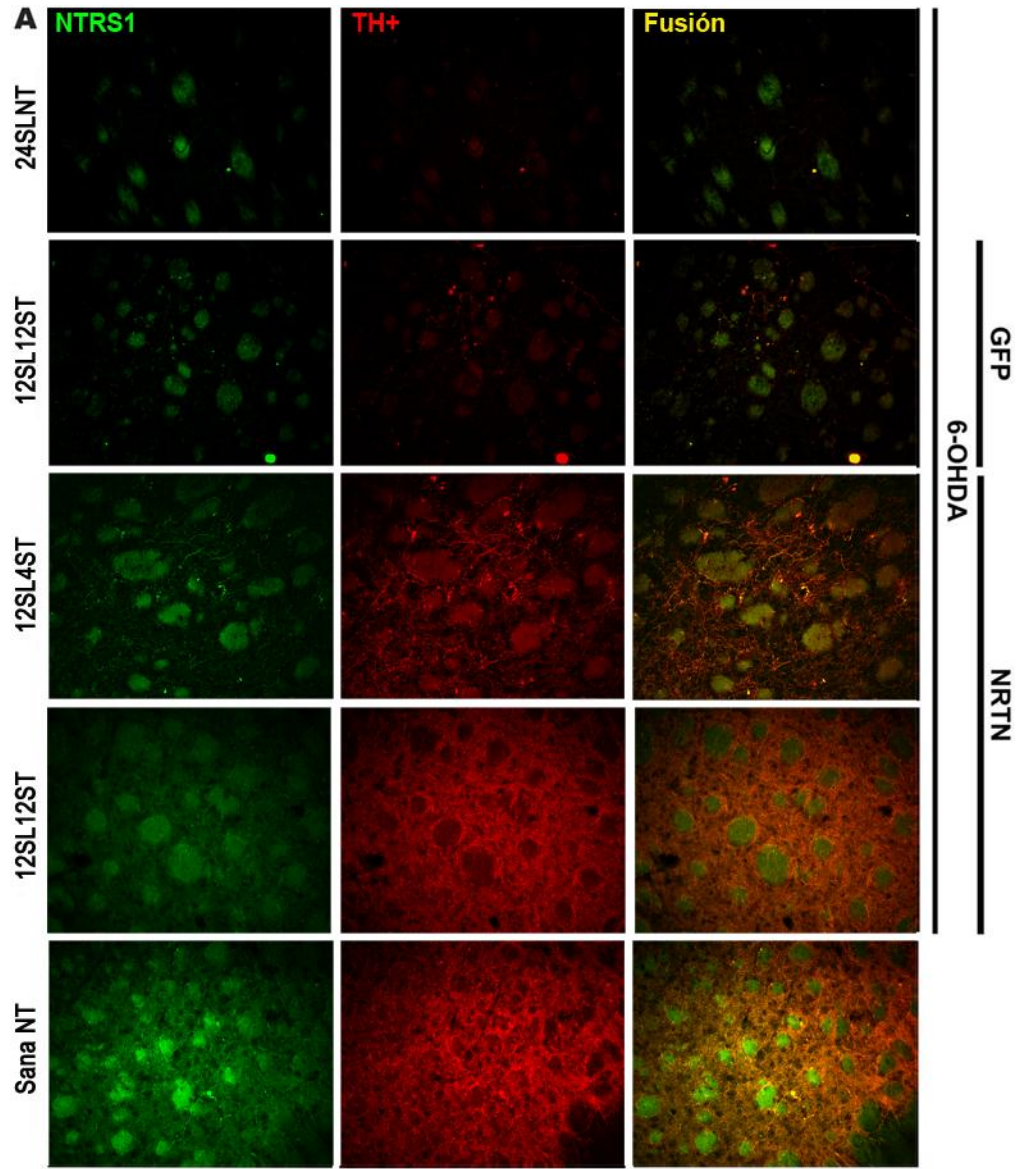
El NTSR1 no es un marcador del fenotipo dopaminérgico, pero este receptor está muy densamente expresado en neuronas dopaminérgicas nigrales y disminuye en la *substantia nigra* de pacientes con enfermedad de Parkinson [125] y en ratas parkinsonianas lesionadas con 6-OHDA [82], y juega un papel importante en la modulación de la neurotransmisión dopaminérgica nigroestriatal [126]. Usando análisis de inmunofluorescencia doble contra NTSR1 y TH, demostramos que la sobre-expresión de NRTN-His también puede inducir la recuperación de los niveles del NTSR1 en la *substantia nigra* (Figura 22) y en el cuerpo estriado (Figura 23). Es interesante notar la cercana correspondencia de los valores del área de la

intensidad de fluorescencia (AIF) para TH con aquellos de la densidad óptica del área para TH en los grupos controles, en los grupos lesionados y en ambos grupos transfectados control y experimental tanto en la *substantia nigra* (Figura 20B vs Figura 22B) como en el cuerpo estriado (Figura 21B vs Figura 23B), lo que da certidumbre a este estudio. El AIF para NTSR1 fue menor que el AIF para TH en ambos núcleos estudiados de la condición sana (Figuras 22B y 23B), lo que sugiere que los niveles de la proteína NTSR1 son normalmente inferiores a los niveles de la proteína TH. La transfección del plásmido pGreenLantern-1 no modificó la reducción en el AIF para NTSR1 inducida por la lesión en la *substantia nigra* (Figura 22B) y en el cuerpo estriado (Figura 23B). En contraste, la transfección del plásmido pTracer-mNRTN-His causó un aumento significativo en el AIF para NTSR1 en la *substantia nigra* (Figura 22B) y en el cuerpo estriado (Figura 23B) en comparación con los controles con sólo lesión. El aumento de NTSR1 fue mayor en el cuerpo estriado (Figura 23B) que en la *substantia nigra* (Figura 22B) en los dos tiempos estudiadas (Figura 22B). Observaciones a mayor aumento muestran detalles de la organización y engrosamiento de los terminales nigroestriatales en la entrada al estriado a los meses 1 y 3 después de la transfección (Figura 24). Estos resultados en conjunto demuestran que el efecto neurotrófico de la sobreexpresión de NRTN-His se ejerce no sólo sobre el fenotipo dopaminérgico (TH), sino también en una proteína diferente (NTSR1) que modula la actividad de las neuronas dopaminérgicas nigrales [126].

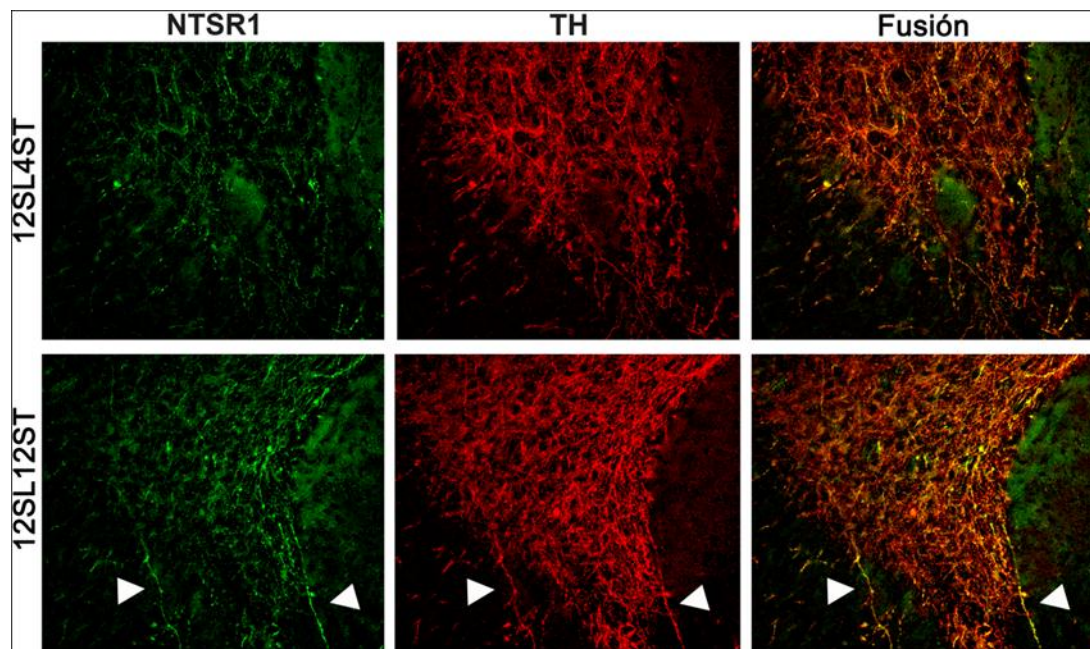




**Figura 22. La transfección con el transgén de NRTN-His incrementa los niveles del NTSR1 en la *substantia nigra* de ratas con lesión crónica. A.** Micrografías representativas de la doble inmunofluorescencia contra el NTSR1 y TH. 24SL NT = Ratas lesionadas con 6-OHDA por 24 semanas sin transfección. 12SL4ST = 12 semanas post-lesión y 4 semanas post-transfección, 12 SL12ST = 12 semanas posterior a la lesión y 12 semanas post-transfección. La barra de calibración es común para todas las micrografías. **B.** El área de la intensidad de la (AIF) para el NTSR1 y TH fue determinada con el software ImageJ v1.46r. NT = No Transfectado. Las transfecciones con el pGreenLantern-1 (GFP) y pTracer-mNRTN-His (NRTN) fueron realizadas a las 12 semanas posteriores a la lesión. Todos los valores representados son la Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Para el análisis estadístico se empleó ANOVA bifactorial y la post-prueba Bonferroni ( $n = 3$  ratas independientes para cada condición experimental). ns = no hay diferencia estadísticamente significativa,  $P > 0.05$ .



**Figura 23. La transfección con el transgén de NRTN-His incrementa los niveles del NTSR1 en el cuerpo estriado de ratas con lesión crónica.** **A.** Micrografías representativas de la doble inmunofluorescencia contra el NTSR1 y TH. 24SL NT = Ratas con 24 semanas de lesión con 6-OHDA sin transfectar. 12SL4ST = 12 semanas post-lesión y 4 semanas post-transfección, 12SL12ST = 12 semanas post-lesión y 12 semanas post-transfección. La barra de calibración es común para todas las micrografías. **B.** El área de la intensidad de inmunofluorescencia (AIF) para NTSR1 y TH fue determinada empleando el software ImageJ v.1.46r. NRTN4S y NRTN12S = 4 y 12 semanas de post-transfección. NT = No Transfectado. Las transfecciones con los plásmidos pGreenLantern-1 (GFP) y pTracer-mNRTN-His (NRTN) se realizaron a la semana 12 post-lesión. Todos los valores se indican como la media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Para el análisis estadístico fue empleado ANOVA bifactorial y la post-prueba de Bonferroni.  $n = 3$  ratas independientes para cada condición experimental. ns = No existe diferencia estadísticamente significativa.



