



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“hGDNF en la alfa-sinucleinopatía generada por BSSG en la rata:
Efecto en la substantia nigra”**

Annai Aguirre Orozco

Tesis para obtener el grado de

Maestría en Ciencias

En la especialidad de:

Neurobiología celular y molecular

Directores de tesis:

Dr. Daniel Martínez Fong

Dra. María Eugenia Gutiérrez

Comité tutorial:

Dra. Ma. Eugenia Mendoza Garrido

Dr. Luis Oskar Soto Rojas.

Ciudad de México, México

Agosto, 2022

El presente trabajo se realizó en los laboratorios 39, 40 y 56 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección del Dr. Daniel Martínez Fong contando con la asesoría de la Doctora María Eugenia Gutiérrez.

A mi madre, Evangelina Orozco Gama, por quien soy una mujer independiente y fuerte.

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 2020-2022 con número de registro 1080794.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), por las instalaciones brindadas para poder realizar este proyecto.

Al Dr. Daniel Martínez Fong, por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de laboratorio, brindándome conocimientos, amistad, confianza y crecimiento para mi futuro.

A la Dra. Maru, gracias por siempre estar dispuesta a apoyarme en cada una de las dificultades que se presentaron en el camino, nunca me dejó sola, confiando en mí y en mi trabajo, es una gran mujer, me ha enseñado mucho. P.D. tomare el curso estadístico del que siempre habla.

A mi comité tutorial, la Dra. Ma. Eugenia Mendoza Garrido y el Dr. Luis Oskar Soto Rojas, quien se ha convertido en mi paño de lágrimas en los momentos en que veo más factible el fracaso que la superación, gracias por ser un excelente tutor, al pendiente de nuestras necesidades y momentos de desesperación.

A mis compañeros del laboratorio, Bismark, por aguantarme, ayudarme, enseñarme y brindarme tu apoyo siempre que lo necesite. Ericka, Paola, Uriel, por enseñarme y apoyarme durante este tiempo compartido. A David Reyes por siempre tener la disponibilidad de apoyarme y enseñarme las técnicas necesarias, a Ignacio, Lulu, Minerva, por todo el apoyo brindado.

Agradecimientos personales

A mi prometido, Miguel Angel Sierra Gonzalez, por no soltar mi mano a pesar de la distancia, por creer en mis sueños, pero más importante, por creer en mí, no dejar que cuando me sentía insegura, desconfiara de mi potencial y me diera por vencida, por confiar en que somos lo suficientemente fuertes para enfrentar cualquier tormenta juntos, te amo.

Agradezco infinitamente a mi familia por siempre estar en la trinchera esperando para levantarme y apoyarme incondicionalmente. A mis roomies Diego y Abiram, por siempre estar dispuestos a escucharme y limpiarme las lagrimas en cada una de las caídas que han sido en este camino, brindándome su compañía y apoyo incondicional. A mis amigos, Solis, Tona, Livier, Joel, por no permitirme que olvide que la diversión y vivir siempre serán primero, y por que me mantienen con estabilidad emocional y paz mental.

A mi amiga Karen Michelle, alias la Mich, por que sin ella no se que hubiera hecho, por darme su tiempo, su amistad, su apoyo, su cariño, por estar, en todos y cada uno de los momentos en esta maestría, por tener esa paciencia que la caracterizada para compartirme de su conocimiento y nunca dejarme sola.

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

DAB 3'3-diaminobenzidina

DMSO Dimetilsulfóxido

DV Dorsoventral

EGF Factor de crecimiento epidérmico

EP Enfermedad de Parkinson

EROs Especies reactivas de oxígeno

FITC Isocianato de fluoresceína

GDNF Factor neurotrófico derivado de la glía

GFR α 1 Receptor alfa-1 de la familia GDNF

hGDNF Factor neurotrófico derivado de la glía humano

i.v. Intravenosa

IgG Inmunoglobulina G

IL-1 α Interleucina-1 α

IL-1 β Interleucina-1 β

IL-2 Interleucina-2

KDa Kilodalton

LCR Líquido cefalorraquídeo

L-DOPA Levodopa

LPS Lipopolisacáridos

MHCII Complejo mayor de histocompatibilidad II

ML Mediolateral

MPTP 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina

NCAM Molécula de adhesión celular neural

NF- κ B 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

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 A-SINUCLÉINA (A-S).....	1
1.1.1 <i>Agregados patológicos de α-S.....</i>	<i>2</i>
1.2 AGREGADOS PATOLÓGICOS DE A-S Y SU PARTICIPACIÓN EN LA NEURO INFLAMACIÓN EN LA EP.	3
1.3 MODELOS EXPERIMENTALES PARA LA EP.....	6
1.3.1 <i>β-sitosterol β-D-glucósido (BSSG), modelo experimental para la EP.</i>	<i>8</i>
1.4 DESARROLLOS TERAPÉUTICOS PARA LA EP	10
1.4.1 <i>Factores neurotróficos y su participación terapéutica en la EP.....</i>	<i>10</i>
1.4.2 <i>Factor Neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y su participación en la EP.....</i>	<i>12</i>
1.4.3 <i>Ensayos preclínicos en la terapia con GDNF.....</i>	<i>13</i>
1.4.4 <i>Nanopartículas de GDNF como tratamiento para la enfermedad de Parkinson.....</i>	<i>16</i>
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS.....	20
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
5. MÉTODOS.....	20
5.1 DECLARACIÓN ÉTICA PARA EL USO Y MANEJO DE ANIMALES EXPERIMENTALES	20
5.2 GRUPOS EXPERIMENTALES	21
5.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	21
5.4 GENERACIÓN DE RATAS PARKINSONIANAS CON B-SITOSTEROL B-D- GLUCÓSIDO.....	22
5.5 SINTESIS DE LAS NANOPARTICULAS DE H-GDNF.	22
5.6 ADMINISTRACIÓN DE NPS-HGDNF VIA ACI.....	23
5.7 PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO.....	24
5.7.1 <i>Prueba de colocación de la extremidad anterior evocada por vibrisas</i>	<i>24</i>
5.7.2 <i>Prueba de la viga.....</i>	<i>24</i>
5.6.3 <i>Prueba del cilindro.....</i>	<i>26</i>
5.8 TÉCNICAS DE INMUNOTINCIÓN.....	26
5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
6. RESULTADOS	28
6.1 <i>Generación de ratas parkinsonianas con BSSG</i>	<i>28</i>
6.2 <i>Ensayo de restricción.....</i>	<i>29</i>
6.3 LA ADMINISTRACIÓN UNILATERAL DE BSSG PROVOCA UNA DISMINUCIÓN PROGRESIVA Y BILATERAL DEL FENOTIPO DOPAMINÉRGICO EN LA VÍA NIGROESTRIATAL ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.	
BIBLIOGRAFÍA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Resumen

Las α -sinucleinopatías son un grupo de trastornos neurodegenerativos caracterizados por la acumulación aberrante de la proteína α -sinucleína (α -S) en neuronas y glía. En este tipo de padecimientos, los depósitos de α -S patológica en neuronas, constituyen una característica distintiva y es una marca representativa de la EP. Estudios recientes indican que la α -S patológica puede causar neuroinflamación y neurodegeneración tanto en encéfalo de pacientes con la EP como en el modelo animal generado por la administración intranigral y única del neurotóxico β -sitosterol β -D-glucósido (BSSG). Anteriormente en este laboratorio se demostró que las nanopartículas NTS-polyplex con el gen humano del factor neurotrófico derivado de la glía (NPs-hGDNF) inyectadas intranigralmente ejercen un poderoso efecto neuroregenerador en el modelo parkinsoniano por 6-OHDA, que no genera agregados de α -S, por lo que, en esta tesis se demostró que la administración intraarterial de nanopartículas NTS-polyplex con el gen humano del factor neurotrófico derivado de la glía (NPs-hGDNF) a ratas parkinsonianas tratadas con BSSG (6 μ g/ μ L de dimetilsulfóxido; DMSO) resulta en transfección de neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal demostrando que la barrera hematoencefálica (BHE) se encuentra comprometida en este modelo de la EP. Se estudiaron 4 grupos experimentales de ratas Wistar macho adultas (230-250g); primero un grupo (n=6) lesionado con una sola administración unilateral intranigral de BSSG, a los 15 días poslesión se transfectó (n=3) vía arteria carótida interna (ACI) el sistema NPs-hGDNF, finalmente un grupo sano (n=3) y un grupo sano transfectado (n=3). Posteriormente se evaluó la afección sensoriomotora a través de pruebas conductuales al día 0, a los 15 días post-lesión y finalmente a los 15 días post-transfección-1 mes lesión, se pudo evaluar el daño motor generado por el neurotóxico BSSG. Finalmente, a través de inmunohistoquímicas e inmunofluorescencia se determinó la expresión del gen terapéutico en el sistema nigroestriatal y su efecto sobre los agregados patológicos de α -S así como de la neurodegeneración, confirmando la potencialidad del hGDNF en combatir la formación de esos agregados y su propagación y avalando la aplicación de las NPs-hGDNF en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Palabras clave: α -sinucleína, enfermedad de Parkinson, β -sitosterol β -D-glucósido, arteria carótida interna, pruebas conductuales, vía nigroestriatal.

Abstract

The α -synucleinopathies, are a group of neurodegenerative disorders characterized by the aberrant accumulation of the protein α -synuclein (α -S) in neurons and glia. In this type of disease, pathological α -S deposits in neurons are a hallmark, and represents a characteristic of the PD. Recent studies indicate that, pathological α -S can cause neuroinflammation and neurodegeneration, both, in the brain of patients with PD and in the animal, model generated by single intraigral administration of the neurotoxic β -sitosterol β -D-glucoside (BSSG). Previously in this laboratory, it was shown that NTS-polyplex nanoparticles with the human glial-derived neurotrophic factor gene (NPs-hGDNF) injected intraigrally, exert a powerful neuroregenerative effect in the parkinsonian model by 6-OHDA, which does not generate α -Syn aggregates, therefore, in this thesis it was demonstrated that the intra-arterial administration of NTS-polyplex nanoparticles with the human glial-derived neurotrophic factor gene (NPs-hGDNF) to parkinsonian rats treated with BSSG (6 μ g/ μ L of dimethyl sulfoxide; DMSO) results in transfection of dopaminergic neurons of the nigrostriatal pathway demonstrating that the blood-brain barrier (BBB) is compromised in this model of EP. Four experimental groups of adult male Wistar rats (230-250g) were studied; first a group (n=6) injured with a single intraigral unilateral administration of BSSG, 15 days after the injury the NPs-hGDNF system was transfected (n=3) via the internal carotid artery (ICA), finally a healthy group (n= 3) and a healthy transfected group (n=3). Subsequently, the sensorimotor condition was evaluated through behavioral tests at day 0, at 15 days post-injury and finally at 15 days post-transfection-1 month injury, with this, it was possible to evaluate the motor damage generated by the neurotoxic BSSG. Finally, through immunohistochemistry and immunofluorescence, the expression of the therapeutic gene in the nigrostriatal system and its effect on pathological aggregates of α -Syn, as well as neurodegeneration, were determined, confirming the potential of hGDNF in combating the formation of these aggregates and their propagation and endorsing the application of intraigrally NPs-hGDNF in the treatment of Parkinson's disease.

Keywords: α -synuclein, Parkinson's disease, β -sitosterol β -D-glucoside, internal carotid artery, behavioral tests, nigrostriatal pathway.

1. Introducción

Las alfa-sinucleinopatías conforman un grupo de enfermedades neurodegenerativas en las que se incluyen a la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la demencia frontotemporal (DFT), las ataxias espinocerebelosas (AEC), la enfermedad de Huntington (EH), demencia por cuerpos de Lewy (DCL), la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP), siendo esta última la más común entre ellas y nuestro foco de atención. La fisiopatología de estas enfermedades aún no es bien comprendida en su integridad ya que difieren en la causa y sintomatología debido a que se generan por alteraciones en diferentes núcleos cerebrales, sin embargo, el sello histopatológico clave de estos trastornos neurodegenerativos son los agregados patológicos de la proteína α -Sinucleína (α -S) (Mavroei. P., 2021).

1.1 α -Sinucleína (α -S).

La α -S, es una proteína intracelular codificada por el gen SNCA, identificada por Maroteaux en 1988, quien la extrajo por primera vez del Torpedo Ray y se le atribuyó su nombre por su localización celular: 'sin' de sinapsis y 'nucleína' de núcleo (Maroteaux L, 1988 Aug). α -S es una proteína pequeña (140 aminoácidos ó 14 kDa), que se expresa abundantemente en las neuronas (J. H. S., 2020). Bajo condiciones fisiológicas, α -S existe principalmente en la sustancia negra, la corteza y el hipocampo, y juega un papel importante en la función y plasticidad sináptica (Lashuel HA, 2013), aunque la función fisiológica de α -S es controversial, es cierto que en los últimos años se le han atribuido numerosas funciones hipotéticas. La función más destacada y estudiada hasta el momento, sugiere que α -S actúa en la terminal presináptica donde se asocia con las vesículas sinápticas, se une a las membranas e induce su curvatura. (Anna Villar-Piqué, 2015). Sin embargo, aunque la α -S se encuentra enriquecida en los botones sinápticos que brotan de los axones de diferentes fenotipos neuroquímicos, la proteína α -S no está presente en todas las terminales sinápticas y, no todas las terminales acumulan la proteína en los trastornos neurodegenerativos, lo que sugiere expresión selectiva, focalización y vulnerabilidad patogénica en ciertas poblaciones neuronales (Totterdell S, 2004).

La α -S se distribuye desde el soma hasta los terminales presinápticos durante las primeras semanas de desarrollo en roedores y en humanos (Withers GS, 1997) (Bayer TA, 1999), Aun no queda claro cómo la α -S llega a la sinapsis, sin embargo, su preferencia por las membranas de

las vesículas sinápticas y su afinidad por la proteína vesicular SNARE sinaptobrevina-2, sinapsina III o rab3A (Burré J, 2010), refuerza la idea de que puede participar en el tráfico vesicular, reciclamiento y liberación de neurotransmisores (J. B. , 2015).

Aunque los estudios sobre la función normal de α -S siguen siendo esquivos, la proteína tiene un papel central en múltiples procesos neurodegenerativos. La identificación de mutaciones en la α -S ha cambiado el enfoque de estudio de enfermedades neurodegenerativas o α -sinucleinopatías, centrándose en la acumulación aberrante de esta proteína en el citoplasma de neuronas o de células gliales.

1.1.1 Agregados patológicos de α -S.

Los depósitos de α -S constituyen el componente principal de los cuerpos de Lewy y de las neuritas distróficas; también, en menor proporción, la α -s se deposita en el citoplasma de células gliales. Estos depósitos, se han vuelto el foco de atención para muchas investigaciones de la EP ya que son las principales inclusiones proteicas que se encuentran en las neuronas en degeneración de la EP (Bendor JT, 2013). Los niveles intracelulares de α -S están estrictamente regulados por el equilibrio entre las tasas de síntesis, eliminación y agregación de α -S, por lo tanto, anomalías que afectan la síntesis de α -S, incluida la multiplicación y los polimorfismos de SNCA, pueden aumentar los niveles intracelulares de α -S e inducir su acumulación (Lashuel HA, 2013). Otras causas de la agregación de la proteína podrían incluir la falla en la degradación de α -S, como podría ser el mecanismo ubiquitina-proteosoma, disfunción en el mecanismo de autofagia mediada por chaperonas (inducida por mutaciones relacionadas con EP) o disfunción de las proteasas (neurosina o metaloproteasa de matriz) (Conway KA, 1998).

