



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

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA  
Y NEUROCIENCIAS

**Efecto motor y neurotrófico de la administración crónica del  
Pramipexol asociado a la transfección del gen para el BDNF en un  
modelo de Parkinson experimental**

**TESIS**

Que presenta

**M. en C. Alina Neftali Benitez Castañeda**

Para obtener el grado de:

**Doctora en ciencias.**

En la especialidad de:

**Neurobiología Celular y Molecular**

Directores de tesis:

**Dr. Jorge Aceves Ruiz**

**Dr. Benjamín Florán Garduño**

**Ciudad de México, México**

**Febrero 2024**

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada durante mi trabajo doctoral (2013-2017).

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por los apoyos recibidos #166638 al doctor Jorge Aceves Ruiz y el apoyo #224222 y el #254686 al Doctor Daniel Martínez Fong.

A mis padres, por todo el apoyo recibido todos estos años y sus palabras de aliento para no dejarme vencer antes las adversidades de la vida.

Al doctor Jorge Acevez Ruiz por haberme aceptado en su laboratorio para realizar la tesis doctoral.

Al doctor Benjamín Floran Garduño por su invaluable apoyo en el proceso de obtención de grado y titulación.

A la Doctora Verónica Anaya Martínez por toda su ayuda y consejos todos estos años.

A mis asesores, el doctor Ismael Jiménez Estrada y el Doctor Daniel Martínez Fong, por todas sus sugerencias y observaciones durante los seminarios.

A Arturo Sierra (QEPD) por su amistad y consejos durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amigas: Elide, Gaby, Any y Laura, por todos los buenos momentos que pasamos durante la maestría y el doctorado.

A mis compañeros de laboratorio: Liz, Paty y Luis, por la compañía durante estos años.

## Abstract

Parkinson's disease is the second neurodegenerative disorder, which is characterized by a progressive degeneration of dopaminergic neurons and the consequent loss of the dopaminergic innervation of the striatum lead to the impairment of motor behavior. There are several therapeutic approaches for the treatment of Parkinson's disease, one of most popular is the use of Levodopa, but this approach loses efficiency over time and generates abnormal involuntary movements or dyskinesias, which become more disabling than the disease itself. An effective therapy for the disease should regenerate the nigral neurons, reinnervate the striatum and recover the neural spines. Nigral neurons express brain derived neurotrophic factor (BDNF) and dopamine D<sub>3</sub> receptors, both of which protect the neurons against the toxic action of 6-hydroxydopamine (6-OHDA). In addition, the long-term activation of dopamine D<sub>3</sub> receptors, restores, in part, the nigral neurons in experimental Parkinson disease. Because of a mutual potentiation between dopamine D<sub>3</sub> receptors and BDNF receptors (TrkB receptors), sharing similar signal transduction pathways to exert their trophic effects, here we explored whether the overexpression of BDNF would enhance the trophic effect of Pramipexole (PPX). To this end, Wistar rats were bilaterally injected with 6-OHDA into the striatum. The experimental animals were divided into three study groups: intact animals, 6-OHDA lesioned but untreated rats and finally lesioned treated group, with 6-OHDA injured but treated with D<sub>3</sub> agonist and transfected with the gene for BDNF. Pramipexole was administered for 4.5 months via mini-osmotic pumps, and BDNF gene was transfected once into the surviving nigral cells using the non-viral transfection method (neurotensin polyplex), (Martínez-Fong *et al.*, 2012). Transfection was done 1 month after initiation of PPX administration. After motor evaluation and two months after the withdrawal of PPX, we extracted the brains of animals for immunohistochemical studies: immunoreactivity for tyrosine hydroxylase (TH) immunofluorescence to determine the colocalization of TH positive neurons and BDNF-flag transfected and the Golgi technique to quantify the number of dendritic spines in striatal medium spiny neurons. The long-term expression of BDNF associated with the administration of D<sub>3</sub> agonist PPX normalized gait, motor coordination, and

balance; also restored working memory. The recovery was related to the restoration of the nigral dopamine neurons and dendritic spines of the striatal neurons. The sustained overexpression of BDNF in dopamine neurons associated with the continuous and chronic activation of the D3 receptors appears to be a novel treatment for restoring motor behavior in Parkinson's disease. These results suggest that the combined therapy improves several aspects of motor behavior induced by the bilateral injury of the nigrostriatal innervation by increasing dendritic spines of striatal projection neurons, locus the synaptic contacts of the corticostriatal input. Although our data show that the combined treatment can increase and preserve various aspects of motor behavior, it would be necessary a more extensive characterization of some aspects of the treatment, such as determining whether the restoring of the dopamine neurons occurs via neurogenesis.

## Resumen

La enfermedad de Parkinson es el segundo desorden neurodegenerativo más común, se caracteriza por la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y la consecuente pérdida de la innervación dopaminérgica del Estriado que lleva a la alteración del desempeño motor.

Existen varios enfoques terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, uno de los más populares es el fármaco Levodopa. Sin embargo, ésta pierde eficiencia a lo largo del tiempo y genera movimientos involuntarios anormales o discinesias, que llegan a ser más incapacitantes que la enfermedad misma.

Una terapia eficaz para el control de la enfermedad debe regenerar las neuronas presentes en la Substancia Nigra, reinervar el cuerpo Estriado y recuperar las espinas dendríticas de las neuronas. Las neuronas nigrales expresan el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) y los receptores de dopamina D<sub>3</sub>, que como se mencionó previamente, protegen a las neuronas contra la acción tóxica de la 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Además, la activación a largo plazo de los receptores dopaminérgicos D<sub>3</sub>, restaura, en parte, las neuronas nigrales en la enfermedad de Parkinson experimental. Debido a la existencia de una potenciación mutua entre los receptores de dopamina D<sub>3</sub> y los receptores de BDNF (receptores de TrkB), que comparten vías de transducción de señales similares para ejercer sus efectos tróficos, aquí exploramos si la sobreexpresión de BDNF potenciaría el efecto trófico de PPX. Para ello, Se inyectó bilateralmente con 6-OHDA en el cuerpo Estriado de ratas macho Wistar. Los animales de experimentación se dividieron en tres grupos de estudio: animales intactos; animales lesionados bilateralmente con 6-OHDA sin tratar; animales lesionados con 6-OHDA, pero tratados con el agonista D<sub>3</sub> y transfectados con el gen para el BDNF. El PPX se administró durante 4.5 meses mediante bombas mini-osmóticas, y el gen BDNF se transfectó una vez en las células de la SNc supervivientes usando un método de transfección no viral neurotensina polyplex (Martínez-Fong *et al.*, 2012). La transfección se realizó 1 mes después del inicio de la administración de PPX y después de la última evaluación motora, se extrajeron los cerebros de los animales para realizar las pruebas inmunohistoquímicas: inmunoreactividad para la TH, inmuno-fluorescencia para determinar la co-localización de las neuronas positivas a TH y el BDNF-flag

transfectado, así como la técnica de Golgi para cuantificar las espinas dendríticas en las neuronas estriatales, asimismo se cuantificaron los contenidos de dopamina y sus metabolitos en el Estriado. La expresión persistente de BDNF asociada con la administración de agonista D<sub>3</sub>, el PPX, normalizó la marcha, la coordinación motora y el equilibrio; también restauró la memoria de trabajo. La recuperación se correlacionó con la restauración de las neuronas dopaminérgicas y las espinas dendríticas de las neuronas estriatales. La sobreexpresión sostenida de BDNF en las neuronas dopaminérgicas asociada con la activación continua y crónica de los receptores D<sub>3</sub> podría ser un nuevo tratamiento para restaurar el comportamiento motor en la enfermedad de Parkinson. Aun cuando los datos muestran que el tratamiento combinado es capaz de recuperar varios aspectos motores y recuperar la inervación nigro-estriatal es necesaria una caracterización más extensa de algunos aspectos del tratamiento como, por ejemplo, evaluar si el tratamiento regenera las neuronas dopaminérgicas a través de la neurogénesis de las neuronas dopaminérgicas de la SN y el AVT.

**Keywords:** Neurotrophic, D<sub>3</sub> agonist, dopamine receptors, gene therapy, bilateral lesion, Neurodegeneration.

**Palabras clave:** Neurotrofina, agonista D<sub>3</sub>, receptores dopaminérgicos, terapia génica, lesión bilateral, neurodegeneración.

## Índice

<i>Agradecimientos</i> .....	2
<i>Abstract</i> .....	3
<i>Resumen</i> .....	5
<i>Índice</i> .....	8
<i>Abreviaciones</i> .....	11
<i>Introducción</i> .....	14
<b>Ganglios Basales</b> .....	14
<b>El sistema dopaminérgico</b> .....	17
<i>Síntesis, almacenamiento y liberación de DA</i> .....	17
<i>Clasificación y localización de los receptores Dopaminérgicos</i> .....	19
<i>Dopamina en el SNC</i> .....	20
<i>Sistema dopaminérgico nigroestriatal</i> .....	20
<i>Sistema dopaminérgico mesolímbico</i> .....	21
<i>Metabolismo de la dopamina</i> .....	22
<b>Receptores de dopamina</b> .....	22
<i>Biología molecular del receptor D<sub>3</sub></i> .....	23
<i>Mecanismos de señalización celular</i> .....	25
<i>Distribución del receptor D<sub>3</sub> en el cerebro</i> .....	25
<i>El receptor D<sub>3</sub> en la función motora</i> .....	25
<i>Efectos neurotróficos del receptor dopaminérgico D<sub>3</sub></i> .....	26
<b>Enfermedad de Parkinson</b> .....	27
<i>Anatomía patológica de la enfermedad de Parkinson</i> .....	27
<i>Patología de la enfermedad de Parkinson</i> .....	29
<i>Etiología de la enfermedad de Parkinson</i> .....	31
<i>Factores ambientales</i> .....	31
<i>Mutaciones genéticas</i> .....	32
<i>Hipótesis del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial</i> .....	33
<i>Moléculas con acción neuroprotectora en la enfermedad de Parkinson</i> .....	35
<i>receptor dopaminérgico D<sub>3</sub></i> .....	35



<i>Neurotrofinas</i> .....	36
<i>Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)</i> .....	37
<i>Interacción entre el BDNF y los receptores D<sub>3</sub></i> .....	39
<i>Tratamiento con L-dopa</i> .....	41
<i>Pramipexol</i> .....	42
<i>Métodos experimentales de la enfermedad de Parkinson</i> .....	43
<i>Modelos experimentales</i> .....	43
<i>MPTP</i> .....	43
<i>Métodos experimentales para inducir Parkinson experimental con 6-OHDA</i> .....	44
<i>Modelos en ratas</i> .....	44
<i>Planteamiento del problema</i> .....	47
<i>Hipótesis</i> .....	50
<i>Objetivo general</i> .....	50
<i>Objetivos específicos</i> .....	50
<i>Diseño experimental</i> .....	51
<i>Animales</i> .....	51
<i>Modelo de lesión bilateral estriatal</i> .....	51
<i>Administración crónica de pramipexol</i> .....	53
<i>Transfección del BDNF</i> .....	54
<b>Pruebas motoras y conductuales</b> .....	55
<i>Cajas de actividad</i> .....	55
<i>Rotarod</i> .....	55
<i>Viga</i> .....	55
<i>Análisis de la marcha</i> .....	56
<b>Pruebas no motoras</b> .....	57
<i>Prueba de reconocimiento de objetos</i> .....	57
<i>Inmunohistoquímica para TH</i> .....	59
<i>Conteo estereológico de neuronas nigrales</i> .....	61

<i>Tinción de Golgi</i> .....	61
<i>Inmunofluorescencia para detectar BDNF-flag/TH</i> .....	62
<i>Determinación de los contenidos de dopamina con la técnica de HPLC</i> .....	62
<i>Análisis estadístico</i> .....	63
<i>Resultados</i> .....	65
Efectos farmacológicos del PPX .....	65
Coordinación motora juzgada por la prueba de la viga .....	67
Coordinación motora juzgada por la prueba del rotarod .....	67
<i>Efecto motor de la terapia combinada</i> .....	68
La terapia combinada es capaz de recuperar la coordinación motora en el modelo bilateral .....	69
La terapia combinada logra mejorar la marcha .....	71
Pruebas no motoras .....	73
<i>El tratamiento combinado logra recuperar la memoria de trabajo en los animales lesionados bilateralmente pero no la actividad locomotora espontánea</i> .....	73
Pruebas inmunohistológicas .....	75
<i>La terapia combinada logra recuperar el número de neuronas TH (+)</i> .....	75
<i>La terapia combinada incrementa el número de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas del Estriado</i> .....	77
<i>Colocalización de TH (+) / BDNF-flag en las neuronas presentes en SNc y AVT</i> .....	79
<i>La terapia combinada aumenta los niveles de dopamina y sus metabolitos en el Estriado</i> .....	80
<i>Discusión</i> .....	82
Aspectos motores .....	84
Locomoción y actividad motora general .....	84
Terapia combinada .....	85

Aspectos neurotróficos .....	88
<i>Conclusiones</i> .....	95
<i>Perspectivas</i> .....	96
<i>Referencias</i> .....	97

## **Abreviaciones**

AADC.....	Descarboxilasa de los ácidos aromáticos
AAV2.....	Vector adenoasociado tipo 2
AC.....	Adenilato ciclasa
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
AMPC.....	Adenosín monofosfato cíclico
ARN.....	Ácido ribonucleico
ATP.....	Adenosín trifosfato
BDNF.....	Factor neurotrófico derivado del cerebro
COMT.....	Catecol-O-metiltransferasa
CREB.....	Elemento de respuesta a la unión de AMPC
DA.....	Dopamina
DAT.....	Transportador de dopamina
DOPAC.....	Ácido 3,4-dihidroxifenilacetico
D3.....	Receptor dopaminérgico D <sub>3</sub>
EP.....	Enfermedad de Parkinson
ERK.....	Cinasa regulada por señal extracelular
GABA.....	Ácido gamma aminobutírico
GAD.....	Descarboxilasa del ácido glutámico enzima limitante de la síntesis del GABA
GB.....	Ganglios basales
GDNF.....	Factor neurotrófico derivado de la glía
GPCR.....	Receptor acoplado a proteínas G

GPF.....	Proteína verde fluorescente
GPe.....	Globo pálido externo
GPI.....	Globo pálido interno
GSH.....	Glutación reducido
GSSH.....	Glutación oxidado
HSV-1.....	Virus del herpes simplex 1
HVA.....	Ácido homovanílico
L-Dopa.....	Levodopa -L-3,4-dihidroxitifenilalanina-
MAO.....	Monoamino oxidasa
MAPK.....	Proteína cinasa mitogénica activada
MDA.....	Malondialdehído
MFB.....	Haz medial del cerebro anterior
MLA.....	Región locomotora del mesencéfalo
MLR.....	Región locomotora mesencefálica
MPTP.....	1-Metil-4-Fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina
MPP+.....	Metabolito de 1-metil-4-fenil-1, 2, 3,6 tetrahidropiridina
MSNs.....	Neuronas espinosas medianas del estriado
NE.....	Norepinefrina
NET.....	Transportador de norepinefrina
NAc.....	Núcleo accumbens
NF-M.....	Neurofilamento
NGF.....	Factor de crecimiento neural
NST.....	Núcleo subtalámico
NTS.....	Neurotensina
ORP.....	Desempeño total en el rotarod
PARK.....	Parkina
PBS.....	<i>Buffer</i> salino de fosfato
PKC.....	Proteína cinasa C
PINK.....	Quinasa putativa inducida-PTEH
PI3K.....	Cinasa activada de fosfatidil inositol 3
PPN.....	Núcleo pedúnculo pontino tegmental

PPX.....	Pramipexol
ROS.....	Especies reactivas del oxígeno
ROT.....	Prueba de reconocimiento de objetos
SNC.....	Sistema nervioso central
SNc.....	<i>Sustancia nigra pars compacta</i>
SNr.....	<i>Sustancia nigra pars reticulata</i>
SOD.....	Superóxido dismutasa
SVZ.....	Zona subventricular
TH.....	Tirosina hidroxilasa
TNF.....	Factor de necrosis tumoral
UCH-L.....	Hidroxilasa ubiquitina del carboxilo terminal
UPS.....	Sistema de proteasoma-ubiquitina
VMAT.....	Transportador vesicular de monoaminas
VTA.....	Área ventral tegmental
7-OH-DPAT.....	7-Hidroxi-dipropilaminotetralina
6-OHDA.....	6-Hidroxidopamina
8-OHdG.....	8-Hidroxi-2'-deoxiguanosina
A-MSH.....	$\alpha$ Hormona estimulante de los melanocitos

## Introducción

### *Ganglios Basales*

El movimiento voluntario se genera a partir de señales provenientes de la Corteza Cerebral, y es controlado por diversas estructuras, entre las cuales se encuentran los Ganglios Basales.

Los Ganglios Basales son un grupo de núcleos subcorticales interconectados que abarcan el Telencéfalo, Diencefalo y Mesencefalo. La estructura aferente primaria de los Ganglios Basales es el núcleo Estriado, al cual las fibras de la cápsula interna dividen en una parte medial que es el núcleo Caudado y una lateral que es el núcleo Putamen. Los núcleos de salida de información de los Ganglios Basales son el Globo Pálido Interno (GPi) y la Sustancia Nigra *pars reticulata* (SNr). Además, el Globo Pálido Externo (GPe) y el Núcleo Subtalámico (STN) forman parte de la llamada vía indirecta de los Ganglios Basales. Estos núcleos están separados por las fibras del Pedúnculo Cerebral (Alvin *et al.*, 1989). Los Ganglios Basales participan en un gran número de funciones tales como la cognición, los movimientos voluntarios y en funciones límbicas (Alexander & Crutcher, 1990). Las neuronas de la SNr y del GP interno contienen Glutamato descarboxilasa (GAD - enzima limitante de la síntesis del ácido gamma aminobutírico: GABA) y son las responsables de una fuerte inhibición sináptica en el Tálamo, Colículo Superior y núcleos Mesencefálicos (Chevalier & Deniau, 1990).

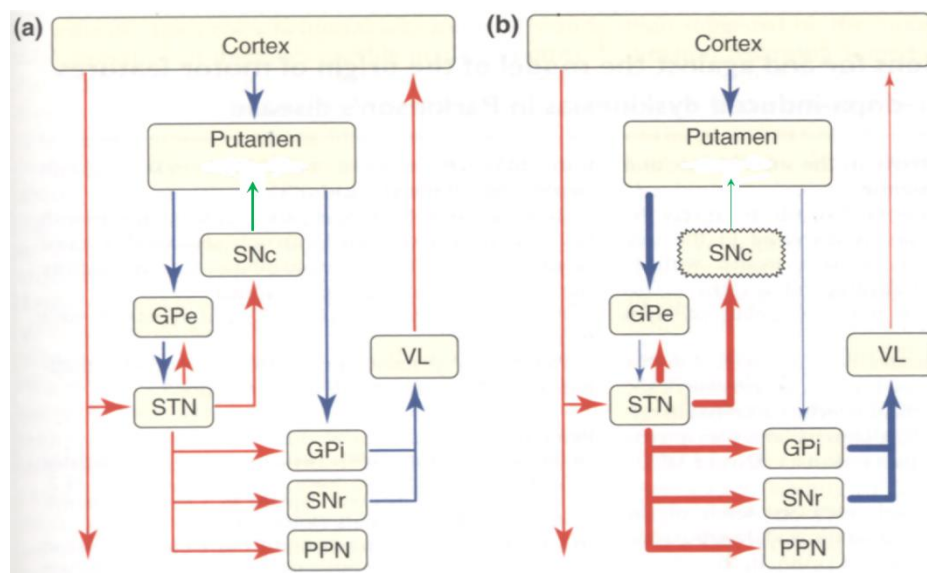
En el circuito motor, las áreas cortico-motoras proyectan de manera somatotópica al Neostriado (Putamen), donde establecen conexiones glutamatérgicas con las neuronas espinosas medianas, las cuales derivan su nombre debido al tamaño mediano (10-20  $\mu\text{m}$ ) de sus cuerpos celulares y a la presencia de numerosas espinas en sus dendritas. Las neuronas espinosas medianas producen GABA, disparan escasos potenciales de acción de forma espontánea y conducen la información proveniente de la corteza a los núcleos de salida, (la SNr y el GP interno) a través de dos vías paralelas, la vía directa y la indirecta. Todos estos núcleos reciben proyecciones dopaminérgicas de la SNc (Anaya-Martínez *et al.*, 2006).

Los núcleos de salida envían la información tanto hacia la Corteza, a través del Tálamo, como a los núcleos Mesencefálicos (Área locomotora Mesencéfala y núcleo Pedúnculo-Pontino) como a los Tubérculos Cuadrigénicos Superiores (“Superior Colliculus”) (Takakusaki, 2004a; Saitoh *et al.*, 2004). El circuito a través del Tálamo controla el movimiento voluntario, en tanto que el circuito a través de los núcleos Mesencefálicos se controla la ambulación, el tono muscular y los movimientos oculares. Las dos vías modulan el funcionamiento del circuito motor.

La dopamina modula la entrada cortical, ejerciendo un efecto dual sobre las neuronas estriatales facilitando la excitación de las neuronas espinosas medianas de proyección de la vía directa que expresan preferencialmente el receptor D<sub>1</sub> e inhibiendo la entrada cortical a las neuronas espinosas medianas de proyección de la vía indirecta que expresan mayoritariamente receptores D<sub>2</sub> (Obeso, 2000; Rodríguez-Oroz *et al.*, 2000; Gerfen & Surmeier, 2011).

El circuito de los Ganglios Basales está constituido (figura 1) por dos sistemas de proyecciones:

- Una vía directa que surge de las neuronas del Estriado que contienen GABA y sustancia P que preferentemente expresan receptores D<sub>1</sub> y que proyectan directamente hacia las porciones motoras del GPi y SNr. Esta población de neuronas se puede caracterizar además por la presencia de los neuropéptidos: sustancia P y dinorfina. Como las fibras pálido-talámicas y las nigro-talámicas presentan una alta tasa de actividad espontánea e inhiben a las neuronas talámicas, la actividad de la vía directa trae como resultado final una desinhibición del tálamo y la consecuente excitación de la Corteza Cerebral (Sil'kis, 2002).
- Una vía indirecta que surge de las neuronas del Estriado que contienen GABA y encefalinas que en su mayor proporción expresan receptores D<sub>2</sub> y proyectan a los núcleos de salida, haciendo relevo en el GPe y el NST (DeLong, 1990).



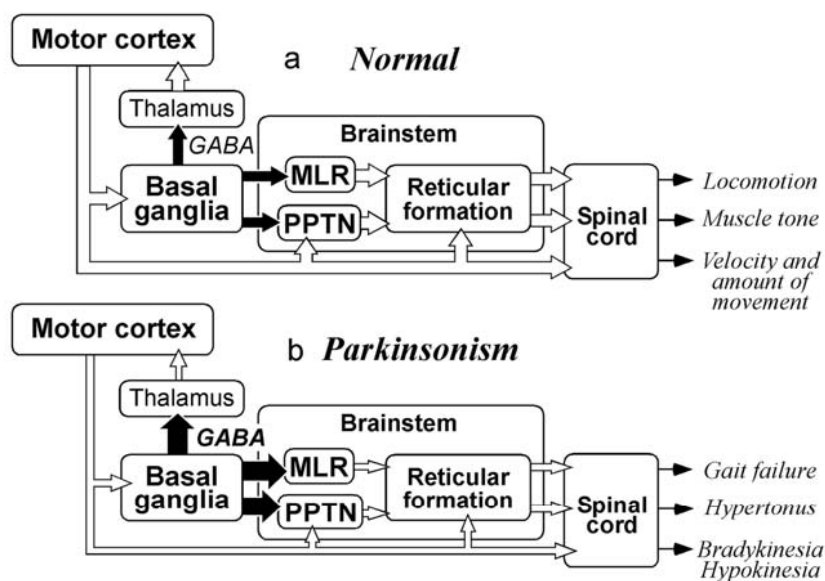
**Figura 1.-** Organización funcional de los Ganglios Basales, así como las alteraciones que se producen en la enfermedad de Parkinson (Modificado de Obeso, 2000). En rojo se muestran las proyecciones excitadoras, y en verde las dopaminérgicas; en azul, las proyecciones inhibitorias. En (a) se muestra la condición normal; en (b) durante la enfermedad de Parkinson. El grosor de las líneas indica el grado de actividad de la vía.

Las neuronas estriato-palidales que participan en esta vía actúan inhibiendo al GPe, presentan receptores de tipo D<sub>2</sub>, y contienen encefalina. En consecuencia, su activación libera la inhibición que normalmente ejerce el GPe (con sus fibras GABAérgicas) sobre el NST (desinhibición subtalámica). El NST también recibe inervaciones directas de la corteza por lo cual, en conjunto, ambas entradas contribuyen a incrementar la tasa de disparo de las fibras glutamatérgicas que proyectan del Subtálamo a los núcleos de salida. El efecto neto de la vía indirecta es el descenso en la actividad del Tálamo y una disminución en la actividad de la Corteza Cerebral (Sil'kis, 2002).

Los núcleos de salida de los Ganglios Basales envían proyecciones inhibitorias a la región locomotora Mesencefálica (MLR) y al núcleo Pedúnculo Pontino (PTN), mientras que la Corteza envía proyecciones excitadoras, que activan las neuronas de estos núcleos y a las neuronas colinérgicas de la Formación Reticular, las que a su vez excitan a neuronas retículo-espinales e interneuronas inhibitorias del sistema gama, así como al centro generador de patrones de la Medula Espinal. Esto permite mantener



regulado el tono muscular, la locomoción, la cantidad y velocidad de movimiento (Figura 2a).



**Figura 2.** Regulación de la marcha y el tono muscular en el estado: a) Normal, b) Durante la enfermedad de Parkinson. Las flechas negras indican proyecciones inhibitorias y las blancas proyecciones excitadoras (Takakusaki *et al.*, 2004b).

### ***El sistema dopaminérgico***

La dopamina es una catecolamina que sirve de neurotransmisor en el Sistema Nervioso Central (SNC) donde controla funciones clave relacionadas con la actividad motriz, cognición, atención, comportamiento afectivo y reforzamiento positivo, además de secreción de hormonas. La dopamina también tiene múltiples papeles en el sistema nervioso periférico en donde es un modulador de la función cardiovascular, de la liberación de catecolaminas, secreción de hormonas, tono vascular, función renal y motilidad gastrointestinal (Missale *et al.*, 1998).