**Figura 24. Organización de las terminales nigroestriatales llegando al cuerpo estriado después de la transfección del plásmido pTracer-NRTN-His.** Los axones nigroestriatales fueron inmunoteñidos para NTSR1 y TH (puntas de flecha). 12SL4ST = 12 semanas post-lesión y 4 semanas post-transfección, 12SL12ST = 12 semanas post-lesión y 12 semanas post-transfección.

### **6.8. Restauración del citoesqueleto de las neuronas dopaminérgicas**

El citoesqueleto neuronal es considerado como un marcador del fenotipo no dopaminérgico pues es una estructura esencial para todo tipo de neuronas incluyendo las neuronas dopaminérgicas. La  $\beta$ -tubulina  $\beta$ III, también conocida como Tuj-1, es un miembro de clase III de la familia de las proteínas beta tubulinas y se encuentra casi exclusivamente en el citoesqueleto neuronal y su expresión correlaciona con las fases tempranas de la diferenciación neuronal y ha sido usado como un marcador positivo de la actividad neuronal [127]. En consecuencia, las células de la *substantia nigra* sin lesión mostraron doble inmunorreactividad a TH y tubulina  $\beta$ -III, la cual disminuyó significativamente con la lesión crónica por 6-OHDA (Figura 13), lo que sugiere la desaparición del citoesqueleto neuronal debido a la muerte celular dopaminérgica [75]. La transfección del plásmido pGreenLantern-1 no alteró la pérdida inducida por 6-OHDA de inmunorreactividad de TH y  $\beta$ -III-tubulina (Figura 25). Por el contrario, la transfección del plásmido pTracer-mNRTN-His provocó una recuperación creciente de células con doble inmunorreactividad a TH y  $\beta$ -III-tubulina a lo largo del tiempo (Figura 25), sugiriendo la restauración del citoesqueleto neuronal en las neuronas dopaminérgicas rescatadas por la expresión de la NRTN-His.

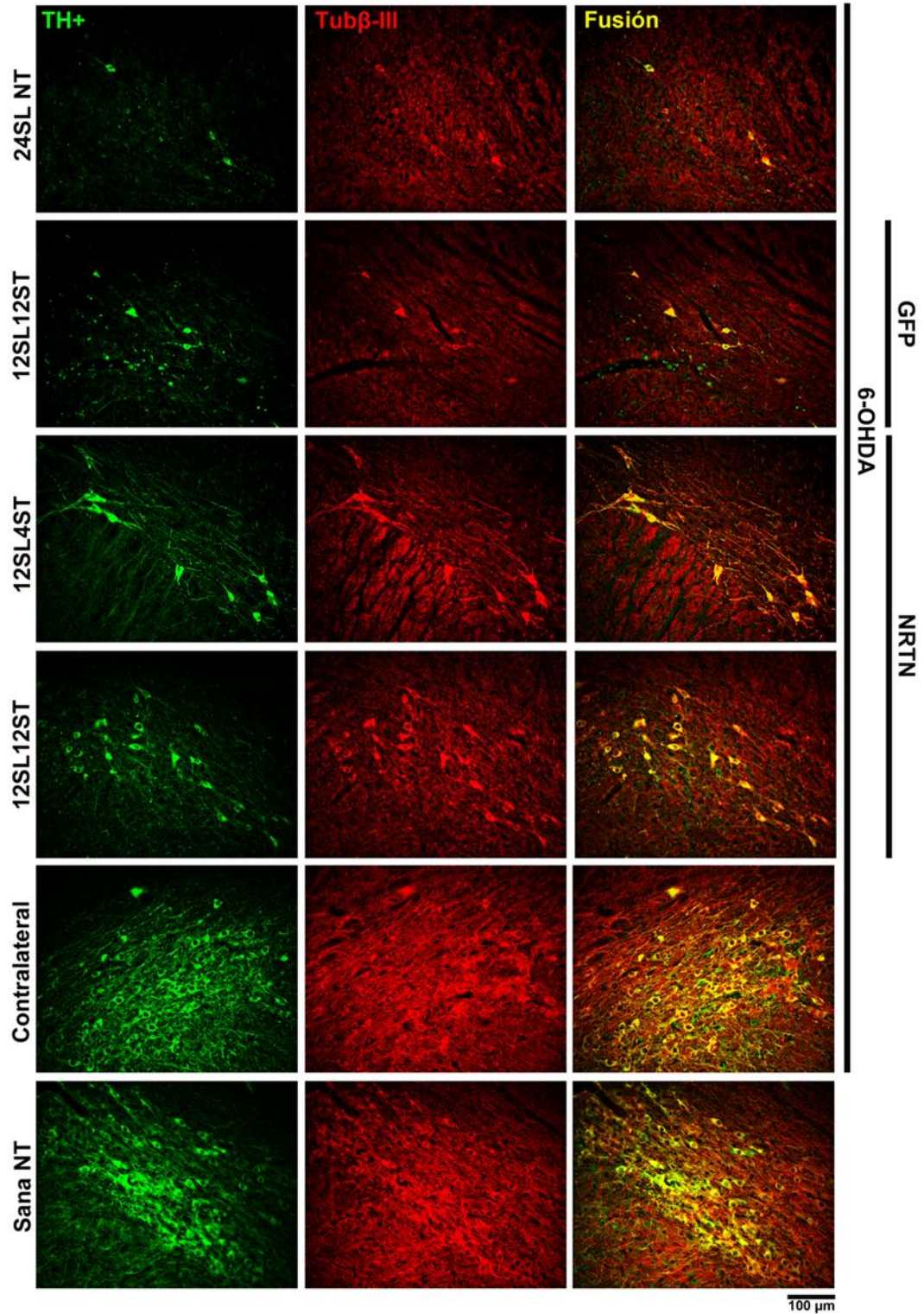
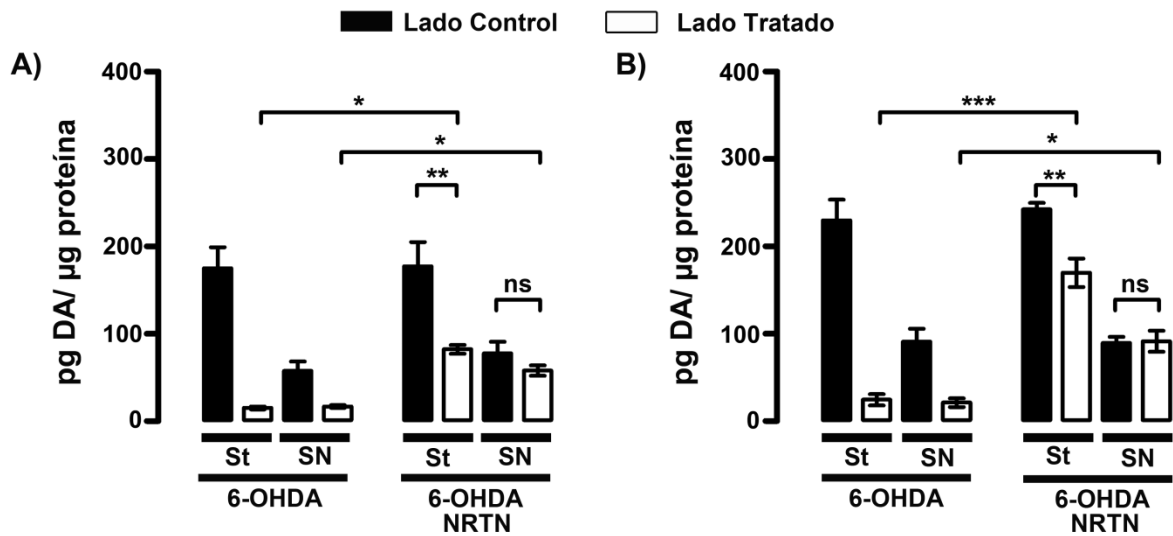


Figura 25. Restauración del citoesqueleto neuronal en la *substantia nigra* posterior a la transfección del plásmido pTracer-NRTN-His. Micrografías representativas de la doble

inmunofluorescencia a TH y Tubulina  $\beta$ -III. 24SL NT = Ratas con 24 semanas de lesión con 6-OHDA sin transfectar. 12SL4ST = 12 semanas posteriores a la lesión y 4 semanas posterior a la transfección. 12SL12ST = 12 semanas posterior a la lesión y 12 semanas posterior a la transfección. Contralateral = Lado sano contralateral al lado lesionado de la misma rata. Sana NT = substantia nigra de rata sana sin transfección. Las transfecciones con los plásmidos pGreenLantern-1 (GFP) y el pTracer-mNRTN-His (NRTN) se realizaron a la semana 12 posterior a la lesión. La barra de calibración es común para todas las micrografías.

### **6.9. Recuperación del contenido de dopamina en el sistema nigroestriatal**

Una profunda pérdida de los niveles de dopamina en el estriado ( $93 \pm 1\%$ ) y la *substantia nigra* ( $75 \pm 2\%$ ) ocurrió en la semana 16 después de la inyección intraestriatal de 6-OHDA en comparación con los niveles del lado contralateral sano (Figura 26A); esos decrementos permanecieron hasta la semana 24 después de la lesión, final del estudio (Figura 26B). Las ratas con un 4 semanas de transfección con el plásmido pTracer-mNRTN-His mostraron un aumento de 5 veces en los niveles de dopamina en el cuerpo estriado y un aumento de 4 veces en la *substantia nigra* en comparación con los lados controles (Figura 26A). Al final del estudio, la recuperación de los niveles de dopamina fue de  $70 \pm 4\%$  en el cuerpo estriado y completa en la *substantia nigra* en comparación con el lado control (Figura 26B).

