Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

"Envío dirigido de nanopartículas de hGDNF a neuronas dopaminérgicas nigrales por vía sistémica en ratas parkinsonianas con agregados de α-sinucleína"

Karen Michelle Delgado Minjares

Tesis para obtener el grado de

Maestría en Ciencias

En la especialidad de:

Neurobiología Celular y Molecular

Directores de tesis:

Dr. Daniel Martínez Fong

Dr. Luis Oskar Soto Rojas

Cómite tutoral:

Dra. Ma. Eugenia Mendoza Garrido

Dr. Porfirio Nava Domínguez

Ciudad de México, México. Enero de 2022

Dedicatoria

A mis hermanas Karla Janette Delgado Minjares y Cynthia Lizeth Delgado Minjares, por enseñarme a ser fuerte cuando no todo es color de rosa.

A todos los animales experimentales que dieron su vida en honor a la ciencia.

Agradecimientos académicos

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría otorgada durante el periodo 2019-2021 con número de registro 755218.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) y la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM (FES Iztacala), por las instalaciones brindadas para poder realizar este proyecto.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IA202021.

Al Dr. Daniel Martínez Fong, por recibirme en su grupo de trabajo para el desarrollo de este proyecto, por su tiempo y confianza invertidos. Así como sus consejos y enseñanzas que me servirán a lo largo de mi vida tanto profesional.

Al Dr. Luis Oskar Soto Rojas, por abrirme las puertas de su laboratorio y enseñarme tanto en tan poco tiempo, sin su apoyo no hubiera podido terminar la revisión y realizar todos los experimentos. Gracias por todas las asesorías y el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto.

A mi comité tutoral, la Dra. Ma. Eugenia Mendoza Garrido y el Dr. Porfirio Nava Domínguez, por sus enseñanzas y asesorías para mejorar este proyecto.

A Lourdes Escobedo, David Reyes, Ignacio y José Ayala, por su disposición en ayudarme siempre que tenía dudas.

A mis compañeros del laboratorio Bismark Gatica, Irais Valenzuela y Uriel Mascotte, por compartir sus conocimientos y ayudarme a realizar experimentos.

Agradecimientos personales

A Dios, por darme todo lo que tengo.

A mi familia, por todo el amor y cariño que me han brindado.

A mis padres, por instruirme y darme las herramientas necesarias para afrontar la vida, por apoyarme en mis decisiones a pesar de que no estén totalmente de acuerdo. Me hacen falta palabras para describir lo agradecida que estoy de ser su hija, son unos excelentes padres, gracias por siempre estar al pendiente de mí y mis hermanas.

A mis hermanas, Karla y Cynthia, por cuidarme y estar conmigo en los momentos más felices como en los más difíciles, son personas que realmente admiro y sé que llegaran muy lejos.

A mi amiga Brianna, por su amistad y motivarme a finalizar esta tesis.

A mi amiga There, por su inmensa bondad y sencillez que me ha permitido aprender muchas cosas buenas, espero que sigamos siendo amigas por mucho tiempo.

A mi amigo Kevyn, por su apoyo incondicional en estos 8 años, por ser el hermano que siempre quise, el novio que no quiero y mi mejor amigo. Gracias por enseñarme el verdadero valor de la amistad, por siempre creer en mí y en lo que puedo llegar a ser. Por todos los buenos consejos (que no sigo, pero los tengo presentes), me siento afortunada de ser tu amiga y espero que a pesar de que tomemos caminos diferentes siempre estemos presentes en la vida del otro.

A mi amiga Claudia, por su apoyo y ánimos para concluir esta tesis, por siempre ver el lado positivo de las cosas y contagiarme con su buen ánimo.

A mi amigo Rulo, por apoyarme desde el inicio de la maestría cuando no tenía beca, por todas las pláticas y risas que compartimos. Gracias por tu bonita y sincera amistad, espero que sigamos siendo amigos por mucho tiempo.

A mi amigo Amaury, por siempre escucharme, apoyarme y abrazarme cada vez que lo necesito. Gracias por estar conmigo en los momentos más difíciles, recuerda que yo siempre estaré para ti.

A mis amigos de la maestría Cecilia, Claudia, Grego, Lázaro, Sara, Victor y Victoria, por su amistad y todos los buenos momentos que compartimos durante estos dos años.

Al Dr. Oskar, por todo el apoyo académico, emocional y económico que me ha brindado, por recordarme que hacer ciencia es algo que se disfruta y que siempre habrá un nuevo día para hacer las cosas mejor. Estoy realmente agradecida por todo lo que me ha enseñado, por su bondad, paciencia y dedicación, que me impulsan a ser mejor persona y profesionista.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Irais, Paola Alejandra, Alexandra y Bismark por ayudarme y compartir tanto sus experiencias como conocimientos en el laboratorio. De igual forma, agradezco los momentos de diversión y risas.

Abreviaturas

6-OHDA	6-hidroxidopamina
ACC	Arteria carótida común
ACI	Arteria carótida interna
ACE	Arteria carótida externa
AP	Anteroposterior
BHE	Barrera hematoencefálica
BSSG	β-sitosterol β-D-glucósido
C1q	Subcomponente q
CD	Cúmulo de diferenciación-14
CD11b	Receptor antígeno de macrófago-1
CD36	Receptor scavenger clase B
DAB	3′3-diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DV	Dorsoventral
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EP	Enfermedad de Parkinson
EP2	Receptor 2 de prostaglandina E2
EROs	Especies reactivas de oxigeno
FcγR	Receptor Fc gamma
FITC	Isocianato de fluoresceína
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GFP	Proteína verde fluorescente
GFRα1	Receptor alfa-1 de la familia GDNF
hGDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía humano
i.v.	Intravenosa
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1α	Interleucina-1α
IL-1β	Interleucina-1β
IL-2	Interleucina-2
KDa	Kilodalton

LCR	Líquido cefalorraquídeo
L-DOPA	Levodopa
LPS	Lipopolisacáridos
MAP cinasas	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad II
MIP-1α	Proteína inflamatoria de macrófagos-1α
ML	Mediolateral
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina
NCAM	Molécula de adhesión celular neural
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NPs	Nanopartículas
NPs-hGDNF	NTS-poliplex con el gen para hGDNF
NTSR1	Receptor de neurotensina 1
P2X7R	Purinoceptor 7 P2X
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
p-rpS6	Proteína S6 fosfo-ribosomal
RET	Receptor tirosina quinasa
SN	*Substantia nigra*
SNC	Sistema nervioso central
SNpc	*Substantia nigra pars compacta*
TGF-α	Factor de crecimiento transformante alfa
TLR2	Receptor 2 tipo Toll
TLR4	Receptor 4 tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TRE	Elemento de respuesta a tetraciclina
ZO-1	Zonula occludens-1
AE	Azul de Evans
FAK	Cinasa de adhesión focal

Índice

1. Introducción 1
1.1 El papel de la α-sinucleína en la enfermedad de Parkinson 3
1.2 Neuroinflamación en la enfermedad de Parkinson 4
1.2.1 Activación microglial en la enfermedad de Parkinson 5
1.2.2 Activación astrocítica en la enfermedad de Parkinson 8
1.2.3 Mediadores inflamatorios 9
1.3 La neuroinflamación afecta la funcionalidad de la barrera hematoencefálica en la enfermedad de Parkinson 9
1.4 Neuroinflamación en modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson 13
1.5 GDNF: estructura, receptores y vías de señalización 17
1.5.1 Disminución de GDNF en la enfermedad de Parkinson 18
1.6 Efecto neuroregenerador y anti-neuroinflamatorio de GDNF en la enfermedad de Parkinson 19
1.7 Nanopartículas de GDNF como tratamiento para la enfermedad de Parkinson . 21
2. Planteamiento del problema 23
3. Hipótesis 24
4. Objetivos 25
4.1 Objetivo general 25
4.2 Objetivos específicos 25
5. Métodos 25
5.1 Declaración ética para el uso y manejo de animales experimentales 25
5.2 Grupos experimentales 25
5.3 Generación de ratas parkinsonianas con β-sitosterol β-D- glucósido 26
5.4 Evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica 27
5.4.1 Administración vía arteria carótida interna y externa 28
5.5 Prueba de colocación de extremidades anteriores evocadas por vibrisas 29
5.6 Síntesis de las Nanopartículas de hGDNF 29
5.7 Determinación de la expresión de hGDNF en las neuronas dopaminérgicas nigrales 30
5.8 Inmunohistoquímica 30
5.9 Análisis estadísticos 31

6. Resultados 32
6.1 Generación de ratas parkinsonianas con β-sitosterol β-D-glucósido 32
6.2 Extravasación del azul de Evans en el cuerpo de la rata 32
6.3 La administración vía arteria carótida interna no desencadena alteraciones sensoriomotoras 36
6.4 Aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al azul de Evans en ratas parkinsonianas 37
6.5 Determinación de relaciones molares óptimas para las NPs hGDNF 40
6.6 Expresión de hGDNF en neuronas dopaminérgicas nigrales mediante la administración intraarterial de NPs hGDNF 41
7. Discusión 43
8. Conclusión 47
9. Perspectivas para el futuro 47
10. Bibliografía 49
11. Apéndice 61

Índice de figuras

Figura 1. Interacción de los agregados patológicos de α-sinucleína con las células gliales, y su comunicación con las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson. 7
Figura 2. Mecanismos de transporte de la barrera hematoencefálica bajo condiciones fisiológicas. 11
Figura 3. Alteraciones de la barrera hematoencefálica en la enfermedad de Parkinson. 13
Figura 4. Nanopartículas de hGDNF y su internalización en las neuronas dopaminérgicas. 23
Figura 5. Diseño experimental. 31
Figura 6. Fotografías representativas del sitio de inyección con fucsina ácida por arriba de la SNpc en el mesencéfalo. 32
Figura 7. Administración de azul de Evans (AE) vía intravenosa (i.v.). 33
Figura 8. Administración del azul de Evans (AE) vía arteria carótida interna (ACI). 34
Figura 9. Administración del azul de Evans (AE) vía arteria carótida externa (ACE). 35
Figura 10. Alteraciones sensoriomotoras en la rata después de administrar dimetil sulfóxido (DMSO) y β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). 36
Figura 11. Alteraciones sensoriomotoras en la rata antes y después de la administración vía arteria carótida interna (ACI). 37
Figura 12. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica a los 4-7 días después de administrar dimetil sulfóxido (DMSO) y β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). 38
Figura 13. Cuantificación de la extravasación del azul de Evans (AE) en el cerebro a los 4-7 días después de la administración de dimetil sulfóxido (DMSO) y β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). 38
Figura 14. Curso temporal de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica con azul de Evans (AE) administrado vía intravenosa después de la inyección estereotáxica con dimetil sulfóxido (DMSO) y β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). Micrografías representativas de cortes cerebrales coronales del grupo de DMSO y 4, 7, 10 y 15 días posteriores a la administración de BSSG. 39
Figura 15. Cuantificación de la extravasación del azul de Evans (AE) en el cerebro a los 4, 7, 10 y 15 días después de la administración de dimetil sulfóxido (DMSO) y β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). 39
Figura 16. Geles de los ensayos de retardo y retención para las NPs hGDNF. a) Gel de retardo y b) Gel de retención. Las flechas amarillas y blancas indican la relación molar óptima para los geles de retardo y retención, respectivamente. 40
Figura 17. Expresión del hGDNF en las neuronas dopaminérgicas del modelo parkinsoniano inducido por la administración de β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). Micrografías representativas del mesencéfalo contra hGDNF y contrateñidas con Nissl en ratas parkinsonianas. 41
Figura 18. Expresión del hGDNF en las neuronas dopaminérgicas del modelo parkinsoniano inducido por la administración de β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG).

Micrografías representativas del mesencéfalo contra hGDNF y contrateñidas con Nissl en ratas parkinsonianas administradas con NPs hGDNF vía intranigral..... 42
Figura 19. Expresión del hGDNF en las neuronas dopaminérgicas del modelo parkinsoniano inducido por la administración de β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). Micrografías representativas del mesencéfalo contra hGDNF y contrateñidas con Nissl en ratas parkinsonianas administradas con NPs hGDNF vía arteria carótida interna (ACI)..... 42

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación entre las características de los modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson. 16
Tabla 2. Efecto anti-neuroinflamatorio de GDNF en la enfermedad de Parkinson..... 20
Tabla 3. Ensayos, grupos y cantidad de animales empleados para cada ensayo. 26

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más común que se caracteriza por alteraciones del comportamiento motor y no motor, degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal, agregación y diseminación de α-sinucleína y neuroinflamación acompañada de la ruptura de la barrera hematoencefálica (BBB). Recientemente, logramos reproducir estas marcas patológicas en la rata mediante una administración única y unilateral de β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG) en la sustancia negra (SN). La interrupción de la BBB en este modelo ofrece una oportunidad única para probar la administración sistémica de nanofármacos antiparkinsonianos al cerebro. Anteriormente demostramos que las nanopartículas NTS-polyplex con el gen humano del factor neurotrófico derivado de la glía (NPs-hGDNF) inyectadas intranigralmente ejercen un poderoso efecto neurorregenerador en el modelo parkinsoniano por 6-OHDA, que no genera agregados de α-sinucleína. Esta tesis exploró si las NPs-hGDNF administrado por vía intraarterial podría transfectar neuronas dopaminérgicas nigrales en ratas parkinsonianas mediante una inyección intranigral de BSSG (6 μg/μL de dimetilsulfóxido; DMSO). Usamos ratas parkinsonianas, un grupo de control con DMSO y un grupo de control sano (n = 3 ratas por grupo). Nuestros resultados de la administración a través de la vena caudal o la arteria carótida interna (ACI) del colorante azul de Evans (69 kDa) sugieren la ruptura de la BHE en los días 4 y 7 después de su administración. Además, la administración a través de ICA no desencadena alteraciones sensoriomotoras. Interesantemente, demostramos la expresión de hGDNF en células similares a neuronas en ambas SNs de ratas parkinsonianas al día cinco después de la inyección a través de ICA de 40 μL de NPs-hGDNF. Se obtuvieron resultados similares con la administración intranigral de 1 μL de NPs-hGDNF. Sin embargo, la cantidad de células hGDNF (+) fue mayor en la administración de ACI que en la inyección local, y la forma sana de las células sugiere el comienzo de la recuperación neuronal. Por el contrario, no se produjo expresión de hGDNF en los controles negativos utilizando ambas vías de administración. Nuestros resultados demuestran por primera vez la capacidad de las nanopartículas NTS-polyplex para administrar genes terapéuticos vía sistémica a las neuronas dopaminérgicas. Este avance es muy prometedor para la nanomedicina de la EP.

Palabras clave: enfermedad de Parkinson, β-sitosterol β-D-glucósido, barrera hematoencefálica, administración, arteria carótida interna, azul de Evans.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder characterized by motor and non-motor behavioral disturbances, nigrostriatal dopaminergic system degeneration, aggregation and spreading of pathological α-synuclein, and neuroinflammation accompanied by blood-brain barrier (BBB) breakdown. We recently succeeded in reproducing these pathological marks in the rat by a single and unilateral administration of β-sitosterol β-D-glucoside (BSSG) in the substantia nigra (SN). The BBB disruption in this model offers a unique opportunity to test the systemic delivery of antiparkinsonian nanodrugs to the brain. We previously demonstrated that NTS-polyplex nanoparticles with the human gene for glia-derived neurotrophic factor (NPs-hGDNF) intranigrally injected exerts a powerful neuroregenerative effect in the parkinsonian model by 6-OHDA, which does not generate α-synuclein aggregates. This thesis explored whether intra-arterially administered NPs-hGDNF could transfect nigral dopaminergic neurons in parkinsonian rats by BSSG (6 μg / μL of dimethyl sulfoxide; DMSO). We used parkinsonian rats, a DMSO control group, and a healthy control group (n=3 rats per group). Our results of the administration via the caudal vein or internal carotid artery (ICA) of Evans blue dye (69 kDa) suggest the rupture of the BBB at days 4 and 7 post-administration. Besides, the administration via ICA did not elicit sensorimotor disturbances. Interestingly, we demonstrated hGDNF expression in neuron-like cells in both SNs of parkinsonian rats on day five after injection via ICA of 40 μL of NPs-hGDNF. Similar results were obtained with the intranigral administration of 1 μL of NPs-hGDNF. However, the amount of hGDNF (+) cells was higher in ACI administration than in local injection, and the healthy cellular shape suggests the beginning of neuronal recovery. In contrast, no hGDNF expression occurred in the negative controls using both routes of administration. Our results demonstrate for the first time the ability of NTS-polyplex nanoparticles to deliver therapeutic genes systemically to dopaminergic neurons. This advancement holds great promise for the nanomedicine of PD.

Keywords: Parkinson's disease, β-sitosterol β-D-glucoside, blood-brain barrier, administration, internal carotid artery, Evans blue.

1. Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más común y afecta a alrededor de 10 millones de personas en el mundo y se estima que en los próximos 30 años su prevalencia se duplicará, debido al incremento en la esperanza de vida (1, 2). La incidencia de esta enfermedad aumenta con la edad, generalmente después de los 45 años, y tiene un mayor impacto en la población masculina (3, 4). En México, la tasa de incidencia de la EP fue de 37.92 por cada 100,000 habitantes en el período 2014-2017 (5). Los síntomas motores característicos de la EP son bradiquinesia, temblor (de intensión o de reposos), rigidez e inestabilidad postural, los cuales están asociados con la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (6). Generalmente, los síntomas aparecen cuando hay una pérdida del 50% de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y el 80% de la dopamina en el núcleo estriado, hasta el momento se siguen debatiendo los mecanismos que dan lugar a esta muerte neuronal (6, 7). Por otra parte, los síntomas no motores pueden manifestarse en el transcurso de la enfermedad, tales como ansiedad, depresión, alteración en los patrones de sueño, disfunción autonómica y cognitiva. Estos síntomas son resultado de la degeneración de los sistemas dopaminérgicos, noradrenérgicos, serotoninérgicos y colinérgicos en diferentes estructuras cerebrales (8, 9).

Además de la pérdida de neuronas dopaminérgicas, otra marca patognomónica de esta enfermedad son la presencia de los denominados cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy, compuestos principalmente de agregados proteicos de α-sinucleína (10). Los agregados insolubles de dicha proteína se pueden encontrar en diferentes patologías tanto en las neuronas como en la glía, adjudicándole el término de α-sinucleinopatías, siendo la EP la más común de estas (11). De manera interesante, se ha propuesto que los agregados patológicos de α-sinucelína ocasionan neuroinflamación, la cual es considerada como la tercera marca patológica de la EP. La neuroinflamación se caracteriza por la liberación de mediadores inflamatorios, y la presencia de microglía activa y astrocitos reactivos, donde estas células gliales se encargan de vigilar el microambiente y mantener la homeostasis cerebral, entre otras funciones (12).

Diversos estudios han demostrado que los agregados extracelulares insolubles de α-sinucleína inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias en la microglía (13). De esta manera, se ha sugerido que la α-sinucleína patológica puede contribuir a aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual es una barrera física que bajo condiciones fisiológicas limita el paso de sustancias presentes en el torrente sanguine al encéfalo. Sin embargo, bajo condiciones patológicas como es la presencia de agregados de α-sinucleína, la BHE puede permitir la infiltración de linfocitos de la circulación periférica al parénquima cerebral (6). Actualmente, no se sabe si el ambiente crónico neuroinflamatorio es una causa o consecuencia de la neurodegeneración. Sin embargo, se propone que la neuroinflamación crónica promueve la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgica (2, 6, 14, 15).

En cuanto a los tratamientos actualmente disponibles para la EP, se encuentra la estimulación cerebral profunda y algunos fármacos que reemplazan la pérdida de dopamina como levodopa (L-DOPA) o agonistas dopaminérgicos. No obstante, estos tratamientos no detienen la progresión de la enfermedad y solo alivian transitoriamente los síntomas motores (10, 16). Por lo tanto, es necesario desarrollar terapias más efectivas que atiendan las deficiencias actuales. En los últimos años, los ensayos clínicos y abordajes terapéuticos se han enfocado en el uso de factores neurotróficos. Los factores neurotróficos son biomoléculas que intervienen en la proliferación y supervivencia de neuronas dopaminérgicas durante el desarrollo cerebral y juegan un papel crucial en la supervivencia neuronal y en la plasticidad sináptica del cerebro adulto (17, 18). Para esta tesis, es de interés el GDNF por su acción en el mantenimiento y regeneración de neuronas dopaminérgicas, y su supuesto efecto anti-inflamatorio (disminución de la activación de microglía, astrocitos y algunas citocinas pro-inflamatorias) (19-22). En estudios preclínicos de terapia génica usando GDNF se demostró que regenera el sistema dopaminérgico nigroestriatal (90 ± 8% en el estriado y 50 ± 4% en la SN), reduce la neuroinflamación y disminuye las alteraciones motoras (21, 23-25). Sin embargo, estos abordajes preclínicos no representan fidedignamente la EP porque se ensayaron en modelos animales que no generan agregados patológicos de α-sinucleína. Además, la terapia génica que emplea NPs como

el NTS-poliplex con el gen para hGDNF (NPs-hGDNF) se realiza inyectándolas directamente en la SN, debido a que hasta el momento estas NPs no pueden atravesar la BHE, por consiguiente, la BHE representa una limitante para la entrega de fármacos dirigidos al cerebro mediante el torrente sanguíneo (23, 26, 27). Por lo tanto, la utilización de un modelo animal de la EP que presente apertura de la BHE y la generación de agregados de α-sinucleína, sería de gran utilidad para explorar la administración sistémica de las NPs-hGDNF.

1.1 El papel de la α-sinucleína en la enfermedad de Parkinson

La α-sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos (14 kDa) codificada por el gen *SNCA* y se expresa principalmente en la neocorteza, hipocampo, SN, tálamo y cerebelo (28). Se localiza en las terminales presinápticas, cerca de las vesículas sinápticas, por lo que se sugiere que puede participar en el tráfico vesicular, reciclamiento y liberación de neurotransmisores (29). Otras funciones atribuidas a esta proteína son la supresión de la apoptosis en neuronas dopaminérgicas, regulación de los niveles de glucosa y ácidos grasos poliinsaturados, modulación de la actividad de la calmodulina, comportamiento de chaperona molecular, regulación de la biosíntesis de dopamina, entre otras (28).

