



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

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Expresión de tirosina hidroxilasa (Th) en astrocitos modificados con CRISPR-dCas9 como
tratamiento experimental de la enfermedad de Parkinson”**

TESIS

Que presenta

M. en C. Luis Fernando Narvárez Pérez

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directores de Tesis:

Dr. José Víctor Segovia Vila.

Dr. Aurelio Campos Romo.

Ciudad de México

Septiembre, 2023.

DEDICATORIA.

*A QUETZALLI DENISSE ANGELES LOPEZ EL AMOR DE MI VIDA, QUIEN SIEMPRE ME HA
APOYADO Y ESTADO A MI LADO.*

AGRADECIMIENTOS.

A CINVESTAV unidad Zacatenco y a CONAHCYT por la oportunidad de continuar mi formación académica.

Al Dr. José Segovia Vila por darme la oportunidad de crear y desarrollar mi proyecto.

Al Dr. Benjamín Florán Garduño por su apoyo y consejos.

Al Dr. Adolfo López Ornelas por sus asesorías, consejos y ayuda en mi vida profesional.

Al Dr. Aurelio Campos Romo por sus asesorías y ayuda en mi vida profesional.

A las auxiliares de investigación del laboratorio 44: Araceli Navarrete Alonso y Paula Vergara Zubillaga, por el apoyo y ayuda en el laboratorio.

INDICE GENERAL.

RESUMEN.	6
ABSTRACT.	7
INTRODUCCIÓN.	8
1. ENFERMEDAD DE PARKINSON.	8
1.1. Concepto.	8
1.2. Variantes de la enfermedad de Parkinson.	8
1.3. Epidemiología.	9
1.4. Etiopatogenia de la enfermedad de Parkinson.	10
1.4.1. Mutaciones en genes relacionados con EP.	10
1.4.2. Disfunción mitocondrial.	12
1.4.3. α -sinucleína.	13
1.4.4. Vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas.	14
1.5. Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson.	16
1.5.1. Ganglios basales.	16
1.5.2. Papel de los astrocitos en la enfermedad de Parkinson.	17
1.6. Cuadro clínico de la enfermedad de Parkinson.	19
1.7. Tratamiento de la enfermedad de Parkinson.	20
1.8. Otros tratamientos para la enfermedad de Parkinson.	22
1.8.1. Estimulación cerebral profunda (DBS).	22
1.8.2. Estimulación magnética transcraneal (TMS).	23
1.9. Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson.	24
1.9.1. Modelos basados en neurotoxinas.	24
2. TERAPIA GÉNICA EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.	26
2.1. Definición de terapia génica.	26
2.2. Herramientas de edición génica.	27
2.3. Terapia génica en la enfermedad de Parkinson.	34
2.3.1. Terapias no modificantes de la enfermedad de Parkinson.	34
2.3.2. Terapias modificadoras de la enfermedad de Parkinson.	38
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	41
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	41
HIPOTESIS.	42
JUSTIFICACIÓN.	42
OBJETIVOS.	43

□ Objetivo General.	43
□ Objetivos Particulares.	43
MATERIALES Y MÉTODOS.	44
RESULTADOS.	56
1. Identificación la secuencia guía que induzca el nivel de transcripción más alto del gen de la tirosina hidroxilasa (Th) con el sistema SAM (CRISPR-dCas9).	56
2. Determinación los niveles de expresión de Th y liberación de dopamina en la línea celular C6 como prueba de concepto con la th sgRNA y el sistema SAM.	57
3. Determinación los niveles de expresión de Th y liberación de dopamina en un cultivo de astrocitos primario de rata que expresen el sistema SAM y la th sgRNA (AST TH).	59
4. Determinación del efecto motor del trasplante de AST TH en el estriado en un modelo hemiparkinsoniano con 6-OHDA en rata.	61
5. Determinación la expresión de Th y el contenido de dopamina en el estriado de las ratas trasplantadas evaluadas en la conducta motora.	64
6. Análisis de la distribución de los AST TH trasplantados en el estriado de ratas hemiparkinsonianas con 6-OHDA.	68
	69
DISCUSIÓN.	70
CONCLUSIÓN.	75
PERSPECTIVAS.	75
BIBLIOGRAFÍA.	76

RESUMEN.

Introducción: La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente. La muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, provoca una disfunción de los circuitos de los ganglios basales, lo que afecta el control motor. Se han utilizado diferentes estrategias de terapia génica como tratamientos experimentales para la EP. CRISPR-Cas es una herramienta exitosa de edición de genes que puede modificar la transcripción de genes y puede usarse para activar la expresión de genes en regiones o células específicas del cerebro. Como prueba de concepto para el tratamiento de la EP, utilizamos Sinergismo de activación múltiple de genes (SAM), un sistema de activación de genes CRISPR, para producir dopamina (DA) en astrocitos en el cuerpo estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA. Una línea celular de astrocitos se modificó para sintetizar tirosina hidroxilasa (TH), la única enzima de la que carecen estas células para producir DA, y se probó por medio de un trasplante en un modelo de rata de la EP.

Metodología: Se probaron diferentes secuencias guías de RNA (sgRNA) candidatas dentro de la región del promotor de *th* de rata, y se determinó la expresión del gen *th* endógeno y la presencia de la expresión de la proteína Th en la línea de células gliales C6 mediante RT-PCR, Western blot y ensayos de inmunofluorescencia. Empleando pseudo-lentivirus, el complejo SAM y el sgRNA se transfirieron a cultivos línea celular de astrocitos de rata, se determinó la expresión génica y la síntesis de proteína Th; asimismo, se determinó la liberación de DA al medio de cultivo. Luego, los astrocitos modificados (que producen DA) se inyectaron en el cuerpo estriado de ratas hemiparkinsonianas lesionadas con 6-OHDA. El comportamiento motor se evaluó mediante una prueba de cilindro, la prueba de rotación inducida por amfetamina y la prueba de la viga inclinada.

Resultados: La expresión de Th en células gliales produce liberación de DA al medio de cultivo (11.78 ± 6.358 nmol/ μ g de proteína). Además, también observamos una mejora del comportamiento motor en las ratas lesionadas con 6-OHDA que recibieron astrocitos Th en comparación con las ratas lesionadas que recibieron astrocitos que no produjeron DA. Por otro lado, no hubo diferencias entre el grupo implantado con astrocitos productores de Th frente al grupo *sham* (no lesionado) en las pruebas de comportamiento motor.

Conclusión: La activación endógena de *th* por el sistema SAM puede producir una mejora motora en el modelo de rata 6-OHDA que demostró los beneficios del uso terapéutico de CRISPR en enfermedades neurodegenerativas de etiología no genética.

ABSTRACT.

Introduction: Parkinson`s disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disease. The death of dopaminergic neurons of the substantia nigra, causes a dysfunction of the basal ganglia circuits, which affects motor control. Different gene therapy strategies have been used as experimental treatments for PD. CRISPR-Cas is a successful gene-editing tool that can modify gene transcription and can be used to activate gene expression in specific brain regions or cells. As a proof of concept for treating PD, we used Synergism activation multiple (SAM), a CRISPR gene activation system, to produce Dopamine (DA) in astrocytes on the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. Astrocytes were modified to synthesize tyrosine hydroxylase (TH), the only enzyme these cells lack to produce DA, and evaluated in a murine PD model.

Methodology: Different candidate sgRNAs within the rat *th* promotor region were tested, and the expression of the endogenous *th* gene and the presence of the TH protein expression was determined in the C6 glial cell line by RT-PCR, Western blot, and immunofluorescence assays. Employing pseudo-lentivirus, the SAM complex, and the sgRNA were transferred into primary cultures of rat astrocytes, and gene expression, and TH protein synthesis were determined; furthermore, DA release into the culture medium was determined. Then, the modified astrocytes (producing DA) were injected into the striatum of 6-OHDA hemiparkinsonian rats. Motor behavior was evaluated by the cylinder test, amphetamine-induced rotation, and the inclined beam test.

Results: The expression of TH in glial cells produces DA release into the culture medium (11.78 ± 6.358 nmol/ μ g protein). Moreover, we observed motor behavior improvement in the 6-OHDA lesioned rats that received TH-astrocytes compared to lesioned rats receiving astrocytes that did not produce DA. On the other hand, there were no differences between the group implanted with TH-producing astrocytes compared to the *sham* group (non-lesioned) in the motor behavior tests.

Conclusion: Endogenous *th* activation by the SAM system can produce motor improvement in the 6-OHDA rat model that demonstrated the benefits of the therapeutic use of CRISPR on neurodegenerative diseases of non-genetic etiology.

INTRODUCCIÓN.

1. ENFERMEDAD DE PARKINSON.

1.1. Concepto.

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo crónico progresivo que se caracteriza por una disfunción motora que incluye los síntomas de bradicinesia, temblor en reposo y dificultad al iniciar y terminar los movimientos (Hayes, 2019; Khan et al., 2019). Originalmente fue descrita en 1817 por James Parkinson en un ensayo donde describía pacientes que presentaban estos síntomas (Hayes, 2019).

El término “*parkinsonismo*” implica al síndrome clínico que incluye bradicinesia, rigidez, temblor en reposo, marcha lenta con arrastre de los pies y pérdida del equilibrio. La causa más común de parkinsonismo es la enfermedad de Parkinson, pero existen otras como el consumo de fármacos, toxinas y enfermedades como la atrofia múltiple sistémica (MSA) que producen un cuadro clínico de parkinsonismo (Reich & Savitt, 2019).

1.2. Variantes de la enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson idiopática presenta una etiología compleja producida por múltiples posibles causas, teniendo un componente genético y de agentes ambientales, pero no uno definido como causa única de la enfermedad. A nivel molecular, la enfermedad de Parkinson presenta α -sinucleína mal plegada en agregados, disfunción mitocondrial, impedimento de sistemas de eliminación de proteínas, neuroinflamación y estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas (Jankovic & Tan, 2020).

El término de Parkinson atípico es utilizado para describir un grupo de patologías neurodegenerativas con sintomatología parecida a la enfermedad de Parkinson; como lo son la atrofia sistémica múltiple, la parálisis supranuclear progresiva y la degeneración corticobasal (Bhatia & Stamelou, 2017).

1.3. Epidemiología.

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente en el mundo; alrededor de 6 millones de personas la padecen, y esta cifra va en aumento al incrementar el número de adultos mayores en la población. La incidencia de EP va en un rango de 5 a 35 por cada 100 000 habitantes, siendo hasta 10 veces más la incidencia entre la sexta y novena década de la vida (Simon et al., 2020).

En nuestro país la incidencia anual en 2014 fue de 8.2 pacientes, en 2015 de 10.4, en 2016 de 11.4, en 2017 de 12.7 y en 2018 de 10.8 por cada 100 000 habitantes. Se ha determinado un incremento exponencial en la incidencia en México después de los 60 años, llegando a valores de 65.9 por 100 000 habitantes en mayores de 65 años. Estimaciones calculan que estos valores aumenten a 14.9 por 100 000 habitantes en 2023 en la población en general (Martínez-Ramírez et al., 2020).

Al continuar incrementando la población mayor de 60 años, se espera que en las siguientes dos décadas incremente de manera drástica la prevalencia de pacientes con EP; esto se verá acompañado con un incremento significativo de la carga económica y social (Simon et al., 2020).

1.4. Etiopatogenia de la enfermedad de Parkinson.

Las características neuropatológicas de la EP son la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra *pars compacta*, junto con los agregados de α -sinucleína intraneuronales llamados cuerpos de Lewy. Durante mucho tiempo se ha considerado, que cerca del 70% de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra deben haber muerto, para que aparezcan los síntomas clínicos característicos de la EP (Fearnley & Lees, 1991). Las posibles afectaciones que causan la muerte de las neuronas dopaminérgicas, se describen a continuación:

1.4.1. Mutaciones en genes relacionados con EP.

La genética de la EP es compleja, existen modificaciones en la expresión de diversos genes que contribuyen al desarrollo de la patología, y pueden interactuar con otros factores genéticos y ambientales para aumentar la probabilidad de desarrollar la enfermedad. Los estudios más recientes de asociación de genoma ampliado han identificado más de 70 sitios que pueden afectar el riesgo de EP (Nalls et al., 2019). La mayoría de estos genes están relacionados con los sistemas de autofagia-lisosoma y con la inmunidad; las cuales son necesarias para poder eliminar agregados proteicos como el caso de la α -sinucleína.

Entre los genes mutados encontrados en mayor frecuencia, se encuentra el gen *SNCA* (α -sinucleína), el cual fue de los primeros genes asociados a la EP, la mutación de este gen se asocia a los agregados de α -sinucleína mal plegados; se considera una mutación de alta penetrancia (autosómica dominante). Los pacientes que presentan esta mutación tienen un inicio temprano de los síntomas de la EP entre los 40 y 50 años, con síntomas motores típicos de Parkinson; también muestran una rápida progresión de la enfermedad (Polymeropoulos et al., 1997).

Las mutaciones en el gen *LRRK2* (cinasa 2 de los repetidos ricos en leucina) son la principal causa de enfermedad de Parkinson familiar. Estudios han identificado hasta 50 posibles mutaciones en este gen que se asocian a formas familiares e idiopáticas de EP. Esta mutación presenta baja penetrancia en los individuos. Pacientes con mutaciones en este gen, presentan un cuadro clínico típico de EP, incluyendo sintomatología no motora, presencia de cuerpos de Lewy y degeneración de neuronas dopaminérgicas (Simón-Sánchez et al., 2009).

El gen *GBA* (glucocerebrosidasa) codifica la proteína lisosomal que degrada a la glucocerebrosidasa; mutaciones del gen *GBA* causan la enfermedad de Gaucher. Pacientes con esta enfermedad desarrollan síntomas parkinsonianos, y tienen hasta diez veces más riesgo de desarrollar EP (Goker-Alpan et al., 2004).

La variedad de EP familiar que inicia a edades muy tempranas (alrededor de los 30 años), que muestra síntomas típicos y/o atípicos, se conoce como EP juvenil. Esta variante se relaciona con mutaciones en el gen *Parkina*, que presenta una herencia autosómica recesiva. El gen *Parkina* codifica a la ligasa E3 ubiquitina, la cual es un regulador clave para la degradación proteica en el proteasoma (Zhou et al., 2016). Los pacientes con esta mutación tienen síntomas motores típicos, una progresión lenta de la enfermedad, distonía prominente, pérdida de neuronas dopaminérgicas, pero sin síntomas no motores y ausencia de los cuerpos de Lewy (Van De Warrenburg et al., 2001).

Las mutaciones en el gen *PINK1* (cinasa 1 inducida por PTEN) y en el gen *DJ-1* (*Daisuke Junko-1*) causan enfermedades similares a las mutaciones del gen *Parkina*, con síntomas motores típicos que aparecen muy temprano, de progresión lenta y ausencia de síntomas no motores. Las proteínas Parkina, PINK1 y DJ-1 pueden ejercer funciones neuroprotectoras en condiciones fisiológicas, y su pérdida parece desencadenar degeneración de neuronas dopaminérgicas (Bonifati et al., 2003; Valente et al., 2004).

1.4.2. Disfunción mitocondrial.

A través de la evaluación con diferentes toxinas (rotenona, piridabeno, MPTP y fenpiroximato) que inducen la inhibición del complejo I mitocondrial en modelos de roedores, se ha podido observar neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas; lo que sugiere un papel en la enfermedad de Parkinson (Subramaniam & Chesselet, 2013). Alterar la cadena de transporte de electrones, causa un incremento en la permeabilidad mitocondrial, que a su vez aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la actividad de la sintasa de óxido nítrico en la mitocondria (Bose & Beal, 2016).

Genes implicados en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson familiar (*Parkina*, *SNCA*, *DJ-1*, *UCHL-1*, *LRRK2*, *PINK1*, *NURR1*, *VPS35*, y *HtrA2*) causan directa o indirectamente disfunción mitocondrial. Por ejemplo, mutaciones en el gen de la *Parkina* causa una forma de Parkinson juvenil. *Parkina* codifica a la ubiquitina proteasa ligasa (E3). En modelos de animales *knockout* para el gen *Parkina*, se ha observado una disminución de proteínas encargadas de regular a los complejos I y IV mitocondriales; produciendo un decremento de la actividad mitocondrial hasta dañar la integridad de la mitocondria (Bose & Beal, 2016).

Modelos en cultivos celulares de corteza cerebelar de rata con mutación puntual del gen *PINK1* (codifica a la proteína PARK6) muestran disminución de la actividad mitocondrial, disminución de la síntesis de ATP y agregados de α -sinucleína (Liu et al., 2009). La α -sinucleína puede causar disrupción proteica mitocondrial en la EP. La α -sinucleína tiene una secuencia dominio terminal que la dirige a la mitocondria (MTS), esta secuencia MTS se une con la translocasa del exterior de la membrana mitocondrial (TOM) permitiendo la entrada de la α -sinucleína al espacio intermembrana de la mitocondria. En este espacio intermembrana, el dominio MTS de la α -

sinucleína se une con la translocasa de la membrana interna mitocondrial (TIM), llevando a la α -sinucleína a la matriz mitocondrial. Se ha reportado la asociación entre las concentraciones crecientes de α -sinucleína con un aumento proporcional de las ROS (Di Maio et al., 2016).

1.4.3. α -sinucleína.

La α -sinucleína es una proteína compuesta de 140 aminoácidos, codificada por el gen *SNCA*. La α -sinucleína tiene tres regiones; una región positivamente cargada en el extremo N terminal, una región hidrofóbica central y una región altamente ácida en el extremo C terminal. Normalmente, se encuentran dos formas de esta proteína en el citoplasma, en forma de monómeros o tetrámeros. Mutaciones en la α -sinucleína pueden disminuir la concentración de los tetrámeros de α -sinucleína, rompiendo el equilibrio de las dos formas; los monómeros de la α -sinucleína son la forma soluble, los cuales tienen la capacidad de romper membranas y causar la muerte celular (Danzer et al., 2007). La α -sinucleína tiene un papel importante en la formación y el tráfico de vesículas para el transporte y liberación de neurotransmisores en neuronas (Diao et al., 2013).

Numerosos estudios *in vitro*, modelos en animales y estudios *post mortem* de pacientes con la enfermedad de Parkinson han demostrado el papel importante de los agregados de α -sinucleína (cuerpos de Lewy) como signo patognomónico de la enfermedad (Farrer et al., 2004).

La disfunción del sistema lisosomal de degradación de proteínas también puede estar implicada en la acumulación de α -sinucleína y la progresión en la enfermedad de Parkinson. Se ha demostrado que el incremento de la concentración de α -sinucleína a nivel intracelular en neuronas se asocia con un aumento de la proteína de membrana asociada a lisosomas tipo 2A (LAMP-2A) y a la proteína lisosomal afín al choque térmico (hsc70), componentes clave para mediar la autofagia. En diversos estudios de inmunofluorescencia en neuronas dopaminérgicas se ha visto la colocación de la α -sinucleína con la proteína LAMP-2A (Mak et al., 2010).

Mutaciones genéticas relacionadas con la aparición de agregados de α -sinucleína (mutación en el gen *GBA1*, mutaciones puntuales en A53T, A30P y E46K del gen *SNCA*) también se relaciona con alteraciones del sistema de degradación de proteínas por lisosomas (Rocha et al., 2018); en un modelo de ratón transgénico con la mutación puntual en A53T se observa agregados de α -sinucleína en astrocitos induciendo neurodegeneración y alteraciones motrices tempranas con una rápida progresión a parálisis (Gu et al., 2010).

Por otro lado, genes que también se han asociado con la enfermedad de Parkinson como *DNAJC6* (auxilina), *SYNJ1* (sinaptojanina 1), *SH3GL2* (endofilina A1), *LRRK2*, *PRKN*, y *VPS35* se relacionan con alteraciones en la endocitosis vesicular (SVE) lo que contribuye a la formación de agregados de α -sinucleína (Nguyen et al., 2019).

1.4.4. Vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas.

Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra *pars compacta* (SNpc) normalmente presentan deficiencias en el sistema de endocitosis vesicular (SVE) y de la formación de lisosomas (sistema ubiquitina proteasoma). Como se ha mencionado anteriormente múltiples alteraciones encontradas en estas neuronas e incluso en astrocitos, se relacionan con la falla de estos sistemas. Sin embargo, no es necesaria la presencia de estas mutaciones en las neuronas dopaminérgicas, para la aparición de la enfermedad. Una vulnerabilidad intrínseca de las neuronas dopaminérgicas, es la acumulación de dopamina (DA) en el interior de la neurona. La DA se encuentra guardada en vesículas previo a su liberación dependiente de calcio en las terminales axónicas, o incluso en el soma neuronal; las concentraciones citoplasmáticas elevadas de α -sinucleína interfieren con las vesículas de DA (interacción con sinaptojanina 1, proteína relacionada con la eliminación de las vesículas; causando disfunción de la vesícula), permitiendo que la DA se incremente en el citoplasma.

Además, las neuronas dopaminérgicas presentan normalmente un metabolismo activo constante, debido a la necesidad de mantener una arborización dendrítica amplia y la producción constante de DA para su liberación; por lo que las neuronas dopaminérgicas producen grandes concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS), radicales de oxígeno y peróxido, sometiendo a las neuronas a una alta tasa de estrés oxidativo constante (Dias et al., 2013). La DA citoplasmática puede interactuar con las ROS llevando a la formación de quinonas de DA (Jana et al., 2011). También, la DA interacciona con la monoamina oxidasa (MAO) en la membrana exterior de la mitocondria produciendo peróxido de hidrogeno; lo que incrementa las ROS y en general, el estrés oxidativo de la neurona (fig. 1) (Jana et al., 2011; Meiser et al., 2013).

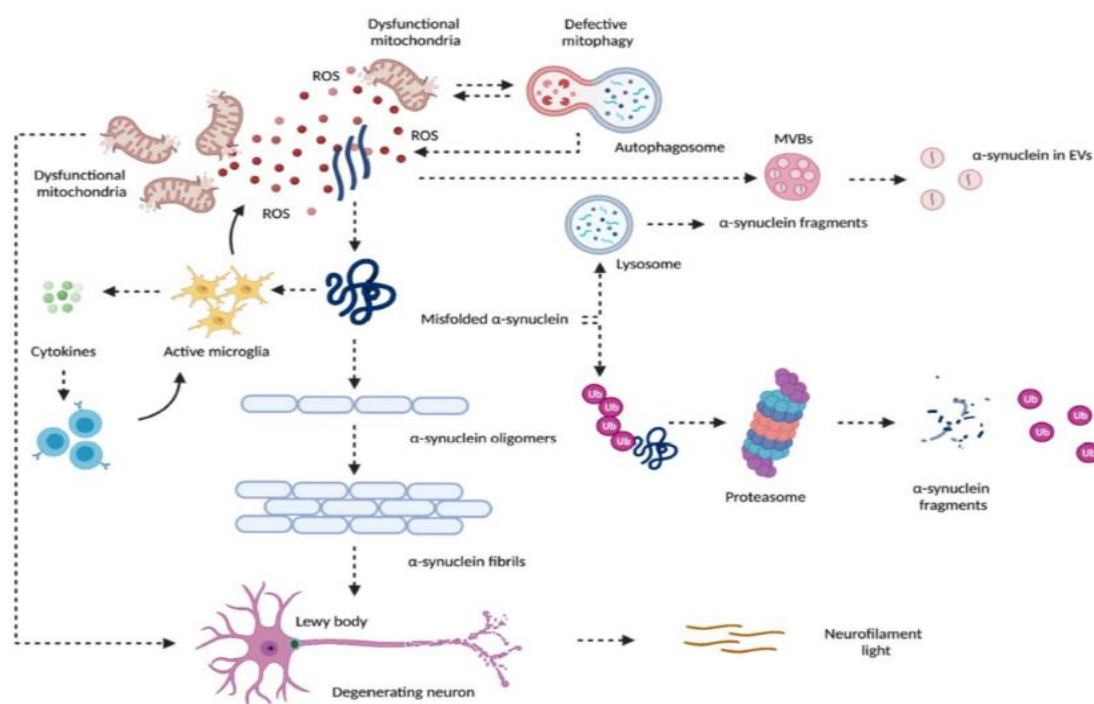


Figura. 1 Representación esquemática de las alteraciones que causan la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Tomado de (Picca et al., 2021).

1.5. Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson.

1.5.1. Ganglios basales.

Los síntomas motores típicos de la enfermedad de Parkinson (EP) y algunas de sus características cognitivas y conductuales son causados por la pérdida de neuronas dopaminérgicas y sus conexiones con el estriado, la pérdida permanente de la innervación dopaminérgica detona cambios estructurales y por ende de los circuitos neuronales (Surmeier, 2018).