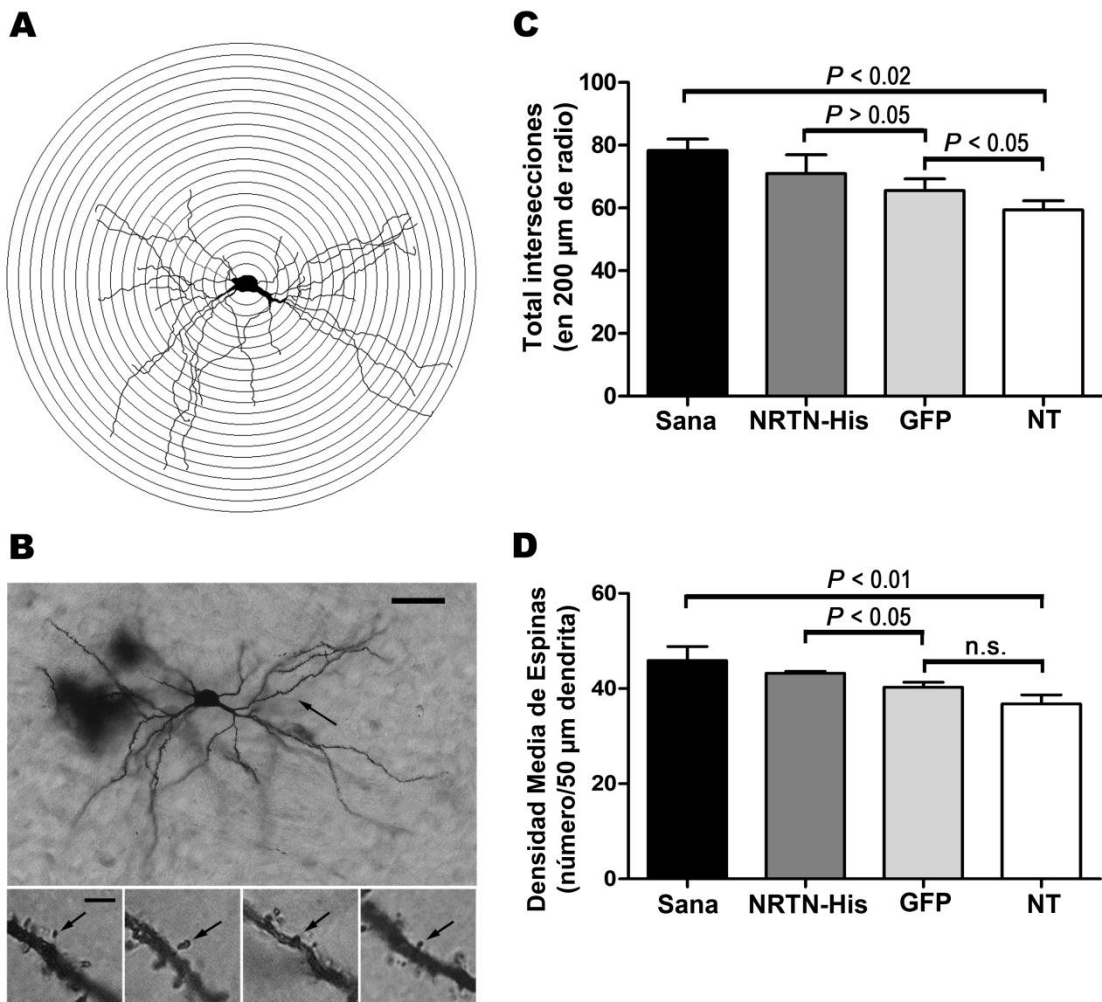


**Figura 26. La transfección con el transgén de la NRTN recupera los niveles de dopamina en la nigroestriatal con lesión crónica por 6-OHDA.** Las mediciones de dopamina por HPLC fueron realizadas a las 4 (A) y 12 (B) semanas posteriores a la transfección con las nanopartículas conteniendo el pTracer-mNRTN-His (NRTN). La transfección fue realizada 12 semanas posteriores a la lesión. Todos los valores representan la media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). DA = Dopamina, St = Núcleo Estriado, SN = *Substantia nigra*. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA unifactorial y corrección de Newman-Keuls.  $n = 4$  ratas independientes en cada condición experimental. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . ns = No hay diferencia estadística.

### 6.10. Recuperación de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del estriado

Las espinas de las NEMs reciben entradas dopaminérgicas del mesencéfalo que desempeñan un papel crítico en la regulación de la aferencia glutamatérgica cortical [128]. En congruencia con publicaciones previas [129,130], mostramos que la lesión con 6-OHDA disminuyó significativamente la ramificación de las dendritas y la densidad de las espinas dendríticas en

las NEMs estriatales en comparación con la condición saludable (Figura 27). De los cuatro tipos diferentes de espinas estudiadas, la lesión con 6-OHDA disminuyó significativamente la densidad de las espinas delgadas y tipo hongo (Tabla 4). La transfección pGreenLantern-1 provocó un aumento modesto en la arborización dendrítica y en la longitud y densidad de las espinas dendríticas delgadas en comparación con la condición de lesión en animales no transfectados (Figura 27 y Tabla 4). El aumento máximo en las variables de arborización dendrítica y espinas dendríticas fue causado significativamente por la transfección de pTracer-mNRTN-His, principalmente en las espinas tipo hongo y espinas anchas, aunque la recuperación no alcanzó los valores de la condición saludable (Figura 27 y Tabla 4).





**Figura 27. La transfección del transgén NRTN-His incrementa en la densidad de espinas y el árbol dendrítico en neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado.** **A)** Diagrama de Sholl para el estudio morfológico de las dendritas y espinas dendríticas. **B)** Micrografía representativa de una neurona espinosa mediana (NEM) de un estriado recuperado. La flecha representa el segmento de 50  $\mu\text{m}$  (dendrita primaria) donde las espinas dendríticas fueron analizadas. La barra de calibración superior = 25  $\mu\text{m}$ . Los paneles pequeños inferiores muestran los diferentes tipos de espinas (delgada, hongo, corta y ancha; de izquierda a derecha) indicadas por la flecha. La barra de calibración = 5  $\mu\text{m}$ . Las transfecciones con los plásmidos pGreenLantern-1 (GFP) y pTracer-mNRTN-His (NRTN) fueron hechas a la semana 12 posterior a la lesión y el análisis de Sholl al final del estudio (12 semanas post-transfección o 24 semanas post-lesión). NT = Ratas no transfectadas con lesión. **C)** Análisis de Sholl del número total de intersecciones a lo largo de las ramificaciones dendríticas en las NEM a una distancia de análisis de 200  $\mu\text{m}$  de radio desde el soma. **D)** Gráfica de la densidad media de espinas analizadas por 50  $\mu\text{m}$  de dendrita primaria a partir del cuerpo celular (segmento proximal, marcado con una flecha superior en B). Se consideraron 6 neuronas por cada rata. Todos los valores representan la media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). El análisis estadístico (**C** y **D**) fue desarrollado usando ANOVA unifactorial con la post-prueba de Tukey.  $n$  = 6 ratas independientes en cada condición experimental.

**Tabla 4. Densidad proporcional de los diferentes tipos de espinas en las NEM en los cuatro grupos experimentales**

Tipo de Espina	Grupo			
	Sana	NRTN-His	GFP	NT
<b>Delgada</b>	29.9 ± 1.7	24.7 ± 0.4 <sup>a,b</sup>	24.9 ± 0.9 <sup>a</sup>	22.4 ± 1.2 <sup>a</sup>
<b>Hongo</b>	10.0 ± 0.5	11.4 ± 0.3 <sup>b,c</sup>	8.4 ± 0.4	8.3 ± 0.5 <sup>a</sup>
<b>Corta</b>	2.4 ± 0.3	2.7 ± 0.2	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1
<b>Ancha</b>	2.0 ± 0.3	2.5 ± 0.0 <sup>a,b,c</sup>	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.2

Los plásmidos pGreenLantern-1 o el pTracer-mNRTN-His fueron transfectados en ratas con 12 semanas de lesión. NT = Ratas no transfectadas con lesión con 6-OHDA. Todos los valores representan la media ± Error Estándar de la Media (SEM), n = 6 ratas independientes en cada condición experimental.  $P < 0.05$ . a: vs. Sana; b: vs. Lesión; c: vs. GFP. Análisis estadístico con ANOVA unifactorial y la post-prueba de Bonferroni.

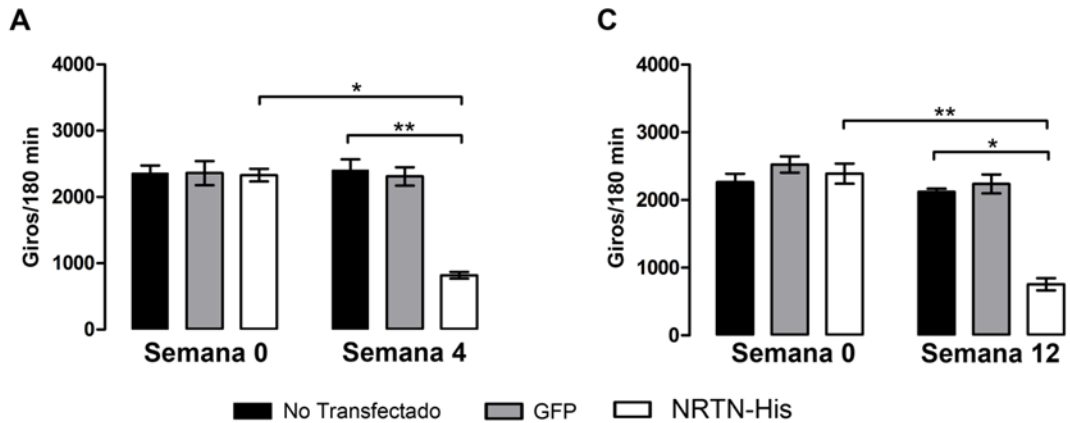
### **6.11. Disminución de las asimetrías motoras activadas por drogas y espontáneas**

La lesión unilateral del sistema dopaminérgico nigroestriatal produce asimetrías motoras que se pueden evidenciar por agonistas dopaminérgicos (metanfetamina o apomorfina) o por estímulo de la actividad motora espontánea [81,82,131,132]. La asimetría motora inducida por agonistas dopaminérgicos también se conoce como conducta de giro o conducta rotacional. Por consiguiente, la conducta de giro ipsilateral activada por metanfetamina en ratas con 12 semanas de lesión (día 0 de transfección) varió de 2263 a 2357 giros ipsilaterales / 180 min (Figura 28A). Mientras que la conducta de giro contralateral activada por apomorfina varió de 229 a 249 giros contralaterales / 40 min (Figura 28B). Ambas asimetrías motoras permanecieron estables hasta el final del estudio (Figuras 28C y 28D). La transfección con pGreenLantern-1 no modificó las conductas de giro activadas por los agonistas dopaminérgicos (Figura 28). Por el contrario, la transfección con pTracer-mNRTN-His disminuyó