En la EP, se han reconocido mutaciones puntuales del gen *SCNA* (A53T, A30P, E46K, G51G, y H50Q), multiplicaciones del gen completo y la presentación de variantes polimórficas (factor de riesgo para el desarrollo de la EP idiopático) que darían lugar al mal plegamiento de la proteína, ocasionando que la proteína forme agregados de α-sinucleína principalmente, oligómeros y fibrillas. Las fibrillas de α-sinucleína son un componente clave de los cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy (30-33). De manera interesante, estas marcas patológicas se encuentran en otras regiones del cerebro y en el sistema nervioso periférico, lo cual contribuye a la aparición de los síntomas no motores de la EP. Por lo tanto, se ha sugerido que el aumento gradual en la patología de Lewy se debe a la propagación tipo prion de los agregados de α-sinucleína en otras células y regiones del cuerpo (10).

Estudios en cerebros *post mortem* de pacientes con la EP mostraron que la patología de Lewy no era un proceso aleatorio y que hay regiones específicas que se afectan primero, tal es el caso del bulbo olfatorio y el sistema nervioso entérico (34). Por consiguiente, se propusieron los estadios de Braak que permiten clasificar la progresión de la EP. En el estadio 1, los cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy se encuentran en el núcleo motor dorsal del nervio glosofaríngeo (IX)/ nervio vago (X) y el núcleo olfatorio anterior. En el estadio 2, se presentan en el núcleo del rafé y *locus coeruleus*. Mientras que en el estadio 3, se localizan en la SNpc. En el estadio 4, se ubican en la región CA2 del hipocampo y la mesocorteza temporal. Finalmente, en los estadios 5 y 6, se localizan en cortezas sensoriales y motoras primarias de orden superior (10, 35). Por lo tanto, Braak y colaboradores sugirieron que la patología de α-sinucleína inicia en el bulbo olfatorio y en el intestino, y se propagan a otras regiones del cerebro que se encuentran interconectadas (36). Otros estudios reportan evidencias que fundamentan la propagación bidireccional trans-sináptica de los agregados patológicos de α-sinucleína a través del nervio vago, que va del duodeno al tallo encefálico al estómago (37).

Estos agregados de α-sinucleína se puede encontrar tanto en el soma de las neuronas como en la periferia, donde interactúa con otras células como la microglía y los astrocitos. Por lo tanto, los agregados de α-sinucleína pueden actuar como iniciadores de la neuroinflamación en la EP, debido a que los agregados de α-sinucleína liberados de las neuronas ejercen una respuesta inflamatoria en la microglía, astrocitos y monocitos circundantes (13, 38).

1.2 Neuroinflamación en la enfermedad de Parkinson

Estudios recientes demuestran que la neuroinflamación es la tercera marca patológica de la EP y es determinante en la progresión de la enfermedad, aunque falta aclarar si es su causa o consecuencia (2, 6, 39). La neuroinflamación se relacionó por primera vez con la EP al encontrar un aumento de microglía reactiva fagocítica, el antígeno común de leucocitos y el receptor de interleucina-2 (IL-2) en especímenes de pacientes analizados *post mortem* (40). Estos hallazgos condujeron a considerar a la neuroinflamación en procesos neurodegenerativos (no infecciosos) y que se abordara

con los principios de la inmunología clásica derivada de procesos infecciosos (41). Recientemente, se ha encontrado que la microglía secreta interleucina-1α (IL-1α), el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) y el subcomponente q (C1q) que inducen un cambio en el fenotipo de los astrocitos, convirtiéndolos en astrocitos reactivos neurotóxicos A1 que liberan toxinas que inducen la muerte neuronal y de la glía (42).

1.2.1 Activación microglial en la enfermedad de Parkinson

Las células de la microglía son los macrófagos residentes del sistema nervioso central (SNC), y, forman parte de la respuesta inmune innata al actuar como células presentadoras de antígenos y con actividad fagocítica. La población de microglía representa entre el 5-10% de las células totales del cerebro (39, 43). Estas células del sistema inmune son altamente dinámicas, adoptando cambios morfológicos para los distintos estados en los que se encuentra el SNC, actuando como un indicador celular de daño (44). En condiciones fisiológicas, la microglía se denomina homeostática (microglía en reposo, ramificada o quiescente) y en estados patológicos sus cambios morfológicos están acompañados de cambios funcionales (39, 45). En la EP, la microglía se activa y realiza distintas funciones como fagocitosis de desechos, detectan la patología y secretan de factores pro- y anti-inflamatorios, que pueden exacerbar o disminuir la progresión de la enfermedad (46). Dicha microglía activada puede adoptar una morfología ameboide, preparada para el estrés (*stress-primed*), oscura o distrófica y ser del tipo pro-inflamatorio (fenotipo M1) o anti-inflamatorio (fenotipo M2) (39, 45). La identificación de cada uno de estos fenotipos se realiza a través de los marcadores cúmulo de diferenciación-14 (CD14), CD16, CD32, CD40, CD86 y complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII) para M1. Mientras que para M2, son CD206 y CD163. Sin embargo, la presencia de los marcadores mencionados anteriormente no es suficiente para diferenciar la microglía de los macrófagos periféricos, para esto se requiere de analizar la presencia de otros marcadores como son CD44 y CD169, los cuales se encuentran presente únicamente en los macrófagos periféricos (47).

En cuanto a la interacción de la microglía con la α-sinucleína extracelular, se ha reportado que existen receptores específicos dependiendo del estado de agregación de la α-sinucleína. Por ejemplo, los oligómeros de α-sinucleína extracelulares actúan como

agonistas endógenos del receptor 2 tipo Toll (TRL2) para inducir la activación de la respuesta inflamatoria de la microglía y su fenotipo neurotóxico (48, 49). También se ha observado que el receptor 4 tipo Toll (TLR4) media la fagocitosis de los agregados de α-sinucleína, la liberación de citocinas pro-inflamatorias y la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). Además, el receptor "scavenger" clase B (CD36) junto con el receptor Fc gamma (FcγR) regulan la captura microglial de α-sinucleína mal plegada (oligómeros y fibrillas, respectivamente), activan la vía de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) y el factor nuclear kappa B (NF-κB) promoviendo la transcripción de los componentes del inflamasoma NLRP3 y la secreción de moléculas pro-inflamatorias (50). Otros receptores microgliales involucrados en la unión de oligómeros son el receptor 2 de prostaglandina E2 (EP2) y el purinoceptor 7 P2X (P2X7R) que activan distintas vías de señalización que dan lugar a la secreción de prostanglandina E2 e interleucina-1β (IL-1β), respectivamente (22). Finalmente, los oligómeros y fibrillas de α-sinucleína se unen al receptor antígeno de macrófago-1 (CD11b) activando al inflamosoma NLRP3 (Figura 1b). En estudios *in vitro* se ha demostrado que este receptor contribuye a la muerte de neuronas dopaminérgicas inducida por la microglía (51). Por consiguiente, se puede sugerir que los agregados de α-sinucleína inducen el fenotipo pro-inflamatorio de la microglía mediante la interacción con receptores inmunes innatos clásicos activando sus vías de señalización (43). Esta activación microglial puede ocasionar la secreción de algunas citocinas pro-inflamatorias como la interleucina-1α (IL-1α), el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) y el subcomponente q (C1q) que inducen un cambio en el fenotipo de los astrocitos (Figura 1a) (42).

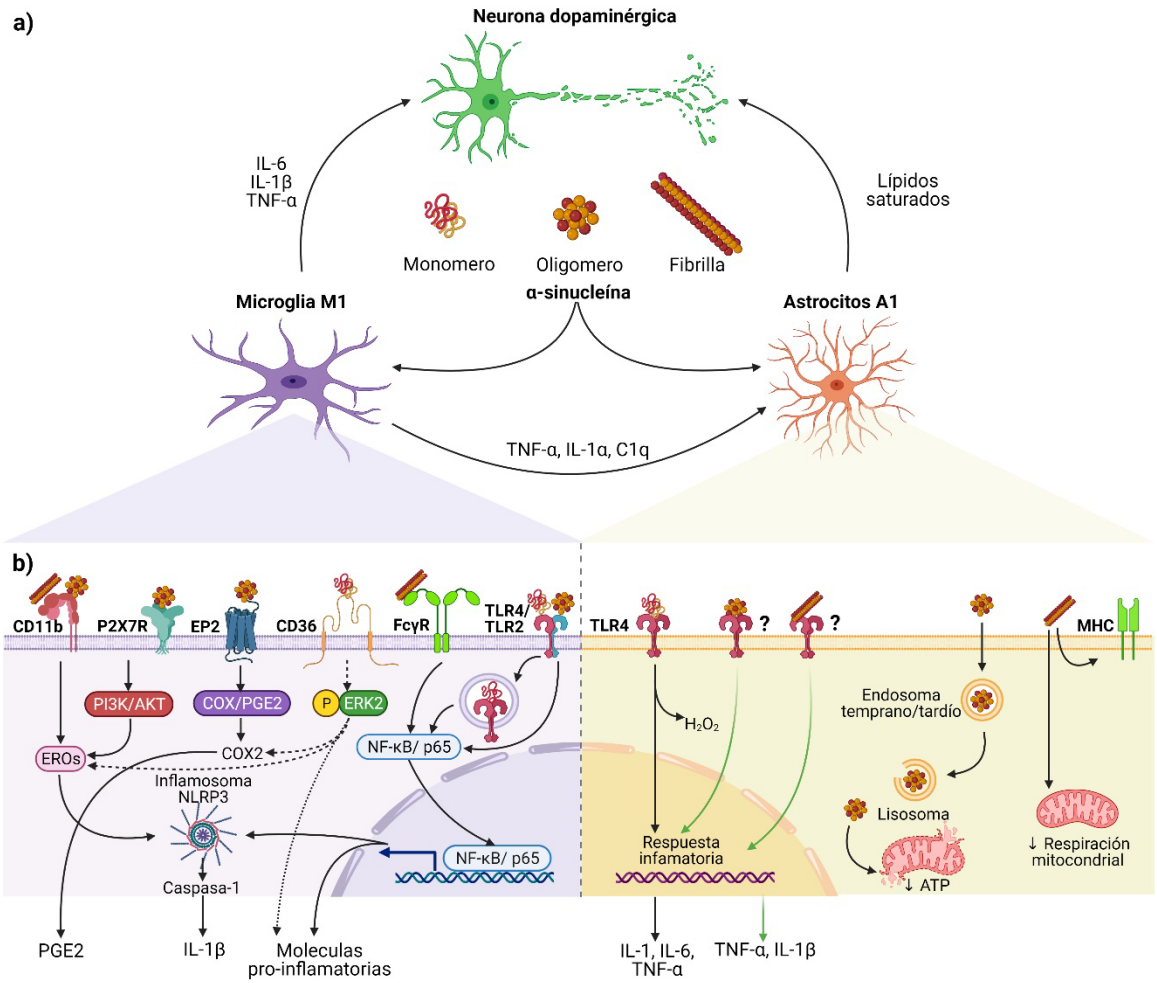

Figura 1. Interacción de los agregados patológicos de α-sinucleína con las células gliales, y su comunicación con las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson. a) Activación de células gliales por lo agregados de α-sinucleína patológica; b) Vías de señalización en microglía y astrocitos activadas por la interacción con diferentes estados de agregación de la α-sinucleína. **Abreviaturas:** ATP, Adenosín trifosfato; C1q, Subcomponente q; CD11b, Receptor antígeno de macrófago-1; CD36, Receptor scavenger clase B; COX, ciclooxigenasa; EP2, Receptor 2 de prostaglandina E2; ERK2, Cinasa 2 regulada por señales extracelulares, EROs, Especies reactivas de oxígeno; FcγR, Receptor Fc gamma; H_2O_2, peróxido de hidrógeno; IL, Interleucina; MAP cinasas, Proteínas cinasas activadas por mitógenos; MHC, Complejo mayor de la histocompatibilidad; NF-κB, Factor nuclear kappa B; P2X7R, Purinoceptor 7 P2X; PGE2, Prostaglandina E2; PI3K, Fosfatidilinositol 3 cinasa, TLR, Receptor tipo Toll; TNF-α, Factor de necrosis tumoral α. Esta figura fue creada con BioRender.com y modificada de (22).

1.2.2 Activación astrocítica en la enfermedad de Parkinson

Los astrocitos, del griego *astron*, estrella, debido a su forma característica de estrella presentan largos procesos que se conectan con otros tipos de células y son las células gliales especializadas más abundantes del SNC (43, 52). La función de los astrocitos es variada, contribuyen en el mantenimiento de la BHE, regulan la transmisión sináptica y el flujo sanguíneo cerebral. También se encargan de la producción de factores neurotróficos como GDNF (53).

Recientemente, se ha observado que los astrocitos presentan un cambio de fenotipo de atrocitos A2 (neurotróficos) a astrocitos reactivos A1(neurotóxicos) en cultivos y muestras de pacientes con la EP. Se ha propuesto que este cambio fenotípico es inducido por IL-1α, TNF-α y C1q liberados por la microglía activa que permite a los astrocitos A1 producir y secretar lípidos saturados (fosfatidilcolina con cadenas de acilo de ácidos grasos de cadena muy larga y ácidos grasos libres saturados de cadena larga) que inducen la muerte rápida de neuronas y oligodendrocitos (42, 54) (Figura 1a). Para identificar las poblaciones de astrocitos A1, se ha utilizado el marcador estructural de la proteína ácida fibrilar (GFAP) y el componente 3 de la cascada del complemento (C3). También se ha evidenciado que estos astrocitos son positivos para C3 y la proteína B de unión al calcio S100 (S100β), esta última es considerada como una proteína pro-inflamatoria, debido a que promueve la liberación de mediadores pro-inflamatorios como óxido nítrico y citocinas (Figura 1a) (55, 56).

Con respecto a la interacción de α-sinucleína monomérica, al igual que en la fagocitosis microglial, la fagocitosis astrocítica es dependiente de TLR4 e induce una respuesta inflamatoria con la liberación de citocinas pro-inflamatorias (48, 57). También se sugiere que este receptor podría estar involucrado en la interacción con α-sinucleína oligomérica y fibrilar (58). Por otra parte, los astrocitos internalizan los oligómeros de α-sinucleína vía lisosomas, sin embargo, la degradación incompleta de estos depósitos intracelulares ocasiona la disfunción mitocondrial (59). Además, se ha reportado que astrocitos humanos tratados con α-sinucleína fibrilar exhiben un fenotipo de células presentadoras de antígeno y alteración de la respiración mitocondrial, pero no inducen la liberación de citocinas pro-inflamatorias (Figura 1b) (60).

1.2.3 Mediadores inflamatorios

Las citocinas y las quimiocinas son los mediadores inflamatorios que promueven la respuesta inflamatoria y juegan un papel importante en la patogénesis de la EP (61).

El TNF-α es un potente citotóxico en casi todos los tejidos. Fue la primera citocina en reportarse en el cuerpo estriado y líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con la EP en concentraciones 4 veces mayores que en pacientes control (62). En el mismo año, se reportó la presencia de otras citocinas y factores de crecimiento como IL-1β, IL-6, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento transformante alfa (TGF-α) en el núcleo caudado, putamen y corteza cerebral de pacientes con la EP. Se encontró que en las regiones del estriado la concentración de dichos factores y citocinas era más elevado que en la corteza cerebral. Los autores llegaron a la conclusión de que la liberación de citocinas y factores de crecimiento pro-inflamatorios en las regiones dopaminérgicas podrían ocurrir en algunos estadios de la enfermedad durante la progresión de la neurodegeneración (63).

En los últimos años, se ha reportado que el incremento de dichas citocinas pro-inflamatorias tanto en modelos experimentales como en pacientes con la EP, contribuyen a la remodelación de la BHE comprometiendo su integridad e induciendo un aumento en su permeabilidad (64-66).

1.3 La neuroinflamación afecta la funcionalidad de la barrera hematoencefálica en la enfermedad de Parkinson

La BHE es una barrera física compuesta por células endoteliales microvasculares que se encuentran sostenidas por pericitos, cubiertos por la lámina basal, y los pies terminales de astrocitos que crean la unidad neurovascular con las neuronas adyacentes (67, 68). Dicha barrera regula el transporte selectivo de diversas sustancias desde el lumen de los vasos hacia el interior del cerebro y se caracteriza principalmente por la presencia de proteínas de unión entre las células endoteliales (67-69). Estas proteínas de unión se dividen en proteínas de uniones estrechas (zonula occludens, ocludina, moléculas de adhesión de unión (JAM), claudinas), adherentes (VE-cadherina,

E-cadherina) y gap (conexinas) (69). Los mecanismos de transporte detectados en la BHE son variados y entre ellos se encuentran los siguientes (Figura 2) (69-72):

a) **Transporte paracelular:** a través de las proteínas de unión que limita el transporte de compuestos solubles en agua, incluyendo medicamentos polares.
b) **Difusión pasiva**: transporte de compuestos solubles en lípidos con un peso molecular menor a 400 Da, como antidepresivos, nicotina, alcohol, entre otros.
c) **Transportadores específicos:** transporte de moléculas pequeñas con un peso molecular menor a 600 Da, como glucosa, aminoácidos, nucleósidos, alcaloides, ciclosporina A, entre otros.
d) **Endocitosis mediada por receptor:** mediante la unión de ligandos específicos a receptores se transportan ciertas proteínas como insulina, transferrina e interleucinas.
e) **Endocitosis mediada por adsorción**: mediante la unión de sustancias policatiónicas a cargas negativas en la membrana plasmática se transportan proteínas plasmáticas como la albumina.
f) **Transportadores de eflujo:** restringen la entrada de moléculas al cerebro mediante la liberación luminal de dichos compuestos. Algunos mecanismos de eflujo son la glicoproteína-P, los transportadores ABC y las proteínas multidroga resistentes (MDR).

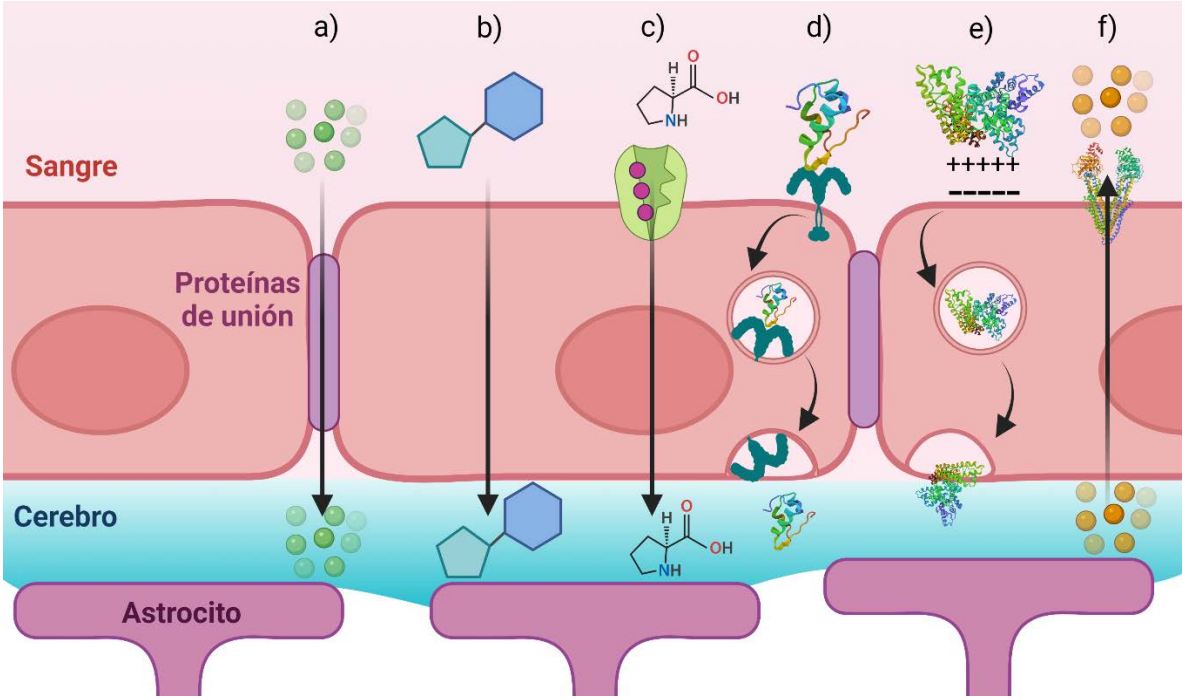

Figura 2. Mecanismos de transporte de la barrera hematoencefálica bajo condiciones fisiológicas. a) Transporte paracelular, b) Difusión pasiva, c) Transportadores específicos, d) Endocitosis mediada por receptor, e) Endocitosis mediada por adsorción, y d) Transportadores de eflujo. Esta figurada fue creada con BioRender.com y modificada de (73).

En condiciones patológicas como la EP, diversos autores han demostrado que se afecta la permeabilidad de la BHE. El primer estudio fue el de Kortekaas y colaboradores (2005) que evaluaron la actividad de la glicoproteína-P mediante la captura del fármaco [^{11}C]-verapamilo. Dicha glicoproteína actúa como una bomba de eflujo molecular que bajo condiciones fisiológicas remueve el verapamilo del cerebro. Sin embargo, los pacientes con EP mostraron una concentración elevada del fármaco en el mesencéfalo (18%), contrario a lo esperado, lo cual puso en evidencia la disrupción de la BHE en la EP (74). Años más tarde, por medio de marcadores histológicos de proteínas séricas, hierro y extravasación de eritrocitos se confirmó la alteración de la permeabilidad de la BHE estriatal en pacientes con la EP (65) (Figura 3). Por otro lado, Al-Bachari y colaboradores (2020) mostraron mediante el uso de resonancia magnética que la BHE de pacientes con la EP se encuentra comprometida específicamente en la SN, la materia blanca y las regiones corticales posteriores (75).

En distintos modelos *in vitro e in vivo* de neuroinflamación, se ha encontrado que la liberación de citocinas pro-inflamatorias induce cambios en la estructura y función de la BHE. En un estudio *in vitro* de la interacción entre la microglía activada por lipopolisacáridos (LPS) y la BHE, se asoció la disminución de la expresión de las proteínas de las uniones estrechas zonula occludens-1 (ZO-1) y ocludina con el aumento de IL-1β, TNFα, IL-1α y proteína inflamatoria de macrófagos-1α (MIP-1α). Por lo tanto, estas cuatro citocinas/quimiocinas podrían ser las responsables de aumentar la permeabilidad de la BHE a través del transporte paracelular (76). Mientras que en las fases tempranas de la neuroinflamación, la microglía activa expresa claudina-5 y envía prolongaciones a través de la lámina basal para contactar las células endoteliales para formar uniones estrechas que protejan la integridad de la BHE (77). Por otra parte, en un modelo murino de la EP inducido con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) se encontró una mayor infiltración de albumina marcada con isocianato de fluoresceína (FITC) en la BHE estriatal, y la disminución de las proteínas ZO-1 y ocludina-1 (78). La disminución en la expresión de las proteínas de las uniones estrechas también se observó en el núcleo subtalámico de cerebros *post mortem* de pacientes con la EP (79). Además, se detectó una reducción en el inmunomarcaje para claudina-5 y VE-cadherina, las cuales son proteínas claves en el mantenimiento de la barrera vascular y en el establecimiento de las interacciones célula-célula de las células endoteliales vasculares, respectivamente. Por consiguiente, la disminución en la expresión de las proteínas de uniones estrechas y adherentes aumenta la permeabilidad de la BHE tal y como se observa en la EP (79) (Figura 3).