### ***Síntesis, almacenamiento y liberación de DA***

La dopamina se sintetiza a partir de la L-tirosina en una serie de reacciones, este aminoácido esencial primero es hidroxilado por la enzima tirosina hidroxilasa (TH) para producir L-DOPA, y luego descarboxilarlo generando así la dopamina.

La TH cataliza la reacción limitante en la síntesis de las catecolaminas, de manera que su actividad determina la concentración de norepinefrina, epinefrina y dopamina. Al parecer la TH une los sustratos de manera secuencial ( $\text{BH}_4$ ,  $\text{O}_2$  y por último la tirosina), antes de llevar a cabo la reacción de hidroxilación, y requiere la presencia del ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) además de los sustratos (Figura 3).

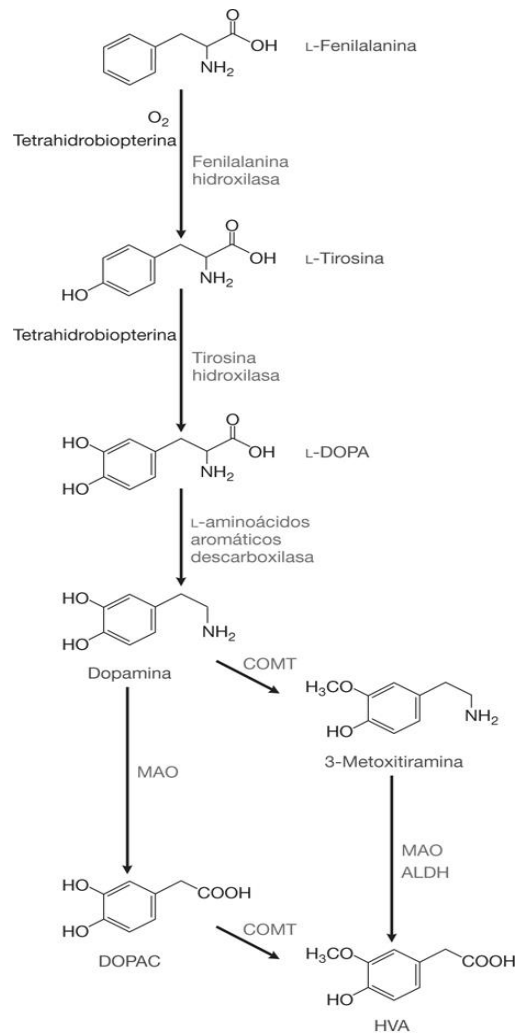
Las neuronas dopaminérgicas se localizan agrupadas en varias regiones del SNC. Los principales grupos dopaminérgicos se localizan en: a) Hipotálamo, b) Bulbo Olfativo, c) la pared del tercer Ventrículo y d) Telencéfalo. Algunas neuronas dopaminérgicas participan en circuitos locales como el Bulbo Olfativo. Otro grupo de neuronas dopaminérgicas se agrupan en sistemas conocidos como: Diencefalo-Espinal y Meso-Telencefálico (Feldman *et al.*, 1997).

La dopamina es almacenada en pequeñas vesículas, y allí se encuentra en una concentración de 10 a 1000 veces mayor que la presente en el citoplasma (Elsworth & Roth, 1997). La internalización de la dopamina a las vesículas es llevada a cabo por el transportador vesicular de monoaminas (VMAT-2), el cual es sensible a la reserpina y amfetamina, y se encuentra tanto en las neuronas dopaminérgicas como en las serotoninérgicas, noradrenérgicas, adrenérgicas e histaminérgicas.

Cuando la membrana de las neuronas dopaminérgicas es despolarizada por el arribo de un potencial de acción, una serie de cambios en la conformación del canal de calcio permite la entrada de calcio a la célula y la dopamina es liberada por un proceso de exocitosis, tanto de las terminales nerviosas como de las dendritas (Elsworth & Roth, 1997).

La acción de la dopamina es terminada, en gran medida, por su rápida recaptura efectuada por el transportador dopaminérgico de la membrana plasmática (DAT). El transportador de dopamina pertenece a la familia de los acarreadores de neurotransmisores acoplados a  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , se localizan exclusivamente en las neuronas dopaminérgicas, son bloqueados por la cocaína y pueden transportar dopamina en cualquier dirección dependiendo del gradiente de concentración. No obstante, se ha

observado que la glía y neuronas no dopaminérgicas pueden, en cierta medida, capturar y metabolizar la dopamina extracelular (Elsworth & Roth, 1997).



Fuente: Randa Hilal-Dandan, Laurence L. Brunton: *Goodman & Gilman. Manual de farmacología y terapéutica*, 2e: www.accessmedicina.com  
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

**Figura 3.** Síntesis de la dopamina. La TH cataliza la conversión de tirosina a L-DOPA en presencia de  $BH_4$  y oxígeno. Posteriormente la L-DOPA es descarboxilada por una descarboxilase de aminoácidos aromáticos (Hilal-Dandan & Brunton, 2015).

### *Clasificación y localización de los receptores Dopaminérgicos*

Los grupos celulares dopaminérgicos mesotelencefálicos se dividen en tres grupos: a) mesolímbico, b) mesocortical y c) mesoestriatal.

El sistema mesolímbico se genera en el AVT (área A10 según la clasificación de Dahlström & Fuxe, 1964), el núcleo Retrorubral (área A8) y en parte del área A9, y sus aferencias se dirigen al Núcleo Accumbens, al Tubérculo Olfativo, la Amígdala y el Septum.

El sistema Mesocortical se origina en el área A10 y proyecta a la Corteza Prefrontal, corteza Cingulada, Corteza Piriforme y Bulbo Olfativo (Robbins, 1992; Cooper *et al.*, 1996).

El sistema mesoestriatal se origina en la SNc (área A9) y proyecta principalmente al Caudado-Putamen (Dahlström & Fuxe, 1964), donde la dopamina modula la postura y el movimiento; este sistema es de gran interés pues en él se encuentran las células relacionadas con el trabajo medular de esta investigación.

### ***Dopamina en el SNC***

Alteraciones observadas en el sistema dopaminérgico en diferentes áreas del cerebro producen diferentes trastornos neurológicos y psiquiátricos incluyendo la enfermedad de Parkinson, esquizofrenia y abuso de drogas. Las neuronas dopaminérgicas están en grupos heterogéneos localizados en el Diencéfalo, Mesencéfalo y Bulbo Olfatorio.

El grupo más importante se encuentra en la parte ventral del Mesencéfalo, el cual contiene aproximadamente el 90% del total de neuronas dopaminérgicas en el cerebro. El sistema dopaminérgico del Mesencéfalo ha sido subdividido en varios sistemas (Chinta & Andersen, 2005).

### ***Sistema dopaminérgico nigroestriatal***

Este sistema se origina en la SN la cual contiene cuerpos celulares de neuronas dopaminérgicas, extienden sus axones dentro del Caudado-Putamen (también conocido como Estriado dorsal). El Estriado es la principal estructura de entrada de los Ganglios

Basales, un circuito subcortical que juega un papel importante en la modulación y planeación de programas motores y de memoria motora. El Estriado se divide en dorsal y ventral; el Estriado dorsal está formado por la parte dorsolateral del Caudado-Putamen, mientras que el Estriado ventral está formado por la parte ventro-medial del Caudado-Putamen, el Núcleo Accumbens y el Tubérculo Olfatorio.

La actividad estriatal es regulada por dos diferentes sistemas neuronales: uno excitatorio glutamatérgico que recibe entradas de varias áreas de la corteza y otro dopaminérgico que recibe entradas de la SNc, estos dos sistemas se regulan entre sí para controlar el comportamiento motor (Nicola *et al.*, 2000). Las terminales dopaminérgicas y glutamatérgicas convergen en las espinas de las neuronas GABAérgicas de las neuronas espinosas medianas de proyección que representan cerca del 90% del total de las neuronas estriatales.

Estas neuronas dan origen a las dos mayores vías eferentes estriatales, las denominadas vías directa e indirecta, conectando al Estriado con otros núcleos de los Ganglios Basales. El sistema dopaminérgico induce actividad motora a través de la activación de la vía directa y por la inhibición de la vía indirecta.

La vía nigro-estriatal es parte del sistema extrapiramidal y juega un papel crucial en el control de la actividad locomotora, del tono muscular y la postura. De hecho, como resultado de la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson y en consecuencia del decremento de dopamina a nivel estriatal, se produce un desbalance de la activación de las vías directa e indirecta, con hiperactividad de la vía indirecta y en consecuencia la aparición de la acinesia (Obeso *et al.*, 2000).

### ***Sistema dopaminérgico mesolímbico***

Este sistema está formado por neuronas dopaminérgicas cuyos somas se encuentran en el AVT. Estas neuronas proyectan principalmente al Núcleo Accumbens (NAc), al Tubérculo Olfatorio, y juegan un papel muy importante en la regulación de la dependencia a las drogas y de los mecanismos de adicción. El Núcleo Accumbens es una parte fundamental de los circuitos límbico y extrapiramidal en los que juega un papel clave en los procesos de reforzamiento positivo (recompensa), así como en los

reforzamientos negativos (castigos). Desde el punto de vista funcional y estructural, el Núcleo Accumbens puede ser dividido en dos partes: núcleo y corteza, el núcleo representa la parte ventral de esta estructura y está directamente conectado a la parte ventral del GP, por lo que también juega un papel importante en la iniciación del movimiento. Por otro lado, la corteza es la parte rostral del sistema nuclear, la llamada extensión amigdalina, con funciones límbicas como la integración de la emoción y la motivación.

### ***Metabolismo de la dopamina***

Los principales productos del metabolismo de la dopamina son el ácido homovanílico (HVA) en el cerebro de primates y el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) en el de rata. Entre las enzimas implicadas en el metabolismo de la dopamina se encuentran:

- La catecol-*O*-metiltransferasa (COMT) que puede estar en forma soluble (en la glía) o unida a la membrana (en las neuronas postsinápticas).
- La monoamino oxidasa (MAO), la cual tiene dos subtipos (ambos mitocondriales): el A ubicado en las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas, y el B situado en la glía y neuronas serotoninérgicas.

### ***Receptores de dopamina***

Los receptores de dopamina son miembros de la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), y están clasificados en dos grupos basados en sus propiedades estructurales, farmacológicas y de señalización.

El receptor de la familia D<sub>1</sub>, dentro de los cuales tenemos al receptor D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>; está localizado postsinápticamente, tiene afinidad nanomolar por la dopamina y estimula la actividad del adenilato ciclasa. Estos receptores son ampliamente expresados por las neuronas estriatales de la vía directa, las cuales envían proyecciones GABAérgicas desde el Putamen a los núcleos de salida (GPi/SNr), lo que tiene como

resultado el incremento de su actividad y con ello aumenta la desinhibición del tálamo y la consecuente excitación de la corteza cerebral.

Los receptores de la familia D<sub>2</sub>, dentro de los cuales tenemos a los receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>; están asociados a la proteína inhibitoria G $\alpha$ i por lo que median la inhibición de la acumulación de AMPc (De Camilli *et al.*, 1979). Estos receptores se ven involucrados en la mitogénesis (Lajiness *et al.*, 1993) y en la diferenciación celular (Van Kampen *et al.*, 2004; O'Keeffe *et al.*, 2009) por la activación de las MAP cinasas, en particular la activación de la MAP cinasa por el receptor D<sub>3</sub> es mediada por la forma típica de PKC, esto sugiere la posibilidad de que esta activación sea para la regulación de eventos celulares diferentes como la plasticidad neuronal, la diferenciación morfológica y la transmisión sináptica (Cussac *et al.*, 1999). Por otro lado, también se ha demostrado que la estimulación de esta familia de receptores activa otra vía de señalización que involucra a la PKB (Akt), un importante mediador de los efectos fisiológicos de varios factores de crecimiento y supervivencia celular, esta activación parece ser a través de PI3-K (Nair *et al.*, 2003; Bolan *et al.*, 2007; Zapata *et al.*, 2007).

El receptor D<sub>2</sub> tiene afinidad nanomolar por la dopamina y es localizado tanto pre como postsinápticamente. Ambos receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> existen en estados de alta y baja afinidad con agonistas dopaminérgicos.

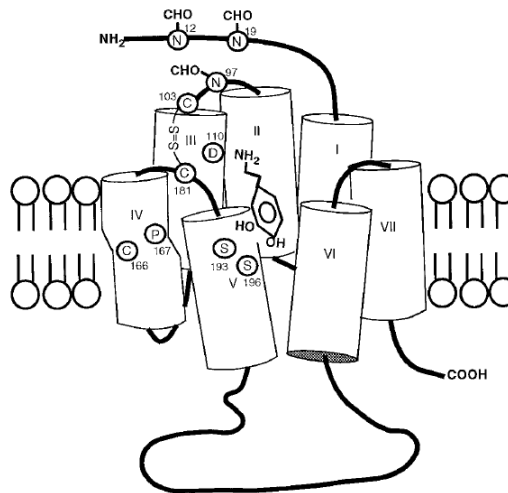
### ***Biología molecular del receptor D<sub>3</sub>***

Basado en su secuencia de aminoácidos y su organización de genes, el receptor D<sub>3</sub> ha sido clasificado como miembro de la familia de receptores de dopamina D<sub>2</sub> (Sibley *et al.*, 1993). El receptor D<sub>3</sub>, está formado por 400 aminoácidos, la tercera asa contiene 120 aminoácidos y su segmento terminal tiene 16 aminoácidos, el gen que codifica para este receptor se encuentra en el cromosoma 3q 13.3 y tiene 5 intrones y 6 exones.

El receptor presente en la rata posee una homología del 52% con el receptor D<sub>2</sub>, con 75% de homología en los dominios transmembranales (Sokoloff *et al.*, 1990). El receptor D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> exhiben un 39% y 41% de homología con el receptor D<sub>4</sub>, respectivamente (Van Tol *et al.*, 1991). El receptor D<sub>3</sub> contiene 446 aminoácidos y es

sintetizado como una proteína de 35 a 37 kDa que sufre una glicosilación postraduccional (Sokoloff *et al.*, 1990; David *et al.*, 1993).

El análisis hidrofóbico indica que el receptor D<sub>3</sub> contiene 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Figura 4); los dominios transmembranales conforman una  $\alpha$ -hélice, con excepción del dominio transmembranal IV en el cual el enlace de la Cys (166)-Pro (167) puede introducir una curva en la  $\alpha$ -hélice (Livingstone *et al.*, 1992).



**Figura 4.-** Representación esquemática de la topografía del receptor D<sub>3</sub> de dopamina. El receptor contiene 7 dominios transmembranales y está acoplado a proteínas Gi/o (Levant B, 1997).

Se ha detectado expresión del receptor D<sub>3</sub> desde el día embrionario 9 (E9) (Fishburn *et al.*, 1996) en el Estriado y otras partes del cerebro. En la etapa prenatal, el ARNm del receptor D<sub>3</sub> se localiza en las células neuroepiteliales (zonas mitóticas) del Estriado, Amígdala, Bulbo Olfatorio y Tectum; la mayoría de estas células pierden rápidamente la capacidad de expresar el receptor D<sub>3</sub> durante su migración y diferenciación. Después del nacimiento y durante el desarrollo posnatal, la zona mitótica se vuelve más delgada a lo largo del ventrículo lateral y se convierte en la zona subventricular (SVZ), en la cual se observa la expresión del ARNm para el receptor D<sub>3</sub> (Díaz *et al.*, 1997).



### ***Mecanismos de señalización celular***

Algunos sitios del receptor D<sub>3</sub> en el cerebro de rata pueden predominantemente existir en estados de baja afinidad bajo condiciones basales como se ha sido sugerido para el receptor D<sub>1</sub> (Richfield *et al.*, 1989). En ausencia de dopamina, algunos de estos sitios, los cuales bajo condiciones normales están predominantemente en estado de baja afinidad, asumen una conformación de alta afinidad por sus agonistas.

### ***Distribución del receptor D<sub>3</sub> en el cerebro***

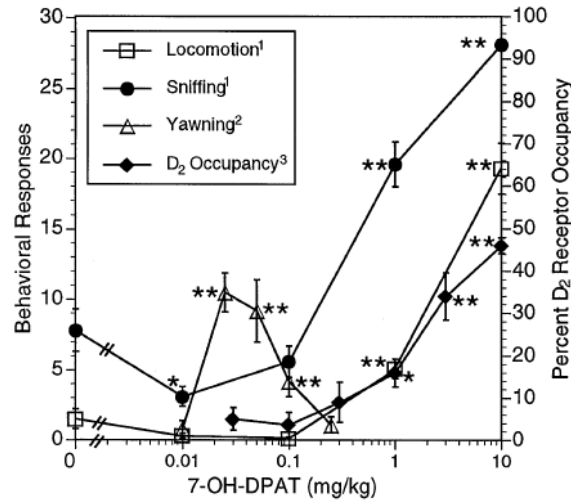
Mediante estudios de hibridación *in situ* en cerebros de ratas se ha demostrado que el ARNm de los receptores D<sub>3</sub> aparece para ser expresado preferencialmente por las áreas límbicas del cerebro. Una alta densidad de estos receptores está localizada en las Islas de Callejas, en las cuales el ARNm del D<sub>3</sub> es expresado en las células granulares (Díaz *et al.*, 1995). Altos niveles son expresados en el Núcleo Accumbens y el Tubérculo Olfatorio (Sokoloff *et al.*, 1990; Mengod *et al.*, 1992).

### ***El receptor D<sub>3</sub> en la función motora***

El antagonista preferencial de los receptores D<sub>3</sub>, el U-99194, se ha reportado que incrementa la actividad locomotora (Waters *et al.*, 1993, 1994) (Figura 5). Finalmente, el incremento en la actividad locomotora y la actividad exploratoria vertical (*rearing*) así como hiperactividad en una prueba de exploración fue observado en un ratón *knock-out* del receptor D<sub>3</sub> (Accili *et al.*, 1996).

La estimulación del receptor D<sub>3</sub> también ha sido implicado en efectos sobre el comportamiento involucrando a las conductas de refuerzo y recompensa, así como la disminución de la autoadministración de cocaína (Caine & Koob, 1993).

Los agonistas preferenciales del receptor D<sub>3</sub> pueden inhibir el disparo de las neuronas en la SN y en el AVT, también pueden inhibir este disparo en preparaciones de rebanadas de cerebro, por la activación de los canales de K<sup>+</sup> (Bowery *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1994; Devoto *et al.*, 1995; Kreiss *et al.*, 1995; Lejeune & Millan, 1995).



**Figura 5.-** Efecto sobre el comportamiento motor después de la administración sistémica del agonista D<sub>3</sub>, 7-OH-DPAT en la rata adulta. Comparación de la ocupación *in vivo* del receptor de dopamina D<sub>2</sub>. Se observa el comportamiento bifásico del receptor D<sub>3</sub> sobre la conducta motora (Levant *et al.*, 1996).

El agonista D<sub>3</sub>, 7-OH-DPAT se ha reportado que disminuye el disparo de neuronas con actividad espontánea o de aferencias glutamatérgicas en el Núcleo Accumbens (Amano *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1994).

### ***Efectos neurotróficos del receptor dopaminérgico D<sub>3</sub>***

Los receptores D<sub>3</sub> juegan un papel neurogénico importante durante el desarrollo del sistema nervioso (Díaz *et al.*, 1997). La dopamina por medio de los receptores dopaminérgicos D<sub>3</sub> activa la mitogénesis a través de proteína G $\beta\gamma$  y de la vía de señalización de Ras (Proteína G monomérica) (Van Biesen *et al.*, 1995). Esta última promueve la fosforilación de la proteína cinasa mitogénica activada (MAPK), la que induce la proliferación celular (Crespo *et al.*, 1995). También se ha visto que el receptor dopaminérgico D<sub>3</sub> es capaz de transactivar a receptores mitogénicos tirosina-cinasa (Lee *et al.*, 2002) que conforman un sistema de receptor de señalización único para neurotrofinas. Se ha demostrado un efecto positivo de los receptores dopaminérgicos D<sub>3</sub> sobre la mitogénesis y la diferenciación neural postnatal en la Zona Subventricular (Coronas *et al.*, 2004). Además, se ha observado que la pérdida de dopamina es seguida

de una reducción en la proliferación celular en la Zona Subventricular (Baker *et al.*, 2004). El receptor dopaminérgico D<sub>3</sub> mediante efectos mitogénicos, es probablemente el origen del incremento de la proliferación celular en la SVZ que es observado *in vivo* tras la administración de agonistas del receptor dopaminérgico D<sub>3</sub> (Van Kampen *et al.*, 2004).

### ***Enfermedad de Parkinson***

Descrita por primera vez por James Parkinson en 1817, la enfermedad de Parkinson es uno de los desórdenes neurodegenerativos más comunes y el primero de los desórdenes de movimiento en el mundo. Se estima que entre el 1 y 2% de la población mayor de 60 años existen entre 7 y 10 millones de personas en todo el mundo con esta enfermedad y se calcula que hay entre 3 y 4 millones más que aún no han sido diagnosticadas (Howells *et al.*, 2000). De acuerdo con el conteo de población y vivienda realizado en 2010, por parte del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) el 9.1% de la población en México se encuentra en este rango de edad, lo que implicaría una prevalencia aproximada de entre 100,000 y 200,000 personas con enfermedad de Parkinson en México.

### ***Anatomía patológica de la enfermedad de Parkinson***

Los desórdenes de los Ganglios Basales constituyen un grupo heterogéneo de síndromes clínicos con un lugar anatómico común. La mayoría están asociados a cambios en la función de subpoblaciones de neuronas de proyección del Estriado. Los desórdenes motores se manifiestan ya sea por síntomas hipocinéticos (como la enfermedad de Parkinson) o hipercinéticos (como la corea de Huntington), que resultan de la disfunción selectiva de las neuronas de proyección estriatal y del GPe, respectivamente. Los desórdenes hipocinéticos, como la enfermedad de Parkinson, son el resultado de una disminución en la actividad de las neuronas estriatales que proyectan a la SNr y una mayor actividad de las que proyectan al GPe, lo que trae consigo un marcado incremento en la salida inhibitoria de los Ganglios Basales (Alvin *et al.*, 1989).

La enfermedad está caracterizada por una degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas localizadas en la SN de los Ganglios Basales, lo que trae consigo la pérdida progresiva de las habilidades motoras y la aparición de síntomas no motores, como la discapacidad intelectual, cambios en el comportamiento, así como alteraciones del sueño y del humor (Lang, 2007; Li *et al.*, 2010a; Merlo *et al.*, 2011). La base neuropatológica de la enfermedad de Parkinson es la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la Substancia Nigra y la consecuente pérdida progresiva de la señalización dopaminérgica nigro-estriatal (Gallagher and Schapira, 2009). En humanos los cambios patológicos están bien definidos y consisten en un patrón de formación de los cuerpos de Lewy, pérdida neuronal y gliosis en el complejo nuclear meso-dopaminérgico, así como pérdida del pigmento (melanina) de las neuronas dopaminérgicas de la SN. Sin embargo, la etiología de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas permanece aún desconocida. Se ha sugerido que se debe a la acción de la  $\alpha$ sinucleína mutada, que pudiera comportarse como un prion (Olanow & Prusiner, 2009).

Una hipótesis, es que la reducción de la expresión de uno o varios factores de crecimiento, que se sabe son necesarios para la sobrevivencia y el crecimiento neurítico de las neuronas dopaminérgicas, contribuye a la degeneración y muerte neuronal (Howells *et al.*, 2000). La enfermedad podría ser causada también por diferentes condiciones patológicas que den como resultado la disfunción del sistema de proteasoma-ubiquitina (UPS) y de las mitocondrias, inducida por el estrés oxidativo que conduciría a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la SN (Li *et al.*, 2010b).

Se considera que la enfermedad de Parkinson es un desorden hipocinético que resulta de una serie compleja de cambios en la actividad de una subpoblación de neuronas de proyección estriatal ante la depleción de la dopamina, presentándose una marcada disminución en la actividad de la vía directa y un aumento en la actividad de la vía indirecta, lo que traería como resultado final un incremento en la salida inhibitoria de los núcleos de salida (SNr y GPi) hacia el tálamo motor y la consecuente pérdida de la entrada excitatoria hacia la corteza motora, produciendo la reducción de

la actividad motora voluntaria (bradicinesia, o inclusive la acinesia) (Alvin *et al.*, 1989).

La excesiva entrada inhibitoria hacia estos núcleos (Tálamo y Corteza cerebral) en la enfermedad de Parkinson trae consigo la marcha anormal y la rigidez muscular. De modo que una inhibición excesiva por los núcleos de salida sobre las neuronas tálamo-corticales reduce la velocidad (bradicinesia) y los movimientos voluntarios (acinesia) (Takakusaki *et al.*, 2004b), y la inhibición excesiva de ALM y el PPN provoca trastornos de la marcha (“marcha festinante” patrón de marcha acelerado e inestable) y aumento del tono muscular (la rigidez muscular característica de la enfermedad).

### ***Patología de la enfermedad de Parkinson***

Esta patología se caracteriza por ser un trastorno crónico, degenerativo, progresivo e incapacitante, debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas y consecuentemente de las áreas cerebrales inervadas por esas neuronas. Como una sola neurona dopaminérgica de la SN proyecta y modula a todos los Ganglios Basales, involucrados en el control motor, y en algunas áreas de la Corteza Cerebral, la neurodegeneración de esas neuronas da origen a alteraciones motoras y a trastornos de las funciones cerebrales superiores (Martínez-Fong *et al.*, 2012).

Aún no se sabe con exactitud la etiología de la enfermedad de Parkinson, pero se conocen varios factores que podrían ocasionar la muerte de las neuronas dopaminérgicas, provocando las alteraciones del movimiento que se observan en los pacientes con la enfermedad de Parkinson. En este sentido, existen evidencias sólidas que indican que la reducción de BDNF, factor neurotrófico esencial para la funcionalidad de las neuronas dopaminérgicas, contribuye de manera relevante en la muerte de este fenotipo neuronal, dando posiblemente lugar a lo que se le conoce como Parkinson idiopático, o síndrome parkinsoniano (Porritt *et al.*, 2005a).