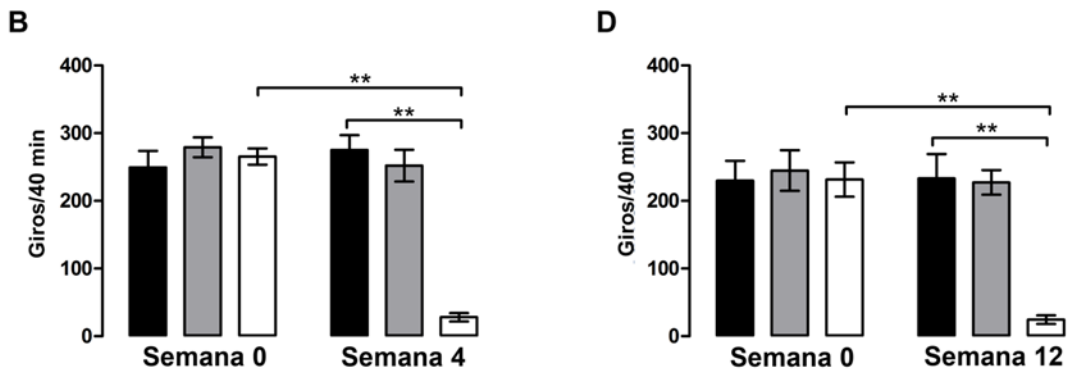
significativamente las conductas de giro  $65 \pm 2\%$  (metanfetamina) y  $89 \pm 1\%$  (apomorfina) en la semana 4 después de la transfección (Figuras 28A y 28B) y  $73 \pm 2\%$  (metanfetamina) y  $89 \pm 1\%$  (apomorfina) en la semana 12 después de la transfección (Figuras 28C y 28D). Estos resultados sugieren fuertemente que la expresión de NRTN-His en el lado de la lesión restauró nuevamente la simetría funcional del sistema nigroestriatal.

La asimetría inducida por la lesión con 6-OHDA también pueden revelarse mediante la prueba de colocación de la extremidad anterior por estímulo de las vibrisas (Figuras 29A y 29B) y la prueba de asimetría de uso de las extremidades, también conocidas como conductas motoras espontáneas (Figuras 29C y 29D). En ambos casos, la alteración motora se produjo en la extremidad anterior del lado contralateral a la lesión y permaneció hasta el final del estudio (Figuras 29A-29D). La transfección con pGreenLantern-1 no modificó las respuestas de la extremidad anterior a los estímulos táctiles (Figuras 29A y 29B) ni el uso espontáneo de la extremidad anterior (Figuras 29C y 29D) en la semana 4 y 12 después de la transfección. Por el contrario, la transfección pTracer-mNRTN-His mejoró significativamente la respuesta a los estímulos táctiles y la colocación de la extremidad anterior afectada en las semanas 4 y 12 después de la transfección, en comparación con los animales no transfectados y los transfectados con el plásmido pGreenLantern-1 (Figuras 29A-29D). Sin embargo, la mejoría inducida por la transfección de pTracer-mNRTN-His en el comportamiento activado por fármacos y el comportamiento espontáneo no alcanzó los valores de referencia de la condición saludable (Figuras 28 y 29).

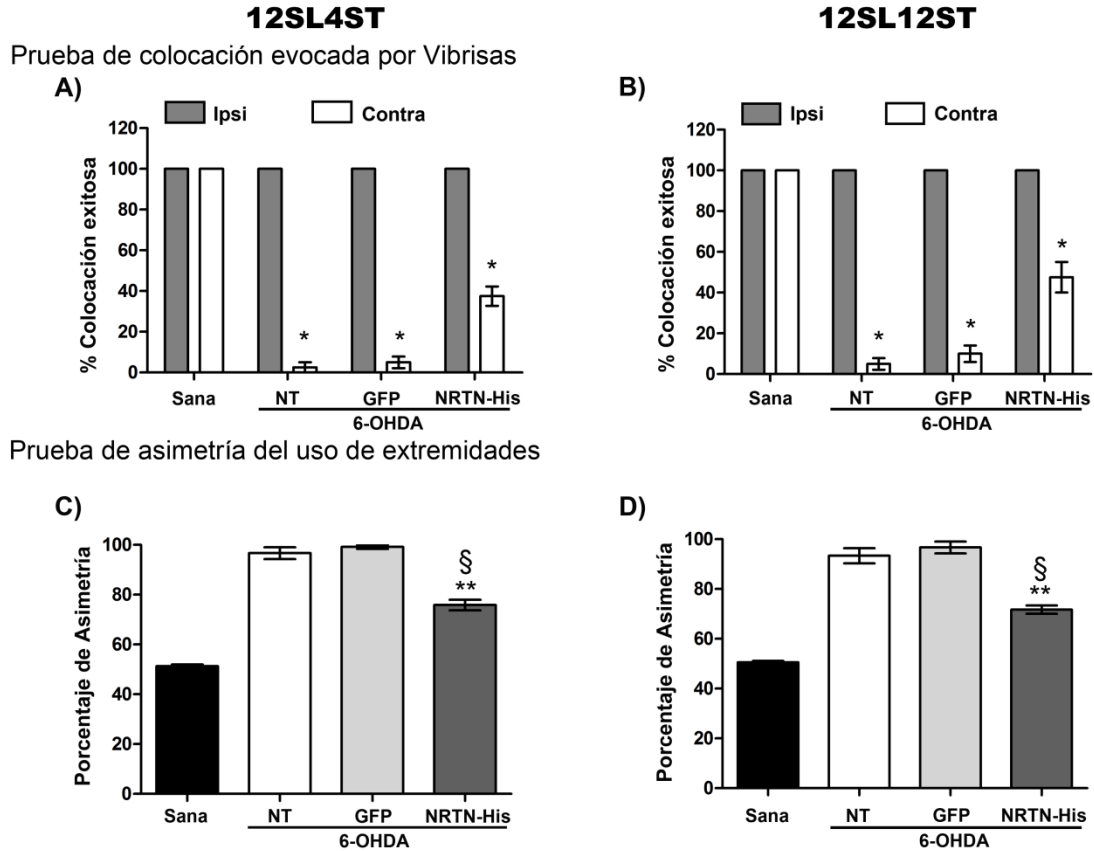
### Conducta de giro ipsilateral



### Conducta de giro contralateral



**Figura 28. Efecto de la transfección del transgén NRTN-His sobre la conducta de giro en ratas con lesión crónica por 6-OHDA.** La conducta de giro ipsilateral (**A** y **C**) fue activada por metanfetamina (8 mg/kg; i.p.) y la conducta de giro contralateral (**B** y **D**) fue activada por apomorfina (0.5 mg/kg; i.p.) a las semanas 0, 4 y 12 posterior a la transfección. Las transfecciones de los plásmidos pGreenLantern-1 (GFP) y pTracer-mNRTN-His (NRTN-His) fueron hechas a la semana 12 posterior a la lesión (Semana 0). Todos los valores representan la media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). El análisis estadístico se realizó empleando ANOVA unifactorial y la post-prueba de Newman-Keuls.  $n = 4$  ratas independientes en cada condición experimental. \* $P < 0.0005$ , \*\* $P < 0.0001$ .



**Figura 29. Prueba de colocación de extremidad anterior evocada por vibrisas y prueba de asimetría del uso de extremidades.** Las transfecciones de los plásmidos pGreenLantern-1 (GFP) y pTracer-mNRTN-His (NRTN-His) fueron realizadas a la semana 12 posterior a la lesión. NT = Ratas no transfectadas. Las pruebas fueron desarrolladas a la semana 4 (12SL4ST) y a la semana 12 (12SL12ST) posterior a la transfección. Todos los valores representan la Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Para el análisis estadístico se realizó ANOVA bifactorial con la post-prueba de Newman-Keuls. \* $P < 0.001$  cuando se comparan los valores de la extremidad contralateral (Contra) con aquellos correspondientes a las extremidades ipsilaterales (Ipsi), \*\* $P < 0.001$  cuando se comparan los valores de NRTN-His vs NT y § $P < 0.001$ , NRTN-His vs GFP.  $n = 4$  ratas independientes en cada condición experimental.

## 7. Discusión

Nuestros resultados muestran por vez primera que la sobre-expresión de la NRTN en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* puede producir cambios plásticos en el sistema nigroestriatal lesionado crónicamente con 6-OHDA. Los principales cambios en las estructuras presinápticas fueron la preservación de un mayor número de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra*, la aparición de neuritas nigrales y terminales estriatales y la recuperación del citoesqueleto., así como una recuperación significativa del NTSR1. Los cambios plásticos en las estructuras postsinápticas consistieron en un aumento de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado, específicamente en las espinas tipo “hongo” y en las espinas “anchas”, cuando fueron comparadas con las condiciones de lesión y sana. El nivel de restauración alcanzada durante el periodo del estudio permitió el re-establecimiento de la actividad bioquímica y de la función de la vía dopaminérgica nigroestriatal desde la semana 4 posterior a la transfección.

La capacidad neuritogénica de la NRTN que consiste en estimular la elongación axonal y la ramificación dendrítica en cultivos celulares y en animales de experimentación [51] puede explicar la reorganización del citoesqueleto así como el incremento de fibras dopaminérgicas en la *substantia nigra* y en el cuerpo estriado encontrados en este estudio. Sin embargo, el aumento del número de neuronas dopaminérgicas no puede ser explicado convincentemente por un efecto de la NRTN sobre la supervivencia de las neuronas mesencefálicas, porque este tema aún es controversial [27,51] y aún no hay evidencia contundente sobre la repoblación de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro adulto. La controversia con los efectos de la NRTN encontrado en otras poblaciones neuronales principalmente del sistema nervioso periférico

podría deberse a diferencias en el tipo de población neuronal, el modelo de lesión, la duración del estudio y el método de transfección.