El proceso de depósito patológico de α -S puede iniciarse hasta varias décadas antes de que el paciente sea diagnosticado de la enfermedad. En ocasiones son los síntomas no motores las primeras manifestaciones de la enfermedad (Claassen DO, 2010). Se han realizados grandes esfuerzos en comprender la anatomía detrás de estos agregados patológicos y un gran número de estudios descritos en la literatura destacan un mecanismo de agregación y propagación de α -S, las formas fibrilares de α -S detectados mayoritariamente en cuerpos de Lewy (Luk KC e. a., 2009) y se cree que reflejan un intento de las neuronas de aislar y/o convertir oligómeros α -S tóxicos en fibrillas, que son estructuras estables, menos dinámicas y exhiben una toxicidad reducida (Braak H S. M., 2007).

Existe evidencia indirecta que apoya la existencia de varias especies oligoméricas de α -S in vivo bajo condiciones fisiopatológicas. A diferencia de la α -S fibrilar, los agregados oligoméricos probablemente se localicen en los axones y terminales presinápticas donde podrían dañar sinapsis y dendritas (Scott DA, 2010).

Estudios sugieren que α -S existe predominantemente como un monómero, y estos monómeros desplegados interactúan para formar dos tipos de dímeros: dímeros antiparalelos, que no se propagan, y dímeros paralelos, que sí se propagan (Perrin RJ, 2001), proceso que puede tener lugar en el citoplasma o asociado a la membrana plasmática. Monómeros desplegados de α -S se adicionan a dímeros que se propagan lo que por ende los hace crecer y generar oligómeros en forma de anillo, que a su vez interactúan con la membrana formando poros transmembrana por los cuales habrá una entrada anormal de calcio intracelular. Oligómeros α -S que permanecen en el citoplasma crecen mediante la adición de monómeros solubles, formando pequeñas fibrillas de amiloide y luego fibrillas más largas. La acumulación de estas fibrillas llevara a la formación de inclusiones intracelulares que conocemos como cuerpos de Lewy (oligómeros, luego en fibrillas de amiloide y finalmente en cuerpos de Lewy). Aunque la α -S normalmente se localiza en la terminal presináptica, sus oligómeros y agregados se localizan en todo el cuerpo celular y las neuritas, lo que sugiere que la α -s podría alterar la función celular más allá de la terminal presináptica. Durante la fibrillogénesis y agregación de α -S, las especies intermedias (oligómeros y fibrillas de amiloide) son altamente tóxicas y afectan la función mitocondrial, el retículo endoplásmico (RE) y el tráfico de Golgi, la degradación de proteínas y/o la transmisión sináptica. Lo que lleva a pensar que estos son algunos de los efectos intracelulares que inducen la neurodegeneración (Lashuel HA, 2013).

Los oligómeros y fibrillas de α -S, así como los monómeros, pueden transferirse entre células e inducir la propagación de la enfermedad a otras regiones del cerebro. Se ha visto que los mecanismos de propagación son múltiples y pueden ocurrir mediante endocitosis, penetración directa, transmisión transináptica o mediante receptores de membrana (Desplats P, 2009).

1.2 Agregados patológicos de α -S y su participación en la neuro inflamación en la EP.

La EP es la α -sinucleinopatía más común, que actualmente afecta a 10 millones de personas en el mundo y cuya incidencia se duplicará para el 2030, con un mayor impacto en la población masculina (Boros, 2021). En la EP, las neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* (SNc) se degeneran, lo que resulta en la pérdida de dopamina en los ganglios basales,

un área del cerebro responsable de coordinar el control motor fino, lo que en última instancia conduce a la aparición de síntomas clínicos de Parkinson tales como acinesia (incapacidad para iniciar el movimiento), bradicinesia, temblor (de intención o de reposo), rigidez e inestabilidad postural (AE, 2015). De igual manera, existen signos no motores que 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 (Tibar H, 2018).

Además de la pérdida de neuronas dopaminérgicas, otra marca importante de esta enfermedad son la presencia de los cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy, a los que se les atribuye son causantes de la 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 (DiSabato DJ, 2016). 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 (MS., 2019). Dicha microglía activada puede adoptar una morfología ameboide, preparada para el estrés, oscura o distrófica y ser del tipo pro-inflamatorio (fenotipo M1) o anti-inflamatorio (fenotipo M2) (Jurga AM, 2020).

De hecho, se ha observado neuroinflamación en múltiples modelos animales con agregados de α -S patológica y podría estar mediada por la expresión microglial del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) II, un regulador clave de la respuesta inmune, dado que el agotamiento de MHCII reduce la activación microglial y neurodegeneración dopaminérgica en modelos de ratón con agregados de α -S patológica (Chung CY, 2009).

Son varios los mecanismos propuestos por los que los agregados de α -S patológicos podrían inducir una respuesta neuroinflamatoria. Por mencionar algunos, se ha sugerido que la α -S es un quimioatrayente que promueve la migración microglial (Wang S, 2015), y las respuestas proinflamatorias a la toxicidad de la α -S podrían estar mediadas adicionalmente por el microARN-155 (miR-155) (Thome AD, 2016). Además, se ha descubierto que la α -S extracelular liberada de las neuronas, es un agonista endógeno de TLR2, lo que conduce a la activación microglial (Kim C, 2013), mientras que se ha propuesto que la α -S oligomérica se une directamente al heterodímero TLR1/2 en la membrana celular para inducir una respuesta proinflamatoria

dependiente en el gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide 88 (MyD88) (Daniele SG, 2015).

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 (McGeer PL, 1988). Recientemente, se ha encontrado que la microglía secreta interleucina-1 α (IL-1 α), 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 (Liddel SA, 2017). En resumen, la conformación y la forma patógena de α -S juegan un papel clave en la regulación de la fagocitosis de la microglía y la posterior activación de la inflamación, que acompaña a la neurodegeneración en la EP.

Por otro lado, en distintos modelos in vitro e in vivo de neuroinflamación, se ha encontrado que los agregados patológicos de α -S promueven la liberación de citocinas pro-inflamatorias que a su vez, inducen cambios en la estructura y función de la barrera hematoencefálica (BHE), por lo que un gran número de células T CD4 (+) y CD8 (+) han sido encontradas en el mesencéfalo ventral de pacientes y modelos animales de EP (Chen X, 2021). Las células T infiltradas podrían generar una respuesta autoinmune a la α -S prolongando así la actividad de la microglía activada, la cual es uno de los principales actores en la neuroinflamación inducida por α -S (Subbarayan MS, 2020). 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 la secreción IL-1 α , TNF- α y C1q y la proteína inflamatoria de macrófagos-1 α (MIP-1 α) por la microglía activada. Por lo tanto, estas cuatro citocinas/quimiocinas podrían ser las responsables de aumentar la permeabilidad de la BHE a través del transporte paracelular (Shigemoto-Mogami Y, 2018). Esta disminución en la expresión de las proteínas de las uniones estrechas ha sido observada en el núcleo subtalámico de cerebros post mortem de pacientes con la EP, corroborando así que 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 (Pienaar IS, 2015). La liberación de IL-1 β , TNF α , y IL-1 α por microglía activada, no solo se ha visto involucrada en la permeabilidad de la BHE, sino que también, estudios recientes han encontrado que a través de esta liberación se induce un fenotipo A1 neurotóxico en los astrocitos, lo que los hace corresponsables de la muerte de las neuronas dopaminérgicas y oligodendrocitos, después de una lesión aguda del sistema nervioso central (SNC) (Kempuraj D, 2016). Por lo tanto, los astrocitos reactivos A1 activados

por la microglía también podrían mediar el efecto neurotóxico de la α -S patológica, aunque su mecanismo de acción aún está bajo investigación.

Aunque se propone que la neuroinflamación crónica promueve la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas, en la actualidad, una de las preguntas que se hacen los investigadores es, ¿el ambiente crónico neuroinflamatorio es una causa o consecuencia de la neurodegeneración?, pregunta que se podría contestar con un modelo experimental propio de la enfermedad en cuestión, que permitiera observar las marcas patológicas eficientemente.

1.3 Modelos experimentales para la EP.

Actualmente, todos los estudios llevados a cabo para la EP se han realizado en modelos que no reproducen fidedignamente las 4 marcas concretas de la enfermedad (Tabla 1);

1. Las alteraciones conductuales motoras y no motoras.
2. La pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) y de sus proyecciones axonales.
3. Presencia de cuerpos de Lewy.
4. Neuroinflamación.

Este hecho, repercute de manera negativa en los resultados obtenidos en los estudios en fase clínica. Por lo que la identificación y el desarrollo de terapias neuroprotectoras eficaces ha estado destinada al fracaso.

La EP debería de reproducirse en un modelo animal que sea de naturaleza progresiva, refleje de cerca el proceso de la enfermedad (compartiendo índices patológicos con la enfermedad de Parkinson humana) y que reflejara la patología generalizada asociada con la enfermedad en las personas (Bezard E, 2013).

Entre los modelos más comúnmente utilizados se encuentran aquellos basados en neurotoxinas tales como el de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), 6-hidroxidopamina (6-OHDA), y rotenona, que inducen la muerte preferencialmente de neuronas dopaminérgicas, posteriormente causan activación microglial y astrogliosis reactiva, sin embargo, la desventaja radica en que no se desarrollan agregados patológicos de α -S (Santiago RM, 2010) (Cankara FN, 2020;).

Tabla 1. Características de los modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson.

Características	Progresión	Alteraciones motoras	Alteraciones no motoras	Neurodegeneración	Agregados de α -Syn	Neuro-inflamación	Disrupción de la BHE	Ref.
LPS	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	(Liu, 2011)
6-OHDA	No	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	(Chia SJ, 2020)
Rotenona	No	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	(Chia SJ, 2020)
BSSG	Si	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	(Van Kampen JM, 2015)
Ratones transgénicos A53T	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	(Yang J, 2021)
Ratas con AAV- α -S	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	(Terse PS, 2021)

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

Por otro lado, 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 (Potashkin JA, 2010). 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 (Pingale T, 2020).

Recientemente se encontró que, el consumo de neurotoxinas dietéticas derivadas de la semilla de la cícada se ha relacionado con características celulares y de comportamiento que se aproximan mucho a las observadas en los pacientes de EP, además de que los signos clínicos y la histopatología continúan desarrollándose durante varios meses después del cese de la

exposición al insulto neurotóxico (Wilson JM, 2002). Estudios *in vitro* empleando estos compuestos aislados de las cícdas, han demostrado que varios de ellos son neurotóxicos 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, replicada en ratones que fueron alimentados con “pellets” suplementados con la harina de cícada. De estos compuestos aislados de las cícdas, se encontró que el β -sitosterol β -D-glucósido (BSSG), que forma la fracción más grande, es neurotóxico tanto *in vitro* como *in vivo*, tomando relevancia ya que al igual que con las cícdas, el consumo de BSSG por parte de las ratas desencadena una neurodegeneración progresiva que se presenta principalmente como un fenotipo parkinsoniano y replica múltiples características de la enfermedad humana (Tabata R, 2008).

Los esfuerzos para desarrollar una terapia neuroprotectora para la EP se han visto gravemente obstaculizados por la falta de buenos modelos animales capaces de predecir con precisión agentes neuroprotectores efectivos en humanos. El modelo BSSG, a través de su naturaleza progresiva y la replicación de múltiples características parkinsonianas clave, puede proporcionar una herramienta valiosa para la detección de candidatos neuroprotectores.

1.3.1 β -sitosterol β -D-glucósido (BSSG), modelo experimental para la EP.

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 (Wilson JMB, Behavioral and neurological correlates of ALS-parkinsonism dementia complex in adult mice fed washed cycad flour. , 2002). Estudios recientes, comprobaron que, en efecto, el BSSG reproduce las 4 marcas de la EP, descubrimiento motivador para su uso como modelo animal para esta enfermedad.

En un estudio *in vivo* la toxina BSSG se preparó y administró en forma de gránulos de harina cinco días a la semana durante los primeros 4 meses del estudio, posteriormente, a los 4, 6 y 8 meses después de la exposición inicial al BSSG, los animales se sometieron a evaluaciones de deficiencias locomotoras, pruebas olfatorias y función cognitiva; finalmente a los 10 meses, fueron sacrificadas para inmunohistoquímicas que les permitieron observar la integridad nigroestriatal, activación microglial (neuroinflamación), agregados de α -S, el inmunomarcaje para a proteína 78 regulada por glucosa (Grp78) en el SN y el cuerpo estriado, como marcador de

estrés ER, además de estudiar la proteína sináptica sinaptofisina, para estimar la patología axonal degenerativa en el hipocampo y la corteza (Van Kampen JM, 2015). Lo que encontraron, en resumen, es que, este modelo de EP en ratas BSSG se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas nigrales, muestra déficits olfativos prodrómicos, un inicio asimétrico, déficits locomotores sensibles a la levodopa, una propagación progresiva de la patología de la α -S y déficits cognitivos en etapa tardía.

Recientemente, en nuestro laboratorio se demostró que la administración unilateral de BSSG (6 μ g BSSG/ 1 μ L 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 -S en las neuronas dopaminérgicas de la SN del lado inyectado (Soto-Rojas LO, 2020) (Soto-Rojas, 2020). Lo que causó gran interés sobre esta investigación, fue observar que los agregados patológicos de α -S invadieron las neuronas dopaminérgicas nigrales del lado contralateral asociándose con la neurodegeneración dopaminérgica nigroestriatal. Además, estos agregados patológicos se propagaron a otras regiones cerebrales del mismo lado tales como bulbo olfatorio, hipocampo, corteza, locus coeruleus, SN y estriado, hecho que pudiera significar una progresión de la enfermedad por etapas, como lo antes propuesto por Braak y colaboradores (Braak H D. T., 2003). Esta propagación en la patología puede deberse, a que la α -S (sus formas oligoméricas), pueden autopropagarse y diseminarse progresivamente entre regiones cerebrales interconectadas a través de un mecanismo de transmisión de célula a célula (Olanow CW, 2013), comportamiento similar al prión. La idea de dispersión tipo prión para la EP, provino primero de estudios de trasplante de células fetales que mostraron la aparición de cuerpos de Lewy en las células huésped más de diez años después del trasplante (Kordower JH C. Y., 2008), estudios que posteriormente fueron corroborados en experimentos con roedores (Kordower JH D. H., 2011) (Luk KC K. V., 2012).

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 (Luna-Herrera C, 2020).

Además, trabajos recientes en este laboratorio, han aportado evidencia de que 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 (Luna-Herrera C, 2020) (Delgado Minjares, 2022), hecho relevante

para nosotros, ya que nos permite realizar nuevos estudios experimentales de abordaje terapéutico, como nuevas vías de administración de fármacos para la EP.

1.4 Desarrollos Terapéuticos para la EP

A pesar del progreso significativo en la comprensión de los mecanismos que conducen a la EP, aún sigue siendo un desafío la caracterización clínica de los pacientes, debido a la ausencia de métodos precisos para establecer un diagnóstico oportuno y estratificar el deterioro neurológico, y, por tanto, ayuden a establecer una atención médica personalizada. Debido a la inoperancia de las terapias actuales por ser sintomáticas, es necesario desarrollar terapias efectivas que detengan el avance de la neurodegeneración, que reduzcan significativamente la aparición de los agregados patológicos de α -S y que restauren los circuitos neuronales dañados.