A la fecha se desconoce con exactitud cuál es el umbral para que se exprese clínicamente la disfunción dopaminérgica; se piensa que las alteraciones motoras aparecen cuando ocurre una pérdida del 70% de los niveles de dopamina en el Estriado y un 50% de muerte de neuronas dopaminérgicas en la SN (Ugrumov *et al.*, 2011). Además de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNc se ha reportado una

reducción de la actividad de las enzimas TH (marcador del fenotipo dopaminérgico) y DOPA descarboxilasa, sin cambios significativos en la actividad de las enzimas encargadas de metabolizar la dopamina (Gerlach & Riederer, 1996a). Todos estos cambios traen como consecuencia, la alteración del circuito “Ganglios Basales-tálamo-cortical”, encargado de la regulación del movimiento.

Aunque la pérdida neuronal en la SN es mayor, también se observa degeneración de neuronas dopaminérgicas en el AVT (Uhl *et al.*, 1985), integrantes de los sistemas Mesolímbico y Mesocortical, e incluso se ven afectadas otras neuronas de áreas no dopaminérgicas, tales como: *Locus Coeruleus* (aminérgico), núcleos del *Raphe* (serotoninérgico), *Nucleus Basalis* de Meynert (colinérgico), así como neuronas hipotalámicas, neuronas corticales pequeñas y del Bulbo Olfatorio, entre otras (Yañez-Bana, 2004). En adición, algunos estudios experimentales indican que es posible inducir acinesia mediante la infusión de antagonistas de los receptores dopaminérgicos en el GPe de la rata y que el déficit motor inducido en la rata por la 6-OHDA puede revertirse por la infusión intrapalidal de dopamina (Galván *et al.*, 2001). Lo que indica que la inervación dopaminérgica es crítica no sólo en el Estriado sino también en los otros núcleos de los Ganglios Basales.

Otra característica de la enfermedad de Parkinson es la aparición de inclusiones citoplasmáticas denominadas cuerpos de Lewy en las neuronas dopaminérgicas de la SNc, así como neuritas distróficas (neuritas de Lewy). Los cuerpos de Lewy son pequeñas inclusiones esféricas (5-25  $\mu\text{m}$  de longitud), consistentes de un núcleo granular denso rodeado por un halo de fibrillas radiales (Issidorides *et al.*, 1991). El principal componente de tales inclusiones son filamentos de  $\alpha$ -sinucleína (de 200-600 nm de longitud y unos 5-10 nm de diámetro), aunque también se encuentran atrapadas otras proteínas citosólicas, incluyendo la ubiquitina, proteínas de choque térmico, subunidades del proteasoma y neurofilamentos (Lang & Lozano, 1998; Lotharius & Brundin, 2002a). Se considera que la formación de agregados se genera por el plegamiento inadecuado de la proteína  $\alpha$ -sinucleína, y que la probabilidad de agregación se incrementa por un aumento en la expresión de esta o alteraciones en su estructura, como resultado de mutaciones o modificaciones postranscripcionales (Ross & Poirier, 2004).

### ***Etiología de la enfermedad de Parkinson***

La etiología de la enfermedad de Parkinson es desconocida, pero estudios a nivel genético y epidemiológico, así como la existencia de nuevos modelos experimentales han arrojado información sobre la patogénesis de la enfermedad. Actualmente se considera que la progresión de la enfermedad involucra la interacción de numerosos factores, tanto genéticos como ambientales, lo cual hace difícil determinar con exactitud su causa. A continuación, mencionaremos algunos de esos factores.

#### ***Factores ambientales***

Diversos estudios epidemiológicos vinculan la exposición a pesticidas, toxinas y drogas con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. La primera evidencia de esta afirmación se obtuvo en 1983, cuando un grupo de adictos a drogas intravenosas desarrollaron una forma de Parkinson aguda y permanente después de inyectarse heroína contaminada con MPTP (1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (Langston *et al.*, 1983). En el cerebro, el MPTP es metabolizado por la enzima MAO-B dando como producto a su metabolito activo, el MPP+. El MPP+ es captado por el transportador membranal de dopamina (DAT) y concentrado en las mitocondrias de las terminales dopaminérgicas. Como resultado, se inhibe el complejo I de la cadena respiratoria, se disminuye la concentración de ATP intracelular y se incrementa la producción de radicales libres y/o la concentración de calcio intracelular (Gerlach & Riederer, 1996b; Luquin, 2000). Asimismo, la exposición a pesticidas como el paraquat y la rotenona, podría incrementar la probabilidad de sufrir Parkinson ya que ambos inhiben el complejo mitocondrial I, e inducen la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína (Dawson and Dawson, 2003; Andersen, 2004; Greenamyre & Hastings, 2004). Un aspecto interesante que conviene hacer mención es que la rotenona, a diferencia del paraquat y el MPTP, no se concentra en las neuronas dopaminérgicas y sin embargo causa la muerte selectiva de las mismas, lo cual sugiere que las neuronas dopaminérgicas son

especialmente susceptibles al mal funcionamiento de la cadena respiratoria (Dawson & Dawson, 2003).

La literatura también hace referencia a la exposición al zinc como un factor de riesgo para el desarrollo del Parkinson, sin embargo, su vinculación con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la inducción de oxidación de sustratos intracelulares es menos evidente (Dexter *et al.*, 1989a; Fiskum *et al.*, 2003). Así mismo, el manganeso también puede inducir la generación de la enfermedad (Aschner & Wegrzynowicz, 2013).

### ***Mutaciones genéticas***

A partir de estudios sobre genes ligados y la evaluación de genes candidatos se ha establecido que aproximadamente un 5-10% de los casos de Parkinson son de carácter hereditario (Bossy-Wetzel *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2004b). En este sentido, numerosos genes han sido identificados como responsables o asociados a las formas mendelianas de la enfermedad, entre los cuales, ya han sido caracterizados la  $\alpha$ -sinucleína y la UCH-L1, las cuales presentan un modo de herencia autosómico dominante, así como la Parkina, y el DJ-1, los cuales se han encontrado en formas autosómicas recesivas de la enfermedad de Parkinson. Después de la edad del paciente, una historia familiar con Parkinson constituye la segunda causa de riesgo para la enfermedad (Lang & Lozano, 1998).

El gen PARK-1, que codifica para la  $\alpha$ -sinucleína, fue el primer gen vinculado a una forma hereditaria de la enfermedad, por lo cual se considera que una modificación en la función en la  $\alpha$ -sinucleína mutada o un incremento en la cantidad de proteína pueden ser importantes en la patogénesis de la enfermedad.

La proteína codificada por el gen de la  $\alpha$ -sinucleína constituye uno de los principales componentes de los cuerpos de Lewy, en conjunto con la ubiquitina, así como con proteínas chaperonas y del sistema proteasomal. La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína de bajo peso molecular y de función desconocida, aunque se ha reportado su interacción con numerosas proteínas (14-3-3, ERK1/2, Parkina, Tau, Fosfolipasa D<sub>2</sub>, PKC, Sinfilina-1), entre las cuales cabe destacar el transportador de dopamina



membranal (DAT) y la TH, cuya actividad se ve reducida por dicha interacción (Pérez & Hastings, 2004). La UCH-L1 es una de las proteínas más abundantes del cerebro y participa en el reciclaje de la ubiquitina, aparte de cumplir con otras funciones (Huang *et al.*, 2004a; Casarrubea *et al.*, 2006).

La lista de genes asociados a la enfermedad de Parkinson sigue creciendo, por ejemplo, tenemos al gen NR4A2, miembro de la superfamilia de los receptores nucleares e indispensable para la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas de la SN (Cepeda *et al.*, 1993) y NF-M (neurofilamento medio) que codifica para uno de los componentes del filamento neuronal intermedio (Huang *et al.*, 2004). Asimismo, se han encontrado polimorfismos en el ADN mitocondrial (A10398G, T4216C y A4336G) que se vinculan con el desarrollo del Parkinson (Otaegui *et al.*, 2004).

### ***Hipótesis del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial***

Independientemente del carácter idiopático o hereditario de la enfermedad, existen numerosas evidencias experimentales que vinculan al estrés oxidativo y a la disfunción mitocondrial con la patogénesis de la enfermedad de Parkinson.

Se considera que, en comparación con otros órganos, el cerebro es más sensible a la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que muestra una alta tasa metabólica y una capacidad relativamente reducida para la regeneración celular (Chinta & Andersen, 2008). En este sentido, las neuronas de la SN son particularmente susceptibles al estrés oxidativo, debido a que el metabolismo de la dopamina puede inducir la producción de radicales libres. Normalmente, la dopamina se encuentra almacenada en vesículas, donde permanece inerte, pero cuando se libera al citosol, es metabolizada por la enzima MAO (monoamino oxidasa) produciendo peróxido de hidrógeno. Luego, el peróxido de hidrógeno (inocuo por sí mismo) puede ser degradado a radicales hidroxilos, mediante la reacción de Fenton, catalizada por el hierro, cuya concentración en la SN es mayor que en otras regiones del cerebro (Lotharius & Brundin, 2002b). Por otro lado, la dopamina puede autooxidarse a neuromelanina (que es de color oscuro y que es razón del color característico de la SN) generando directamente aniones superóxido, quinonas e hidroquinonas potencialmente tóxicas, así como peróxido de hidrógeno (Dexter *et al.*, 1989a). Un dato

interesante constituye el hecho de que la noradrenalina y la serotonina también tienen altos potenciales de oxidación y pueden promover el estrés oxidativo, lo cual explicaría por qué el núcleo *Locus Coeruleus* y los núcleos del *Rafé* también se ven afectados por la enfermedad de Parkinson (Lotharius & Brundin, 2002b).

Además del metabolismo de la dopamina y sus posibles efectos deletéreos, otra evidencia que apoya la importancia del estrés oxidativo en el proceso de degeneración de las neuronas nigro estriatales, proviene del estudio del modelo del MPTP y su acción sobre el complejo mitocondrial I.

El estrés oxidativo puede surgir por causa de un incremento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) o una disminución en la actividad de los mecanismos de defensa.

Estudios *post-mortem* realizados en cerebros de pacientes con Parkinson y de individuos sanos (control), han revelado cambios específicos en la SN (pero no en otras regiones del cerebro) de las personas que padecieron la enfermedad, en comparación con la de los sujetos sanos. Tales cambios se enlistan a continuación:

1.- Alteraciones en los mecanismos protectores de la célula ante el estrés oxidativo. Estos mecanismos funcionan eliminando las especies reactivas de oxígeno que se generan de un número considerable de reacciones bioquímicas que ocurren en la célula.

2.- Mayor concentración total de hierro en la SN de pacientes con Parkinson, en comparación con los controles (Sofic *et al.*, 1988; Dexter *et al.*, 1989b), lo que se vincula a una disminución en los niveles de ferritina (Muller *et al.*, 1997).

3.- Mayores niveles de malondialdehído (MDA), el cual es un marcador de la peroxidación de lípidos (Dexter *et al.*, 1989a) y de productos del ataque de radicales libres al ADN (Alam *et al.*, 1997), tales como la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG). También se ha reportado una mayor presencia de carbonilos proteínicos (marcadores de la oxidación de proteínas) en el tejido cerebral *post-mortem* de la SN de pacientes que sufrieron Parkinson (Beal, 2003).

4.- Decremento en la actividad del complejo mitocondrial I de la cadena respiratoria, lo que puede conducir a un incremento en la producción de ROS, como ocurre tras la administración de las neurotoxinas MPTP o rotenona (Muller *et al.*, 1997).

En resumen, es de esperarse que cualquier proceso que deteriore la habilidad de las neuronas para mantener su potencial de membrana en reposo, incremente su vulnerabilidad al glutamato, a esta hipótesis se le denomina de excitotoxicidad indirecta o débil (Blandini *et al.*, 1996). Un dato a favor del posible papel del efecto excitotóxico en la degeneración lo constituye el hecho de que tanto el PTN como el NST, proveen aferencias excitadoras hacia la SNc, y en particular el NST, se encuentran hiperactivadas en la condición de Parkinson (Hutchison *et al.*, 1998; Obeso *et al.*, 2000). Lamentablemente a pesar de todas estas evidencias y estudios, aún se desconoce si el estrés oxidativo es causa del proceso degenerativo o una consecuencia secundaria de la degeneración celular.

### ***Moléculas con acción neuroprotectora en la enfermedad de Parkinson receptor dopaminérgico D<sub>3</sub>***

En la enfermedad de Parkinson se han descrito bajos niveles en la expresión del receptor dopaminérgico D<sub>3</sub> en la SNc (Díaz *et al.*, 2000), focalizando la atención a si los agonistas de estos receptores pueden aumentar la neurogénesis en esta región; por otra parte, se ha demostrado que estos agonistas estimulan la producción de factores neurotróficos como el BDNF y el GDNF en células mesencefálicas cultivadas (Li *et al.*, 2010a). Estos efectos podrían explicar la neuroprotección que producen los agonistas de los receptores dopaminérgicos D<sub>3</sub> y sugieren que una terapia combinada, asociando un agonista de estos receptores a factores neurotróficos, pudiera ser de gran utilidad en la prevención de la neurodegeneración.

El beneficio de la utilización de agonistas D<sub>3</sub> en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson es doble. Por un lado, actúa como agonista farmacológico de la dopamina. Por otro lado, ejerce efectos neuro protectores a través de la producción de un factor neurotrófico dopaminérgico (Carvey *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la incubación de cultivos primarios mesencefálicos con agonistas D<sub>3</sub> aumenta significativamente el número de neuronas dopaminérgicas y los niveles de GDNF y BDNF. Bloqueando GDNF y BDNF con sus anticuerpos, disminuye significativamente los efectos neurotróficos de estos agonistas en cultivos celulares (Du *et al.*, 2005).

## *Neurotrofinas*

Las neurotrofinas son proteínas estructuralmente relacionadas entre sí, regulan el desarrollo y función del SNC. Entre las funciones inducidas por la unión de las neurotrofinas a sus receptores específicos destacan la supervivencia y diferenciación celular, así como el crecimiento axonal, remodelación dendrítica, la formación de sinapsis, y la expresión de proteínas cruciales para el funcionamiento neural normal (Huang & Reichardt, 2001; Skaper, 2012). Además de unirse a sus receptores específicos, las neurotrofinas también poseen capacidad de unión al receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75NTR, miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), cuya activación desencadena cascadas de señalización que activan la apoptosis (Koshimizu *et al.*, 2010; Skaper, 2012). A esta familia pertenecen el factor de crecimiento neuronal (NGF), el BDNF, y las neurotrofinas 3, 4/5, 6 y 7.

Hasta ahora no se ha utilizado el BDNF en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, pero otros factores neurotróficos se han evaluado como posibles terapias de neuroprotección (Unsicker, 1994; Lindsay, 1995; Connor & Dragunow, 1998; Hughes *et al.*, 1999). El GDNF es un factor implicado en la protección, en el incremento de la velocidad de disparo y de la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas (Beck *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2002). Sus efectos protectores son más fuertes que los de otros factores neurotróficos. Sin embargo, GDNF se degrada rápidamente en el cuerpo humano y no cruza la barrera hematoencefálica eficientemente. La administración intracerebroventricular del GDNF no se recomienda, debido a su bajo índice de difusión del líquido céfalo-raquídeo al parénquima del cerebral, por lo que se requieren dosis altas de GDNF con potenciales efectos secundarios.

Por otro lado, se ha utilizado un vector adenoasociado tipo 2 (AAV2) para transfectar el gen neurotrófico de la neurturina en ambos núcleos putámenes de pacientes con enfermedad de Parkinson en etapa avanzada. El argumento racional para el uso del vector AAV2-neurturina fue que éste sería internalizado por las neuronas estriatales, las cuales después expresarían, secretaría neurturina, y una vez liberada sería transportada retrógradamente a través de las fibras remanentes en degeneración hasta el cuerpo celular de la SN (Marks *et al.*, 2010). Desafortunadamente, la

valoración de los pacientes 12 meses después de la transfección no mostró ninguna mejoría significativa en la motricidad de los pacientes, respecto a la motricidad primaria manifiesta en los pacientes sometidos a una cirugía placebo. En contraste, un año después de la transfección con AAV2-neurturina en el caudado-putamen de monos Rhesus que poseían una inervación dopaminérgica íntegra en el sistema nigroestriatal, se observó inmunorreactividad incrementada de TH, así como hipertrofia de las células TH+ en la SNc (Herzog *et al.*, 2008). Con base en la experiencia preclínica y clínica obtenida con la transfección de AAV2-neurturina, es justificable la búsqueda de una terapia génica dirigida principalmente a las neuronas dopaminérgicas de la SN.

### ***Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)***

Está bien establecido que la producción de factores tróficos durante el desarrollo del organismo juega un rol crítico en la regulación de la sobrevivencia y diferenciación de las neuronas (Yurek *et al.*, 1996). Existen varias neurotrofinas y factores de crecimiento con actividad sobre neuronas dopaminérgicas, entre ellas el BDNF, el cual aumenta la sobrevivencia de las neuronas y las protege contra efectos neurotóxicos como los inducidos por las toxinas: MPP<sup>+</sup> y 6-OHDA (Howells *et al.*, 2000). El GDNF, es otra neurotrofina necesaria para la sobrevivencia neuronal pero su expresión se reduce en el cerebro adulto y, aparentemente, no participa en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, ya que sus niveles de expresión permanecen sin cambios (Howells *et al.*, 2000). Así, el BDNF es el principal factor neurotrófico que promueve la sobrevivencia y la maduración morfológica de las neuronas dopaminérgicas, ejerce efectos significativos en la reinervación funcional del Estriado en trasplantes de neuronas dopaminérgicas fetales en la rata adulta (Yurek *et al.*, 1996).

Es importante el hecho de que el BDNF y su receptor TrkB se expresan particularmente en las neuronas dopaminérgicas de la SNc de animales adultos (Seroogy *et al.*, 1994; Benisty *et al.*, 1998; Numan & Seroogy, 1999) y de seres humanos incluyendo a pacientes parkinsonianos (Nishio *et al.*, 1998; Parain *et al.*, 1999; Howells *et al.*, 2000). Estos receptores participan en diversas funciones celulares de las neuronas dopaminérgicas; por ejemplo, inducen su fenotipo (Zhou *et al.*, 1994), promueven su supervivencia (Hyman *et al.*, 1991), incrementan su velocidad de

disparo (Shen *et al.*, 1994), median la potenciación a largo plazo (Kovalchuk *et al.*, 2002), promueven la generación de espinas dendríticas (Tanaka *et al.*, 2008), estimulan la liberación de dopamina (Blochl & Sirrenberg, 1996), determinan el número de neuronas dopaminérgicas adecuado en la etapa perinatal (Baquet *et al.*, 2005), y aumentan la sensibilidad de los receptores dopaminérgicos postsinápticos (Li *et al.*, 2011).

El BDNF sintetizado por las neuronas dopaminérgicas es responsable de la aparición del receptor dopaminérgico D<sub>3</sub> durante el desarrollo y de mantener su expresión en la edad adulta (Sokoloff *et al.*, 2002). La activación de estas vías de supervivencia podría estar involucrada en el efecto neuroprotector de los agonistas del receptor D<sub>3</sub> y esto puede tener relevancia en el tratamiento de la degeneración dopaminérgica en el Parkinson (Presgraves *et al.*, 2004). En neuronas cultivadas, el BDNF promueve el brote y el crecimiento neurítico de neuronas dopaminérgicas de feto humano y aumenta la reinervación del Estriado denervado. El BDNF expresado por las neuronas dopaminérgicas de la SNc es transportado al Estriado donde modula la acción de la dopamina (Howells *et al.*, 2000). La dopamina además juega un rol muy importante en la maduración de las neuronas GABAérgicas estriatales (Küppers *et al.*, 2001). Por ello la reducción en la expresión del BDNF tiene implicaciones importantes en la funcionalidad de los circuitos de los Ganglios Basales y el desarrollo de la enfermedad de Parkinson por lo que posiblemente una terapia génica que induzca el incremento en la expresión de BDNF produzca efectos que mejoren la condición de los circuitos motores en la enfermedad.

El BDNF es el principal factor neurotrófico que promueve la sobrevivencia y la maduración morfológica de las neuronas dopaminérgicas y en la rata adulta, ejerce efectos significativos en la reinervación funcional del Estriado en trasplantes de neuronas dopaminérgicas fetales (Yurek *et al.*, 1996). La transfección del BDNF a través del receptor de neurotensina, es un método de transfección desarrollado en el laboratorio del Dr. Martínez-Fong (Alvarez-Maya 2001) es un procedimiento novedoso y seguro (no es tumorigénico como algunos de los virales), que potencialmente ha mostrado gran utilidad terapéutica y una transfección efectiva en

neuronas dopaminérgicas, siendo además selectivo ya que transfecta sólo a las neuronas dopaminérgicas y no a células gliales (Álvarez-Maya *et al.*, 2001).

Con estos antecedentes, se han ensayado diversas estrategias preventivas y restaurativas con la finalidad de proveer BDNF exógeno en modelos *in vivo* de lesión del sistema nigroestriatal. La estrategia preventiva consiste en producir un incremento de los niveles de BDNF antes de practicar la lesión del sistema dopaminérgico nigroestriatal en animales de experimentación. Se ha demostrado que la infusión de BDNF en el sistema dopaminérgico previo a la lesión mecánica por axotomía (Hagg, 1998), o el incremento de BDNF endógeno inducido por la lesión estriatal con kainato (Canudas *et al.*, 2005) previenen parcialmente la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la SNc. Otros abordajes experimentales donde se ha probado el efecto neuroprotector de BDNF utilizan trasplantes de neuronas dopaminérgicas embrionarias a huéspedes hemiparkinsonianos. En estos estudios, se ha encontrado que el pretratamiento de los cultivos con BDNF incrementa la funcionalidad del implante (Sauer *et al.*, 1993; Yurek *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1997).

Hasta hoy, la terapia génica *in vivo* sólo se ha ensayado utilizando vectores virales para llevar a cabo la transferencia del gen que codifica para el BDNF al SNC de animales de experimentación previo a la lesión inducida por 6-OHDA. Klein y colaboradores utilizaron el vector viral adenoasociado recombinante para producir bicistricamente, BDNF-myc y la proteína verde fluorescente (GFP), el cual fue inyectado en la SNc 6 meses antes de la administración de 6-OHDA en el Estriado de ratas adultas. Aunque el BDNF-myc transgénico no tuvo efecto sobre el número de neuronas dopaminérgicas de la SNc, sí previno el desarrollo de giro inducido por amfetamina 10 semanas posteriores a la lesión (Klein *et al.*, 1999).

### ***Interacción entre el BDNF y los receptores D<sub>3</sub>.***

El BDNF sintetizado por las neuronas dopaminérgicas es responsable de la aparición de los receptores D<sub>3</sub> durante el desarrollo y de mantener su expresión en la etapa adulta (Guillin *et al.*, 2001). La activación de estos receptores por agonistas específicos (PPX) protege a las neuronas de la degeneración inducida por MPTP. El

efecto se ejerce a través del BDNF, ya que el bloqueo de la acción del BDNF por anticuerpos elimina la protección (Du *et al.*, 2005). Este resultado sugiere una interacción entre los receptores D<sub>3</sub> y el BDNF; en el que éste último regularía la expresión de los receptores D<sub>3</sub> y aquellos ejercerían su efecto protector, y probablemente su efecto neurogénico, (Merlo *et al.*, 2011), al menos en parte, a través del BDNF. Además, la dopamina incrementa el número de neuronas TH (+) aisladas de la corteza cerebral de embriones de 14 a 15 días de edad, y asociada con el BDNF incrementa hasta diez veces la cantidad de éstas neuronas (Zhou *et al.*, 1994); es posible que tales efectos estén mediados por el receptor D<sub>3</sub> ya que empiezan a aparecer en el embrión en la misma edad (Díaz *et al.*, 1997), por lo que existe la posibilidad de que el BDNF potencie los efectos tróficos de la activación de receptores D<sub>3</sub> en el cerebro adulto.

Dado que la efectividad de los tratamientos con agonistas D<sub>3</sub> se reduce con el tiempo debido a que la densidad de estos receptores disminuye a lo largo de la enfermedad de Parkinson, y considerando que el BDNF es responsable del control normal de la expresión del receptor D<sub>3</sub> tanto durante el desarrollo y en la etapa adulta (Guillin *et al.*, 2001; Sokoloff *et al.*, 2002; Guillin *et al.*, 2003; Le Foll *et al.*, 2005), es viable considerar que este factor neurotrófico es esencial para el mantenimiento de la eficacia de los tratamientos con agonistas D<sub>3</sub>. Desafortunadamente, el BDNF también está disminuido en pacientes con Parkinson y en los modelos de la enfermedad de Parkinson, lo que potencia la pérdida de este receptor y en consecuencia la falta de eficacia de los agonistas (Porritt *et al.*, 2005b; Venero *et al.*, 1994; Mogi *et al.*, 1999; Howells *et al.*, 2000). Es en este punto donde la transfección no viral del gen para BDNF en la SNc juega un papel crucial en la eficacia terapéutica, ya que se induce una expresión del BDNF en las neuronas dopaminérgicas sobrevivientes por la transfección del gen con el NTS-polyplex (Martínez-Fong, 2001). Este BDNF incrementará la expresión del receptor D<sub>3</sub>, amplificando así los efectos mitogénicos, neurogénicos y de control del crecimiento de la arborización dendrítica y axonal, que tienen estos receptores al ser activados por su agonista selectivo PPX, adicionalmente la activación del receptor D<sub>3</sub> controlará la liberación del BDNF endógeno (Du *et al.*, 2005), potenciándose mutuamente en beneficio del efecto neurotrófico.