En esta tesis, utilizamos el modelo de lesión de una sola inyección de 6-OHDA (20 µg) en el sitio de divergencia del haz medial del cerebro anterior en el cuerpo estriado, que se sabe activa la apoptosis en neuronas dopaminérgicas nigrales en un curso de tiempo limitado [75]. En este modelo, el proceso apoptótico y la desorganización del citoesqueleto dura 4 semanas y posteriormente permanecen un 10 a 20% de células TH(+) que fue documentado hasta las 8 semanas posterior a la lesión [75]. Nuestros resultados en ratas no transfectadas con lesión crónica confirman el deterioro presináptico de la vía nigroestriatal dopaminérgica y demuestran que la población remanente (10 a 20%) aún está presente a las 24 semanas de lesión [75]. Como se esperaba, la concentración creciente de NRTN-His a lo largo del tiempo estuvo acompañada por la progresiva aparición del citoesqueleto neuronal y una robusta ramificación de las fibras TH(+) en la *substantia nigra* [135]. Además, el aumento de la inmunorreactividad del citoesqueleto colocalizó con un gran número de neuronas TH(+). Estos resultados constituyen una prueba de la recuperación estructural de las neuronas dopaminérgicas y no solamente de la recuperación del fenotipo dopaminérgico. Esa recuperación no puede deberse a un efecto anti-apoptótico de la NRTN-His, debido a que este evento termina justo a las 4 semanas posteriores a la lesión con 6-OHDA, como previamente se ha reportado [75]. Por lo que una posibilidad para explicar el incremento en el número de neuronas dopaminérgicas podría ser la diferenciación de células progenitoras de la *substantia nigra* que tienen el potencial de generar nuevas neuronas en roedores [135-137]. Otros estudios han encontrado un incremento en el número de nuevas células NG2 y GFAP(+) en la *substantia nigra* [138-140] en lugar de neuronas dopaminérgicas nuevas [82] incluso después del tratamiento con GDNF [138]

o BDNF [82,139]. Estos estudios sugieren que ese estímulo gliogénico induce cambios micro-ambientales significativos en la *substantia nigra* adulta que podrían mejorar la conducta motora en las ratas lesionadas con 6-OHDA. Otras posibilidades son que la NRTN podría haber inducido el fenotipo dopaminérgico en las neuronas TH(-) residentes en la *substantia nigra* [141] o podría rescatar el fenotipo dopaminérgico [34,138] en aquella población de neuronas sobrevivientes que no fueron cuantificadas en el modelo de lesión con 6-OHDA usado para este estudio [75]. Por lo tanto se requieren investigaciones adicionales para entender mejor el mecanismo por el cual la NRTN-His induce la repoblación de neuronas dopaminérgicas nigrales en el modelo de lesión crónica con 6-OHDA en la rata.

Los niveles de NRTN-His en la *substantia nigra* y en el cuerpo estriado como resultado de la transfección con el nanovector NTS-poliplex, estuvieron en el rango de nanogramos similar a los niveles de NRTN humana (hNRTN) inducidas por la transducción de células estriatales por el vector viral adeno-asociado serotipo 2 (AAV2-NRTN) [54]. Los niveles de NRTN-His fueron también similares a aquellos alcanzados después de la infusión de NRTN (10 µg) o GDNF (15 µg) dentro del cerebro de la rata [142]. Los niveles de la NRTN en el rango de nanogramos (desde 4.5 a 60 ng, en total) alcanzados por las tres técnicas de liberación independientes incluyendo la nuestra producen actividad biológica [54,142].

Nuestros resultados mostraron que los niveles de NRTN-His en el cuerpo estriado corresponden a casi el 40% de los niveles en la *substantia nigra* después de la transfección. Es bien conocida la pobre difusión de la NRTN causada por su fuerte unión a la matriz extracelular y unión a proteoglicanos heparan-sulfato de superficie celular [143,144]. Por lo tanto, la difusión de la NRTN no puede explicar los altos niveles de NRTN-His en el estriado y la etiqueta His añadida es poco probable que modifique la tasa de difusión de la NRTN. Entonces,



proponemos que la selectividad del nanovector NTS-poliplex para transfectar a las neuronas dopaminérgicas es un factor importante para explicar los altos niveles de la proteína NRTN-His en el cuerpo estriado. De acuerdo a esto, la sobre-expresión de NRTN-His en las neuronas dopaminérgicas podría favorecer su transporte axonal anterógrado hacia el cuerpo estriado que también podría ser potenciado por el crecimiento de las terminales nigroestriatales y la restauración del citoesqueleto neuronal como se demuestra en este trabajo. Es bien sabido que el citoesqueleto neuronal juega un papel importante en el transporte anterógrado de los factores neurotróficos [145-147].

Encontramos que la 6-OHDA causó una pérdida significativa del contenido de dopamina en el cuerpo estriado que fue acompañado por la atrofia de las espinas dendríticas de las NEMs. Estos resultados confirman resultados previos en el modelo de 6-OHDA en la rata y provee más apoyo al rol neurotrófico de la dopamina en el cuerpo estriado durante la edad adulta [85,129]. Por lo tanto, la dopamina y la NRTN-His en el estriado podrían haber causado la recuperación de las espinas dendríticas de las NEMs. Sin embargo, la restitución de las espinas dendríticas no fue tan completo como el causado por el tratamiento con un agonista D3 combinado con la transfección de BDNF [85]. Si bien la NRTN puede ejercer efectos restauradores en las neuronas estriatales [148], es posible que se necesite la co-transfección del gen BDNF para alcanzar una recuperación completa de las espinas dendríticas de las NEMs [85,149]. Además, se ha demostrado que el mantenimiento de las espinas dendríticas de las NEMs es esencial para la recuperación completa y duradera de la conducta motora fisiológica [85]. En concordancia con este hallazgo encontramos un incremento en la conducta motora espontánea y una reducción en la conducta de giro inducida farmacológicamente solamente en aquellas ratas transfectadas con NRTN-His que permaneció hasta el final del estudio (12 semanas

después de la transfección). La reducción de la conducta de giro inducida por apomorfina revela que hubo una reducción de la hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos postsinápticos posiblemente causados por su continua activación por los niveles de dopamina, los cuales fueron altos en el cuerpo estriado de aquellas ratas transfectadas con el gen de NRTN-His. Sin embargo, la reducción de las alteraciones motoras no alcanzaron los valores normales evaluados en todas las pruebas conductuales, lo que está en concordancia con la recuperación parcial de las espinas dendríticas de las NEMs mostrada en este trabajo.

La recuperación de los niveles del NTSR1 en las neuronas TH(+) y en las terminales estriatales, aunque significativa, fue también parcial. Todos estos resultados juntos sugieren que la NRTN es menos potente que el GDNF o el BDNF más un agonista D3 para restablecer el sistema dopaminérgico en el modelo de lesión con la 6-OHDA. Esta diferencia pudiera deberse a que la NRTN no señalizara a través de su receptor natural de alta afinidad GFR $\alpha$ 2, el cual todavía no ha sido demostrado convincentemente en las neuronas dopaminérgicas nigrales. En su lugar, pudiera señalizar a través del GFR $\alpha$ 1 [38,39], o el receptor de arresto del crecimiento específico I [150,151], o receptores independientes de RET tales como NCAM [152-154], Integrina  $\beta$ -I [155] y el receptor heparan-sulfato proteoglicano syndecan-3 [143]. Otra causa podría ser la fuerte unión de la NRTN a grupos heparan-sulfatos de la matriz extracelular que incrementa su inestabilidad y limita su difusión por el parénquima cerebral [107]. Para superar esta limitante, recientemente se han desarrollado nuevas variantes de la NRTN con una alta estabilidad y amplia capacidad de difusión [107]. Finalmente, otra posibilidad podría ser que las etiquetas V5 y His en C-terminal podrían disminuir la bioactividad de la NRTN en base al hallazgo de que el C-terminal en el GDNF está muy cerca del sitio de unión al receptor de acuerdo con la estructura por cristalografía del complejo GDNF-GFR $\alpha$ 1 [156]. Sin embargo, el análisis

bioinformático de interacción de la NRTN con su receptor GFR $\alpha$ 2 demostró que los extremos C-terminal se encuentran en estado libre y son más bien las hojas  $\beta$  plegadas denominadas “fingers” las que están involucradas en la unión con el GFR $\alpha$ 2 (Ver Figura 2). Por lo tanto, podemos inferir que la etiqueta His-V5 añadida en el extremo C-terminal de la NRTN no interfiere con el efecto trófico de la NRTN sobre las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*.

La transducción del gen NRTN en el putamen de pacientes con la enfermedad de Parkinson utilizando el vector AAV2-NRTN (CERE-120) es el primer estudio clínico abierto de terapia restaurativa [102]. La terapia génica intraputamina con el AAV2-NRTN mostró mejoría clínica en las etapas tempranas de la enfermedad [157] y sus resultados en la fase I fueron positivos (referentes a la bioseguridad) [35]. Sin embargo, los resultados en la fase II fueron desalentadores [62,63]. Los autores del trabajo los explican por la pobre difusión de la NRTN en el cuerpo estriado, donde fue aplicado el procedimiento, hasta la *substantia nigra* donde debe activar los programas genéticos de supervivencia y restauración neuronal [105]. La limitada difusión se puede deber a la fuerte interacción de la NRTN con la matriz extracelular y a las escasas terminales dopaminérgicas en el estriado que fueron insuficientes para capturar a la NRTN y transportarla retrógradamente [105]. Esta explicación es congruente con el hecho de que la NRTN es necesaria en el cuerpo neuronal y en sus terminales para provocar una respuesta neurotrófica robusta como lo demuestran nuestros resultados en ratas viejas con lesión crónica por 6-OHDA. En este caso, la sobreexpresión de NRTN en las neuronas dopaminérgicas pudo estimular simultáneamente la supervivencia neuronal por un efecto autócrino y parácrino sobre los somas neuronales y también el crecimiento de neuritas en la vía

nigroestriatal y en las espinas dendríticas estriatales por la liberación en el cuerpo estriado después de su transporte anterógrado.

## **8. Conclusión**

Este trabajo demuestra que una sola transfección con el plásmido pTracer-mNRTN-His en las neuronas dopaminérgicas utilizando el nanovector NTS-poliplex promueve niveles sostenidos de NRTN-His en la *substantia nigra* y en el cuerpo estriado que fueron acompañados de la recuperación estructural, bioquímica y funcional del sistema nigroestriatal dopaminérgico crónicamente dañado. Sin embargo, estas mejoras no alcanzaron el estándar de la condición sana al tiempo máximo de 12 semanas post-transfección, sugiriendo que la NRTN ejerce menor efecto neurotrófico que el GDNF o la combinación de BDNF con un agonista D3, sin embargo el efecto final de la NRTN es suficiente para restablecer el equilibrio de ambas vías nigroestriatales, con lo que las manifestaciones de hemiparkinsonismo desaparecen, colocando a la rata en un estadio de hemiparkinsonismo subclínico. Nuestros resultados abren la posibilidad de probar las nuevas variantes de la NRTN con o sin combinaciones con otras estrategias terapéuticas. Seguramente con estas variantes se logrará una mayor difusión de la NRTN por el espacio extracelular que sumada a la acción simultánea de la expresión de la NRTN mediada por el nanovector NTS-poliplex producirá la recuperación total del sistema dopaminérgico nigroestriatal.