Los tratamientos actuales para la EP implican principalmente la administración de levodopa (L-DOPA), agonistas de la dopamina o inhibidores de la MAO-B o cirugía en forma de estimulación cerebral profunda (DBS) que consiste en la implantación de un aparato médico que envía impulsos eléctricos a puntos específicos del cerebro que controlan el movimiento, bloqueando las señales nerviosas anormales que causan el temblor y los síntomas de la enfermedad (S, 2015). Sin embargo, estos tratamientos son sintomáticos y no previenen la progresión de la EP y pueden estar asociados con efectos secundarios significativos (Marks WJ Jr, 2010), motivo suficiente de la gran necesidad de desarrollar terapias más efectivas.

1.4.1 Factores neurotróficos y su participación terapéutica en la EP.

Recientemente se ha surgido la posibilidad de desarrollar terapias con base en los factores neurotróficos, que son polipéptidos o proteínas importantes en la proliferación y diferenciación durante el desarrollo cerebral y en la supervivencia neuronal y plasticidad sináptica en la edad adulta. Los factores neurotróficos se secretan en el espacio extracelular y, siguiendo la inervación neuronal, pueden ser transportados tanto de forma retrógrada como anterógrada (Mahato, 2020). Los factores neurotróficos secretados actúan a través de receptores que, activando cascadas de señalización intracelular, prenden programas genéticos asociados a la neurogénesis, diferenciación neuronal, neuritogénesis, supervivencia, plasticidad sináptica y funcionamiento neuronal (Chang HM, 2019).

Los factores neurotróficos se dividen en cuatro familias principales cuyos miembros actúan a través de receptores específicos (Tabla 2) (Sidorova YA, 2020). La primera familia que se conoció fue la familia de las Neurotrofinas (NT), la cual comprende cinco miembros (Tabla 2). En seguida se identificaron los cuatro miembros estructuralmente relacionados de la familia de ligandos del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF- del inglés Glial cell line-derived neurotrophic factor) (Tabla 2) (Tenenbaum, 2017). Posteriormente se descubrió que ciertas proteínas tenían funciones muy específicas a nivel periférico como citocinas o factores de crecimiento que también podían actuar como factores neurotróficos en ciertas condiciones; debido a la gran variedad de esta familia se le conoce como citocinas neuropoieticas (Tabla 2). La última familia identificada hasta hoy fue descubierta por el Dr. Mart Saarma y se le conoce como la familia de proteínas evolucionariamente conservadas y que actualmente se han identificado dos miembros (Tabla 2) (Saarma M, 2020).

Tabla 2. Familias de los factores neurotróficos: sus miembros y sus receptores.

Familia	Proteína	Receptor
Neurotrofinas	NGF, BDNF, NT-3, NT-5	TrkA, TrkB, TrkC
Familia de ligandos GDNF	GDNF, Neurturina, Persefina, Artemina	GFR α 1, GFR α 2, GFR α 3, GFR α 4
Citocinas neuropoieticas	IL-6, TGF β , VEGF, IGF, FGF, etc.	Trks
Proteínas evolucionariamente conservadas	CDNF, MANF	Desconocidos

Abreviaturas: Factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), Neurotrofrina 3 y 5 (NT-3 y NT-5), factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF- del inglés Glial cell line-derived neurotrophic factor), factor de crecimiento transformador-beta (TGF- β), factor de crecimiento insulínico (IGF), interleucina (IL)-6, factor de crecimiento de placenta (FGF), factor de crecimiento vascular (VEGF), factor neurotrófico de dopamina cerebral (CDNF), factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos (MANF), receptores de tirosina proteína quinasa, Trks (también conocida como TrkA, TrkB y TrkC), subtipo α 1, α 2, α 3 y α 4 del receptor de la familia GDNF (GFR α 1, GFR α 2, GFR α 3 y GFR α 4)

No todos los factores neurotróficos tienen acción sobre las neuronas dopaminérgicas nigrales, pues se requiere que tengan el receptor para el respectivo factor neurotrófico. Para los fines de este proyecto, nos centraremos en el GDNF, por su supuesto efecto antiinflamatorio (disminuyendo la activación de microglía, astrocitos y algunas citocinas proinflamatorias) (Tenenbaum, 2017).

1.4.2 Factor Neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y su participación en la EP.

Dentro de la familia de ligandos GDNF, como primer miembro podemos encontrar al GDNF, el cual, en 1993 fue aislado de células gliales de rata B49 por Lin y colaboradores (Lin L.F., 1993). El GDNF está codificado por el gen GDNF y se traduce como un precursor de 211 aminoácidos que, después del procesamiento proteolítico, se secreta como una proteína madura de 134 aminoácidos (Lin L.F., 1993). En el SNC, la expresión de GDNF aumenta durante el desarrollo embrionario y disminuye en la edad adulta, restringiéndose a áreas cerebrales específicas como la corteza, el hipocampo, el estriado (STR), el SN, el tálamo, el cerebelo y la médula espinal (Hellmich H.L., 1996). En condiciones fisiológicas, el GDNF se expresa en tejidos blandos, testículos, riñones, glándulas suprarrenales, glándulas paratiroides, placenta, tracto gastrointestinal, médula espinal y múltiples núcleos cerebrales (The Human Protein Atlas. , 2021). El GDNF juega un papel vital en la regulación de la morfogénesis renal, el desarrollo del sistema entérico y la proliferación y migración de neuronas parasimpáticas. Además, para este proyecto, su importancia recae en el hecho de que el GDNF es conocido por su potente efecto sobre la maduración, el mantenimiento y la supervivencia de las neuronas DA (Michos O., 2010) (Gianino S., 2003) (Lin L.F., 1993).

En enfermedades neurodegenerativas, como la EP, la señalización y expresión de GDNF se encuentra desregulada (Chu Y., 2021) (Chauhan N.B., 2001). Por lo tanto, la supresión del GDNF endógeno debido a la EP hace que no esté disponible para contribuir al proceso de restauración neural.

En la EP, en comparación con sujetos sanos, se ha visto que los pacientes muestran, sistemáticamente, un agotamiento de la proteína GDNF e neuronas supervivientes de *Sustantia Nigra pars compacta* (SNpc), hecho que explica por qué su falta de efecto restaurador en el sistema nigroestriatal (Chauhan N.B., 2001). De manera similar, en otras regiones del sistema nigroestriatal, curiosamente se han observado reducción en los niveles de proteína GDNF,

asociada con deterioro cognitivo incluso en ausencia de pérdida neuronal, por lo que, se piensa que el GDNF podría realizar acciones fisiológicas en la neurotransmisión del hipocampo similares a las del BDNF (Griego E., 2021).

Como línea terapéutica que apunta a combatir la α -sinucleinopatía y la neuroinflamación para impedir la neurodegeneración, encontramos la restauración del sistema dopaminérgico comprometido mediante factores neurotróficos, en particular empleando GDNF, razón por la que su valoración en ensayos preclínicos ha ido en aumento.

1.4.3 Ensayos preclínicos en la terapia con GDNF

El GDNF es un candidato atractivo que se ha probado en modelos de EP in vitro e in vivo debido a su potente acción neuroregenerativa y sus aparentes efectos anti- α -S y antiinflamatorios (Chmielarz P. E. S., 2020) (Zhao Y., 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. J. , 2019). En estudios preclínicos de terapia génica usando GDNF se demostró que regenera el sistema dopaminérgico nigroestriatal ($90 \pm 8\%$ en el estriado y $50 \pm 4\%$ en la SN), reduce la neuroinflamación y disminuye las alteraciones motoras (Rocha S.M., 2012). Sin embargo, estos abordajes preclínicos no representan fidedignamente la EP porque se ensayaron en modelos animales que no generan agregados patológicos de α -S, además de que los ensayos clínicos con GDNF a través de varias vías de administración han sido desalentadores y algunos pacientes han desarrollado efectos secundarios adversos graves 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) (Barker R.A., 2020) (Nutt J.G., 2003). Motivo por el que se ha propuesto la terapia génica como candidato para evitar esta respuesta no favorable en pacientes con EP.

La terapia génica se describió por primera vez en 1972 como un medio para "reemplazar el ADN malo con ADN bueno" (Axelsen TM, 2018). La terapia génica se puede utilizar para tratar enfermedades mediante la introducción de genes terapéuticos o reemplazando, silenciando o corrigiendo genes defectuosos. Existen muchos enfoques diferentes, pero la estrategia principal es el uso de vectores virales no replicantes diseñados; predominantemente diversos serotipos de virus adenoasociados recombinantes (AAV) o lentivirus (Axelsen TM, 2018).

Con esta propuesta en mente, se han empleado vectores lentivirales para transducir el transgén GDNF en el núcleo estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA (Kirik D, 2004) (Quintino L, 2019). Sumado a esto, se han trasplantado células troncales mesenquimales derivadas de adipocitos (hAMSCs, por sus siglas en inglés) genéticamente modificadas por vectores virales para producir GDNF y se ha logrado neuroprotección y neuroregeneración (Sun S, 2020) tras el trasplante de estas células en el estriado de ratones lesionados con 6-OHDA, dando como resultado favorable, un aumento en el número de neuronas dopaminérgicas en la *sustantia nigra* (SN) además de que disminuyó los síntomas motores (Sun S, 2020). Otros autores también han reportado efecto anti-neuroinflamatorio de GDNF en la EP (Tabla 3) y un posible efecto anti- α -S (Delgado-Minjares KM, 2021).

Tabla 3. Efecto anti-neuroinflamatorio de GDNF en la EP.

Modelo experimental/ Tipo de terapia con GDNF	Resultados relevantes	Mecanismo propuesto
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 <i>in vitro</i> .	Activación del complejo GFR α 1-RET y la inhibición de la vía de señalización FAK.
Ratón knockdown GDNF ^{+/-} (12 meses de edad)/ Inyección estereotáxica bilateral de GDNF (10 μ g 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.
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-1 β , y TNF- α .	Inhibición de la activación microglial por la reducción en la fosforilación de p38.
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.

Inyección intercutánea de 6-OHDA en ratón/ Macrófagos transfectados con GDNF (i.v. 1×10^6 células/ 100 μ l, 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.
Inyección intraperitoneal de MPTP en ratón/ Administración IN de GDNF en un nanovector de lípidos conjugado con péptidos.	GDNF disminuyó la microglía activa.	Reducción de la microglía activa al modular la neuroinflamación.
Ratón transgénico Parkina Q311X(A) (4 meses de edad)/ Administración de GDNF-macróforos (i.v. 2×10^6 células/100 μ l/ratón, una vez por semana por 3 semanas)	El tratamiento disminuyó de la microgliosis y astrogliosis.	Efecto anti-neuroinflamatorio al modular la activación microglial.
Inyección intraperitoneal de MPTP 2 veces por semana por 3 semanas/ Entrega de GDNF vía sistema UTMD (3.6×10^8 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.
Referencias:	(Rocha S.M., 2012), (Zhao Y, 2014), (Lapchak P.A., 1997), (Martin D., 1996)	(Bowenkamp K.E., 1997), (Sullivan A.M., 1998), (Winkler C., 1996)

Abreviaturas: 6-hidroxidopamina (6-OHDA), Ciclooxygenasa 2 (COX-2), Factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), Receptor alfa-1 de la familia GDNF (GFR α 1), intravenoso (i.v.), Interleucina (IL), Intranasal (IN), Óxido nítrico sintasa (iNOS), Lipopolisacáridos (LPS), Microburbujas (MBs), Complejo mayor de histocompatibilidad 2 (MHCII), Metaloproteínasa-9 (MMP-9,), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), Óxido nítrico (ON), Proteína cinasa activada por mitógenos (p38), Receptor tirosina quinasa (RET), GDNF - Factor neurotrófico derivado de la glía humano recombinante (rhGDNF), Substantia nigra pars compacta (SNpc),

Superóxido dismutasa 2 (SOD-2), Factor de necrosis tumoral α (TNF- α), Destrucción de microburbujas dirigido por ultrasonido (UTMD).

Las características neuroregenerativas de GDNF se han demostrado ampliamente en animales parkinsonianos, pero su efecto anti- α -S se ha evaluado solo en cinco estudios (Chmielarz P. E. S., 2020), (Zhao Y., 2019), (Lo Bianco C., 2004), (Decressac M. U. A.-R., 2011), (Decressac M. K. B., 2012). Una línea de evidencia muestra que la terapia con GDNF administrada antes o después de la inducción de α -S no previene ni reduce los niveles de α -S (Lo Bianco C., 2004), razón por la que se ha llegado a pensar que la falla de GDNF depende de la etapa de la neurodegeneración, siendo efectiva en la etapa temprana, cuando hay suficientes neuronas sobrevivientes para responder al efecto terapéutico (Quintino L, 2019). Otra explicación de la falta de efectos neuroprotectores y anti- α -S de GDNF en algunos experimentos podría estar relacionada con el modelo de EP empleado, por lo que, investigaciones futuras sobre GDNF deben llevarse a cabo en el modelo BSSG estereotáxico de EP, donde los efectos de GDNF pueden evaluarse en la neuroinflamación, la neurodegeneración DA, la sinucleinopatía α y los déficits motores y no motores.

La terapia génica es un abordaje clínico prometedor para la EP; desafortunadamente, aún se ha prestado poca atención a aquellos sistemas no virales que dependen de la endocitosis mediada por receptores para la transferencia de genes porque la mayoría de ellos no han mejorado su eficiencia para proporcionar una expresión génica sostenida in vivo (Huang R, 2013). Para fines de este proyecto, se empleará el sistema de nanopartículas poliplex de neurotensina o NTS-poliplex, que es un nanovector génico no viral capaz de transfectar eficientemente neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra in vivo.

1.4.4 Nanopartículas de GDNF como tratamiento para la enfermedad de Parkinson

En el modelo de lesión con 6-OHDA, se demostró que la administración intravenosa de GDNF encapsulado en NPs conjugadas con angiopéptido, que utiliza la transcitosis de la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1), promovió la recuperación del fenotipo dopaminérgico (Huang R, 2013). Resultados semejantes se obtuvieron con la administración intravenosa del plásmido de GDNF encapsulado en NPs formadas a partir de la congulación de polietilimina (PEI) y polietilenglicol, y con aplicación de ultrasonido focalizado (Mead BP, 2017).

Estos estudios avalan el surgimiento de la nanobiotecnología con NPs de 1-100 nm como vehículos prometedores versátiles para el envío de genes como alternativa a los vectores virales (P., 2002).

En el campo del Sistema Nervioso Central (SNC) el poliplex de neurotensina (NTS-poliplex) es un sistema de transferencia génica no viral con una probada habilidad de transfectar neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra tanto in vitro (Hernandez-Baltazar, 2012), como in vivo (Gonzalez-Barrios, 2006) (Alvarez-Maya, 2001) (Arango-Rodriguez, 2006.) (Navarro-Quiroga, 2002). Este sistema consiste en nanopartículas que resultan de la compactación de un plásmido (pADN) por las uniones electrostáticas del péptido cariofílico (PK) y el conjugado neurotensinapéptido fusogénico-polilisina (NTS-PF-PLL) (Arango-Rodriguez, 2006.) (Castillo-Rodriguez, 2014) (Hernandez, 2014). Diversos trabajos describen el papel que juegan los componentes del NTS-poliplex en la transferencia génica. En resumen, el acarreador de NTS activa la internalización del NTSR1, promoviendo la entrada de las nanopartículas de NTS-poliplex (Figura 1) (Hernandez-Baltazar, 2012) (Alvarez-Maya, 2001) (Navarro-Quiroga, 2002) (Castillo-Rodriguez, 2014). El PF (péptido fusogénico) rescata a las nanopartículas de NTS-poliplex de la degradación endosomal, y el PK dirige al pADN al núcleo celular (Figura 1). El gen se transcribe únicamente en las neuronas dopaminérgicas, debido a la alta densidad de NTSR1 y al promotor NBRE3X, específico para esas neuronas (Figura 1) (Martinez-Fong, 2012) (Espadas-Alvarez AJ, 2017). Las principales propiedades biofísicas de las nanopartículas de NTS-poliplex se han caracterizadas utilizando estudios de radioactividad, análisis electroforético, y técnicas de microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (Castillo-Rodriguez, 2014) (Navarro-Quiroga, 2002) (Arango-Rodriguez, 2006.). Estos estudios han mostrado que las nanopartículas de NTS-poliplex son de forma toroide, con un diámetro de 50 a 150 nm y tienen carga eléctrica neutra. Es importante hacer notar que el NTS-poliplex contiene ya los dominios mínimos funcionales de las moléculas que lo conforman (Martinez-Fong, 2012). La NTS es un péptido de 13 aminoácidos. El PF tiene 22 aminoácidos y el PK tiene 20 aminoácidos. Estos péptidos son dominios funcionales. En estudios previos en este laboratorio se ha demostrado que la transferencia de genes neurotróficos (GDNF o NRTN) mediante el NTS-poliplex a neuronas dopaminérgicas fue capaz de promover supervivencia, reborización axonal y mejoría de la conducta motora en el modelo de 6-OHDA en la rata (Gonzalez-Barrios, 2006) (Hernandez, 2014). 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 invasión aberrante de las fibras dopaminérgicas (Espadas-Alvarez AJ, 2017) (Gonzalez-Barrios, 2006).