### ***Tratamiento con L-dopa***

La L-dopa es el fármaco por excelencia en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Las acciones de la L-Dopa son generalmente atribuidas por su conversión, por la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (AADC) de las neuronas dopaminérgicas y aparentemente las serotoninérgicas y noradrenérgicas, en dopamina, restableciendo así los niveles de dopamina en el Estriado y los otros núcleos de los Ganglios Basales (Mancilla-Díaz *et al.*, 2005; Rangel-Barajas *et al.*, 2011); así como restablecer la neurotransmisión dopaminérgica deficiente en el Estriado (Bartholini *et al.*, 1967; Hornykiewicz, 1974). La L-dopa se ha usado por más de 40 años, y es el tratamiento más efectivo para revertir los síntomas de la enfermedad de Parkinson (Schapira *et al.*, 2006). Los mecanismos precisos por los cuales la L-Dopa exógena alivia los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson permanecen inciertos. Aún no es claro porque la calidad de acción anti-Parkinsonica de la L-Dopa es mucho mayor que el de los agonistas selectivos de los receptores dopaminérgicos. Similarmente, los mecanismos bajo los cuales se desarrollan las complicaciones asociadas al tratamiento a largo plazo con L-Dopa particularmente la pérdida de respuesta a esta droga (Marsden & Parkes, 1976; Rascol, 2000) y sus efectos como la inducción de discinesias permanecen aún sin resolver (Quinn *et al.*, 1987; Papa *et al.*, 1994; Ahlskog & Muentner, 2001; Brotchie *et al.*, 2005; Muller & Russ, 2006; Schapira *et al.*, 2006).

Se ha sugerido que el tratamiento crónico con L-dopa no afecta a las neuronas dopaminérgicas remanentes en ratas con lesiones parciales del tracto nigro-estriatal, y que incluso podría incrementar el número de neuronas con fenotipo dopaminérgico (Datla *et al.*, 2001). También se ha observado que la L-dopa y el agonista de receptores D<sub>3</sub>, pramipexol (PPX) tienen propiedades neuro protectoras semejantes sobre las neuronas dopaminérgicas en modelos animales de la enfermedad producidos por la administración de la toxina MPTP (Shin *et al.*, 2009). Otro efecto benéfico de la L-dopa es que la estimulación dopaminérgica producida por su administración oral puede promover directamente la expresión de BDNF en el Estriado (Okazawa *et al.*, 1992), este aspecto resulta de vital importancia en el tratamiento de la enfermedad, ya que los

factores neurotróficos como el BDNF juegan un papel clave en la neuro protección y neuroregeneración del fenotipo dopaminérgico (Siegel et al., 2000; Fumagalli *et al.*, 2006).

### ***Pramipexol***

Desde su aprobación en 1997 en EUA y en 1998 en la mayoría de los países europeos, los agonistas para receptores dopaminérgicos del tipo D<sub>3</sub> se han convertido en los más prescritos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y actualmente son indicados para el tratamiento de los signos y síntomas del Parkinson idiopático, tanto como monoterapia como en asociación con la L-dopa, en estados tempranos como avanzados de la enfermedad de Parkinson. El PPX reduce significativamente los episodios de “off” durante el día (45.6%), la ansiedad y la apatía (Dooley & Markham, 1998), así como la rigidez muscular (Lorenc-Koci & Wolfarth, 1999), generalmente el PPX tiene una vida medica considerablemente más larga que la L-dopa. En conjunto con L-dopa, el PPX permite reducir la dosis de este último en un 27%. Por otro lado, la desventaja de la monoterapia con agonistas D<sub>3</sub>, como el PPX, son sus efectos secundarios, así como su pérdida de eficiencia farmacológica. En pacientes con Parkinson temprano, los efectos adversos son: discinesias, náuseas, mareos, somnolencia, insomnio, constipación, astenia, alucinaciones, amnesia, hipertonía y confusión. En pacientes con enfermedad de Parkinson avanzada, los efectos secundarios son más comunes y se presentan frecuentemente cuando el PPX se administra en asociación con L-dopa (Dooley & Markham, 1998). Aunque el PPX tiene una menor presencia de discinesias comparado con la L-dopa.

Aún más, la efectividad del tratamiento con estos agonistas en la enfermedad de Parkinson se ve reducida debido a la disminución de la densidad del receptor D<sub>3</sub> en neuronas dopaminérgicas encontradas en los modelos animales de Parkinson y en los pacientes con esta patología (Levesque *et al.*, 1995, Ryoo *et al.*, 1998, Quik *et al.*, 2000, Joyce *et al.*, 2004). Esto se relaciona con la disminución de la respuesta a los tratamientos con agonistas dopaminérgicos (Joyce *et al.*, 2002).

## ***Métodos experimentales de la enfermedad de Parkinson***

### ***Modelos experimentales***

Con el fin de crear modelos experimentales que sirvan de herramienta en el estudio de las alteraciones motoras, se han empleado neurotoxinas que afectan selectivamente el sistema catecolaminérgico. Se destacan la 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y la 6-OHDA (Winn, 1991), las cuales han sido ampliamente utilizadas en animales de experimentación para inducir un estado de deficiencia dopaminérgica, análogo al presentado por los pacientes afectados por la enfermedad de Parkinson.

### ***MPTP***

Mediante la administración sistémica y prolongada de MPTP se puede desarrollar en algunos mamíferos un síndrome neurológico con síntomas similares a los exhibidos por personas que padecen la enfermedad de Parkinson (Langston *et al.*, 1983).

Entre los organismos sensibles a esta neurotoxina se han reportado humanos, gatos, perros, ratones y monos (Heikkila *et al.*, 1985; Johannessen *et al.*, 1985), siendo las dos últimas especies las más sensibles al efecto.

Cuando la administración de MPTP es sistémica, se disminuye el número de las neuronas nigrales inmunorreactivas a TH en un 80-95%, se reducen los niveles de dopamina estriatal y sus metabolitos, y se presenta acinesia (Hallman *et al.*, 1985; Heikkila *et al.*, 1984). En ratones, la recuperación de la acinesia y la aparición de neuronas nigrales TH (+) se presenta después de un mes sin tratamiento, pero es hasta pasado un año sin la administración de la neurotoxina cuando se recuperan el 100% las neuronas TH (+) (Donnan *et al.*, 1987; Nishi *et al.*, 1989). En primates, el síndrome inducido por la administración de MPTP se caracteriza por bradicinesia, acinesia, rigidez muscular, temblor y postura encorvada; es irreversible espontáneamente y se

requiere del tratamiento con agonistas dopaminérgicos para inducir una tendencia a la recuperación (Davis *et al.*, 1979).

### ***Métodos experimentales para inducir Parkinson experimental con 6-OHDA***

La 6-OHDA fue la primera neurotoxina descubierta, empleada para inducir selectivamente la muerte celular catecolaminérgica. (Tranzer & Thoenen, 1968; Ungerstedt, 1968; Jonsson & Sachs, 1975). La 6-OHDA induce un daño específico vía estrés oxidativo, por el uso del transportador de dopamina y norepinefrina.

El uso de la toxina 6-OHDA constituye el modelo clásico y más utilizado en animales para el desarrollo experimental de la enfermedad de Parkinson (Blesa *et al.*, 2012). Esta neurotoxina tiene una estructura similar a la dopamina por lo que puede ser transportada al interior de las neuronas por los transportadores catecolaminérgicos: transportador de dopamina y del transportador de norepinefrina (Jonsson & Sachs, 1975). Una vez adentro es llevada hasta los somas neuronales, afectándolos y causando la degeneración de terminales (Deumens *et al.*, 2002). La presencia del grupo hidroxilo (-OH) la vuelve tóxica para las neuronas catecolaminérgicas mediante la inhibición de la cadena respiratoria en sus complejos I y IV (Glinka *et al.*, 1997) y por la formación de especies reactivas del oxígeno y quinonas (Cohen, 1984). Es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica por lo que debe ser inyectada directamente en la SNc, Haz del Cerebro Medio (MFB) o en el Estriado.

La rata es la especie animal que más se ha utilizado para inducir el modelo de la enfermedad de Parkinson. Usando un atlas estereotáxico (Paxinos & Watson, 1986) un área específica puede ser seleccionada. Para su administración, 6-OHDA debe ser preparada en fresco, se disuelve el compuesto en solución salina y ácido ascórbico (0.2 mg/ml en 0.9% de salina). Debido a que este compuesto es sensible a la luz debe almacenarse en la obscuridad. Dependiendo de la localización del sitio de inyección, el número de sitios de inyección y la cantidad de neurotoxina, los animales presentan diferente curso temporal de progresión y severidad de la lesión.

### ***Modelos en ratas***

**a. Lesión unilateral (6-OHDA)**

1. *Lesión haz cerebro medio (enfermedad de Parkinson avanzada).*
2. *Lesión Sustancia Nigra compacta (enfermedad de Parkinson avanzada).*
3. *Lesión del Estriado (enfermedad de Parkinson moderada).*

**b. Lesión bilateral**

- 1) *6-OHDA en el haz del cerebro medio (enfermedad de Parkinson catastrófica: afagia, adipsia, muerte).*
- 2) *Exposición a manganeso por 6 meses.*
- 3) *Inhibición del sistema proteasoma-ubiquitina.*

Actualmente, la 6-OHDA se utiliza comúnmente para generar lesiones unilaterales, porque la inyección bilateral en el haz medial provoca adipsia y afagia severas, así como la muerte de los animales (Ungerstedt, 1971; Bourn *et al.*, 1972). La lesión del haz medial o nigral produce una pérdida casi total de neuronas (cerca del 90% de pérdida celular en la Sustancia nigra) lo cual es equivalente a la etapa final de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la SNc en la enfermedad de Parkinson tiene lugar en ambos hemisferios, por lo que el tener un modelo bilateral sería más cercano a lo que acontece en la enfermedad. Se ha reportado que la administración estriatal en 4 puntos de 20 µg de 6-OHDA produce una pérdida del 80% de neuronas dopaminérgicas en la SN (Roedter *et al.*, 2001, Sauer & Oertel, 1994), lo cual acerca más a las condiciones de la enfermedad. La administración de la neurotoxina en el Estriado provee una ventana más amplia de tiempo para actuar, incrementando las posibilidades de detectar la neuroprotectora. En este sentido en el laboratorio hemos desarrollado un método de lesión bilateral que mejora el índice de supervivencia de los animales y reproduce los síntomas más relevantes de la enfermedad de Parkinson como la bradicinesia, hipocinesia y pérdida del control de la marcha y del desempeño motor general. El modelo consiste en lesionar bilateralmente el Estriado induciendo un Parkinson

avanzado, de esta manera logramos obtener una degeneración bilateral de magnitud similar en ambos lados, lo que sería semejante a lo que ocurre en la condición patológica de los enfermos de Parkinson.

## Planteamiento del problema

El uso de la L-Dopa constituye el fármaco de elección para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, pero presenta una gran desventaja ya que su uso prolongado llega a producir discinesias y disminuye su eficiencia farmacológica con el paso del tiempo (Quinn *et al.*, 1987; Schapira *et al.*, 2006). Es por ello, que en la actualidad, se han buscado otros enfoques terapéuticos, tales como la combinación de varias terapias o el uso de otros fármacos, encaminados a disminuir los síntomas motores que produce la enfermedad de Parkinson, sin que éstos generen efectos secundarios indeseados o disminuyan su eficiencia farmacológica después de una administración prolongada. Uno de tales fármacos es el PPX; empleado para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, el cual es un agonista preferencial de los receptores D<sub>3</sub> (Camacho-Ochoa *et al.*, 1995; Mierau *et al.*, 1995; Sautel *et al.*, 1995; Piercey *et al.*, 1996) y que ha demostrado tener buena eficiencia para el control de los síntomas motores de los enfermos de Parkinson, aunque su eficacia farmacológica disminuye al cabo de algunos años.

Estudios previos de nuestro grupo, han mostrado que existe recuperación motora mediante la administración crónica del 7-OH-DPAT o PPX, (ambos agonistas del receptor dopaminérgico D<sub>3</sub>) asociada a la transfección del gen para BDNF en modelos experimentales de la enfermedad producidos por lesiones unilaterales, inyectando la 6-OHDA en un solo Estriado (Razgado-Hernández *et al.*, 2015; Quintero, *et al.*, datos por publicar). Asimismo, se ha reportado que las alteraciones motoras (de la marcha, el tono muscular y la coordinación motora en la rata) se recuperan totalmente con el tratamiento combinado crónico de una terapia génica, con BDNF, y farmacológica con un agonista preferencial del receptor dopaminérgico D<sub>3</sub> y no así, al utilizar cada una de las estrategias experimentales mencionadas por separado (Razgado-Hernández *et al.*, 2015). Los agonistas dopaminérgicos al activar el receptor D<sub>3</sub> podrían, estar modulando la liberación de dopamina y BDNF (Guillin *et al.*, 2003), así como de otros neurotransmisores como el GABA y el glutamato, que posiblemente estarían interactuando entre sí, para de alguna manera, provocar los cambios motores que se observan tras su administración.

Es importante señalar que los modelos unilaterales de lesión química para inducir Parkinson experimental no representan por sí mismos la condición patológica de los enfermos con Parkinson ni reproducen todos los síntomas de la enfermedad. Son pocos los modelos experimentales en donde se realiza una lesión bilateral de los ganglios basales. Los modelos de lesión bilateral en el haz medial son poco empleados ya que los animales presentan diversos efectos secundarios, tales como afagia y adipsia, los cuales son síntomas limitantes que llegan a producir la muerte de los animales, lo que a su vez impide la realización de estudios a largo plazo (Ungerstedt, 1971; Bourn *et al.*, 1972), así como la evaluación de terapias para el tratamiento de la enfermedad (Jolicoeur *et al.*, 1991). Un modelo de lesión bilateral consiste en la lesión en ambos lados del Estriado, lo que provoca la aparición de síntomas que representan a un Parkinson de moderado-avanzado y que es capaz de reproducir síntomas motores característicos de la enfermedad de Parkinson que no se observan en modelos unilaterales y acercándose a la condición patológica real que presentan los pacientes con esta enfermedad.

Es por lo que, para el presente proyecto, hemos decidido emplear el modelo de lesión bilateral estriatal para inducir Parkinson experimental, para obtener la pérdida casi total de la innervación nigro-estriatal y reproducir los síntomas motores, característicos de la enfermedad de Parkinson, tales como: acinesia, bradicinesia y disminución de la coordinación motora, entre otros.

Una vez que elegimos el modelo que más se acerca a la condición patológica, nos preguntamos, si la administración de un agonista de los receptores D<sub>3</sub> podría tener efectos en este modelo de lesión, ya que en la clínica se han visto una mejora motora en pacientes con la enfermedad de Parkinson. Una vez que se evaluó el efecto agudo del agonista nos preguntamos cual sería el efecto motor que se produciría tras una administración crónica de una terapia combinada de PPX (agonista de los receptores D<sub>3</sub>) asociado a la transfección del gen para el BDNF a las neuronas dopaminérgicas para controlar el Parkinson experimental producido por la lesión bilateral de la innervación nigro-estriatal, debido a que una monoterapia solo con PPX, pierde su eficiencia farmacológica al paso de unos años y se vuelve ineficiente para tratar los síntomas motores característicos de la enfermedad de Parkinson. El estudiar los efectos



de esta terapia combinada en el modelo de lesión bilateral podría tener una relevancia clínica para el control de los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson y asimismo entender si hay una participación preponderante de los receptores D<sub>3</sub> en el desarrollo o mejora de la enfermedad de Parkinson asociado con el efecto potenciador del BDNF, ambos tienen una retroalimentación positiva en su expresión y liberación, sumando sus efectos tróficos, controlando los síntomas motores de manera permanente. De aquí la importancia de estudiar más a fondo el papel de los receptores D<sub>3</sub> en la regulación del movimiento, así como entender las acciones que se producen sobre la respuesta motora, una vez que se administra el agonista asociado a la transfección del BDNF, se produzca una activación del receptor D<sub>3</sub> y un efecto del BDNF sobre las neuronas dopaminérgicas remanentes para el control motor en la enfermedad de Parkinson.

## **Hipótesis**

La asociación del pramipexol (agonista preferente del receptor D3) con la transfección del BDNF recuperan la conducta motora en animales con lesión bilateral de la inervación nigroestriatal y produce efectos tróficos en las neuronas dopaminérgicas y estriatales.

## **Objetivo general**

Evaluar el efecto del tratamiento combinado de pramipexol asociado a la transfección del gen para BDNF sobre las alteraciones motoras y los efectos neurotróficos en un modelo de degeneración bilateral de la inervación nigro-estriatal.

## **Objetivos específicos**

1. Estudiar los efectos farmacológicos del pramipexol sobre la conducta motora en ratas con lesión bilateral de la inervación nigro-estriatal (parkinsonicas).
2. Determinar los efectos de la asociación del PPX + BDNF sobre los síntomas motores en un modelo de Parkinson por lesión bilateral.
3. Determinar los efectos de la terapia combinada sobre los síntomas no motores como memoria y ansiedad.
4. Determinar la efectividad de la transfección en las neuronas dopaminérgicas.
5. Evaluar los efectos tróficos de la terapia combinada sobre las neuronas dopaminérgicas y estriatales.

## **Diseño experimental**

### ***Animales***

Todos los procedimientos fueron realizados en estricto apego a la legislación mexicana actual, la NOM-062-ZOO-1999 y la NOM-087-ECOL-1995 (SAGARPA), basados en la guía para el uso y manejo de animales de laboratorio. El comité institucional del Cinvestav para el uso y cuidado de los animales (UPEAL) aprobó nuestros procedimientos (protocolo #0121-03). Se realizaron todos los esfuerzos necesarios para minimizar el sufrimiento de los animales, empleando anestésicos ketamina (Ketamine-Pet Laboratory Aranda 75 mg/Kg, procina al 2% (xilacina, Pisa, 5 mg/Kg) intraperitonealmente (i.p.) y analgésicos (ketoprofeno 1%, 0.2 ml i.p.) cuando fue apropiado bajo la supervisión de un veterinario para reducir el dolor y estrés de los animales. Estos medicamentos también se aplicaron previo al procedimiento de eutanasia empleando ketamina y xilacina (75 mg/Kg y 5 mg/Kg i.p. respectivamente; con la perfusión con 120 ml de solución salina (0.9% NaCl) seguida de 300 ml de paraformaldehído (4% en PBS pH. 7.4, 0.1M).

Se utilizaron ratas macho Wistar de un peso entre 220-250 g al inicio del estudio, proporcionadas por la Unidad de Producción de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Cinvestav con número de protocolo 121, las cuales fueron mantenidas en el bioterio con un ciclo invertido de luz-obscuridad de 12 h y con acceso a comida y agua *ad libitum*.

### ***Modelo de lesión bilateral estriatal***

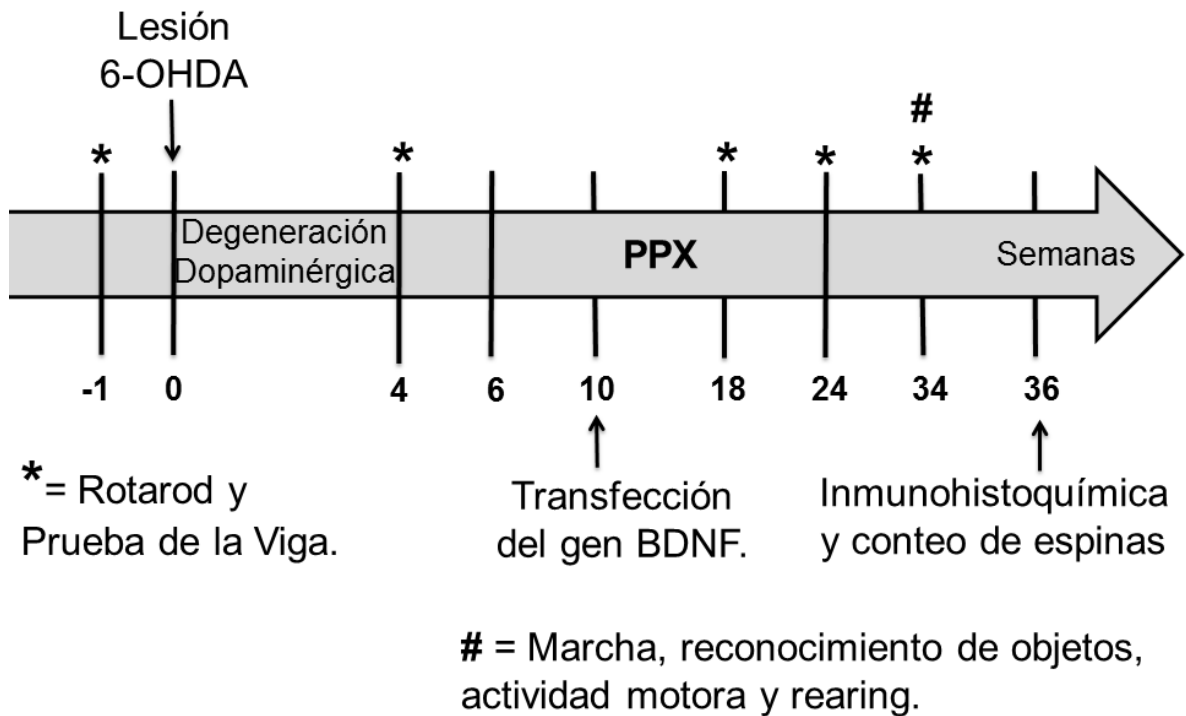
Los parámetros motores se evaluaron antes de lesionar cada rata con el fin de realizar un seguimiento de su desempeño individual a lo largo del protocolo y tener los parámetros motores iniciales. La prueba de rotarod se utilizó como tarea discriminativa antes y después de un mes de la lesión con 6-OHDA (animales con  $\leq 50\%$  de pérdida del rendimiento inicial en el desempeño motor se incluyeron para el diseño experimental). Las ratas se dividieron aleatoriamente en tres grupos de 8 sujetos cada

uno: 1) ratas tratadas con el agonista del receptor D<sub>3</sub>, PPX, asociadas a la transfección del gen BDNF (PPX + BDNF); 2) ratas lesionadas sin tratar y 3) ratas control / intactas. Algunas muertes de animales ocurrieron durante el estudio, pero fueron aleatorias entre los grupos y no se relacionaron con los procedimientos experimentales.

Se eligió la lesión dorso-medial intraestriatal con el objetivo de evitar el daño químico inespecífico de la 6-OHDA sobre las MSNs de la parte dorsolateral del estriado (Kirik *et al.*, 1998), lo que podría evitar la reinervación de esta zona, predominantemente inervada por las aferencias de la corteza sensoriomotora (Voorn *et al.*, 2004, Graybiel, 2005). Para ello las ratas fueron anestesiadas con ketamina y xilacina (75 mg/Kg y 5 mg/Kg i.p., respectivamente) y colocadas en un aparato estereotáxico (David Kopf instruments, Tujunga, CA. modelo 201025R), después de una incisión en la parte superior de la cabeza y de dos hoyos pequeños en el cráneo se utilizó una cánula calibre 30 para inyectar (1 µL de solución). Se lesionó el Estriado en tres sitios, las coordenadas fueron obtenidas con respecto al atlas estereotáxico de Paxinos & Watson (1998), las coordenadas empleadas a partir de bregma fueron: sitio 1: +1.9 mm anteroposterior, ±2.5 mm lateral y -5 mm ventral a partir de la superficie de la duramadre. Sitio 2: +0.8 mm anteroposterior, ±2.9 mm lateral y -4 mm ventral a partir de la superficie de la duramadre y, sitio 3: -0.5 mm anteroposterior, ±5.2 mm lateral y -5 mm ventral, a partir de la superficie de la duramadre. En cada sitio se inyectaron 7 µl de 6-OHDA disuelta en solución salina al 0.9% con 0.1% de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) en 1 µl de solución de vehículo a un flujo de 0.1 µl/min. Tras la infusión se dejó la cánula 3 min más al final de la inyección para prevenir el reflujo y para permitir la difusión de la toxina, antes de retirar la aguja. Una semana después se realizó la inyección de la neurotoxina o solución salina en el Estriado contralateral con las coordenadas antes mencionadas. 7 µg/µl/sitio de la toxina 6-OHDA, la cual se mantuvo a una temperatura de 4 °C protegida de la luz para minimizar la oxidación. Los animales fueron suturados y colocados en cajas individuales por dos semanas, durante su recuperación, se les administró terramicina durante 5 d en el agua para prevenir alguna infección. Debido a que la enfermedad de Parkinson se presenta generalmente en personas de edad avanzada, el deterioro de la capacidad motora que presentan estos pacientes es causada no sólo por la enfermedad sino también por la

edad. Es por ello que, en el presente estudio, se utilizó un grupo de animales intactos que fueron evaluados en paralelo con los grupos de ratas lesionadas, con la finalidad de evaluar los efectos de la edad sobre la capacidad motora de dichos animales.

## Diseño Experimental



**Figura 6.** Protocolo experimental utilizado en este trabajo. La flecha gris indica la duración en semanas y cada línea vertical negra representa un proceso realizado a lo largo del tiempo. La evaluación del comportamiento motor se indica con asteriscos, que incluyen rotarod, viga y actividad ambulatoria; # indica las pruebas motoras realizadas 2 meses después de retirar el PPX.

### *Administración crónica de pramipexol*

Se utilizaron mini bombas osmóticas marca Alzet (Duret Corporation, EUA, modelo 2006), las cuales fueron implantadas en el lomo de los animales. Cada mini

bomba osmótica (con capacidad de 200  $\mu$ l y flujo de 0.15  $\mu$ l/h, dosis de 0.5 mg/Kg/día; la cual, de acuerdo con estudios previos es adecuada para activar los receptores D<sub>3</sub> (Maj *et al.*, 1997) fue llenada con el agonista preferente del receptor D<sub>3</sub>, PPX (7-hidroxi-2-(di-N-propilamino) tetralina hidrobromida (Sigma-Aldrich) disuelto en solución vehículo (solución salina estéril al 0.09%). Se reemplazó la bomba cada 1.5 meses en cada rata para dar un total de 4.5 meses de infusión continua del agonista.

### ***Transfección del BDNF***

El gen de BDNF-flag fue transfectado a las neuronas dopaminérgicas de la SNc usando el NTS-polyplex descrito por Martínez-Fong y mejorado por Navarro-Quiroga (Martínez-Fong *et al.*, 1999; Navarro-Quiroga *et al.*, 2002). El procedimiento detallado de la síntesis del acarreador NTS y la formación del NTS-polyplex a una proporción molar óptima fue reportado anteriormente (Martínez-Fong & Navarro-Quiroga, 2000; Navarro-Quiroga *et al.*, 2002; Arango-Rodríguez *et al.*, 2006). El plásmido phDAT-BDNF-flag (10.5 kb) que codifica el gen de BDNF-flag bajo el control del promotor del transportador de DA humano (hDAT) fue obtenido clonando 868 pb del BDNF-flag dentro de los sitios Not I-Sal I del phDAT-EGFP (Sacchetti *et al.*, 1999, Arango-Rodríguez *et al.*, 2006). Los microensayos de retención y retardo (Navarro-Quiroga *et al.*, 2002, Hernández-Baltazar *et al.*, 2012), fueron usados para determinar los índices óptimos de molaridad de los componentes del NTS-polyplex, los cuales fueron 30 nM pADN; 30  $\mu$ M péptido cariofílico y 1.17  $\mu$ M NTS-FP-PLL (un conjugado de NTS, péptido cariofílico y poli-L-lisina).