El modelo clásico del control motriz incluye al sistema de los ganglios basales, de los cuales forma parte el estriado. En el sistema de los ganglios basales, existen las neuronas espinosas medianas (MSN) estriatales de dos poblaciones distintas; en la vía directa y en la indirecta. Las MSN de la vía directa (dMSN) expresan receptores de dopamina D1 y D5, acoplados a una proteína Gs y proyectan directamente al globo pálido interno y a la sustancia *nigra pars reticulata* (GPi/SNr), considerados los núcleos de salida de los ganglios basales. Por lo tanto, se cree que la activación de la vía directa reduce la salida de los ganglios basales mientras inhabilita la inhibición talámica, estimulando el movimiento. Por el contrario, las MSN de la vía indirecta (iMSN) expresan receptores de dopamina D2, D3 y D4 acoplados a una proteína Gi e indirectamente proyectan a la salida de los ganglios basales a través del globo pálido externo y el núcleo subtalámico (GPe y STN). El tálamo se inhibe y el movimiento se suprime cuando se activa esta vía, aumentando la salida de los ganglios basales (McGregor & Nelson, 2019).

La DA modula a estas dos poblaciones de manera opuesta, provocando un aumento en la actividad de dMSN y una disminución en la actividad de iMSN. En general, este balance de las dos vías tiene como resultado permitir el movimiento al inhibir la innervación GABAérgica del GPi hacia el tálamo. En la enfermedad de Parkinson, la ausencia de dopamina en el estriado causa una disminución significativa de la actividad de la vía directa; causando un desbalance en la actividad de los ganglios basales, que origina un aumento de la actividad de GPi/SNr dando una inhibición del tálamo, disminuyendo su actividad glutamatergica hacia la corteza; resultando en una disminución del movimiento (fig. 2) (McGregor & Nelson, 2019).

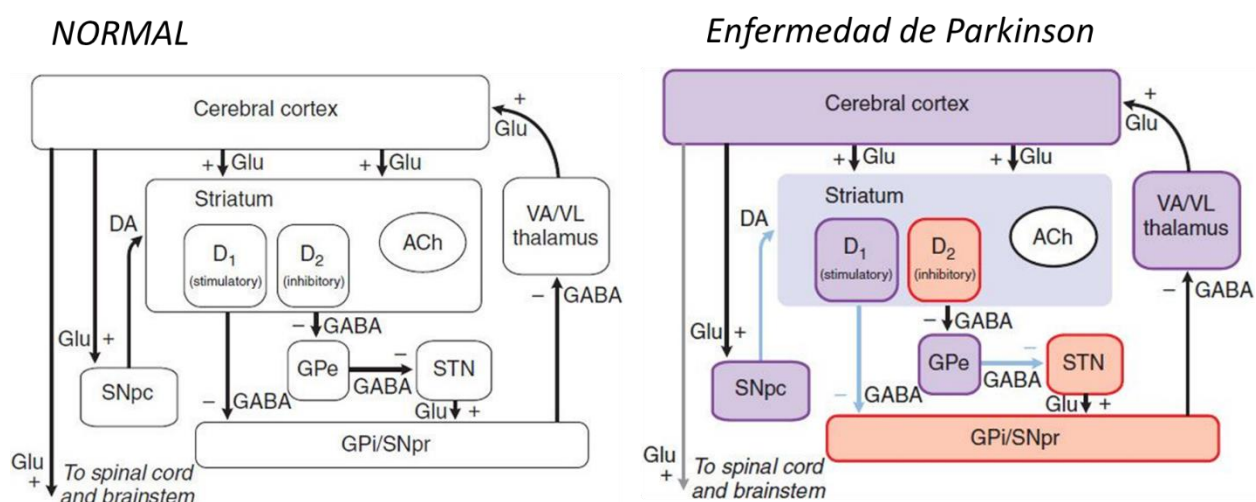


Figura 2. Alteraciones de los ganglios basales en la enfermedad de Parkinson. En morado se presentan los núcleos con menor actividad y en rojo con actividad aumentada.

1.5.2. Papel de los astrocitos en la enfermedad de Parkinson.

Los astrocitos son necesarios para preservar a las neuronas, mantienen la estructura y el metabolismo del cerebro y controlan el flujo sanguíneo, el transporte de agua y la transmisión sináptica (Sofroniew & Vinters, 2010). En particular, el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) es crucial para el crecimiento y la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, es una

de las muchas sustancias químicas neurotróficas que son producidas por la glía (Leu-Fen. et al., 1993). La barrera hematoencefálica, que se ha demostrado que está comprometida en pacientes con EP, también está influenciada por los astrocitos (Gray & Woulfe, 2015). Además, los astrocitos rodean el lugar donde la microglía inicia una respuesta inmunitaria, formando una barrera para detener la propagación de señales dañinas hacia el tejido sano cercano (Sofroniew & Vinters, 2010).

Se han encontrado mutaciones en 17 genes diferentes relacionadas con el desarrollo de la EP. Recientemente, al comparar el transcriptoma de varios subtipos de células cerebrales humanas y de ratón, muchos de los genes asociados con mutaciones monogénicas de EP, se presentan mutados en astrocitos y neuronas simultáneamente, incluso superiores en astrocitos (Zhang et al., 2016).

Se ha observado inclusiones de α -sinucleína en astrocitos, teorizando que los astrocitos pueden endocitar la α -sinucleína que proviene de las neuronas. Se ha propuesto, que lo hacen por medio del receptor TLR4. Por otra parte, se ha descrito que la α -sinucleína endocitada se localiza en el lisosoma, indicando que los astrocitos pueden estar involucrados en su eliminación y descomposición, con el fin de preservar un entorno favorable para las neuronas (Fellner et al., 2013).

En cultivos primarios de astrocitos se ha demostrado que altas cantidades de α -sinucleína extracelular provocan una respuesta inflamatoria dependiente de TLR4. Este efecto parece depender de la concentración, lo que puede ser crucial para comprender cómo se desarrolla la enfermedad de Parkinson. La α -sinucleína puede ser endocitada y degradada por los astrocitos cuando es producida por las neuronas, pero es posible que, si la concentración de α -sinucleína incrementan en el espacio extracelular por encima de un umbral determinado, desencadene una respuesta inflamatoria y comience a surgir la enfermedad (Fellner et al., 2013; Klegeris et al., 2006). Al mismo tiempo, es posible que cuando la α -sinucleína extracelular está presente en altas

concentraciones, los astrocitos endociten cantidades cada vez mayores, lo que provoca la agregación y la creación de inclusiones de α -sinucleína. Esta acumulación excesiva lleva al astrocito a una desregulación de la recaptura de glutamato y de la integridad de la barrera hematoencefálica (por el canal de acuaporina 4) (Gu et al., 2010).

1.6. Cuadro clínico de la enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por síntomas cardinales como la bradicinesia (lentitud del movimiento con detención transitoria) acompañada de golpeteo frecuente con los dedos de manos y pies. Otras manifestaciones de la bradicinesia se pueden observar durante el examen clínico, que incluyen la micrografía, (voz hipofónica / suave), fascies similar a una máscara causada por la disminución del movimiento facial espontáneo y una velocidad de parpadeo más lenta.

Los temblores en reposo de la enfermedad de Parkinson normalmente son lentos (4-6 Hz), de inicio son asimétricos y frecuentemente comienzan en la extremidad superior distal, sin embargo, a veces pueden comenzar en la extremidad inferior.

Las primeras modificaciones en la forma de andar se caracterizan por un aleteo de brazos acortado asimétricamente, pero a medida que avanzan los cambios, la longitud de la zancada y la altura del paso disminuyen, lo que le da a la forma de andar su característica. Es posible que los pacientes ya no puedan girar (o girar el cuerpo en su mismo eje), por lo que deben dar muchos pasos para dar una vuelta completa (Waller et al., 2021).

La enfermedad de Parkinson tiene un periodo prodrómico en donde se presentan síntomas no motores como lo son datos de ansiedad y/o depresión; trastornos del sueño REM, disminución del olfato (anosmia), constipación, disfunción urinaria, hipotensión ortostática y excesiva somnolencia

durante el día. Estos síntomas ocurren años antes de que el paciente presente síntomas motores (Armstrong & Okun, 2020; Poewe et al., 2017).

1.7. Tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Existen una gran variedad de tratamientos farmacológicos para la EP y su sintomatología tanto motora como no motora (tabla 1); pero el fármaco de elección para la sintomatología motora es la levodopa, como tratamiento basado en la sustitución de la dopamina en el estriado (Armstrong & Okun, 2020). Otros fármacos como los inhibidores de la monoamino oxidasa B (MAO-B) o la catecol-O-metiltransferasa (COMT), permiten en etapas tempranas de la enfermedad controlar la sintomatología motora, evitando la degradación de la DA; pero conforme progresa la enfermedad y continúan muriendo las neuronas dopaminérgicas, su efecto terapéutico es insuficiente, por lo que los pacientes terminaran dependiendo de la levodopa para controlar los síntomas motores (Poewe et al., 2017; You et al., 2018).

Sintomas	Neurotransmisor involucrado en la farmacoterapia.				
	<i>Dopamina</i>	<i>Seotonina</i>	<i>Norepinefrina</i>	<i>Acetilcolina</i>	<i>Otros</i>
<i>Sintomas motores</i>	Levodopa con carbidopa, agonistas dopaminérgicos (pramipexol), inhibidores de la MAO B (rasagilina) inhibidores de la COMT (entacapone).			Anticolinérgicos (fesoterodina, darifenacina), Inhibidores de la colinesterasa (rivastigmina).	Amantadina.
<i>Alteraciones Cognitivas</i>	Inhibidores de la MAO B.			Inhibidores de la colinesterasa.	
<i>Psicosis</i>	Quetiapina, Clozapina.	Primavanserina.		Inhibidores de la colinesterasa.	
<i>Depresión Ansiedad</i>	Agonistas dopaminérgicos.	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina, de serotonina y norepinefrina, antidepresivos tricíclicos.		Antidepresivos tricíclicos (imipramina, amitriptilina).	

Tabla 1 Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Parkinson.

La levodopa es el precursor de la síntesis de DA, esta conversión se lleva a cabo por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC); la ventaja del uso de levodopa en comparación con la DA, es que la levodopa puede atravesar la barrera hematoencefálica y la DA no, por lo que su administración de manera sistémica es posible (Birkmayer & Hornykiewicz, 1961).

Un mecanismo potencialmente significativo en el efecto de la levodopa es que las neuronas no dopaminérgicas, en particular las neuronas serotoninérgicas, expresan AADC y son, hasta cierto punto, capaces de convertir la levodopa exógena y absorber, almacenar y liberar dopamina (Carta et al., 2007).

A medida que la EP avanza y un mayor número de neuronas dopaminérgicas mueren, empiezan a aparecer trastornos motores asociados a la administración continua de levodopa. Esto sucede debido a que el patrón de disparo tónico normal en la transmisión de dopamina nigroestriatal cambia a un patrón fásico, por la pérdida progresiva de las concentraciones de dopamina estriatal causada por la degeneración de las terminales dopaminérgicas y la dependencia de la dosificación intermitente con levodopa exógena. Este cambio altera los receptores postsinápticos con cambios posteriores en genes, proteínas y neurotransmisores, lo que lleva a cambios en los circuitos motores de los ganglios basales (Vijayakumar & Jankovic, 2016).

Las discinesias son movimientos involuntarios, impredecibles y de contorsión de la cara, los brazos, las piernas o el tronco, con frecuencia tienen una cualidad fluida, parecida a la de un baile, pero también pueden provocar sacudidas rápidas o espasmos musculares lentos y prolongados; estos normalmente suceden poco tiempo después de la administración de la levodopa (Poewe et al., 2017; You et al., 2018).

Otro problema del uso de levodopa de manera continua, son efectos adversos como la aparición de trastornos del control de impulsos, que se definen como una falla para controlar o resistirse a impulsos, deseos o tentación a realizar acciones que pueden ser dañinas a uno mismo o a otros (Guze, 1995; You et al., 2018). En estos trastornos se encuentran desde compras compulsivas, impulso para realizar apuestas, trastornos de alimentación y sexuales; estudios han demostrado que estos comportamientos aumentan cuando los pacientes están en etapas avanzadas de la EP y con el uso de levodopa (Voon et al., 2017). Aunque parte de los síntomas prodrómicos de la EP se encuentra los trastornos del sueño REM, también se ha visto un aumento de estos trastornos en los pacientes con tratamiento de levodopa (Fantini et al., 2015).

1.8. Otros tratamientos para la enfermedad de Parkinson.

1.8.1. Estimulación cerebral profunda (DBS).

Una terapia complementaria llamada estimulación cerebral profunda (DBS) puede ayudar a disminuir algunos de los síntomas motores producidos por la administración de levodopa en pacientes con Parkinson en etapas tardías de la enfermedad. Reduce las discinesias y las fluctuaciones motoras inducidas por levodopa en un 73% a 83%, así como el deterioro motor en un 33% a 67%. DBS emplea electrodos acoplados a un "generador de pulso implantable" que envía estimulación eléctrica a un área seleccionada del cerebro; el núcleo subtalámico (STN) es un objetivo común para DBS (Houeto et al., 2000; Kogan et al., 2019).

La DBS desincroniza las vías neuronales paralelas a lo largo de los rangos de frecuencia y controla la descarga palidal excesiva. Pero, la teoría más ampliamente aceptada es que la DBS reduce la sincronización oscilatoria anormal a bajas frecuencias (13-35 Hz), lo que reduce los síntomas de la EP. Si la DBS del núcleo subtalámico de alta frecuencia reduce los patrones de actividad

anormalmente sincronizados en la banda, que son el sello distintivo de los pacientes con EP no tratados, esto podría explicar la mejora en la función motora (Eusebio et al., 2012).

No todos los pacientes con EP son candidatos a este tratamiento; la elección del paciente adecuado para la DBS puede resultar más difícil debido a la heterogeneidad clínica de los casos específicos de EP. La elección y la familiaridad con el centro quirúrgico (otros aspectos a considerar son la habilidad quirúrgica y la especialización del neurocirujano), la prevalencia de discinesias y distonías, la probabilidad de futuras comorbilidades cognitivas o psiquiátricas y la necesidad de levodopa preoperatoria son factores que afectan la selección del paciente. Actualmente, no existen datos objetivos inequívocos que sirvan como guía para la selección precisa de pacientes en la DBS para EP, sin embargo, muchos médicos intentan personalizar la selección de criterios de DBS según las necesidades específicas de cada paciente (Kogan et al., 2019).

1.8.2. Estimulación magnética transcraneal (TMS).

La estimulación magnética transcraneal (TMS) emplea la inducción electromagnética a través de un campo magnético que cambia rápidamente para generar pequeñas corrientes eléctricas que estimulan la actividad en áreas particulares o difusas del cerebro, y puede crear cambios en la excitabilidad sináptica en la corteza cerebral; los cambios plásticos pueden ser duraderos, sobre todo en la corteza motora y/o corteza suplementaria. Estas modificaciones de la conectividad cortical neuronal pueden causar la liberación de dopamina desde los ganglios basales (Heumann et al., 2014).

La TMS se ha utilizado para tratar los efectos crónicos del uso de levodopa y el desarrollo de discinesias. En protocolos donde se usa estimulación magnética repetitiva transcraneal (rTMS) se ha observado reducción de la sintomatología discinética, en donde frecuencias mayores de 5 Hz induce mejorías en la excitabilidad de la corteza y frecuencias menores de 1 Hz pueden disminuirla (Chen et al., 1997; Pascual-Leone et al., 1994). Otra variante de la TMS es la estimulación de disparos beta, la cual aplicada sobre el área motora M1 de la corteza, ha demostrado una mejoría de la sintomatología discinética y de larga duración (Morgante et al., 2006).

En otro estudio se evaluó la sintomatología no motora de la enfermedad de Parkinson tratada con la estimulación magnética transcraneal repetitiva (rTMS) sobre el área motora M1, obteniendo mejoría en el rendimiento motor y en la cognición, aunque un efecto menor en la cognición comparado con la mejoría motora. La eficacia preliminar de la TMS sobre la depresión y la cognición, ha demostrado resultados prometedores en pacientes con la EP (Khedr et al., 2020). Aún se desconoce si los cambios en la plasticidad y la neuromodulación cortical serán permanentes después de aplicar varias sesiones de TMS en pacientes con EP, pero un estudio pequeño indicó que la TMS puede mejorar la memoria de trabajo en pacientes con EP (Q. Zhang et al., 2020).

1.9. Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson.

1.9.1. Modelos basados en neurotoxinas.

Los modelos basados en neurotoxinas son los más clásicos y utilizados para probar terapias e investigar mecanismos de la EP, ya que tiene la gran ventaja de ser más sencillos de llevar a cabo. De estos modelos los más populares son el modelo basado en 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y el de 1-metil, 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Dauer & Przedborski, 2003).

La 6-OHDA debe administrarse directamente en el parénquima cerebral ya que no puede atravesar la barrera hematoencefálica. Los sitios de inyección son en el estriado y el haz del prosencéfalo

medial (MFB). La autooxidación rápida de 6-OHDA da como resultado la creación de peróxido de hidrógeno, radicales superóxidos, quinonas y radicales hidroxilo; las neuronas dopaminérgicas son sensibles a las ROS, degenerando de forma retrógrada. Los signos y síntomas suelen ser graves y persistentes, este modelo excluye la enfermedad relacionada con cuerpos de Lewy (Blandini et al., 2007; Przedbroski et al., 1995).

La inyección de 6-OHDA se administra con mayor frecuencia de forma unilateral. Debido a que el lado contralateral se usa como control del lado dañado. Se evalúa mediante la prueba de giros con amfetamina (los animales giran hacia el lado de la lesión). Además, la lesión bilateral, es bien conocida por causar afagia, adipsia y deterioro motor bilateral (Kin et al., 2019).

Modelos de primates no humanos y ratones de la EP, han sido inducidos por toxinas como MPTP, una de las neurotoxinas más conocidas que mata a las neuronas dopaminérgicas. Este modelo surgió al observarse el efecto de la toxina en humanos, que desarrollaban sintomatología parkinsoniana severa posterior al contacto. MPTP es una molécula lipofílica que cruza rápidamente la barrera hematoencefálica. Después de la inyección sistémica, la monoamino oxidasa B en los astrocitos cambia el MPTP en MPDP+. Después de eso, se oxida a MPP+, un subproducto tóxico que las neuronas dopaminérgicas internalizan a través del transportador de dopamina. Interrumpiendo el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, el MPP+ provoca estrés oxidativo y una reducción en la síntesis de ATP, causando la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Cui et al., 2009; Javitch et al., 1985).

Aunque los ratones son sensibles al envenenamiento por MPTP, el daño producido por la toxina puede ser reversible; en comparación a los primates que presentan un daño permanente. Pero, se ha observado que mediante el desarrollo de un régimen crónico de MPTP, los ratones tratados con MPTP se emplean como un modelo que es fácil de usar, económico y altamente reproducible

(Meredith & Rademacher, 2011). La neurodegeneración rápida y temporal en el modelo de 6-OHDA es una de sus deficiencias más significativas. Sin embargo, este inconveniente podría no aplicarse al modelo de MPTP, porque la muerte de las neuronas dopaminérgicas es progresiva y, por lo tanto, los síntomas se desarrollan gradualmente (Bezard et al., 1999).

2. TERAPIA GÉNICA EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

2.1. Definición de terapia génica.

La terapia génica es el proceso de tratar una enfermedad mediante la introducción de material genético, ya sea ADN o ARN, en las células de los pacientes. Uno de los siguientes tres mecanismos subyace a la acción del material genético transferido: (i) permitir la expresión del gen transferido, (ii) prevenir la expresión de un gen objetivo o (iii) alterar un gen objetivo. Hace más de 50 años, la idea de la terapia génica se propuso por primera vez como un medio para tratar los trastornos monogénicos hereditarios (Friedmann & Roblin, 1972).

Ejemplos de tratamientos basados en terapia génica es en la atrofia muscular espinal tipo 1 (SMA1), la cual es una enfermedad monogénica (mutación del gen *SMN1*) que afecta a las motoneuronas; los pacientes presentan disminución del tono muscular y debilidad progresiva (Finkel et al., 2014). Hoy en día existen opciones de terapia génica en donde se reemplaza el gen mutado con un vector viral de un adenovirus asociado. Mendell y colaboradores realizaron la terapia en un grupo de 15 pacientes con la enfermedad, los pacientes han superado la expectativa promedio de vida y presentando mejoría motora (Mendell et al., 2017). Este es un ejemplo de una terapia génica exitosa, una simple aplicación para una modificación genética y resultados duraderos.

2.2. Herramientas de edición génica.

En la terapia génica, se han implantado una gran variedad de herramientas de edición genética, dentro de las cuales las más importantes son las nucleasas relacionadas con los dedos de zinc (ZFNs), el efector similar al activador de la transcripción (TALEN) y el sistema CRISPR-Cas.

Las ZFNs son una clase de endonucleasas que se han usado y modificado para producir rupturas de doble cadena del ADN (DSB) en sitios específicos del genoma. Detectan secuencias de ADN largas (de 12 a 40 pares de bases [pb]). Sin embargo, las nucleasas no se han utilizado mucho en la edición del genoma debido a sus pocos sitios de reconocimiento y al desafío de determinar su orientación precisa. Además, los cortes aleatorios producto de las ZFNs resultan en la reparación homóloga (HDR) o heteróloga (NHEJ) de la doble cadena de ADN, o incluso un remplazo de una secuencia completa para inactivar o activar un gen respectivamente. No obstante, se ha tratado crear terapias basadas en esta herramienta, existe una edición cruzada con los ZF para la mayoría de los sitios genómicos, ya que muchos dominios de ZF se encuentran adyacentes unos con otros, por lo que una edición específica se vuelve más complicada. Por lo tanto, es necesario examinar muchos dominios ZF para producir un par de modificaciones funcionales. Dentro de las ventajas de los ZF es ser una herramienta de terapia génica prometedora debido a su pequeño tamaño y capacidad para incorporarse a virus adeno-asociados (AAV), que son vectores prácticos y comunes para la edición de genes *in vivo* (Yin et al., 2017).

Las proteínas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALE) se encontraron en el patógeno vegetal bacteriano *Xanthomonas* y tienen dominios de unión al ADN que son repeticiones de residuos de 33 a 34 aminoácidos (Boch & Bonas, 2010). Una combinación de motivos TALE repetitivos con los RVD correctos puede unirse a una secuencia de ADN específica. TALE, a diferencia de los ZF, pueden reconocer y vincularse a sitios blanco sin interferir con ninguno de los

dominios TALE individuales (Moscou & Bogdanove, 2009). Sin embargo, la recombinación homóloga entre secuencias TALE repetidas dificulta la creación de vectores que expresan los arreglos TALE (Veres et al., 2014).

De las herramientas de edición genética, la más nueva, eficiente y prometedora es el sistema CRISPR/Cas, el cual se descubrió como un mecanismo de defensa bacteriano para proporcionar inmunidad adquirida contra la inserción del genoma de los bacteriófagos (fagos). La mayoría de los sistemas CRISPR/Cas que se utilizan para la edición de genes son sistemas de clase 2, que solo necesitan una endonucleasa de ADN, como Cas9 o Cas12a (Cpf1), para separar las cadenas del ADN de bacteriófagos o plásmidos mientras son guiados por una secuencia de ARN (sgRNA). La sgRNA y las Cas9 trabajan juntos en el sistema CRISPR/Cas9 para crear una RNAsa III que puede editar el ADN de doble cadena (Jinek et al., 2012).

El complejo Cas9 se une al sitio objetivo, que es complementario a la región espaciadora del sgRNA y tiene un motivo adyacente al protoespaciador (PAM). En general, diferentes secuencias de PAM son reconocidas por varias proteínas Cas. Por ejemplo, la proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) utilizada con frecuencia puede detectar una secuencia NGG en el extremo 3' de la región del protoespaciador. Los dominios de endonucleasas similares a HNH y RuvC de Cas9 cortan las cadenas de ADN complementario y no complementario, respectivamente, después de

unirse a una ubicación objetivo. El punto de escisión se encuentra 3 pb corriente arriba de la secuencia PAM y da como resultado dos extremos romos de ADN (fig.3) (Zetsche et al., 2015).