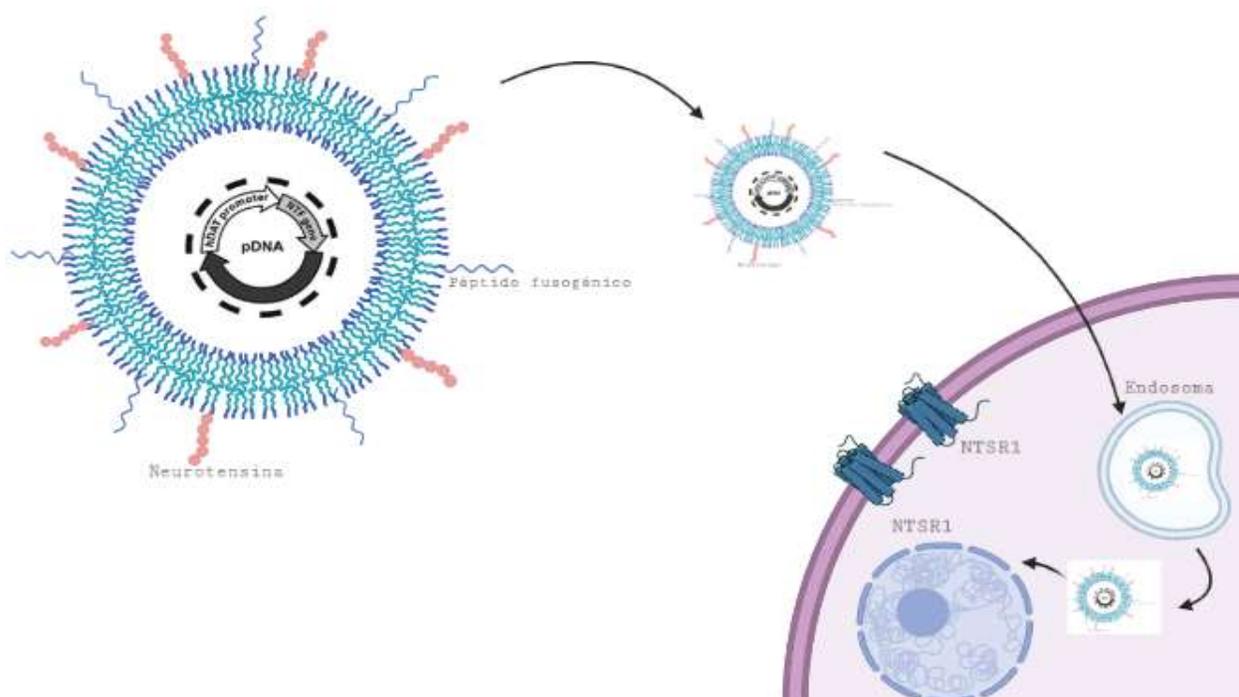


Figura 1. Nanopartículas de hGDNF y su internalización en las neuronas dopaminérgicas. (Figura creada con Biorender.com). NTS-poliplex, transportador de genes neurotróficos a la célula, utilizando los mecanismos de endocitosis, escape endosomal, y direccionamiento nuclear. **Abreviaturas:** Receptor de neurotensina 1 (NTSR1).

2. Planteamiento del problema

La EP como la α -sinucleinopatía más común, clásicamente considerado un trastorno del movimiento, representa una de las enfermedades actuales con mayor foco de atención, de la cual se sabe mucho sobre las conexiones anatómicas y los cambios neuropatológicos y farmacológicos de la EP, en relación con la pérdida de la función dopaminérgica y la aparición de síntomas motores. Esta comprensión del papel de la dopamina en la EP ha llevado al desarrollo de tratamientos farmacológicos efectivos de los síntomas motores en forma de terapia de reemplazo de dopamina usando levodopa y agonistas dopaminérgicos. Gran parte de la información sobre estos tratamientos farmacológicos se ha obtenido utilizando modelos neurotóxicos clásicos que imitan la depleción de dopamina (MPTP o 6-OHDA). Sin embargo, la EP es más que un trastorno de la vía dopaminérgica nigroestriatal. Con el descubrimiento de que

las mutaciones en la α -S causan una forma familiar de la EP y que la patología de la EP puede propagarse, afectando múltiples sistemas de neurotransmisores y regiones del cerebro, la comprensión que teníamos sobre la EP se ha transformado por completo. Este hecho, exige que reconsideremos nuestros modelos animales. Recientemente, 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 -S que se propagan como prion, neuroinflamación, infiltrado linfocítico, y apertura de la BHE. Este hecho es sumamente relevante para nuestro laboratorio ya que el uso de este modelo para EP en este proyecto, nos permitirá estudiar mas de cerca que pasa con los agregados patológicos de α -S, además de realizar una aproximación terapéutica con el envío dirigido del gen hGDNF por el sistema de NPs NTS-poliplex administrado vía arteria carótida interna (ACI) ya que se sabe que, los ensayos clínicos empleando GDNF en pacientes con EP, no han sido exitosos y se ha debatido si la presencia de agregados de α -S podría comprometer la efectividad de los tratamientos, además de que la vía de administración es extremadamente invasiva (inyección intracerebroventricular, inyección intraputamina, infusión por catéter, entre otros) asociándose a efectos adversos severos en los pacientes.

Por lo tanto, este proyecto busca conocer si la expresión de hGDNF disminuirá la formación y propagación de los agregados patológicos de α -S y evitará el progreso de la neurodegeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal en el modelo murino parkinsoniano de BSSG, planteándonos la siguiente pregunta científica:

1. ¿Las NPs-hGDNF administradas por vía ACI disminuyen los agregados patológicos de α -S y su propagación, así como la neurodegeneración dopaminérgica en el modelo estereotáxico de BSSG?

3. Hipótesis

La expresión de hGDNF disminuye la formación y propagación de los agregados patológicos de α -S y evita el progreso de la neurodegeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal en el modelo murino parkinsoniano de BSSG.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar si las NPs-hGDNF administradas por vía intraarterial disminuyen los agregados patológicos de α -S y su propagación, así como la neurodegeneración dopaminérgica en el modelo estereotáxico de BSSG.

4.2 Objetivos específicos

1. Confirmar las alteraciones sensorio motoras.
2. Confirmar la disminución de neuronas dopaminérgicas nigrales.
3. Confirmar la generación y propagación de agregados patológicos de α -S.
4. Demostrar la expresión de hGDNF en las neuronas dopaminérgicas de *la substantia nigra*.
5. Demostrar la disminución de la agregación y propagación de α -S patológica, resultante de la administración sistémica de NPs-hGDNF.
6. Demostrar la recuperación neuronal y la reinervación estriatal, resultante de la administración sistémica de NPs-hGDNF.
7. Demostrar la reducción de las alteraciones conductuales, resultante de la administración sistémica de NPs-hGDNF.

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) 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 $60 \pm 5\%$, con comida y agua ad libitum.

5.2 Grupos experimentales

Los animales (n = 20) fueron asignados aleatoriamente en los siguientes grupos experimentales:

- 1) ratas sanas (sin lesión estereotáxica) (n=3).
- 2) ratas parkinsonianas (lesión con BSSG) (n=7).
- 3) ratas sanas-transfectadas (NPs-hGDNF vía ACI) (n=5).
- 4) ratas parkinsonianas (lesión con BSSG) y transfectadas (NPs-hGDNF vía ACI) (n=5).

Todos los grupos serán evaluados por 3 pruebas sensoriomotoras: vibrisas, cilindro y viga.

5.3 Diseño experimental

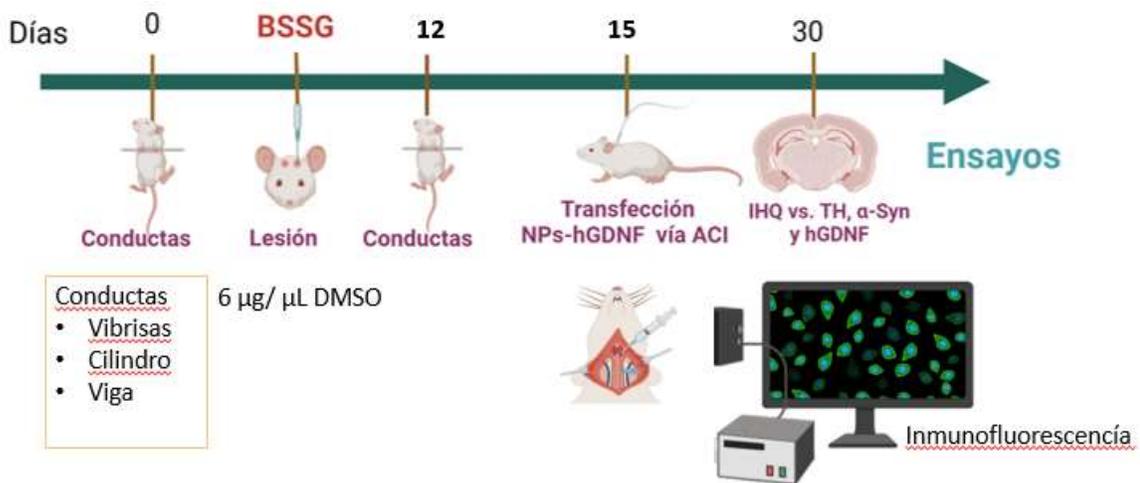


Figura 2. Diseño experimental. Al día cero, a todos los grupos experimentales se les realizaron las 3 pruebas conductuales propuestas (viga, cilindro y vibrisas), posteriormente, al término de las pruebas se inició la lesión con β -sitosterol β -D-glucósido (BSSG). 12 días después de la lesión, todos los grupos experimentales fueron sometidos a las tres pruebas conductuales nuevamente, posteriormente, cumplidos los 15 días, el grupo experimental asignado para la terapia genica fue transfectado con NPs-hGDNF vía arteria carótida interna (ACI), finalmente a los 30 días, todos los grupos experimentales nuevamente se sometieron a la evaluación por pruebas conductuales y fueron sacrificadas para la obtención de muestras a través de ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Esta figura fue creada con BioRender.com.

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

La inyección del neurotóxico BSSG se realizó mediante cirugía estereotáxica. 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). La denervación dopaminérgica del sistema nigroestriatal se llevó a cabo inyectando 6 μ g del neurotóxico BSSG (MedChemExpress; Monmouth Junction, NJ, EE. UU.) disuelto en 1 μ L de DMSO (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.) (Soto-Rojas, 2020), en las siguientes coordenadas adaptadas del atlas de Paxinos G. y Watson (Paxinos G, 2007): antero-posterior (AP) -0.6 mm desde Bregma, medio-lateral (ML) +4.0 mm respecto a Bregma y dorso-ventral (DV) -5.4 mm desde la dura madre. El flujo de la inyección fue de 0.16 μ L/min utilizando una bomba de microperfusión Stoelting (Hernandez-Baltazar, 2012). 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.

5.5 Síntesis de las Nanopartículas de h-GDNF.

Las nanopartículas basadas en el NTS-poliplex resultan de la compactación del ADN plasmídico (pADN) por la unión electrostática entre el péptido cariophilico (PC) y el acarreador de Neurotensina (AC-NTS). Para el ensamblaje fue empleado el PC modificado del péptido original de la proteína de direccionamiento nuclear del Vp1 del virus SV40, resultando en un péptido de 8 aminoácidos (KMAPKKRK, Peptide2.0 Inc. Chantilly, VA). Los componentes principales para la formación de las nanopartículas fueron disueltas en el vehículo en las siguientes proporciones: 1 parte de PC, 3 partes de pADN y 2 partes del AC-NTS. Todos los procedimientos fueron realizados a temperatura ambiente y bajo condiciones de esterilidad empleando una campana de PCR.

El primer paso para el ensamblaje es la obtención de los complejos pADN-PC, los cuales para su formación fueron seleccionadas las concentraciones de 6 nM del plásmido p3xNBRE-hGDNF

y la concentración de 6 μM del PC; ambas soluciones fueron incubadas por un periodo de 30 min en agitación constante, no mayor a los 600 rpm empleando un vortex. El segundo paso para la obtención de las nanopartículas terapéuticas los complejos pADN-PC deben unirse al AC-NTS. Por lo tanto, al término de la incubación, a los conjugados formados les fue agregado lentamente y de forma constante el volumen respectivo del AC-NTS a una concentración de 198 nM.

Después de agregar el AC-NTS, nuevamente toda la solución fue sometida a agitación constante, no mayor a las 600 rpm a temperatura ambiente por 30 min adicionales. Posteriormente, pasado el último tiempo de incubación, las nanopartículas terapéuticas fueron empleadas para los estudios de transfección in vivo.

5.6 Administración de NPs-hGDNF via ACI

Para realizar la administración vía ACI, se tomo como referencia el trabajo de tesis realizado por mi compañera de laboratorio Karen Delgado (Delgado Minjares, 2022). Previo a la administración, se elaboraron catéteres para administrar las NPs-hGDNF 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) fueron marcadas cada 5 μL para regular el volumen y la velocidad de administración (5 $\mu\text{L}/\text{min}$) con la finalidad de evitar hemorragias subaracnoideas (Messmer SJ, 2021). 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, posteriormente, se retrajeron con ganchos los músculos esternohioideo, esternomastoideo y digástrico del lado izquierdo de la tráquea, y se localizó la arteria carótida común (ACC) palpando 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. La finalidad de este último nudo es la de reducir la velocidad del flujo sanguíneo, para evitar hemorragia al momento de realizar la administración. La administración se llevó a cabo 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 μ L a 5 μ L/min. Una vez que finalizó la administración, el catéter se dejó 1 min dentro de la arteria, aplicando hemostasia tras su remoción. Finalmente, los nudos y ganchos fueron removidos y se procedió a suturar.

5.7 Pruebas de comportamiento

Las pruebas de comportamiento se realizaron de 10:00 a 14:00 h. Las ratas se trasladaron al lugar de experimentación en jaulas protegidas de la luz, al menos 1 h antes de la prueba para permitir la aclimatación de los animales. Las ratas deben manipularse gentilmente diariamente durante unos minutos con fines de habituación (al menos 5 días antes de las pruebas de comportamiento), para evitar estrés que puede modificar los resultados. En todas las pruebas de comportamiento, entre cada evaluación, los dispositivos y las superficies deben limpiarse con etanol al 30%

El objetivo de realizar las pruebas de comportamiento fue el evaluar deficiencias locomotoras en el modelo animal Parkinsoniano inducido por BSSG administrado intracranealmente o la recuperación de la alteración conductual al administrar NPS a ratas parkinsonianas inducidas por BSSG. El desempeño en el desafío de las pruebas no mejora con la práctica, lo que permite probar al mismo animal varias veces. Daño en neuronas dopaminérgica en la sustancia nigra o lesión en el estriado entorpece el desempeño en esta prueba.