El NTS-polyplex (2  $\mu$ L de la solución phDAT-BDNF-flag/acarreador NTS) fue inyectado justo arriba de la SNc, lentamente (0.1  $\mu$ L/min). Se utilizó el polyplex de neurotensina que contiene el gen que codifica para el BDNF como un método de transfección no viral a las neuronas dopaminérgicas (González-Barrios *et al.*, 2006). El polyplex con el gen para BDNF fue generosamente proporcionado por el Dr. Daniel Martínez-Fong y aplicado a los animales una sola vez bilateralmente en la SNc, un mes después del implante de las bombas, por medio de la microinyección de 2  $\mu$ l a un flujo de 0.1  $\mu$ l/min de la solución, las coordenadas fueron obtenidas con respecto al atlas estereotáxico de Paxinos & Watson (1988), a partir de bregma: del

lado derecho: anteroposterior -5 mm, 1.9 mm lateral y 7.1 mm ventral; del lado izquierdo: anteroposterior -5 mm, -1.9 mm lateral y 7.1 mm ventral.

## **Pruebas motoras y conductuales**

### ***Cajas de actividad***

La distancia y la velocidad de desplazamiento voluntario, así como el tiempo de ambulación y actividad exploratoria vertical (*rearing*), fueron evaluadas en cajas de actividad motora, cajas de acrílico con las siguientes dimensiones 43.2 x 43.2 x 30.5 cm, conteniendo un set de 16 haces de luz infrarroja y sensores ópticos que detectan cuando se interrumpe un haz de luz o dos haces consecutivos, lo que permite determinar el desplazamiento horizontal o vertical de la rata en el recinto. La actividad del animal se registró durante 60 min. Se utilizó la media de los valores obtenidos para realizar la gráfica correspondiente. Cabe señalar que se habituó al animal en la caja durante 20 min antes de iniciar la prueba.

### ***Rotarod***

Mediante el uso del equipo rotarod se evaluó la coordinación motora y el equilibrio de los animales en estudio. En este aparato, el cilindro comienza a girar a la velocidad que se le programe hasta que el animal cae, lo que es percibido por sensores ópticos que paran el giro del rodillo y en la pantalla se despliega el tiempo de permanencia del animal y la velocidad seleccionada. Se eligió un protocolo de 5 velocidades constantes (5, 10, 15, 20 y 25 RPM) con un tiempo máximo de prueba de 2 min por velocidad. Cada velocidad fue videograbada para posteriormente confirmar el tiempo que permanece cada rata en el rodillo.

### ***Viga***

Para analizar la coordinación motora gruesa, se entrenaron a las ratas a pasar en 5 ocasiones, a través de vigas de madera de 2 m de longitud de 12 mm y de 5 mm de grosor, colocadas con una inclinación de 15°, durante 5 d consecutivos. En el extremo más alto de la viga se coloca la caja hogar del animal y este iniciaba el recorrido en la parte más baja. Al quinto día se realizó la prueba, haciéndolas pasar una sola vez por cada viga (de 12 mm y de 5 mm de grosor). Cada evaluación fue videograbada para posteriormente determinar el tiempo que tarda cada rata en recorrer todo el largo de la viga hasta llegar a su caja hogar.

### ***Análisis de la marcha***

El trastorno de la marcha es uno de los síntomas más incapacitantes de la enfermedad de Parkinson. En modelos de roedores de la enfermedad de Parkinson permite probar el grado de pérdida de dopamina en el Estriado (Wang *et al.*, 2012). Aquí se estudió la marcha para evaluar la recuperación de la inervación dopaminérgica del Estriado por el tratamiento combinado. El paso fue registrado en una pista de acrílico transparente (17 cm de alto, 15 cm de ancho y 170 cm de largo, con un compartimiento oscuro al final de la pista para refugio). La pista estaba a 150 cm por encima del nivel del suelo. La cresta ilíaca, trocánter mayor, lateral, el maléolo y la cabeza distal del quinto metatarsiano fueron marcados con tinta indeleble, como referencia para analizar la marcha. Para evitar la variabilidad entre los ensayadores, el mismo operador evaluó la fase final de la prueba. Como el análisis de la marcha se limitó al plano sagital, la cámara se colocó frente al lado izquierdo de la rata, perpendicular a la dirección del movimiento. Los puntos marcados fueron rastreados cuadro por cuadro, obteniendo unas coordenadas bidimensionales (X, Y) utilizando el *software* ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los datos se importaron en Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft) y se analizaron con hojas de Excel preensambladas a segmentos del cuerpo modelados como líneas rectas rígidas a los puntos marcados. La posición de la rodilla se calculó indirectamente mediante la superposición de dos círculos centrados, en pivotes de cadera y tobillo, con un radio de la longitud del fémur y la tibia, respectivamente (Filipe *et al.*, 2006). La cinemática de



la marcha fue reconstruida a partir de los cambios en los puntos marcados situados entre tramas consecutivas, facilitando la generación de diagramas de barras (superponiendo modelos segmentos del cuerpo de cada marco) y parcelas de desplazamiento espacial. Los ángulos y distancias fueron calculados directamente por el *software*. Para las mediciones de ángulos, se utilizó el ángulo más pequeño de las dos alternativas típicamente empleadas, éste era el ángulo en el lado flexor de la articulación. Nosotros elegimos analizar el ángulo de la articulación del tobillo porque era el más alterado por la lesión con 6-OHDA. Para aprender a moverse a lo largo de la pista con velocidad constante, las ratas fueron entrenadas durante tres días consecutivos antes de la sesión de grabación. Una sesión usualmente consistió en pasar 10 veces al animal a lo largo de la pista. Se obtuvieron cuatro pasos por rata a una velocidad relativamente constante (centro de la pista). La deformación óptica de la imagen producida por la lente de la cámara fue determinada y corregida mediante el uso de un cuadrado de acrílico (5 cm x 5 cm) que sirvió como una escala bidimensional.

## ***Pruebas no motoras***

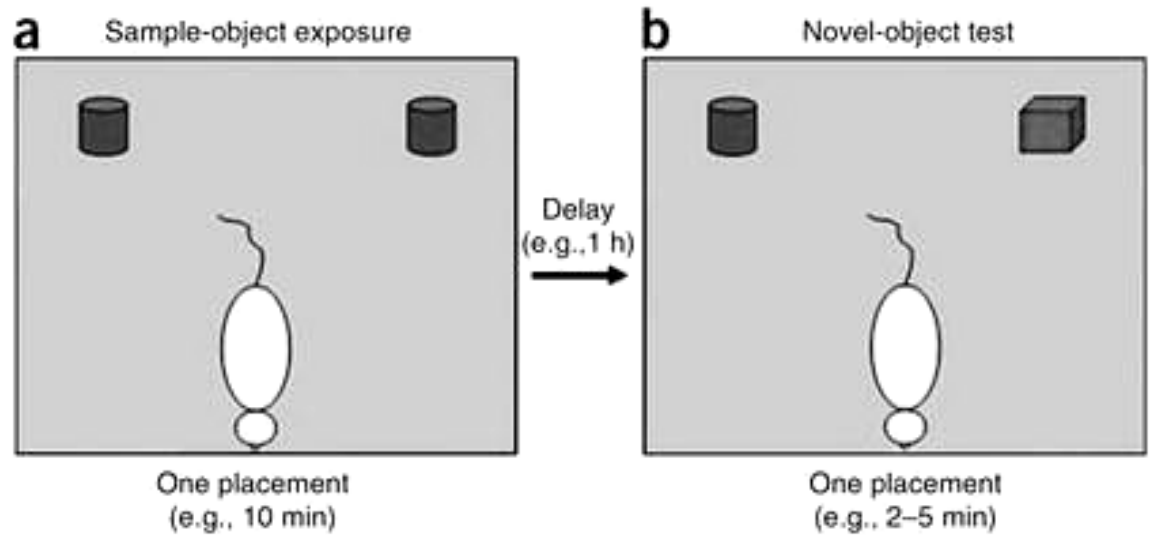
### ***Prueba de reconocimiento de objetos***

La prueba de reconocimiento de objetos se utiliza para evaluar la cognición, particularmente la memoria de reconocimiento, en modelos de roedores de trastornos del SNC (Beato *et al.*, 2008). Esta prueba se basa en la tendencia espontánea de los roedores a pasar más tiempo explorando un objeto novedoso que uno familiar (Ennaceur & Delacour, 1988). La elección de explorar el nuevo objeto refleja el uso de la memoria de aprendizaje y reconocimiento. El aparato consiste en una arena con las siguientes dimensiones: 45 cm por lado, con una altura de 50 cm, las paredes están hechas de madera. Durante la prueba, la arena se encuentra en completa oscuridad. En los ensayos de ROT, dos objetos fueron colocados en la arena en una posición simétrica.

En cada ensayo los objetos fueron colocados en la misma ubicación. Se utilizaron cuatro conjuntos diferentes de objetos. Los diferentes conjuntos de objetos

utilizados son generalmente consistentes en altura y volumen, pero son diferentes en forma y apariencia. Durante la habituación, se permite a los animales explorar una arena vacía. La fase de familiarización se realizó colocando ratas individualmente durante 5 min en el campo, en el que dos objetos idénticos (objetos A1 y A2) se colocaron en dos esquinas adyacentes, a 5 cm de las paredes (fase de familiarización).

Después de eso, las ratas exploraron la arena durante 5 min en presencia de un objeto familiar (A) y uno nuevo (B). La figura 7 muestra en una caricatura el diseño del experimento de reconocimiento de objetos. Los objetos fueron elegidos después de determinar, en experimentos preliminares, que eran igualmente preferidos por los animales en experimentación. Entre cada ensayo tanto la arena del campo abierto como los objetos se lavaron con solución de etanol al 95% y se cambió el aserrín. Todas las sesiones fueron filmadas. La exploración del objeto nuevo se definió como olfatear o tocar el objeto con la nariz; sentarse sobre el objeto no se consideró exploración. La colocación de objetos fue contrapesada de modo que la mitad de los animales en cada grupo de tratamiento vio el nuevo objeto en el lado izquierdo (relativo a la posición de partida del animal) del campo abierto y la otra mitad vio el nuevo objeto en el lado derecho de la arena. La proporción del tiempo de exploración total que el animal gastó investigando el objeto novedoso fue el índice de memoria de reconocimiento para la prueba. Para analizar el video, se inició el temporizador cuando el animal entra en contacto "dirigido" con el nuevo objeto. Se detuvo el temporizador cuando el animal dejó de ponerse en contacto con el objeto. Se repite durante las dos fases de la prueba y para cada objeto. Los contactos dirigidos incluyen cualquier contacto con la boca, la nariz o la pata. El IRNO (índice de reconocimiento de objeto novedoso), fue calculado como el tiempo de exploración de un objeto nuevo menos el tiempo de exploración del objeto familiar entre el tiempo total de exploración del objeto familiar y novedoso.



**Figura 7.** Reconocimiento de objetos. Dibujo de la fase de exposición del objeto idéntico (a) y de la fase de exposición al nuevo objeto (b).

### ***Inmunohistoquímica para TH***

Una vez cumplidos los periodos y realizadas las pruebas motoras y no motoras señaladas, cada animal fue anestesiado con ketamina y xilacina (75 mg/Kg y 5 mg/Kg i.p. respectivamente), luego se procede a perfundir, intracardiamente, con la ayuda de una bomba peristáltica (Masterflex), solución salina al 0.09% durante 5 min para posteriormente pasar 250 ml del fijador paraformaldehído al 4% (diluidos en solución amortiguadora PBS 0.1 M, pH 7.4), una vez concluida la perfusión se procede a extraer el cerebro y colocarlo en una solución similar a la fijadora (paraformaldehído en PBS) y dejarlo para su postfijación durante 24 h a temperatura ambiente.

Posteriormente para su crio-preservación se coloca el tejido en una solución de PBS (0.1 M, pH 7.4) y sacarosa al 30% y se deja en el refrigerador (a 4° C) hasta que la sacarosa se haya infiltrado en el tejido. Una vez que el tejido baja por aumento de su densidad, se procede a rebanarlo con un crióstato obteniendo rebanadas con un grosor de 30 micras las cuales se colocan en una solución con PBS al 0.1 M pH 7.4. Se colocan las rebanadas en pozos para iniciar con la Técnica de la TH, sin cambiarlas de pozo para evitar la fragmentación de estas. Se realizó la técnica convencional de inmunocitoquímica anti-TH por flotación del tejido. El primer paso es lavar las rebanas

con PBS-tritón frío al 0.5%, tres veces durante 5 min. Posteriormente se desecha esa solución y se agrega PBS-SDS a temperatura ambiente al 0.5% durante 5 min. Luego se procede al apagamiento de la peroxidasa, se colocan las rebanadas en una solución con isopropanol al 10%, peróxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% y PBS al 0.1 M pH 7.4, se hacen dos lavados de 15 min cada uno a temperatura ambiente. A continuación se procede al paso del bloqueo durante una hora a temperatura ambiente en una solución con suero de cabra al 10%, de peróxido al 2% y PBS-tritón al 0.025%. Se hacen 3 lavados con PBS-Tritón al 0.025% durante 5 min cada uno. Luego se añade a las rebanadas el anticuerpo primario (ANTI-TH policlonal) en una solución de anti-TH 1:1000, suero de cabra al 2% y PBS-Tritón al 0.025%, durante 48 h a 4 °C con agitación suave en obscuridad. Posteriormente se lavan las rebanadas con PBS-Tritón 0.025%, se hacen 3 lavados de 5 min cada uno. Se agrega el anticuerpo secundario biotinilado en una solución de anti-rabbit 1:200, suero de cabra 2% y PBS-tritón al 0.025% en obscuridad durante 2 h con agitación suave. Luego se hacen 3 lavados de 10 min cada uno en PBS al 0.025%. Se colocan las rebanadas en el marcador avidina-biotina, el cual debe prepararse 30 min antes de usarse, dicha solución contiene: 1 gota de A (avidina) más 1 gota de B (biotina) del *kit* correspondiente por cada 5 mL de PBS-Tritón al 0.025%, se coloca en obscuridad durante 2 h en agitación suave. Se hacen 3 lavados de 10 min cada uno con PBS-Tritón al 0.025%. A continuación se hace el revelado: una gota del *kit* ABC (avidina, iotina y diaminobenzidina) en 5 mL de agua MilliQ más 1 gota de *buffer*, 1 gota de peróxido, con 1 gota de diaminobenzidina (DAB) más 0.25 mL de níquel con 50 µl de suero de cabra, se coloca de 2 a 3 min y se procede a lavar las rebanas con PBS 1 M. Posteriormente se procede al montaje de las rebanadas en un portaobjetos gelatinizado de acuerdo a las estructuras presentes en cada rebanada; una vez en los portaobjetos se dejan secar aproximadamente 1 semana a temperatura ambiente y cubiertas de la luz solar. Luego se procede a deshidratar el tejido mediante una serie de alcoholes isopropanílicos a diferentes concentraciones (80-100%) durante 1 min en cada solución, para posteriormente pasar al xilol que es el solvente de la resina con la que se cubrirán, se coloca resina sintética sobre las rebanadas para cubrirlas y posteriormente realizar el conteo de las neuronas positivas a TH en los diferentes grupos de estudio mediante microscopía de luz.

### ***Conteo estereológico de neuronas nigrales***

Se realizó un estudio estereológico nigral estereológico de las neuronas TH inmunopositivas utilizando el *software* StereoInvestigator v.11 (MicroBrightField Inc.) acoplado a un microscopio estereológico Nikon Labophot-2 equipado con un modelo motorizado de escenario Ludl MAC-2000 con un framegrabber y un CCTV Exwave HAD Sony cámara. La SNc y la AVT fueron delimitadas dentro de un conjunto de claras referencias anatómicas de Paxinos & Watson, 1998. Las neuronas se contaron usando un objetivo 40X N.A. 0.5 con un relé de lentes 1x / 16 por cada 10 rebanadas que contenían la SNc y la AVT (6-7 rebanadas por rata, n = 3 ratas por grupo) por un experimentador cegado al historial del tratamiento.

### ***Tinción de Golgi***

Una vez que se realiza la perfusión del animal, se procede a tomar un pedazo del Estriado rostral para continuar con la tinción de Golgi la cual consiste en la impregnación argéntica de la muestra (rebanadas de 4 mm de Estriado dorsal anterior) en una mezcla de osmio-dicromato ( $\text{OsO}_4$  0.3%  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  2.7% en  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada) durante 7 d a temperatura ambiente, en oscuridad. Posteriormente las muestras se lavan rápidamente en agua bidestilada, y se sumergen en nitrato de plata al 0.75%, se dejan 24 h, para después realizar los cortes, los fragmentos de tejido se encastran en parafina y se obtienen cortes de 100 micras de grosor que se colocan secuencialmente en alcoholes a diferentes concentraciones iniciando con alcohol isopropílico al 95% 2 veces, luego alcohol absoluto al 100% 2 veces por 10 min cada uno; para aclarar el tejido se pasa a un baño de esencia de clavo por 10 min y finalmente se pasa por xilol durante 10 min, luego se procede al montaje de las rebanadas en un portaobjetos para posteriormente cubrirse con resina sintética para dejarse secar por un plazo aproximado de 18 d.

El conteo de las espinas dendríticas se hace en 5 dendritas secundarias de 10 neuronas espinosas medianas en ambos hemisferios; se cuentan las espinas en segmentos de 10 micrómetros posteriores a los 10 primeros micrómetros de la dendrita secundaria a partir de la primera bifurcación mediante microscopía de luz (Ávila-Costa *et al.*, 2004).

### ***Inmunofluorescencia para detectar BDNF-flag/TH***

De las rebanadas previamente cortadas, se seleccionan solo las que contengan sustancia nigra y VTA a diferentes niveles, antes de proceder a hacer la técnica de TH. Luego se procede a permeabilizar con PBS-Tritón al 0.5%, esto 4 veces por 10 min. Se decanta esa solución y se agrega PBS-SDS al 0.5% una sola vez durante 10 min. Se procede al bloqueo por 30 min a 37 °C con BSA al 10% en PBS 0.1 M pH 7.4. Se lavan las rebanadas con PBS 0.1 M durante 5 min 2 veces. Se incuban con los anticuerpos primarios durante 2 h a 37 °C: anti-flag M1284 1:300, Anti-TH 1:1000 en PBS 0.1 M /BSA al 3%, luego se dejan 48 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Se hacen 3 lavados con PBS 0.1 M durante 5 min. Se incuban con los anticuerpos secundarios durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad: anti-mouse (*rabbit*) Alexa 488 1:200, anti-rabbit (*goat*) Cy5 1:200 en PBS 0.1 M /BSA 3%. Se lavan con PBS 0.1 M 3 veces durante 5 min. Una vez que se hacen los lavados, se procede a montar las rebanadas en la oscuridad y en portaobjetos limpios y libres de gelatina o de polilisinas. Se mantienen refrigerados a 4 °C hasta que se analizan con el microscopio confocal para evaluar y cuantificar la colocalización de las neuronas positivas a TH y BDNF-flag.

### ***Determinación de los contenidos de dopamina con la técnica de HPLC***

Una manera de comprobar la depleción dopaminérgica, después de inyectar la 6-OHDA en el sistema dopaminérgico, es midiendo los contenidos del neurotransmisor, debido a que este dato revela el grado de pérdida de la inervación sobre el núcleo estudiado. La disminución de los contenidos ocurre después de 24 h de

la lesión y no se presenta recuperación aun después de 140 a 180 d (Heikkila y Cohen, 1984; Zigmond y Stricker, 1989; Yuan *et al.*, 2005).

Una vez que se terminó con la evaluación motora dos meses después de retirar la administración sistémica del PPX, los animales fueron sacrificados y se extrajo el cerebro para medir las concentraciones de DA y sus metabolitos en el Estriado. Utilizando un vibratomo se obtuvieron rebanadas coronales de 300  $\mu\text{m}$ , y de ellas se disecaron manualmente secciones de ambos lados del Estriado. Se homogenizó el tejido con ácido perclórico (0.1 N) y con ayuda de una microcentrífuga Airfuge (Beckman, Fullerton CA., EUA) a 300 PSI por minuto se obtuvieron dos fases. La fase líquida se filtró en membranas de nylon con poro de 0.22  $\mu\text{m}$ , y se ocupó para medir las concentraciones de DA en un cromatógrafo LC-4C (Bioanalytical System, Inc. - BAS-, West Lafayette, IN, EUA) equipado con un inyector automático Rheodyne con asa de 5  $\mu\text{L}$ . El flujo de la fase móvil se mantuvo a 0.9 mL/min.; la composición de la fase móvil fue: ácido monocloroacético 0.1 M, ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA) 0.65 mM, ácido octanosulfónico 0.9 mM, y acetonitrilo al 4.5%, pH ajustado a 4.5 con hidróxido de sodio (NaOH) y desgasificada con agitación y vacío. La separación de las catecolaminas se efectuó en una columna de microporo C18 (100 X 1 mm) con partículas de 3  $\mu\text{m}$  (BAS- Unijet).

La detección electroquímica se hizo mediante una celda con dos electrodos de carbono vidriado colocados en serie y controlados por dos módulos LC-4C (BAS). El primer electrodo se trabajó a un potencial de + 300 mV, con el fin de oxidar contaminantes; y al segundo electrodo se le asignó un voltaje de + 750 mV, cuya señal obtenida fue digitalizada por una tarjeta de interfase, procesada en una PC y analizada mediante el programa Peak II (SRI Instruments, Torrance, CA, EUA).

La fase sólida fue resuspendida en 120  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.2 N y en alícuotas de 20  $\mu\text{l}$  se cuantificó por triplicado la cantidad de proteína con el método de Bradford.

### ***Análisis estadístico***

Se analizó el comportamiento motor en el rotarod, viga y cajas de actividad de cada rata antes de la lesión bilateral con 6-OHDA. Los valores de estos análisis se

tomaron como 100% (condición normal). Para determinar el número de neuronas TH + que expresan la inmunofluorescencia BDNF-Flag, el 100% fue el total de las neuronas TH (+) en la misma SNc. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Como los mismos animales fueron sometidos a múltiples pruebas, los efectos secuenciales del tratamiento combinado y las diferencias entre los grupos se estimaron mediante análisis de ANOVA de medidas repetidas unidireccionales seguidas por las comparaciones múltiples de Tukey post-test o análisis de ANOVA de medidas repetidas de dos vías. Los significados estadísticos se estimaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego California, EUA). Se tomó  $P < 0.05$  como una diferencia estadísticamente significativa.



## Resultados

### *Efectos farmacológicos del PPX*

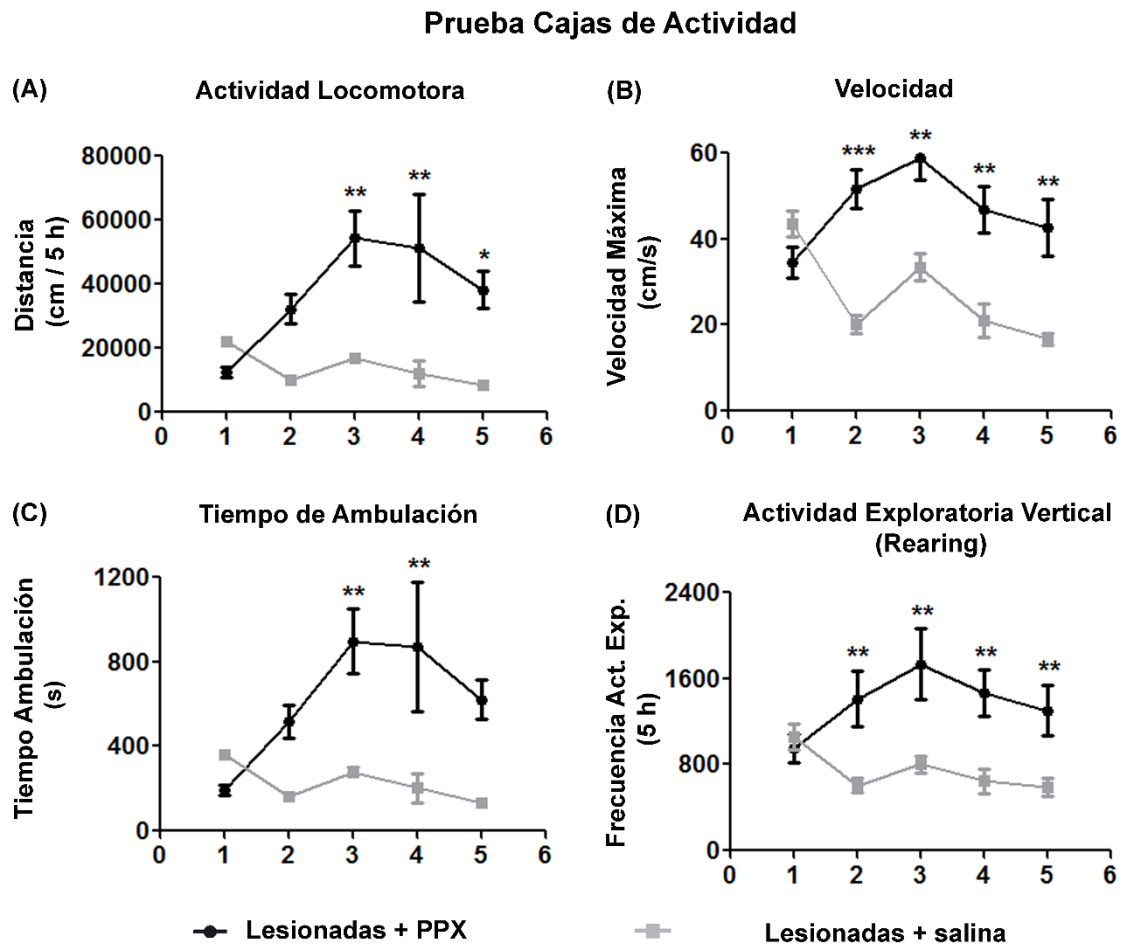
La enfermedad de Parkinson produce síntomas motores característicos como lo son: la acinesia, bradicinesia, disminución del movimiento voluntario, entre otros. El modelo de lesión bilateral empleado para este trabajo logra reproducir estos síntomas motores, por lo que nos preguntamos qué respuesta tendría administrar el agonista de estos receptores que es actualmente empleado en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson en el modelo de lesión bilateral. Para asegurarnos de que la activación del receptor D<sub>3</sub> produce una respuesta sobre los efectos motores en el modelo de lesión bilateral estriatal, se decidió administrar una dosis diaria de PPX (1mg/kg, vía oral, durante 5 d) y registrar el efecto producido sobre la actividad locomotora general mediante la prueba de cajas de actividad durante 5 h; cabe mencionar que los animales se habituaron durante 20 min en las cajas antes de iniciar la prueba.