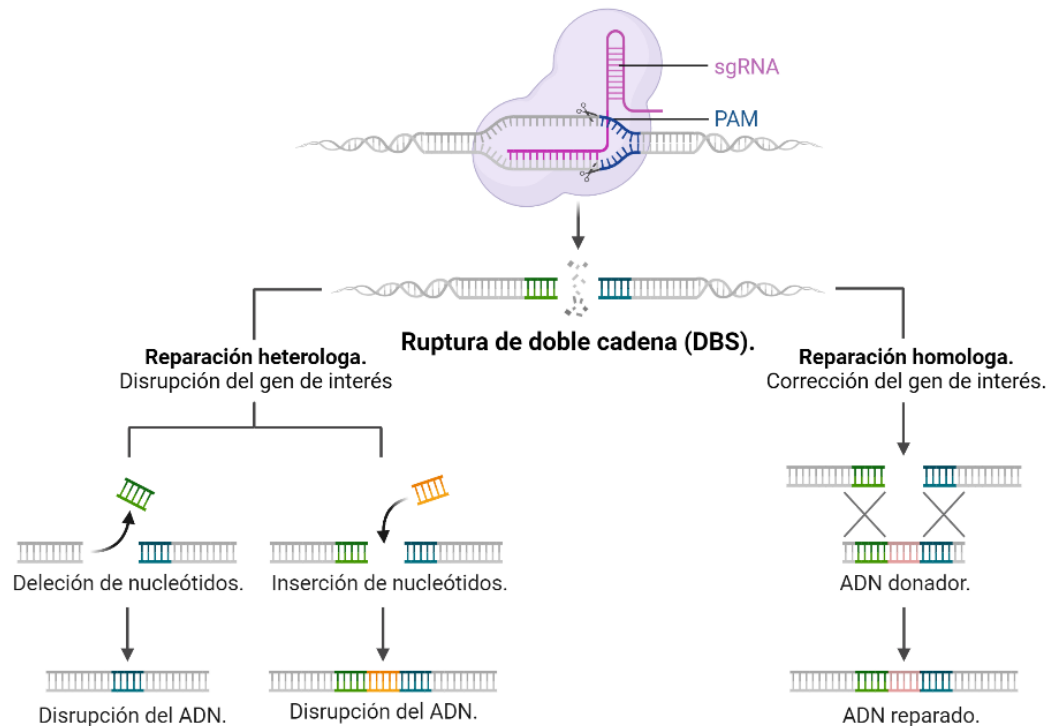


Figura 3. Sistema CRISPR/Cas9. Componentes del sistema CRISPR/Cas9 y los dos tipos de reparaciones de la doble cadena de ADN para la inactivación o activación de un gen específico.

En general, la región distal de PAM puede tolerar los desajustes de la unión entre el área del espaciador de sgRNA y el sitio proximal al PAM (no es necesario que la sgRNA hibride perfectamente para iniciar el primer cambio conformacional de las Cas). El desarrollo de un mejor sistema CRISPR/Cas9 con una excelente especificidad de edición, redujo considerablemente sus efectos de sitios equivocados de reconocimiento. Debido al hecho de que las proteínas Cas9 tienen dos dominios de endonucleasa, es posible alterar uno de estos dominios y producir una forma de nickasa de Cas9 (nCas9). Cuando nCas9 se coexpresa con un par de sgRNA que se dirigen a las hebras de ADN opuestas de un sitio objetivo, se puede utilizar para eliminar genes (Ran et al., 2013).

2.2.1. CRISPR de activación (CRISPRa).

Los primeros estudios para diseñar la proteína Cas9 identificaron numerosos residuos de catálisis de ADN que, cuando se alteran, producen variantes de la proteína que aún son capaces de unirse al ADN, pero carecen de actividad de nucleasa. Estas variantes de Cas9 (dCas9) sin actividad de nucleasa, inactivadas o muertas pueden fusionarse posteriormente con dominios efectores transactivadores, lo que permite a los usuarios guiar con precisión una determinada actividad funcional a cualquier sitio arbitrario del genoma. Varios grupos de investigación han desarrollado recientemente formas que brindan a la dCas9 la capacidad de inducir la expresión génica, con dCas9-VP64 sirviendo como el primer activador y el estándar contra el cual, se miden de forma rutinaria los activadores de segunda generación posteriores (Chavez et al., 2016).

Los sistemas de CRISPRa pueden activar la transcripción directamente de un gen, afectar la conformación de la cromatina permitiendo la lectura y pueden reclutar otros activadores transcripcionales y/o epigenéticos en el sitio objetivo. Hay al menos tres tipos de sistemas CRISPRa, estos pueden dividirse en: dependiente de una proteína transactivadora fusionada a la dCas9, a una proteína acoplada a la sgRNA o un sistema CRISPRa combinado en donde la dCas9 y la sgRNA traen unidas o fusionadas proteínas transactivadoras.

El primer sistema de activación de genes fue el dCas9-VP64, en el cual la Cas9 inactivada se encuentra fusionada con la proteína VP64, la cual son cuatro copias de la proteína viral 16 del virus *Herpes simplex*. Con este sistema también se pudo lograr la múltiple activación de genes por primera vez con un sistema basado en CRISPR, demostrando una activación específica (Maeder et al., 2013; Perez-Pinera et al., 2013).

El dominio de transactivación VP64 aumenta la acetilación de histonas y atrae el componente p300 del complejo activador. En un estudio, en cultivo primario de fibroblastos de ratón se transformó directamente en células neuronales inducidas funcionales, mediante la activación de genes endógenos de los factores de transcripción neuronal de ratón *Brn2*, *Ascl1* y *Myt1l* (factores BAM). En ese estudio, también se determinó que una elevación inmediata y continua de la expresión génica endógena de estos marcadores, iba acompañada de un aumento de los marcadores epigenéticamente activos H3K27ac y H3K4me3 (Balboa et al., 2015; Black et al., 2016).

Los genes pueden activarse alterando directamente los estados epigenéticos en la región potenciadora utilizando el dCas9 fusionado con un modificador epigenético. A diferencia de los sistemas de proteína de fusión del factor de transcripción activador de dCas9, la proteína de fusión dCas9-modificador epigenético, modifica directamente las marcas epigenéticas específicas en ubicaciones específicas, en contraste con los dominios activadores utilizados en factores transcripcionales diseñados anteriormente como VP64, que actúan como andamios para reclutar múltiples componentes del complejo de preiniciación, incluidos factores transcripcionales y epigenéticos.

Se puede realizar la activación de genes en células humanas por medio de la fusión de la dCas9 con la proteína acetiltransferasa p300 (dCas9-p300). La p300 es una enzima altamente conservada involucrada en una variedad de funciones celulares, entre las cuales, servir como proteína transactivadora (reclutadora de la polimerasa). Se ha probado el efecto del sistema CRISPR-dCas9/p300, encontrándose que la proteína de fusión dCas9/p300 cataliza la acetilación de la histona H3 lisina 27 en sus ubicaciones objetivo, pudiendo activar la transcripción de genes como *IL1RN*, *MYOD* y *OCT4* de manera específica y sólida a partir de promotores y potenciadores con la sgRNA (Hilton et al., 2015).

Otro sistema de CRISPRa con modificaciones epigenéticas, es el CRISPR de sinergismo de activación múltiple (SAM), el cual se compone de la dCas9 fusionada con la proteína VP64, y una secuencia guía de ARN con un triple bucle, que permite la unión de un complejo transactivador MPH (incluye las proteínas transactivadoras HSF1 y p65) (fig.4) (Konermann et al., 2015; Y. Zhang et al., 2015). Estos componentes permiten la desacetilación del genoma y la transcripción robusta de los genes de interés. SAM permite activar múltiples genes lo que se ha comprobado con altos niveles de transcripción, de manera robusta y continua (Konermann et al., 2015); en un estudio en fibroblastos se desdiferenciaron a células troncales pluripotentes (iPSCs) por medio de SAM activando los genes *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC*, por medio de pseudolentivirus (Xiong et al., 2016).

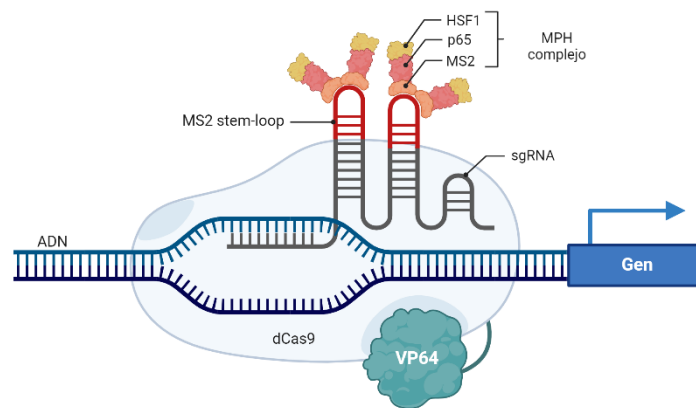


Figura 4. Complejo CRISPR SAM.

En otro estudio se utilizó SAM para activar el gen de la *follistatina* (Fst) que su sobreexpresión induce el incremento de la masa muscular, en un modelo de ratón transgénico de distrofia muscular, teniendo crecimiento de fibras musculares en los miembros anteriores (Liao et al., 2017). En general, el sistema SAM y Suntag (otro sistema de CRISPR de activación basado en la proteína p300 fusionada con la dCas9) presentan las más altas tasas de transcripción de genes en un estudio donde se compararon varios sistemas de CRISPRa en células HEK293T (Chavez et al., 2016).

2.2.2. CRISPR de inactivación (CRISPRi).

El CRISPRi es el utilizado para inactivar un gen, tiene dos vertientes, una que funciona como el CRISPR clásico inicial que se describió anteriormente, y la segunda que es por medio de una Cas9 catalíticamente inactivada (dCas9) sin actividad endonucleolítica. En donde los dominios de nucleasa similar a RuvC (D10A) y HNH (H840A) de dCas9 se ven afectados por dos mutaciones puntuales, agregando una proteína represora que permite el bloqueo de la transcripción de un gen activo (Jinek et al., 2012). CRISPRi permite el silenciamiento de ARN codificantes y la búsqueda de áreas reguladoras codificantes sin tener los efectos secundarios dañinos de Cas9 provocados por roturas de doble cadena de ADN. Sin embargo, en comparación con el Cas9 activo, CRISPRi es más susceptible de guiar la selección de ARN (sgRNA), y el silenciamiento génico suele ser insuficiente (Gilbert et al., 2014).

Dentro de las opciones de CRISPRi, se encuentra la dCas9 fusionada con Krüppel (KRAB) un represor transcripcional, el cual ha demostrado tener las más grandes tasas de interferencia génica al crear bibliotecas de sgRNA mejoradas y unir varios dominios represores a dCas9, estas dificultades se han superado en gran medida (Alerasool et al., 2020).

El dominio KRAB de KOX1 (ZFN10) se usa en casi todos los métodos, posiblemente porque fue el primer KRAB7 funcionalmente descrito (Margolin et al., 1994). En una revisión sistemática, se evaluó una construcción bipartita de la proteína 2 de unión a metil-CpG (MeCP2) acoplada a KOX1 KRAB. En numerosas pruebas, el represor KOX1 KRAB-MeCP2-dCas9 funcionó mejor que KOX1 KRAB-dCas9, lo que demuestra la posibilidad de ajustar la actividad represiva de las fusiones dCas9 (Yeo et al., 2018).

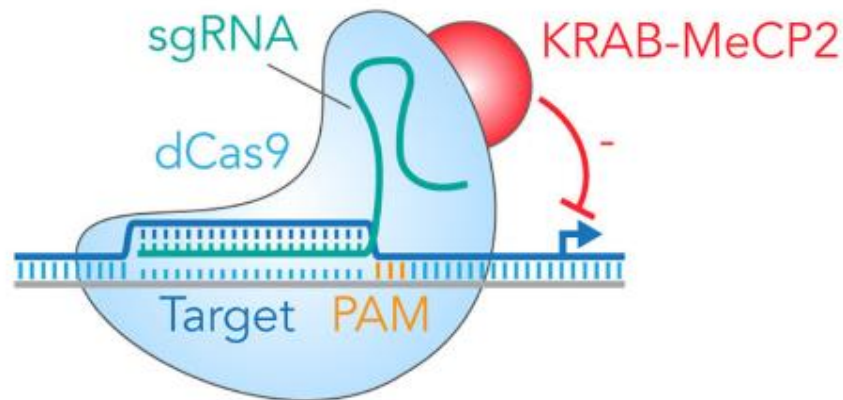


Figura 5. Complejo CRISPR KRAB.

2.3. Terapia génica en la enfermedad de Parkinson.

2.3.1. Terapias no modificantes de la enfermedad de Parkinson.

2.3.1.1. Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC).

La enzima AADC forma parte en la síntesis de dopamina, convirtiendo la levodopa en dopamina. Estudios en ratón han mostrado que la sobreexpresión de AADC en el estriado mejora los síntomas parkinsonianos (W. Y. Lee et al., 2006; Sánchez-Pernaute et al., 2001; Sanftner et al., 2006). Este acercamiento se llevó a un modelo de primates no humanos (NHP) que reveló una menor necesidad de medicación con levodopa, así como una mejoría en la función motora sin medicación (Forsayeth et al., 2006).

Posteriormente en el 2008, se realizó el primer estudio clínico de fase 1 con expresión de AADC inducida por AAV2 bilateral en el putamen de pacientes con enfermedad de Parkinson gravemente afectados. Se encontró una pequeña mejora en la escala unificada de calificación de la enfermedad de Parkinson (UPDRS) y, lo que es más importante, ningún efecto nocivo de la sobreexpresión de AADC mediada por AAV en las personas. Además, los estudios de fase 1 lograron los mismos hallazgos sobre la reducción de la sintomatología en pacientes en estado OFF, así como una reducción general de la UPDRS y una tendencia hacia una menor demanda de levodopa (S. Muramatsu et al., 2010).

El estudio de seguimiento de esta investigación de fase 1 en pacientes, reveló un claro aumento en las puntuaciones UPDRS, así como una modesta disminución en la actividad del ligando AADC 18Fluoro-L-m-tyrosine. Ambos fueron, sin embargo, significativamente más altos que la línea de base. El estudio atribuye la caída a la degradación continua de las neuronas dopaminérgicas no transfectadas, pero aún funcionales (Christine et al., 2009). Aunque la terapia AADC parece ser eficaz, no es adecuada como tratamiento independiente debido a la necesidad constante de L-DOPA exógena.

2.3.1.2. Tirosina hidroxilasa (TH).

En una investigación preliminar, ratas lesionadas con 6-OHDA que recibieron AAV-TH en el cuerpo estriado, mostraron una mejora en el comportamiento motor (Kaplitt et al., 1994). Para probar esta estrategia, se inyectó una mezcla de AAV-TH y AAV-AADC en el cuerpo estriado de monos verdes. Sin embargo, en comparación con los controles que recibieron inyecciones de un vector vacío, no pudieron identificar ningún efecto conductual del tratamiento. Sin embargo, notaron un aumento en la producción de DA estriatal. Debido a las diminutas dosis de vector

inyectadas, es posible que la ausencia de beneficio clínico en su investigación se deba a una restauración subclínica de los niveles de dopamina (During et al., 1998).

La enzima Th necesita a su cofactor tetrahidrobiopterina (BH4), a su vez, la síntesis de este cofactor es llevada por la enzima GTP ciclohidroxilasa 1 (GCH). La expresión de las tres enzimas (AADC, Th y GCH) ha sido el foco principal de la investigación sobre la restauración del sistema dopaminérgico. Las tres enzimas combinadas son demasiado grandes para caber en un solo genoma de AAV, por lo que para la entrega de los tres genes se utilizó un pseudolentivirus (LV). Otras estrategias que se utilizaron, fueron el uso de múltiples virus adeno-asociados (un virus por cada gen) o por lipofección directa; que tiene una mayor capacidad de expresión transgénica. Los estudios en roedores muestran, que la aplicación de esta terapia es efectiva para disminuir el fenotipo parkinsoniano y son bien tolerados (Azzouz et al., 2002; Fan et al., 2001; Imaoka et al., 1998; Shen et al., 2000; Sun et al., 2004).

Las primeras investigaciones en primates no humanos con vectores AAV demostraron la sobreexpresión de Th, AADC y GCH en el estriado, que no presentaba reacción inflamatoria ni efectos adversos, pero teniendo falta de efecto clínico (Muramatsu et al., 2002). Años más tarde, otro estudio aumentó la titulación viral en monos tratados con MPTP, y se demostró un aumento significativo en la producción de dopamina, así como un rescate del fenotipo parkinsoniano, con un efecto persistente a los 15 años de seguimiento en un mono (Sehara et al., 2017).

Otro acercamiento de esta terapéutica, es utilizar específicamente los astrocitos como células blanco para liberar la dopamina en el estriado afectado, esto se debe a que el astrocito presenta la enzima AADC (Juorio et al., 1993; Tsai & Lee, 1996; Ugrumov, 2009). Adicionalmente, los astrocitos tienen la capacidad de convertir la levodopa a dopamina y liberarla en el medio (Juorio et al., 1993). Por lo que la única enzima que necesita para poder sintetizar dopamina es la Th. Para

esto, se usó el promotor específico de astrocitos gfa2, con el fin que el transgén humano de Th solo se pueda expresar en estas células. En ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA se realizó una lipofección directa en el estriado y en otro estudio una infección con retrovirus, observándose en ambos estudios, una mejoría motora al disminuir el porcentaje de giros ipsilaterales en comparación al grupo control de la lesión (Cortez et al., 2000; Segovia et al., 1998).

En el modelo de primate no humano lesionado con MPTP, se utilizaron estos vectores administrados por lipofección directa en el estriado, para la expresión astrocitaria de Th, mostrando también mejoría motora significativa en la prueba de HALLWAY y manteniendo la expresión de Th del transgén humano (Campos-Romo et al., 2012).

2.3.1.3. Descarboxilasa de ácido glutámico (GAD).

La descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) es la enzima que cataliza la producción de GABA. En una investigación preliminar, se demostró que la sobreexpresión de GAD en el núcleo subtalámico en un modelo de rata con enfermedad de Parkinson, era bien tolerada y capaz de reducir los síntomas motores parkinsonianos, además de mostrar un efecto neuroprotector de las neuronas dopaminérgicas (Luo et al., 2002). Desafortunadamente, un ensayo posterior con ratas, obtuvo mejores resultados motores, pero no el efecto neuroprotector (B. Lee et al., 2005).

En un estudio, se administró AAV2-GAD en el estriado de primates no humanos lesionados con MPTP, pero en las evaluaciones, no se observaron mejoras en la calificación UPDRS (Emborg et al., 2007). Sin embargo, los estudios clínicos de fase 1, demostraron una mejora persistente sustancial en las puntuaciones de UPDRS tanto en el estado ON como OFF, y no identificaron efectos secundarios asociados con la terapia (Kaplitt et al., 2007). Un ensayo clínico de fase 2, basado en el perfil de seguridad, demostró que AAV-GAD es una terapia eficaz para la EP, con una

reducción sustancial en la puntuación UPDRS a seis meses después de la transfección, en comparación con los pacientes que se sometieron a una cirugía simulada (LeWitt et al., 2011).

2.3.2. Terapias modificadoras de la enfermedad de Parkinson.

2.3.2.1. Factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF).

En modelos de EP inducidos por toxinas, se ha demostrado que la administración directa de GDNF en la sustancia nigra y en el estriado estimula la aparición de neuritas y disminuye la conducta motora parkinsoniana (Collier & Sortwell, 1999). Estudios de terapia génica con GDNF, han llegado a ensayos clínicos fase 1 (hasta tener que repetirse estos ensayos) sin tener resultados favorables para avanzar a la fase 2. Se ha sugerido, que las cantidades insuficientes de neuronas dopaminérgicas residuales pueden ser la causa de la ineficacia de GDNF. La inyección de AAV-GDNF en el putamen, es segura y eficaz para tratar la conducta motora en modelos hemiparkinsonianos de rata (Gill et al., 2003; Patel et al., 2005).

En un estudio, utilizaron el enfoque de transfección de neurotensina-polyplex para inducir la sobreexpresión de GDNF por medio de un promotor sensible a la tetraciclina, modulando la expresión de GDNF en células dopaminérgicas como alternativa a la administración de vectores virales, teniendo resultados prometedores en un modelo de rata (Espadas-Alvarez et al., 2017).

En otra investigación, se usaron monos ancianos y tratados con MPTP para evaluar los efectos antiparkinsonianos de la sobreexpresión de GDNF mediada por vectores virales en neuronas dopaminérgicas del cerebro medio, con hallazgos alentadores. Pero, otro ensayo en primates no humanos, destacó serias preocupaciones de seguridad, ya que los monos *rhesus* parkinsonianos que recibieron inyecciones bilaterales de AAV GDNF en la sustancia negra, no exhibieron ninguna mejora motora, sino que sufrieron una pérdida de peso considerable (Ai et al., 2003; Grondin et al., 2002; Maswood et al., 2002).

2.3.2.2. Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

El BDNF interactúa predominantemente con el receptor de cinasa B relacionada con la tropomiosina (TrkB). Es un miembro de la familia de factores de crecimiento de las neurotrofinas (Patapoutian & Reichardt, 2001). Se ha demostrado que ayuda a las neuronas a sobrevivir y protege a las neuronas dopaminérgicas de insultos (Ding et al., 2011; Hyman et al., 1991). Se ha descubierto que los niveles de BDNF nativo, son más bajos en la sustancia negra de los pacientes con EP (Parain et al., 1999), y se inducen síntomas parkinsonianos en ratas cuando se inhibe la expresión de BDNF en la sustancia negra (Porritt et al., 2005).

Después de su inyección intraventricular, el BDNF puede estimular la neurogénesis en ratas, lo que puede compensar la pérdida de células en la EP. A ratas con lesiones parciales de 6-OHDA, se les inyectó en la sustancia negra un vector AAV para expresión de BDNF. Aunque los giros inducidos por amfetamina se redujeron y la actividad locomotora general aumentó en las ratas tratadas con BDNF, no hubo indicios de neuroprotección (Klein et al., 1999).

Otro estudio comparó los efectos de BDNF y GDNF en un modelo de rata con lesión unilateral de 6-OHDA y se descubrió que el GDNF era más efectivo que el BDNF para proteger el sistema neuronal y aliviar los síntomas de Parkinson. Además, no hubo diferencia estadísticamente significativa en el comportamiento de las ratas tratadas con HSV1-GDNF solo y las ratas tratadas con HSV1-GDNF más HSV1-BDNF, lo que indica que GDNF es una opción preferible de tratamiento (Sun et al., 2005). Antes de que la terapia con BDNF pueda continuar con las investigaciones en primates no humanos, también se deben tener en cuenta las estimaciones de las posibles consecuencias a largo plazo de niveles más altos de BDNF, ya que un estudio anterior

indicó, problemas de seguridad con respecto a la elevación de los niveles de BDNF en el cuerpo estriado (Lapchak et al., 1993).

2.3.2.3. Neurturina (NTN).

La neurturina (NTN) es un homólogo funcional y estructural del GDNF que se ha demostrado que se une a los receptores GFR2 y GFR1 (Cik et al., 2000). En los primates no humanos que recibieron una infusión de AAV2-NTN, 4 días después de la inyección de MPTP en el cuerpo estriado y la sustancia negra, se examinó el potencial de la neurturina para servir como agente neuroprotector, comparable al del GDNF (Kordower et al., 2006). Junto con la evidencia histológica de inervación dopaminérgica nigroestriatal continua, se produjo una recuperación gradual de la función que comenzó 4 meses después de la infusión y duró hasta la finalización del ensayo (10 meses).

Se han hecho estudios fase I y fase II administrando AAV2-NTN en el putamen. En el ensayo clínico fase I, se evaluaron dos grupos de dosificación (dosis baja y dosis alta), doce pacientes recibieron infusiones bilaterales de AAV2-NTN en el putamen. Los pacientes mostraron una mejora sustancial en su puntuación motora UPDRS seis meses después de la infusión (una reducción del 27.9 % en el grupo de dosis baja y un aumento del 51.2 % en el grupo de dosis alta), sin efectos secundarios importantes (Marks et al., 2008).

En el ensayo clínico fase II, se llevó a cabo cirugía simulada a doble ciego durante 12 meses de duración, que utilizó los mismos parámetros que el ensayo clínico de fase I, con la inscripción de 34 pacientes. A los 12 meses después de la infusión del AAV2-NTN, no se encontró mejoría clínica estadísticamente significativa en comparación al grupo placebo (Marks et al., 2010).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en México y en el mundo, su evolución causa una disminución de la calidad de vida hasta llevar a los pacientes a la incapacidad de llevar una vida independiente. El estándar de oro de tratamiento de la enfermedad, desde hace más de 5 décadas, es la levodopa, pero al ser un tratamiento que presenta efectos adversos y complicaciones motoras, no puede ser usado de manera permanente. Existen terapias coadyuvantes y alternativas a la levodopa. Sin embargo, ninguna ha demostrado ser superior a esta. La terapia génica ha tenido resultados prometedores hasta llegar a ensayos clínicos, y en la actualidad, se han desarrollado nuevas herramientas de edición genómica que se pueden aplicar a la terapia génica de enfermedades neurodegenerativas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Existirán cambios motores y moleculares tras el trasplante de astrocitos modificados con SAM, para inducir la expresión endógena de tirosina hidroxilasa (*th*) en el modelo hemiparkinsoniano de rata provocado con 6-OHDA?

HIPOTESIS.

Habrá mejoria motora, expresi3n de Th y liberaci3n de dopamina, en el modelo hemiparkinsoniano de 6-OHDA en rata, tras el trasplante en el estriado de astrocitos modificados con SAM en los que se inducen la expresi3n end3gena de gen de la tirosina hidroxilasa (*th*).

JUSTIFICACI3N.

El desarrollo de una prueba de concepto de terapia génica para la EP basada en un sistema de CRISPRa, nos permitirá evaluar a CRISPR como un coadyuvante para esta clase de tratamientos, y crear una plataforma de terapia génica para su aplicaci3n en patologías neurodegenerativas cuyo origen no necesariamente sea monogénico. Asimismo, valorar los efectos que tiene este sistema en un modelo de rata hemiparkinsoniano, no solo a nivel celular.

OBJETIVOS.