Recientemente, en un modelo de la EP inducido por β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG) se encontró que la destrucción de la BHE es necesario para que exista infiltración de leucocitos de la circulación periférica a la SNpc (Figura 3) (80). Esta nueva comunicación entre el cerebro y la periferia ofrece una ventaja para la administración no invasiva de nuevos tratamientos para la EP, como el uso de NPs (73). Sin embargo, para obtener resultados prometedores de estos nuevos agentes terapéuticos es necesario tener modelos experimentales apropiados que replique las cuatro marcas patológicas de la EP (81).

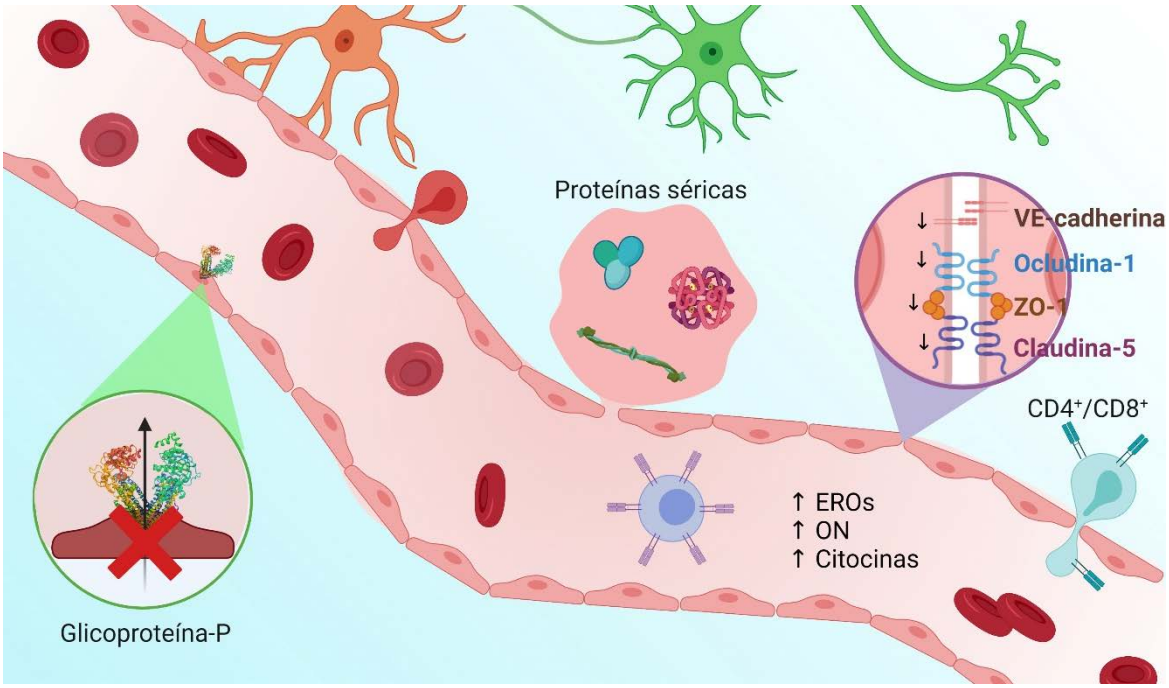

Figura 3. Alteraciones de la barrera hematoencefálica en la enfermedad de Parkinson. Disminuye la actividad en la glicoproteína-P, extravasación de eritrocitos, proteínas séricas, se reduce la expresión de las proteínas de las unión estrechas y adherentes que permiten la infiltración de linfocitos en el parénquima cerebral, Existe un aumento de especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y citocinas pro-inflamatorias que contribuyen al aumento de la permeabilidad de la BHE. Esta figura fue hecha en BioRender.com. **Abreviaturas:** EROs, Especies reactivas de oxígeno; ON, Óxido nítrico.

1.4 Neuroinflamación en modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson

Los modelos animales empleados para estudiar el proceso neuroinflamatorio en la EP, se clasifican en: inflamatorios, basados en neurotoxinas y genéticos (82). Sin embargo, no todos presentan las cuatro marcas características de la EP; esto es, neuroinflamación asociada a astrocitos reactivos neurotóxicos A1, agregados patológicos de α-sinucleína, neurodegeneración dopaminérgica nigroestriatal, y alteraciones de la conducta motora y no motora (Tabla 1). Por consiguiente, la falta de modelos experimentales apropiados, repercuten de manera negativa en los resultados obtenidos en los estudios en fase clínica (81, 83).

El modelo inflamatorio más conocido es el inducido por el LPS, endotoxina de la membrana externa de las bacterias gram negativas, que ocasiona una respuesta inflamatoria mediante la activación del TLR4. Sin embargo, la EP no es una complicación neurológica común en individuos sépticos con alto contenido de LPS (82, 84). Experimentalmente, la administración de LPS en la SNpc de ratas, activa a la microglía, aumenta los astrocitos reactivos y la producción de citocinas (pro-inflamatorias y anti-inflamatorias), y disminuye el fenotipo dopaminérgico, sugiriendo que la neuroinflamación aguda puede conducir a la neurodegeneración dopaminérgicas (15). Es importante aclarar que en este modelo no se ha investigado la disrupción de la BHE, a diferencia de la administración sistémica de LPS, donde no aumenta la permeabilidad de la BHE (85). Sin embargo, al combinar el modelo de LPS inyectado vía intraperitoneal con el modelo basado en la neurotoxina MPTP, se detectó un aumento de la inmunoglobulina G (IgG) en el estriado y SN, indicando que la BHE se encuentra comprometida (86).

Los modelos basados en potentes neurotoxinas tales como el de MPTP, 6-hidroxidopamina (6-OHDA), y rotenona inducen la muerte preferencialmente de neuronas dopaminérgicas, posteriormente causan activación microglial y astrogliosis reactiva, se infiere que esta activación podría ser para remover los detritus celulares. Sin embargo, la desventaja de estos modelos basados en toxinas radica en que no desarrollar agregados patológicos de α-sinucleína. Por el contrario, la neurotoxina BSSG aislada de la harina elaborada a partir de semillas de la planta cícada (*Cycas micronesica*), origina la EP en las personas que la consumen habitualmente como sucedió con la población de chamorros nativa de la isla de Guam (87). Se ha sugerido que otras neurotoxinas contenidas en la planta cícada, son las responsables de causar la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Alzheimer (EA) en los indios chamorros. El conjunto de estas neuropatologías se conoce como la triada ELA/EP/EA. Dicha triada fue replicada en ratones que fueron alimentados con “pellets” suplementados con la harina de cícada (87). De manera semejante, las ratas alimentadas con “pellets” suplementados sólo con BSSG replicaron las cuatro marcas características de la EP en 8 meses después del inicio de la administración (10, 88). Sin

embargo, en este modelo a pesar de que se demostró el desarrollo de agregados patológicos de α-sinucleína de acuerdo con los estadios de Braak descritos para el humano, no se pudo demostrar la propagación tipo prion de dichos agregados. Tampoco se evaluó la inducción de los astrocitos reactivos neurotóxicos A1, pero sí la activación microglial (10, 88).

Recientemente, nuestro equipo de trabajo demostró que la administración unilateral de BSSG (6 μg BSSG/ 1 μL de dimetil sulfóxido, DMSO) en la SN, reprodujo las cuatro marcas de la EP en la rata, entre estas la generación de agregados patológicos de α-sinucleína en las neuronas dopaminérgicas de la SN del lado inyectado (89), (90). De manera interesante, los agregados patológicos de α-sinucleína invadieron las neuronas dopaminérgicas nigrales del lado contralateral asociándose con la neurodegeneración dopaminérgicas nigroestriatal. Además, estos agregado patológicos se propagaron a otras regiones cerebrales del mismo lado tales como bulbo olfatorio, hipocampo, corteza, *locus coeruleus*, SN y estriado (90). La afectación del bulbo olfatorio y de la corteza cerebral explican el desarrollo de alteraciones no motoras incluyendo la hiposmia, característica en la EP (89). Por otro lado, la administración de BSSG indujo a la neuroinflamación característica en la EP; esto es, activación microglial, liberación de citocinas proinflamatorias y la activación de astrocitos reactivos neurotóxicos A1, eventos también asociados a la progresión de la neurodegeneración del sistema nigroestriatal dopaminérgico (80). De interés para esta tesis, la neuroinflamación inducida por BSSG ocasiona apertura local de la BHE demostrada por la presencia de azul de Evans (AE; colorante que en condiciones fisiológicas no atraviesa la BHE), y la infiltración de linfocitos (80).

Finalmente, los modelos genéticos de la EP incluyen animales transgénicos y animales transfectados por vectores virales basados en genes relacionados con la forma familiar de la EP (Konnova & Swanberg, 2018). Estos modelos tampoco exhiben la fisiopatología observada en la EP y no están completamente caracterizados (91, 92). Incluso, los animales transgénicos con mutaciones en los genes asociados con la EP familiar como *SNCA, LRRK2, PINK1, DJ-1* y *ATP13A2*, no producen suficiente neurodegeneración nigral y síntomas típicos (93). Sin embargo, la participación de la neuroinflamación se ha

reportado en ratones transgénicos con la mutación A53T en el gen *SNCA*, la cual ocasiona la agregación de α-sinucleína, el deterioro de la señalización dopaminérgica y la plasticidad sináptica estriatal (94). Con respecto a los animales transfectados con virus adeno-asociados (AAV, por sus siglas en inglés)-α-sinucleína, se ha encontrado que la sobrexpresión de α-sinucleína ocasiona la disminución de la expresión de RET dependiente de Nurr1 y en consecuencia bloquea la señalización de GDNF de las neuronas dopaminérgicas nigrales (95). Por el contrario, Su y colaboradores (2017) refutan esta posibilidad al mostrar que la presencia de los agregados de α-sinucleína no comprometía la señalización de GDNF en los modelos murinos y en muestras de pacientes con la EP, sugiriendo que el déficit se debe al modelo experimental empleado (96). Por lo tanto, estos resultados inconclusos encontrados en los distintos modelos experimentales deben interpretarse con precaución para evitar errores al trasladarse a ensayos clínicos (83).

Tabla 1. Comparación entre las características de los modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson.

	Tipo de modelo						
Características	LPS	6-OHDA	MPTP	Rotenona	BSSG	Ratones transgénicos A53T	Ratas con AAV-α-sinucleína
Progresivo	No	No	No	No	Sí	No	No
Alteraciones motoras	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Alteraciones no motoras	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Neurodegeneración	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Agregados de α-sinucleína	No	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Neuroinflamación	Sí	No	No	No	Sí	Sí	No
Disrupción de la BHE	No	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí

Referencias	(15, 97)	(98, 99)	(78)	(100) (101)	(80, 90)	(102)	(103, 104)

Abreviaciones: 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; BHE, Barrera hematoencefálica; BSSG, β-sitosterol β-D-glucósido; LPS, Lipopolisacáridos; MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina; AAV, Virus adeno-asociado.

1.5 GDNF: estructura, receptores y vías de señalización

GDNF es una proteína de 134 aminoácidos que forma parte de la familia de ligandos de GDNF (GFLs, por su abreviación en inglés). En 1993, se aisló de un cultivo de astrocitos de rata y se identificó como un factor neurotrófico promotor de la supervivencia y diferenciación de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. Desde entonces ha sido propuesto como un candidato terapéutico de la EP (19, 105). La expresión de GDNF aumenta durante el desarrollo embrionario y disminuye en la etapa adulta, restringiéndose a ciertas zonas del cerebro como corteza, hipocampo, estriado, SN, tálamo, cerebelo y medula espinal (106, 107). Desafortunadamente, existe una desregulación en la producción de GDNF asociada a cambios patológicos, por ejemplo, en pacientes con la EP se ha reportado una reducción significativa de GDNF nigral de dos a ocho veces en comparación con otros factores neurotróficos (108).

La forma activa de GDNF consiste en un homodímero estabilizado por un enlace disulfuro y se une preferentemente al receptor alfa-1 de la familia de receptores a GDNF (GFRα1, por sus siglas en inglés), sin embargo, puede llegar a interactuar con GFRα2 y GFRα3. Una vez que GDNF está unido a GFRα1, forma un complejo el GDNF-GFRα1-RET con dos moléculas del receptor tirosina quinasa (RET). La formación del complejo ocasiona la transfosforilación de residuos de tirosina específicos (Y^{905}, Y^{1015}, Y^{1062} y Y^{1096}) y activa dos vías de señalización: MAP cinasas y fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) /AKT. Ambas vías se encargan de promover la proliferación, migración, diferenciación, mantenimiento y supervivencia neuronal (109). Tanto GFRα1 como RET se expresan ampliamente en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (alrededor de 10,000-15,000 neuronas dopaminérgicas) (110, 111).

Por otra parte, GDNF puede tener una señalización vía independiente de RET, donde GDNF se une a GFRα1 y a la molécula de adhesión celular neural (NCAM) formando el

complejo GDNF-GFRα1-NCAM. Dicho complejo activa la vía de señalización de la cinasa de adhesión focal (FAK)/fyn que promueve la migración de células de Schwann, el crecimiento axonal, la adhesión celular y el crecimiento de neuritas. A su vez, la interacción directa entre NCAM y GDNF no activa la señalización intracelular, y en ausencia de GDNF, GFRα1 se une a NCAM inhibiendo la adhesión celular (105). También se ha observado que GDNF puede unirse a sindecan-3 y activar a la Src cinasa e inducir el crecimiento de neuritas y la propagación celular (105, 112).

1.5.1 Disminución de GDNF en la enfermedad de Parkinson

En los pacientes con la EP, se ha encontrado que el GDNF disminuye en regiones del sistema nigroestriatal, como la SNpc y el núcleo putamen (113). De la misma forma, existe una reducción significativa en los niveles de proteína de GDNF en el hipocampo, lo cual se asocia con el deterioro cognitivo incluso en ausencia de la pérdida neuronal (114). Por lo tanto, GDNF podría desempeñar acciones fisiológicas en la neurotransmisión del hipocampo similares a las del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) (115). Sin embargo, en otras áreas del cerebro como la corteza frontal y el cerebelo, no se alteran los niveles de proteicos de GDNF (113).

Por otra parte, ha surgido un interés especial en los efectores de señalización de GDNF. En las neuronas nigrales con inclusiones de α-sinucleína de pacientes con la EP los niveles de proteína para el receptor RET y su molécula de señalización río abajo, proteína S6 fosfo-ribosomal (p-rpS6), se encuentran disminuidas significativamente. Estos resultados fueron recapitulados en un modelo de primates no humados que sobre-expresaban a la α-sinucleína humana mutante A53T. No obstante, la expresión remanente de RET en las neuronas nigrales es suficiente para activar a p-rpS6, y la presencia de la sinucleinopatía no es un impedimento para que GDNF ejerza su efecto trófico (116).

1.6 Efecto neuroregenerador y anti-neuroinflamatorio de GDNF en la enfermedad de Parkinson

Los resultados de ensayos clínicos fase 1 y 2 utilizando la infusión crónica de GDNF en el putamen o intraventricular, no han sido alentadores (83, 117, 118). Debido a que no se han reportado efectos benéficos, pero sí efectos adversos severos en algunos pacientes como anorexia, pérdida de peso, hiponatremia, parestesia, fenómeno de Lhermitte y eventos adversos relacionados a la implantación de dispositivos (catéteres para la infusión de GDNF) (83). Por consiguiente, se ha propuesto el uso de terapia génica como una alternativa (83). Esta propuesta ha sido apoyada por los resultados favorables utilizando vectores lentivirales para transducir el transgén *GDNF* en el núcleo estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA (119, 120). Incluso, se ha logrado neuroprotección y neuroregeneración con el trasplante de las células troncales mesenquimales derivadas de adipocitos (hAMSCs, por sus siglas en inglés) y genéticamente modificadas por vectores virales para producir GDNF (25). El trasplante de estas células en el estriado de ratones lesionados con 6-OHDA aumentó el número de neuronas dopaminérgicas en la SN y disminuyó los síntomas motores (25). Con el propósito de aplicar tratamientos menos invasivos, se ha probado la administración intravenosa de macrófagos genéticamente modificados para producir GDNF en el ratón transgénico Parkina Q311X(A), el cual presenta un curso lento y progresivo de la enfermedad con inflamación cerebral moderada, ocasionada por la mutación del gen *PARKIN*. Este abordaje disminuyó la neurodegeración inducida por la expresión de *PARKIN* mutada y disminuyó la microgliosis y astrogliosis, sugiriendo un efecto anti-neuroinflamatorio adicional (21). En el modelo de ratas lesionadas con 6-OHDA, se ha confirmado este efecto anti-neuroinflamatorio utilizando microburbujas de GDNF administradas en el estriado, donde los niveles de la citocina pro-inflamatoria TNF-α disminuyeron significativamente (121). Además, otros autores han reportado este efecto anti-neuroinflamatorio de GDNF en la EP (Tabla 2) y un posible efecto anti-α-sinucleína (22).

Tabla 2. Efecto anti-neuroinflamatorio de GDNF en la enfermedad de Parkinson.

Modelo experimental/ Tipo de terapia con GDNF	Resultados relevantes	Mecanismo propuesto	Ref.
Cultivos microgliales del mesencéfalo de rata activados por Zymozan A/ Terapia con GDNF derivado de astrocitos.	GDNF disminuyó la activación microglial en un modelo de neuroinflamación *in vitro*.	Activación del complejo GFRα1-RET y la inhibición de la vía de señalización FAK.	(20)
Ratón knockdown $GDNF^{+/-}$ (12 meses de edad)/ Inyección estereotáxica bilateral de GDNF (10 µg de GDNF por cada hemisferio) en el estriado.	GDNF atenuó del deterioro motor y los niveles de dopamina nigroestriatal.	Reducción de la expresión de COX-2 y aumento de SOD-2 en la SN, lo que sugiere la disminución de la activación microglial.	(122)
Cultivo microglial de rata activado por LPS/ Terapia con rhGDNF (50 ng/mL, antes de administrar LPS).	rhGDNF atenuó la síntesis de ON y iNOS, y la expresión de COX-2, IL-6, IL-1β, y TNF-α.	Inhibición de la activación microglial por la reducción en la fosforilacion de p38.	(123)
Modelo de 6-OHDA en rata/ Liberación intraestriatal de GDNF por LCM (1.5 mg/k, 3 días después de la inyección de 6-OHDA).	GDNF redujo los niveles de caspasa-3 y TNF-α, y activación de la microglía.	Reducción de la activación de la microglía al disminuir la expresión de MMP-9 y MHCII.	(121)
Inyección intercutánea de 6-OHDA en ratón/ Macrófagos transfectados con GDNF (i.v. $1x10^6$ células/ 100 µl, 2 días después de 6-OHDA).	El tratamiento disminuyó la microglía activa en la SNpc.	Los macrófagos migraron al sitio de inflamación y modularon la activación de las células gliales.	(124)
Inyección intraperitoneal de MPTP en ratón/ Administración IN de GDNF	GDNF disminuyó la microglía activa.	Reducción de la microglía activa al modular la neuroinflamación.	(24)

en un nanovector de lípidos conjugado con péptidos.			
Ratón transgénico Parkina Q311X(A) (4 meses de edad)/ Administración de GDNF-macrófagos (i.v. 2 x 10^6 células/100 µl/ratón, una vez por semana por 3 semanas)	El tratamiento disminuyó de la microgliosis y astrogliosis.	Efecto anti-neuroinflamatorio al modular la activación microglial.	(21)
Inyección intraperitoneal de MPTP 2 veces por semana por 3 semanas/ Entrega de GDNF vía sistema UTMD (3.6 x 10^8 MBs/mL, dos veces por 3 semanas, 1 día después de administrar MPTP)	GDNF redujo la apoptosis y la astrogliosis.	Reducción en la liberación de iones de calcio y la expresión de la proteína apoptótica caspasa-3.	(125)

Abreviaturas: 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; COX-2, Ciclooxigenasa 2; GDNF, Factor neurotrófico derivado de la glía; GFRα1, Receptor alfa-1 de la familia GDNF; i.v., intravenoso; IL, Interleucina; IN, Intranasal; iNOS, Óxido nítrico sintasa; LPS, Lipopolisacáridos; MBs, Microburbujas; MHCII, Complejo mayor de histocompatibilidad 2; MMP-9, Metaloproteinasa-9; MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina; ON, Óxido nítrico; p38, Proteína cinasa activada por mitógenos; RET, Receptor tirosina quinasa; rhGDNF, GDNF - Factor neurotrófico derivado de la glía humano recombinate; SNpc, Substantia nigra pars compacta; SOD-2, Superóxido dismutasa 2; TNF-α, Factor de necrosis tumoral α; UTMD, Destrucción de microburbujas dirigido por ultrasonido.

1.7 Nanopartículas de GDNF como tratamiento para la enfermedad de Parkinson

El surgimiento de la nanobiotecnología ha favorecido la utilización de NPs de 1-100 nm como vehículos prometedores versátiles para el envío de genes como alternativa a los vectores virales (126). En el modelo de lesión con 6-OHDA, se demostró que la administración intravenosa de GDNF encapsulado en NPs conjugadas con angiopep, péptido que utiliza la transcitosis de la proteína 1 relacionada con el receptor de

lipoproteínas de baja densidad (LRP1), promovió la recuperación del fenotipo dopaminérgico (127). Resultados semejantes se obtuvieron con la administración intravenosa del plásmido de GDNF encapsulado en NPs formadas a partir de la congulación de polietilenimina (PEI) y polietilenglicol, y con aplicación de ultrasonido focalizado (128).

Otro tipo de nanovector empleado para terapia génica es el NTS-poliplex, sistema de nanopartículas compuesto por un vector de neurotensina y un complejo péptido cariofílico-plásmido (ADNp). El vector de neurotensina es el conjugado de neurotensina y péptido fusogénico con poli-L-lisina. Mientras que el complejo péptido cariofílico-ADNp, se forma por la unión electrostática del péptido cariofílico y el gen de interés GDNF con el promotor NBRE3X. Cada uno de los componentes del NTS-poliplex desempeñan una función importante para internalizarse en las células (27). El ligando neurotensina activa la endocitosis mediada por receptor en las células que presenten el receptor de neurotensina 1 (NTSR1, por sus siglas en inglés), el cual se encuentra densamente expresado en las neuronas dopaminérgicas nigrales (129). Por otra parte, el péptido fusogénico permite el escape oportuno de la endosoma y el péptido cariofílico direcciona el gen al núcleo. El gen se transcribe únicamente en las neuronas dopaminérgicas, debido la alta densidad de NTSR1 y al promotor NBRE3X, específico para esas neuronas (Figura 4)(27, 130).