En la figura 8 podemos observar los efectos motores producidos por la activación del receptor D<sub>3</sub>, la línea color negro representa los animales lesionados que recibieron el PPX, la línea gris a los animales lesionados que recibieron solución salina.

El PPX induce un incremento a partir del segundo día de administración en la actividad locomotora general de los animales lesionados bilateralmente, tanto en su distancia (Figura 8A), la velocidad de desplazamiento (Figura 8B) y el tiempo de ambulación (Figura 8C), lo que involucra el control de la bradicinesia o acinesia característico en los enfermos de Parkinson y que está presente en los animales con lesión bilateral, este efecto no se observa en los animales lesionados bilateralmente que reciben solución salina (línea color gris,.) donde no observamos cambios significativos a lo largo del experimento, en los parámetros evaluados, distancia, velocidad y tiempo de ambulación, evaluados al segundo día de administración de solución salina.

La actividad exploratoria vertical (“rearing”) está asociado al grado de ansiedad que presenta el animal, juzgado en las cajas de actividad. La Figura 8D muestra que el PPX aumenta significativamente la actividad exploratoria vertical, indicando que puede controlar la ansiedad de las ratas lesionadas bilateralmente. Los animales lesionados bilateralmente que reciben solución salina no presentan cambios

significativos en los diferentes días de administración. Con estos resultados observamos que el PPX si presenta efectos motores importantes sobre la conducta motora en el modelo de lesión bilateral.



**Figura 8.-** Efectos agudos del PPX en el modelo de lesión estriatal bilateral. El PPX (1 mg/Kg/día) incrementa la locomoción (A), la velocidad (B) y tiempo de ambulación (C) así como la actividad exploratoria vertical (“rearing”, D) en los animales lesionados bilateralmente. La solución salina no afectó la actividad locomotora de las ratas con lesión bilateral. \*  $P < 0.05$  lesionada + salina vs lesionada + PPX, \*\*  $P < 0.01$  lesionada + salina vs lesionada + PPX, \*\*\*  $P < 0.001$  lesionada + salina vs lesionada + PPX,  $n = 6$ . Los datos fueron analizados con una prueba de Anova de una vía con un *post test* de Tukey.  $\alpha = 0.05$ .

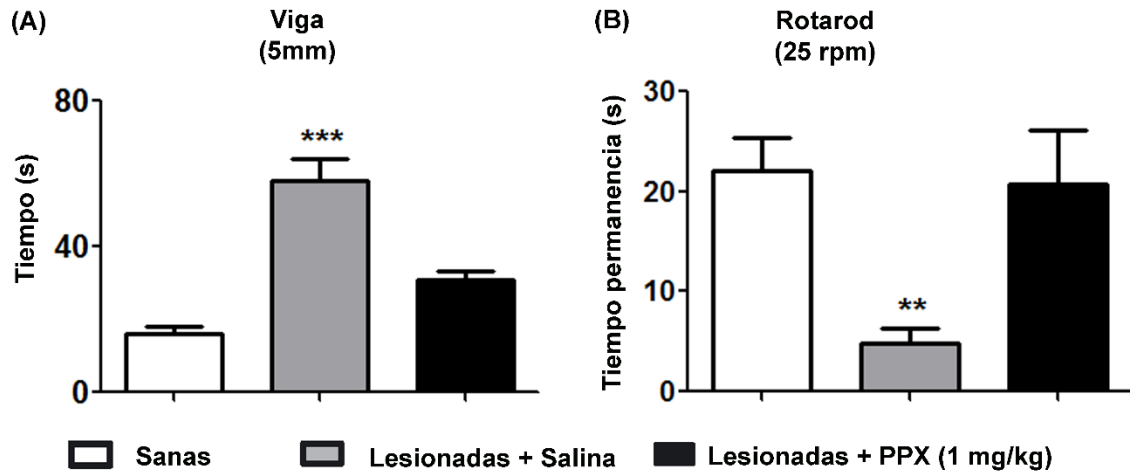
### ***Coordinación motora juzgada por la prueba de la viga***

La enfermedad de Parkinson produce inestabilidad postural, así como pérdida de la coordinación motora para realizar el movimiento voluntario normal. Nuestro modelo de lesión bilateral logra reproducir este síntoma motor característico en los enfermos con Parkinson, por lo que evaluamos el efecto del PPX sobre la coordinación motora en los animales lesionados bilateralmente. Este agonista eliminó la incoordinación motora que presentan las ratas con la lesión bilateral de la innervación nigro-estriatal (Figura 9A, barra negra) a valores semejantes a los de la condición sana (barra gris, Figura 9A, el cual no muestra diferencia estadística significativa). Este efecto motor es el observado en los pacientes con la enfermedad de Parkinson tras administrar este agonista. Los animales lesionados que reciben solución salina incrementan el tiempo que tardan en realizar la prueba y algunos no logran atravesar la viga y llegar a su caja, demostrando la alteración de coordinación motora (barra Gris).

### ***Coordinación motora juzgada por la prueba del rotarod***

Asimismo, otra manera de evaluar el desempeño motor de los animales lesionados bilateralmente es mediante el uso de la prueba del rotarod. En la figura 9B podemos observar que al analizar los resultados a la velocidad más alta (25 rpm), la administración con PPX (barra negra) logró recuperar la coordinación motora a valores similares a los de las ratas sanas (barra Blanca), es decir, logra que las ratas puedan mantenerse mayor tiempo sobre el rodillo, aunque la velocidad a la que gire este, sea alta. Las ratas lesionadas bilaterales que reciben solución salina (barra gris) no logran mantenerse un mayor tiempo en el rodillo, mostrando, que no tiene recuperación espontánea, (Figura 9B). El PPX controla las alteraciones posturales y descoordinación de movimientos del enfermo con enfermedad de Parkinson. La mejora motora mostrada representaría la recuperación observada en el paciente de la enfermedad de Parkinson tratado con PPX.

## Pruebas motoras



**Figura 9.-** El PPX recuperó la coordinación motora en las ratas lesionadas bilateralmente evaluada tanto en la prueba de la viga (A) como en la prueba del rotarod (B). Las barras representan el promedio de las mediciones individuales de los diferentes grupos  $\pm$  el error estándar para cada grupo. \*\*  $P < 0.01$  lesionada bilateral + salina vs sanas / lesionadas + PPX, \*\*\*  $P < 0.001$  lesionada bilateral + salina vs sanas / lesionada bilateral + PPX,  $n=14$ . Los datos fueron analizados con una prueba de Anova de una vía con un *post test* de Tukey.  $\alpha=0.05$ .

### *Efecto motor de la terapia combinada*

No se empleó el BDNF por sí solo, ya que antecedentes en nuestro laboratorio (Razgado-Hernández et al., 2015), mostraron que no recupera la conducta motora normal en un modelo de lesión unilateral estriatal.

Una vez que observamos el efecto motor que produce el PPX sobre el modelo de lesión bilateral, así como los síntomas motores que presenta nuestro modelo de lesión, decidimos administrar una terapia combinada, asociando el agonista del receptor  $D_3$ , el PPX y la transfección para BDNF sobre las neuronas remanentes de la SN.

### ***La terapia combinada es capaz de recuperar la coordinación motora en el modelo bilateral***

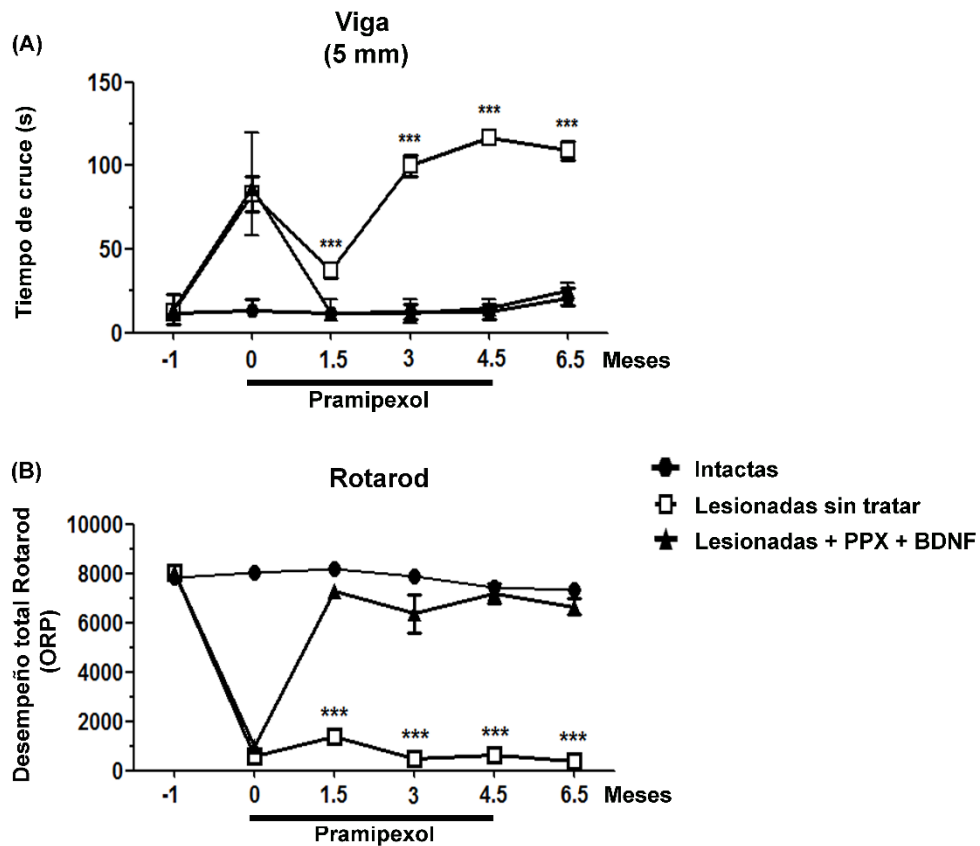
Recuperar la coordinación motora en los pacientes con la enfermedad de Parkinson es de gran importancia ya que esto mejoraría la calidad de vida de estos para poder realizar sus actividades cotidianas con normalidad. La coordinación motora y el balance de las ratas fue evaluado mediante dos pruebas motoras: una de ellas la prueba de la viga (Figura 10A) y la otra por el rotarod (Figura 10B).

La prueba de la viga, es un método sensible para evaluar la discapacidad motora que se presenta en los animales (Drucker-Colín & García-Hernández, 1991), se registró el desempeño que tuvieron las ratas en la prueba empleando una viga de 5 mm de grosor (Figura 10A), podemos apreciar que las ratas lesionadas bilateralmente que reciben el tratamiento combinado durante 4 meses y medio (PPX + BDNF, representada por la línea negra con triángulos) muestran una disminución significativa en el tiempo que tardan en atravesar la viga a valores semejantes a los de las ratas intactas (representadas con una línea continua con círculos negros), los cuales mantienen sus tiempos de manera constante a lo largo del protocolo experimental. Los animales lesionados sin tratar (representados por la línea discontinua negra con cuadros blancos) no mejoran su desempeño motor a lo largo del experimento, lo que refleja que no se presenta recuperación espontánea de los animales.

La prueba del rotarod evalúa la cantidad de tiempo que las ratas permanecen en el rodillo que gira a distintas velocidades (Figura 10B) y su desempeño total en el rotarod, calculado como el área bajo la curva en la gráfica de tiempo en el rodillo contra velocidad de rotación del tambor (Rozas & Labandeira García, 1997, Rozas *et al.*, 1998). La lesión nigro-estriatal produjo una marcada alteración de la capacidad de movimiento de las ratas, manifestada como una reducción significativa en el tiempo de permanencia sobre el rodillo del rotarod, siendo más evidente a velocidades de 15, 20 y 25 rpm (Figura 10B, línea color negro con cuadros blancos). El grupo de animales que recibió el tratamiento combinado después de 4.5 meses de administración, mejoraron significativamente el tiempo de estancia sobre el rodillo (Figura 10B, Línea

negra con triángulos negros) a valores semejantes a los de las ratas intactas (Figura 10B, Línea color negro con círculos negros).

Estos efectos, de igual manera, perduraron al menos 2 meses después de haber concluido el tratamiento con el agonista D<sub>3</sub>, el PPX, (Figura 10B). Como se observa, el tratamiento combinado induce una recuperación significativa (450% mayor con respecto a la lesión bilateral) después de concluir la administración del PPX, lo que posiblemente refleja cambios neurotróficos permanentes en los animales.

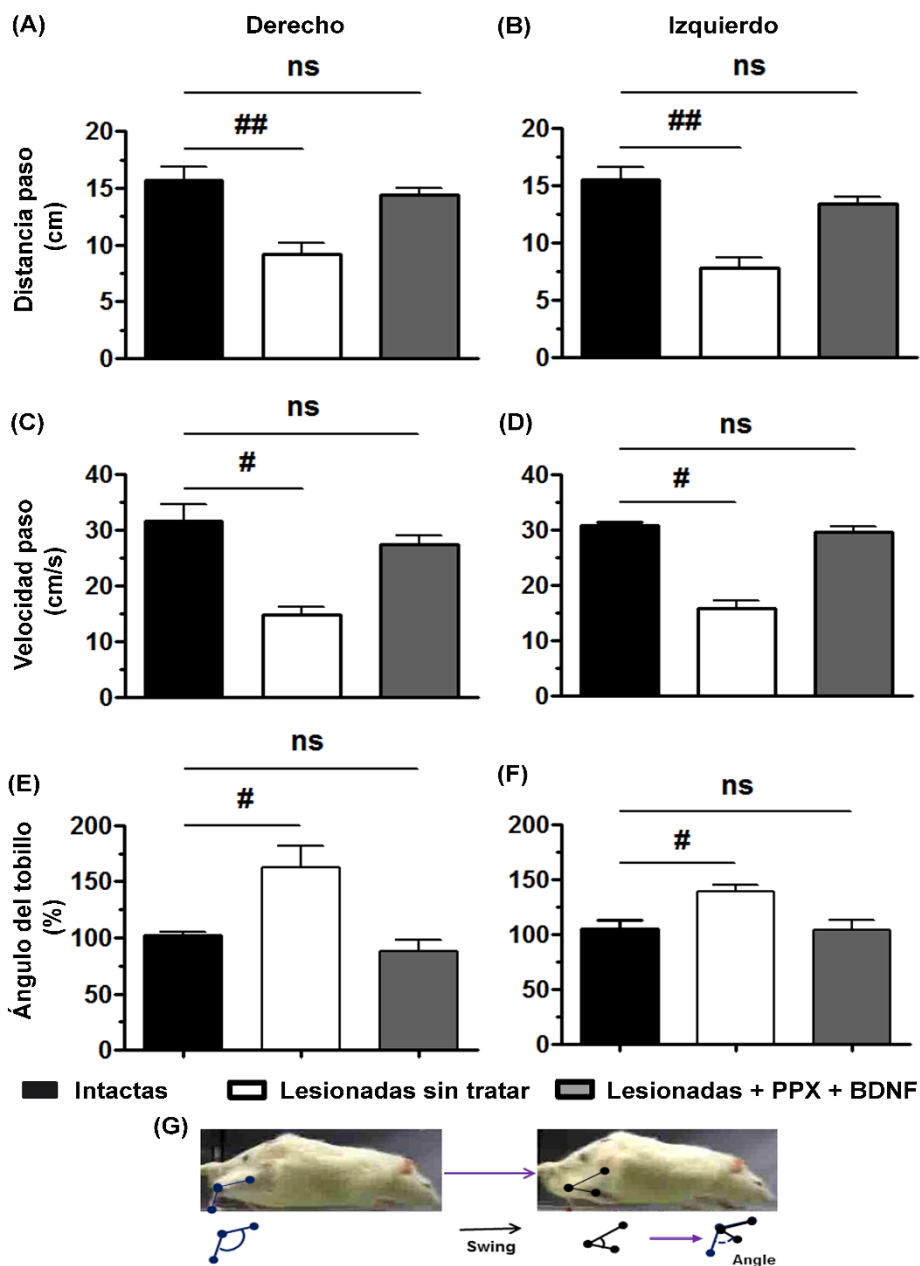


**Figura 10.**-El PPX asociado a la transfección del gen para el BDNF eliminó de manera permanente la incoordinación motora evaluada por la prueba de la viga (A) y la prueba del rotarod (B). Las líneas representan el promedio de las mediciones individuales de los diferentes grupos  $\pm$  el error estándar para cada grupo. \*\*\*  $P < 0.001$  lesionada bilateral vs intactas/lesionadas + PPX+ BDNF;  $n=4$ ). Los datos fueron analizados con una prueba de Anova de dos vías,  $\alpha=0.05$ .

### ***La terapia combinada logra mejorar la marcha***

La pérdida de dopamina en el modelo animal de la enfermedad de Parkinson aumenta el ángulo del tobillo durante la fase de balanceo de la marcha (Metz *et al.*, 2005), lo que indica una dorsiflexión aumentada del tobillo. En el presente estudio, la lesión estriatal bilateral con 6-OHDA aumento el ángulo del tobillo contralateral en un 40% del lado izquierdo y un 55% del lado derecho, al final de la flexión durante la fase de balanceo de la zancada. La administración del agonista D<sub>3</sub> en asociación con la transfección no viral del gen para BDNF redujo el ángulo del tobillo a valores cercanos al de los animales intactos (Figura 11E-F, barra color gris y negra). La lesión también redujo el ángulo de flexión de la rodilla, tanto del lado derecho como del izquierdo, y el tratamiento combinado restableció significativamente a valores similares a los de los animales intactos ( $P < 0.05$ ) (datos no mostrados). La lesión afectó la velocidad en ambos lados (Figura 11C-D, barra blanca) y la longitud de la zancada (Figura 11A y B, barra blanca), reduciendo ambas condiciones. La terapia combinada normalizó la longitud (Figura 11A y B, barra gris) la velocidad de la zancada (Figura 11C y D, barra gris) tanto del lado izquierdo como del derecho y también recuperó el ángulo del tobillo (Figura 11E y F, barra gris) a valores normales del grupo intacto (barra negra en todos los casos), que sirvió como control del experimento. La recuperación se observó a los dos meses después de retirar la administración del PPX, lo que sugiere un efecto neurotrófico permanente del tratamiento combinado. El dibujo. bajo la fotografía, es la representación esquemática del ángulo del tobillo, la manera en la que se marcan los puntos para cuantificar los ángulos, así como las fotografías que se obtienen del video al grabar a los animales a través de la pasarela

### ANÁLISIS DE LA MARCHA



**Figura 11.-** El tratamiento combinado (PPX + BDNF) recuperó la marcha. La recuperación de la marcha se estimó mediante la recuperación de la longitud de la zancada (A-B), la velocidad de zancada (C-D) y el ángulo del tobillo durante la fase de oscilación de la marcha (E-F), tanto del lado derecho como del izquierdo. (G) Diagramas representativos de la estimación de la diferencia entre la extensión y flexión en el ángulo del tobillo. Las barras representan el promedio de las mediciones individuales de los diferentes grupos  $\pm$  el error estándar para cada



grupo. #  $P < 0.05$ . Lesionada sin tratar vs intactas / lesionadas + PPX+ BDNF, \*\*  $P < 0.01$  Lesionada sin tratar vs intactas / lesionadas+ PPX+ BDNF, \*\*\*  $P < 0.001$ . Lesionada sin tratar vs intactas / lesionadas+ PPX+BDNF, n=4). Los datos fueron analizados con una prueba de Anova de una vía con un *post test* de Tukey.  $\alpha=0.05$ ).

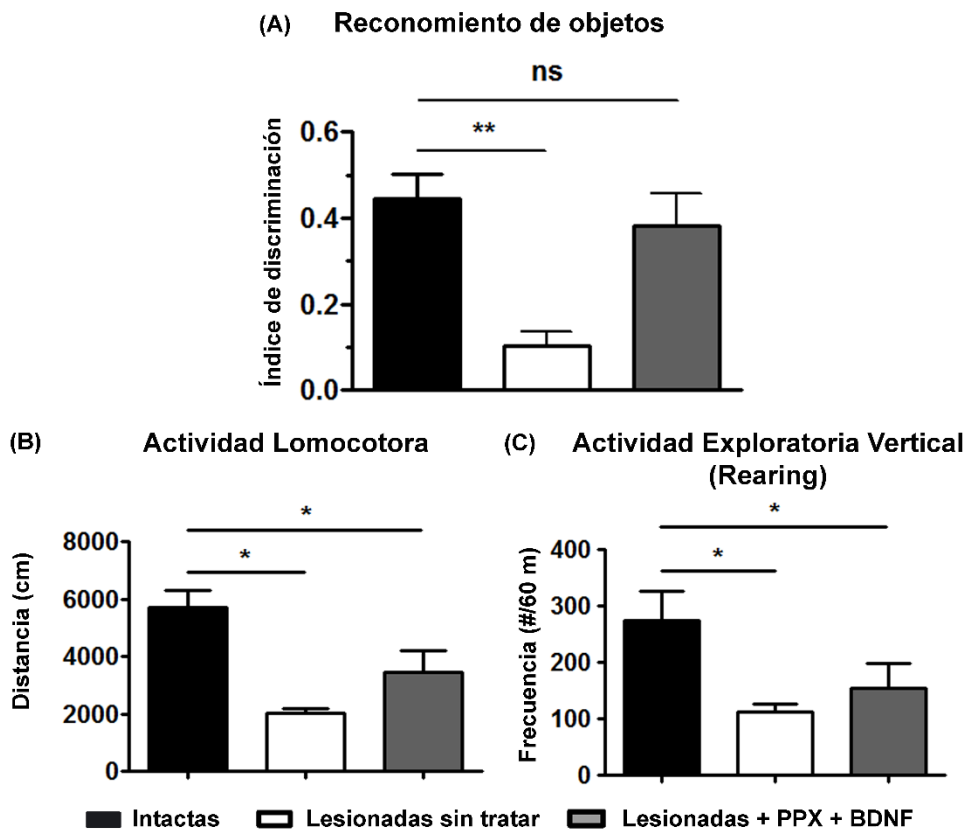
## ***Pruebas no motoras***

### ***El tratamiento combinado logra recuperar la memoria de trabajo en los animales lesionados bilateralmente pero no la actividad locomotora espontánea***

Uno de los síntomas no motores que presentan los pacientes con enfermedad de Parkinson es una cognición reducida, en particular, la memoria de trabajo reducida (Cooper *et al.*, 1991). Las ratas pasan más tiempo explorando un objeto nuevo que uno explorado previamente (Berlyne, 1950). En este trabajo evaluamos el efecto del tratamiento combinado de PPX y la transfección del gen para BDNF en la memoria de trabajo de ratas lesionadas bilateralmente juzgada por la prueba de reconocimiento de objetos. La lesión bilateral reduce el índice de reconocimiento (IRNO) de ratas en un 78% (Figura 3A, barra blanca) con respecto a las ratas intactas. Tal efecto persiste en los animales lesionados hasta dos meses después de haber retirado la administración del PPX. Por el contrario, las ratas que recibieron el tratamiento combinado mostraron una restauración significativa del 77.27% en los valores del índice de reconocimiento de objetos (Figura 3A, barra gris) que permaneció incluso dos meses después del final de la fase farmacológica del tratamiento (eliminación de bombas que infunden PPX, Figura 6). Esto último es indicativo de que el tratamiento combinado ejerce una acción neurotrófica, que podría haber mejorado la memoria de trabajo de forma permanente a valores semejantes a los de los animales intactos.

Con respecto al comportamiento motor de las ratas en las cajas de actividad, donde se evalúa la actividad locomotora espontánea de los animales, la lesión bilateral del sistema nigro-estriatal dopaminérgico, redujo significativamente la frecuencia de la actividad exploratoria vertical o rearing (Figura 3C, barra blanca) y la actividad ambulatoria (Figura 3B, barra blanca) de las ratas en comparación con los animales intactos. La prueba se realizó dos meses después de retirar la administración del PPX.

En este caso, el tratamiento combinado no provocó ninguna recuperación de la actividad exploratoria vertical o la ambulación espontánea en las ratas lesionadas bilateralmente. Debido a que las ratas no estaban habituadas, a razón del intervalo prolongado entre las pruebas, las cajas de actividad fueron un ambiente nuevo que posiblemente desencadenó ansiedad en las ratas. Lo que podría explicar el efecto observado.