- **Objetivo General.**

Determinar el efecto del trasplante de astrocitos modificados para inducir la expresión endógena del gen de la tirosina hidroxilasa (*th*) con SAM en el modelo hemiparkinsoniano de rata con 6-OHDA.

- **Objetivos Particulares.**

1. Identificar la secuencia guía que induzca el nivel de transcripción más alto del gen de tirosina hidroxilasa (*th*) con el sistema SAM (CRISPR-dCas9).
2. Determinar los niveles de expresión de Th y liberación de dopamina en la línea C6 de origen glial como prueba de concepto con la *th* sgRNA seleccionada y el sistema SAM.
3. Determinar los niveles de expresión de Th y la liberación de dopamina en un cultivo de astrocitos primario de rata que expresen el sistema SAM y la *th* sgRNA (AST TH).
4. Determinar el efecto del trasplante de AST TH en el estriado en la conducta motora de ratas hemiparkinsoniano con 6-OHDA.
5. Determinar la expresión de Th y el contenido de dopamina en el estriado de las ratas trasplantadas evaluadas en la conducta motora.
6. Analizar la distribución de los AST TH trasplantados en el estriado de ratas hemiparkinsonianas con 6-OHDA.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Secuencia y clonación. Los plásmidos lentiSAMv2 y lentiMPH v2 (un obsequio de Feng Zhang Addgene #75112 y #89308) se usaron para la activación de CRISPR-Cas9. Analizamos la región promotora del gen *th* de rata, 1000-1200 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, en busca de regiones PAM. Obtuvimos ~ 20 secuencias que se evaluaron mediante el análisis BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para verificar que no haya otros sitios que coincidan en el genoma de la rata (*Rattus Norvegicus*). Además, la región promotora *th*, también se evaluó con el *software* E-CRISP, CRISPRESSO2, CHOPCHOP y Benchling para seleccionar las secuencias candidatas por puntaje de especificidad, puntaje de anotación, puntaje de eficiencia, puntaje de desajuste y número de aciertos. Finalmente, elegimos 13 candidatos de sgRNA, que se evaluaron en busca de sitios equivocados de unión en el genoma utilizando la herramienta BLAST. Las secuencias de ARN de guía única (sgRNA), se clonaron en el vector lentiSAM v2, empleando el protocolo Golden Gate, usando *BsmBI* (Thermo Fisher Scientific cat. No. IVGN0136) para la restricción de plásmidos, t4 PNK (NEB, n.º de cat. M0201) para hibridación de oligo y t7 ligasa (NEB, n.º de cat. M0318) para clonación (Koneremann et al., 2015). La región de sgRNA de clonación se amplificó mediante PCR utilizando *primers* específicos. Los productos de PCR amplificados se purificaron utilizando el kit Sap-Exo. (Jena Bioscience, Cat. No. PP-218L, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados se secuenciaron mediante secuenciación automática en un ABI PRISM 3100 con el *kit* de secuenciación de ciclo BigDye Terminator v3.1 (nº de catálogo 4337458, Biosystems, EE. UU.).

Cultivo de células. Las células HEK293T/17 (ATCC CRL-11268) se mantuvieron en medio DMEM alto en glucosa (Gibco, cat. no. 12800-017) con suplemento de piruvato y con 10 % de

suero fetal bovino (FBS) (Gibco, cat. no. 16000-044) y penicilina/estreptomicina al 1% (Thermo Fisher Scientific cat. no. 15140122). Las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Se realizaron pasajes de las células cada dos días en una proporción de 1:6 o 1:5 utilizando Tripsina 1x (Sigma, n° de catálogo 59428C). La línea celular de glioblastoma de rata C6 (ATCC CCL-107) se mantuvo en medio F12 DMEM (Gibco, n.º de cat. 12500-062) con L-glutamina y piruvato suplementado con suero fetal bovino al 10 % (Gibco, n.º de cat. 16000-044) y penicilina/estreptomicina al 1 % (Thermo Fisher Scientific, n° de cat. 15140122), incubados a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad, se realizaron pasajes cada dos días en una proporción de 1:6 o 1: 5 usando Tripsina 1x (Sigma, cat. no. 59428C). Las células CTX-TNA2, una línea no tumorigénica de astrocitos primarios obtenida de la corteza cerebral de rata (ATCC CRL-2006), se mantuvieron en medio DMEM con alto contenido de glucosa (Gibco, n.º de cat. 12800-017) con suplemento de piruvato y con 10 % de suero fetal bovino (Gibco, n° de cat. 16000-044) y penicilina/estreptomicina al 1% (Thermo Fisher Scientific, n° de cat. 15140122). Las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad, se realizaron pasajes cada dos días en una proporción de 1:6 o 1:5 utilizando Tripsina 1x (Sigma, n° de catálogo 59428C).

Transfección de células C6. Las células C6 se transfectaron con Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific, n° de catálogo L3000-15). El sistema SAM con cada sgrNA se probó en células C6 sembradas en placas de Petri de 60 mm; para cada secuencia, las células se sembraron a una confluencia de ~ 40 % (~ 1.2 x 10⁶ células) el día anterior y se transfectaron 0.5 µgr de ADN plasmídico durante la noche anterior con 1.5 ml de medio sin suero y el medio se cambió al día siguiente con medio fresco con FBS al 10 %.

Producción de lentivirus e infección celular. Un día antes de la transfección, se sembraron células HEK293T a confluencia de ~50% (~4.4 x 10⁶ células) en placas de Petri de 100 mm. Las células

se transfectaron al día siguiente a una confluencia de ~70-80% ($\sim 6.6 \times 10^6$ células). Para cada placa de Petri, se transfectaron 3 μg de cada uno de los siguientes plásmidos utilizando 24 μL de Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. L3000-15) y 24 μL de P3000 Enhancer (Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. L3000-15): pMD2.G (Addgene 12259); pMDLg/pRRE (Addgene 12251) y pRSV-Rev (Addgene 12253). Las células se transfectaron con 8 ml de DMEM alto en glucosa (Gibco 12800-017) sin suero fetal bovino y 12 horas después de la transfección, se cambió el medio por medio de mantenimiento completo. El sobrenadante se cosechó 48 hrs después de la transfección y se centrifugó a 1200 rpm para eliminar los restos y las células muertas. Luego, el sobrenadante con virus se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C . Se infectaron diferentes líneas celulares con un título viral de 3 en 1.5 ml de pseudolentivirus con el sistema SAM, y se incubó durante la noche; luego, se retiró el medio y se aplicó medio nuevo completo; después de 48 horas, las células se procesaron para la extracción de ARN y proteínas. Se construyeron curvas de resistencia para blasticidina S HCl (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. A1113903) e higromicina B (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma n.º de cat. H3274), y las células se seleccionaron por su resistencia a los antibióticos. Después de 24 horas de infección, se aplicaron medios nuevos que contenían los antibióticos y las células se mantuvieron bajo selección de antibióticos.

RT-PCR. Las células se sembraron en placas de 60 mm y se cultivaron hasta un 90% de confluencia ($\sim 2.8 \times 10^6$ células) antes de la RT-PCR. El ARN total se extrajo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, n.º de cat. 15596026). La cuantificación y la pureza del ARN se evaluaron mediante análisis espectrofotométrico utilizando el instrumento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 13-400-525). Se usó ADNasa I (Sigma, n.º de cat. AMPD1) para degradar el ADN. El ADNc se sintetizó utilizando M-MLV (Invitrogen, n.º de catálogo 28025-013), dNTP 100 mM (Invitrogen, n.º de catálogo 10297-018) y oligo dT (T4 Oligo Oligo dT 18-mer).

La RT-PCR se realizó con polimerasa Taq Kappa (Sigma, n.º de cat. BK1004), dNTP (Invitrogen, n.º de cat. 10297-018), agua destilada libre de DNasa/RNasa UltraPure™ (Invitrogen, n.º de cat. 10977015) y se utilizaron los siguientes *primers*: para *th* (fw 'GGAGAGCTCCTGCACTCCCC' rev 'GGCATAGTTCCTGAGCTTG'), para β -*actina* (fw 'TCACGCACGATTTCCCTCTCAG' rev 'TGGCACCACCCTTCTACA'), para *dCas9* (fw 'GCACATACCACGATCTGCTG' rev 'CGCTTCAGCTGCTTCATCAC') y para *ms2* (fw 'GGGATGGTGACAGTGGCTCC' rev 'GGACCTCCACCTTGATGGTATAC'). Los *primers* fueron sintetizados por Sigma-Aldrich. Utilizamos las siguientes temperaturas para los ensayos de PCR: 94 °C para la desnaturalización, 57 °C para la alineación y 72 °C para el paso de extensión con un termociclador T100 Bio-Rad.

Western Blot. La extracción de proteínas de células o tejidos se realizó utilizando una solución de lisis que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche Diagnostics, n.º de catálogo 04574834001). La proteína total (25 µg) se cargó para cada muestra para su separación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (8 %) y se transfirió a membranas de nitrocelulosa (BioRad; n.º de cat. 1620115). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5 % diluida en solución salina con Tris (como buffer) que contenía Tween-20 al 0,1 % (TBST) durante una hora y se incubaron en presencia de anti-Th (Abcam, ab112 monoclonal, 1:1000), o anti-Th F-11 (Santa Cruz Technology, sc-25269 monoclonal, 1:1000), o anti-Th ab152 (Millipore, monoclonal, 1:1000), anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (DAKO Z0334, policlonal, 1 :2000), anti-beta-actina-peroxidasa (Sigma A3854, monoclonal, 1:25000). Las proteínas se revelaron usando anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo acoplados a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch), usando el kit Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer; Waltham, MA). Las imágenes se capturaron digitalmente con el instrumento FUSION SOLO S (Vilbert Smart imaging). Los autorradiografías se analizaron por densitometría utilizando el *software* Image J® (NIH).

Inmunofluorescencia. Células C6 y astrocitos se sembraron en cubreobjetos (~80 % de confluencia en una placa de Petri de 60 mm, $\sim 2.5 \times 10^6$ células), se fijaron con paraformaldehído al 4 % y/o metanol frío, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 0.2 % Triton X - 100/PBS/1% BSA durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron usando un anticuerpo monoclonal primario contra anti-Th (Abcam ab112, monoclonal) en células C6 y anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (DAKO Z0334, policlonal) y anti-Th F-11 (Santa Cruz Technology sc-25269, monoclonal) en astrocitos durante 12 hrs. Los cubreobjetos se lavaron con 2% Triton X-100/PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados, Alexa Fluor 594 burro anti-ratón IgG (H+L) (Invitrogen A21203) y Alexa Fluor 488 burro anti-conejo IgG (H+ L) (Invitrogen A21206). Los núcleos se contrastaron utilizando DAPI con Vectashield (Vector Laboratories).

Animales experimentales. Se utilizaron ratas Wistar macho que pesaban ~200 g al inicio del experimento. Las ratas se alojaron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 hrs con libre acceso a comida y agua a ~25 °C, con una humedad relativa de 40 a 60 %. Todos los estudios con animales se realizaron de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (National Research Council (U.S.), Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. & Institute for Laboratory Animal Research (U.S.), 2011), adoptada por los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. y la Norma Oficial NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Las ratas se mantuvieron y manipularon de acuerdo con las directrices del Comité de Cuidado de Animales del Cinvestav, haciendo todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento y la cantidad de animales utilizados. Se siguieron los principios de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) para garantizar un punto final humanitario.

Inmunofluorescencia de cortes de estriado. Las ratas se sacrificaron diez semanas después del trasplante de astrocitos o del tratamiento simulado (*sham*), con una sobredosis de pentobarbital sódico (200 mg/kg i.p.) y se perfundieron transcardiacamente con solución salina seguida de paraformaldehído (PFA) al 4 % en solución buffer con fosfato (PBS). Los cerebros se diseccionaron y se fijaron en PFA a 4 °C durante 24 hrs y luego se crioprotegieron en sacarosa al 10 %/PBS durante 24 hrs, sacarosa al 20 %/PBS durante 24 hrs y sacarosa al 30 %/PBS durante 24 hrs adicionales a 4°C. Las secciones coronales congeladas de 35 µm de espesor se cortaron en un micrótopo deslizante (Leica Microsystems), se recogieron en 2% PFA/PBS y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento.

Las secciones de cerebro elegidas para el análisis del cuerpo estriado se incubaron en condiciones de flotación libre en 0.2% Triton X-100/PBS durante 30 min y se bloquearon durante 30 min en BSA al 1 % en 0.2% Triton X-100/PBS a temperatura ambiente. Luego, las secciones se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario contra la proteína ácida fibrilar glial (Dako Z0334, polyclonal, 1:500) y anti-Th (Sigma T1299, monoclonal, 1:200) diluidos en 0.02% Triton X-100/0,1 % BSA/PBS. Para la detección de anticuerpos primarios, las secciones se enjuagaron con 0.02% Triton X-100/PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 anti-mouse IgG (H+L) A21203 y Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (H+L) A21206 diluido en la misma solución que el anticuerpo primario. Los núcleos se contrastaron usando 4',6-diamino-2-fenildol (DAPI) con Vectashield (Vector Laboratories).

Inmunohistoquímica de cortes de estriado. La inmunohistoquímica se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-tirosina hidroxilasa Th (1:400, Abcam ab112), un anticuerpo de conejo contra la proteína ácida fibrilar glial (Dako Z0334, policlonal, 1:500) y una IgG anti-conejo biotinizada (H+L) (1:100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.). La tinción

inmunohistoquímica se desarrolló utilizando el complejo avidina-biotina-peroxidasa (1:10; ABC Kit; Vector Laboratories) y DAB (Sigma). El marcaje inmunohistoquímico se observó con un microscopio Olympus BX53 y las imágenes se digitalizaron.

Microscopía confocal. Las imágenes con triple etiqueta se obtuvieron usando un microscopio de escaneo láser confocal (Leica TCS-SP8) en el modo XYZ (*Z-stacks*) usando un objetivo 63X (inmersión en aceite). Se usaron las siguientes configuraciones de filtros de emisión/láser de excitación para los diversos cromóforos: se usó un láser de argón para el Alexa Fluor 488, con una excitación máxima a 490 nm y una emisión en el rango de 505 a 530 nm; se utilizó un láser He-Ne para Alexa Fluor 594 con una excitación máxima a 543 nm y una emisión en el rango de 568 a 615 nm; y se usó un láser UV para revelar DAPI con una excitación máxima a 456 nm y una emisión en el rango de 410 a 480 nm, usando la adquisición secuencial de canales de longitud de onda separados para reducir la interferencia entre canales. Luego, los cortes en Z (3 o 4 cortes ópticos) se convirtieron en una imagen de proyección tridimensional utilizando el software Leica LAS AF lite.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se cortaron rebanadas de cerebro, de 100 μm de espesor, utilizando un microtomo Leica (RM2125 RTS) en solución de Krebs-Henseleit enfriada con hielo. Inmediatamente, se disecaron secciones del cuerpo estriado izquierdo y derecho, se recolectaron en un tubo Eppendorf ámbar de 1.5 ml con solución de PBS estéril a 4°C (100 μl) y 50 μl de ácido perclórico 0.1 N, el tejido se homogeneizó manualmente, sónico y ultracentrifugó, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore GSWP04700) para analizar DA y DOPAC (Cruz-Trujillo et al., 2013; M. J. Gu et al., 2016). Las muestras del medio de cultivo se recolectaron en un tubo Eppendorf ámbar de 1.5 ml con 50 μl de ácido perclórico 0,1 N por 950 μl de medio, las muestras se agitaron con un vórtex durante un minuto y se ultracentrifugaron, el

sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0.22 μm (Millipore GSWP04700) para determinar DA y DOPAC. Brevemente, los niveles de dopamina se determinaron usando un método de HPLC con detección electroquímica como se describió anteriormente (Cruz-Trujillo et al., 2013; Guerrero-Cázares et al., 2007). La separación de dopamina y DOPAC se realizó utilizando una columna microbore dC-18 (Atlantis, 2,1 x 150 mm, Waters Co.). La fase móvil fue: buffer 97%, NaCl 135 mg/l; ácido cítrico 10.5 mg/l; EDTA 20 mg/l; OSA 20 mg/l; metanol al 3%, pH 2,9 ajustado con NaOH. El flujo fue de 0.3 ml/min a 30°C. El sistema de detección electroquímica fue de Waters Co. acoplado a un electrodo de carbón vítreo (VT-03, Antec Leyden). El potencial de oxidación fue de ± 380 mV frente al electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (ISSAC).

Cirugía estereotáxica con 6-OHDA unilateral. Las ratas se anestesiaron con Ketamina 75 mg/kg y Xilazina 5 mg/kg i.p; colocado en un marco estereotáxico David Kopf e inyectado unilateralmente con 6-hidroxidopamina (6-OHDA de Sigma, n° de cat. H4381); 1.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de solución salina que contiene 0.1 % de ácido ascórbico en el haz del prosencéfalo medial en las coordenadas (AP -1,8; ML 2,4; DV -7 mm) en relación con Bregma según el atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos et al., 1997), y se administraron 5 μl a razón de 1 μl por minuto. Para prevenir el daño de las neuronas noradrenérgicas, las ratas se trataron previamente con desipramina (10 mg/kg i.p.) 40 minutos antes de la cirugía. Doce días después de la lesión de 6-OHDA, se seleccionaron las ratas que mostraban diez o más giros ipsilaterales/min durante 30 min después de la inyección de amfetamina (Hudson et al., 1993). Se usó como control un grupo de ratas con lesiones simuladas con el procedimiento quirúrgico, pero sin lesión estereotáxica o administración de 6-OHDA. Llamamos lado lesionado al lado derecho que recibió 6-OHDA y como lado intacto al lado izquierdo que no recibió lesión estereotáxica y administración de 6-OHDA.

Trasplante de astrocitos. Se anestesiaron ratas hemiparkinsonianas (~300 g) con ketamina/xilazina (75/5 mg/kg i.p.) y se colocaron en un marco estereotáxico David Kopf y recibieron 20,000 astrocitos en cada uno de los dos sitios del cuerpo estriado lesionado: anterior (AP 1.9; ML 2.2; DV -5 mm) y posterior (AP 0.9; ML 3.0; DV -4 mm) con respecto a Bregma según el atlas cerebral de Paxinos (Paxinos et al., 1997). Los astrocitos (AST) y los astrocitos que expresan Th (AST-TH) se tripsinizaron a partir de placas de Petri de 60 mm con una confluencia del 90 %, se contaron y se concentraron inmediatamente 20,000 células en 3-4 μ l de medio de cultivo sin suero para usar en el procedimiento de trasplante (Song et al., 2017). Las ratas con lesiones simuladas no recibieron trasplantes.

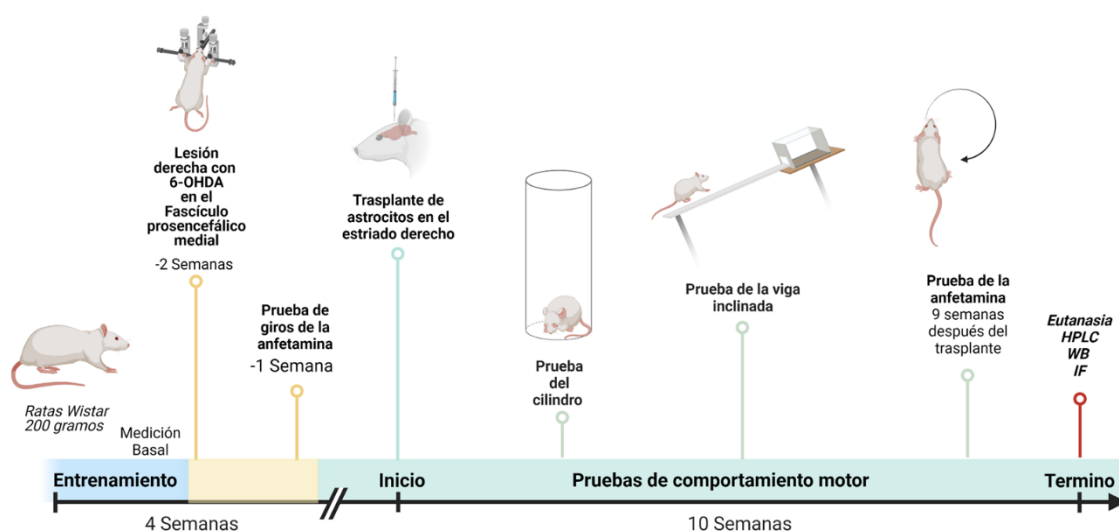


Figura 6. Línea del tiempo de las evaluaciones de conducta en los animales trasplantados.

Pruebas de conducta motora. Las ratas se entrenaron durante dos semanas antes de la lesión con 6-OHDA. Dos semanas después de la lesión de 6-OHDA, se trasplantaron astrocitos y AST-TH en el estriado de los sujetos experimentales. Las ratas trasplantadas se evaluaron durante las siguientes nueve semanas. Las ratas experimentales y de control se sacrificaron diez semanas después de la

lesión para obtener tejido estriatal para HPLC, inmunofluorescencia y ensayos de *Western Blot* (figura 6).

Prueba de giros inducida por anfetamina. A las ratas se les administró anfetamina (8 mg/kg i.p. Sigma, n.º de cat. NMID420D) y se analizó el comportamiento de giros ipsilateral; el número de vueltas por minuto fue medido y registrado durante 30 min, 15 min después de la administración peritoneal de la anfetamina (Björklund & Dunnett, 2019).

Prueba del cilindro. La prueba se realizó de la siguiente manera: las ratas se colocaron individualmente dentro de un cilindro acrílico (diámetro: 22 cm; altura: 26 cm) con un espejo detrás en un ángulo de 45° para permitir una visión de 360°. Las ratas se grabaron en video durante 5 min después de que tocaron por primera vez las paredes del cilindro con cada extremidad anterior. Las puntuaciones se calcularon mediante la relación de asimetría: derecha-izquierda/ (derecha + izquierda + ambas). Las puntuaciones en el índice de asimetría de las extremidades anteriores oscilan entre -1 y 1 (Landers et al., 2014; Su et al., 2018).

Prueba de la viga inclinada. Los animales fueron entrenados durante tres días para caminar sobre vigas de 2 m de largo desde la plataforma de partida hasta una jaula en la parte superior; a los animales se les presentó un estímulo negativo en la base con una lámpara de luz amarilla y una galleta de azúcar como recompensa en la jaula oscura. Las vigas estaban inclinadas a 15°; Se utilizaron dos vigas diferentes con anchos de 24 y 18 mm. Los animales fueron probados para la medida basal cuatro días después del inicio del entrenamiento y antes de la lesión de 6-OHDA. Para la prueba se registró el tiempo que les tomó a los animales caminar desde la base de la viga hasta la jaula al final del recorrido. Solo se seleccionaron en el experimento los animales que completaron la prueba en menos de 120 s durante la determinación basal (Drucker-Colín & García-Hernández, 1991).

Distribución de astrocitos trasplantados: Tres ratas Wistar lesionadas con 6-OHDA fueron trasplantadas con AST-TH y diez semanas después de la implantación fueron sacrificadas, y se obtuvieron secciones coronales del cuerpo estriado (~35 μm) desde AP +1.60 mm hasta -0.92 mm. Las secciones se tiñeron para GFAP, Th y se contrastaron con DAPI para revelar los núcleos. Las coordenadas estimadas se establecieron utilizando el atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos et al., 1997). Determinamos el número de células GFAP+/TH+ de tres campos independientes de cada corte estriatal de tres ratas.

Análisis estadístico. Los resultados se expresan como media \pm SD (n = 4). El tamaño de la muestra se calculó con el *software* G*Power (Faul et al., 2007). Se utilizó un tamaño del efecto grande. Utilizamos el *software* GraphPad versión 8.0 para analizar los datos. Evaluamos la distribución de datos con la prueba de Shapiro-Wilk. La determinación de dopamina por HPLC se analizó con la prueba ANOVA de Brown-Forsythe y la prueba ANOVA de Welch con un procedimiento de aumento lineal de dos etapas de la prueba de Benjamini, Krieger y Yekutieli como *post hoc*. La relación DOPAC/DA y la comparación de la densitometría Th se analizaron mediante ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey como *post hoc*. $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

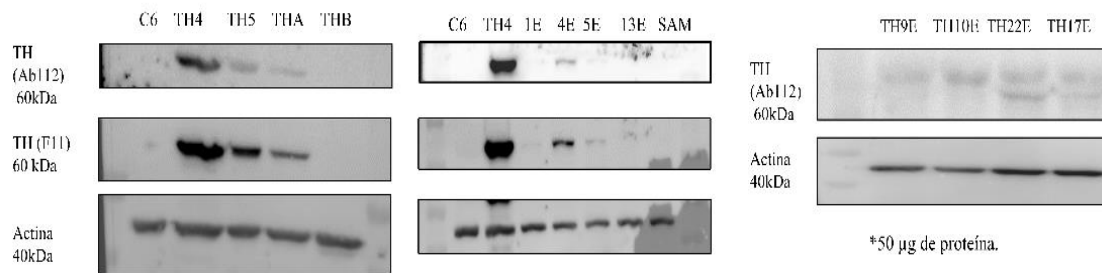
Para las pruebas de comportamiento se utilizaron cuatro animales por grupo, luego de aplicar los criterios de inclusión en base a los resultados de la prueba de entrenamiento, los animales fueron aleatorizados en cada grupo. Los datos de los grupos obtenidos fueron sometidos a un ciego. Los datos de la prueba de rotación inducida por anfetamina se analizaron con un ANOVA de dos vías con la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Sidak. Los datos de la asimetría de colocación de las extremidades anteriores y la prueba de la viga inclinada (24 y 18 mm) se analizaron con ANOVA de medidas repetidas y la prueba *post hoc* de comparación múltiple de

Tukey. $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo, se estimó la varianza entre los grupos comparados y fue similar.