## **9. Perspectivas**

1. Identificar el poder de reprogramación celular de la NRTN en las poblaciones celulares intranigrales.

2. Estudiar otras variantes de la NRTN que tienen mejor difusión en el modelo de lesión crónica del sistema nigroestriatal.
3. Caracterizar las vías de señalización asociadas al efecto neurorestaurador de la NRTN.

## 10. Referencias

1. Nasrolahi A, Mahmoudi J, Akbarzadeh A, Karimipour M, Sadigh-Eteghad S, et al. (2018) Neurotrophic factors hold promise for the future of Parkinson's disease treatment: is there a light at the end of the tunnel? *Rev Neurosci*.
2. Wang CY, Yang F, He X, Chow A, Du J, et al. (2001) Ca<sup>2+</sup> binding protein frequenin mediates GDNF-induced potentiation of Ca<sup>2+</sup> channels and transmitter release. *Neuron* 32: 99-112.
3. Nangle MR, Keast JR (2006) Loss of nitroergic neurotransmission to mouse corpus cavernosum in the absence of neurturin is accompanied by increased response to acetylcholine. *Br J Pharmacol* 148: 423-433.
4. Yu T, Scully S, Yu Y, Fox GM, Jing S, et al. (1998) Expression of GDNF family receptor components during development: implications in the mechanisms of interaction. *J Neurosci* 18: 4684-4696.
5. Lee H, Thuret S (2018) Adult Human Hippocampal Neurogenesis: Controversy and Evidence. *Trends Mol Med* 24: 521-522.
6. Farzanehfar P (2018) Comparative review of adult midbrain and striatum neurogenesis with classical neurogenesis. *Neurosci Res*.
7. Peterson AL, Nutt JG (2008) Treatment of Parkinson's disease with trophic factors. *Neurotherapeutics* 5: 270-280.
8. Bernalov MM, Saarma M (2007) GDNF family receptor complexes are emerging drug targets. *Trends Pharmacol Sci* 28: 68-74.
9. Airaksinen MS, Saarma M (2002) The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3: 383-394.
10. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, et al. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374: 1-20.
11. Grothe C, Timmer M (2007) The physiological and pharmacological role of basic fibroblast growth factor in the dopaminergic nigrostriatal system. *Brain Res Rev* 54: 80-91.
12. Zacchigna S, Pattarini L, Zentilin L, Moimas S, Carrer A, et al. (2008) Bone marrow cells recruited through the neuropilin-1 receptor promote arterial formation at the sites of adult neoangiogenesis in mice. *J Clin Invest* 118: 2062-2075.
13. Jorgensen JR, Thompson L, Fjord-Larsen L, Krabbe C, Torp M, et al. (2009) Characterization of Meteorin--an evolutionary conserved neurotrophic factor. *J Mol Neurosci* 39: 104-116.
14. Nishino J, Yamashita K, Hashiguchi H, Fujii H, Shimazaki T, et al. (2004) Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension. *EMBO J* 23: 1998-2008.
15. Lindholm P, Saarma M (2010) Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Dev Neurobiol* 70: 360-371.
16. Airavaara M, Shen H, Kuo CC, Peranen J, Saarma M, et al. (2009) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor reduces ischemic brain injury and promotes behavioral recovery in rats. *J Comp Neurol* 515: 116-124.
17. Lindholm P, Peranen J, Andressoo JO, Kalkkinen N, Kokaia Z, et al. (2008) MANF is widely expressed in mammalian tissues and differently regulated after ischemic and epileptic insults in rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 39: 356-371.

18. Lindholm P, Voutilainen MH, Lauren J, Peranen J, Leppanen VM, et al. (2007) Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* 448: 73-77.
19. Palgi M, Lindstrom R, Peranen J, Piepponen TP, Saarma M, et al. (2009) Evidence that DmMANF is an invertebrate neurotrophic factor supporting dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2429-2434.
20. Petrova P, Raibekas A, Pevsner J, Vigo N, Anafi M, et al. (2003) MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. *J Mol Neurosci* 20: 173-188.
21. Voutilainen MH, Back S, Porsti E, Toppinen L, Lindgren L, et al. (2009) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 29: 9651-9659.
22. Saarma M (2000) GDNF - a stranger in the TGF-beta superfamily? *Eur J Biochem* 267: 6968-6971.
23. Knowles PP, Murray-Rust J, Kjaer S, Scott RP, Hanrahan S, et al. (2006) Structure and chemical inhibition of the RET tyrosine kinase domain. *J Biol Chem* 281: 33577-33587.
24. Kramer ER, Liss B (2015) GDNF-Ret signaling in midbrain dopaminergic neurons and its implication for Parkinson disease. *FEBS Lett* 589: 3760-3772.
25. Klein RD, Sherman D, Ho WH, Stone D, Bennett GL, et al. (1997) A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. *Nature* 387: 717-721.
26. Widenfalk J, Nosrat C, Tomac A, Westphal H, Hoffer B, et al. (1997) Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-beta (GDNFR-beta), novel proteins related to GDNF and GDNFR-alpha with specific cellular patterns of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs. *J Neurosci* 17: 8506-8519.
27. Horger BA, Nishimura MC, Armanini MP, Wang LC, Poulsen KT, et al. (1998) Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 18: 4929-4937.
28. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260: 1130-1132.
29. Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibanez CF (1995) GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron* 15: 1465-1473.
30. Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, et al. (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266: 1062-1064.
31. Mount HT, Dean DO, Alberch J, Dreyfus CF, Black IB (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival and morphologic differentiation of Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9092-9096.
32. Friedman W (2012) Chapter 29 - Growth Factors A2 - Brady, Scott T. In: Siegel GJ, Albers RW, Price DL, editors. *Basic Neurochemistry* (Eighth Edition). New York: Academic Press. pp. 546-557.
33. Erickson JT, Brosenitsch TA, Katz DM (2001) Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo. *J Neurosci* 21: 581-589.
34. Saarma M, Sariola H (1999) Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech* 45: 292-302.

35. Sidorova YA, Saarma M (2016) [Glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands and their therapeutic potential]. *Mol Biol (Mosk)* 50: 589-598.
36. Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden JP, Creedon DJ, et al. (1996) Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 384: 467-470.
37. Fjord-Larsen L, Johansen JL, Kusk P, Tornoe J, Gronborg M, et al. (2005) Efficient in vivo protection of nigral dopaminergic neurons by lentiviral gene transfer of a modified Neurturin construct. *Exp Neurol* 195: 49-60.
38. Creedon DJ, Tansey MG, Baloh RH, Osborne PA, Lampe PA, et al. (1997) Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7018-7023.
39. Wang LC, Shih A, Hongo J, Devaux B, Hynes M (2000) Broad specificity of GDNF family receptors GFRalpha1 and GFRalpha2 for GDNF and NTN in neurons and transfected cells. *J Neurosci Res* 61: 1-9.
40. Akerud P, Alberch J, Eketjall S, Wagner J, Arenas E (1999) Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin on developing and adult substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neurochem* 73: 70-78.
41. Wan G, Zhou L, Lim Q, Wong YH, Too HP (2011) Cyclic AMP signalling through PKA but not Epac is essential for neurturin-induced biphasic ERK1/2 activation and neurite outgrowths through GFRalpha2 isoforms. *Cell Signal* 23: 1727-1737.
42. Bizon JL, Lauterborn JC, Gall CM (1999) Subpopulations of striatal interneurons can be distinguished on the basis of neurotrophic factor expression. *J Comp Neurol* 408: 283-298.
43. Barroso-Chinea P, Cruz-Muros I, Aymerich MS, Rodriguez-Diaz M, Afonso-Oramas D, et al. (2005) Striatal expression of GDNF and differential vulnerability of midbrain dopaminergic cells. *Eur J Neurosci* 21: 1815-1827.
44. Cho J, Kholodilov NG, Burke RE (2004) Patterns of developmental mRNA expression of neurturin and GFRalpha2 in the rat striatum and substantia nigra do not suggest a role in the regulation of natural cell death in dopamine neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 148: 143-149.
45. Heuckeroth RO, Enomoto H, Grider JR, Golden JP, Hanke JA, et al. (1999) Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* 22: 253-263.
46. Rossi J, Luukko K, Poteryaev D, Laurikainen A, Sun YF, et al. (1999) Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR alpha2, a functional neurturin receptor. *Neuron* 22: 243-252.
47. Hiltunen PH, Airaksinen MS (2004) Sympathetic cholinergic target innervation requires GDNF family receptor GFR alpha 2. *Mol Cell Neurosci* 26: 450-457.
48. Wanigasekara Y, Airaksinen MS, Heuckeroth RO, Milbrandt J, Keast JR (2004) Neurturin signalling via GFRalpha2 is essential for innervation of glandular but not muscle targets of sacral parasympathetic ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci* 25: 288-300.
49. Runeberg-Roos P, Saarma M (2007) Neurotrophic factor receptor RET: structure, cell biology, and inherited diseases. *Ann Med* 39: 572-580.
50. Kramer ER, Aron L, Ramakers GM, Seitz S, Zhuang X, et al. (2007) Absence of Ret signaling in mice causes progressive and late degeneration of the nigrostriatal system. *PLoS Biol* 5: e39.
51. Holm PC, Akerud P, Wagner J, Arenas E (2002) Neurturin is a neuritogenic but not a survival factor for developing and adult central noradrenergic neurons. *J Neurochem* 81: 1318-1327.