5.7.1 Prueba de colocación de la extremidad anterior evocada por vibrisas

La prueba de vibrisas se realizó para determinar la afección sensoriomotora bilateral. Esta prueba nos permite evaluar la asimetría en la corteza sensoriomotora y el estriado (Woodlee MT, 2005). 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) (Soto-Rojas LO., 2020). Los animales sanos colocan rápidamente sus patas delanteras sobre la mesa después de la estimulación con vibrisas. Se contó en un máximo de 10 eventos, el número de colocaciones exitosas de las extremidades anteriores contralaterales e ipsilaterales a la lesión (Reyes-Corona D, 2017) (Soto-Rojas LO, 2020).

5.7.2 Prueba de la viga

La prueba de caminata en la viga mide la capacidad de los roedores para desplazarse en un haz estrecho. Esta prueba evalúa el equilibrio y la coordinación motora durante el tiempo de desplazamiento y el número de deslizamientos de las extremidades posteriores (Soto-Rojas LO., 2020). Las extremidades posteriores sin duda proporcionan la medida más sensible del rendimiento y los déficits motores.

Para esta prueba, fue necesario contar con dos vigas de madera, una estrecha de 1 cm de ancho y 2 m de largo, y una de 3 cm de ancho y 2 m de largo. Las vigas se fijaron manteniendo un ángulo de 30 grados para desafiar el equilibrio y la coordinación de la rata, además de que fueron colocadas horizontalmente a 50 cm del piso. La prueba fue grabada en cámaras de videos montadas en su respectivo trípode. El tiempo de recorrido se monitoreó por las cámaras de video y posteriormente fue evaluado.

Día 1 y 2: Entrenamiento

Objetivo: Entrenar a los animales a ascender por la viga, una vez que el roedor aprende que tiene acceso a la parte alta de la viga se siente motivado para realizarlo nuevamente.

Para el entrenamiento se uso la viga más gruesa (3 cm de ancho), colocando la caja en la que estaban siendo alojadas las ratas en el extremo superior de la viga (para que al identificar su olor se sintieran seguras de finalizar el trayecto). Se colocó al roedor en el extremo inferior de la viga. Se espero hasta que el roedor caminara hacia el extremo superior de la viga. Generalmente, este primer día, es complicado para los animales caminar a través de la viga. Se entreno a los animales nuevamente 24 h más tarde, pero ahora usando la viga de 1 cm de ancho, y se repitieron los pasos anteriores.

Día 3: Prueba

Objetivo: Evaluar el desempeño de la rata en el reto de subir la viga, al cuantificar el deslizamiento y las claudicaciones realizadas por la rata al ascender la viga.

Se colocó la viga de 1 cm de ancho, colocando la caja en la que estaban siendo alojadas las ratas en el extremo superior de la viga. Se colocó una de las cámaras en el extremo inferior de la viga, la segunda cámara en el extremo superior de la misma y la última cámara de manera frontal de tal forma que abarcara el inicio y final de la viga. Se inició la videograbación. Se colocó al roedor en el extremo inferior de la viga. Una vez que el animal ascendió por la viga y llegó al extremo superior la prueba fue dada por terminada y se detuvo la grabación. Estos pasos fueron repetidos para cada rata de cada grupo experimental.

Nota: el momento preciso para medir los deslizamientos o errores es cuando ambas extremidades traseras no están correctamente apoyadas en la viga, por lo que se deslizan hacia el lado lateral de la viga.

5.6.3 Prueba del cilindro

La prueba del cilindro se utilizó para evaluar la asimetría locomotora (Soto-Rojas LO., 2020). En esta, las ratas se colocaron en un cilindro acrílico transparente y se grabaron en video. Se cuantificaron los primeros 20 contactos de las patas (ipsilateral o contralateral a la lesión o ambos, cuando las patas se usan simultáneamente) realizados por las ratas sobre la pared del cilindro (Soto-Rojas, 2020). El porcentaje de asimetría se expresó como el número de contactos con el miembro anterior ipsilateral + 1/2 de contactos simultáneos, dividido por el número total de contactos [ipsilateral + contralateral + simultáneo] y multiplicando el cociente por 100 (Soto-Rojas LO, 2020). Los contactos ipsilateral y contralateral están relacionados con el lado de la lesión. Los contactos simultáneos se contaron cuando ambas extremidades anteriores estaban en la pared del cilindro al mismo tiempo, y se reducen a la mitad solo para considerar los contactos con la extremidad anterior ipsilateral. El divisor corresponde al número total de contactos observados. Un valor del 50% indica que un animal explora simétricamente con ambas extremidades anteriores. Las puntuaciones más altas (> 50 %) indican una menor dependencia del miembro anterior contralateral (ya que evalúa el lado lesionado), y las puntuaciones más bajas (< 50 %) indican una menor dependencia del miembro anterior ipsilateral (ya que evalúa el lado de control) (Soto-Rojas LO., 2020).

5.8 Técnicas de inmunotinción

Las técnicas de inmunotinción se realizaron de acuerdo con el procedimiento estándar descrito en otro lugar (Soto-Rojas, 2020) (Luna-Herrera C, 2020) (Hernandez-Baltazar, 2012). Las ratas se anestesiaron profundamente con pentobarbital sódico (50 mg/kg ip) y se perfundieron a través de la aorta ascendente con 30 ml de PBS, seguido de 100 ml de paraformaldehído al 4% en PBS. A continuación, sus cerebros se extrajeron y se fijaron posteriormente en paraformaldehído al 4 % durante 24 h, seguido de crioprotección en sacarosa al 30 %. se extrajo el cerebro y se mantuvo en el fijador durante 48 horas a 4 °C. Después, el cerebro se seccionó en cortes de 30

μm (según el protocolo de inmunotinción) en el plano coronal utilizando un micrótopo deslizante de congelación (Jung Histoslide 2000R ; Leica; Heidelberg, Alemania).

Las rebanadas de cerebro se permeabilizaron mediante incubación en PBS/0,3 % Triton X-100 (PBS/Triton), 3 veces durante 5 min cada una, y los sitios de unión no específicos se bloquearon con albúmina de suero bovino o ASB (más conocida por sus siglas en inglés, BSA) en PBS/Triton durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Las peroxidasas endógenas se eliminaron incubando los cortes con peróxido de hidrógeno al 3 % en PBS/Triton y metanol al 10 % a TA durante 10 min.

Los anticuerpos primarios utilizados para la inmunohistoquímica fueron anti-LB-509 α -sinucleína monoclonal de ratón (1:500; Abcam; Cambridge, MA, EE. UU.), anti-TH monoclonal de ratón (1:1000; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.). Todos los anticuerpos primarios se incubaron a 4 °C durante la noche. En el caso del anticuerpo anti-LB-509 α -sinucleína, se realizó una incubación previa con ácido fórmico al 80% durante 20 min para evidenciar agregados patológicos de α -sinucleína (Soto-Rojas, 2020). Los anticuerpos secundarios utilizados en estos ensayos fueron IgG anti-TH hecho en rabbit (1: 500; Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE. UU.) e IgG anti-mouse biotinilado hecho en caballo (1: 200; Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE. UU.). La tinción inmunohistoquímica se desarrolló utilizando el kit ABC (1,10; Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE. UU.) y se reveló utilizando 3'3-diaminobencidina (DAB; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.). Los cortes de cerebro se lavaron 3 veces durante 5 min en PBS, se contrastaron con β -Gal y montados en portaobjetos utilizando resina Entellan (Merck, KGaA; Darmstadt, Alemania), y observados con un microscopio óptico Leica DMIRE2 con objetivos 5x, 20x y 40x (Leica Microsystems; Nussloch, Alemania).

La conformación de hoja β de α -sinucleína se detectó en cortes inmunomarcados con TH contrateñidos con 0,05 % de tioflavina T en etanol al 60 % (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.) durante 8 min, seguido de 5 lavados con 70 % etanol y agua MilliQ como se describe en otra parte (Soto-Rojas, 2020).

La densidad del área para la tinción inmunohistoquímica de TH (+) se midió con el software ImageJ v.1.46r (The National Institutes of Health; Bethesda, MD) en los lados lesionados y de control de la SNpc. La medición se realizó sobre imágenes tomadas con objetivo 5x de la zona central del SNpc en tres niveles anatómicos (uno caudal, uno medial y uno rostral).

Para el ensayo de inmunofluorescencia doble para ver la expresión de hGDNF en las neuronas dopaminérgicas nigrales, los anticuerpos principales utilizados fueron h-GDNF hecho en mouse

(1: 300; Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE. UU.) y un TH hecho en rabbit (1: 1000; Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE. UU.). Se utilizaron como anticuerpos secundarios un Alexa Fluor 488 pollo anti-raton H+L IgG (1:400; Invitrogen Molecular Probes; Eugene, Oregón, EE. UU.) y un Texas Red cabra anti-conejo H + L IgG (1: 1000; Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE. UU.). Después de lavar con PBS, las rodajas se montaron en portaobjetos de vidrio utilizando VECTASHIELD (Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE. UU.).

5.9 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se graficó la media \pm 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 BSSG

La exactitud de las coordenadas seleccionadas para lesionar con el neurotóxico BSSG directamente en la SNpc, se demostró con fucsina, un colorante magenta utilizado en histología. La marca de este colorante después de su inyección en las coordenadas estereotáxicas indica que quedó localizado el sitio por arriba de la SNpc izquierda y de este modo se evitó daño mecánico directo. Las coordenadas estereotáxicas establecidas a partir del bregma fueron: AP +3.2, ML +2.1 y DV -6.7 (Figura 3).

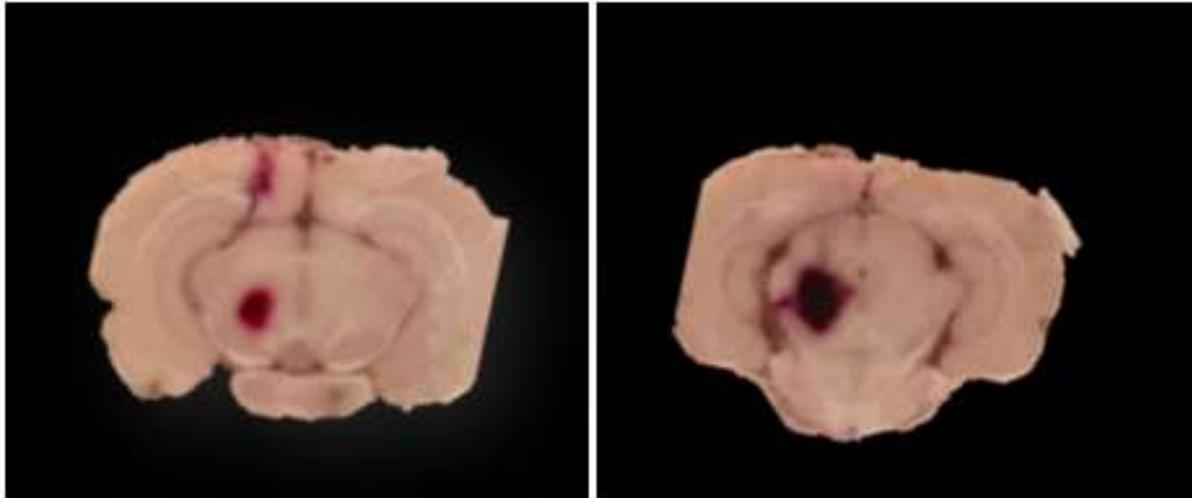
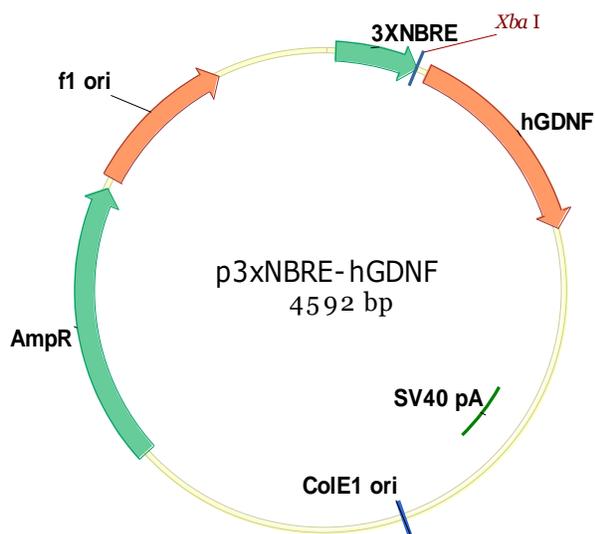


Figura 3. Fotografías representativas del sitio de inyección con fucsina ácida por arriba de la SNpc en el mesencéfalo. Imágenes representativas de cortes cerebrales coronales de rata: a) Interaural +2.64 mm; b) Interaural +3.12 mm.

6.2 Ensayo de restricción

Con la finalidad de corroborar que efectivamente nuestro gen de interés (hGDNF) se encontraba en el plásmido utilizado (pNBRE3x-hGDNF), se llevó a cabo un ensayo de restricción con la enzima de restricción *Bsm I* (Figura 4).



Sitios de corte de la enzima *Bsm I*

p3xNBRE-hGDNF <u>Antisentido</u>	p3xNBRE-hGDNF
2750	2750
670	1030
517	517
414	105
93	93
93	93

Figura 4. Mapa de restricción del plásmido pNBRE3x-hGDNF donde se muestra el sitio de corte por la enzima *BsmI*, además de los sitios de corte específicos de la enzima, tanto sentido como antisentido.

Tras realizar una electroforesis y revelar nuestro gel de agarosa, corroboramos los sitios específicos de corte con la enzima de restricción *BsmI*, donde efectivamente corroboramos la presencia de nuestro gen de interés h-GDNF en el plásmido que se empleó (pNBRE3x-hGDNF) para la elaboración de las NPs utilizadas (Figura 5).

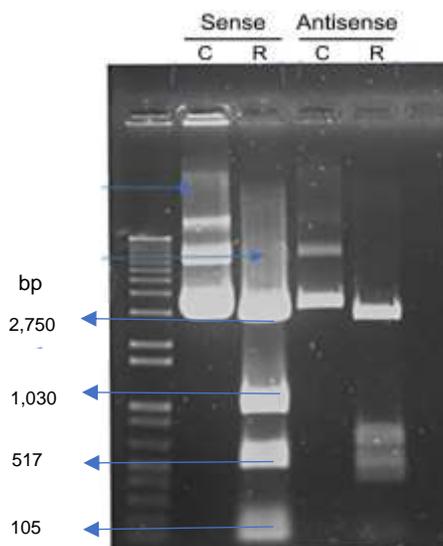


Figura 5. Fotografía representativa del gel de agarosa después de la electroforesis que muestra las bandas para hGDNF tanto antisentido como sentido.

6.2 La administración unilateral de BSSG desencadena alteraciones motoras y no motoras

BSSG causó un deterioro progresivo en el comportamiento motor y no motor evaluado con los tres tipos de prueba, en comparación con el grupo simulado. De acuerdo con la neurodegeneración dopaminérgica bilateral, la prueba de cilindro reveló el desarrollo de afectación sensitivomotora bilateral por la administración unilateral de BSSG al mes post-lesión, además de una recuperación del 35% de la media total del porcentaje de asimetría obtenido por los grupos experimentales, por otra parte, no se observó un efecto significativo entre los grupos ($p < 0,05$; Fig. 6).