RESULTADOS.

1. Identificación la secuencia guía que induzca el nivel de transcripción más alto del gen de la tirosina hidroxilasa (Th) con el sistema SAM (CRISPR-dCas9).

Se obtuvieron 13 sgRNA para el gen de *th* de rata, se clonaron individualmente en el vector SAM v2 (Addgene # 75112). Para probar las secuencias seleccionadas, las células C6 fueron transfectadas transitoriamente con el sistema SAM con cada Th sgRNA, se realizó RT-PCR para determinar la expresión de ARNm de *th*; seleccionando solamente las secuencias que dieron positivo al mensajero. Después, de las secuencias seleccionadas se evaluó la expresión de proteína inducida por cada sgRNA transfectadas. Los resultados de la expresión de la proteína Th de las sgRNA se muestran en la figura 7. Observándose, que la secuencia guía TH4 induce mayor expresión de proteína en comparación con el resto de secuencias; además que las células C6 sin sistema CRISPR ni sgRNA no expresan Th.



*25 µg de proteína.

Figura 7. Western Blot de las sgRNA probadas en células C6.

2. Determinación los niveles de expresión de Th y liberación de dopamina en la línea celular C6 como prueba de concepto con la th sgRNA y el sistema SAM.

Se utilizó RT-PCR para evaluar los niveles del ARN mensajero para *th* en células C6 transfectadas con la secuencia guía seleccionada para *th* (TH4 sgRNA), como control positivo se empleó el estriado de rata. No se encontró expresión de ARN mensajero en células C6 control o en aquellas transfectadas con el sistema SAM sin sgRNA (Figura 8A, carril 2 y 3), la expresión solo se observó en células C6 transfectadas con el SAM completo y la secuencia guía para *th* (Figura 8A, carril 4). Además, también se determinó la expresión de la proteína Th en las células transfectadas con C6 usando dos anticuerpos monoclonales (Abcam 112 y Santa Cruz Technologies F-11). En la Figura 8B, se muestra el *WB* de células C6 transfectadas con el sistema SAM junto con sgRNA de *th*, se puede observar que solo estas células expresan Th (Figura 8B, carriles 2 a 4), en cambio no se encontró expresión de Th en control (células C6 en el carril 1) o células C6 transfectadas sin sgRNA (carril 5). Como control positivo para la expresión de Th, usamos proteína de estriado de rata (carril 6).

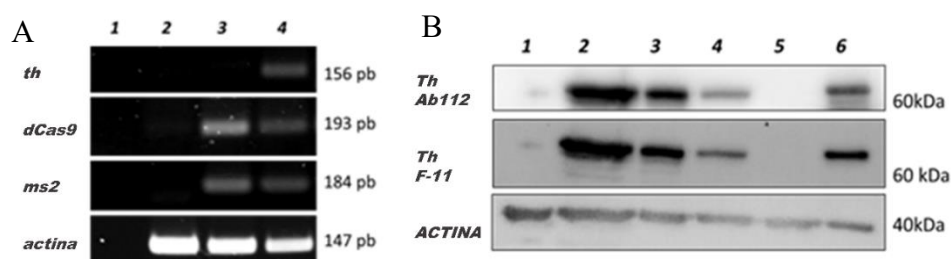


Figura 8. Expresión de Th en las células C6. A) RT-PCR para el mensajero de *th*, *dCas9*, *ms2* y *actina*. carril 1 control H₂O, carril 2 - células C6, carril 3 - células C6 transfectadas con el sistema SAM y carril 4 - células C6 transfectadas con el sgRNA de TH4. B) Western Blot para Th y actina. Carril 1 - Células C6, carril 2 a 4 - C6 TH4 (muestras diferentes), carril 5 - C6 SAM y carril 6 - Muestra de estriado de rata.

En células C6 transfectadas y seleccionadas con blasticidina e higromicina, se detectó producción de dopamina. La doble selección de antibióticos se aplicó para garantizar que todos los elementos del sistema SAM y el sgRNA seleccionado se expresaran de manera estable. La figura 9, muestra que la línea celular estable C6 que expresa Th secretó dopamina al medio de cultivo, pero no se pudo detectar dopamina en las células C6 control (no es detectable a menos de 2 μ M).

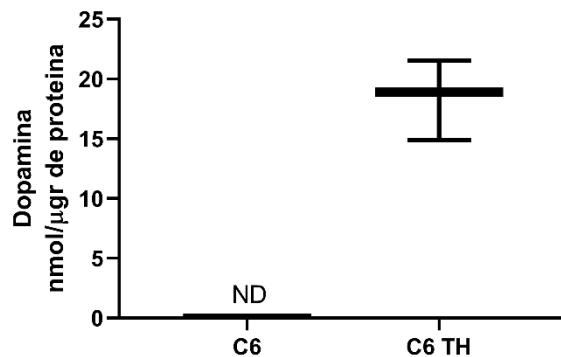


Figura 9. Contenido de dopamina en el medio de las células C6 por HPLC.

La figura 10 muestra la expresión de Th por inmunofluorescencia en células C6 transfectadas con el sistema SAM con o sin la th sgRNA. En las células que expresan el mensajero de *th* se observa marcaje rojo positivo para Th, a diferencia de las células C6 que no expresan el mensajero. Estos datos demuestran que el sistema SAM-TH puede activar la expresión del gen *th* endógeno en células de origen glial e inducir la síntesis de una proteína activa capaz de producir y liberar DA al medio extracelular.

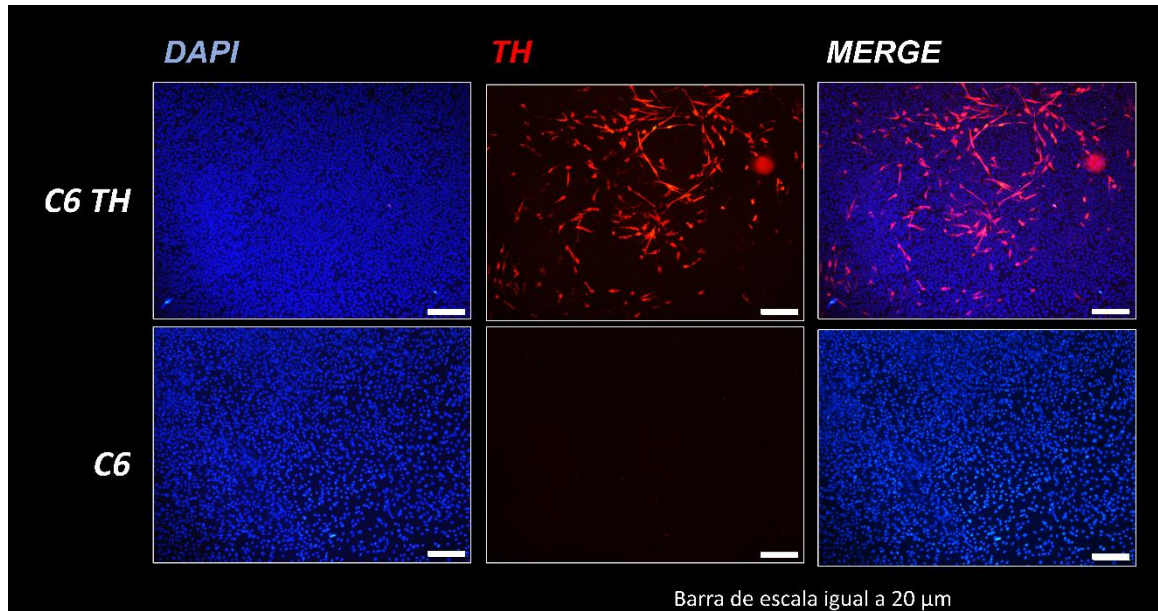


Figura 10. Expresión de Th en la línea celular C6 por inmunofluorescencia. Imágenes tomadas por microscopio de epifluorescencia.

3. Determinación los niveles de expresión de Th y liberación de dopamina en un cultivo de astrocitos primario de rata que expresen el sistema SAM y la th sgRNA (AST TH).

Se infectó una línea celular de astrocitos corticales con el complejo p-Lenti SAM TH y MPHv2, y se realizó la doble selección con blasticidina e higromicina. Después de la selección, se extrajo ARN y proteína. La Figura 11 A muestra la expresión del gen *th* y del ARNm de *dCas9* y *ms2* en astrocitos infectados según lo evaluado por RT-PCR. No se detecta ARNm de *th*, *dCas9* o *ms2* en células de astrocitos (Figura 11 A, carril 2), pero se expresó el ARNm de *th* en astrocitos infectados con el sistema completo (Figura 11 A, carril 3); de ahora en adelante se reconocerá esta línea celular como AST-TH. También se determinó la expresión de la proteína Th en astrocitos infectados usando un anticuerpo monoclonal contra Th (Abcam 112). En la Figura 11 B, se muestra el *Western blot* de la proteína Th de las células AST-TH, y se puede observar que estas células expresan Th (Figura 11 B, carril 2). Como se esperaba, no se detectó ninguna señal para Th en los astrocitos control (carril 1). Como control positivo, se usó la misma cantidad de proteína del estriado de rata (25 μg, carril 3).

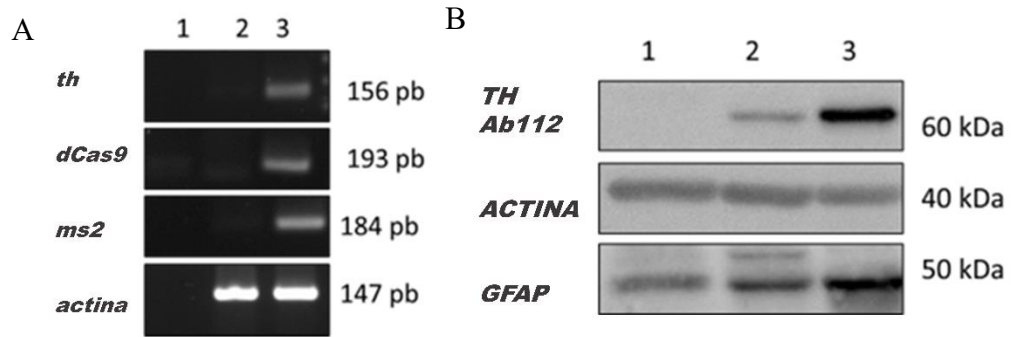


Figura 11. Expresión de Th en astrocitos. A) RT-PCR para el mensajero de *th*, *dCas9*, *ms2* y *actina*. Carril 1- H₂O, carril 2- astrocitos, carril 3- AST TH. B) Western Blot para Th y *actina*. Carril 1: astrocitos, carril 2: AST TH y carril 3: estriado de rata

La figura 12 muestra el contenido de dopamina en el medio de cultivo de astrocitos, se observa que la línea celular estable que expresa AST-TH liberó dopamina al medio de cultivo, pero no se detectó dopamina en el medio de cultivo de astrocitos control.

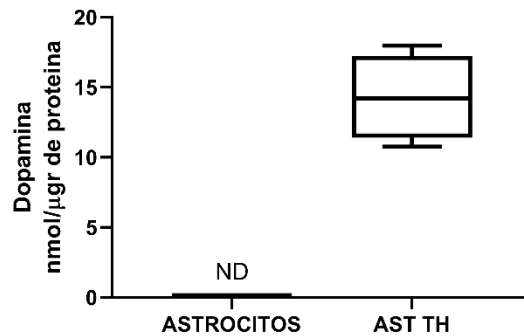


Figura 12. Contenido de dopamina en el medio de astrocitos por HPLC.

En la figura 13 se muestra la inmunofluorescencia para Th y el marcador de astrocitos GFAP en células AST-TH y en astrocitos. Puede verse que las células AST-TH presentan doble marcaje para Th y GFAP; por el contrario, los astrocitos control no expresan la proteína Th y solamente GFAP.

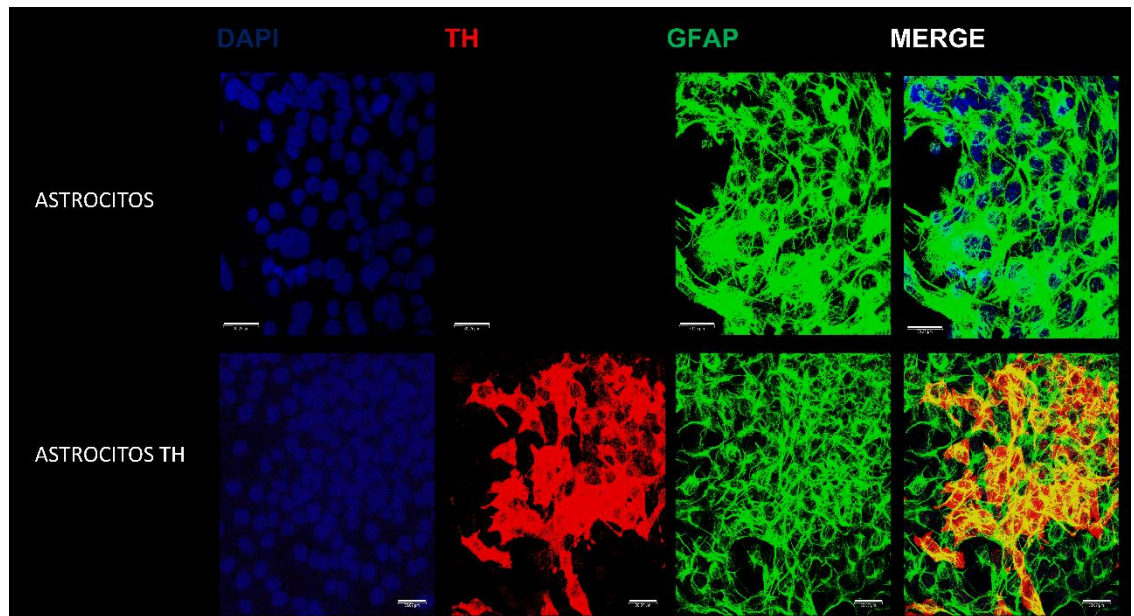


Figura 13. Expresión de Th en la línea celular de astrocitos por inmunofluorescencia. Imágenes tomadas por microscopio confocal. DAPI para los núcleos en azul, GFAP marcaje en verde y Th marcaje en rojo. Barras en blanco indican 30 μ m.

4. Determinación del efecto motor del trasplante de AST TH en el estriado en un modelo hemiparkinsoniano con 6-OHDA en rata.

La figura 14 presenta un incremento significativo en los giros ipsilaterales de las ratas que recibieron astrocitos no modificados en comparación con las que recibieron las células AST-TH. Las ratas *sham* mostraron un comportamiento de giro insignificante que no cambió durante el transcurso del experimento.

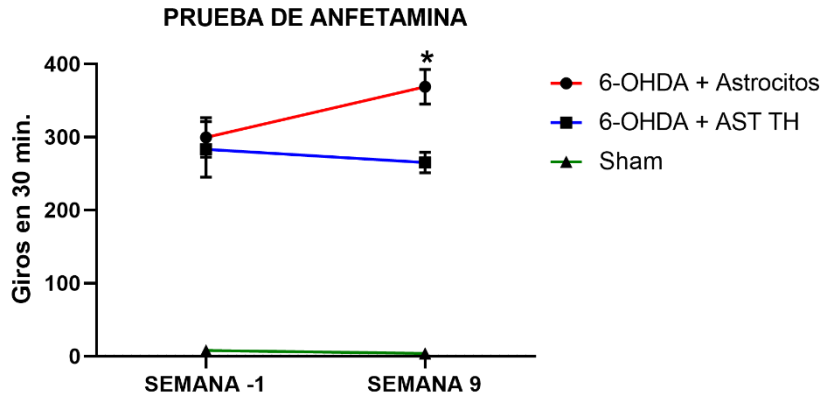


Figura 14. Prueba de giros ipsilaterales con anfetamina de los grupos evaluados. Prueba de ANOVA de dos vías con post hoc de Sidak. $n=4$, $*p<0.05$.

Se aplicó la prueba del cilindro a los tres grupos antes de la lesión para determinar el índice de asimetría basal. Se puede observar que antes de la lesión, las ratas no mostraron diferencias significativas en la asimetría de colocación de las extremidades anteriores (Figura 15). De hecho, los valores en los tres grupos fueron inferiores a 0.5, lo que indica poca o ninguna asimetría en el uso de las extremidades anteriores. A la semana cuatro después del trasplante, las ratas tratadas con astrocitos control mostraron un incremento del índice de asimetría sobre los valores de las ratas sham y trasplantadas con AST-TH. Este valor aumenta significativamente por encima de 0.5 a la octava semana posterior al trasplante, mientras que permanece por debajo de 0.5 en los otros dos grupos, lo que indica que el trasplante de células AST-TH evita incrementos en el índice de asimetría.

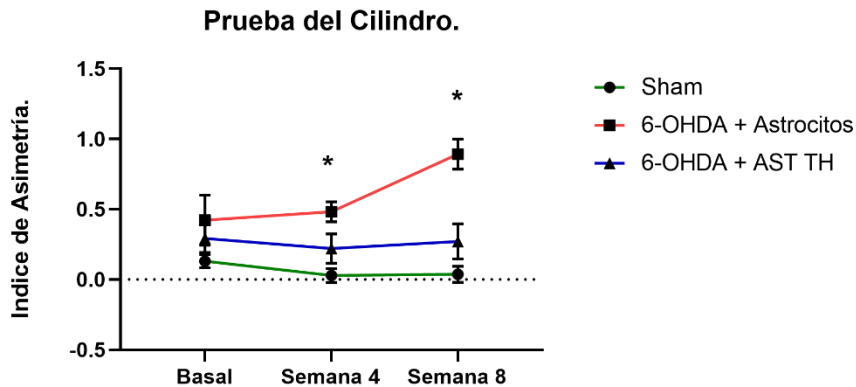


Figura 15. Prueba de asimetría de los miembros anteriores (prueba del cilindro) de los grupos evaluados. Prueba de ANOVA de medidas repetidas con prueba post hoc de Tukey. $n=4$, $*p<0.05$.

La figura 16 muestra los resultados de las evaluaciones de la prueba de la viga inclinada con dos diferentes medidas de ancho, realizadas cada semana después del trasplante (semana 1 a 8). En la viga de 24 mm de ancho, el grupo trasplantado con AST-TH muestra un tiempo similar para escalar la viga en comparación con el grupo *sham*. Por el contrario, el grupo trasplantado con astrocitos aumentó el tiempo necesario para escalar. En la viga de 18 mm de ancho, no se observan diferencias en el tiempo que tardaron las ratas en subir la viga para el grupo *sham* y el AST-TH. Sin embargo, las ratas que recibieron solo astrocitos aumentaron las puntuaciones de tiempo y fueron estadísticamente diferentes de los otros dos grupos. Estos datos indican que el implante de células AST-TH disminuye el desequilibrio motor y la asimetría de las ratas lesionadas con 6-OHDA.

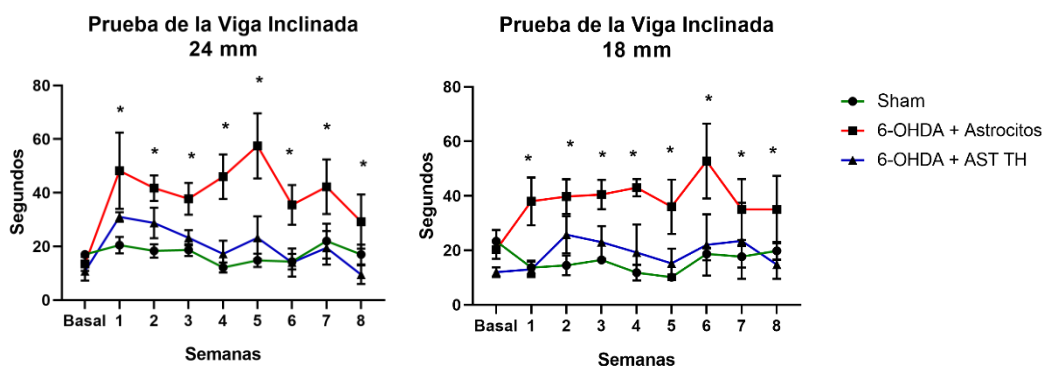


Figura 16. Prueba de la viga inclinada en los grupos evaluados. Prueba de ANOVA de medidas repetidas con prueba post hoc de Tukey. $n=4$, $*p<0.05$.

5. Determinación la expresión de Th y el contenido de dopamina en el estriado de las ratas trasplantadas evaluadas en la conducta motora.

La figura 17 muestra que no hubo diferencias en el contenido de dopamina en el lado intacto (izquierdo) de ninguno de los grupos; sin embargo, en el derecho, no encontramos dopamina detectable en las ratas que recibieron solo astrocitos, mientras que hay un nivel claramente detectable de dopamina en el estriado trasplantado con AST-TH, que corresponde al 14.42% en relación al contenido de dopamina del grupo *sham*. Al no poderse detectar dopamina en el grupo que recibió solo astrocitos, no se puede realizar un análisis estadístico para comparar los grupos trasplantados.

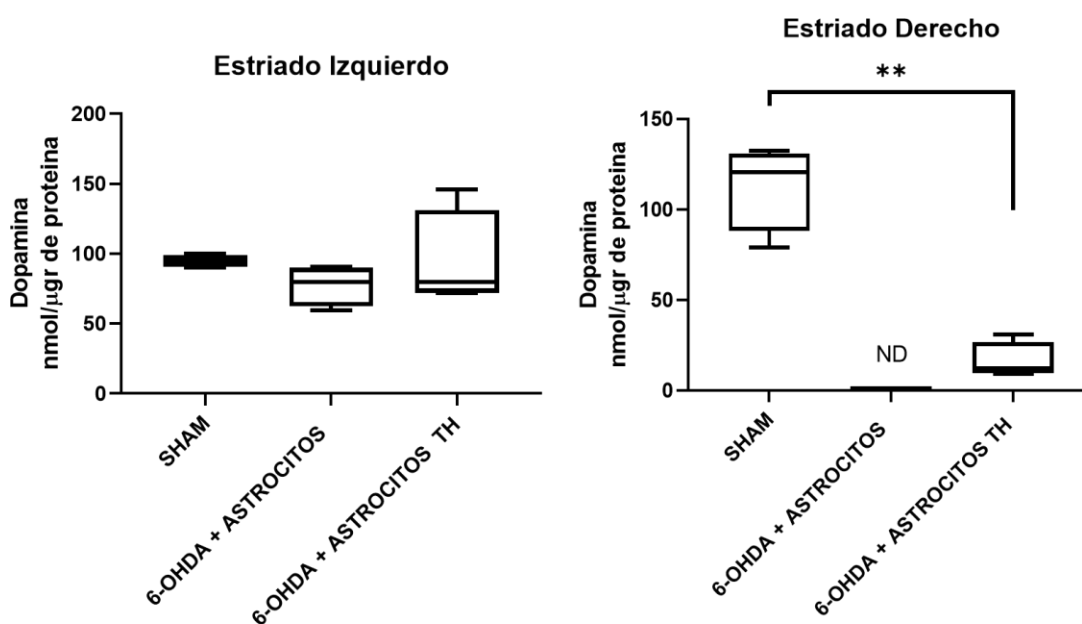


Figura 17. Contenido de dopamina en la región del estriado de los grupos evaluados. Prueba de ANOVA de una vía con post hoc de Tukey. $n=4$, $*p<0.05$, $**p<0.01$.

Posteriormente, se evaluó el recambio de dopamina con DOPAC en el estriado (figura 18). En el estriado intacto (izquierdo), los valores de recambio fueron similares en todos los grupos. Por el contrario, no se puede determinar el recambio en el grupo trasplantado de astrocitos de control en el lado lesionado (derecho). No obstante, el recambio en el grupo de AST-TH muestra valores que no son diferentes del grupo *sham*, lo que sugiere un metabolismo acelerado de dopamina en el estriado trasplantado con AST-TH.