Ensayos preclínicos de terapia génica con el gen *GDNF* contenido en las nanopartículas de NTS-poliplex inyectadas en la SN de ratas con hemiparkinsonismo demostraron la reversión de la discapacidad motriz, la recuperación del contenido de dopamina en el estriado y SN, y una recuperación significativa de las neuronas dopaminérgicas y de la inervación estriatal (Gonzalez-Barrios et al., 2006). Recientemente, se logró implementar en las NPs-GDNF el elemento de respuesta a tetraciclina (TRE, por sus siglas en inglés) para inducir la expresión regulada de GDNF mediante la administración de doxiciclina, con el propósito de evitar los efectos adversos ocasionados por el exceso de GDNF como la inervación aberrante de las fibras dopaminérgicas (23, 130).

Hasta el momento se ha reportado que GDNF tiene un efecto neuroregenerador y un posible efecto anti-neuroinflamatorio, y haciendo uso de vehículos como células y NPs, pueden atravesar la BHE. Sin embargo, no se conoce si las NPs que emplean el sistema NTS-poliplex con el gen para hGDNF pueden atravesar la BHE en un modelo donde se encuentra abierta, como en el modelo de BSSG.

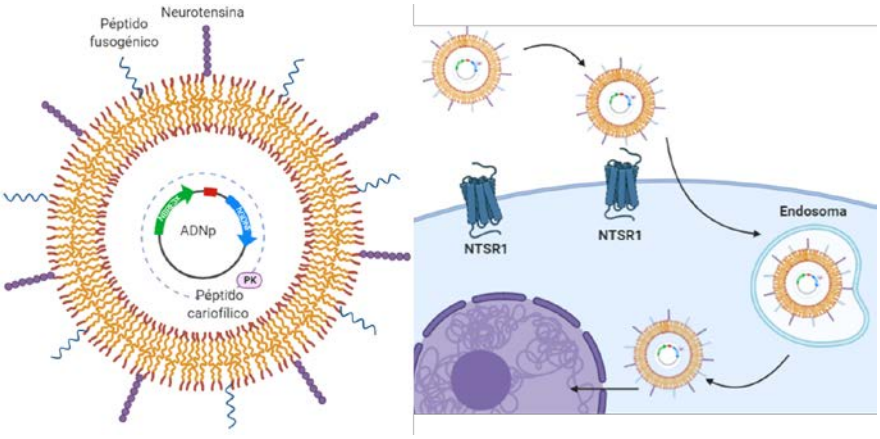

Figura 4. Nanopartículas de hGDNF y su internalización en las neuronas dopaminérgicas. Esta figura fue creada con BioRender.com. **Abreviaciones:** NTSR1, Receptor de neurotensina 1.

2. Planteamiento del problema

La EP es el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente a nivel mundial, multifactorial, y que hasta la fecha carece de un tratamiento oportuno y eficaz. Por consiguiente, se han intentado desarrollar terapias más efectivas que puedan satisfacer las desventajas actuales. Los abordajes experimentales con base en factores neurotróficos ofrecen la posibilidad de detener la degeneración y restaurar el sistema dopaminérgico nigroestriatal. Sin embargo, aún se ignora si pueden evitar la generación y propagación de los agregados patológicos de α-sinucleína, que inducen neuroinflamación y neurodegeneración. Se ha sugerido al GDNF, como un factor neurotrófico prometedor en la terapéutica de la EP, debido a sus efectos neuroprotectores, neuroregeneradores y posiblemente anti-neuroinflamatorios y anti-α-sinucleína. No obstante, en los ensayos clínicos empleando GDNF en pacientes con EP, no han sido exitosos y se ha debatido si la presencia de agregados de α-sinucleína

podría comprometer la efectividad de los tratamientos. Otro de los inconvenientes es que no atraviesa la BHE y en consecuencia la vía de administración es extremadamente invasiva (inyección intracerebroventricular, inyección intraputaminal, infusión por catéter, entre otros) asociándose a efectos adversos severos en los pacientes. Recientemente se ha sugerido que la neuroinflamación en la EP promueve un aumento en la permeabilidad de la BHE, representando una ventaja para la administración de fármacos vía sistémica. Por tanto, se requiere corroborar esa hipótesis empleando un modelo animal que mimetice los sellos patognomónicos de la EP, entre ellos ruptura de la BHE. El modelo murino generado por la administración única e intranigral del neurotóxico BSSG, representa un modelo fidedigno para la EP, debido a que desarrolla alteraciones motoras y no motoras, neurodegeneración del sistema nigroestriatal, agregados patológicos de α-sinucleína que se propagan como prion, neuroinflamación, infiltrado linfocítico, y apertura de la BHE.

Por lo tanto, este proyecto busca conocer si el envío dirigido del gen *hGDNF* por el sistema de NPs NTS-poliplex puede atravesar la BHE, cuando se administre vía arteria carótida interna (ACI) en el modelo murino parkinsoniano de BSSG. Por consiguiente, se plantearon las siguientes preguntas científicas:

1. ¿Cuánto tiempo permanecerá permeable la BHE en el modelo murino parkinsoniano de BSSG?
2. ¿La intervención de la ACI generará daño en la funcionalidad sensoriomotora?
3. ¿Las NPs GFP y hGDNF atravesarán la BHE en el modelo murino parkinsoniano de BSSG?

3. Hipótesis

Las NPS-hGDNF administradas por vía sistémica atravesarán la BHE, en el modelo parkinsoniano de BSSG.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar si las nanopartículas de hGDNF administradas por vía ACI atraviesan la BHE y transfectan el gen *hGDNF* en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* de ratas parkinsonianas con agregados de α-sinucleína.

4.2 Objetivos específicos

1. Analizar la funcionalidad sensoriomotora posterior a la intervención vía ACI.
2. Determinar el curso temporal de la permeabilidad de la BHE en el modelo murino parkinsoniano de BSSG.
3. Determinar la expresión de GFP y hGDNF en las neuronas dopaminérgicas nigrales del modelo animal de BSSG.

5. Métodos

5.1 Declaración ética para el uso y manejo de animales experimentales

Este proyecto se realizó bajo el protocolo experimental #162-15 aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) y por el comité interno de ética de la FES-Iztacala (protocolo experimental I-186), ambos con base en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. Las ratas *Wistar* macho (210-230 g) se mantuvieron bajo condiciones estándar de ciclos invertidos de luz-oscuridad de 12 h, temperatura de 22 ± 2 °C y humedad relativa de 60 ± 5%, con comida y agua *ad libitum*.

5.2 Grupos experimentales

Los animales ($n = 35$) fueron asignados aleatoriamente en los siguientes grupos experimentales (Tabla 3): 1) ratas intactas (sin lesión estereotáxica) más administración de azul de Evans (AE) vía ACI ($n = 4$); 2) ratas intactas (sin lesión estereotáxica) más administración de AE vía ACE ($n = 3$); 3) DMSO; inyección estereotáxica de DMSO más administración vía intravenosa (i.v.) de AE a los 4 y 7 días

(*n = 3*); 4) Parkinsonismo-AE i.v.; ratas parkinsonianas (4, 7, 10 y 15 días después de lesión con BSSG) más administración con AE vía i.v. (*n = 3*); 5) Parkinsonismo-AE ACI; ratas parkinsonianas (7 días después de lesión con BSSG) más administración con AE vía ACI (*n = 4*); 6) Parkinsonismo; ratas parkinsonianas (12 días después de lesión con BSSG) (*n = 3*); 7) Parkinsonismo-NPs hGDNF intranigral (IN); ratas parkinsonianas (7 días después de lesión con BSSG) más administración vía IN hGDNF (*n = 3*); 8) Parkinsonismo-NPs hGDNF ACI; ratas parkinsonianas (7 días después de lesión con BSSG) más administración vía ACI con NPs-hGDNF (5 días) (*n = 3*).

Tabla 3. Ensayos, grupos y cantidad de animales empleados para cada ensayo.

Ensayos (n = 3)	Grupos	Ratas
Permeabilidad de la BHE (Objetivos 1 y 2)	**1)** Intactas-AE ACI	4
	2) Intactas-AE ACE	3
	3) DMSO	3
	4) Parkinsonismo-AE i.v.	12
	5) Parkinsonismo-AE ACI	4
Expresión de hGDNF (Objetivo 3)	**1)** Parkinsonismo	3
	2) Parkinsonismo-NPs hGDNF IN	3
	3) Parkinsonismo-NPs hGDNF ACI	3
		Total
		35 ratas

Abreviaturas: ACE, Arteria carótida externa; ACI, Arteria carótida interna; AE, Azul de Evans; BHE, Barrera hematoencefálica; DMSO, Dimetil sulfóxido; hGDNF, Factor neurotrófico derivado de la glía humano; i.v., Intravenosa; NPs, nanopartículas.

5.3 Generación de ratas parkinsonianas con β-sitosterol β-D- glucósido

Las ratas se anestesiaron empleando una mezcla de xilacina/ketamina (10 mg/kg/ 100 mg/kg, i. p.) y se colocaron en el aparato estereotáxico (Stoelting; Wood Dale, IL, USA). Para establecer las coordenadas estereotáxicas, se realizó un trepano y se inyectó 1 µL del colorante fucsina ácida, mediante una aguja dental roma de calibre 20 arriba de la

SNpc izquierda. Las coordenadas estereotáxicas fueron anteroposterior (AP), +3.2 mm del punto medio interaural; mediolateral (ML), +2.1 mm de la sutura intraparietal; dorsoventral (DV), -6.7 mm de la duramadre. Una vez establecidas las coordenadas se administraron 6 µg del neurotóxico BSSG (MedChemExpress; Monmouth Junction, NJ, EE. UU.) disuelto en 1 µL de DMSO (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.) (90, 135). La infusión se realizó con ayuda de una bomba de microperfusión (Stoelting; Wood Dale, IL, USA) a una velocidad de 0.16 µL/min. Al término de la administración, la aguja permaneció en el cerebro por 5 min y luego se retiró lentamente para evitar el reflujo de la solución administrada. Se suturó la herida quirúrgica y se trató con una mezcla de oxitetraciclina y polimixina B (Pfizer; Toluca, México). Las ratas se mantuvieron en una caja individual con calor hasta completar su recuperación.

5.4 Evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

Para evaluar la permeabilidad de la BHE se administró el colorante AE al 2% (peso molecular de 69 kDa, tomando en cuenta la unión de la albumina al colorante) en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) por la vena caudal (4 mL/kg) y ACI izquierda (2 mL/kg, sin controlar la velocidad de administración) a los 4, 7, 10 y 15 días después de la inyección estereotáxica con BSSG, con el objetivo de determinar el curso temporal en el cual la BHE se encuentra permeable (80, 136) (Figura 4). Las ratas se anestesiaron empleando una mezcla de xilacina/ketamina (10 mg/kg/ 100 mg/kg, i. p.) para realizar la administración del AE. Después de 24 horas, los animales se anestesiaron profundamente con pentobarbital (50 mg/kg, intraperitoneal) y se perfundieron transcardialmente con 200 mL de PBS y 200 mL de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS.

Al finalizar la perfusión, se removieron los cerebros, se fijaron con PFA al 4% durante 24 h y se seccionaron en rebanadas coronales de 500 µm con un vibratomo (Leica Microsystems Inc, VT1200S; Buffalo Grove, IL, USA).

Posteriormente, se observó la presencia del AE en dos cortes anatómicos mediante campo claro con un estereomicroscopio Leica MZ6 equipado con una cámara digital

(Heidelberg, Germany) y se cuantificó la densidad de intensidad bruta usando el software ImageJ v.1.46r (National Institutes of Health; Bethesda, MD).

5.4.1 Administración vía arteria carótida interna y externa

Para realizar la administración vía ACI se diseñó un protocolo tomando como referencia el trabajo de otros autores (137-139). Previo a la administración, se elaboraron catéteres para administrar el AE y las NPs empleando la punta de una aguja dental roma de calibre 20 (8 mm de largo), unida a una tubería PTFE STT-28 (tubing, Light Wall, W17716) marcada cada 5 µL para regular el volumen y la velocidad de administración (5 µL/min) y evitar hemorragias subaracnoideas (138). Las ratas se anestesiaron empleando una mezcla de xilacina/ketamina (10 mg/kg/ 100 mg/kg, i. p.) y se colocaron en posición supina, se esterilizó el área cervical ventral con etanol al 70% y posteriormente se rasuraron. Para disecar la arteria carótida común (ACC), se realizó una incisión en el cuello debajo de la mandíbula hasta arriba del esternón (3 a 4 cm aproximadamente). Primero, se separó el tejido conectivo y adiposo para exponer la tráquea y se colocó un objeto redondo pequeño con diámetro de 7 mm en la zona dorsal cervical, con el objetivo de mantener una hiperextensión cervical y exponer la tráquea. Después, se retrajeron con ganchos los músculos esternohioideo, esternomastoideo y digástrico del lado izquierdo de la tráquea, y se localizó la ACC palpitando paralela a la tráquea, se removió con pinzas la fascia que cubría a la arteria carótida común, externa (ACE) e interna con precaución de no perforar la arteria o dañar el nervio vago. Una vez aislada la arteria se ataron dos nudos con seda quirúrgica 4.0, uno arriba de la bifurcación de la arteria carótida común que da origen a la ACE y otro en la parte más baja de la arteria carótida común. El propósito de este último nudo fue reducir la velocidad del flujo sanguíneo, para evitar hemorragia al momento de realizar la administración. En el caso de la administración vía ACE, se ligó la ACI y se dejó libre la externa. Por último, se realizó la administración insertando la punta del catéter en la arteria carótida común con dirección hacia la ACI. El volumen y velocidad de administración para las NPs fue de 40 µL a 5 µL/min. Cabe enfatizar que durante la administración la arteria carótida común permaneció ligada por un tiempo no mayor a

10 min para evitar ocasionar un accidente cerebrovascular o déficits motores permanentes (140). Al finalizar la administración, se dejó 1 min el catéter dentro de la arteria y al removerlo se aplicó hemostasia a través de la compresión por 1 min. Se quitaron los nudos y ganchos colocados anteriormente, y se cerró la incisión usando una aguja y seda quirúrgica.

5.5 Prueba de colocación de extremidades anteriores evocadas por vibrisas

La prueba de vibrisas se realizó para determinar la afección sensoriomotora bilateral posterior a la intervención vía ACI. Esta prueba nos permite evaluar la asimetría en la corteza sensoriomotora y el estriado (141). Las ratas se sostuvieron cuidadosamente del torso y sus vibrisas se estimularon con el borde una mesa, desencadenando una respuesta ipsilateral de la extremidad anterior, es decir, la rata colocó su pata anterior en la superficie de la mesa (colocación exitosa). Se contó en un máximo de 10 eventos, el número de colocaciones exitosas de las extremidades anteriores contralaterales e ipsilaterales a la lesión (89).

5.6 Síntesis de las Nanopartículas de hGDNF

Se siguió el protocolo de Arango-Rodríguez y colaboradores (2006) para la síntesis del acarreador NTS-poliplex utilizando Succinimidil 6-(3 (2-piridildithio) propionamido) hexanoato (LC-SPDP) para entrecruzar la neurotensina (Sigma, St. Louis, MO, USA) y el péptido fusogénico (PF, GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCAKKK; pureza N90%; SynPep, Dublin, CA, USA) con poli-L-lisina (48 kDa). Los derivados de SPDP y el conjugado de neurotensina-SPDP-(FP-SPDP)-poli-L-lisina (acarreador de neurotensina) se purificaron por cromatografía de filtración en gel. Dicho conjugado se concentró en 1 mL, se dializó contra PBS (pH 7.4) y se esterilizará por filtración.

Para la formación de las NPs, se formó primero el complejo péptido cariofílico (PK)-ADN plasmídico (ADNp), mediante la unión electrostática entre el PK con carga neta positiva y el polianión ADNp (pNBRE3x-hGDNF). La relación molar óptima de los

componentes de las NPs se determinó mediante microensayos de retención y retardo (23, 142).

5.7 Determinación de la expresión de hGDNF en las neuronas dopaminérgicas nigrales

Para los estudios de transfección de las neuronas dopaminérgicas nigrales, se exploró la presencia del plásmido NBRE3x-hGDNF en la SNpc de ratas parkinsonianas con agregados de α-sinucleína, se determinó 5 días después de la administración vía ACI de las NPs de GFP y hGDNF (Figura 5). De acuerdo con lo descrito en el apartado 5.5, las ratas se anestesiaron profundamente, se perfundieron intracardialmente y los cerebros se fijaron durante 24 horas en PFA al 4% y posteriormente se colocaron en sacarosa al 30% para su crio protección por 72 hrs. En este caso se realizaron rebanadas de 35 µm de espesor utilizando un micrótomo de deslizamiento (Leica SM1100; Heidelberg, Alemania). También se realizaron ensayos de inmunohistoquímica empleando un anticuerpo contra hGDNF y se contra tiñeron con Nissl para delimitar los somas neuronales correspondientes a la SNpc. Estas técnicas se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el siguiente apartado.

5.8 Inmunohistoquímica

Las rebanadas cerebrales obtenidas se permeabilizaron mediante incubación con PBS/ Tritón X-100 0.3% (PBS/ Tritón), 3 veces por 5 minutos cada una. Para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena, las rebanas se incubaron con peróxido de hidrogeno 3% en PBS y 10% de metanol por 10 min a TA (80, 90). Con el propósito de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, se bloquearon con albumina al 0.2% (Invitrogen; Carlsbad, CA, EE. UU.) en PBS/Tritón por 1 h a temperatura ambiente (TA) y se realizaron lavados. Después, para identificar si las nanopartículas fueron capaces de atravesar la BHE, los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario policlonal anti-hGDNF de conejo (1:100; Abcam; Cambridge, RU). Subsecuentemente se incubó por 1 hora a TA con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano IgG (HRP, por sus siglas en inglés) hecho en burro anti-conejo (1: 500; Zymed; Cambridge, MA, EE.

UU.). Las tinciones se revelaron utilizando 3′3-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.) / peróxido de hidrogeno al 0.7 % y los tejidos se montaron en portaobjetos gelatinizados. Posteriormente los tejidos se contra tiñeron con la técnica de Nissl, utilizándose el colorante violeta de cresilo (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) y se colocó la resina DPX (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.) para subsecuentemente analizarlos con un microscopio equipado con objetivos de 5 y 20 x (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) en tres niveles anatómicos de la SNpc (rostral, medial y caudal) (Figura 5).

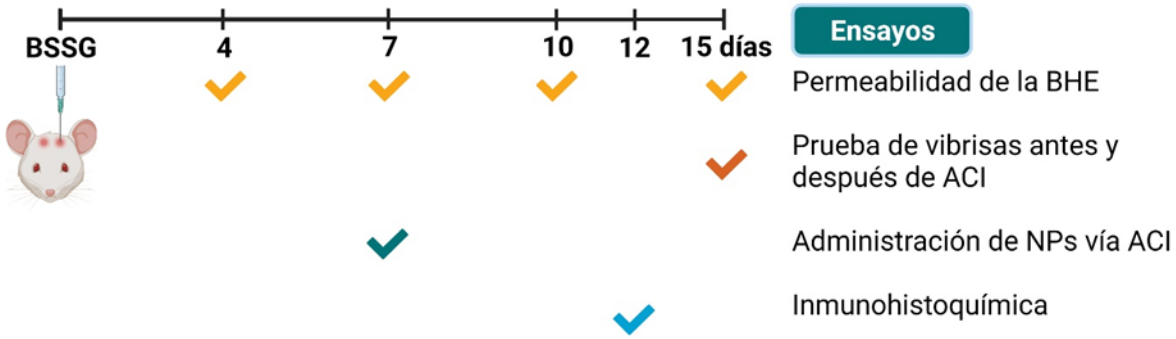

Figura 5. Diseño experimental. El curso temporal de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) se analizó los días 4, 7, 10 y 15 días posterior a la lesión con β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). Posterior a la administración vía arteria carótida interna (ACI) se realizó la prueba de vibrisas. Los tratamientos con nanopartículas (NPs) se administraron al día 7, y la expresión de GFP y hGDNF se evaluó a través de ensayos de inmunohistoquímica a los 5 días post-transfección. Esta figura fue creada con BioRender.com.

5.9 Análisis estadísticos

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se graficó la media ± error estándar. Se llevó a cabo una prueba de homogeneidad de datos y un análisis de variancia (ANOVA) de una vía mediante la comparación de medias por la prueba *post hoc* Turkey para determinar las diferencias significativas entre los grupos. Se utilizó programa *Graphpad Prism 5.0* (*GraphPad Software Inc*; La Jolla, CA, USA) para el análisis estadístico y obtención de gráficos. La significancia se estableció en $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1 Generación de ratas parkinsonianas con β-sitosterol β-D-glucósido

Para generar el modelo parkinsoniano con BSSG, primero se estandarizaron las coordenadas estereotáxicas del sitio de lesión con fucsina acida. El objetivo fue que el colorante quedará localizado por arriba de la SNpc izquierda y de este modo no ocasionar un daño mecánico directo. Las coordenadas estereotáxicas establecidas a partir del bregma fueron: AP +3.2, ML +2.1 y DV -6.7 (Figura 6).

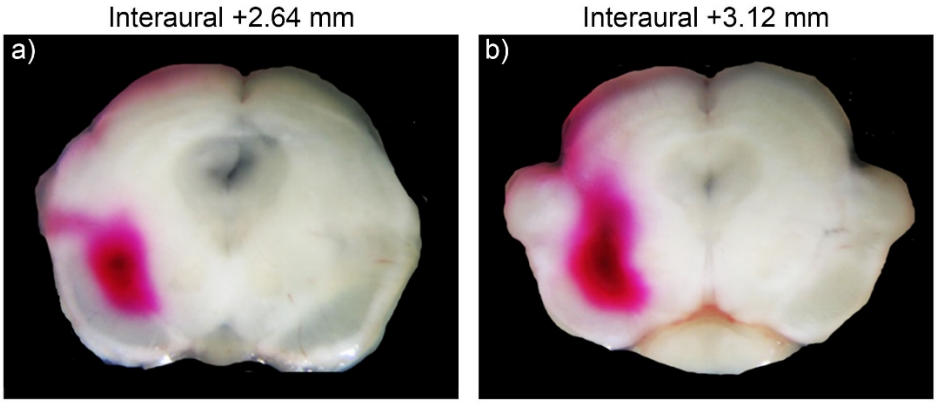

Figura 6. Fotografías representativas del sitio de inyección con fucsina ácida por arriba de la SNpc en el mesencéfalo. Imágenes representativas de cortes cerebrales coronales de rata: a) Interaural +2.64 mm; b) Interaural +3.12 mm.