La acción combinada de la pérdida de dopamina y la toxicidad de la α -S en áreas subcorticales y corticales sugiere neurodegeneración en estas áreas y el desarrollo de comportamientos no motores. Sabiendo que el BSSG afecta bilateralmente, ambas partes de la SNpc se verán afectadas, con mayor incidencia en el lado ipsilateral de la lesión, esto explicaría el hecho de que el lado contralateral de la lesión se ve afectado motoramente al no apoyar su pata contra el cilindro, hecho que se ve disminuido en el grupo de ratas lesionado y transfretado (15 días lesión, 15 días transfección).

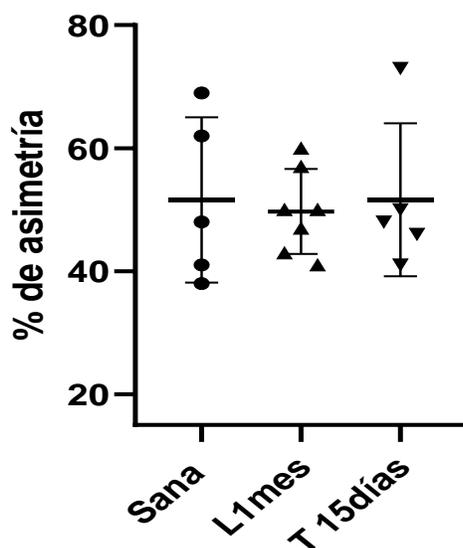


Figura 6. Gráfico que representa el porcentaje de asimetría en el número de contactos de las patas delanteras sobre una pared cilíndrica transparente. Se representan 3 de los 4 grupos experimentales. Grupo sano con una media de asimetría del 51.60%, grupo lesionado 1 mes (L1mes) con una media de 47.19% y grupo transfretado (T 15 días) con una media del 49.97%. No presentaron diferencia significativa entre ellos ($p < 0,05$). Un valor del 50% indica que un animal explora simétricamente con ambas extremidades anteriores. Las puntuaciones más altas ($> 50\%$) indican una menor dependencia del miembro anterior contralateral (ya que evalúa el lado lesionado), y las puntuaciones más bajas ($< 50\%$) indican una menor dependencia del miembro anterior ipsilateral (ya que evalúa el lado de control) (Soto-Rojas LO., 2020). Los datos se presentan como promedio \pm error estándar, $n = 3$ por grupo, a los cuales se les realizó ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* Turkey.

En el caso de la prueba de la viga, se evaluó el tiempo en el que las ratas cruzaron de un extremo a otro, además de los deslizamientos (claudicaciones) que tuvieron durante su recorrido. Esta prueba nos permitió observar alteración de la marcha provocada por la lesión con BSSG. Las primeras alteraciones motoras aparecieron a partir del día 15 post-lesión, con un claro aumento del tiempo de recorrido, además del aumento de claudicaciones y un retardo para iniciar la marcha (Figura 7). Estos resultados, pueden relacionarse directamente con las características motoras particulares de la EP: acinesia (el movimiento se vuelve difícil de iniciar) y bradicinesia (movimientos lentos).

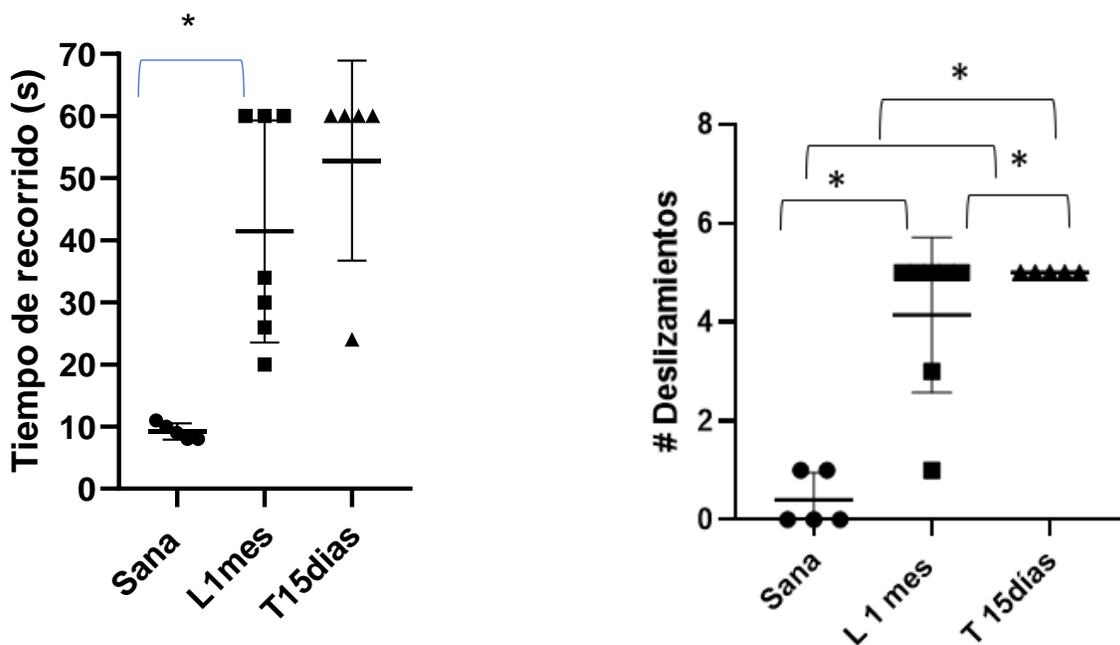


Figura 7. Graficos que representan el tiempo que tardaron en atravesar la viga y el numero de claudicaciones que tuvieron en cada momento del experimento. Se presentan los 3 grupos experimentales sano (día 0), lesionado (1 mes post lesión) y transfectedo (15 días post-transfección). En el tiempo recorrido se observa una diferencia significativa entre el grupo sano y el grupo L1mes, diferencia que no presentan entre T15días y L1mes. Diferencia significativa que persiste en el grafico representativo de claudicaciones. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar, $n = 5$ por grupo, a los cuales se les realizó ANOVA de una vía y la prueba post hoc Turkey.

Finalmente, para determinar que el BSSG ocasiona disfunción sensoriomotora la prueba mas sensible que llevamos acabo para este proyecto, fue la prueba de vibrisas, realizada, de igual manera que las anteriores, a todos los grupos control del experimento. Al comparar el grupo sano

contra el grupo L1mes y T15días (ipsilateral y contralateral), se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) (Figura 8). Al mes de lesión con BSSG se observa una clara alteración motora con la ausencia de respuesta motora ipsilateral al lado lesionado, hecho que se presenta desde los 15 días post-lesion-BSSG. Sin embargo, 15-días post-transfección este hecho se ve alterado, regresando casi al estado del grupo control sano (Figura 8).

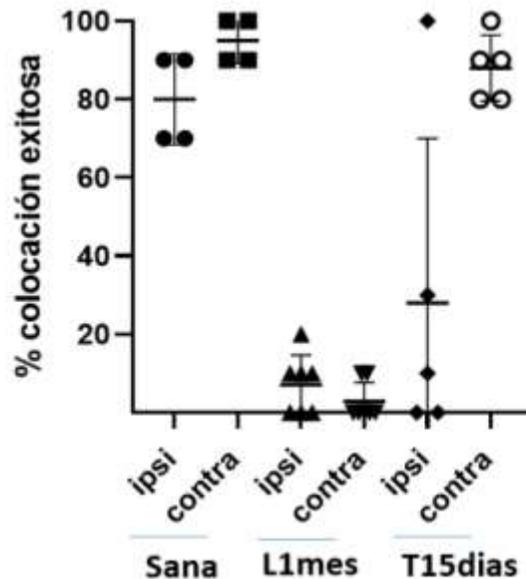


Figura 8. Alteraciones sensoriomotoras en la rata después de lesión con β -sitosterol β -D-glucósido (BSSG) y transfección con NPs-Hgdnf. Respuesta contralateral e ipsilateral a la estimulación de vibrisas. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar, $n = 5$ por grupo, a los cuales se les realizó ANOVA de una vía y la prueba post hoc Turkey. * $p < 0.05$.

6.3 La administración unilateral de BSSG provoca una disminución progresiva y bilateral del fenotipo dopaminérgico en la vía nigroestriatal

Una sola inyección intranigral de BSSG disminuyó significativamente el número de células TH (+) en la SNpc del lado lesionado y del contralateral, así como del VTA, 4 semanas después de la lesión en uno de los grupos experimentales (L1mes) en comparación con el lado control intacto. Por otro lado, en las micrografías representativas del mesencéfalo se puede observar que el grupo experimental T15días presenta un rescate parcial de neuronas inmunorreactivas a TH de la sustancia negra con NPs-hGDNF transfectadas vía ACI 2 semanas después de la transfección.

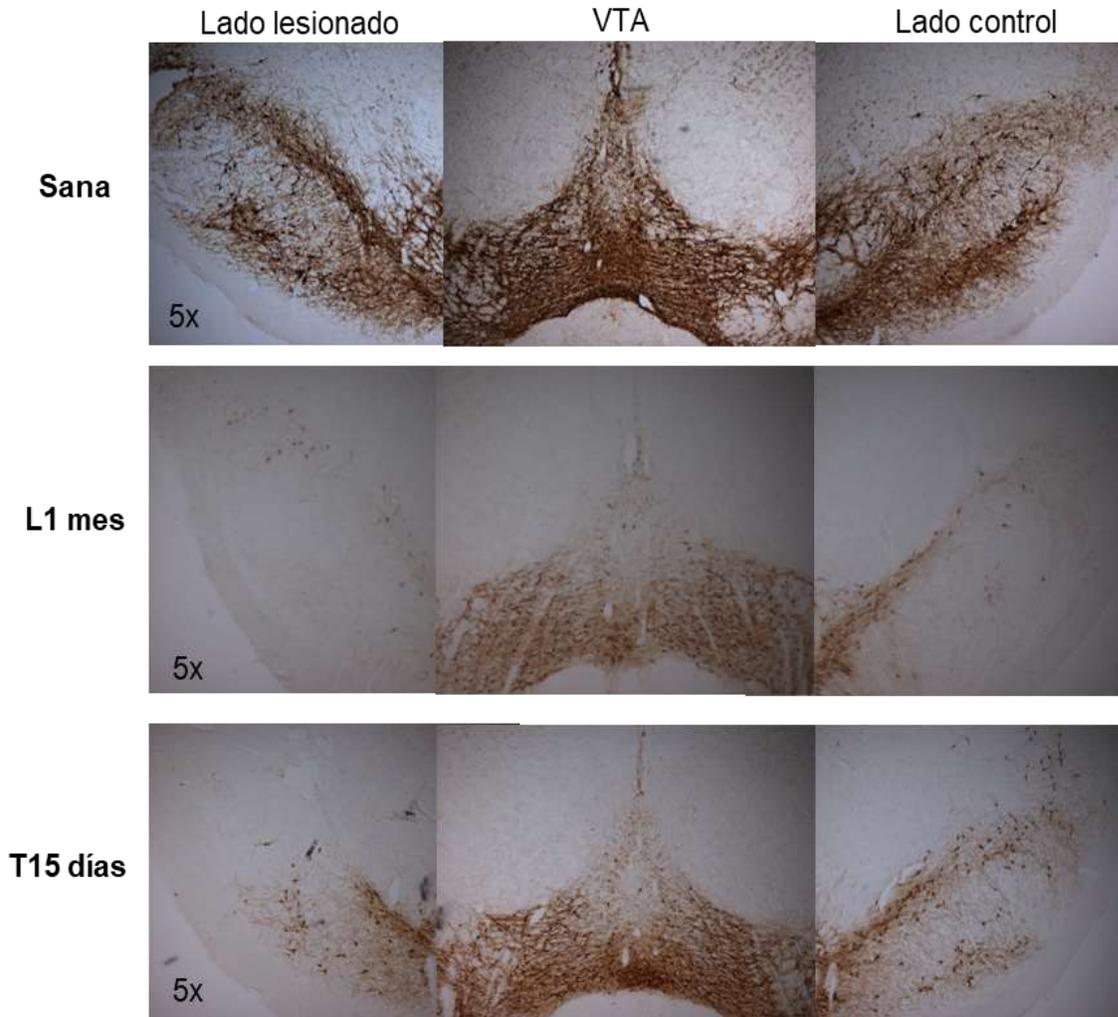


Figura 9. Micrografías representativas de la tinción inmunohistoquímica de TH (+) de cortes de mesencéfalo (rostral, medial y caudal). La administración intranigral unilateral de BSSG disminuye significativamente las células TH (+) y sus ramas en los núcleos del mesencéfalo en el grupo Lesionado 1 mes, mientras que la transfección de NPs-hGDNF vía ACI parece detener la progresión de la degeneración, así como una posible regeneración en comparación con el grupo control sano. La administración intranigral unilateral de BSSG desencadena la agregación progresiva y la diseminación intracerebral de la α -sinucleína patológica.

6.4 La administración intranigral unilateral de BSSG desencadena la agregación progresiva de la α -S patológica.

BSSG provocó un aumento progresivo y significativo en la inmunorreactividad patológica de α -S en el SNpc tanto en el lado lesionado como en el contralateral, en comparación con el grupo control sano (Figura 10). Entre grupos experimentales, la variabilidad del tiempo en lesión muestra diferencias en el monto de agregados patológicos de α -S, tanto en un lado como en otro de cada grupo control. La inmunorreactividad de la α -S con tinción tioflavina-T (Figura 11), muestra células TH (+) que contenían inmunorreactividad lo que sugiere la presencia de α -S soluble en las neuronas dopaminérgicas.

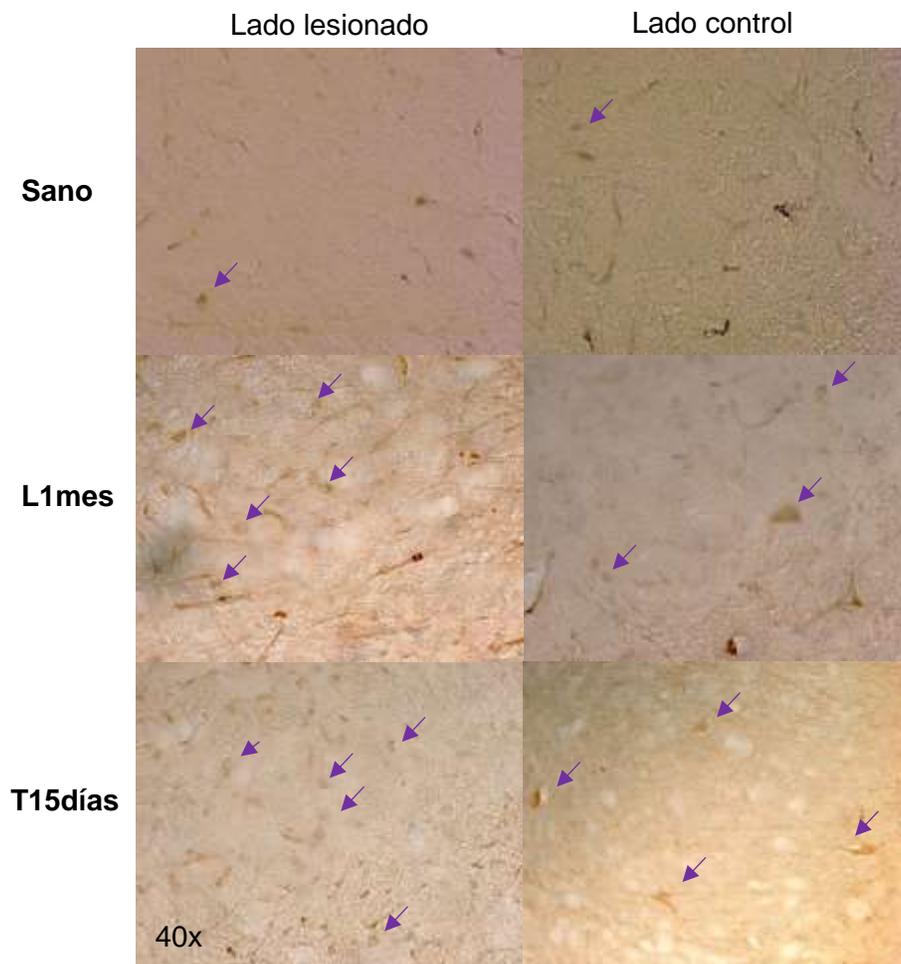


Figura 10. Una sola administración intranigral unilateral de BSSG desencadena agregados de α -sinucleína bilaterales progresivos en la SNpc. Micrografías representativas de la

immunohistoquímica de α -S. Amplificaciones que muestran patrones de agregación de α -S con estructuras difusas y condensadas (Flechas).