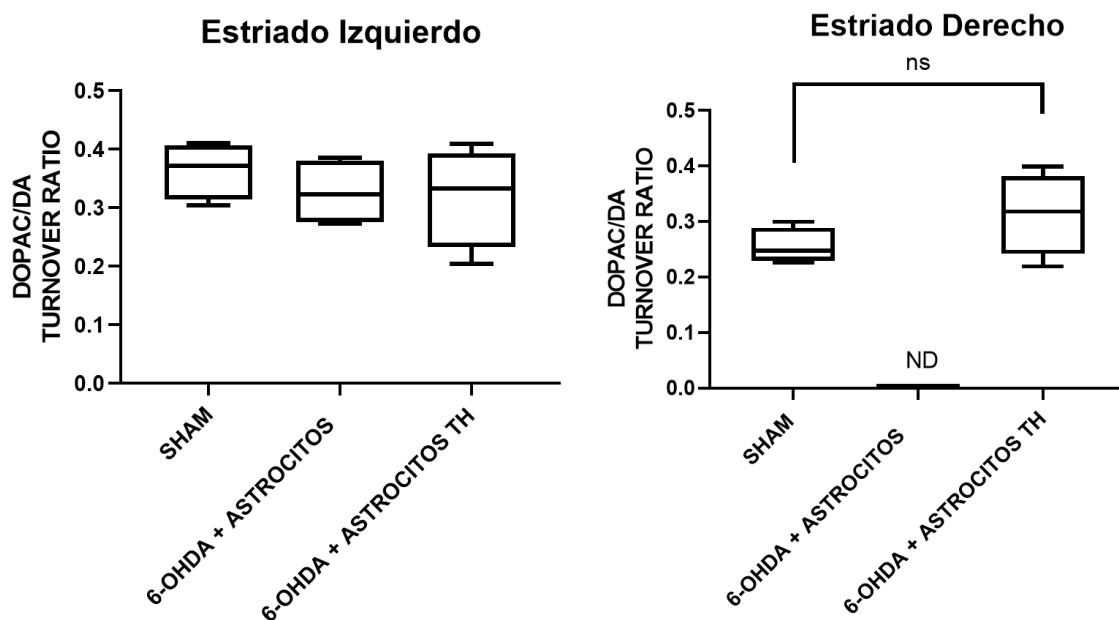


Figura 18. Recambio DOPAC/DA en el estriado de los grupos evaluados. Prueba de ANOVA de una vía con post hoc de Tukey. $n=4$, $*p<0.05$.

Además, se evaluó si las células AST-TH aún expresaban la proteína Th en el estriado trasplantado. La figura 19 muestra la expresión de Th determinada por análisis de *Western Blot* de los homogenados de los tres grupos de animales evaluados. Se puede observar que los homogenados de estriado de todas las ratas expresan la proteína Th en el lado intacto (izquierdo) y que sólo en los grupos *sham* y AST-TH se detectó Th en el lado derecho. El análisis densitométrico de la expresión de Th usando el anticuerpo ab112 indica que en el lado intacto de los astrocitos

control y los grupos AST-TH, se produce un incremento de la expresión de Th. En el lado lesionado del grupo AST-TH, hay una recuperación de la expresión de Th comparable al grupo *sham*.

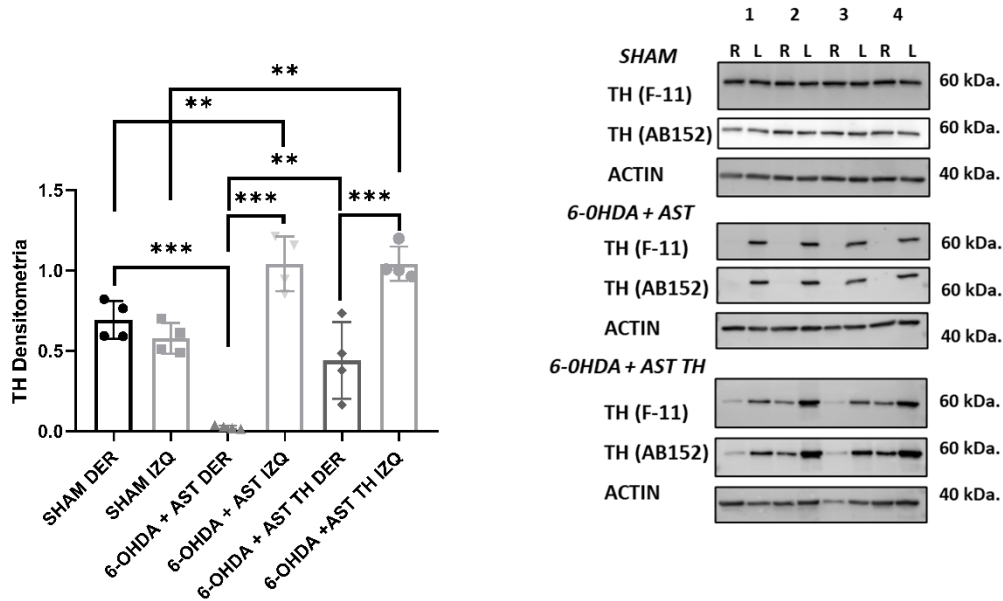


Figura 19. Densitometría de Th en el estriado intacto y lesionado de los grupos evaluados. Prueba de ANOVA de una vía con post hoc de Tukey. $n=4$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Los números arriba de los Western Blot indican el número de rata al cual le pertenecen, R y L indican el lado del estriado evaluado, derecho e izquierdo respectivamente.

La Figura 20 muestra la expresión de Th y GFAP en el cuerpo estriado intacto y lesionado de ratas que recibieron astrocitos y AST TH. En el grupo de trasplante de astrocitos no modificados solo se observa señal de Th en el lado intacto, y la señal de GFAP se puede observar marcaje en ambos lados, pero sin colocación de ambas señales. En el grupo trasplantado con los AST TH, se puede observar que en ambos lados (intacto y lesionado) hay marcaje para Th, pero en el lado lesionado (derecho) este marcaje colocaliza con el marcaje de los astrocitos con GFAP. Asimismo, se puede observar marcaje de GFAP en ambos estriados, pero solo en el lado lesionado hay astrocitos con el doble marcaje de Th y GFAP.

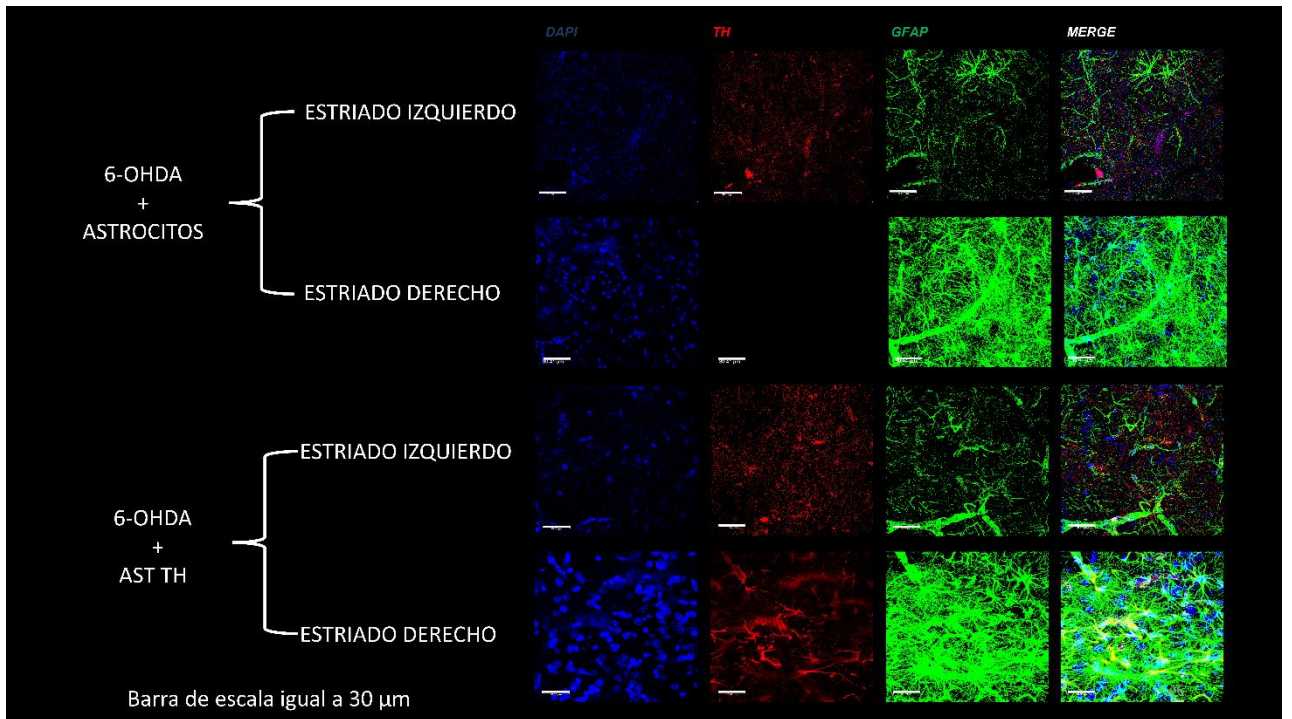


Figura 20. Expresión de Th y GFAP en el estriado de los grupos trasplantados con astrocitos. Imágenes tomadas con microscopía confocal. DAPI para los núcleos en azul, GFAP marcaje en verde y Th marcaje en rojo. Barras representan 30 μ m.

La figura 21 muestra la reconstrucción en Z de un astrocito que expresa tanto GFAP como Th del lado lesionado (derecho) del grupo AST TH de la figura 20.

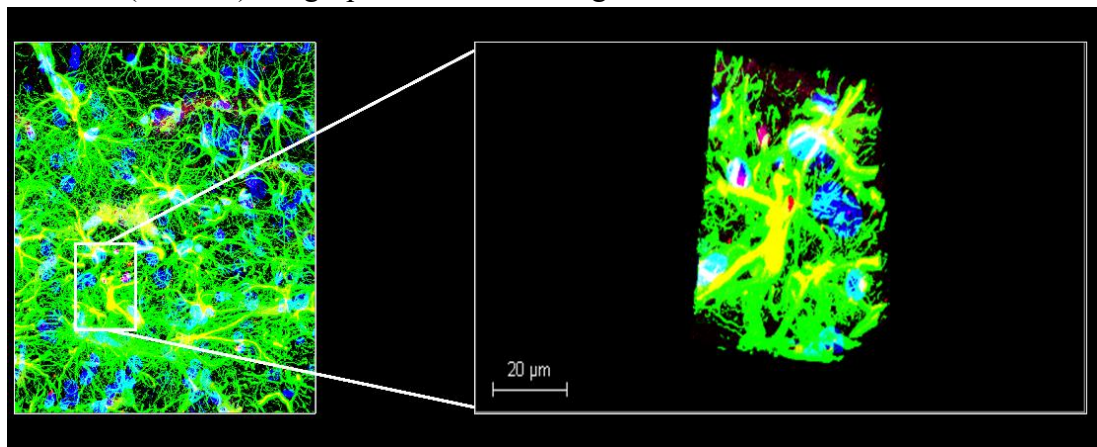


Figura 21. Corte en Z por microscopía confocal de los AST TH en el estriado trasplantado. DAPI para los núcleos en azul, GFAP marcaje en verde y Th marcaje en rojo. Barra representa a 20 μ m.

6. Análisis de la distribución de los AST TH trasplantados en el estriado de ratas hemiparkinsonianas con 6-OHDA.

Finalmente, la figura 22 muestra la distribución de las células AST-TH dentro del estriado lesionado de una serie de cortes coronales que van desde AP +1.60 mm a -0.92 mm, marcaje para Th y con DAPI para revelar los núcleos.

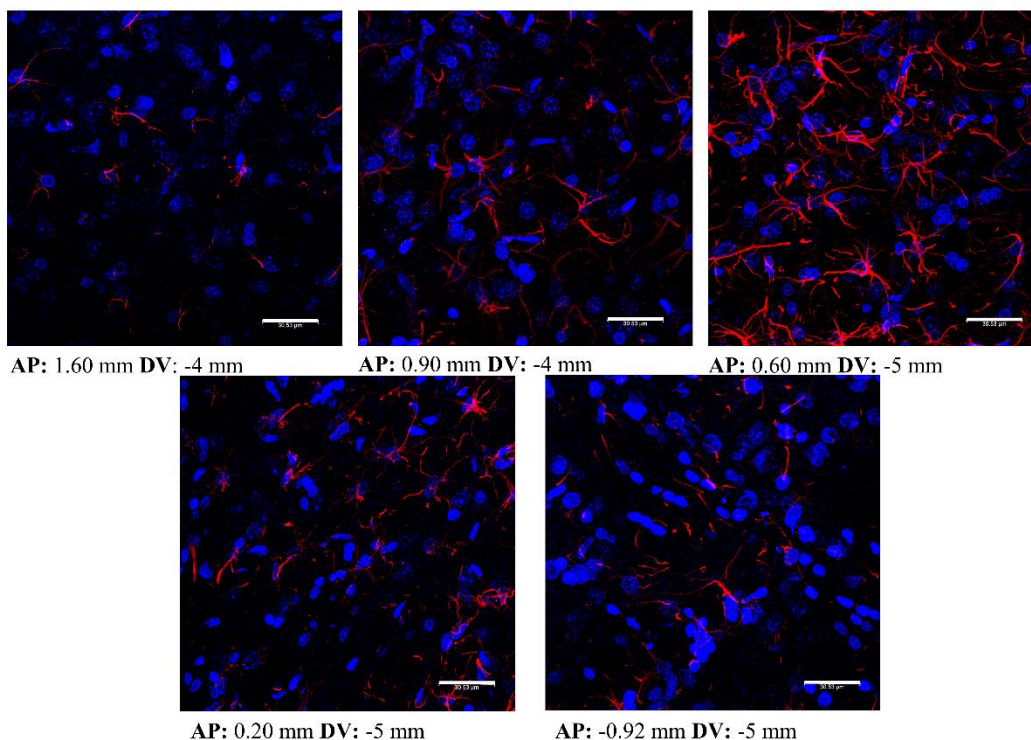


Figura 22. Distribución de los AST TH a diferentes niveles del estriado. Imágenes de microscopía confocal. DAPI para núcleos en azul y Th en rojo. Barras de escala igual a 30 μm.

La media de células Th positivas de los tres sujetos, a lo largo de las coordenadas estereotaxicas, se muestra en la figura 23. Los AST TH se pueden encontrar ampliamente distribuidas dentro del estriado, aunque con una mayor concentración en los puntos del trasplante.

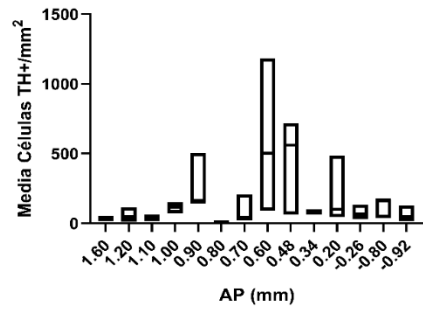


Figura 23. Media de astrocitos con doble marcaje de Th/GFAP en el estriado lesionado del grupo trasplantado con AST TH, en secuencia con diferentes niveles del estriado.

DISCUSIÓN.

Este trabajo es una prueba de concepto que utilizó un sistema CRISPR-Cas9 para tratar una enfermedad neurodegenerativa. La estrategia de este proyecto se basa en que la expresión de *Th* induce la síntesis de DA en los astrocitos ya que es la única enzima ausente en estas células para completar la ruta biosintética para producir DA (Juorio et al., 1993). Anteriormente, habíamos demostrado que la transferencia del gen *th* a los astrocitos provoca la expresión de la enzima y la recuperación motora tanto en ratas como en un modelo de primates no humanos de EP (Campos-Romo A et al., 2012; Cortez et al., 2000; Guerrero-Cázares et al., 2007; Segovia et al., 1998), demostrando así, que los astrocitos que expresan *Th*, pueden inducir la recuperación del comportamiento en diferentes modelos animales de EP. En el presente trabajo, utilizamos un enfoque nuevo y diferente: la activación del gen *th* del astrocito endógeno. SAM induce niveles transcripcionales más altos que otros sistemas de transferencia de transgenes (métodos retrovirales y lentivirales), e incluso cuando se compara con otros sistemas de activación CRISPR (Chavez et al., 2016); es muy específico, no altera el genoma ni causa rotura de la doble cadena de ADN (DSB), y la modificación epigenética es posiblemente reversible (Zhang et al., 2015).

Además, los pseudolentivirus de tercera generación (p-lenti) son un sistema de administración de genes eficiente y seguro para obtener líneas celulares estables que expresen SAM. También, el sistema lentiviral permite la entrega de múltiples sgRNAs obteniendo potencialmente la activación de varios genes dentro de la misma célula. Por último, estos virus son autoinactivables y menos inmunogénicos que los métodos anteriores de transferencia de genes virales, por lo que es uno de los métodos más seguros para ser utilizado en protocolos de terapia génica (Gándara et al., 2018; Zufferey et al., 1998).

Empleando el complejo cotranscripcional SAM, activamos la expresión del gen *th* endógeno en células de origen glial, células de glioma C6 y astrocitos de rata, los cuales sintetizaron la proteína, produjeron y liberaron DA al medio. Igualmente, cuando los astrocitos primarios modificados por SAM productores de DA se trasplantaron en un modelo de EP en rata, pudieron revertir los comportamientos motores inducidos por la lesión de 6-OHDA (Fig. 14-16). La mejoría motora es atribuible a la DA producida por los astrocitos que expresan su gen *th* endógeno, ya que no se observó ninguna mejoría conductual cuando se implantaron astrocitos que no activaban el gen.

También demostramos la expresión del gen *th* en astrocitos mediante doble marcaje con el marcador glial GFAP y Th. Además, la proteína tirosina hidroxilasa solo se detectó en el estriado lesionado de ratas implantadas con astrocitos productores de Th (AST TH), que también contenían cantidades significativas de dopamina, que estaba ausente en las ratas lesionadas que recibieron astrocitos control y no expresaron el gen *th*. Todos estos datos demuestran que es posible inducir la expresión del gen *th* endógeno de los astrocitos, con un sistema de activación CRISPR e inducir una mejora conductual en un modelo animal de EP.

Los niveles de DA en el estriado lesionado de las ratas que recibieron AST-TH fueron más bajos que los de los animales *sham* (no lesionados). Existe una amplia variación en la literatura en cuanto a la cantidad de DA necesaria para inducir la recuperación conductual después de lesiones estriatales, que puede estar alrededor del 11% en relación con las de ratas normales (Carder et al., 1989; Gundlach & Beart, 1982). Por lo tanto, los niveles reportados en este trabajo (14.42%) están dentro del rango descrito anteriormente para inducir la recuperación de la conducta motora. El efecto inducido por concentraciones más bajas de DA probablemente se deba al aumento de la vida extracelular de la DA, probablemente causado por una menor recaptación de DA, a su vez, causada por una reducción de los transportadores de DA en el lado lesionado y la hipersensibilidad de los

receptores de DA (Cragg et al., 2000; Schwarting & Huston, 1996; Ungerstedt, 1971). Consideramos que la producción de DA podría incrementarse implantando más astrocitos productores de DA en las ratas lesionadas. Elegimos la primera semana después de la lesión de 6-OHDA para seleccionar los animales en función de su comportamiento de giro, ya que una semana después de la lesión, la degeneración dopaminérgica es suficiente para inducir el deterioro motor, sin embargo, el daño completo se observa entre la tercera y cuarta semanas posterior a la lesión (Labandeira-Garcia JL et al., 1996; Sauer & Oertel, 1994; Zuch et al., 2000).

Varios argumentos respaldan el uso de los astrocitos como plataforma para producir dopamina y otras moléculas que pueden afectar el desarrollo y el tratamiento de la EP, como BDNF y GDNF, que pueden ayudar a preservar las pocas neuronas dopaminérgicas restantes y mejorar el metabolismo de la dopamina en el cuerpo estriado (Allen et al., 2013; Kirik et al., 2017). Estudios previos demostraron que la astrogliosis está presente en el sitio de la lesión en el modelo hemiparkinsoniano de 6-OHDA, en otros modelos animales y en evaluaciones *post mortem* de pacientes con EP, en donde han encontrado inflamación en el estriado afectado, específicamente astrogliosis (Choi et al., 2018; Tansey & Romero-Ramos, 2019). En la figura 20, en los sitios lesionados de ambos grupos podemos observar astrogliosis, pero no en el lado intacto, esto indica que el implante de astrocitos tanto en el grupo lesionado como en el trasplantado tienen la misma respuesta glial. La astrogliosis y los aumentos de la expresión de GFAP se han reportado en trabajos previos después de la lesión con 6-OHDA en evaluaciones a corto y largo plazo (Batassini et al., 2015; Nomura et al., 2000).

Los astrocitos pueden solo sintetizar DA a partir de levodopa y liberarla al medio. Sin embargo, si se expresa la enzima Th, los astrocitos modificados son capaces de tomar el aminoácido tirosina para producir y liberar DA (Horellou et al., 1990; Juorio et al., 1993). Asimismo, los astrocitos

poseen mecanismos de recaptura de DA para regular los niveles de DA extracelular, expresan DAT (que recicla la dopamina de vuelta a la célula) y COMT/MAO (que metaboliza la dopamina) (Asanuma et al., 2014). Por todo ello, los astrocitos son una excelente opción para expresar Th y regular los niveles de DA en los ganglios basales. Elegimos la línea de astrocitos de rata CTX-TNA2 porque la doble selección con antibióticos necesaria para crear una línea celular estable que exprese el complejo SAM requiere varios pasajes celulares. Esta línea de astrocitos no es tumorigénica (CTX TNA2, 2022), y no encontramos datos de rechazo por el huésped. Observamos (Fig. 22) la distribución de células en el cuerpo estriado lesionado nueve semanas después de la implantación. Las células parecían sanas y con una amplia distribución en el tejido, que parece seguir un gradiente desde los sitios de inyección (fig. 23).

El modelo hemiparkinsoniano de 6-OHDA, es una representación de la EP en etapa tardía, ya que provoca la muerte unilateral de las neuronas dopaminérgicas, por lo que en un hemisferio se agota la DA. Las ratas lesionadas presentan desequilibrio y asimetría motora, ya que la falta de DA induce una pérdida del control motor del lado lesionado (Truong et al., 2006). En nuestro estudio, queríamos determinar si la DA liberada por las células AST-TH, podría corregir el desequilibrio y la asimetría inducidos por la lesión de 6-OHDA. Para determinar las alteraciones motoras inducidas por el implante se utilizó una prueba farmacológica, la prueba de giros inducida por amfetamina, la cual valora la liberación de dopamina de las terminales nigroestriatales del lado intacto y la sensibilidad de los receptores DA postsinápticos. La prueba de la amfetamina nos permite evaluar la mejora de la asimetría motora inducida por el trasplante, como se ha mostrado anteriormente (Abrous et al., 1993; Corkrum et al., 2020; Torres & Dunnett, 2007).

Para evaluar otros aspectos del comportamiento motor que pueden mejorar los trasplantes, decidimos realizar una prueba espontánea (prueba del cilindro) y una prueba que requiere

entrenamiento (prueba de la viga inclinada). La prueba del cilindro evalúa la asimetría y la función sensorio-motora que presentan las ratas lesionadas, y la prueba de la viga inclinada es una evaluación del equilibrio sensorio-motor y del desempeño motor. Las ratas que recibieron AST-TH mostraron una mejora en todas las pruebas, lo que demuestra que los astrocitos modificados con SAM, son capaces de expresar su gen *th* endógeno, son funcionales en un modelo *in vivo* de EP.

Elegimos el sistema SAM como un primer enfoque de un experimento de prueba de concepto porque es robusto, estable y tiene una alta capacidad para activar genes endógenos en células de mamíferos (Zhang et al., 2015), activación transcripcional de genes múltiples (Konermann et al., 2015) y la generación de iPSC de fibroblastos humanos (Xiong et al., 2016). Por otra parte, las células modificadas con SAM se han utilizado en un modelo de ratón con síndrome metabólico con buenos resultados (Wang et al., 2020). Esto indica que SAM se puede utilizar para reprogramar otras células de mamíferos, además de los astrocitos, y quizás también transferir directamente el sistema SAM a los astrocitos cerebrales endógenos, sin necesidad de implantar células externas.

El rompimiento de ADN de doble cadena (DSB) ocurre cuando se usa CRISPR, lo que provoca mutaciones que podrían transformar las células y alterar la expresión génica (Fu et al., 2013; Hsu et al., 2013; Leibowitz et al., 2021; Nahmad et al., 2022; Zuccaro et al., 2020). Sin embargo, el sistema SAM no causa DSB y por lo tanto, no presenta este tipo de problema. La respuesta inmune del huésped a las proteínas Cas puede ser una preocupación (Tang et al., 2022), pero como han demostrado otros estudios, la mejora de los sistemas CRISPR-Cas menos inmunogénicos y de mayor fidelidad, junto con sistemas de administración nuevos, más específicos y seguros, pueden superar los problemas antes mencionados asociados con el uso de CRISPR-Cas para la terapia (Bravo et al., 2022; Chen et al., 2017; Kleinstiver et al., 2016).

CONCLUSIÓN.

En resumen, mostramos un trabajo de prueba de concepto que demuestra la capacidad funcional de los astrocitos que expresan el gen *th* endógeno para producir DA, e inducir una mejoría del comportamiento motor en un modelo experimental de EP en ratas. Por lo tanto, esta prueba de concepto demuestra que un sistema CRISPR de activación, puede utilizarse como terapia génica para enfermedades neurodegenerativas que tienen un componente multifactorial y no solamente monogénico.