6.2 Extravasación del azul de Evans en el cuerpo de la rata

Para evaluar la permeabilidad de la BHE con el colorante AE, se estandarizaron tres vías de administración: intravenosa, ACE y ACI. Para la administración intravenosa, el colorante AE se inyectó por la vena caudal (Figura 7a). Inmediato a la administración del colorante, la rata adquirió una coloración azul en las orejas, ojos, nariz, vestíbulo de la nariz, patas y cola (Figura 7 b-d).

En la administración vía carótida interna se observó la extravasación del colorante únicamente en el ojo y vestíbulo de la nariz izquierda (Figura8a-d). Por otra parte, como control para determinar que el AE se estaba administrando correctamente por la ACI, se suministró el colorante vía ACE (Figura 9a) y se observó una coloración azul

exclusivamente en la oreja izquierda de las ratas, ipsilateral a la administración del AE (Figura 9b-d).

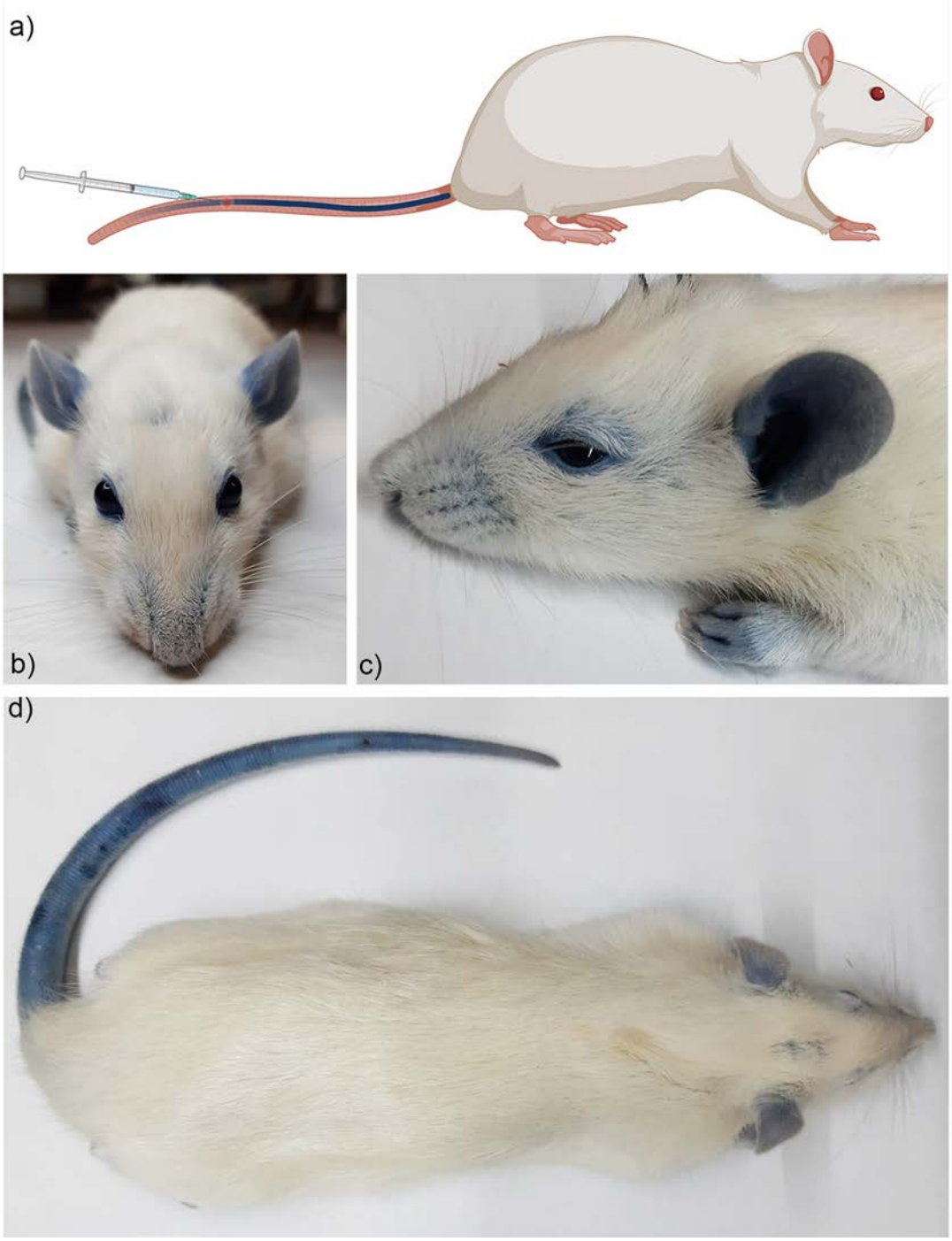

Figura 7. Administración de azul de Evans (AE) vía intravenosa (i.v.). a) Esquema representativo de la administración por la vena caudal. Extravasación del AE en: b) orejas, ojos y nariz; c) vestíbulo de la nariz y patas; d) cola. Inciso a) creado con BioRender.com.

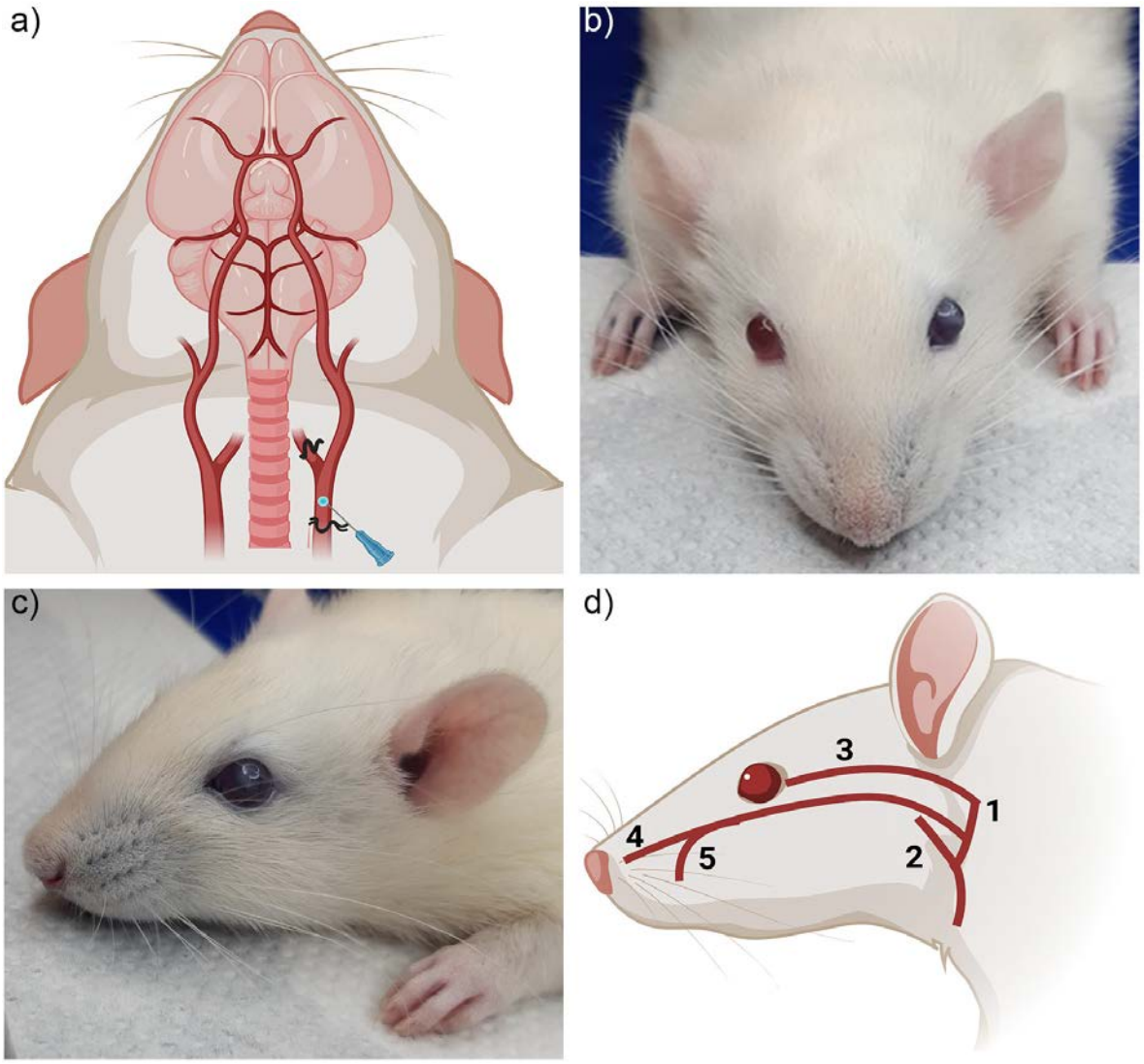

Figura 8. Administración del azul de Evans (AE) vía arteria carótida interna (ACI). a) Esquema representativo de la administración vía ACI; b-c) Extravasación del AE en la oreja izquierda; d) Diagrama de la irrigación sanguínea del ojo y vestíbulo de la nariz, donde con números se denota la ACI (1), ACE (2), arteria oftálmica (3), arteria etmoidal anterior (4) y arteria etmoidal posterior (5). Inciso a) y b) creado con BioRender.com.

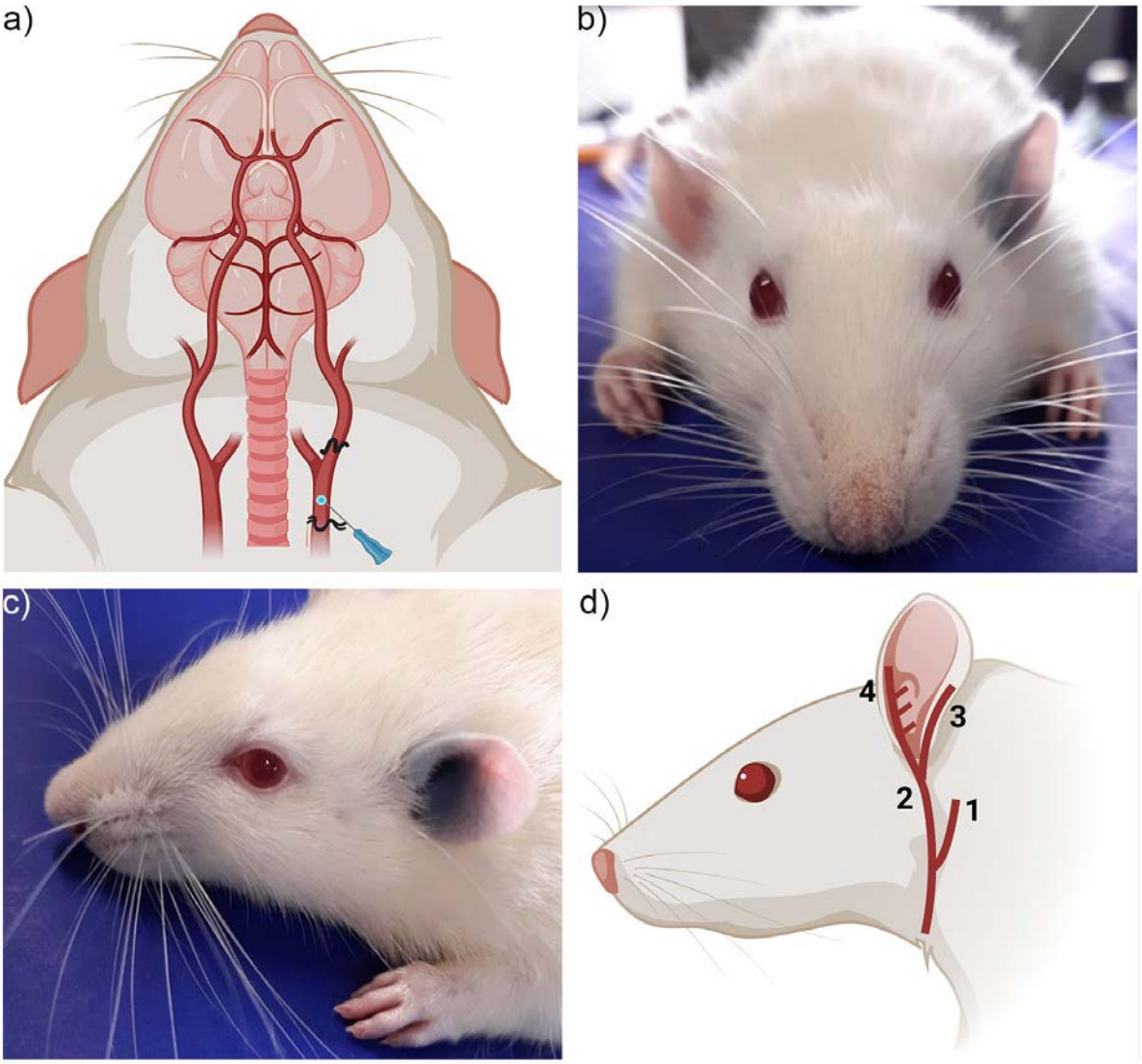

Figura 9. Administración del azul de Evans (AE) vía arteria carótida externa (ACE). a) Esquema representativo de la administración vía ACE; b-c) Extravasación del AE en la oreja izquierda; d) Diagrama de la irrigación sanguínea de la oreja, donde con números se denota la arteria carótida interna (ACI) (1), ACE (2), arteria auricular posterior (3) y arteria temporal superficial (4). Inciso a) y b) creado con BioRender.com.

6.3 La administración vía arteria carótida interna no desencadena alteraciones sensoriomotoras

Para determinar que el BSSG ocasiona disfunción sensoriomotora y que la administración vía ACI no desencadena esta afección, se realizó la prueba de vibrisas al grupo de DMSO, parkinsonianas (15 días post-DMSO y -BSSG, *n*= 3), y a las ratas parkinsonianas (15 días post-BSSG, *n* = 3) antes y después de la administración de AE. Al comparar el grupo DMSO contra el grupo parkinsoniano (BSSG ipsilateral y contralateral), se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) (Figura 10). Por otra parte, no se observó un efecto significativo ($p > 0.05$) entre los grupos después de la administración (BSSG + ACI, ipsilateraL y contralateral) con respecto al grupo previo a la lesión (BSSG, ipsilateral y contralateral) (Figura 11).

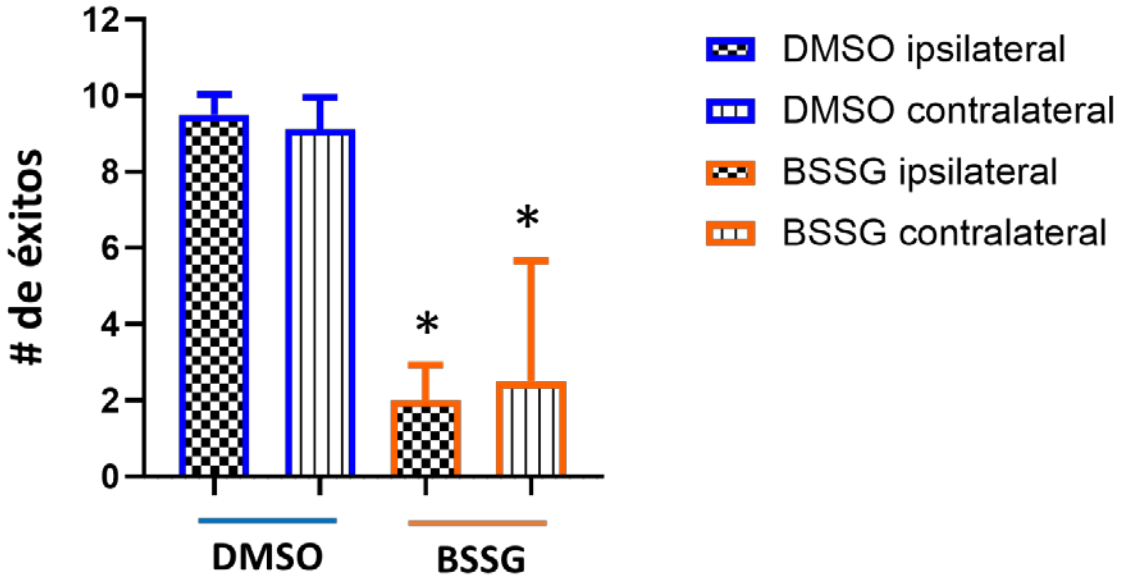

Figura 10. Alteraciones sensoriomotoras en la rata después de administrar dimetil sulfóxido (DMSO) y β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). Los datos se presentan como promedio ± error estándar, *n* = 3 por grupo, a los cuales se les realizó ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* Turkey. *p <0.05, cuando el grupo control DMSO es comparado contra el de BSSG.

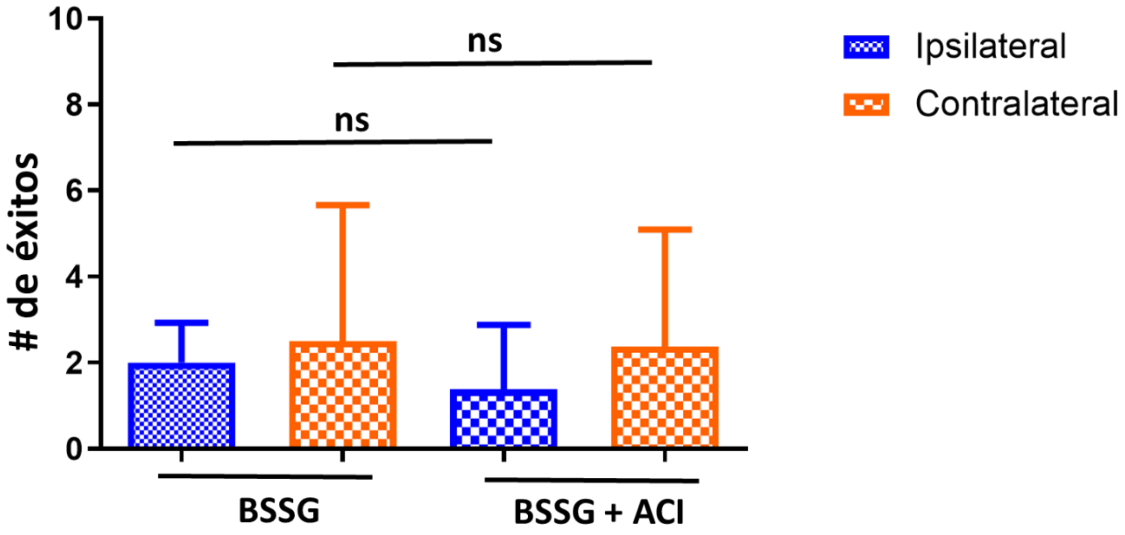

Figura 11. Alteraciones sensoriomotoras en la rata antes y después de la administración vía arteria carótida interna (ACI). Los datos se presentan como promedio ± error estándar, *n* = 3 por grupo, a los cuales se les realizó ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* Turkey. ns= no significancia estadística.

6.4 Aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al azul de Evans en ratas parkinsonianas

Para evaluar la permeabilidad de la BHE en ratas control, control DMSO y parkinsonianas, se administró el colorante AE vía intravenosa y ACI. Se observó una coloración azul por arriba de la SNpc en los cortes coronales interaural 2.64 y 3.24 mm del cerebro de ratas entre los 4-7 días después de la inyección estereotáxica con DMSO y BSSG (Figura 12). Sin embargo, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos BSSG i.v. y ACI (Figura 13). De la misma forma, se evaluó el curso temporal de la permeabilidad de la BHE a los 4, 7, 10 y 15 días, donde se encontró la presencia del AE únicamente a los días 4 y 7 (Figura 14). Sin embrago, solo se evidenció incremento significativo ($p \leq 0.05$) de la permeabilidad de la BHE en el grupo lesionado con BSSG 4 d, con respecto a los demás grupos. Además, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el grupo DMSO y los grupos BSSG 10 y 15 días (Figura 15).

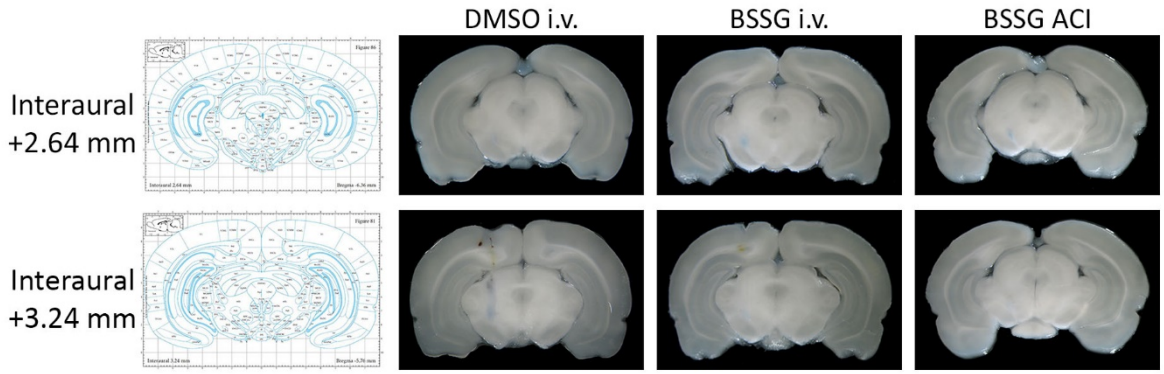

Figura 12. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica a los 4-7 días después de administrar dimetil sulfóxido (DMSO) y β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). Administración de azul de Evans (AE) vía intravenosa (i.v.) y arteria carótida interna (ACI). Micrografías representativas de la extravasación del AE en cortes cerebrales coronales en las coordenadas interaurales +2.64 y +3.24 mm, de acuerdo al atlas de Paxinos & Watson (2007).