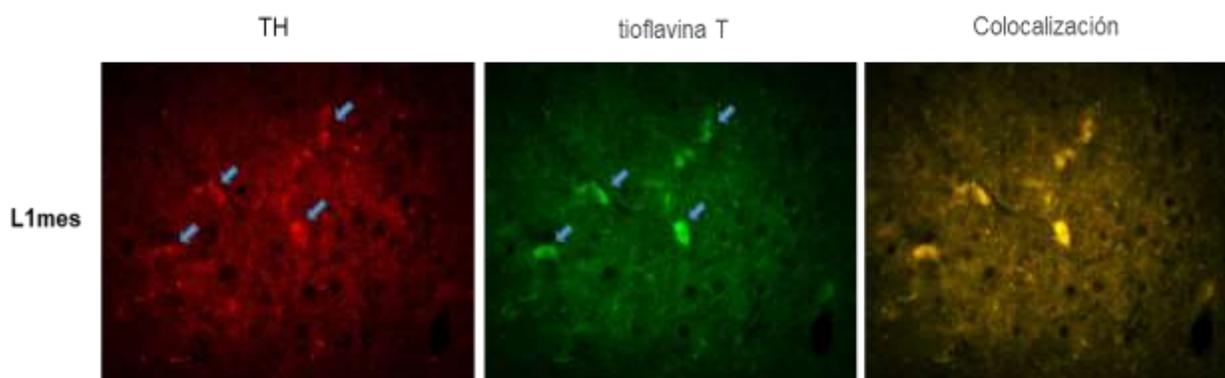


Figura 11. Inmunofluorescencia doble contra TH (rojo) con contratinción de tioflavina-T (verde) (agregados proteicos). Las flechas muestran la agregación de α -S dentro de las neuronas dopaminérgicas.

6.5 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 doble inmunofluorescencia con TH y h-GDNF. Se emplearon controles negativos para descartar que la inmunoreactividad observada para hGDNF no fuera ocasionada por la inespecificidad del anticuerpo, estos controles fueron: grupo intacto transfectado vía ACI con el gen de interés, que corroborara que, en efecto, si no existe una lesión, la BHE no se ve comprometida, por ende, las NPs no se internalizaron y finalmente nuestro grupo Lesionado 1 mes y nuestro control sano. Mientras que, como control positivo, se utilizaron ratas parkinsonianas con una inyección IN de NPs hGDNF (CSTN- control sano transfectado in nigra). La inmunoreactividad para hGDNF se observó en las ratas del grupo CSTN y L1 mes. Además, se apreció una mayor inmunoreactividad cuando las NPs-hGDNF se administraron vía ACI (Figura12). Por consiguiente, las NPs-hGDNF atraviesan la BHE en ratas parkinsonianas y transfectan neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

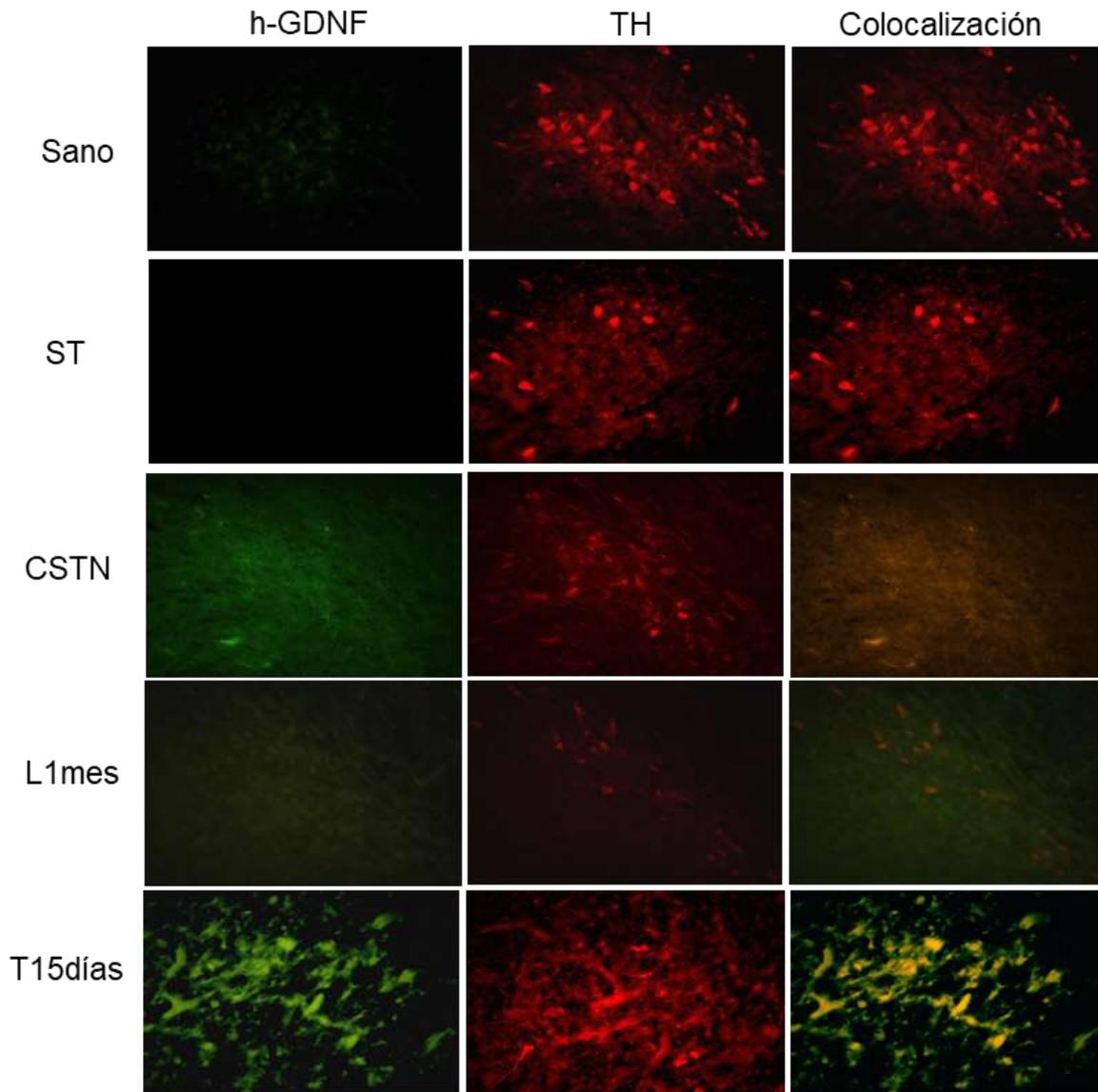


Figura 12. Micrografías combinadas representativas de inmunotinción doble contra h-GDNF (verde) y TH (rojo). Expresión del hGDNF en las neuronas dopaminérgicas del modelo parkinsoniano inducido por la administración de β -sitosterol β -D-glucósido (BSSG).

Discusión

La EP, como la α -sinucleinopatía más común, presenta marcas que la caracterizan y diferencian de las demás, sin embargo, los modelos experimentales que se utilizan para estudiar esta enfermedad no cumplen con la representación de todas ellas, neurodegeneración, agregados patológicos de α -S, alteraciones motoras/no motoras y pérdida de neuronas dopaminérgicas de

la SNpc; hecho que nos lleva a un diagnóstico desfavorable. El consumo crónico de β -sitosterol β -D-glucósido (BSSG), una neurotoxina contenida en las semillas de las cícadas, conduce a la EP en humanos y roedores (Van Kampen JM, 2015). Nuestros resultados muestran que una administración de BSSG en la SNpc provoca una agregación progresiva de α -S endógena en estructuras similares a cuerpos de Lewy en el lado del receptor, y una posterior propagación al lado contralateral. Como se mostró en los resultados, donde presentamos micrografías en las que la inmunorreactividad de la α -S aparece dentro de las células que son TH (+), y luego en las células TH (+) con tinción de tioflavina, lo que sugiere que el mal plegamiento de la α -S comienza en las neuronas dopaminérgicas que luego degeneran. Evidencia que apoyaría la propuesta de que los agregados patológicos de α -S causan neurodegeneración dopaminérgica (Subbarayan MS, 2020). La aparición de agregados de α -S similar a un cuerpo de Lewy, seguida de la neurodegeneración dopaminérgica en el lado control no tratado favorece la propagación y la toxicidad de los agregados de α -S, posiblemente a núcleos cerebrales anatómica y fisiológicamente interconectadas, lo que explica la propagación de la patología de la α -S de manera similar a los priones (Soto-Rojas, 2020) (Bendor JT, 2013). Los mecanismos de agregación de α -S aún están en proceso de caracterización, incluidos aquellos por causas genéticas (Burré J, 2010). La neurotoxina BSSG podría inducir la agregación de α -S mediante la modificación de uno de sus múltiples mecanismos postraduccionales, que incluyen fosforilación, oxidación, acetilación, ubiquitinación, glicación, glicosilación, nitración y proteólisis (Burré J, 2010). Sin embargo, se necesitan más estudios para conocer los mecanismos de agregación de la proteína α -S y el modelo de BSSG estereotáxico podría contribuir a estos avances prometedores.

Por otro lado, distintos factores como la neuroinflamación y los agregados patológicos de α -S podrían ocasionar cambios en la estructura y función de la BHE en pacientes con la EP (Pediaditakis I, 2021). 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, y promover la internalización de otros factores neurotróficos como terapia para la enfermedad. En el presente trabajo, se logró ver la localización de h-GDNF en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc tras la inmunofluorescencia doble para TH (+) y h-GDNF, lo que avala nuestro envío dirigido de NPs-hGDNF a través de una vía menos invasiva que podría ayudar a evitar los efectos adversos que se ha visto genera el uso del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF). Su colocación en las neuronas dopaminérgicas al final de estos experimentos, es sumamente relevante ya que se sabe que, en enfermedades

neurodegenerativas, como la EP, la señalización y expresión de GDNF se encuentra desregulada (Chu Y., 2021) (Chauhan N.B., 2001). Por lo tanto, la supresión del GDNF endógeno debido a la EP hace que no esté disponible para contribuir al proceso de restauración neural y se ha visto que los pacientes muestran, sistemáticamente, un agotamiento de la proteína GDNF e neuronas supervivientes de *Sustantia Nigra pars compacta* (SNpc), hecho que explica por qué su falta de efecto restaurador en el sistema nigroestriatal (Chauhan N.B., 2001). De manera similar, en otras regiones del sistema nigroestriatal, curiosamente se han observado reducción en los niveles de proteína GDNF, asociada con deterioro cognitivo incluso en ausencia de pérdida neuronal, por lo que, se piensa que el GDNF podría realizar acciones fisiológicas en la neurotransmisión del hipocampo similares a las del BDNF (Griego E., 2021).

La denervación dopaminérgica inducida por BSSG en la SNpc se asoció con el desarrollo de acinesia, bradicinesia y marcha descoordinada que presentaron los grupos experimentales de animales, tras realizarles las pruebas conductuales. Hecho que pudiera ser causado por el desarrollo de agregados y estructuras similares a neuritas de α -S patológica generadas por el modelo de BSSG. Juntos, los hallazgos clínicos y experimentales sugieren que la agregación de α -s también puede inducir la degeneración de las neuronas estriatales, lo que se refleja principalmente en una disminución diferencial en la densidad de las espinas dendríticas y por ende el desarrollo de disfunciones motoras.

Conclusión

Los experimentos realizados en esta tesis, que una sola administración intranigral de BSSG promueve la aparición progresiva de agregados patológicos de α -S y la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, provocando los déficits motores de la EP, representados por nuestros grupos experimentales en las pruebas conductuales. Además de que se pudo observar la propagación similar a priones de agregados tóxicos de α -S, características que concuerdan con el fenotipo de la EP como α -sinucleinopatía. Y finalmente, 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.

Perspectivas

7. Extender el estudio de la administración de NPs-hGDNF por vía ACI para demostrar si se producen cambios en la alterada permeabilidad de la BHE inducida en el modelo de ratas parkinsonianas de BSSG.
8. Extender el estudio del uso la terapia génica del NPs-hGDNF para analizar la modulación de la expresión de la α -Syn en el modelo de parkinson.
9. Extender el estudio de la terapia génica del NPs-hGDNF para estudiar su efecto sobre marcadores de neuroinflamación (activación microglial, reactividad de astorocitos neurotóxicos A1, infiltración linfocítica y factores humorales).

Bibliografía

- (29 de August de 2021). Obtenido de The Human Protein Atlas. : Available online: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168621-GDNF/tissue>
- AE, K. L. (2015). Parkinsons disease. *Lancet* , 896–912 .
- Alvarez-Maya, I. e. (2001). In vivo gene transfer to dopamine neurons of rat substantia nigra via the high-affinity neurotensin receptor. *Mol Med.*, 7(3): p. 186-92.
- Anna Villar-Piqué, T. L. (2015). Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. *Journal of Neurochemistry.*, 240-255.
- Arango-Rodriguez, M. e. (2006.). Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection. *Biochim.Biophys Acta*, 1760(7): p. 1009-20.
- Axelsen TM, W. D. (2018). Gene Therapy for Parkinson's Disease, An Update. . *J Parkinsons Dis.*, 8(2):195-215.
- Barker R.A., B. A. (2020). GDNF and Parkinson's Disease: Where Next? A Summary from a Recent Workshop. *J. Parkinsons Dis.* , 10:875–891.
- Bayer TA, J. P. (1999). Neural expression profile of alpha-synuclein in developing human cortex. *Neuroreport.*, 2799–2803.
- Bendor JT, L. T. (2013). The function of α -synuclein. *Neuron.*, 1044-66.
- Bezard E, Y. Z. (2013). Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov Disord.* , 28(1):61–70. .
- Boros, F. A. (2021). NEAT1 on the Field of Parkinson's Disease: Offense, Defense, or a Player on the Bench? . *Journal of Parkinson's disease*, 123–138. .
- Bowenkamp K.E., L. P. (1997). Intracerebroventricular glial cell line-derived neurotrophic factor improves motor function and supports nigrostriatal dopamine neurons in bilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats. . *Exp. Neurol.* , 145:104–117.
- Braak H, D. T. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*.
- Braak H, S. M. (2007). Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. . *Acta Neuropathol.*, 231–241.
- Burré J, S. M. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. . *Science* , 1663–1667.
- Cankara FN, G. C. (2020;). The neuroprotective action of lenalidomide on rotenone model of Parkinson's Disease: Neurotrophic and supportive actions in the substantia nigra pars compacta. . *Neuroscience letters.*, 738:135308.