PERSPECTIVAS.

- Este mismo enfoque se puede mejorar logrando la expresión de otras proteínas que pueden proteger las neuronas, como factores neurotróficos como BDNF y GDNF que pueden incrementar el metabolismo de la DA en el cuerpo estriado (Grondin & Gash, 1998; Jin, 2020), y utilizando diferentes tipos de células como células iPSC para mejorar la integración de las células dentro de los circuitos neuronales de los ganglios basales.
- Este sistema también puede mejorar utilizando nuevos sistemas de entrega de genes *in situ*, para descartar el uso de trasplante y utilizar un método más seguro.
- El abordaje terapéutico utilizado puede mejorarse mediante el uso de inhibidores farmacológicos de la COMT y de la MAO-B para aumentar los niveles de DA en el espacio extracelular.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abrous, D. N., Shaltot A, Torres E M, & Dunnett, S. B. (1993). Dopamine-rich grafts in the neostriatum and/or nucleus accumbens: Effects on drug-induced behaviours and skilled paw-reaching. *Neuroscience*, *53*(1), 187–197.
- Ai, Y., Markesbery, W., Zhang, Z., Grondin, R., Elseberry, D., Gerhardt, G. A., & Gash, D. M. (2003). Intraputaminal infusion of GDNF in aged rhesus monkeys: Distribution and dopaminergic effects. *The Journal of Comparative Neurology*, *461*(2), 250–261. <https://doi.org/10.1002/cne.10689>
- Alerasool, N., Segal, D., Lee, H., & Taipale, M. (2020). An efficient KRAB domain for CRISPRi applications in human cells. *Nature Methods*, *17*(11), 1093–1096. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0966-x>
- Allen, S. J., Watson, J. J., Shoemark, D. K., Barua, N. U., & Patel, N. K. (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 138, Issue 2, pp. 155–175). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.004>
- Armstrong, M. J., & Okun, M. S. (2020). Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. In *JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 323, Issue 6, pp. 548–560). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360>
- Asanuma, M., Miyazaki, I., Murakami, S., Diaz-Corrales, F. J., & Ogawa, N. (2014). Striatal Astrocytes Act as a Reservoir for L-DOPA. *PLoS ONE*, *9*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106362.g001>
- Azzouz, M., Martin-Rendon, E., Barber, R. D., Mitrophanous, K. A., Carter, E. E., Rohll, J. B., Kingsman, S. M., Kingsman, A. J., & Mazarakis, N. D. (2002). Multicistronic Lentiviral

Vector-Mediated Striatal Gene Transfer of Aromatic l-Amino Acid Decarboxylase, Tyrosine Hydroxylase, and GTP Cyclohydrolase I Induces Sustained Transgene Expression, Dopamine Production, and Functional Improvement in a Rat Model of Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 22(23), 10302–10312. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-23-10302.2002>

Balboa, D., Weltner, J., Eurola, S., Trokovic, R., Wartiovaara, K., & Otonkoski, T. (2015). Conditionally Stabilized dCas9 Activator for Controlling Gene Expression in Human Cell Reprogramming and Differentiation. *Stem Cell Reports*, 5(3), 448–459. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.08.001>

Batassini, C., Broetto, N., Tortorelli, L. S., Borsoi, M., Zanotto, C., Galland, F., Souza, T. M., Leite, M. C., & Gonçalves, C. A. (2015). Striatal injury with 6-OHDA transiently increases cerebrospinal GFAP and S100B. *Neural Plasticity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/387028>

Bezard, E., Gross, C. E., Fournier, M. C., Dovero, S., Bloch, B., & Jaber, M. (1999). Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Experimental Neurology*, 155(2), 268–273. <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6995>

Bhatia, K. P., & Stamelou, M. (2017). Nonmotor Features in Atypical Parkinsonism. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 134, pp. 1285–1301). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2017.06.001>

Birkmayer, W., & Hornykiewicz, O. (1961). [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 73, 787–788.

- Björklund, A., & Dunnett, S. B. (2019). The amphetamine induced rotation test: A re-assessment of its use as a tool to monitor motor impairment and functional recovery in rodent models of Parkinson's disease. In *Journal of Parkinson's Disease* (Vol. 9, Issue 1, pp. 17–29). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JPD-181525>
- Black, J. B., Adler, A. F., Wang, H. G., D'Ippolito, A. M., Hutchinson, H. A., Reddy, T. E., Pitt, G. S., Leong, K. W., & Gersbach, C. A. (2016). Targeted Epigenetic Remodeling of Endogenous Loci by CRISPR/Cas9-Based Transcriptional Activators Directly Converts Fibroblasts to Neuronal Cells. *Cell Stem Cell*, *19*(3), 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.001>
- Blandini, F., Levandis, G., Bazzini, E., Nappi, G., & Armentero, M.-T. (2007). Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *European Journal of Neuroscience*, *25*(2), 397–405. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05285.x>
- Boch, J., & Bonas, U. (2010). Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annual Review of Phytopathology*, *48*(1), 419–436. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>
- Bonifati, V., Rizzu, P., Van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., Dekker, M. C. J., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., Van Dongen, J. W., Vanacore, N., Van Swieten, J. C., Brice, A., Meco, G., Van Duijn, C. M., Oostra, B. A., & Heutink, P. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, *299*(5604), 256–259. <https://doi.org/10.1126/science.1077209>

- Bose, A., & Beal, M. F. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. In *Journal of Neurochemistry* (pp. 216–231). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.13731>
- Bravo, J. P. K., Liu, M. Sen, Hibshman, G. N., Dangerfield, T. L., Jung, K., McCool, R. S., Johnson, K. A., & Taylor, D. W. (2022). Structural basis for mismatch surveillance by CRISPR–Cas9. *Nature*, *603*(7900), 343–347. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04470-1>
- Campos-Romo A, Ojeda-Flores R, Moreno-Briseño P, Vergara P, Segovia J, Carrillo-Ruiz JD, & Fernandez-Ruiz J. (2012). Behavioral improvement in MPTP-treated nonhuman primates in the HALLWAY task after transfer of TH cDNA to host astrocytes. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *72*(2), 166–176.
- Carder, R. K., Jackson, D., Morris, H. J., Lund, R. D., & Zigmond, M. J. (1989). *Dopamine Released from Mesencephalic Transplants Restores Modulation of Striatal Acetylcholine Release after Neonatal 6-Hydroxydopamine: An in Vitro Analysis*.
- Carta, M., Carlsson, T., Kirik, D., & Bjorklund, A. (2007). Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain*, *130*(7), 1819–1833. <https://doi.org/10.1093/brain/awm082>
- Chavez, A., Tuttle, M., Pruitt, B. W., Ewen-Campen, B., Chari, R., Ter-Ovanesyan, D., Haque, S. J., Cecchi, R. J., Kowal, E. J. K., Buchthal, J., Housden, B. E., Perrimon, N., Collins, J. J., & Church, G. (2016). Comparison of Cas9 activators in multiple species. *Nature Methods*, *13*(7), 563–567. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3871>
- Chen, J. S., Dagdas, Y. S., Kleinstiver, B. P., Welch, M. M., Sousa, A. A., Harrington, L. B., Sternberg, S. H., Joung, J. K., Yildiz, A., & Doudna, J. A. (2017). Enhanced proofreading

governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, 550(7676), 407–410.
<https://doi.org/10.1038/nature24268>

Chen, R., Classen, J., Gerloff, C., Celnik, P., Wassermann, E. M., Hallett, M., & Cohen, L. G. (1997). Depression of motor cortex excitability by low-frequency transcranial magnetic stimulation. *Neurology*, 48(5), 1398–1403. <https://doi.org/10.1212/WNL.48.5.1398>

Choi, D. J., Kwon, J. K., & Joe, E. H. (2018). A Parkinson's disease gene, DJ-1, regulates astrogliosis through STAT3. *Neuroscience Letters*, 685, 144–149.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.08.025>

Christine, C. W., Starr, P. A., Larson, P. S., Eberling, J. L., Jagust, W. J., Hawkins, R. A., VanBrocklin, H. F., Wright, J. F., Bankiewicz, K. S., & Aminoff, M. J. (2009). Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*, 73(20), 1662–1669. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c29356>

Cik, M., Masure, S., Lesage, A. S. J., Van der Linden, I., Van Gompel, P., Pangalos, M. N., Gordon, R. D., & Leysen, J. E. (2000). Binding of GDNF and Neurturin to Human GDNF Family Receptor α 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 27505–27512.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M000306200>

Collier, T. J., & Sortwell, C. E. (1999). Therapeutic Potential of Nerve Growth Factors in Parkinson's Disease. *Drugs & Aging*, 14(4), 261–287. <https://doi.org/10.2165/00002512-199914040-00003>

Corkrum, M., Covelo, A., Lines, J., Bellocchio, L., Pisansky, M., Loke, K., Quintana, R., Rothwell, P. E., Lujan, R., Marsicano, G., Martin, E. D., Thomas, M. J., Kofuji, P., & Araque, A. (2020).

Dopamine-Evoked Synaptic Regulation in the Nucleus Accumbens Requires Astrocyte Activity. *Neuron*, *105*(6), 1036-1047.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.12.026>

Cortez, N., Trejo, F., Vergara, P., & Segovia, J. (2000). Primary astrocytes retrovirally transduced with a tyrosine hydroxylase transgene driven by a Glial-Specific promoter elicit behavioral recovery in experimental Parkinsonism. *J Neurosci Res.* , *59*(1), 39–46.

Cragg, S. J., Clarke, D. J., & Greenfield, S. A. (2000). Real-time dynamics of dopamine released from neuronal transplants in experimental Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, *164*(1), 145–153. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7420>

Cruz-Trujillo, R., Avalos-Fuentes, A., Rangel-Barajas, C., Paz-Bermúdez, F., Sierra, A., Escartín-Perez, E., Aceves, J., Erlij, D., & Florán, B. (2013). D3 dopamine receptors interact with dopamine D1 but not D4 receptors in the GABAergic terminals of the SNr of the rat. *Neuropharmacology*, *67*, 370–378. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.11.032>

CTX TNA2. (2022). ATCC. <https://www.atcc.org/products/crl-2006#product-references>

Cui, M., Aras, R., Christian, W. V, Rappold, P. M., Hatwar, M., Panza, J., Jackson-Lewis, V., Javitch, J. A., Ballatori, N., Przedborski, S., & Tieu, K. (2009). The organic cation transporter-3 is a pivotal modulator of neurodegeneration in the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(19), 8043–8048. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900358106>

Danzer, K. M., Haasen, D., Karow, A. R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B., & Kostka, M. (2007). Different species of α -synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *Journal of Neuroscience*, *27*(34), 9220–9232. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2617-07.2007>

- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889–909. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00568-3)
- Di Maio, R., Barrett, P. J., Hoffman, E. K., Barrett, C. W., Zharikov, A., Borah, A., Hu, X., McCoy, J., Chu, C. T., Burton, E. A., Hastings, T. G., & Greenamyre, J. T. (2016). α -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Science Translational Medicine*, 8(342), 342–378. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf3634>
- Diao, J., Burré, J., Vivona, S., Cipriano, D. J., Sharma, M., Kyoung, M., Südhof, T. C., & Brunger, A. T. (2013). Native α -synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2. *ELife*, 2013(2). <https://doi.org/10.7554/eLife.00592>
- Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013). The role of oxidative stress in parkinson's disease. In *Journal of Parkinson's Disease* (Vol. 3, Issue 4, pp. 461–491). I O S Press. <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>
- Ding, Y.-X., Xia, Y., Jiao, X.-Y., Duan, L., Yu, J., Wang, X., & Chen, L.-W. (2011). The TrkB-Positive Dopaminergic Neurons are Less Sensitive to MPTP Insult in the Substantia Nigra of Adult C57/BL Mice. *Neurochemical Research*, 36(10), 1759–1766. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0491-5>
- Drucker-Colín, R., & García-Hernández, F. (1991). A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function. *Journal of Neuroscience Methods*, 39(2), 153–161. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90081-A](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90081-A)

- During, M., Samulski, R., Elsworth, J., Kaplitt, M., Leone, P., Xiao, X., Li, J., Freese, A., Taylor, J., Roth, R., Sladek, J., O'Malley, K., & Redmond, D. (1998). In vivo expression of therapeutic human genes for dopamine production in the caudates of MPTP-treated monkeys using an AAV vector. *Gene Therapy*, 5(6), 820–827. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300650>
- Emborg, M. E., Carbon, M., Holden, J. E., During, M. J., Ma, Y., Tang, C., Moirano, J., Fitzsimons, H., Roitberg, B. Z., Tuccar, E., Roberts, A., Kaplitt, M. G., & Eidelberg, D. (2007). Subthalamic Glutamic Acid Decarboxylase Gene Therapy: Changes in Motor Function and Cortical Metabolism. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 27(3), 501–509. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600364>
- Espadas-Alvarez, A. J., Bannon, M. J., Orozco-Barrios, C. E., Escobedo-Sanchez, L., Ayala-Davila, J., Reyes-Corona, D., Soto-Rodriguez, G., Escamilla-Rivera, V., De Vizcaya-Ruiz, A., Eugenia Gutierrez-Castillo, M., Padilla-Viveros, A., & Martinez-Fong, D. (2017). Regulation of human GDNF gene expression in nigral dopaminergic neurons using a new doxycycline-regulated NTS-polyplex nanoparticle system. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(4), 1363–1375. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.02.006>
- Eusebio, A., Cagnan, H., & Brown, P. (2012). Does suppression of oscillatory synchronisation mediate some of the therapeutic effects of DBS in patients with Parkinson's disease? *Frontiers in Integrative Neuroscience*, JULY 2012. <https://doi.org/10.3389/fnint.2012.00047>
- Fan, D., Shen, Y., Kang, D., Nakano, I., & Ozawa, K. (2001). Adeno-associated virus vector-mediated triple gene transfer of dopamine synthetic enzymes. *Chinese Medical Journal*, 114(12), 1276–1279.

- Fantini, M. L., Macedo, L., Zibetti, M., Sarchioto, M., Vidal, T., Pereira, B., Marques, A., Debilly, B., Derost, P., Ulla, M., Vitello, N., Cicolin, A., Lopiano, L., & Durif, F. (2015). Increased risk of impulse control symptoms in Parkinson's disease with REM sleep behaviour disorder. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 86(2), 174–179. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-307904>
- Farrer, M., Kachergus, J., Forno, L., Lincoln, S., Wang, D.-S., Hulihan, M., Maraganore, D., Gwinn-Hardy, K., Wszolek, Z., Dickson, D., & Langston, J. W. (2004). Comparison of Kindreds with Parkinsonism and-Synuclein Genomic Multiplications. In *Ann Neurol* (Vol. 55).
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. (2007). G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39(2), 175–191. <https://doi.org/10.3758/BF03193146>
- Fearnley, J. M., & Lees, A. J. (1991). AGEING AND PARKINSON'S DISEASE: SUBSTANTIA NIGRA REGIONAL SELECTIVITY. In *Brain* (Vol. 114). <http://brain.oxfordjournals.org/>
- Fellner, L., Irschick, R., Schanda, K., Reindl, M., Klimaschewski, L., Poewe, W., Wenning, G. K., & Stefanova, N. (2013). Toll-like receptor 4 is required for α -synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *GLIA*, 61(3), 349–360. <https://doi.org/10.1002/glia.22437>
- Finkel, R. S., McDermott, M. P., Kaufmann, P., Darras, B. T., Chung, W. K., Sproule, D. M., Kang, P. B., Foley, A. R., Yang, M. L., Martens, W. B., Oskoui, M., Glanzman, A. M., Flickinger, J., Montes, J., Dunaway, S., O'Hagen, J., Quigley, J., Riley, S., Benton, M., ... De Vivo, D. C. (2014). Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. *Neurology*, 83(9), 810–817. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000741>

- Forsayeth, J. R., Eberling, J. L., Sanftner, L. M., Zhen, Z., Pivrotto, P., Bringas, J., Cunningham, J., & Bankiewicz, K. S. (2006). A Dose-Ranging Study of AAV-hAADC Therapy in Parkinsonian Monkeys. *Molecular Therapy*, 14(4), 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.04.008>
- Friedmann, T., & Roblin, R. (1972). Gene Therapy for Human Genetic Disease? *Science*, 175(4025), 949–955. <https://doi.org/10.1126/science.175.4025.949>
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31(9), 822–826. <https://doi.org/10.1038/nbt.2623>
- Gándara, C., Affleck, V., & Stoll, E. A. (2018). Manufacture of third-generation lentivirus for preclinical use, with process development considerations for translation to good manufacturing practice. *Human Gene Therapy Methods*, 29(1), 1–15. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2017.098>
- Gilbert, L. A., Horlbeck, M. A., Adamson, B., Villalta, J. E., Chen, Y., Whitehead, E. H., Guimaraes, C., Panning, B., Ploegh, H. L., Bassik, M. C., Qi, L. S., Kampmann, M., & Weissman, J. S. (2014). Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*, 159(3), 647–661. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.029>
- Gill, S. S., Patel, N. K., Hotton, G. R., O’Sullivan, K., McCarter, R., Bunnage, M., Brooks, D. J., Svendsen, C. N., & Heywood, P. (2003). Direct brain infusion of glial cell line–derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nature Medicine*, 9(5), 589–595. <https://doi.org/10.1038/nm850>

- Goker-Alpan, O., Schiffmann, R., LaMarca, M. E., Nussbaum, R. L., McInerney-Leo, A., & Sidransky, E. (2004). Parkinsonism among Gaucher disease carriers. *Journal of Medical Genetics*, *41*(12), 937–940. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.024455>
- Gray, M. T., & Woulfe, J. M. (2015). Striatal blood-brain barrier permeability in Parkinson's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *35*(5), 747–750. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.32>
- Grondin, R., & Gash, D. M. (1998). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, *245*(11 Suppl 3), P35-42. <https://doi.org/10.1007/pl00007744>
- Grondin, R., Zhang, Z., Yi, A., Cass, W. A., Maswood, N., Andersen, A. H., Elsberry, D. D., Klein, M. C., Gerhardt, G. A., & Gash, D. M. (2002). Chronic, controlled GDNF infusion promotes structural and functional recovery in advanced parkinsonian monkeys. *Brain*, *125*(10), 2191–2201. <https://doi.org/10.1093/brain/awf234>
- Gu, M. J., Jeon, J. H., Oh, M. S., & Hong, S. P. (2016). Measuring levels of biogenic amines and their metabolites in rat brain tissue using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Archives of Pharmacal Research*, *39*(1), 59–65. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0661-0>
- Gu, X.-L., Long, C.-X., Sun, L., Xie, C., Lin, X., & Cai, H. (2010). Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T α -synuclein causes neurodegeneration in mice. *Molecular Brain*, *3*, 12. <http://www.molecularbrain.com/content/3/1/12>
- Guerrero-Cázares, H., Alatorre-Carranza, M. del P., Delgado-Rizo, V., Duenas-Jimenez, J. M., Mendoza-Magana, M. L., Morales-Villagran, A., Ramirez-Herrera, M. A., Guerrero-

- Hernández, A., Segovia, J., & Duenas-Jimenez, S. H. (2007). Dopamine release modifies intracellular calcium levels in tyrosine hydroxylase-transfected C6 cells. *Brain Research Bulletin*, 74(1–3), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.05.008>
- Gundlach, A. L., & Beart, P. M. (1982). Neurochemical studies of the mesolimbic dopaminergic pathway: glycinergic mechanisms and glycinergic-dopaminergic interactions in the rat ventral tegmentum. *J Neurochem.* , 38(2), 574–581.
- Guze, S. B. (1995). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. (DSM-IV). *American Journal of Psychiatry*, 152(8), 1228–1228. <https://doi.org/10.1176/ajp.152.8.1228>
- Hayes, M. T. (2019). Parkinson’s Disease and Parkinsonism. In *American Journal of Medicine* (Vol. 132, Issue 7, pp. 802–807). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.03.001>
- Heumann, R., Moratalla, R., Herrero, M. T., Chakrabarty, K., Drucker-Colín, R., Garcia-Montes, J. R., Simola, N., & Morelli, M. (2014). Dyskinesia in Parkinson’s disease: Mechanisms and current non-pharmacological interventions. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 130, Issue 4, pp. 472–489). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.12751>
- Hilton, I. B., D’Ippolito, A. M., Vockley, C. M., Thakore, P. I., Crawford, G. E., Reddy, T. E., & Gersbach, C. A. (2015). Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology*, 33(5), 510–517. <https://doi.org/10.1038/nbt.3199>
- Horellou, P., Marlier’, L., Privat’, A., & Mallet, J. (1990). Behavioural Effect of Engineered Cells that Synthesize L-DOPA or Dopamine after Grafting into the Rat Neostriatum. *European Journal of Neuroscience*, 2, 116–119.

- Houeto, J. L., Damier, P., Bejjani, P. B., Staedler, C., Bonnet, A. M., Arnulf, I., Pidoux, B., Dormont, D., Cornu, P., & Agid, Y. (2000). Subthalamic Stimulation in Parkinson Disease. *Archives of Neurology*, *57*(4), 461. <https://doi.org/10.1001/archneur.57.4.461>
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G., & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, *31*(9), 827–832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- Hudson, J. L., Van Horne, C. G., Strömberg, I., Brock, S., Clayton, J., Masserano, J., Hoffer, B. J., & Gerhardt, G. A. (1993). Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. In *Brain Research* (Vol. 626).
- Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y.-A., Juhasz, M., Yancopoulos, G. D., Squinto, S. P., & Lindsay, R. M. (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*, *350*(6315), 230–232. <https://doi.org/10.1038/350230a0>
- Imaoka, T., Date, I., Ohmoto, T., & Nagatsu, T. (1998). Significant Behavioral Recovery in Parkinson's Disease Model by Direct Intracerebral Gene Transfer Using Continuous Injection of a Plasmid DNA–Liposome Complex. *Human Gene Therapy*, *9*(7), 1093–1102. <https://doi.org/10.1089/hum.1998.9.7-1093>
- Jana, S., Sinha, M., Chanda, D., Roy, T., Banerjee, K., Munshi, S., Patro, B. S., & Chakrabarti, S. (2011). Mitochondrial dysfunction mediated by quinone oxidation products of dopamine: Implications in dopamine cytotoxicity and pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochimica et*

Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 1812(6), 663–673.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.013>

Jankovic, J., & Tan, E. K. (2020). Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 91(8), 795–808. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322338>

Javitch, J. A., D'Amato, R. J., Strittmatter, S. M., & Snyder, S. H. (1985). Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(7), 2173–2177. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.7.2173>

Jin, W. (2020). Regulation of BDNF-TrkB signaling and potential therapeutic strategies for parkinson's disease. *Journal of Clinical Medicine*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/jcm9010257>

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

Juorio, A. V., Li, X.-M., Walz, W., & Paterson, I. A. (1993). Decarboxylation of Dopa by cultured mouse astrocytes. *Brain Research*, 626(1–2), 306–309. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90592-B](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90592-B)

Kaplitt, M. G., Feigin, A., Tang, C., Fitzsimons, H. L., Mattis, P., Lawlor, P. A., Bland, R. J., Young, D., Strybing, K., Eidelberg, D., & During, M. J. (2007). Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label,

phase I trial. *The Lancet*, 369(9579), 2097–2105. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60982-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60982-9)

Kaplitt, M. G., Leone, P., Samulski, R. J., Xiao, X., Pfaff, D. W., O'Malley, K. L., & During, M. J. (1994). Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nature Genetics*, 8(2), 148–154. <https://doi.org/10.1038/ng1094-148>

Khan, A. U., Akram, M., Daniyal, M., & Zainab, R. (2019). Awareness and current knowledge of Parkinson's disease: a neurodegenerative disorder. In *International Journal of Neuroscience* (Vol. 129, Issue 1, pp. 55–93). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1486837>

Khedr, E. M., Mohamed, K. O., Ali, A. M., & Hasan, A. M. (2020). The effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on cognitive impairment in Parkinson's disease with dementia: Pilot study. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 38(1), 55–66. <https://doi.org/10.3233/RNN-190956>

Kin, K., Yasuhara, T., Kameda, M., & Date, I. (2019). Animal models for Parkinson's disease research: Trends in the 2000s. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20215402>

Kirik, D., Cederfjäll, E., Halliday, G., & Petersén. (2017). Gene therapy for Parkinson's disease: Disease modification by GDNF family of ligands. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 97, pp. 179–188). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.09.008>

Klegeris, A., Giasson, B. I., Zhang, H., Maguire, J., Pelech, S., & McGeer, P. L. (2006). Alpha-synuclein and its disease-causing mutants induce ICAM-1 and IL-6 in human astrocytes and

- astrocytoma cells. *The FASEB Journal*, 20(12), 2000–2008. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6183com>
- Klein, R. L., Lewis, M. H., Muzyczka, N., & Meyer, E. M. (1999). Prevention of 6-hydroxydopamine-induced rotational behavior by BDNF somatic gene transfer. *Brain Research*, 847(2), 314–320. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02116-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02116-2)
- Kleinstiver, B. P., Pattanayak, V., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Zheng, Z., & Joung, J. K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529(7587), 490–495. <https://doi.org/10.1038/nature16526>
- Kogan, M., McGuire, M., & Riley, J. (2019). Deep Brain Stimulation for Parkinson Disease. *Neurosurgery Clinics of North America*, 30(2), 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2019.01.001>
- Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A. E., Joung, J., Abudayyeh, O. O., Barcena, C., Hsu, P. D., Habib, N., Gootenberg, J. S., Nishimasu, H., Nureki, O., & Zhang, F. (2015). Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517(7536), 583–588. <https://doi.org/10.1038/nature14136>
- Kordower, J. H., Herzog, C. D., Dass, B., Bakay, R. A. E., Stansell, J., Gasmi, M., & Bartus, R. T. (2006). Delivery of neurturin by AAV2 (CERE-120)-mediated gene transfer provides structural and functional neuroprotection and neurorestoration in MPTP-treated monkeys. *Annals of Neurology*, 60(6), 706–715. <https://doi.org/10.1002/ana.21032>
- Labandeira-Garcia JL, Rozas G, Lopez-Martin E, Liste I, & Guerra MJ. (1996). Time course of striatal changes induced by 6-hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal pathway, as studied

by combined evaluation of rotational behaviour and striatal Fos expression. *Experimental Brain Research*, 108(1), 69–84.