52. Bartus RT, Herzog CD, Bishop K, Ostrove JM, Tuszynski M, et al. (2007) Issues regarding gene therapy products for Parkinson's disease: the development of CERE-120 (AAV-NTN) as one reference point. *Parkinsonism Relat Disord* 13 Suppl 3: S469-477.
53. Gasmi M, Brandon EP, Herzog CD, Wilson A, Bishop KM, et al. (2007) AAV2-mediated delivery of human neurturin to the rat nigrostriatal system: long-term efficacy and tolerability of CERE-120 for Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 27: 67-76.
54. Gasmi M, Herzog CD, Brandon EP, Cunningham JJ, Ramirez GA, et al. (2007) Striatal delivery of neurturin by CERE-120, an AAV2 vector for the treatment of dopaminergic neuron degeneration in Parkinson's disease. *Mol Ther* 15: 62-68.
55. Herzog CD, Brown L, Gammon D, Kruegel B, Lin R, et al. (2009) Expression, bioactivity, and safety 1 year after adeno-associated viral vector type 2-mediated delivery of neurturin to the monkey nigrostriatal system support cere-120 for Parkinson's disease. *Neurosurgery* 64: 602-612; discussion 612-603.
56. Herzog CD, Dass B, Gasmi M, Bakay R, Stansell JE, et al. (2008) Transgene expression, bioactivity, and safety of CERE-120 (AAV2-neurturin) following delivery to the monkey striatum. *Mol Ther* 16: 1737-1744.
57. Herzog CD, Dass B, Holden JE, Stansell J, 3rd, Gasmi M, et al. (2007) Striatal delivery of CERE-120, an AAV2 vector encoding human neurturin, enhances activity of the dopaminergic nigrostriatal system in aged monkeys. *Mov Disord* 22: 1124-1132.
58. Kordower JH, Herzog CD, Dass B, Bakay RA, Stansell J, 3rd, et al. (2006) Delivery of neurturin by AAV2 (CERE-120)-mediated gene transfer provides structural and functional neuroprotection and neurorestoration in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol* 60: 706-715.
59. Ramaswamy S, McBride JL, Han I, Berry-Kravis EM, Zhou L, et al. (2009) Intrastriatal CERE-120 (AAV-Neurturin) protects striatal and cortical neurons and delays motor deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 34: 40-50.
60. Ramaswamy S, McBride JL, Herzog CD, Brandon E, Gasmi M, et al. (2007) Neurturin gene therapy improves motor function and prevents death of striatal neurons in a 3-nitropropionic acid rat model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 26: 375-384.
61. Marks WJ, Jr., Bartus RT, Siffert J, Davis CS, Lozano A, et al. (2010) Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol* 9: 1164-1172.
62. Marks WJ, Jr., Baumann TL, Bartus RT (2016) Long-Term Safety of Patients with Parkinson's Disease Receiving rAAV2-Neurturin (CERE-120) Gene Transfer. *Hum Gene Ther* 27: 522-527.
63. Warren Olanow C, Bartus RT, Baumann TL, Factor S, Boulis N, et al. (2015) Gene delivery of neurturin to putamen and substantia nigra in Parkinson disease: A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann Neurol* 78: 248-257.
64. Cohen G, Heikkila RE (1974) The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* 249: 2447-2452.
65. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, et al. (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65: 135-172.
66. Andrew R, Watson DG, Best SA, Midgley JM, Wenlong H, et al. (1993) The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochem Res* 18: 1175-1177.

67. Bove J, Perier C (2012) Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 211: 51-76.
68. Glinka Y, Gassen M, Youdim MBH. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. In: Riederer P, Calne DB, Horowski R, Mizuno Y, Poewe W et al., editors; 1997 1997//; Vienna. Springer Vienna. pp. 55-66.
69. Tarabin V, Schwaninger M (2004) The role of NF-kappaB in 6-hydroxydopamine- and TNFalpha-induced apoptosis of PC12 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369: 563-569.
70. Hanrott K, Murray TK, Orfali Z, Ward M, Finlay C, et al. (2008) Differential activation of PKC delta in the substantia nigra of rats following striatal or nigral 6-hydroxydopamine lesions. *Eur J Neurosci* 27: 1086-1096.
71. Lu X, Kim-Han JS, Harmon S, Sakiyama-Elbert SE, O'Malley KL (2014) The Parkinsonian mimetic, 6-OHDA, impairs axonal transport in dopaminergic axons. *Mol Neurodegener* 9: 17.
72. Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, et al. (2000) Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol* 60: 409-470.
73. Beck KD, Valverde J, Alexi T, Poulsen K, Moffat B, et al. (1995) Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature* 373: 339-341.
74. Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909.
75. Hernandez-Baltazar D, Mendoza-Garrido ME, Martinez-Fong D (2013) Activation of GSK-3beta 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.
76. Hernandez-Baltazar D, Martinez-Fong D, Trudeau LE (2012) Optimizing NTS-polyplex as a tool for gene transfer to cultured dopamine neurons. *PLoS One* 7: e51341.
77. Alvarez-Maya I, Navarro-Quiroga I, Meraz-Rios MA, Aceves J, Martinez-Fong D (2001) In vivo gene transfer to dopamine neurons of rat substantia nigra via the high-affinity neurotensin receptor. *Mol Med* 7: 186-192.
78. Arango-Rodriguez ML, Navarro-Quiroga I, Gonzalez-Barrios JA, Martinez-Arguelles DB, Bannon MJ, et al. (2006) Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection. *Biochim Biophys Acta* 1760: 1009-1020.
79. Martinez-Fong D, Bannon MJ, Trudeau LE, Gonzalez-Barrios JA, Arango-Rodriguez ML, et al. (2012) NTS-Polyplex: a potential nanocarrier for neurotrophic therapy of Parkinson's disease. *Nanomedicine*.
80. Martinez-Fong D, Navarro-Quiroga I (2000) Synthesis of a non-viral vector for gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor. *Brain Res Brain Res Protoc* 6: 13-24.
81. Gonzalez-Barrios JA, Lindahl M, Bannon MJ, Anaya-Martinez V, Flores G, et al. (2006) Neurotensin polyplex as an efficient carrier for delivering the human GDNF gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats. *Mol Ther* 14: 857-865.
82. Hernandez-Chan NG, Bannon MJ, Orozco-Barrios CE, Escobedo L, Zamudio S, et al. (2015) Neurotensin-polyplex-mediated brain-derived neurotrophic factor gene delivery into nigral dopamine neurons prevents nigrostriatal degeneration in a rat model of early Parkinson's disease. *J Biomed Sci* 22: 59.

83. Martinez-Fong D, Navarro-Quiroga I, Ochoa I, Alvarez-Maya I, Meraz MA, et al. (1999) Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells. *Brain Res Mol Brain Res* 69: 249-262.
84. Navarro-Quiroga I, Antonio Gonzalez-Barrios J, Barron-Moreno F, Gonzalez-Bernal V, Martinez-Arguelles DB, et al. (2002) Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 nuclear localization signal. *Brain Res Mol Brain Res* 105: 86-97.
85. Razgado-Hernandez LF, Espadas-Alvarez AJ, Reyna-Velazquez P, Sierra-Sanchez A, Anaya-Martinez V, et al. (2015) The transfection of BDNF to dopamine neurons potentiates the effect of dopamine D3 receptor agonist recovering the striatal innervation, dendritic spines and motor behavior in an aged rat model of Parkinson's disease. *PLoS One* 10: e0117391.
86. Espadas-Alvarez AJ, Bannon MJ, Orozco-Barrios CE, Escobedo-Sanchez L, Ayala-Davila J, et al. (2017) Regulation of human GDNF gene expression in nigral dopaminergic neurons using a new doxycycline-regulated NTS-polyplex nanoparticle system. *Nanomedicine* 13: 1363-1375.
87. Hernandez ME, Rembao JD, Hernandez-Baltazar D, Castillo-Rodriguez RA, Tellez-Lopez VM, et al. (2014) Safety of the intravenous administration of neurotensin-polyplex nanoparticles in BALB/c mice. *Nanomedicine* 10: 745-754.
88. Orozco-Barrios CE, Battaglia-Hsu SF, Arango-Rodriguez ML, Ayala-Davila J, Chery C, et al. (2009) Vitamin B12-impaired metabolism produces apoptosis and Parkinson phenotype in rats expressing the transcobalamin-oleosin chimera in substantia nigra. *PLoS One* 4: e8268.
89. Pons L, Battaglia-Hsu SF, Orozco-Barrios CE, Ortiou S, Chery C, et al. (2009) Anchoring secreted proteins in endoplasmic reticulum by plant oleosin: the example of vitamin B12 cellular sequestration by transcobalamin. *PLoS One* 4: e6325.
90. Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, Alberto JM, Jeannesson E, et al. (2009) Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21930-21935.
91. Nadella R, Voutilainen MH, Saarma M, Gonzalez-Barrios JA, Leon-Chavez BA, et al. (2014) Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced neuroinflammation in the rat substantia nigra. *J Neuroinflammation* 11: 209.
92. Yi X, Manickam DS, Brynskikh A, Kabanov AV (2014) Agile delivery of protein therapeutics to CNS. *J Control Release* 190: 637-663.
93. Patel MM, Goyal BR, Bhadada SV, Bhatt JS, Amin AF (2009) Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery. *CNS Drugs* 23: 35-58.
94. Grondin R, Zhang Z, Ai Y, Gash DM, Gerhardt GA (2003) Intracranial delivery of proteins and peptides as a therapy for neurodegenerative diseases. *Prog Drug Res* 61: 101-123.
95. Salvatore MF, Ai Y, Fischer B, Zhang AM, Grondin RC, et al. (2006) Point source concentration of GDNF may explain failure of phase II clinical trial. *Exp Neurol* 202: 497-505.
96. Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, et al. (2003) Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 60: 69-73.

97. Trapani A, De Giglio E, Cafagna D, Denora N, Agrimi G, et al. (2011) Characterization and evaluation of chitosan nanoparticles for dopamine brain delivery. *Int J Pharm* 419: 296-307.
98. Yurek D, Hasselrot U, Sesenoglu-Laird O, Padegimas L, Cooper M (2017) Intracerebral injections of DNA nanoparticles encoding for a therapeutic gene provide partial neuroprotection in an animal model of neurodegeneration. *Nanomedicine* 13: 2209-2217.
99. Guo X, Huang L (2011) Recent Advances in Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Acc Chem Res*.
100. Huang R, Han L, Li J, Ren F, Ke W, et al. (2009) Neuroprotection in a 6-hydroxydopamine-lesioned Parkinson model using lactoferrin-modified nanoparticles. *J Gene Med* 11: 754-763.
101. Su L, Zhang B, Huang Y, Zhang H, Xu Q, et al. (2017) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles modified with dimyristoylphosphatidylcholine and their distribution in the brain after injection in the rat substantia nigra. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 81: 400-406.
102. Bartus RT (2012) Translating the therapeutic potential of neurotrophic factors to clinical 'proof of concept': a personal saga achieving a career-long quest. *Neurobiol Dis* 48: 153-178.
103. Bartus RT, Baumann TL, Siffert J, Herzog CD, Alterman R, et al. (2013) Safety/feasibility of targeting the substantia nigra with AAV2-neurturin in Parkinson patients. *Neurology* 80: 1698-1701.
104. Bartus RT, Brown L, Wilson A, Kruegel B, Siffert J, et al. (2011) Properly scaled and targeted AAV2-NRTN (neurturin) to the substantia nigra is safe, effective and causes no weight loss: support for nigral targeting in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 44: 38-52.
105. Bartus RT, Weinberg MS, Samulski RJ (2014) Parkinson's disease gene therapy: success by design meets failure by efficacy. *Mol Ther* 22: 487-497.
106. Herzog CD, Brown L, Kruegel BR, Wilson A, Tansey MG, et al. (2013) Enhanced neurotrophic distribution, cell signaling and neuroprotection following substantia nigral versus striatal delivery of AAV2-NRTN (CERE-120). *Neurobiol Dis* 58C: 38-48.
107. Runeberg-Roos P, Piccinini E, Penttinen AM, Matlik K, Heikkinen H, et al. (2016) Developing therapeutically more efficient Neurturin variants for treatment of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 96: 335-345.
108. Martinez-Fong D, Bannon MJ, Trudeau LE, Gonzalez-Barrios JA, Arango-Rodriguez ML, et al. (2012) NTS-Polyplex: a potential nanocarrier for neurotrophic therapy of Parkinson's disease. *Nanomedicine* 8: 1052-1069.
109. Goldman LA, Cutrone EC, Kotenko SV, Krause CD, Langer JA (1996) Modifications of vectors pEF-BOS, pcDNA1 and pcDNA3 result in improved convenience and expression. *Biotechniques* 21: 1013-1015.
110. Mizushima S, Nagata S (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* 18: 5322.
111. Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*: Academic Press.
112. Tiehua HaP, T K (1996) Liquid Chromatographic Determination of Serotonin in Homogenized Dog Intestine and Rat Brain Tissue Using a 2 mm i.d. PEEK Column. *Current Separations* 14: 114-119