- Castillo-Rodriguez, R. e. (2014). Suicide HSVtk gene delivery by neurotensin-polyplex nanoparticles via the bloodstream and GCV Treatment specifically inhibit the growth of human MDA-MB-231 triple negative breast cancer tumors xenografted in athymic mice. . *PLoS One*, 9(5): p. e97151.
- Chang HM, W. H. (2019). Neurotrophins and glial cell line-derived neurotrophic factor in the ovary: physiological and pathophysiological implications. . *Hum Reprod Update.* , 1;25(2):224-242.
- Chauhan N.B., S. G. (2001). Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain. . *J. Chem. Neuroanat.*, 21:277–288.
- Chen X, F. W. (2021). Evidence for Peripheral Immune Activation in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci.* .
- Chia SJ, T. E. (2020). Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. . *Int J Mol Sci.*, 21(7):2464.
- Chmielarz P., E. S. (2020). GDNF/RET Signaling Pathway Activation Eliminates Lewy Body Pathology in Midbrain Dopamine Neurons. *Mov. Disord.* , 35:2279–2289.
- Chmielarz P., E. S. (2020). GDNF/RET Signaling Pathway Activation Eliminates Lewy Body Pathology in Midbrain Dopamine Neurons. . *Mov. Disord.* , 35:2279–2289.
- Chu Y., K. J. (2021). GDNF signaling in subjects with minimal motor deficits and Parkinson's disease. . *Neurobiol. Dis.* , 153:105298.
- Chung CY, K. J. (2009). Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy. *J. Neurosci* 29, 3365–3373 .
- Claassen DO, J. K. (2010). REM sleep behavior disorder preceding other aspects of synucleinopathies by up to half a century. . *Neurology*, 494-9.
- Conway KA, H. J. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med.* , 1318–1320.
- Daniele SG, B. D.-Z. (2015). Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded α -synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders. *Sci Signal.* , 8(376).
- Decressac M., K. B. (2012). alpha-Synuclein-induced down-regulation of Nurr1 disrupts GDNF signaling in nigral dopamine neurons. . *Sci. Transl. Med.*, 4:163ra156.
- Decressac M., U. A.-R. (2011). GDNF fails to exert neuroprotection in a rat alpha-synuclein model of Parkinson's disease. . *Brain.* , 134:2302–2311.
- Delgado Minjares, K. (2022). Envío dirigido de nanopartículas de hGDNF a neuronas dopaminérgicas nigrales por vía sistémica en ratas parkinsonianas con agregados de α -sinucleína. . [Tesis de maestría no publicada]. Dpto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias-CINVESTAV.

- Delgado-Minjares KM, M.-F. D.-D.-C.-A.-A.-M.-H.-R. (2021). Mechanistic Insight from Preclinical Models of Parkinson's Disease Could Help Redirect Clinical Trial Efforts in GDNF Therapy. . *Int J Mol Sci.* , 22(21):11702.
- Desplats P, L. H. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 13010-5.
- DiSabato DJ, Q. N. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of neurochemistry.*, 136-53.
- Espadas-Alvarez AJ, B. M.-B.-S.-D.-C. (2017). Regulation of human GDNF gene expression in nigral dopaminergic neurons using a new doxycycline-regulated NTS-polyplex nanoparticle system. *Nanomedicine.*
- Gianino S., G. J. (2003). GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. . *Development.* , 130:2187–2198.
- Gonzalez-Barrios, J. e. (2006). Neurotensin polyplex as an efficient carrier for delivering the human GDNF gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats. *Mol Ther*, 14(6): p. 857-65.
- Griego E., H.-L. G.-L. (2021). Functional expression of TrkB receptors on interneurons and pyramidal cells of area CA3 of the rat hippocampus. . *Neuropharmacology.*, 182:108379.
- Hellmich H.L., K. L. (1996). Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. *Mech. Dev.* .
- Hernandez, M. e. (2014). Safety of the intravenous administration of neurotensin-polyplex nanoparticles in BALB/c mice. . *Nanomedicine*, 10(4): p. 745-754.
- Hernandez-Baltazar, D. D.-F. (2012). Optimizing NTS-polyplex as a tool for gene transfer to cultured dopamine neurons. *PLoS One.*, 7(12): p. e51341.
- Huang R, M. H. (2013). Angiopep-conjugated nanoparticles for targeted long-term gene therapy of Parkinson's disease. . *Pharm Res.* , 30(10):2549-59. .
- J., B. (2015). The Synaptic Function of α -Synuclein. *J Parkinsons Dis.* . *Journal of Parkinsons Disease* , 699-713.
- J., H. S. (2020). Alpha-Synuclein: The Interplay of Pathology, Neuroinflammation, and Environmental Factors in Parkinson's Disease. *Neurodegenerative Diseases*, 55-64.
- J., H. S. (2021). Alpha-Synuclein: the interplay of pathology, neuroinflammation, and environmental factors in Parkinson's disease. *Neurodegenerative diseases*, 55-64.
- Jurga AM, P. M. (2020). Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. 14(198).
- Kempuraj D, T. R. (2016). Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. . *J Neurol Neurosurg Spine.* , 1(1):1003.
- Kim C, H. D. (2013). Neuron-released oligomeric α -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. . *Nat Commun*, 1562-4.

- Kirik D, G. B. (2004). Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. . *Nat Neurosci.*, 7(2):105-10.
- Kordower JH, C. Y. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. . *Nat Med.* , 14(5):504–506.
- Kordower JH, D. H. (2011). Transfer of host-derived α synuclein to grafted dopaminergic neurons in rats. . *Neurobiol Dis.* , 43(3):552–557.
- Lapchak P.A., J. S. (1997). Glial cell line-derived neurotrophic factor: Distribution and pharmacology in the rat following a bolus intraventricular injection. . *Brain Res.* , 747:92–102.
- Lashuel HA, O. C. (2013). The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci.*, 38-48.
- Liddel SA, G. K. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 481-7.
- Lin L.F., D. D. (1993). GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* , 260:1130–1132.
- Liu, M. a. (2011). “Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease.” . *Parkinson's disease vol.* .
- Lo Bianco C., D. N. (2004). Lentiviral nigral delivery of GDNF does not prevent neurodegeneration in a genetic rat model of Parkinson's disease. . *Neurobiol. Dis.* , 17:283–289.
- Luk KC, e. a. (2009). Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 20051–20056.
- Luk KC, K. V. (2012). Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. . *Science.* , 338(6109):949–953.
- Luna-Herrera C, M.-D. I.-R.-M.-P.-D. (2020). 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.*
- Mahato, A. K. (2020). 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*, 382(1), 147–160.
- Marks WJ Jr, B. R. (2010). Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: A double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol* 9, 1164–1172.
- Maroteaux L, C. J. (1988 Aug). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*, 8(8):2804-15.
- Martin D., M. G. (1996). Glial cell line-derived neurotrophic factor: The lateral cerebral ventricle as a site of administration for stimulation of the substantia nigra dopamine system in rats. Eur. . *J. Neurosci.* .
- Martinez-Fong, D. e. (2012). NTS-Polyplex: a potential nanocarrier for neurotrophic therapy of Parkinson's disease. *Nanomedicine*, 8(7): p. 1052-69.

- Mavroeiidi, P., y. X. (2021). Neurons and Glia Interplay in alpha-synucleinopathies. *International journal of molecular sciences*, 4994.
- McGeer PL, I. S. (1988). Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. . *Annals of neurology.*, 574-6.
- Mead BP, K. N. (2017). Novel Focused Ultrasound Gene Therapy Approach Noninvasively Restores Dopaminergic Neuron Function in a Rat Parkinson's Disease Model. . *Nano letters.* , 17(6):3533-42.
- Messmer SJ, F. J. (2021). Method of intra-arterial drug administration in a rat: Sex based optimization of infusion rate. . *Journal of neuroscience methods.* , 357:109178.
- Michos O., C. C. (2010). Kidney development in the absence of Gdnf and Spry1 requires Fgf10. . *PLoS Genet.* , 6:e1000809.
- MS., H. (2019). Microglia in Parkinson's Disease. . *Advances in experimental medicine and biology.* , 1175:335-53.
- Navarro-Quiroga, I. e. (2002). Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 nuclear localization signal. . *Brain Res Mol Brain Res*, 105(1-2): p. 86-97.
- Nutt J.G., B. K. (2003). Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. . *Neurology.* , 60:69–73.
- Olanow CW, B. P. (2013). Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder? *Mov Disord.* , 28(1):31–40.
- P., B. (2002). GDNF treatment in Parkinson's disease: time for controlled clinical trials? . *Brain : a journal of neurology.* , 125(Pt 10):2149-51.
- Paxinos G, W. C. (2007). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition: . *Elsevier Science.*
- Pediaditakis I, K. K.-S. (2021). Modeling alpha-synuclein pathology in a human brain-chip to assess blood-brain barrier disruption. . *Nature Communications.* , 12(1):5907.
- Perrin RJ, W. W. (2001). Exposure to long chain polyunsaturated fatty acids triggers rapid multimerization of synucleins. *J Biol Chem*, 41958–41962.
- Pienaar IS, L. C. (2015). Deep-brain stimulation associates with improved microvascular integrity in the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. . *Neurobiology of disease.*, 392-405.
- Pingale T, G. G. (2020). Classic and evolving animal models in Parkinson's disease. . *Pharmacology, biochemistry, and behavior.* , 199:173060.
- Potashkin JA, B. S. (2010). Limitations of animal models of Parkinson's disease. . *Parkinson's disease.*, 2011:658083.
- Quintino L, A. M. (2019). GDNF-mediated rescue of the nigrostriatal system depends on the degree of degeneration. *Gene therapy.* , 26(1-2):57-64.

- Reyes-Corona D, V.-H. N.-B.-D.-L.-M.-A.-P.-B.-C.-B.-F. (2017). Neurturin overexpression in dopaminergic neurons induces presynaptic and postsynaptic structural changes in rats with chronic 6-hydroxydopamine lesion. . *PLoS One.* , 12:e0188239.
- Rocha S.M., C. A. (2012). Astrocyte-derived GDNF is a potent inhibitor of microglial activation. *Neurobiol. Dis.*, 47:407–415.
- S, F. (2015). The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. . *Mov Disord* 3, 4–18.
- Saarma M, M. W. (2020). Editorial for the special issue neurotrophic factors. . *Cell Tissue Res.* , 382(1):1-4.
- Santiago RM, B. J. (2010). 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.
- Scott DA, e. a. (2010). A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in alpha-synuclein-induced neurodegeneration. *J Neurosci.*, 8083–8095.
- Shigemoto-Mogami Y, H. K. (2018). Activated Microglia Disrupt the Blood-Brain Barrier and Induce Chemokines and Cytokines in a Rat in vitro Model. . *Front Cell Neurosci.* , 12:494.
- Sidorova YA, S. M. (2020). Growth Factors Cure Parkinson's Disease? . *Trends Pharmacol Sci.*, 41(12):909-922.
- Soto-Rojas LO, G.-R. L.-H.-M.-R.-G. (2020). A single intranigral administration of β -sitosterol β -d-glucoside elicits bilateral sensorimotor and non-motor alterations in the rat. *Behavioural brain research*, 378:112279.
- Soto-Rojas LO., B. C.-R.-H.-M.-R.-G.-S.-D.-C.-V.-L.-D.-F. (2020). A sequential methodology for integral evaluation of motor and non-motor behaviors in parkinsonian rodents. *MethodsX.*, ;7:100821.
- Soto-Rojas, L.-D. I.-H.-C.-S.-G. (2020). Unilateral intranigral administration of β -sitosterol β -D-glucoside triggers pathological α -synuclein spreading and bilateral nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the rat. *Acta neuropathological communications.*
- Subbarayan MS, H. C. (2020). T cell infiltration and upregulation of MHCII in microglia leads to accelerated neuronal loss in an α -synuclein rat model of Parkinson's disease. . *J Neuroinflammation.* , 17(1):242. .
- Sullivan A.M., O.-J. J. (1998). Long-term protection of the rat nigrostriatal dopaminergic system by glial cell line-derived neurotrophic factor against 6-hydroxydopamine in vivo. . *Eur. J. Neurosci.* , 10:57–63.
- Sun S, Z. Q. (2020). GDNF Promotes Survival and Therapeutic Efficacy of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Mouse Model of Parkinson's Disease. . *Cell transplantation.* .
- Tabata R, W. J. (2008). Chronic exposure to dietary sterol glucosides is neurotoxic to motor neurons and induces an ALS-PDC phenotype. . *Neuromolecular Med.* , 10(1):24–39.

- Tenenbaum, L. &.-C. (2017). Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Gene Delivery in Parkinson's Disease: A Delicate Balance between Neuroprotection, Trophic Effects, and Unwanted Compensatory Mechanisms. . *Frontiers in neuroanatomy.*, 11,29.
- Terse PS, K. A. (2021). Safety Assessment of AAV2-hGDNF Administered Via Intracerebral Injection in Rats for Treatment of Parkinson's Disease. . *Int J Toxicol.* , 40(1):4-14.
- Thome AD, H. A.-D. (2016). microRNA-155 regulates alpha-synuclein-induced inflammatory responses in models of Parkinson disease. *J. Neurosci* 36, 2383–2390.
- Tibar H, E. B. (2018). *Front Neurology*, 170-9.
- Totterdell S, H. D. (2004). The ultrastructural distribution of alpha-synuclein-like protein in normal mouse brain. *Brain Res.*, 61–72.
- Van Kampen JM, B. D. (2015). The Progressive BSSG Rat Model of Parkinson's: Recapitulating Multiple Key Features of the Human Disease. *PLoS One.* , 10(10).
- Van Kampen JM, B. D. (2015). The Progressive BSSG Rat Model of Parkinson's: Recapitulating Multiple Key Features of the Human Disease. . *PLoS One.*, 6;10(10):e0139694.
- Wang S, C. C. (2015). α -Synuclein, a chemoattractant, directs microglial migration via H₂O₂-dependent Lyn phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 112(15).
- Wilson JM, K. I. (2002). Behavioral and neurological correlates of ALS-parkinsonism dementia complex in adult mice fed washed cycad flour. *Neuromolecular Med.* , 1:207–21. .
- Wilson JMB, K. I. (2002). Behavioral and neurological correlates of ALS-parkinsonism dementia complex in adult mice fed washed cycad flour. . *NeuroMolecular Medicine.* , 1(3):207-21.
- Wilson JMB, K. I. (2002). Behavioral and neurological correlates of ALS-parkinsonism dementia complex in adult mice fed washed cycad flour. . *NeuroMolecular Medicine.* , 1(3):207-21.
- Winkler C., S. H. (1996). Short-term GDNF treatment provides long-term rescue of lesioned nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. . *J. Neurosci.*, 16:7206–7215.
- Withers GS, G. J. (1997). Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res.*, 87-94.
- Woodlee MT, A.-G. A. (2005). Testing forelimb placing "across the midline" reveals distinct, lesion-dependent patterns of recovery in rats. . *Exp Neurol.* , 191:310–317.
- Yang J, L. S. (2021). Exosome-mediated delivery of antisense oligonucleotides targeting α -synuclein ameliorates the pathology in a mouse model of Parkinson's disease. . *Neurobiol Dis.* , 148:105218.
- Zhao Y, H. M. (2014). GDNF-transfected macrophages produce potent neuroprotective effects in Parkinson's disease mouse model. . *PloS one.* , 9(9):e106867.
- Zhao Y., H. M.-H. (2019). 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. *J. Control. Release.* , 315:139–149.

Zhao Y., H. M.-H. (2019). 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. *J. . Control. Release.* , 315:139–149.