Landers, M. R., Kinney, J. W., & Van Breukelen, F. (2014). Forced exercise before or after induction of 6-OHDA-mediated nigrostriatal insult does not mitigate behavioral asymmetry in a hemiparkinsonian rat model. *Brain Research*, 1543, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.10.054>

Lapchak, P. A., Beck, K. D., Araujo, D. M., Irwin, I., Langston, J. W., & Hefti, F. (1993). Chronic intranigral administration of brain-derived neurotrophic factor produces striatal dopaminergic hypofunction in unlesioned adult rats and fails to attenuate the decline of striatal dopaminergic function following medial forebrain bundle transection. *Neuroscience*, 53(3), 639–650. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90612-J](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90612-J)

Lee, B., Lee, H., Nam, Y. R., Oh, J. H., Cho, Y. H., & Chang, J. W. (2005). Enhanced expression of glutamate decarboxylase 65 improves symptoms of rat parkinsonian models. *Gene Therapy*, 12(15), 1215–1222. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302520>

Lee, W. Y., Lee, E. A., Jeon, M. Y., Kang, H. Y., & Park, Y. G. (2006). Vesicular monoamine transporter-2 and aromatic l-amino acid decarboxylase gene therapy prevents development of motor complications in parkinsonian rats after chronic intermittent 1-3,4-dihydroxyphenylalanine administration. *Experimental Neurology*, 197(1), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.09.012>

Leibowitz, M. L., Papathanasiou, S., Doerfler, P. A., Blaine, L. J., Sun, L., Yao, Y., Zhang, C. Z., Weiss, M. J., & Pellman, D. (2021). Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR–

Cas9 genome editing. *Nature Genetics*, 53(6), 895–905. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00838-7>

Leu-Fen H., Lin, D. H., Doherty, J. D., Lile, S. B., & Frank Collins. (1993). GDNF: a Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor for Midbrain Dopaminergic Neurons. *Science*, 260(5111), 1130–1132. [https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.8493557](https://doi.org/10.1126/science.8493557)

LeWitt, P. A., Rezai, A. R., Leehey, M. A., Ojemann, S. G., Flaherty, A. W., Eskandar, E. N., Kostyk, S. K., Thomas, K., Sarkar, A., Siddiqui, M. S., Tatter, S. B., Schwalb, J. M., Poston, K. L., Henderson, J. M., Kurlan, R. M., Richard, I. H., Van Meter, L., Sapan, C. V, Doring, M. J., ... Feigin, A. (2011). AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *The Lancet Neurology*, 10(4), 309–319. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70039-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70039-4)

Liao, H. K., Hatanaka, F., Araoka, T., Reddy, P., Wu, M. Z., Sui, Y., Yamauchi, T., Sakurai, M., O'Keefe, D. D., Núñez-Delicado, E., Guillen, P., Campistol, J. M., Wu, C. J., Lu, L. F., Esteban, C. R., & Izpisua Belmonte, J. C. (2017). In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation. *Cell*, 171(7), 1495-1507.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.025>

Liu, G., Zhang, C., Yin, J., Li, X., Cheng, F., Li, Y., Yang, H., Uéda, K., Chan, P., & Yu, S. (2009). α -Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neuroscience Letters*, 454(3), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.02.056>

- Luo, J., Kaplitt, M. G., Fitzsimons, H. L., Zuzga, D. S., Liu, Y., Oshinsky, M. L., & During, M. J. (2002). Subthalamic GAD Gene Therapy in a Parkinson's Disease Rat Model. *Science*, 298(5592), 425–429. <https://doi.org/10.1126/science.1074549>
- Maeder, M. L., Linder, S. J., Cascio, V. M., Fu, Y., Ho, Q. H., & Joung, J. K. (2013). CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nature Methods*, 10(10), 977–979. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2598>
- Mak, S. K., McCormack, A. L., Manning-Bog, A. B., Cuervo, A. M., & Di Monte, D. A. (2010). Lysosomal degradation of α -synuclein in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 285(18), 13621–13629. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.074617>
- Margolin, J. F., Friedman, J. R., K-H MEYERt, W., Vissing, H., THIESENt, H., & Rauscher Iii, F. J. (1994). Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains (zinc finger protein/gene regulatlon/transcriptional regulatlon/GAL4). In *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* (Vol. 91).
- Marks, W. J., Bartus, R. T., Siffert, J., Davis, C. S., Lozano, A., Boulis, N., Vitek, J., Stacy, M., Turner, D., Verhagen, L., Bakay, R., Watts, R., Guthrie, B., Jankovic, J., Simpson, R., Tagliati, M., Alterman, R., Stern, M., Baltuch, G., ... Olanow, C. W. (2010). Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *The Lancet Neurology*, 9(12), 1164–1172. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70254-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70254-4)
- Marks, W. J., Ostrem, J. L., Verhagen, L., Starr, P. A., Larson, P. S., Bakay, R. A., Taylor, R., Cahn-Weiner, D. A., Stoessl, A. J., Olanow, C. W., & Bartus, R. T. (2008). Safety and tolerability of intraputaminial delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2–neurturin) to

- patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *The Lancet Neurology*, 7(5), 400–408. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70065-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70065-6)
- Martínez-Ramírez, D., Rodríguez-Violante, M., Velázquez-Ávila, E. S., Cervantes-Arriaga, A., González-Cantú, A., Corona, T., & Velásquez-Pérez, L. (2020). Incidencia y distribución geográfica de la enfermedad de Parkinson en México. In *Salud Publica de Mexico* (Vol. 62, Issue 6, pp. 873–875). Instituto Nacional de Salud Publica. <https://doi.org/10.21149/11750>
- Maswood, N., GRONDIN, R., ZHANG, Z., STANFORD, J., SURGENER, S., GASH, D., & GERHARDT, G. (2002). Effects of chronic intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in aged Rhesus monkeys. *Neurobiology of Aging*, 23(5), 881–889. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00022-2](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00022-2)
- McGregor, M. M., & Nelson, A. B. (2019). Circuit Mechanisms of Parkinson's Disease. In *Neuron* (Vol. 101, Issue 6, pp. 1042–1056). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.004>
- Meiser, J., Weindl, D., & Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. In *Cell Communication and Signaling* (Vol. 11). <http://www.biosignaling.com/content/11/1/34>
- Mendell, J. R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W. D., Rodino-Klapac, L. R., Prior, T. W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., Kissel, J. T., Nagendran, S., L'Italien, J., Sproule, D. M., Wells, C., Cardenas, J. A., Heitzer, M. D., Kaspar, A., Corcoran, S., ... Kaspar, B. K. (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine*, 377(18), 1713–1722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706198>
- Meredith, G. E., & Rademacher, D. J. (2011). MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *Journal of Parkinson's Disease*, 1(1), 19–33. <https://doi.org/10.3233/JPD-2011-11023>

- Morgante, F., Espay, A. J., Gunraj, C., Lang, A. E., & Chen, R. (2006). Motor cortex plasticity in Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesias. *Brain*, *129*(4), 1059–1069. <https://doi.org/10.1093/brain/awl031>
- Moscou, M. J., & Bogdanove, A. J. (2009). A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science*, *326*(5959), 1501–1501. <https://doi.org/10.1126/science.1178817>
- Muramatsu, S., Fujimoto, K., Kato, S., Mizukami, H., Asari, S., Ikeguchi, K., Kawakami, T., Urabe, M., Kume, A., Sato, T., Watanabe, E., Ozawa, K., & Nakano, I. (2010). A Phase I Study of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Molecular Therapy*, *18*(9), 1731–1735. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.135>
- Muramatsu, S.-I., Fujimoto, K.-I., Ikeguchi, K., Shizuma, N., Kawasaki, K., Ono, F., Shen, Y., Wang, L., Mizukami, H., Kume, A., Matsumura, M., Nagatsu, I., Urano, F., Ichinose, H., Nagatsu, T., Terao, K., Nakano, I., & Ozawa, K. (2002). Behavioral Recovery in a Primate Model of Parkinson's Disease by Triple Transduction of Striatal Cells with Adeno-Associated Viral Vectors Expressing Dopamine-Synthesizing Enzymes. *Human Gene Therapy*, *13*(3), 345–354. <https://doi.org/10.1089/10430340252792486>
- Nahmad, A. D., Reuveni, E., Goldschmidt, E., Tenne, T., Liberman, M., Horovitz-Fried, M., Khosravi, R., Kobo, H., Reinstein, E., Madi, A., Ben-David, U., & Barzel, A. (2022). Frequent aneuploidy in primary human T cells after CRISPR–Cas9 cleavage. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01377-0>
- Nalls, M. A., Blauwendraat, C., Vallerga, C. L., Heilbron, K., Bandres-Ciga, S., Chang, D., Tan, M., Kia, D. A., Noyce, A. J., Xue, A., Bras, J., Young, E., von Coelln, R., Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Sharma, M., Krohn, L., Pihlstrøm, L., Siitonen, A., ... International Parkinson's

- Disease Genomics Consortium. (2019). Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *The Lancet. Neurology*, *18*(12), 1091–1102. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30320-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30320-5)
- National Research Council (U.S.). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., & Institute for Laboratory Animal Research (U.S.). (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies Press.
- Nguyen, M., Wong, Y. C., Ysselstein, D., Severino, A., & Krainc, D. (2019). Synaptic, Mitochondrial, and Lysosomal Dysfunction in Parkinson's Disease. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 42, Issue 2, pp. 140–149). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.11.001>
- Nomura, T., Yabe, T., Rosenthal, E. S., Krzan, M., & Schwartz, J. P. (2000). PSA-NCAM distinguishes reactive astrocytes in 6-OHDA-lesioned substantia nigra from those in the striatal terminal fields. *J. Neurosci. Res*, *61*, 588–596.
- Parain, K., Murer, M. G., Yan, Q., Faucheux, B., Agid, Y., Hirsch, E., & Raisman-Vozari, R. (1999). Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. *NeuroReport*, *10*(3), 557–561. <https://doi.org/10.1097/00001756-199902250-00021>
- Pascual-Leone, A., Valls-Sole, J., Brasil-Neto, J. P., Cammarota, A., Grafman, J., & Hallett, M. (1994). Akinesia in Parkinson's disease. II. Effects of subthreshold repetitive transcranial motor cortex stimulation. *Neurology*, *44*(5), 892–892. <https://doi.org/10.1212/WNL.44.5.892>
- Patapoutian, A., & Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current Opinion in Neurobiology*, *11*(3), 272–280. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00208-7)

- Patel, N. K., Bunnage, M., Plaha, P., Svendsen, C. N., Heywood, P., & Gill, S. S. (2005). Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: A two-year outcome study. *Annals of Neurology*, *57*(2), 298–302. <https://doi.org/10.1002/ana.20374>
- Paxinos, G., Watson, C., Diego, S., Boston, L., & York, N. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Academic Press*.
- Perez-Pinera, P., Kocak, D. D., Vockley, C. M., Adler, A. F., Kabadi, A. M., Polstein, L. R., Thakore, P. I., Glass, K. A., Ousterout, D. G., Leong, K. W., Guilak, F., Crawford, G. E., Reddy, T. E., & Gersbach, C. A. (2013). RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nature Methods*, *10*(10), 973–976. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2600>
- Picca, A., Guerra, F., Calvani, R., Romano, R., Josécoelho-Júnior, H., Bucci, C., & Marzetti, E. (2021). Mitochondrial dysfunction, protein misfolding and neuroinflammation in parkinson's disease: Roads to biomarker discovery. In *Biomolecules* (Vol. 11, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom11101508>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A. E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*, 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, *276*(5321), 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>

- Porritt, M. J., Batchelor, P. E., & Howells, D. W. (2005). Inhibiting BDNF expression by antisense oligonucleotide infusion causes loss of nigral dopaminergic neurons. *Experimental Neurology*, *192*(1), 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.11.030>
- Przedbroski, S., Leviver, M., Jiang, H., Ferreira, M., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D., & Togasaki, D. M. (1995). Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*, *67*(3), 631–647. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00066-R](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00066-R)
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., Scott, D. A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., & Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, *154*(6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
- Reich, S. G., & Savitt, J. M. (2019). Parkinson's Disease. In *Medical Clinics of North America* (Vol. 103, Issue 2, pp. 337–350). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.014>
- Rocha, E. M., De Miranda, B., & Sanders, L. H. (2018). Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 109, pp. 249–257). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.04.004>
- Sánchez-Pernaute, R., Harvey-White, J., Cunningham, J., & Bankiewicz, K. S. (2001). Functional Effect of Adeno-associated Virus Mediated Gene Transfer of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase into the Striatum of 6-OHDA-Lesioned Rats. *Molecular Therapy*, *4*(4), 324–330. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0466>
- Sanftner, L. M., Rivera, V. M., Suzuki, B. M., Feng, L., Berk, L., Zhou, S., Forsayeth, J. R., Clackson, T., & Cunningham, J. (2006). Dimerizer regulation of AADC expression and

- behavioral response in AAV-transduced 6-OHDA lesioned rats. *Molecular Therapy*, 13(1), 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.06.480>
- Sauer, H., & Oertel, W. H. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. In *Neuroscience* (Vol. 59, Issue 2).
- Schwartz, R. K. W., & Huston, J. P. (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 50).
- Segovia, J., Vergara, P., & Brenner, M. (1998). Astrocyte-specific expression of tyrosine hydroxylase after intracerebral gene transfer induces behavioral recovery in experimental Parkinsonism. *Gene Therapy*, 5, 1650–1655. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300776>.
- Sehara, Y., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Katakai, Y., Ono, F., Takino, N., Ito, M., Ozawa, K., & Muramatsu, S. (2017). Persistent Expression of Dopamine-Synthesizing Enzymes 15 Years After Gene Transfer in a Primate Model of Parkinson's Disease. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 28(2), 74–79. <https://doi.org/10.1089/humc.2017.010>
- Shen, Y., Muramatsu, S.-I., Ikeguchi, K., Fujimoto, K.-I., Fan, D.-S., Ogawa, M., Mizukami, H., Urabe, M., Kume, A., Nagatsu, I., Urano, F., Suzuki, T., Ichinose, H., Nagatsu, T., Monahan, J., Nakano, I., & Ozawa, K. (2000). Triple Transduction with Adeno-Associated Virus Vectors Expressing Tyrosine Hydroxylase, Aromatic-L-Amino-Acid Decarboxylase, and GTP Cyclohydrolase I for Gene Therapy of Parkinson's Disease. *Human Gene Therapy*, 11(11), 1509–1519. <https://doi.org/10.1089/10430340050083243>

- Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. In *Clinics in Geriatric Medicine* (Vol. 36, Issue 1, pp. 1–12). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>
- Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Bras, J. M., Sharma, M., Gibbs, J. R., Berg, D., Paisan-Ruiz, C., Lichtner, P., Scholz, S. W., Hernandez, D. G., Krüger, R., Federoff, M., Klein, C., Goate, A., Perlmutter, J., Bonin, M., Nalls, M. A., Illig, T., Gieger, C., ... Gasser, T. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature Genetics*, *41*(12), 1308–1312. <https://doi.org/10.1038/ng.487>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 119, Issue 1, pp. 7–35). <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Song, J.-J., Oh, S.-M., Kwon, O.-C., Wulansari, N., Lee, H.-S., Chang, M.-Y., Lee, E., Sun, W., Lee, S.-E., Chang, S., An, H., Lee, C. J., & Lee, S.-H. (2017). Cografting astrocytes improves cell therapeutic outcomes in a Parkinson's disease model. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(1), 463–482. <https://doi.org/10.1172/JCI93924>
- Su, R. J., Zhen, J. L., Wang, W., Zhang, J. L., Zheng, Y., & Wang, X. M. (2018). Time-course behavioral features are correlated with Parkinson's disease-associated pathology in a 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat model. *Molecular Medicine Reports*, *17*(2), 3356–3363. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8277>
- Subramaniam, S. R., & Chesselet, M. F. (2013). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. In *Progress in Neurobiology* (Vols. 106–107, pp. 17–32). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.004>

- Sun, M., Kong, L., Wang, X., Holmes, C., Gao, Q., Zhang, G.-R., Pfeilschifter, J., Goldstein, D. S., & Geller, A. I. (2004). Coexpression of Tyrosine Hydroxylase, GTP Cyclohydrolase I, Aromatic Amino Acid Decarboxylase, and Vesicular Monoamine Transporter 2 from a Helper Virus-Free Herpes Simplex Virus Type 1 Vector Supports High-Level, Long-Term Biochemical and Behavioral Correction of a Rat Model of Parkinson's Disease. *Human Gene Therapy*, *15*(12), 1177–1196. <https://doi.org/10.1089/hum.2004.15.1177>
- Sun, M., Kong, L., Wang, X., Lu, X., Gao, Q., & Geller, A. I. (2005). Comparison of the capability of GDNF, BDNF, or both, to protect nigrostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Research*, *1052*(2), 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.05.072>
- Surmeier, D. J. (2018). Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease. In *FEBS Journal* (Vol. 285, Issue 19, pp. 3657–3668). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/febs.14607>
- Tang, X. Z. E., Tan, S. X., Hoon, S., & Yeo, G. W. (2022). Pre-existing adaptive immunity to the RNA-editing enzyme Cas13d in humans. *Nature Medicine*, *28*(7), 1372–1376. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01848-6>
- Tansey, M. G., & Romero-Ramos, M. (2019). Immune system responses in Parkinson's disease: Early and dynamic. In *European Journal of Neuroscience* (Vol. 49, Issue 3, pp. 364–383). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ejn.14290>
- Torres, E. M., & Dunnett, S. B. (2007). Amphetamine induced rotation in the assessment of lesions and grafts in the unilateral rat model of Parkinson's disease. *European Neuropsychopharmacology*, *17*(3), 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2006.04.009>

- Truong, L., Allbutt, H., Kassiou, M., & Henderson, J. M. (2006). Developing a preclinical model of Parkinson's disease: A study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behavioural Brain Research*, *169*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.11.026>
- Tsai, M. J., & Lee, E. H. (1996). Characterization of L-DOPA transport in cultured rat and mouse astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, *43*(4), 490–495. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19960215\)43:4<490::AID-JNR10>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19960215)43:4<490::AID-JNR10>3.0.CO;2-6)
- Ugrumov, M. V. (2009). Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: Distribution in the brain, development and functional significance. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *38*(4), 241–256. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2009.08.004>
- Ungerstedt, U. (1971). Postsynaptic Supersensitivity after 6-Hydroxy-dopamine Induced Degeneration of the Nigro-striatal Dopamine System. *Acta Physiologica Scandinavica*, *82*(367 S), 69–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.1971.tb11000.x>
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M. K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., González-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., ... Wood, N. W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, *304*(5674), 1158–1160. <https://doi.org/10.1126/science.1096284>
- Van De Warrenburg, B. P. C., Lammens, ; M, Lücking, ; C B, Denèfle, ; P, Wesseling, ; P, Booij, ; J, Praamstra, ; P, Quinn, ; N, Brice, ; A, Horstink, M. W. I. M., & Horstink, W. I. M. (2001). *Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations*. www.neurology.org

- Veres, A., Gosis, B. S., Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H., Erdin, S., Cowan, C. A., Talkowski, M. E., & Musunuru, K. (2014). Low Incidence of Off-Target Mutations in Individual CRISPR-Cas9 and TALEN Targeted Human Stem Cell Clones Detected by Whole-Genome Sequencing. *Cell Stem Cell*, *15*(1), 27–30. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.04.020>
- Vijayakumar, D., & Jankovic, J. (2016). Drug-Induced Dyskinesia, Part 1: Treatment of Levodopa-Induced Dyskinesia. In *Drugs* (Vol. 76, Issue 7, pp. 759–777). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0566-3>
- Voon, V., Napier, T. C., Frank, M. J., Sgambato-Faure, V., Grace, A. A., Rodriguez-Oroz, M., Obeso, J., Bezard, E., & Fernagut, P.-O. (2017). Impulse control disorders and levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: an update. *The Lancet Neurology*, *16*(3), 238–250. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30004-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30004-2)
- Waller, S., Williams, L., Morales-Briceño, H., & Fung, V. S. (2021). Focus | Clinical The initial diagnosis and management of Parkinson's disease. *The Royal Australian College of General Practitioners*, *50*(11), 793.
- Wang, C.-H., Lundh, M., Fu, A., Kriszt, R., Huang, T. L., Lynes, M. D., Leiria, L. O., Shamsi, F., Darcy, J., Greenwood, B. P., Narain, N. R., Tolstikov, V., Smith, K. L., Emanuelli, B., Chang, Y.-T., Hagen, S., Danial, N. N., Kiebish, M. A., & Tseng, Y.-H. (2020). CRISPR-engineered human brown-like adipocytes prevent diet-induced obesity and ameliorate metabolic syndrome in mice. *Sci. Transl. Med*, *12*.
- Xiong, K., Zhou, Y., Hyttel, P., Bolund, L., Freude, K. K., & Luo, Y. (2016). Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) stably expressing CRISPR-based synergistic activation

mediator (SAM). *Stem Cell Research*, 17(3), 665–669.
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.10.011>

Yeo, N. C., Chavez, A., Lance-Byrne, A., Chan, Y., Menn, D., Milanova, D., Kuo, C. C., Guo, X., Sharma, S., Tung, A., Cecchi, R. J., Tuttle, M., Pradhan, S., Lim, E. T., Davidsohn, N., Ebrahimkhani, M. R., Collins, J. J., Lewis, N. E., Kiani, S., & Church, G. M. (2018). An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation. *Nature Methods*, 15(8), 611–616. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0048-5>

Yin, H., Kauffman, K. J., & Anderson, D. G. (2017). Delivery technologies for genome editing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(6), 387–399. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.280>

You, H., Mariani, L. L., Mangone, G., Le Febvre de Nailly, D., Charbonnier-Beaupel, F., & Corvol, J. C. (2018). Molecular basis of dopamine replacement therapy and its side effects in Parkinson's disease. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 373, Issue 1, pp. 111–135). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2813-2>

Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2015). Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*, 163(3), 759–771. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>

Zhang, Q., Aldridge, G. M., Narayanan, N. S., Anderson, S. W., & Uc, E. Y. (2020). Approach to Cognitive Impairment in Parkinson's Disease. *Neurotherapeutics*, 17(4), 1495–1510. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00963-x>

Zhang, Y., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Caneda, C., Plaza, C. A., Blumenthal, P. D., Vogel, H., Steinberg, G. K., Edwards, M. S. B., Li, G., Duncan, J. A., Cheshier, S. H., Shuer, L. M.,

- Chang, E. F., Grant, G. A., Gephart, M. G. H., & Barres, B. A. (2016). Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron*, 89(1), 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>
- Zhang, Y., Yin, C., Zhang, T., Li, F., Yang, W., Kaminski, R., Fagan, P. R., Putatunda, R., Young, W. Bin, Khalili, K., & Hu, W. (2015). CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep16277>
- Zhou, Z. D., Sathiyamoorthy, S., Angeles, D. C., & Tan, E. K. (2016). Linking F-box protein 7 and parkin to neuronal degeneration in Parkinson's disease (PD). *Molecular Brain*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0218-2>
- Zuccaro, M. V., Xu, J., Mitchell, C., Marin, D., Zimmerman, R., Rana, B., Weinstein, E., King, R. T., Palmerola, K. L., Smith, M. E., Tsang, S. H., Goland, R., Jasin, M., Lobo, R., Treff, N., & Egli, D. (2020). Allele-Specific Chromosome Removal after Cas9 Cleavage in Human Embryos. *Cell*, 183(6), 1650-1664.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.025>
- Zuch, C. L., Nordstroem, V. K., Briedrick, L. A., Hoernig, G. R., Granholm, A.-C., & Bickford, P. C. (2000). Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. *J. Comp. Neurol*, 427, 440–454.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., & Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 72, Issue 12).