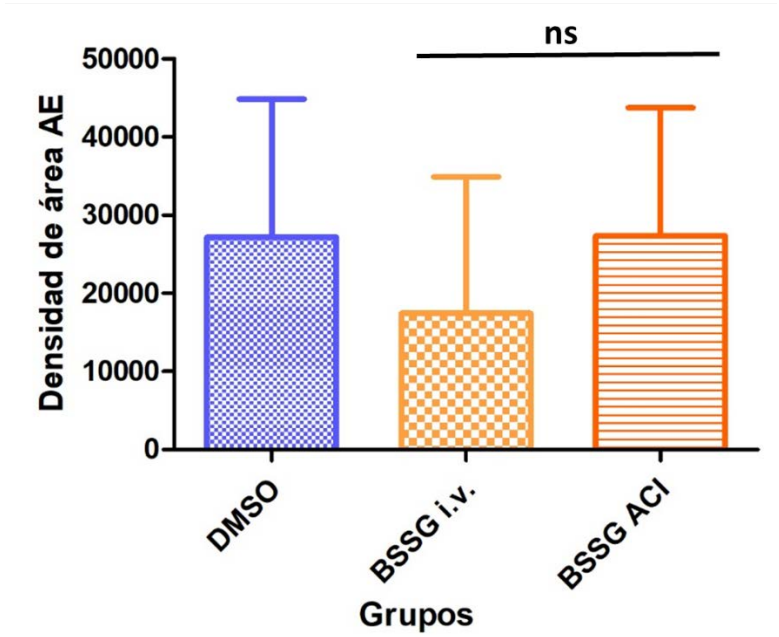

Figura 13. Cuantificación de la extravasación del azul de Evans (AE) en el cerebro a los 4-7 días después de la administración de dimetil sulfóxido (DMSO) y β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). Administración de AE vía intravenosa (i.v.) y arteria carótida interna (ACI). Los datos se presentan como promedio ± error estándar, n = 3 por grupo, a los cuales se les realizó ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* Turkey. ns= no significancia estadística.

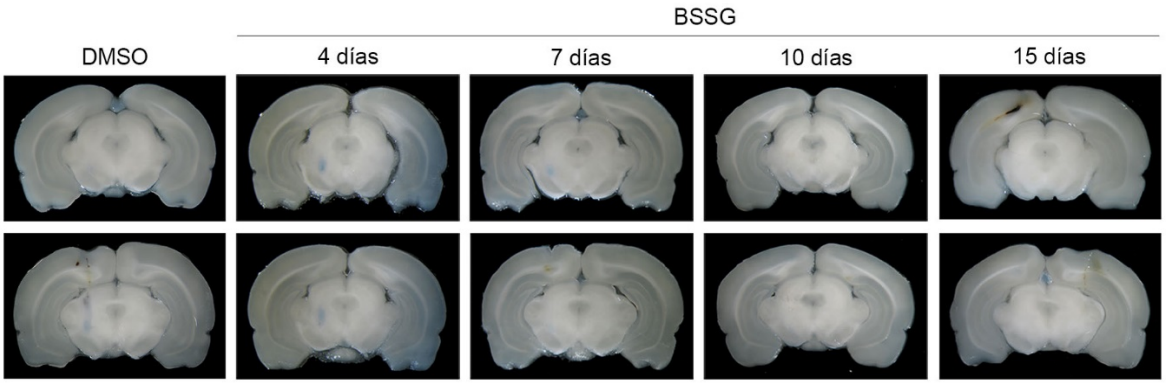

Figura 14. Curso temporal de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica con azul de Evans (AE) administrado vía intravenosa después de la inyección estereotáxica con dimetil sulfóxido (DMSO) y β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). Micrografías representativas de cortes cerebrales coronales del grupo de DMSO y 4, 7, 10 y 15 días posteriores a la administración de BSSG.

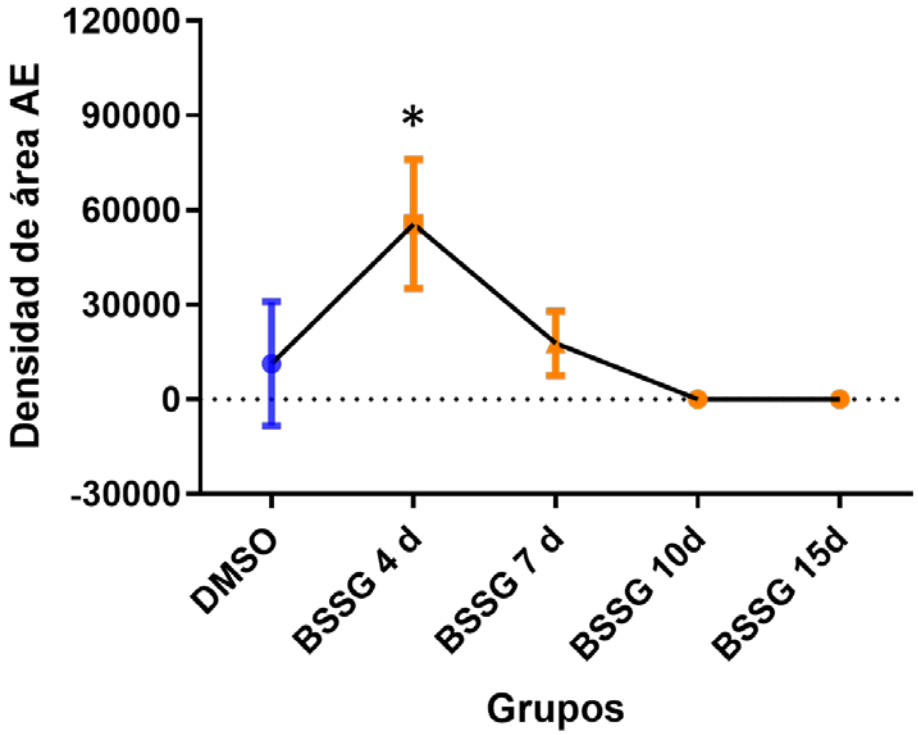

Figura 15. Cuantificación de la extravasación del azul de Evans (AE) en el cerebro a los 4, 7, 10 y 15 días después de la administración de dimetil sulfóxido (DMSO) y β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). Los datos se presentan como promedio ± error estándar, *n* = 3 por grupo, a los cuales

se les realizó ANOVA de una vía y la prueba post prueba Turkey. *p <0.05, cuando el grupo lesionado con BSSG 4 d es comparado contra los demás grupos.

6.5 Determinación de relaciones molares óptimas para las NPs hGDNF

Para determinar las relaciones molares óptimas de los componentes de las NPs hGDNF, se realizaron ensayos de retardo y retención. El gel de retardo se realizó con una concentración constante del ADNp (6 nM, pNBRE3x-hGDNF), mientras se aumentaba la concentración del PK (4-16 µM). Se encontró que la relación molar óptima del PK para formar el complejo PK-ADNp fue de 6 µM, debido a que corresponde a la primera concentración del PK que retarda la banda del ADNp sobre el borde superior de la banda control del ADNp (Figura 16 a,c). En cuanto a los geles de retención, se realizaron para determinar la relación molar óptima entre el complejo PK-ADNp y el acarreador. Se mantuvo constate el complejo PK-ADNp y se incrementó la concentración del acarreador. La relación molar óptima del acarreador fue de 198 nM para hGDNF, donde la concentración del acarreador produce la última retención visible de la banda del complejo PK-ADNp en comparación con el control (pADN) (Figura 16 b,d).

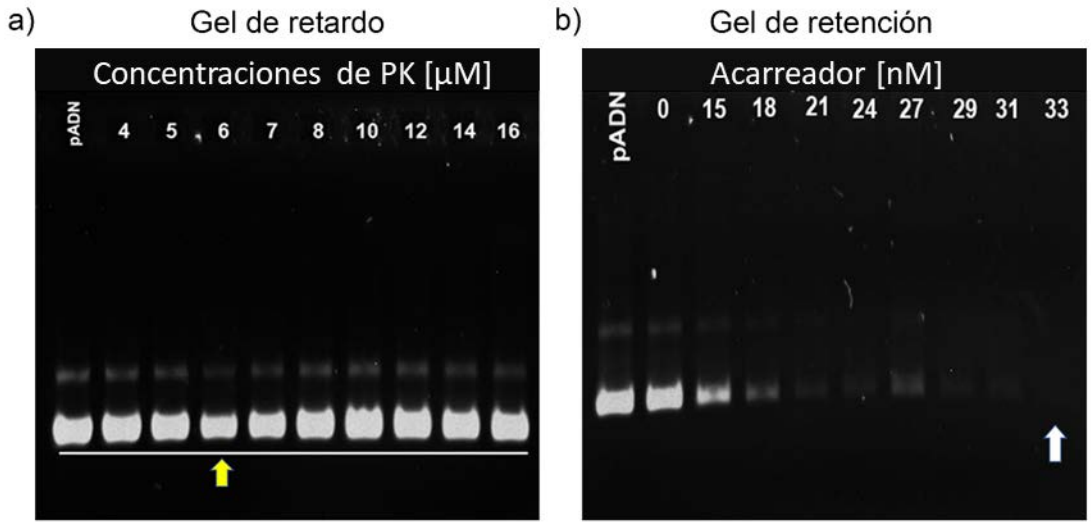

Figura 16. Geles de los ensayos de retardo y retención para las NPs hGDNF. a) Gel de retardo y b) Gel de retención. Las flechas amarillas y blancas indican la relación molar óptima para los geles de retardo y retención, respectivamente.

6.6 Expresión de hGDNF en neuronas dopaminérgicas nigrales mediante la administración intraarterial de NPs hGDNF

Para determinar la expresión de hGDNF en neuronas dopaminérgicas nigrales se realizó la técnica de inmunohistoquímica. Como control negativo se emplearon ratas parkinsonianas (administración intranigral de BSSG), para descartar que la inmunoreactividad observada para hGDNF fuera ocasionada por la inespecificidad del anticuerpo (Figura 17). Mientras que, como control positivo, se utilizaron ratas parkinsonianas con una inyección IN de NPs hGDNF (parkinsonismo-NPs hGDNF IN). Finalmente, se realizó un grupo de ratas parkinsonianas administradas con NPs hGDNF vía ACI (parkinsonismo-NPs hGDNF ACI). La inmunoreactividad para hGDNF se observó en el lado lesionado y control (lado contralateral a lesión) en las ratas del grupo parkinsonismo-NPs hGDNF IN y parkinsonismo-NPs hGDNF ACI. Además, se apreció una mayor inmunoreactividad cuando las NPs hGDNF se administraron vía ACI (Figura18,19). Por consiguiente, las NPs hGDNF atraviesan la BHE en ratas parkinsonianas.

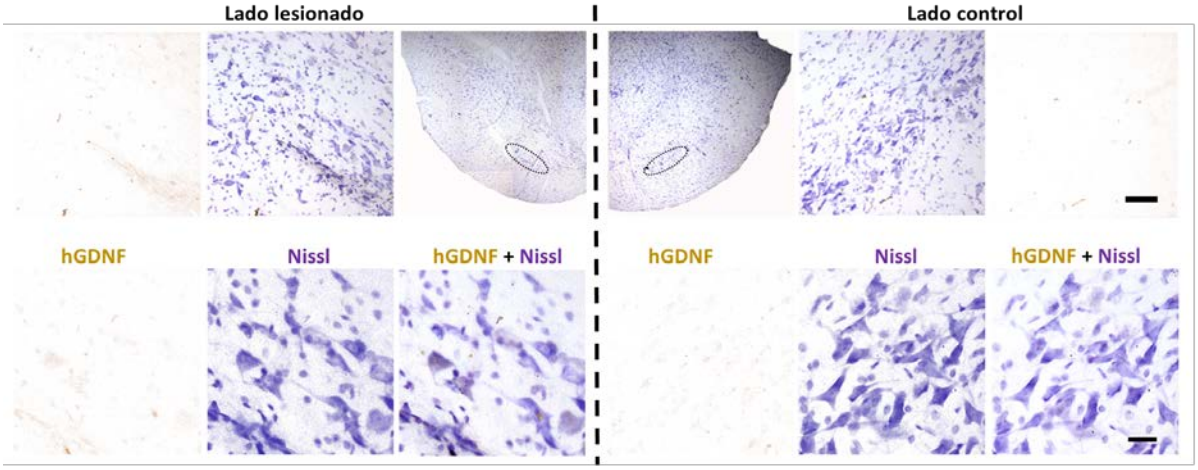

Figura 17. Expresión del hGDNF en las neuronas dopaminérgicas del modelo parkinsoniano inducido por la administración de β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). Micrografías representativas del mesencéfalo contra hGDNF y contrateñidas con Nissl en ratas parkinsonianas. En color café se aprecia la inmunoreactividad para hGDNF y en morado la tinción con Nissl. La barra de escala superior corresponde a 50 µm, mientras que la barra de escala inferior equivale a 20 µm.

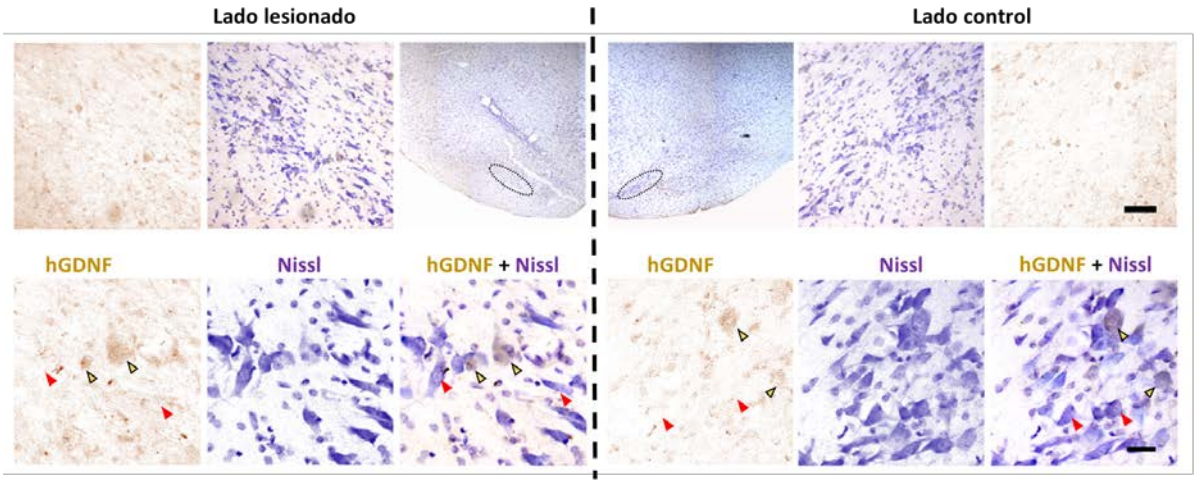

Figura 18. Expresión del hGDNF en las neuronas dopaminérgicas del modelo parkinsoniano inducido por la administración de β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). Micrografías representativas del mesencéfalo contra hGDNF y contrateñidas con Nissl en ratas parkinsonianas administradas con NPs hGDNF vía intranigral. En color café se aprecia la inmunoreactividad para hGDNF y en morado la tinción con Nissl. Las cabezas de flechas amarillas indican las neuronas que expresan hGDNF y las cabezas de flechas rojas señalan a las neuronas que no expresan o tienen una mínima expresión de hGDNF. La barra de escala superior corresponde a 50 µm, mientras que la barra de escala inferior equivale a 20 µm.

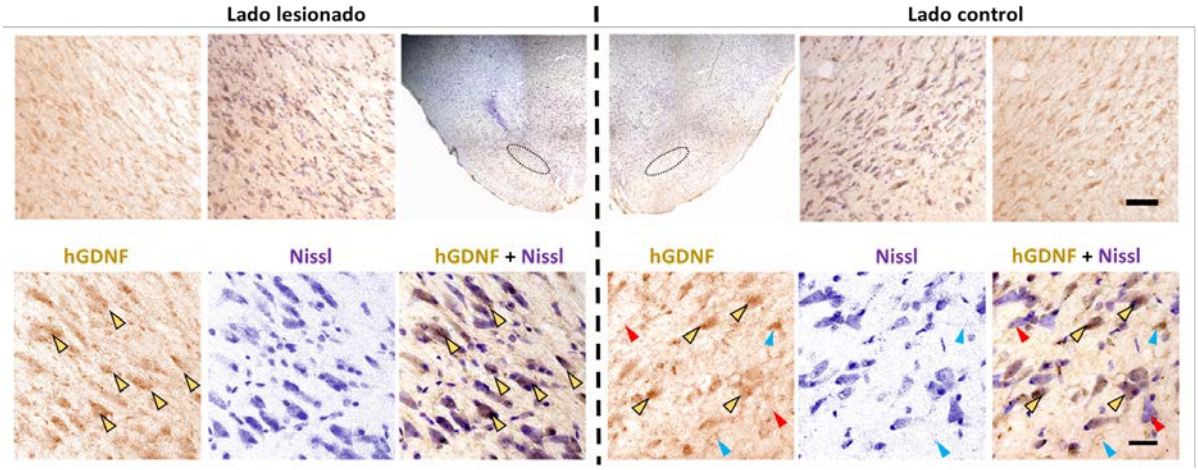

Figura 19. Expresión del hGDNF en las neuronas dopaminérgicas del modelo parkinsoniano inducido por la administración de β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG). Micrografías representativas del mesencéfalo contra hGDNF y contrateñidas con Nissl en ratas parkinsonianas administradas con NPs hGDNF vía arteria carótida interna (ACI). En color café se aprecia la inmunoreactividad para hGDNF y en morado la tinción con Nissl. Las cabezas de

flechas amarillas indican las neuronas que expresan hGDNF, las cabezas de flechas rojas señalan a las neuronas que no expresan o tienen una mínima expresión de hGDNF, y las cabezas de flechas azules denotan células no neuronales. La barra de escala superior corresponde a 50 μm, mientras que la barra de escala inferior equivale a 20 μm.

7. Discusión

En la EP se ha reportado que distintos factores como la neuroinflamación y los agregados patológico de α-sinucleína podrían ocasionar cambios en la estructura y función de la BHE (76, 143). Los mecanismos exactos por los cuales tienen lugar estas alteraciones, hasta el momento se desconocen (143, 144). Biológicamente se ha postulado que los cambios en la BHE inducen un aumento en la permeabilidad, lo cual podría ser una ventaja para administrar NPs hGDNF vía ACI. No obstante, solo en algunos modelos experimentales de la EP es posible observar la disrupción de la BHE, y desafortunadamente la mayoría de ellos no representa las cuatro marcas características de la enfermedad, a excepción del modelo de BSSG (78, 80, 90, 99, 104). Por eso en este trabajo decidimos usar dicho modelo para evaluar la administración de NPs hGDNF vía ACI y para ello fue necesario estandarizar el sitio de inyección con fucsina ácida arriba de la SNpc, tomando como referencia el atlas de Paxinos & Watson (2007) (135). Es importante resaltar que el sitio de inyección debe localizarse arriba de la SNpc para descartar que la muerte de las neuronas dopaminérgicas observadas en el modelo de BSSG, sea resultado del daño mecánico ocasionado por el procedimiento quirúrgico (145, 146). Una vez generado el modelo, se administró AE vía sistémica para evaluar la permeabilidad de la BHE en diferentes puntos temporales del modelo de BSSG, para complementar los resultados del estudio realizado por Luna-Herrera y colaboradores (2020) (80). Inmediatamente después de la administración, las ratas adquirieron una coloración azul, debido a la extravasación del colorante en orejas, ojos, nariz, vestíbulo de nariz, nariz, patas y cola. Esto confirma que se realizó correctamente la administración y distribución del colorante (147, 148). Por otra parte, se realizó un control negativo para comprobar que el AE se estaba administrando correctamente por la ACI y que la coloración azul observada en los tejidos correspondiera a la irrigación sanguínea de la arteria. Dicho control negativo consistió en suministrar el AE vía ACE y

se observó una coloración azul en la oreja de la rata, debido a que la ACE se encarga de proveer sangre a la cara y cuello, y da lugar a muchas ramificaciones que irrigan la oreja, como la arteria auricular posterior y arteria temporal superficial (149, 150). En cuanto a la administración vía ACI, se observó una coloración azul en el ojo y vestíbulo de la nariz. Esto se debe a que la ACI se ramifica primero en la arteria oftálmica que es el principal suministro de sangre al ojo y a través de sus ramas terminales y las arterias etmoidales anterior y posterior provee sangre a la nariz (151, 152). Además, la ACI es una de las 4 arterias encargadas de suministrar la sangre al cerebro que converge en el polígono de Willis en la base de cerebro (153). A su vez, el polígono de Willis (indirectamente la ACI) le provee la irrigación a la SN a través de las ramas de la arteria basilar y arteria cerebral posterior. La porción medial de la SN recibe sangre de las ramas paramedianas de la arteria basilar. Mientras que las porciones laterales de la SN son irrigadas por una rama de la arteria cerebral posterior, las arterias coroideas posteriores (154). También se evaluó si dicha administración ocasionaba daño neurológico mediante la prueba de colocación de extremidades anteriores evocadas por vibrisas. Se encontró que no hubo ninguna alteración significativa, lo cual concuerda con lo reportado por Leda y colaboradores (2017) (139). Diversos factores podrían influir en dichos resultados, pero definitivamente es claro que en dicho resultado influye el hecho de que los animales pequeños tienen la arteria carótida externa e interna más grande en comparación con las arterias vertebrales, por lo tanto, la oclusión se tolera bien y solo disminuye el flujo sanguíneo de manera transitoria (155).

En cuanto a la permeabilidad de la BHE al suministrar el AE vía i.v. y ACI, se observó el colorante en cortes coronales del mesencéfalo de ratas con DMSO y BSSG a los 4-7 días después de su administración. En comparación con lo reportado previamente por Luna-Herrera y colaboradores, donde mencionan que no hay un aumento en la permeabilidad de la BHE con el DMSO (80). Otros autores han reportado que el DMSO promueve la apertura de la BHE de manera transitoria, sin ocasionar alteraciones morfológicas, a los marcadores de alto peso molecular, peroxidasa de rábano (40 kDa) y AE (69 kDa). Los mecanismos propuestos son la estimulación de la pinocitosis, el transporte vesicular y

la apertura de uniones estrechas entre células endoteliales (156, 157). De la misma forma, el aumento en la permeabilidad de la BHE en el grupo DMSO pudo ser ocasionado por el daño mecánico inducido por la trayectoria de la aguja al realizar la inyección del DMSO (146). Mientras que, a nivel neuronal y glial, el DMSO ocasiona cambios morfológicos, reduce la viabilidad e induce gliosis de manera dependiente de la concentración o dosis empleada (158, 159). Sin embargo, en el modelo de BSSG, se observó que el DMSO no induce muerte neuronal significativa (disminución del 10% de neuronas dopaminérgicas) con respecto al grupo intacto (sin lesión) (90). Por otro lado, al comparar los grupos BSSG administrados vía i.v. y ACI con el AE, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos BSSG administrados vía i.v. y ACI, la cuantificación indirecta del colorante muestra una mayor densidad de área AE en el grupo ACI. Es importante mencionar que se ha reportado que el tipo de administración no es un factor que afecte la acumulación del colorante en el cerebro (162). En cambio, Wang y colaboradores (2018) demostraron que si había una diferencia significativa en la concentración del colorante en el cerebro dependiente de la vía de administración (147). Por consiguiente, sería importante aumentar el número de animales experimentales para corroborar si esto genera diferencias significativas entre la administración vía i.v. y ACI. No obstante, la administración ACI presenta ciertas ventajas como permitir la administración dirigida sin circulación sistémica previa, aumentando de esta forma la eficacia y disminuyendo el volumen de administración (136, 138). Además, este método presenta un bajo índice de mortalidad y se ha empleado exitosamente en animales grandes como conejos, lo cual lo convierte en una buena vía de administración terapéutica para su traslado en humanos (138, 139).