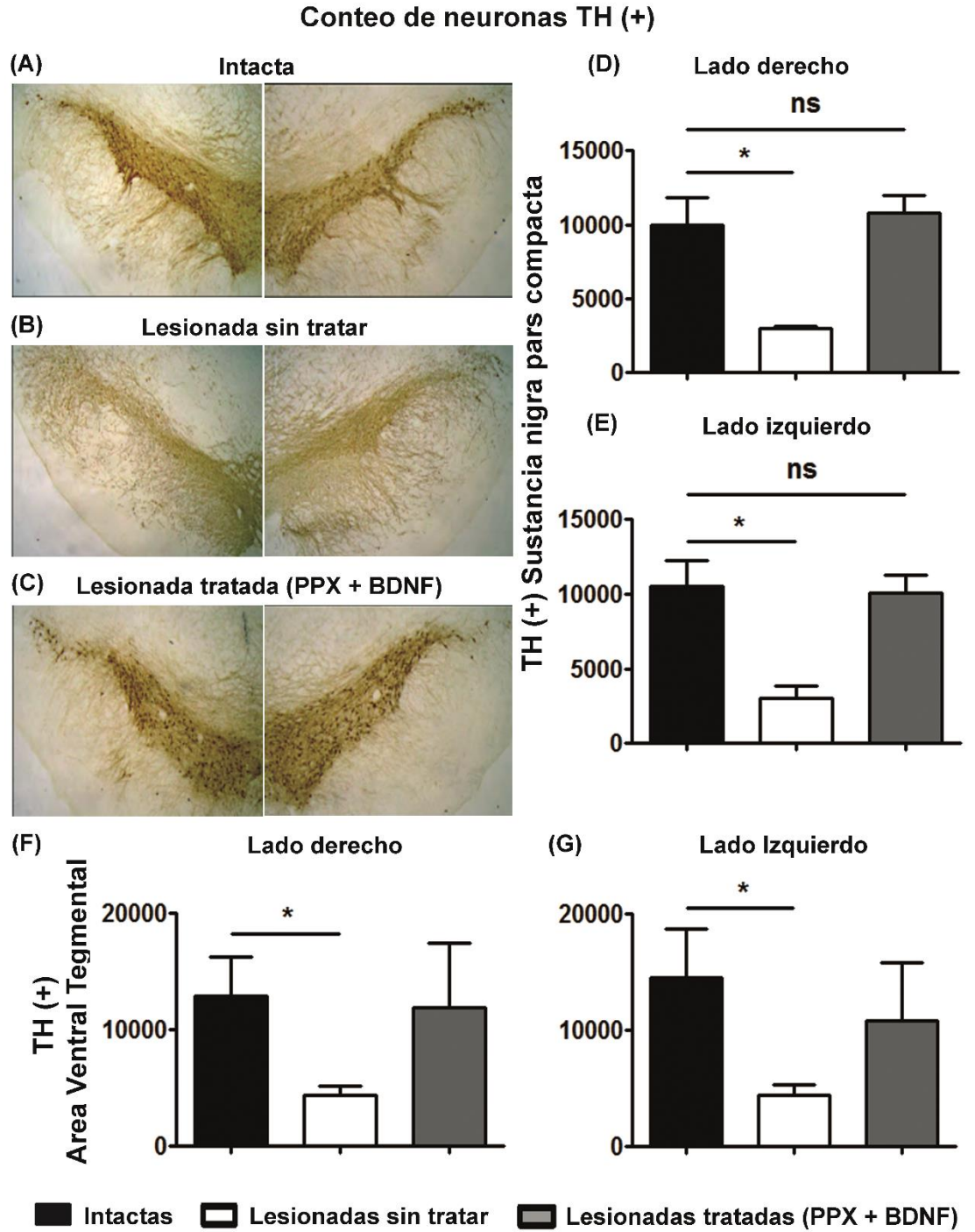
**Figura 12.-** La lesión bilateral disminuye la actividad locomotora general de los animales lesionados bilateralmente, pero la terapia combinada logra recuperar la memoria de trabajo. (A) Se muestra la prueba de reconocimientos de objetos, (B) la actividad locomotora, (C) la actividad exploratoria vertical juzgada por las cajas de actividad motora, 2 meses después de concluir la administración del PPX. Las barras representan el promedio de las mediciones individuales de los diferentes grupos  $\pm$  el error estándar para cada grupo. \*\*  $P < 0.01$  intactas / lesionadas+ PPX+ BDNF vs lesionada sin tratar, \*  $P < 0.05$  intactas vs lesionada sin tratar / lesionadas + PPX+ BDNF,  $n=4$ . Los datos fueron analizados con una prueba de Anova de una vía con un *post test* de Tukey.  $\alpha=0.05$ .

### ***Pruebas inmunohistológicas***

Una vez que se concluyeron las distintas pruebas motoras y no motoras para evaluar los efectos de la terapia combinada, se procedió al sacrificio de los animales para realizar los estudios inmunohistológicos correspondientes para evaluar los posibles efectos neurotróficos resultado de la terapia combinada a largo plazo.

### ***La terapia combinada logra recuperar el número de neuronas TH (+)***

La lesión bilateral produjo una disminución en el número de neuronas dopaminérgicas en un 70% de ambos lados de la SN comparados con el grupo intacto (Figura 13D-E) así como del AVT en un 67% de ambos lados comparados con el grupo intacto (Figura 13F-G), según la cuenta directa de todas las neuronas TH (+) en 6-8 rebanadas tomadas cada 200 µm a todo lo largo de la SN y el AVT estimadas por la inmunorreactividad TH (+). El tratamiento combinado (barra gris), agonista del receptor D<sub>3</sub> asociado a la transfección del BDNF, recuperó significativamente el número de neuronas nigrales a valores similares de los animales intactos (barra negra). En el AVT, para el grupo que recibe la terapia combinada, se observa una tendencia a aumentar el número de neuronas, aunque no logra ser estadísticamente significativa con respecto al grupo intacto. El grupo lesionado sin tratar no muestra recuperación del número de neuronas inmunorreactivas a TH (+) en la SN o el AVT. Se muestran microfotografías representativas de cada grupo en cortes del mesencéfalo, (A) intactas, en (B) lesionadas sin tratar y en (C) los animales lesionados + PPX + BDNF (Figura 13A-C).



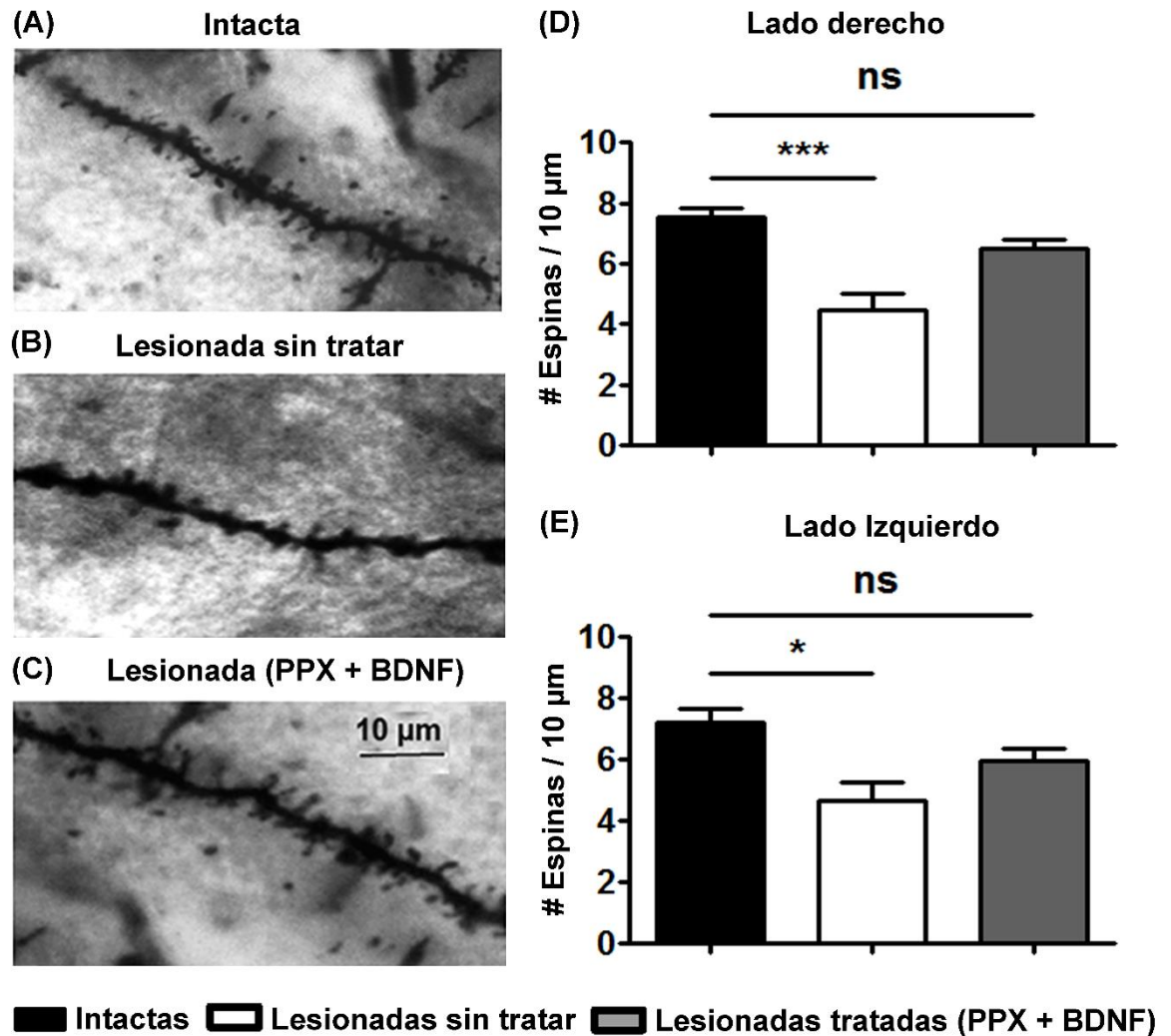
**Figura 13.-** La administración del PPX asociado con la transfección de BDNF restauró el número de neuronas TH (+) en SN y el AVT en ambos lados en comparación con el grupo intacto. La lesión bilateral produjo una disminución del 80% del número de neuronas TH (+). Las barras representan el promedio de las mediciones individuales de los diferentes grupos  $\pm$

el error estándar para cada grupo. \*  $P < 0.05$  lesionada sin tratar vs intactas / lesionadas + PPX+ BDNF, n=3. Los datos fueron analizados con una prueba de Anova de una vía con un *post test* de Tukey  $\alpha=0.05$ .

***La terapia combinada incrementa el número de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas del Estriado***

Las neuronas espinosas medianas son las neuronas encargadas de la salida de información del Estriado y el principal blanco sináptico de la vía glutamatérgica cortico-estriatal y de la vía dopaminérgica nigro-estriatal. Ambas vías convergen mediante las espinas dendríticas presentes en estas neuronas, el sitio crítico de integración sináptica de las neuronas espinosas medianas. Como se ilustra en la figura 14, la lesión nigro-estriatal redujo significativamente el número de espinas dendríticas del lado derecho, así como del izquierdo, en comparación con el grupo intacto y produjo una atrofia marcada en sus dendritas (microfotografía B, lesionada sin tratar), indicando una profunda disfunción de la integración sináptica sobre estas neuronas. Sin embargo, el tratamiento combinado logra recuperar significativamente el número de estas espinas en las neuronas espinosas medianas del Estriado en ambos hemisferios y redujo la atrofia dendrítica (microfotografía C) comparado con el grupo intacto (microfotografía A).

### Conteo de Espinas Dendríticas

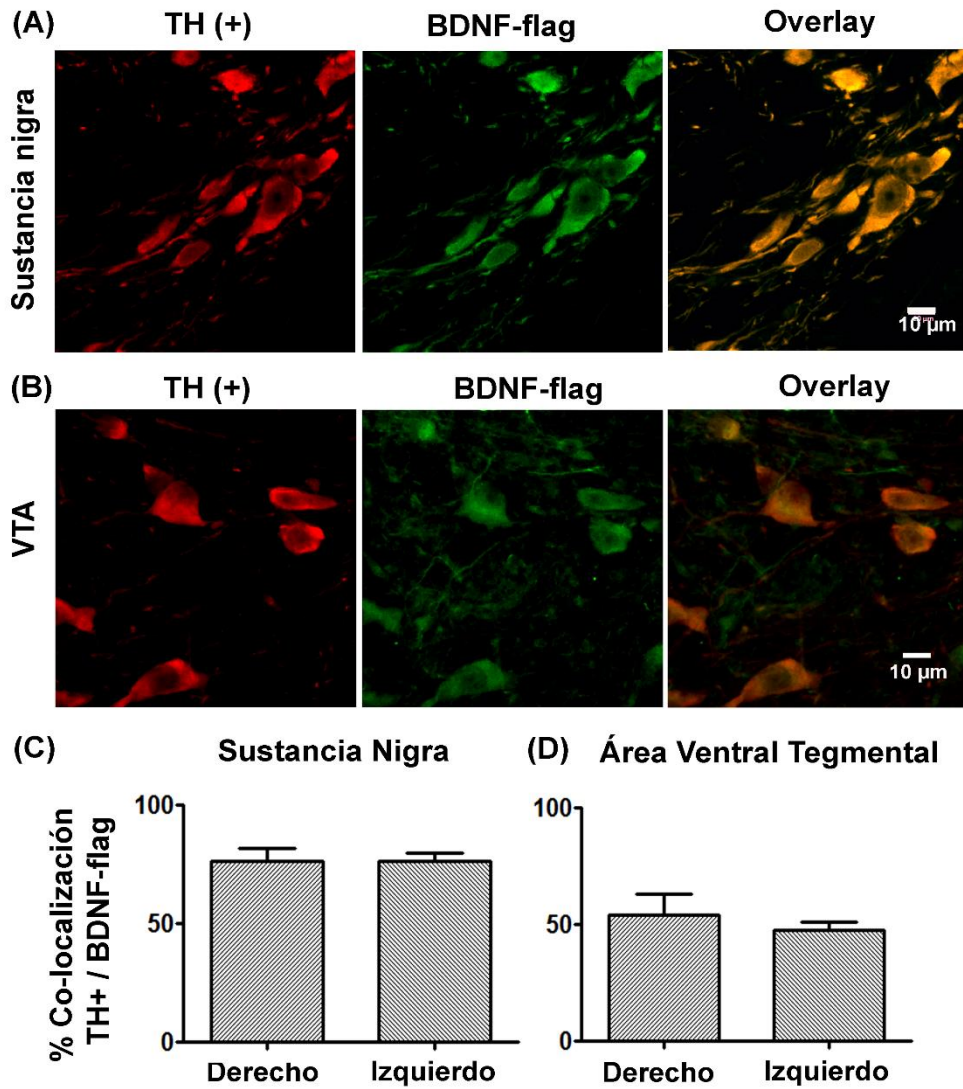


**Figura 14.-** La terapia combinada restauró el número de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del cuerpo Estriado de ambos lados en comparación con el grupo intacto. Se presentan microfotografías de los diferentes grupos de estudio, (A) intactas, (B) lesionadas sin tratar y (C) lesionadas PPX + BDNF. (D-E) Muestran las gráficas correspondientes al conteo de las espinas dendríticas en ambos hemisferios. Las barras representan el promedio de las mediciones individuales de los diferentes grupos  $\pm$  el error estándar para cada grupo. \*  $P < 0.01$  lesionada sin tratar vs intactas/lesionadas + PPX + BDNF, \*\*\*  $P < 0.001$  lesionada sin tratar vs intactas/lesionadas + PPX + BDNF,  $n=3$ . Los datos fueron analizados con una prueba de Anova de una vía con un *post test* de Tukey.  $\alpha=0.05$ .

### ***Colocalización de TH (+) / BDNF-flag en las neuronas presentes en SNc y AVT***

En el presente estudio también encontramos que la transfección del gen para BDNF-flag por el NTS-polyplex produce una alta expresión de la proteína BDNF-flag en las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Figura 15 A) así como en la AVT (B), como lo indica la colocalización (mostrada en color naranja-amarillento) de la inmunorreactividad para TH (+) (mostrada en color rojo) con la inmunorreactividad en la misma neurona dopaminérgica del BDNF-flag (color verde). Cerca de un 76% de las neuronas de la SNc mostraron la colocalización de ambos marcadores tanto del lado derecho como del izquierdo (Figura 15 C), así mismo observamos una co-localización de aproximadamente un 50% en las neuronas de la AVT (D) de ambos hemisferios, demostrando la efectividad del método de transfección empleado para el BDNF.

### Co-localización TH (+) / BDNF-flag

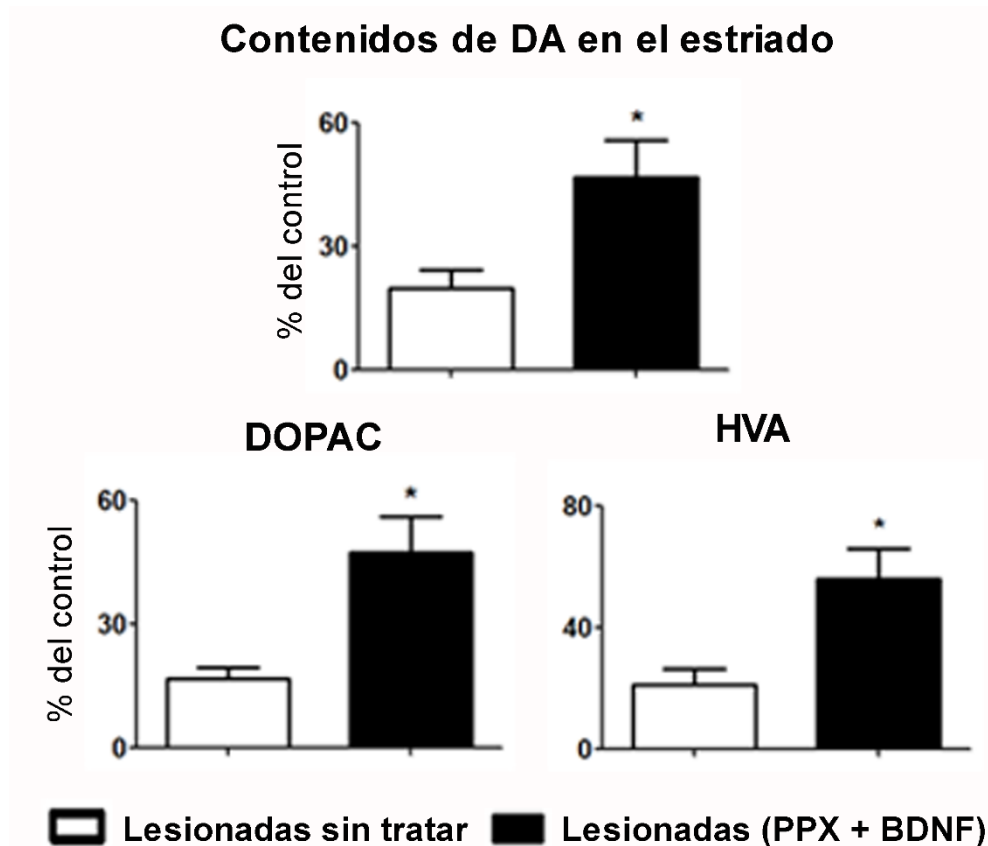


**Figura 15.-** Colocalización de los marcadores para TH (+) / BDNF-flag en las neuronas de la SNc y la AVT, en ambos hemisferios. Las barras representan el promedio de las mediciones individuales de las diferentes rebanadas  $\pm$  el error estándar para cada rebanada, n=10 rebanadas de 3 ratas por grupo.

*La terapia combinada aumenta los niveles de dopamina y sus metabolitos en el Estriado.*



La lesión bilateral produce una disminución en los contenidos de dopamina (Figura 16A, barra blanca) y sus metabolitos: ácido homovanílico (Figura 16B, barra blanca) y DOPAC (Figura 16C, barra blanca) en el Estriado, con respecto de la condición intacta. Los animales tras 2 meses de haber concluido la administración de PPX presentan un incremento en los niveles de DA y sus metabolitos en el Estriado con respecto a los contenidos del grupo intacto, como lo muestra la barra negra de los incisos A-C (Figura 16, barras negras).



**Figura 16.-** Contenidos de dopamina (A), y sus metabolitos (HVA, B; DOPAC, C) en el Estriado expresado como porcentaje del grupo intacto. Las barras representan el promedio de las mediciones individuales de los diferentes grupos  $\pm$  el error estándar para cada grupo. \*  $P < 0.01$  lesionada sin tratar vs lesionadas + PPX + BDNF,  $n=3$ . Los datos fueron analizados con una prueba de  $t$  de Student con un *post-test* de *Mann Whitney*.  $\alpha=0.05$ .

## Discusión

La terapia combinada empleada para este modelo de lesión bilateral logró recuperar la coordinación motora, así como la marcha normal; asociado a una mejora en la memoria de trabajo, recuperación en el número de las neuronas dopaminérgicas TH (+) y las espinas dendríticas de las neuronas espinosas mediadas del Estriado.

En la actualidad existen varios modelos experimentales que reproducen la enfermedad de Parkinson. Los modelos más exitosos son aquellos que emplean neurotoxinas selectivas; pero desafortunadamente, algunas neurotoxinas (por ejemplo, MPTP) tienen la desventaja de afectar solo a algunas especies animales (ratón, mono) (Blesa *et al.*, 2012). Puesto que el manejo de roedores es más simple, han proliferado los experimentos que emplean la 6-OHDA para inducir el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson. Mediante la aplicación de la neurotoxina 6-OHDA en el Estriado o la SNc, donde se logra producir un modelo de Parkinson moderado. Otro es la lesión unilateral en el haz medial, produciendo un modelo de Parkinson avanzado, estos modelos reproducen parcialmente la condición patológica de los pacientes con la enfermedad, en los cuales se presenta una degeneración bilateral de diferente magnitud en ambos hemisferios (Roedter *et al.*, 2001). Cabe señalar que en la actualidad ya existen modelos experimentales que representan los signos y síntomas propios en los enfermos de Parkinson ya que producen las cuatro características patogonómicas de la enfermedad. Van Den Berge y colaboradores utilizaron un modelo animal en ratas, en el cual transformaron la alfa-sinucleína endógena en agregados de la misma, característicos en los enfermos de Parkinson para probar modelos tempranos de la enfermedad (Berge *et al.*, 2019). En ciertos modelos, los cuerpos de Lewy que se propagan como prion causan neuroinflamación y neurodegeneración. Dado que la enfermedad de Parkinson se caracteriza por dos procesos: uno es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas y el otro es la acumulación interneuronal de los cuerpos de Lewy. Luk y colaboradores (2012) mostraron que la acumulación de los cuerpos de Lewy conduce a una progresiva pérdida de neuronas dopaminérgicas en el SNc. Rojas y colaboradores (2020) utilizaron el  $\beta$ -sitosterol  $\beta$ -D-glucosido para inducir una progresiva agregación de los cuerpos de Lewy y la degeneración dopaminérgica en un modelo animal, en dicho modelo la patología es bilateral a pesar de que la

administración del neurotóxico es unilateral. El modelo de lesión bilateral en el haz medial representa un Parkinson avanzado, pero es poco o nualmente empleado debido a que los animales presentan síntomas como afagia y adipsia, así como baja tasa de sobrevivencia, lo que limita el estudio de los animales de experimentación por largos periodos de tiempo o evaluar terapias (Ungerstedt, 1971).

Existen otros modelos bilaterales de lesión, uno de ellos es la lesión bilateral por inyección de la neurotóxina en el Estriado, este reproduce un Parkinson moderadamente avanzado. Es por lo que en este trabajo decidimos emplear un modelo de lesión bilateral con el cual hemos podido evaluar síntomas motores como la disminución de la locomoción (distancia, tiempo y velocidad) y la disminución de la actividad exploratoria vertical ("rearing", propia de los roedores), síntomas que no son reproducidos en modelos unilaterales, además, es un modelo más acercado a la degeneración patológica que se presenta en los enfermos de Parkinson.

Cabe resaltar que algunos de los síntomas motores no están presentes en modelos de lesión unilateral pero que los enfermos con Parkinson (exceptuando la actividad exploratoria propia de ratas y ratones) sí los presentan, pudiendo llegar a ser altamente incapacitantes (Jolicœur *et al.*, 1991). Nuestro modelo de lesión bilateral nos permite evaluar síntomas motores que los modelos unilaterales no reproducen como: bradicinesia y disminución de la actividad exploratoria vertical, así como la pérdida de la memoria de trabajo.

Existen diferentes enfoques terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la L-Dopa es el fármaco de elección, desde su introducción por Cotzias (1967), pero al administrar tal compuesto en una terapia prolongada se observa que algunos pacientes llegan a presentar síntomas incapacitantes conocidos como discinesias y con ello se ve disminuida su eficiencia farmacológica, además de ser más incapacitantes que la propia enfermedad.

Es por lo que en la actualidad se han buscado otros enfoques terapéuticos con el fin de detener la progresión de la enfermedad y al mismo tiempo no se pierda su eficacia farmacológica, pretendiendo restablecer el balance entre la actividad de la vía indirecta y la vía directa de los Ganglios Basales, así como recuperar las neuronas dopaminérgicas en la SN.

## *Aspectos motores*

### *Locomoción y actividad motora general*

La disminución de la locomoción es un indicativo de un estado alterado del desempeño motor presente en los pacientes con la enfermedad de Parkinson, pero son pocos los estudios en los cuales se evalúa el desempeño motor en un modelo de lesión bilateral, como el que aquí hemos desarrollado. En este estudio pudimos observar que los animales lesionados bilateralmente se desplazaban más lentamente y en menor proporción que los animales intactos, es decir, mostraban bradicinesia (Figura 8A, línea gris). Es de notar que la lesión unilateral no reproduce la bradicinesia, ya que la lesión no reduce la velocidad de desplazamiento de los animales como se mostró en nuestro laboratorio previamente (Razgado-Hernández *et al.*, 2015), ni disminuye la actividad exploratoria vertical, un síntoma propio de los roedores. También la locomoción se vio disminuida notoriamente (Figura 8A, línea gris) en este modelo de lesión bilateral estriatal, así como disminución del tiempo de ambulación general (Figura 8C, línea gris) juzgado por la prueba de cajas de actividad motora. La lesión bilateral disminuyó el tiempo de ambulación, reflejando de nuevo que indujo hipocinesia en los animales, tal y como ya se había determinado previamente en otros modelos de lesión bilateral (Zhou & Palmiter, 1995).

La actividad exploratoria vertical ("*rearing*") es una conducta propia de los roedores y está bajo el control de la dopamina (Camp *et al.*, 1994). La pérdida de dopamina trae como consecuencia una marcada disminución en la actividad de exploración, lo que se considera como una expresión de ansiedad aumentada. En este proyecto pudo comprobarse que la pérdida de dopamina disminuye la exploración vertical, ya que la lesión bilateral produjo una marcada disminución de esa conducta (figura 8D, línea gris). Por todo lo anterior, podemos señalar que la lesión bilateral produce síntomas motores como la bradicinesia, disminución de la locomoción y disminución de la actividad exploratoria vertical, que los modelos de lesión unilateral no reproducen.

### ***Terapia combinada***

Debido a que la enfermedad de Parkinson se presenta generalmente en personas de edad avanzada, el deterioro de la capacidad motora que presentan estos pacientes es causada no sólo por la enfermedad sino también por la edad. Es por ello que, en el presente estudio, se utilizó un grupo de animales intactos que fueron evaluados en paralelo con los grupos de ratas lesionadas, con la finalidad de evaluar los efectos de la edad sobre la capacidad motora.