113. Feria-Velasco A, Karnovsky MJ (1970) [Optimal central nervous system preservation with glutaraldehyde perfusion for ultrastructural study]. *Arch Invest Med (Mex)* 1: 201-220.
114. Gonzalez-Burgos I, Tapia-Arizmendi G, Feria-Velasco A (1992) Golgi method without osmium tetroxide for the study of the central nervous system. *Biotech Histochem* 67: 288-296.
115. Sholl DA (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87: 387-406.
116. Gonzalez-Burgos I (2009) Dendritic spines plasticity and learning/memory processes: Theory, evidence and perspectives. Baylog LR, editor *Dendritic spines: Biochemistry, modelling and properties Neuroscience Research Progress*,: 163-186.
117. Gonzalez-Burgos I (2012) From synaptic transmission to cognition: an intermediary role for dendritic spines. *Brain Cogn* 80: 177-183.
118. Tarelo-Acuna L, Olvera-Cortes E, Gonzalez-Burgos I (2000) Prenatal and postnatal exposure to ethanol induces changes in the shape of the dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal neurons of the rat. *Neurosci Lett* 286: 13-16.
119. Harris KM, Jensen, F.E., Tsao, B. (1989) Ultrastructure, development, and plasticity of dendritic spine synapses in area CA1 of the rat hippocampus: Extending our vision with serial electron microscopy and three-dimensional analyses. Cham-Palay V, Kohler, C, editor *The Hippocampus New Vistas* 52: 33-52.
120. Hernandez ME, Rembao JD, Hernandez-Baltazar D, Castillo-Rodriguez RA, Tellez-Lopez VM, et al. (2013) Safety of the intravenous administration of neurotensin-polyplex nanoparticles in BALB/c mice. *Nanomedicine*.
121. Castillo-Rodriguez RA, Arango-Rodriguez ML, Escobedo L, Hernandez-Baltazar D, Gompel A, et al. (2014) Suicide HSVtk gene delivery by neurotensin-polyplex nanoparticles via the bloodstream and GCV Treatment specifically inhibit the growth of human MDA-MB-231 triple negative breast cancer tumors xenografted in athymic mice. *PLoS One* 9: e97151.
122. Aranda-Barradas ME, Marquez M, Quintanar L, Santoyo-Salazar J, Espadas-Alvarez AJ, et al. (2018) Development of a Parenteral Formulation of NTS-Polyplex Nanoparticles for Clinical Purpose. *Pharmaceutics* 10.
123. Daubner SC, Le T, Wang S (2011) Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys* 508: 1-12.
124. Gard DL, Kirschner MW (1985) A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *J Cell Biol* 100: 764-774.
125. Uhl GR, Whitehouse PJ, Price DL, Tourtelotte WW, Kuhar MJ (1984) Parkinson's disease: depletion of substantia nigra neurotensin receptors. *Brain Res* 308: 186-190.
126. Castel MN, Beaudet A, Laduron PM (1994) Retrograde axonal transport of neurotensin in rat nigrostriatal dopaminergic neurons. Modulation during ageing and possible physiological role. *Biochem Pharmacol* 47: 53-62.
127. Katsetos CD, Legido A, Perentes E, Mork SJ (2003) Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J Child Neurol* 18: 851-866; discussion 867.
128. Deutch AY, Colbran RJ, Winder DJ (2007) Striatal plasticity and medium spiny neuron dendritic remodeling in parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 13 Suppl 3: S251-258.

129. Solis O, Limon DI, Flores-Hernandez J, Flores G (2007) Alterations in dendritic morphology of the prefrontal cortical and striatum neurons in the unilateral 6-OHDA-rat model of Parkinson's disease. *Synapse* 61: 450-458.
130. Villalba RM, Smith Y (2010) Striatal spine plasticity in Parkinson's disease. *Front Neuroanat* 4: 133.
131. Woodlee MT, Kane JR, Chang J, Cormack LK, Schallert T (2008) Enhanced function in the good forelimb of hemi-parkinson rats: compensatory adaptation for contralateral postural instability? *Exp Neurol* 211: 511-517.
132. Anstrom KK, Schallert T, Woodlee MT, Shattuck A, Roberts DC (2007) Repetitive vibrissae-elicited forelimb placing before and immediately after unilateral 6-hydroxydopamine improves outcome in a model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 179: 183-191.
133. Hernandez-Chan NG, Zamudio S, Escobedo L, De La Cruz F, Gongora-Alfaro JL, et al. (2008) BDNF-Flag Gene Transfer by NT-Polyplex to Nigral Dopaminergic Neurons Causes Morphological and Functional Recovery from Hemiparkinsonism in the Rat. *Mol Ther* 16: 974.
134. Napier TC, Gay DA, Hulebak KL, Breese GR (1985) Behavioral and biochemical assessment of time-related changes in globus pallidus and striatal dopamine induced by intranigally administered neurotensin. *Peptides* 6: 1057-1068.
135. Lie DC, Dziewczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, et al. (2002) The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 22: 6639-6649.
136. Van Kampen JM, Eckman CB (2006) Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior. *J Neurosci* 26: 7272-7280.
137. Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, et al. (2003) Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7925-7930.
138. Chen Y, Ai Y, Slevin JR, Maley BE, Gash DM (2005) Progenitor proliferation in the adult hippocampus and substantia nigra induced by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol* 196: 87-95.
139. Frielingsdorf H, Schwarz K, Brundin P, Mohapel P (2004) No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10177-10182.
140. Steiner B, Winter C, Hosman K, Siebert E, Kempermann G, et al. (2006) Enriched environment induces cellular plasticity in the adult substantia nigra and improves motor behavior function in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 199: 291-300.
141. Worlitzer MM, Viel T, Jacobs AH, Schwamborn JC (2013) The majority of newly generated cells in the adult mouse substantia nigra express low levels of Doublecortin, but their proliferation is unaffected by 6-OHDA-induced nigral lesion or Minocycline-mediated inhibition of neuroinflammation. *Eur J Neurosci* 38: 2684-2692.
142. Hadaczek P, Johnston L, Forsayeth J, Bankiewicz KS (2010) Pharmacokinetics and bioactivity of glial cell line-derived factor (GDNF) and neurturin (NTN) infused into the rat brain. *Neuropharmacology* 58: 1114-1121.
143. Bernalov MM, Sidorova YA, Tumova S, Ahonen-Bishopp A, Magalhaes AC, et al. (2011) Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *J Cell Biol* 192: 153-169.

144. Hamilton JF, Morrison PF, Chen MY, Harvey-White J, Pernaute RS, et al. (2001) Heparin coinfusion during convection-enhanced delivery (CED) increases the distribution of the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) ligand family in rat striatum and enhances the pharmacological activity of neurturin. *Exp Neurol* 168: 155-161.
145. von Bartheld CS, Wang X, Butowt R (2001) Anterograde axonal transport, transcytosis, and recycling of neurotrophic factors: the concept of trophic currencies in neural networks. *Mol Neurobiol* 24: 1-28.
146. Schwartz JH (1979) Axonal transport: components, mechanisms, and specificity. *Annu Rev Neurosci* 2: 467-504.
147. Schindowski K, Belarbi K, Buee L (2008) Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav* 7 Suppl 1: 43-56.
148. Perez-Navarro E, Akerud P, Marco S, Canals JM, Tolosa E, et al. (2000) Neurturin protects striatal projection neurons but not interneurons in a rat model of Huntington's disease. *Neuroscience* 98: 89-96.
149. Vigers AJ, Amin DS, Talley-Farnham T, Gorski JA, Xu B, et al. (2012) Sustained expression of brain-derived neurotrophic factor is required for maintenance of dendritic spines and normal behavior. *Neuroscience* 212: 1-18.
150. Airaksinen MS, Holm L, Hatinen T (2006) Evolution of the GDNF family ligands and receptors. *Brain Behav Evol* 68: 181-190.
151. Schueler-Furman O, Glick E, Segovia J, Linial M (2006) Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands? *Trends Pharmacol Sci* 27: 72-77.
152. Lindholm D, Makela J, Di Liberto V, Mudo G, Belluardo N, et al. (2016) Current disease modifying approaches to treat Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* 73: 1365-1379.
153. Sarabi A, Hoffer BJ, Olson L, Morales M (2001) GFRalpha-1 mRNA in dopaminergic and nondopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 441: 106-117.
154. Andressoo JO, Saarma M (2008) Signalling mechanisms underlying development and maintenance of dopamine neurons. *Curr Opin Neurobiol* 18: 297-306.
155. Schmutzler BS, Roy S, Pittman SK, Meadows RM, Hingtgen CM (2011) Ret-dependent and Ret-independent mechanisms of Gfl-induced sensitization. *Mol Pain* 7: 22.
156. Parkash V, Goldman A (2009) Comparison of GFL-GFRalpha complexes: further evidence relating GFL bend angle to RET signalling. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 65: 551-558.
157. Hickey P, Stacy M (2013) AAV2-neurturin (CERE-120) for Parkinson's disease. *Expert Opin Biol Ther* 13: 137-145.