Por otra parte, al evaluar el curso temporal de la permeabilidad de la BHE a través del colorante AE en ratas a los 4, 7, 10 y 15 días después de inyectar el BSSG, se encontró la extravasación del colorante únicamente a los 4 y 7 días. Mientras que a los días 10 y 15 post-BSSG, no se apreció el colorante, contrario a lo reportado por Luna-Herrera y colaboradores (80), posiblemente, debido a que este colorante se une rápidamente a la albumina (5 min después de la inyección), pero de manera reversible (160, 161). Con respecto a esto, Manaenko y colaboradores encontraron una fuerte tendencia

dependiente del tiempo de circulación hacia el aumento de la acumulación del AE en el tejido (162). No obstante, existen pocos artículos que evalúan la relación entre el tiempo de circulación del AE y su acumulación en tejido (161). Además, es necesario realizar estudios complementarios más sensible, donde se evalúen los cambios en la permeabilidad de la BHE empleando marcadores de menor peso molecular como dextranes (3, 4, 40 kDa) (163, 164, 165).

Con respecto a la síntesis de las NPs GFP y hGDNF, se encontró que la relación molar óptima del PK fue de 6 μM para ambas NPs y del acarreador fue de 144 nM para NPS GFP y 198 nM para NPs hGDNF. La relación molar óptima del PK-ADNp es necesaria para lograr la transfección de las neuronas dopaminérgicas (más del 20%), lo cual coincide con lo reportado previamente (166). Mientras que la relación molar optima del acarreador para las NPs de hGDNF (198 nM) es un poco mayor a lo reportado previamente para pNBRE3x-hGDNF (162 nM), sin embargo, para otros ADNp se ha reportado una concentración de hasta 216 nM (pNBRE3x-rtTA-Adv-TRE-hGDNF), sin llegar a ser tóxico para las células (130). Así mismo, al administrar vía ACI las NPs hGDNF en el modelo de ratas parkinsonianas inducido por BSSG, se encontró que las NPs podían atravesar la BHE y expresar el hGDNF en las neuronas dopaminérgicas de lado lesionado y contralateral a la lesión. Bajo condiciones fisiológicas la BHE permite el paso de moléculas con un peso molecular alrededor de 400-600 Da en distintos tipos de transporte, sin embargo, en el modelo de BSSG la integridad de la BHE se encuentra comprometida y como consecuencia aumenta su permeabilidad permitiendo que moléculas de mayor peso molecular, como el AE (69 kDa) y las NPs (<180 kDa), entren al parénquima cerebral (69-72, 80, 167). Hasta el momento, se desconoce el mecanismo por el cual el BSSG aumenta la permeabilidad de la BHE. No obstante, otros compuestos fitoesteroles similares al BSSG como el β-sitosterol se han evaluado en cultivos primarios de células endoteliales de microvasos del cerebro de ratas y se encontró que ocasiona un aumento en la permeabilidad paracelular (168). Se ha reportado que otros sitosteroles induce un aumento de EROs que aumenta la expresión de la COX-2 ocasionando alteraciones en el perfil prostanoide que conducen a la disfunción endotelial y angiogénesis (169). Estos resultados por primera vez

demuestran que en el modelo de BSSG las NPs hGDNF administradas vía intraarterial atraviesan la BHE y expresan el hGDNF en neuronas dopaminérgicas. Por lo tanto, se convierte en una excelente oportunidad terapéutica para pacientes con la EP en estadios iniciales, debido a que atiende una de las principales preocupaciones de los ensayos clínicos actuales con GDNF que consiste en la vía de administración invasiva del factor neurotrófico (neurocirugía) y sus riesgos (83, 117, 118). Además, permite el envío dirigido del gen *GDNF* específicamente en neuronas dopaminérgicas.

8. Conclusión

Los estudios realizados en esta tesis demuestran que la administración vía ACI no ocasiona alteraciones sensoriomotoras y las ratas parkinsonianas (modelo BSSG) presentan un aumento en la permeabilidad de la BHE al colorante AE arriba de la SN, a los 4 y 7 días post-BSSG, siendo el día 4 el punto máximo en la apertura de BHE y posteriormente se cierra. Además, al administrar las NPs hGDNF vía sistémica el día 7 post-BSSG, las NPs atraviesan la BHE que se encuentra comprometida y permite el envío dirigido del gen *GDNF* en las neuronas dopaminérgicas.

Estos hallazgos indican que la vía de administración por la ACI es adecuada para suministrar moléculas que presentan un peso molecular de <180 kDa, cuando la BHE se encuentre comprometida, como es el caso del modelo de BSSG y los pacientes con la EP. Por lo tanto, el uso de estas NPs hGDNF administradas vía ACI representan una buena alternativa terapéutica menos invasiva que permite la entrega específica del gen de interés en pacientes con la EP.

9. Perspectivas para el futuro

- Evaluar la permeabilidad de la BHE con marcadores de distinto peso molecular para establecer un rango de las moléculas que pueden atravesar la BHE.
- Determinar el curso temporal de la permeabilidad de la BHE en las ratas con la inyección intranigral DMSO, para comprobar que el efecto observado en los grupos con BSSG se debe al DMSO.

- Optimizar la administración de AE vía ACI, con el objetivo de disminuir el volumen y el tiempo de circulación del colorante.
- Cuantificar la extravasación del colorante azul en el cerebro mediante espectrofotometría o espectrofotofluorometría.
- Estudiar el efecto de anti-inflamatorio y anti-α-sinucleína de las NPs-hGDNF en el modelo de BSSG.

10. Bibliografía

1. Acharya S, Salgado-Somoza A, Stefanizzi FM, Lumley AI, Zhang L, Glaab E, et al. Non-Coding RNAs in the Brain-Heart Axis: The Case of Parkinson's Disease. International journal of molecular sciences. 2020;21(18).
2. Chmielarz P, Saarma M. Neurotrophic factors for disease-modifying treatments of Parkinson's disease: gaps between basic science and clinical studies. Pharmacol Rep. 2020;72(5):1195-217.
3. Hong M, Mukhida K, Mendez I. GDNF therapy for Parkinson's disease. Expert review of neurotherapeutics. 2008;8(7):1125-39.
4. Mahato AK, Sidorova YA. Glial cell line-derived neurotrophic factors (GFLs) and small molecules targeting RET receptor for the treatment of pain and Parkinson's disease. Cell and tissue research. 2020;382(1):147-60.
5. Rodríguez-Violante M, Velásquez-Pérez L, Cervantes-Arriaga A. Incidence rates of Parkinson's disease in Mexico: Analysis of 2014-2017 statistics. Revista Mexicana de Neurociencia. 2019;20(3):136-40.
6. Joshi N, Singh S. Updates on immunity and inflammation in Parkinson disease pathology. Journal of neuroscience research. 2018;96(3):379-90.
7. Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. Brain : a journal of neurology. 1991;114 (Pt 5):2283-301.
8. Mahato A, Sidorova Y. Glial cell line-derived neurotrophic factors (GFLs) and small molecules targeting RET receptor for the treatment of pain and Parkinson's disease. Cell and tissue research. 2020.
9. Tibar H, El Bayad K, Bouhouche A, Ait Ben Haddou EH, Benomar A, Yahyaoui M, et al. Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease and Their Impact on Quality of Life in a Cohort of Moroccan Patients. Front Neurol. 2018;9:170-.
10. Volpicelli-Daley L, Brundin P. Prion-like propagation of pathology in Parkinson disease. Handbook of clinical neurology. 2018;153:321-35.
11. Chokroverty S, Montagna P. Chapter 29 - Sleep, Breathing, and Neurologic Disorders. In: Chokroverty S, editor. Sleep Disorders Medicine (Third Edition). Philadelphia: W.B. Saunders; 2009. p. 436-98.
12. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. Journal of neurochemistry. 2016;139 Suppl 2(Suppl 2):136-53.
13. Varanita T, Bubacco L. Chapter 27 - Alpha-synuclein and neuroinflammation in Parkinson's disease. In: Martin CR, Preedy VR, editors. Genetics, Neurology, Behavior, and Diet in Parkinson's Disease: Academic Press; 2020. p. 431-46.
14. Gelders G, Baekelandt V, Van der Perren A. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. Journal of immunology research. 2018;2018:4784268.
15. Flores-Martinez YM, Fernandez-Parrilla MA, Ayala-Davila J, Reyes-Corona D, Blanco-Alvarez VM, Soto-Rojas LO, et al. Acute Neuroinflammatory Response in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rats after a Local Injection of Lipopolysaccharide. Journal of immunology research. 2018;2018:1838921.
16. Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, et al. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. The New England journal of medicine. 2004;351(24):2498-508.

17. Ferreira RN, de Miranda AS, Rocha NP, Simoes ESAC, Teixeira AL, da Silva Camargos ER. Neurotrophic Factors in Parkinson's Disease: What Have we Learned from Pre-Clinical and Clinical Studies? Current medicinal chemistry. 2018;25(31):3682-702.
18. Vilar M, Mira H. Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles. Frontiers in neuroscience. 2016;10:26.
19. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science (New York, NY). 1993;260(5111):1130-2.
20. Rocha SM, Cristovão AC, Campos FL, Fonseca CP, Baltazar G. Astrocyte-derived GDNF is a potent inhibitor of microglial activation. Neurobiology of disease. 2012;47(3):407-15.
21. Zhao Y, Haney MJ, Jin YS, Uvarov O, Vinod N, Lee YZ, et al. GDNF-expressing macrophages restore motor functions at a severe late-stage, and produce long-term neuroprotective effects at an early-stage of Parkinson's disease in transgenic Parkin Q311X(A) mice. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2019;315:139-49.
22. Delgado-Minjares KM, Martinez-Fong D, Martínez-Dávila IA, Bañuelos C, Gutierrez-Castillo ME, Blanco-Alvarez VM, et al. Mechanistic Insight from Preclinical Models of Parkinson's Disease Could Help Redirect Clinical Trial Efforts in GDNF Therapy. International journal of molecular sciences. 2021;22(21).
23. Gonzalez-Barrios JA, Lindahl M, Bannon MJ, Anaya-Martínez V, Flores G, Navarro-Quiroga I, et al. Neurotensin polyplex as an efficient carrier for delivering the human GDNF gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2006;14(6):857-65.
24. Hernando S, Herran E, Figueiro-Silva J, Pedraz JL, Igartua M, Carro E, et al. Intranasal Administration of TAT-Conjugated Lipid Nanocarriers Loading GDNF for Parkinson's Disease. Molecular neurobiology. 2018;55(1):145-55.
25. Sun S, Zhang Q, Li M, Gao P, Huang K, Beejadhursing R, et al. GDNF Promotes Survival and Therapeutic Efficacy of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Mouse Model of Parkinson's Disease. Cell transplantation. 2020;29:963689720908512.
26. Rubio-Zapata HA, Rembao-Bojorquez JD, Arango-Rodriguez ML, Dupouy S, Forgez P, Martinez-Fong D. NT-polyplex: a new tool for therapeutic gene delivery to neuroblastoma tumors. Cancer Gene Therapy. 2009;16(7):573-84.
27. Martinez-Fong D, Bannon MJ, Trudeau LE, Gonzalez-Barrios JA, Arango-Rodriguez ML, Hernandez-Chan NG, et al. NTS-Polyplex: a potential nanocarrier for neurotrophic therapy of Parkinson's disease. Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine. 2012;8(7):1052-69.
28. Emamzadeh FN. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences. 2016;21:29.
29. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. Science (New York, NY). 2010;329(5999):1663-7.

30. Klein C, Westenberger A. Genetics of Parkinson's disease. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2(1):a008888-a.
31. Simon DK, Tanner CM, Brundin PJCigm. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology. 2020;36(1):1-12.
32. Ahn TB, Kim SY, Kim JY, Park SS, Lee DS, Min HJ, et al. alpha-Synuclein gene duplication is present in sporadic Parkinson disease. Neurology. 2008;70(1):43-9.
33. Gómez-Benito M, Granado N, García-Sanz P, Michel A, Dumoulin M, Moratalla R. Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein. 2020;11(356).
34. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiology of aging. 2003;24(2):197-211.
35. Visanji NP, Brooks PL, Hazrati LN, Lang AE. The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future. Acta neuropathologica communications. 2013;1:2.
36. Rey N, Petit G, Bousset L, Melki R, Brundin P. Transfer of human α-synuclein from the bulb to interconnected brain regions in mice. Acta neuropathologica. 2013;126.
37. Van Den Berge N, Ferreira N, Gram H, Mikkelsen TW, Alstrup AKO, Casadei N, et al. Evidence for bidirectional and trans-synaptic parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats. Acta Neuropathologica. 2019;138(4):535-50.
38. Alvarez-Erviti L, Couch Y, Richardson J, Cooper JM, Wood MJA. Alpha-synuclein release by neurons activates the inflammatory response in a microglial cell line. Neuroscience Research. 2011;69(4):337-42.
39. Troncoso-Escudero P, Parra A, Nassif M, Vidal RL. Outside in: Unraveling the Role of Neuroinflammation in the Progression of Parkinson's Disease. 2018;9(860).
40. McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, McGeer EG. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. Annals of neurology. 1988;24(4):574-6.
41. Hirsch EC, Standaert DG. Ten Unsolved Questions About Neuroinflammation in Parkinson's Disease. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society. 2021;36(1):16-24.
42. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature. 2017;541(7638):481-7.
43. Kam T-I, Hinkle JT, Dawson TM, Dawson VL. Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease. Neurobiology of disease. 2020;144:105028.
44. York EM, LeDue JM, Bernier L-P, MacVicar BA. 3DMorph Automatic Analysis of Microglial Morphology in Three Dimensions from Ex Vivo and In Vivo Imaging. 2018;5(6):ENEURO.0266-18.2018.
45. Lecours C, Bordeleau M, Cantin L, Parent M, Paolo TD, Tremblay M-È. Microglial Implication in Parkinson's Disease: Loss of Beneficial Physiological Roles or Gain of Inflammatory Functions? Front Cell Neurosci. 2018;12:282-.
46. Ho MS. Microglia in Parkinson's Disease. Advances in experimental medicine and biology. 2019;1175:335-53.
47. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. 2020;14(198).

48. Fellner L, Irschick R, Schanda K, Reindl M, Klimaschewski L, Poewe W, et al. Toll-like receptor 4 is required for α-synuclein dependent activation of microglia and astroglia. Glia. 2013;61(3):349-60.
49. Kim C, Ho DH, Suk JE, You S, Michael S, Kang J, et al. Neuron-released oligomeric α-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. Nat Commun. 2013;4:1562.
50. Panicker N, Sarkar S, Harischandra DS, Neal M, Kam TI, Jin H, et al. Fyn kinase regulates misfolded α-synuclein uptake and NLRP3 inflammasome activation in microglia. The Journal of experimental medicine. 2019;216(6):1411-30.
51. Kinugawa K, Monnet Y, Béchade C, Alvarez-Fischer D, Hirsch EC, Bessis A, et al. DAP12 and CD11b contribute to the microglial-induced death of dopaminergic neurons in vitro but not in vivo in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. Journal of neuroinflammation. 2013;10:82.
52. Matejuk A, Ransohoff RM. Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview. 2020;11(1416).
53. Booth HDE, Hirst WD, Wade-Martins R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. Trends in neurosciences. 2017;40(6):358-70.
54. Guttenplan KA, Weigel MK, Prakash P, Wijewardhane PR, Hasel P, Rufen-Blanchette U, et al. Neurotoxic reactive astrocytes induce cell death via saturated lipids. Nature. 2021;599(7883):102-7.
55. Esposito G, De Filippis D, Cirillo C, Sarnelli G, Cuomo R, Iuvone T. The astroglial-derived S100beta protein stimulates the expression of nitric oxide synthase in rodent macrophages through p38 MAP kinase activation. Life sciences. 2006;78(23):2707-15.
56. Sathe K, Maetzler W, Lang JD, Mounsey RB, Fleckenstein C, Martin HL, et al. S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF-α pathway. Brain : a journal of neurology. 2012;135(Pt 11):3336-47.
57. Lee HJ, Kim C, Lee SJ. Alpha-synuclein stimulation of astrocytes: Potential role for neuroinflammation and neuroprotection. Oxidative medicine and cellular longevity. 2010;3(4):283-7.
58. Chavarría C, Rodríguez-Bottero S, Quijano C, Cassina P, Souza JM. Impact of monomeric, oligomeric and fibrillar alpha-synuclein on astrocyte reactivity and toxicity to neurons. The Biochemical journal. 2018;475(19):3153-69.
59. Lindström V, Gustafsson G, Sanders LH, Howlett EH, Sigvardson J, Kasrayan A, et al. Extensive uptake of α-synuclein oligomers in astrocytes results in sustained intracellular deposits and mitochondrial damage. Molecular and cellular neurosciences. 2017;82:143-56.
60. Russ K, Teku G, Bousset L, Redeker V, Piel S, Savchenko E, et al. TNF-α and α-synuclein fibrils differently regulate human astrocyte immune reactivity and impair mitochondrial respiration. Cell reports. 2021;34(12):108895.
61. Flood P, Arbabzada N, Sharma M. Inflammation: role in Parkinson's disease and target for therapy: IntechOpen; 2016.
62. Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. Neuroscience letters. 1994;165(1-2):208-10.

63. Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, et al. Interleukin-1β, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-α are elevated in the brain from parkinsonian patients. Neuroscience letters. 1994;180(2):147-50.
64. Desai BS, Monahan AJ, Carvey PM, Hendey B. Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. Cell transplantation. 2007;16(3):285-99.
65. Gray MT, Woulfe JM. Striatal blood-brain barrier permeability in Parkinson's disease. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2015;35(5):747-50.
66. Nagatsu T, Sawada M. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. Current pharmaceutical design. 2005;11(8):999-1016.
67. Cabezas R, Ávila M, Gonzalez J, El-Bachá RS, Báez E, García-Segura LM, et al. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. 2014;8(211).
68. Devraj K, Guérit S, Macas J, Reiss Y. An In Vivo Blood-brain Barrier Permeability Assay in Mice Using Fluorescently Labeled Tracers. Journal of visualized experiments : JoVE. 2018(132).
69. Stamatovic SM, Johnson AM, Keep RF, Andjelkovic AV. Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. Tissue barriers. 2016;4(1):e1154641.
70. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. Nature Reviews Neuroscience. 2006;7(1):41-53.
71. Sharma K, Kalakoti P, Nanda A, Sun H. Blood-Brain Barrier Disruption During Neuroinflammation. Neuroinflammation2018. p. 529-39.
72. van Rooy I, Cakir-Tascioglu S, Hennink WE, Storm G, Schiffelers RM, Mastrobattista E. In vivo methods to study uptake of nanoparticles into the brain. Pharmaceutical research. 2011;28(3):456-71.
73. Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2016;235:34-47.
74. Kortekaas R, Leenders KL, van Oostrom JC, Vaalburg W, Bart J, Willemsen AT, et al. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. Annals of neurology. 2005;57(2):176-9.
75. Al-Bachari S, Naish JH, Parker GJM, Emsley HCA, Parkes LM. Blood-Brain Barrier Leakage Is Increased in Parkinson's Disease. Frontiers in physiology. 2020;11:593026.
76. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Sato K. Activated Microglia Disrupt the Blood-Brain Barrier and Induce Chemokines and Cytokines in a Rat in vitro Model. Front Cell Neurosci. 2018;12:494.
77. Haruwaka K, Ikegami A, Tachibana Y, Ohno N, Konishi H, Hashimoto A, et al. Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. Nature Communications. 2019;10(1):5816.
78. Chen X, Lan X, Roche I, Liu R, Geiger JD. Caffeine protects against MPTP-induced blood-brain barrier dysfunction in mouse striatum. Journal of neurochemistry. 2008;107(4):1147-57.

79. Pienaar IS, Lee CH, Elson JL, McGuinness L, Gentleman SM, Kalaria RN, et al. Deep-brain stimulation associates with improved microvascular integrity in the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. Neurobiology of disease. 2015;74:392-405.
80. Luna-Herrera C, Martínez-Dávila IA, Soto-Rojas LO, Flores-Martinez YM, Fernandez-Parrilla MA, Ayala-Davila J, et al. Intranigral Administration of β-Sitosterol-β-D-Glucoside Elicits Neurotoxic A1 Astrocyte Reactivity and Chronic Neuroinflammation in the Rat Substantia Nigra. Journal of immunology research. 2020;2020:5907591.
81. Van Kampen JM, Baranowski DC, Robertson HA, Shaw CA, Kay DG. The Progressive BSSG Rat Model of Parkinson's: Recapitulating Multiple Key Features of the Human Disease. PloS one. 2015;10(10):e0139694.
82. Cebrián C, Loike JD, Sulzer D. Neuroinflammation in Parkinson's disease animal models: a cell stress response or a step in neurodegeneration? Current topics in behavioral neurosciences. 2015;22:237-70.
83. Barker RA, Björklund A, Gash DM, Whone A, Van Laar A, Kordower JH, et al. GDNF and Parkinson's Disease: Where Next? A Summary from a Recent Workshop. Journal of Parkinson's disease. 2020;10(3):875-91.
84. Alasia DD, Asekomeh GA, Unachuku CN. Parkinsonism induced by sepsis: a case report. Nigerian journal of medicine : journal of the National Association of Resident Doctors of Nigeria. 2006;15(3):333-6.
85. Liu M, Bing G. Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease. Parkinson's disease. 2011;2011:327089.
86. García-Domínguez I, Veselá K, García-Revilla J, Carrillo-Jiménez A, Roca-Ceballos MA, Santiago M, et al. Peripheral Inflammation Enhances Microglia Response and Nigral Dopaminergic Cell Death in an in vivo MPTP Model of Parkinson's Disease. Front Cell Neurosci. 2018;12:398.
87. Wilson JMB, Khabazian I, Wong MC, Seyedalikhani A, Bains JS, Pasqualotto BA, et al. Behavioral and neurological correlates of ALS-parkinsonism dementia complex in adult mice fed washed cycad flour. NeuroMolecular Medicine. 2002;1(3):207-21.
88. Van Kampen JM, Robertson HA. The BSSG rat model of Parkinson's disease: progressing towards a valid, predictive model of disease. EPMA J. 2017;8(3):261-71.
89. Soto-Rojas LO, Garces-Ramirez L, Luna-Herrera C, Flores-Martinez YM, Soto-Rodriguez G, Gatica-Garcia B, et al. A single intranigral administration of β-sitosterol β-d-glucoside elicits bilateral sensorimotor and non-motor alterations in the rat. Behavioural brain research. 2020;378:112279.
90. Soto-Rojas LO, Martínez-Dávila IA, Luna-Herrera C, Gutierrez-Castillo ME, Lopez-Salas FE, Gatica-Garcia B, et al. Unilateral intranigral administration of β-sitosterol β-D-glucoside triggers pathological α-synuclein spreading and bilateral nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the rat. Acta neuropathologica communications. 2020;8(1):56.
91. Potashkin JA, Blume SR, Runkle NK. Limitations of animal models of Parkinson's disease. Parkinson's disease. 2010;2011:658083.
92. Pingale T, Gupta GL. Classic and evolving animal models in Parkinson's disease. Pharmacology, biochemistry, and behavior. 2020;199:173060.

93. Minjing Ke C-MC, Qi Zhu,Ke Zhang,Cui-Zan Cai,Jia-Hong Lu,Dajiang Qin,Huanxing Su. Comprehensive Perspectives on Experimental Models for Parkinson’s Disease. 2021;12(1):223-46.
94. Castro-Sánchez S, García-Yagüe Á J, López-Royo T, Casarejos M, Lanciego JL, Lastres-Becker I. Cx3cr1-deficiency exacerbates alpha-synuclein-A53T induced neuroinflammation and neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. Glia. 2018;66(8):1752-62.
95. Decressac M, Ulusoy A, Mattsson B, Georgievska B, Romero-Ramos M, Kirik D, et al. GDNF fails to exert neuroprotection in a rat α-synuclein model of Parkinson's disease. Brain : a journal of neurology. 2011;134(Pt 8):2302-11.
96. Su X, Fischer DL, Li X, Bankiewicz K, Sortwell CE, Federoff HJ. Alpha-Synuclein mRNA Is Not Increased in Sporadic PD and Alpha-Synuclein Accumulation Does Not Block GDNF Signaling in Parkinson's Disease and Disease Models. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2017;25(10):2231-5.
97. Deng I, Corrigan F, Zhai G, Zhou X-F, Bobrovskaya L. Lipopolysaccharide animal models of Parkinson's disease: Recent progress and relevance to clinical disease. Brain, Behavior, & Immunity - Health. 2020;4:100060.
98. Bonito-Oliva A, Masini D, Fisone G. A mouse model of non-motor symptoms in Parkinson's disease: focus on pharmacological interventions targeting affective dysfunctions. 2014;8(290).
99. Carvey PM, Zhao CH, Hendey B, Lum H, Trachtenberg J, Desai BS, et al. 6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood-brain barrier permeability. The European journal of neuroscience. 2005;22(5):1158-68.
100. Santiago RM, Barbieiro J, Lima MM, Dombrowski PA, Andreatini R, Vital MA. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry. 2010;34(6):1104-14.
101. Cankara FN, Günaydın C, Bilge SS, Özmen Ö, Kortholt A. The neuroprotective action of lenalidomide on rotenone model of Parkinson's Disease: Neurotrophic and supportive actions in the substantia nigra pars compacta. Neuroscience letters. 2020;738:135308.
102. Paumier KL, Sukoff Rizzo SJ, Berger Z, Chen Y, Gonzales C, Kaftan E, et al. Behavioral characterization of A53T mice reveals early and late stage deficits related to Parkinson's disease. PloS one. 2013;8(8):e70274.
103. Mutluay S, Cinar E, Cakmakli G, Ulusoy A, Elibol B, Tel B. Modelling Non-motor Symptoms of Parkinson's Disease: AAV Mediated Overexpression of Alpha-synuclein in Rat Hippocampus and Basal Ganglia. Turkish Journal Of Neurology. 2020;26:322-9.
104. Elabi O, Gaceb A, Carlsson R, Padel T, Soylu-Kucharz R, Cortijo I, et al. Human α-synuclein overexpression in a mouse model of Parkinson's disease leads to vascular pathology, blood brain barrier leakage and pericyte activation. Scientific Reports. 2021;11(1):1120.
105. Cintrón-Colón AF, Almeida-Alves G, Boynton AM, Spitsbergen JM. GDNF synthesis, signaling, and retrograde transport in motor neurons. Cell and tissue research. 2020;382(1):47-56.

106. Duarte Azevedo M, Sander S, Tenenbaum L. GDNF, A Neuron-Derived Factor Upregulated in Glial Cells during Disease. Journal of clinical medicine. 2020;9(2).
107. Hellmich HL, Kos L, Cho ES, Mahon KA, Zimmer A. Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. Mechanisms of Development. 1996;54(1):95-105.
108. Chauhan NB, Siegel GJ, Lee JM. Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain. Journal of chemical neuroanatomy. 2001;21(4):277-88.
109. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. Nature Reviews Neuroscience. 2002;3(5):383-94.
110. Kim M, Kim DJ. GFRA1: A Novel Molecular Target for the Prevention of Osteosarcoma Chemoresistance. International journal of molecular sciences. 2018;19(4).
111. Trupp M, Belluardo N, Funakoshi H, Ibáñez CF. Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1997;17(10):3554-67.
112. Bespalov MM, Sidorova YA, Tumova S, Ahonen-Bishopp A, Magalhães AC, Kulesskiy E, et al. Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. The Journal of cell biology. 2011;192(1):153-69.
113. Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Kogure O, Kuno S, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor in the substantia nigra from control and parkinsonian brains. Neuroscience letters. 2001;300(3):179-81.
114. Virachit S, Mathews KJ, Cottam V, Werry E, Galli E, Rappou E, et al. Levels of glial cell line-derived neurotrophic factor are decreased, but fibroblast growth factor 2 and cerebral dopamine neurotrophic factor are increased in the hippocampus in Parkinson's disease. Brain pathology (Zurich, Switzerland). 2019;29(6):813-25.
115. Griego E, Herrera-López G, Gómez-Lira G, Barrionuevo G, Gutiérrez R, Galván EJ. Functional expression of TrkB receptors on interneurones and pyramidal cells of area CA3 of the rat hippocampus. Neuropharmacology. 2021;182:108379.
116. Chu Y, Kordower JH. GDNF signaling in subjects with minimal motor deficits and Parkinson's disease. Neurobiology of disease. 2021;153:105298.
117. Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER, Jr., et al. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. Neurology. 2003;60(1):69-73.
118. Whone A, Luz M, Boca M, Woolley M, Mooney L, Dharia S, et al. Randomized trial of intermittent intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. Brain : a journal of neurology. 2019;142(3):512-25.
119. Kirik D, Georgievska B, Bjorklund A. Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. Nat Neurosci. 2004;7(2):105-10.
120. Quintino L, Avallone M, Brännstrom E, Kavanagh P, Lockowandt M, Garcia Jareño P, et al. GDNF-mediated rescue of the nigrostriatal system depends on the degree of degeneration. Gene therapy. 2019;26(1-2):57-64.

121. Wang X, Cui G, Yang X, Zhang Z, Shi H, Zu J, et al. Intracerebral administration of ultrasound-induced dissolution of lipid-coated GDNF microbubbles provides neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. Brain Research Bulletin. 2014;103:60-5.
122. Littrell OM, Granholm AC, Gerhardt GA, Boger HA. Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) replacement attenuates motor impairments and nigrostriatal dopamine deficits in 12-month-old mice with a partial deletion of GDNF. Pharmacology, biochemistry, and behavior. 2013;104:10-9.
123. Rickert U, Grampp S, Wilms H, Spreu J, Knerlich-Lukoschus F, Held-Feindt J, et al. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Family Members Reduce Microglial Activation via Inhibiting p38MAPKs-Mediated Inflammatory Responses. Journal of neurodegenerative diseases. 2014;2014:369468.
124. Zhao Y, Haney MJ, Gupta R, Bohnsack JP, He Z, Kabanov AV, et al. GDNF-transfected macrophages produce potent neuroprotective effects in Parkinson's disease mouse model. PloS one. 2014;9(9):e106867.
125. Lin CY, Lin YC, Huang CY, Wu SR, Chen CM, Liu HL. Ultrasound-responsive neurotrophic factor-loaded microbubble- liposome complex: Preclinical investigation for Parkinson's disease treatment. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2020;321:519-28.
126. Brundin P. GDNF treatment in Parkinson's disease: time for controlled clinical trials? Brain : a journal of neurology. 2002;125(Pt 10):2149-51.
127. Huang R, Ma H, Guo Y, Liu S, Kuang Y, Shao K, et al. Angiopep-conjugated nanoparticles for targeted long-term gene therapy of Parkinson's disease. Pharmaceutical research. 2013;30(10):2549-59.
128. Mead BP, Kim N, Miller GW, Hodges D, Mastorakos P, Klibanov AL, et al. Novel Focused Ultrasound Gene Therapy Approach Noninvasively Restores Dopaminergic Neuron Function in a Rat Parkinson's Disease Model. Nano letters. 2017;17(6):3533-42.
129. Boules M, Li Z, Smith K, Fredrickson P, Richelson E. Diverse roles of neurotensin agonists in the central nervous system. Frontiers in endocrinology. 2013;4:36.
130. Espadas-Alvarez AJ, Bannon MJ, Orozco-Barrios CE, Escobedo-Sanchez L, Ayala-Davila J, Reyes-Corona D, et al. Regulation of human GDNF gene expression in nigral dopaminergic neurons using a new doxycycline-regulated NTS-polyplex nanoparticle system. Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine. 2017;13(4):1363-75.
131. Iarkov A, Barreto GE, Grizzell JA, Echeverria V. Strategies for the Treatment of Parkinson's Disease: Beyond Dopamine. 2020;12(4).
132. Chmielarz P, Er Ş, Konovalova J, Bandres L, Hlushchuk I, Albert K, et al. GDNF/RET Signaling Pathway Activation Eliminates Lewy Body Pathology in Midbrain Dopamine Neurons. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society. 2020;35(12):2279-89.
133. Soto-Rojas LO, Bañuelos C, Garces-Ramirez L, Luna-Herrera C, Flores-Martínez YM, Soto-Rodríguez G, et al. A sequential methodology for integral evaluation of motor and non-motor behaviors in parkinsonian rodents. MethodsX. 2020;7:100821.
134. Vivekanantham S, Shah S, Dewji R, Dewji A, Khatri C, Ologunde R. Neuroinflammation in Parkinson's disease: role in neurodegeneration and tissue repair. The International journal of neuroscience. 2015;125(10):717-25.

135. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition: Elsevier Science; 2007.
136. Kozler P, Pokorný J. Altered blood-brain barrier permeability and its effect on the distribution of Evans blue and sodium fluorescein in the rat brain applied by intracarotid injection. Physiological research. 2003;52(5):607-14.
137. Santillan A, Rubin DG, Foley CP, Sondhi D, Crystal RG, Gobin YP, et al. Cannulation of the internal carotid artery in mice: A novel technique for intra-arterial delivery of therapeutics. Journal of neuroscience methods. 2014;222:106-10.
138. Messmer SJ, Fraser JF, Pennypacker KR, Roberts JM. Method of intra-arterial drug administration in a rat: Sex based optimization of infusion rate. Journal of neuroscience methods. 2021;357:109178.
139. Leda AR, Dygert L, Bertrand L, Toborek M. Mouse Microsurgery Infusion Technique for Targeted Substance Delivery into the CNS via the Internal Carotid Artery. Journal of visualized experiments : JoVE. 2017(119).
140. Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS. 2011;50(5):600-13.
141. Barth TM, Stanfield BB. Homotopic, but Not Heterotopic, Fetal Cortical Transplants Can Result in Functional Sparing following Neonatal Damage to the Frontal Cortex in Rats. Cerebral Cortex. 1994;4(3):271-8.
142. Arango-Rodriguez ML, Navarro-Quiroga I, Gonzalez-Barrios JA, Martinez-Arguelles DB, Bannon MJ, Kouri J, et al. Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection. Biochimica et biophysica acta. 2006;1760(7):1009-20.
143. Pediaditakis I, Kodella KR, Manatakis DV, Le CY, Hinojosa CD, Tien-Street W, et al. Modeling alpha-synuclein pathology in a human brain-chip to assess blood-brain barrier disruption. Nature Communications. 2021;12(1):5907.
144. Erickson MA, Dohi K, Banks WA. Neuroinflammation: a common pathway in CNS diseases as mediated at the blood-brain barrier. Neuroimmunomodulation. 2012;19(2):121-30.
145. Ivanova S, Tracey KJ. 78 - Research Methods in Neurosurgery. In: Souba WW, Wilmore DW, editors. Surgical Research. San Diego: Academic Press; 2001. p. 1095-105.
146. Simonato M, Wahlberg LU, Goins WF, Glorioso JC. Chapter 9 - Gene Therapy for Neurological Diseases. In: Laurence J, Franklin M, editors. Translating Gene Therapy to the Clinic. Boston: Academic Press; 2015. p. 129-46.
147. Wang HL, Kuo EY, Lai TW. Vascular delivery of intraperitoneal Evans blue dye into the blood-brain barrier-intact and disrupted rat brains. Neuroreport. 2018;29(11):924-31.
148. Xu Q, Qaum T, Adamis AP. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. Investigative ophthalmology & visual science. 2001;42(3):789-94.
149. Hasan TF, Akinduro OO, Haranhalli N, Tawk RG. Chapter 3 - Neurovascular Anatomy in Relation to Intracranial Neoplasms. In: Chaichana K, Quiñones-Hinojosa A, editors. Comprehensive Overview of Modern Surgical Approaches to Intrinsic Brain Tumors: Academic Press; 2019. p. 37-51.

150. Guppy KH, Charbel FT. Revascularization, Cerebral. In: Aminoff MJ, Daroff RB, editors. Encyclopedia of the Neurological Sciences. New York: Academic Press; 2003. p. 171-6.
151. Charlick M, Das JMJS. Anatomy, Head and Neck, Internal Carotid Arteries. 2020.
152. Fatakia A, Winters R, Amedee RG. Epistaxis: a common problem. The Ochsner journal. 2010;10(3):176-8.
153. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, LaMantia A, McNamara J, et al. The blood supply of the brain and spinal cord. 2001;2.
154. Sonne J, Reddy V, Beato MR. Neuroanatomy, substantia nigra. 2019.
155. Joshi S, Meyers PM, Ornstein E. Intracarotid delivery of drugs: the potential and the pitfalls. Anesthesiology. 2008;109(3):543-64.
156. Broadwell RD, Salcman M, Kaplan RS. Morphologic effect of dimethyl sulfoxide on the blood-brain barrier. Science (New York, NY). 1982;217(4555):164-6.
157. Kleindienst A, Dunbar JG, Glisson R, Okuno K, Marmarou A. Effect of dimethyl sulfoxide on blood-brain barrier integrity following middle cerebral artery occlusion in the rat. Acta neurochirurgica Supplement. 2006;96:258-62.
158. Soltani N, Mohammadi E, Allahtavakoli M, Shamsizadeh A, Roohbakhsh A, Haghparast A. Effects of Dimethyl Sulfoxide on Neuronal Response Characteristics in Deep Layers of Rat Barrel Cortex. Basic and clinical neuroscience. 2016;7(3):213-20.
159. Zhang C, Deng Y, Dai H, Zhou W, Tian J, Bing G, et al. Effects of dimethyl sulfoxide on the morphology and viability of primary cultured neurons and astrocytes. Brain Res Bull. 2017;128:34-9.
160. Goldim MPS, Della Giustina A, Petronilho F. Using Evans Blue Dye to Determine Blood-Brain Barrier Integrity in Rodents. Current protocols in immunology. 2019;126(1):e83.
161. Lee S, Lim W, Ryu H-W, Jo D, Min J-J, Kim H, et al. ZW800-1 for Assessment of Blood-Brain Barrier Disruption in a Photothrombotic Stroke Model. International Journal of Medical Sciences. 2017;14:1430-5.
162. Manaenko A, Chen H, Kammer J, Zhang JH, Tang J. Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model. Journal of neuroscience methods. 2011;195(2):206-10.
163. Natarajan, R., Northrop, N., & Yamamoto, B. (2017). Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-Dextran Extravasation as a Measure of Blood-Brain Barrier Permeability. Current protocols in neuroscience, 79, 9.58.1–9.58.15. https://doi.org/10.1002/cpns.25
164. Hoffmann, A., Bredno, J., Wendland, M. *et al.* High and Low Molecular Weight Fluorescein Isothiocyanate (FITC)–Dextrans to Assess Blood-Brain Barrier Disruption: Technical Considerations. *Transl. Stroke Res.* **2,** 106–111 (2011). https://doi.org/10.1007/s12975-010-0049-x
165. Chen, H., & Konofagou, E. E. (2014). The size of blood-brain barrier opening induced by focused ultrasound is dictated by the acoustic pressure. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *34*(7), 1197–1204. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.71

166. Hernandez-Baltazar, D., Martinez-Fong, D., & Trudeau, L. E. (2012). Optimizing NTS-polyplex as a tool for gene transfer to cultured dopamine neurons. *PloS one*, *7*(12), e51341. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051341
167. Arango-Rodriguez, M. L., Navarro-Quiroga, I., Gonzalez-Barrios, J. A., Martinez-Arguelles, D. B., Bannon, M. J., Kouri, J., Forgez, P., Rostene, W., Garcia-Villegas, R., Jimenez, I., & Martinez-Fong, D. (2006). Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection. *Biochimica et biophysica acta*, *1760*(7), 1009–1020. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.02.021
168. Li, J., Wang, X., Liu, H., Guo, H., Zhang, M., Mei, D., Liu, C., He, L., Liu, L., & Liu, X. (2014). Impaired hepatic and intestinal ATP-binding cassette transporter G5/8 was associated with high exposure of β-sitosterol and the potential risks to blood-brain barrier integrity in diabetic rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, *66*(3), 428–436. https://doi.org/10.1111/jphp.12178
169. Yang, C., Chen, Z. Y., Wong, S. L., Liu, J., Liang, Y. T., Lau, C. W., Lee, H. K., Huang, Y., & Tsang, S. Y. (2013). β-Sitosterol oxidation products attenuate vasorelaxation by increasing reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Cardiovascular research*, *97*(3), 520–532. https://doi.org/10.1093/cvr/cvs370

11. Apéndice

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Review

Mechanistic Insight from Preclinical Models of Parkinson's Disease Could Help Redirect Clinical Trial Efforts in GDNF Therapy

Karen M. Delgado-Minjares [1], Daniel Martinez-Fong [1,2,3], Irma A. Martínez-Dávila [1], Cecilia Bañuelos [4], M. E. Gutierrez-Castillo [5], Víctor Manuel Blanco-Alvarez [6,7], Maria-del-Carmen Cardenas-Aguayo [8], José Luna-Muñoz [9,10], Mar Pacheco-Herrero [11] and Luis O. Soto-Rojas [12,*]

1 Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Ciudad de México 07360, Mexico; km95.delgado@gmail.com (K.M.D.-M.); daniel.martinezfong@cinvestav.mx (D.M.-F.); irmaalice@yahoo.com (I.A.M.-D.)
2 Programa de Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Ciudad de México 07360, Mexico
3 Nanoparticle Therapy Institute, 404 Avenida Monte Blanco Aguascalientes, Aguascalientes 20120, Mexico
4 Coordinación General de Programas de Posgrado Multidisciplinarios, Programa de Doctorado Transdisciplinario en Desarrollo Científico y Tecnológico para la Sociedad, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Ciudad de México 07360, Mexico; cebanuelos@cinvestav.mx
5 Departamento de Biociencias e Ingeniería, Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios Sobre Medio Ambiente y Desarrollo, Instituto Politécnico Nacional, 30 de Junio de 1520 s/n, Ciudad de México 07340, Mexico; ainegue9@gmail.com
6 Facultad de Medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 13 Sur 2702, Puebla 72420, Mexico; victor.blancoa@correo.buap.mx
7 Facultad de Enfermería, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Av. 25 Poniente 1304, Los Volcanes, Puebla 72410, Mexico
8 Laboratory of Cellular Reprogramming, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM. Av. Universidad No. 3000, Ciudad de México 04510, Mexico; mcardenasaguayo@unam.mx
9 National Dementia BioBank, Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México City 53150, Mexico; jluna_tau67@comunidad.unam.mx
10 Banco Nacional de Cerebros, Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña, Santo Domingo 1423, Dominican Republic
11 Neuroscience Research Laboratory, Faculty of Health Sciences, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Santiago de los Caballeros 51000, Dominican Republic; mpacheco@pucmm.edu.do
12 Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios No. 1, Tlalnepantla, Edo. de México 54090, Mexico
* Correspondence: oskarsoto123@unam.mx; Tel.: +52-55-39-37-94-30

Citation: Delgado-Minjares, K.M.; Martinez-Fong, D.; Martínez-Dávila, I.A.; Bañuelos, C.; Gutierrez-Castillo, M.E.; Blanco-Alvarez, V.M.; Cardenas-Aguayo, M.-d.-C.; Luna-Muñoz, J.; Pacheco-Herrero, M.; Soto-Rojas, L.O. Mechanistic Insight from Preclinical Models of Parkinson's Disease Could Help Redirect Clinical Trial Efforts in GDNF Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11702. https://doi.org/10.3390/ijms222111702

Academic Editor: Timo T Myöhänen

Received: 2 October 2021
Accepted: 25 October 2021
Published: 28 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: Parkinson's disease (PD) is characterized by four pathognomonic hallmarks: (1) motor and non-motor deficits; (2) neuroinflammation and oxidative stress; (3) pathological aggregates of the α-synuclein (α-syn) protein; (4) neurodegeneration of the nigrostriatal system. Recent evidence sustains that the aggregation of pathological α-syn occurs in the early stages of the disease, becoming the first trigger of neuroinflammation and subsequent neurodegeneration. Thus, a therapeutic line aims at striking back α-synucleinopathy and neuroinflammation to impede neurodegeneration. Another therapeutic line is restoring the compromised dopaminergic system using neurotrophic factors, particularly the glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF). Preclinical studies with GDNF have provided encouraging results but often lack evaluation of anti-α-syn and anti-inflammatory effects. In contrast, clinical trials have yielded imprecise results and have reported the emergence of severe side effects. Here, we analyze the discrepancy between preclinical and clinical outcomes, review the mechanisms of the aggregation of pathological α-syn, including neuroinflammation, and evaluate the neurorestorative properties of GDNF, emphasizing its anti-α-syn and anti-inflammatory effects in preclinical and clinical trials.