Una vez que se evaluó la respuesta aguda del PPX en el modelo de lesión bilateral, procedimos a evaluar el efecto motor tras una administración crónica de la terapia combinada, asociando el PPX a la transfección del gen para BDNF, ya que en la clínica lo que se requiere es la asociación de 2 o más terapias que tengan la posibilidad de restablecer el equilibrio entre la actividad de la vía directa e indirecta de los Ganglios Basales y restablecer el número de neuronas TH(+) en la SNc, para recuperar la conducta motora normal.

Por ello después de obtener un nuevo lote de ratas lesionadas bilateralmente y administrar la terapia combinada durante 4.5 meses. La lesión bilateral de la innervación nigro-estriatal reproduce la mayoría de las alteraciones motoras y no motoras presentes en la enfermedad de Parkinson avanzada. En ambos, el punto crítico que explica la disfunción motora es la pérdida de las espinas dendríticas en las neuronas de proyección estriatal, porque son el lugar de la entrada sináptica de la corteza motora (Freund *et al.*, 1984; Ingham *et al.*, 1998; Day *et al.*, 2006). La pérdida de las sinapsis cortico-estriatales altera el procesamiento de la información motora, alterando así el comportamiento motor. En este estudio, mostramos que la infusión a largo plazo de PPX asociado con la transfección no viral del gen BDNF, es un tratamiento exitoso para el rescate de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas del Estriado y la innervación nigro-estriatal, lo que conduce a la normalización del rendimiento del motor.

Van Kampen y Eckmann (2006), administraron el agonista D<sub>3</sub> durante dos meses en el tercer ventrículo en ratas con lesión unilateral de la innervación nigro-estriatal inducida por la aplicación de 6-OHDA en el Estriado, un modelo

representativo de las etapas iniciales de la enfermedad de Parkinson. Ellos eligieron el agonista D<sub>3</sub> debido a las propiedades mitogénicas que se han visto tanto *in vitro* (Chio *et al.*, 1994, Pilon *et al.*, 1994, Griffon *et al.*, 1997, Coronas *et al.*, 2004) como *in vivo* (Van Kampen *et al.*, 2004, Van Kampen & Robertson, 2005). En estos trabajos, se mostró que la infusión crónica y continua del agonista D<sub>3</sub> induce proliferación celular en la SN, y que varias de estas células adquieren el fenotipo dopaminérgico. De igual forma, el tratamiento reduce los giros inducidos por anfetamina y recupera el uso de la pata contralateral (evaluado por la prueba de la escalera). La asociación del PPX, con la transfección no viral del BDNF, permite potenciar el efecto de ambos en las neuronas remanentes de la SNc, ya que ambos actúan sobre vías de señalización relacionadas con proliferación, diferenciación y neuroprotección.

En este trabajo, observamos que los animales tuvieron una recuperación de la coordinación motora juzgada la prueba de la viga, disminuyendo el tiempo en el que atraviesan la barra (Figura 10A) y por la prueba del rotarod, en la cual los animales fueron capaces de mantenerse más tiempo en el rodillo que gira a diferentes velocidades (Figura 10B), a valores semejantes a los del grupo intacto. Además, la recuperación perduró 2 meses después de haber terminado la administración del PPX, indicando un posible efecto neurotrófico de la terapia combinada.

La enfermedad de Parkinson altera la marcha, síntoma motor característico de los enfermos. Aunque la L-Dopa restaura este síntoma motor, las discinesias asociadas previenen la normalización completa de la marcha (Curtze, *et al.*, 2015). Double & Crocker demostraron que la pérdida de la activación de receptores dopaminérgicos en la SNr incrementa el tono muscular (Double & Crocker, 1995). Esto debido, posiblemente, a que la salida GABAérgica de la SNr es controlada por estos receptores, y el incremento de esta salida GABAérgica al PTN y MLR, incrementa los trastornos de la marcha (Takakusaki *et al.*, 2004b, Takakusaki, 2008). En este trabajo, el tratamiento combinado normalizó la marcha evaluada mediante la restauración de la longitud (Figura 11 A-B), la velocidad de la zancada (C-D), así como el ángulo de flexión del tobillo (E-F), de ambos lados, dos meses después que finalizó la administración de la terapia combinada, lo que habla de un posible efecto neurotrófico permanente y posiblemente la recuperación de la inervación normal que se lleva a cabo

en núcleos mesencefálicos encargados de controlar esta conducta motora. No se observaron discinesias durante o después del tratamiento, lo que podría sugerir su empleo en la clínica para el tratamiento de la enfermedad. La recuperación del equilibrio y la coordinación motora (Figura 10 A-B) puede haber ayudado en la mejora de la marcha.

Eskow y colaboradores encontraron que la lesión unilateral nigroestriatal inducida por 6-OHDA inyectada en el haz medial producía ansiedad (reducción de la ambulación y la frecuencia del “*rearing*”) (Eskow-Jaunarajs *et al.*, 2010) y depresión (incremento del tiempo para conseguir subir a la plancha en la prueba de nado forzado) y que la L-dopa por razones desconocidas, no elimina estas manifestaciones de ansiedad, lo que sugiere un origen no dopaminérgico.

Aunque el tratamiento combinado restauró el comportamiento motor, no pudo eliminar la ansiedad, estimada mediante el *rearing* (exploración vertical) y la actividad ambulatoria espontánea (Figura 12B-C), evaluadas en las cajas de actividad motora (Goma & Tobeña, 1978). Sin embargo, restauró la memoria de trabajo en las ratas parkinsonianas experimentales, según lo evaluado por la prueba de reconocimiento de objetos (Figura 12A). Por lo tanto, hay una disociación de las funciones emocionales y cognitivas. La cognición, evaluada por aprendizaje motor, es procesada por el cuerpo Estriado dorsal, y está controlada por L-dopa (Beeler *et al.*, 2010) pero la ansiedad es procesada, aparentemente, por otros centros neuronales que no están controlados por L-dopa (Eskow-Jaunarajs *et al.*, 2010). Esta observación sugiere que la ansiedad no está relacionada con la pérdida de dopamina en el cuerpo Estriado. Dado que la zona dorso-medial del Estriado recibe información de áreas prefrontales y de asociación corticales (Voorn *et al.*, 2004, Graybiel, 2005). McGeorge, & Faull, 1989; Berendse, *et al.*; 1992), es un componente crucial en los circuitos que median el control sobre la locomoción y la reactividad a lo novedoso del ambiente (Rinaldi *et al.*, 2010; Maia y Frank, 2011; Durieux, 2012), por lo que la falta de reinervación, acompañada de la muerte de las neuronas espinosas medianas del Estriado en dicha zona explicarían la disminución en la ambulación y frecuencia de “*rearing*” en las cajas de actividad.

Debido a la observación anterior, decidimos agregar una prueba conductual de enterramiento que nos permitiera evaluar el grado de ansiedad de los animales. Con tal

prueba pudimos determinar un incremento importante en los niveles de ansiedad, tanto de los animales lesionados bilateralmente sin tratar como en los animales lesionados que reciben la terapia combinada. Al establecer el grado de ansiedad de los animales que reciben la terapia combinada, se podría explicar ese comportamiento que es debido a una pérdida de la inervación dopaminérgica en el GP que es producida por la administración de 6-OHDA en el Estriado (Jan *et al.*, 2000; Debeir *et al.*, 2005). Dado que se conoce que tal región cerebral participa en la expresión de la agresividad de los animales, podemos proponer que la pérdida de inervación dopaminérgica extraestriatal estaría provocando un incremento del estado de ansiedad general del animal y que la terapia combinada, por su efecto regenerador de la innervación estriatal no está recuperando la inervación extraestriatal que produce este tipo de síntomas no motores asociados a la deficiencia motora observada. Las observaciones preliminares de nuestro grupo indican que el presente tratamiento permite el control de la ansiedad mediante ansiolíticos (diazepam). Sin embargo, esta observación requiere ser confirmada por otros experimentos.

### ***Aspectos neurotróficos***

Después de evaluar aspectos motores y no motores tras la administración de la terapia combinada en este modelo de lesión bilateral, decidimos evaluar componentes inmunohistológicos para comprobar si existen efectos neurotróficos que expliquen las mejoras motoras observadas.

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) juega un papel crítico en la fisiología y fisiopatología de los Ganglios Basales. La expresión sostenida de BDNF es necesaria para mantener las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas en el Estriado (Baquet *et al.*, 2004). La enfermedad de Parkinson conduce a una disminución profunda y selectiva en la longitud y arborización dendrítica y una pérdida de las espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas en el Estriado (McNeill *et al.*, 1988, Ingham *et al.*, 1993; Stephens *et al.*, 2005; Zaja- Milatovic *et al.*, 2005; Solís *et al.*, 2007). Debido a la pérdida de espinas dendríticas, hay una pérdida de las sinapsis cortico-estriatal (Ingham *et al.*, 1998; Day *et al.*, 2006), que es la base de la mayoría de la fisiopatología de la enfermedad.



Como el BDNF, la dopamina no solo tiene un efecto funcional sino también neurotrófico (Zhou *et al.*, 1994). El efecto neurotrófico está mediado principalmente por los receptores D<sub>3</sub>, cuya activación es necesaria para la supervivencia y protección de las neuronas dopaminérgicas (Presgraves *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010) y para mantener su arborización dendrítica (Collo *et al.*, 2008). La activación de los receptores D<sub>3</sub> por sus agonistas y de los receptores TrkB por el BDNF, comparten vías intracelulares similares para ejercer sus efectos neurotróficos (Collo *et al.*, 2014), de ahí la importancia de nuestra terapia combinada, por lo cual creemos que ambas vías se potencian dando como resultado las mejoras motoras que observamos tras la lesión bilateral. Además, existe una potenciación mutua entre la activación de los receptores de dopamina y los receptores de BDNF, lo que aumenta el número de células dopaminérgicas en embriones (E12-14) de la corteza cerebral de rata en cultivos celulares; donde el BDNF aumenta hasta 17 veces el número de neuronas dopaminérgicas que las inducidas solo por la dopamina (Zhou *et al.*, 1994), esto es lo que podría explicar el efecto trófico observado, incrementando el número de neuronas en la SNc dos meses después de retirar la administración del PPX.

La preservación de las espinas dendríticas es fundamental para el control de la enfermedad de Parkinson. Se ha demostrado que la depleción de dopamina conduce a una degeneración rápida, profunda y selectiva de la longitud y ramificaciones de las dendritas de las neuronas espinosas medianas del Estriado y con ello de las espinas dendríticas (McNeill *et al.*, 1988, Ingham *et al.*, 1993, Stephens *et al.*, 2005, Zaja-Milatovic *et al.*, 2005, Deutch, 2006, Solís *et al.*, 2007), como resultado de la desinhibición de los canales de calcio Cav 1.3 del tipo L (Day *et al.*, 2006, Soderstrom *et al.*, 2010), debido a la pérdida de los receptores a dopamina del tipo D<sub>2</sub> (Olson *et al.*, 2005). Las consecuencias de tal interrupción entre las neuronas del caudado-putamen y el GP podrían contribuir de manera importante al inicio de la aparición de los síntomas de la enfermedad de Parkinson (Day *et al.*, 2006).

En ambas alteraciones, el punto crítico que explica la disfunción motora es la pérdida de las espinas dendríticas de las neuronas de proyección estriatal, porque son el lugar de la sinapsis de la entrada de la corteza motora (Freund *et al.*, 1984, Ingham *et al.*, 1998, Day *et al.*, 2006). La pérdida de la sinapsis interrumpe el procesamiento

de la información motora, alterando así el comportamiento motor. Un tratamiento exitoso requiere el rescate de las espinas dendríticas, como se ejemplifica en el presente estudio, donde la normalización del comportamiento motor se asoció con la recuperación de las espinas.

Solís y colaboradores (2007) realizaron un estudio donde observaron una reducción en los valores de las espinas de las neuronas espinosas medianas del Estriado en ratas con lesión por 6-OHDA. Zaja-Milatovic y colaboradores en estudios *post mortem* de pacientes con la enfermedad de Parkinson reportaron una reducción de cerca del 45% (Zaja-Milatovic *et al.*, 2005), mientras que el grupo de Stephens reportó un 27% de reducción en el número de espinas (Stephens *et al.*, 2005). En las ratas con lesión unilateral con 6-OHDA, la reducción del número de espinas correlaciona con una reducción similar de las sinapsis glutamatérgicas de las aferentes cortico-estriatales (Ingham *et al.*, 1998), lo cual explica las anomalías motoras que presentan los animales en estos modelos de lesión y más aún en nuestro modelo donde la pérdida es de ambos hemisferios cerebrales.

Como se mostró previamente (Berger *et al.*, 1991), la lesión bilateral de 6-OHDA indujo la pérdida de neuronas de dopamina tanto en la SNc como en el AVT (Figura 12 D-G). La enfermedad de Parkinson también induce la pérdida de neuronas dopaminérgicas en ambas estructuras (Alberico *et al.*, 2015).

La administración crónica de agonistas del receptor de dopamina del tipo D<sub>3</sub>, infundidos intracerebroventricular (Van Kampen & Eckman, 2006) o intraperitonealmente (Razgado-Hernández *et al.*, 2005) restaura parcialmente el número de neuronas dopaminérgicas de la SN que se pierden por la acción neurotóxica de la 6-OHDA. La recuperación completa de las espinas requirió la asociación de la infusión del agonista D<sub>3</sub> a la transfección del gen BDNF (Razgado-Hernández *et al.*, 2015), ejemplificando así otro caso de la potenciación del efecto trófico de la activación crónica y continua de los Receptores D<sub>3</sub> por la transfección de BDNF en las neuronas de dopamina supervivientes.

El tratamiento combinado en este modelo de lesión bilateral incrementó el número de neuronas dopaminérgicas en la SN (Figura 13D-E) posiblemente vía recuperación del fenotipo dopaminérgico o por neurogénesis en la SNc (Van Kampen

*et al.*, 2004) y de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del Estriado (Figura 14D-E), lo que puede explicar la ausencia de discinesias en la recuperación del comportamiento motor normal. Esto contrasta con la hiperdopaminergia asociada a los injertos de dopamina, que conduce a discinesias en ratas parkinsonianas (Lane *et al.*, 2006) o en pacientes (Politis *et al.*, 2011).

De acuerdo con lo anterior, la recuperación casi completa de las espinas dendríticas inducida por el tratamiento combinado, mostrando el efecto neurotrófico de la activación crónica y continua de los receptores D<sub>3</sub> de dopamina asociado a la transfección con BDNF, que podría explicar la recuperación motora observada en el presente trabajo. Esta idea es consistente con el hecho de que la eficacia de los trasplantes de neuronas dopaminérgicas en el Estriado también requiere la recuperación o preservación de las espinas dendríticas (Soderstrom *et al.*, 2010). Es de gran importancia este hallazgo ya que la lesión es bilateral, reproduciendo un modelo de la enfermedad de Parkinson avanzado que asemeja la condición patológica de los enfermos y podría tener una relevancia clínica de interés para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

En el presente trabajo mostramos que la administración del agonista D<sub>3</sub>, PPX cuando se asocia con la sobreexpresión de BDNF en las neuronas dopaminérgicas supervivientes también es capaz de normalizar el comportamiento motor a través de la recuperación de las espinas dendríticas de las neuronas de proyección estriatal. Cabe señalar que la única transfección del gen BDNF a neuronas dopaminérgicas supervivientes no restablece el número de neuronas nigrales (Hernández-Chan *et al.*, 2015; Quintero *et al.*, 2015).

La recuperación se asoció con la presencia del marcador BDNF en las neuronas TH (+) de ambas estructuras (Figura 15C-D), en donde observamos que el BDNF colocalizan tanto en el AVT como en la SN de ambos hemisferios en neuronas TH (+). La expresión fisiológica del gen de BDNF-flag podría ser un punto clave en la eficacia del tratamiento combinado. La transfección del gen para BDNF-flag a las neuronas dopaminérgicas, produce una expresión de la proteína quimérica BDNF-flag en un gran número (70%) de estas neuronas en la SNc (Figura 15C). Sin embargo, es posible que la proteína del BDNF-flag estuviera presente no solo en las neuronas transfectadas sino

también en neuronas vecinas dado que se sabe que tales neuronas pueden capturar el BDNF que liberan las otras neuronas (Arango-Rodríguez *et al.*, 2006, Zheng *et al.*, 2008). Si fuera el caso, esto amplificaría el efecto de la transfección recuperando la reinervación del Estriado y con ello el comportamiento motor. La propagación de la etiqueta BDNF-flag de la SNc (donde se inyectó NTS-Polyplex, el portador del gen) al AVT (Figura 15D) estuvo mediada, probablemente, por la acción paracrina bien establecida del BDNF (Davies, 1996; Kim *et al.*, 2004). La presencia de receptores TrkB en neuronas nigrales y su expresión de BDNF (Aliaga *et al.*, 1998; Murer *et al.*, 1999) explican las acciones autocrinas y paracrinas.

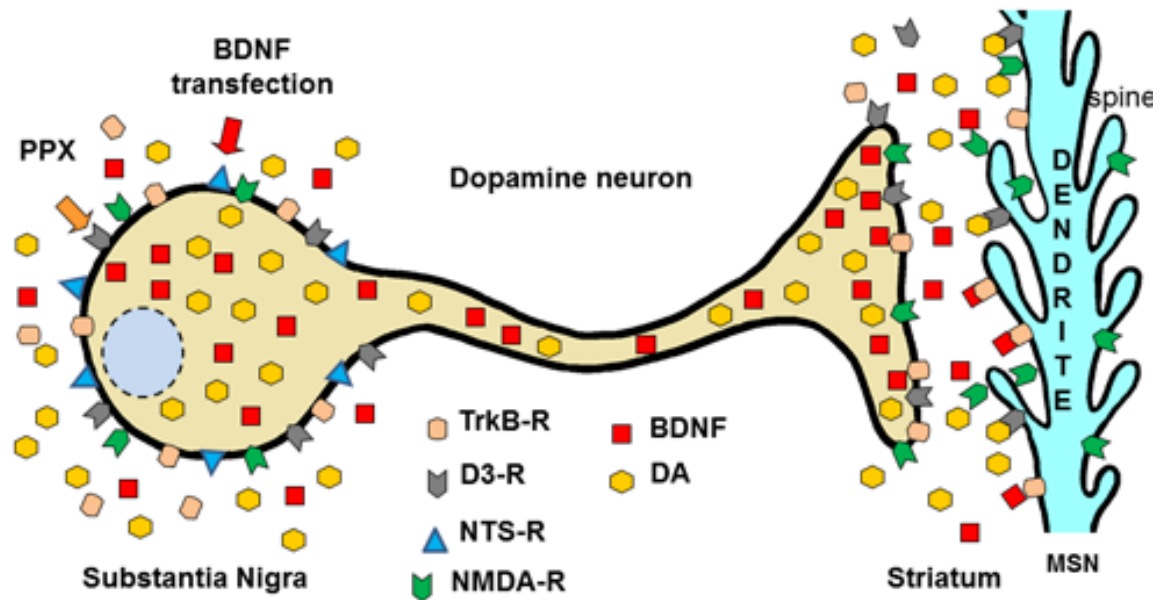
Los presentes resultados son muy promisorios para un posible uso del tratamiento combinado en el control de la enfermedad de Parkinson en la clínica, así como para eliminar los síntomas motores característicos de la misma de manera permanente.

La figura 17 muestra la distribución del receptor D<sub>3</sub>, el receptor TrkB, receptor a neurotensina y el receptor a NMDA en el sistema nigro-estriatal, dando un resumen de los diferentes procesos que se llevan a cabo tras la activación de los receptores D<sub>3</sub>, así como los TrkB por neurotrofinas como el BDNF. Los receptores de dopaminérgicos D<sub>3</sub> están presentes en el soma y las dendritas de las neuronas nigrales, así como en sus terminales en el cuerpo Estriado (Díaz *et al.*, 2000). También están presentes en las espinas dendríticas de las neuronas de proyección estriatal (Prieto *et al.*, 2011). Los receptores TrkB y NMDA también tienen la misma distribución (Numan & Seroogy, 1999; Rosales *et al.*, 1997; Martínez-Fong *et al.*, 1992). El PPX activaría los receptores D<sub>3</sub> de dopamina presentes en todos estos sitios. La transfección de BDNF está mediada por los receptores de neurotensina. El BDNF es sintetizado por neuronas dopaminérgicas y transportado al Estriado a través de la proyección nigro-estriatal (Altar *et al.*, 1997). La presencia de TrkB en el soma de las neuronas nigrales explica tanto la acción autocrina como la acción paracrina del BDNF (Davies, 1996). La activación de los receptores TrkB induciría la liberación de dopamina, a través de los receptores D<sub>3</sub>, que, a su vez, induciría la liberación de BDNF (Du *et al.*, 2005), estableciendo así un mecanismo de retroalimentación positiva, lo que mejoraría el efecto trófico de BDNF. La activación de los receptores NMDA por glutamato a partir

de la proyección subtálamo-nigral mejoraría la liberación tanto de BDNF como de dopamina (Bustos *et al.*, 2009; Rosales *et al.*, 1997), mejorando así el efecto trófico de ambos. Los receptores de neurotensina modulan el efecto fisiológico de la dopamina (Binder *et al.*, 2001) pero se desconoce su efecto trófico sobre las neuronas dopaminérgicas. La recuperación de estas neuronas puede ser a través de la neurogénesis, ya que tanto los receptores D<sub>3</sub> como los receptores TrkB inducen la neurogénesis (Van kampen & Eckman, 2005, Kaplan & Stephens, 1994). La presencia de células progenitoras neuronales en la Sustancia Nigra *pars compacta* (Lie *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003; Höglinger *et al.*, 2004) aumenta esta posibilidad.

Los modelos de la enfermedad de Parkinson, donde se emplea la 6-OHDA presentan limitaciones, ya que dichos modelos no producen cuerpos de Lewy característicos en los enfermos de Parkinson. Por lo que sería necesario aplicar la terapia combinada empleada en este estudio en modelos experimentales que produzcan estos cuerpos y evaluar la efectividad, como el modelo usado por Rojas y colaboradores, y dependiendo de los resultados exitosos que se obtengan, se podría concluir la posible aplicación en el humano.

A pesar de que los resultados son muy alentadores, es necesario realiza más estudios para corroborar que el tratamiento combinado utilizado es adecuado como una nueva terapia para aplicarla en la clínica en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.



**Figura 17.-** Diagrama representativo de los receptores presentes en las neuronas dopaminérgicas de la SNc, para explicar los efectos positivos de la terapia combinada empleada en este trabajo.

## Conclusiones

Los resultados del presente trabajo de tesis muestran que la transfección no viral del gen de BDNF a las neuronas dopaminérgicas asociada a la activación crónica y continua (4.5 meses) del agonista de los receptores D<sub>3</sub>, el PPX, recupera la marcha normal, la coordinación motora y el balance, así como la memoria de trabajo en el modelo bilateral estriatal de la enfermedad de Parkinson en la rata. Esta recuperación motora se acompaña de un incremento de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y el AVT, así como una recuperación casi completa de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del Estriado de ambos hemisferios, un incremento en los niveles de dopamina en el Estriado y de sus metabolitos.

El PPX elimina los síntomas motores presentes en el modelo de Parkinson por lesión bilateral de la innervación nigro-estriatal:

- Incrementa la locomoción.
  - Recupera el balance y la coordinación motora.
1. El PPX asociado a la transfección del gen para BDNF:
- Recupera de manera permanente la marcha, la coordinación motora y el balance.
  - Recupera la memoria juzgada por la prueba de reconocimientos de objetos.
  - Incrementa el número de neuronas TH(+) en la SN y el AVT.
  - Recupera las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas en el Estriado.
  - Incrementa los niveles de dopamina y sus metabolitos en el Estriado.

## **Perspectivas**

Los enfoques terapéuticos actuales para tratar la enfermedad de Parkinson están encaminados al reemplazo de las neuronas dopaminérgicas perdidas y no a la regeneración del circuito motor.

Las perspectivas de este trabajo son determinar si la transfección del BDNF afecta o no las discinesias por Levodopa, así como estudiar los efectos del tratamiento en el modelo de Parkinson en el mono y en un modelo de Parkinson experimental con cuerpos de Lewy. Asimismo, es crucial validar las sugerencias propuestas de que la mejora motora obtenida es debida a la regeneración de las neuronas de la SNc y de la reinervación funcional de los núcleos, como el Estriado. Además, se debe explorar si la reinervación fue producto de la neurogénesis a partir de células madre presentes en la SN como lo sugieren los estudios de Van Kampen (2006).

Es importante verificar si la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la SNc puede disminuir en los animales que reciben el tratamiento combinado para así aumentar la reinervación dopaminérgica en el Estriado. También es importante analizar el tipo de sinapsis que se llevan a cabo en las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del Estriado que serviría para evaluar si la reinervación obtenida es funcional.



## Referencias

- Accili, D., Fishburn, C. S., Drago, J., Steiner, H., Lachowicz, J. E., Park, B. H., Fuchs, S. (1996). A targeted mutation of the D3 dopamine receptor gene is associated with hyperactivity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(5), 1945–9.
- Aschner, M. & Wegrzynowicz, S. (2013). Manganese toxicity in the central nervous system: The glutamine/glutamate- $\gamma$ -aminobutyric acid cycle. *Journal of Internal Medicine*, 273(5), 466–477. <https://doi.org/10.1111/joim.12040>
- Ahlskog, J., Muentner, M. (2001). Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*. 16(3), 448-58.
- Alam, Z. I., Jenner, A., Daniel, S. E., Lees, A. J., Cairns, N., Marsden, C. D., Jenner, P., Halliwell, B. (1997). Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *Journal of neurochemistry*, 69, 1196-1203.
- Alberico, S.L., Cassell, M.D., Narayanan, N.S. (2015). The Vulnerable Ventral Tegmental Area in Parkinson's Disease. *Basal Ganglia*, 5(2-3), 51–55.
- Alexander, G. E., Crutcher, M. D. (1990). Neural representations of the target (goal) of visually guided arm movements in three motor areas of the monkey. *Journal of neurophysiology*, 64, 164-178.
- Aliaga, E., Rage, F., Bustos, G., & Tapia-Arancibia, L. (1998). BDNF gene transcripts in mesencephalic neurons and its differential regulation by NMDA. *Molecular Neuroscience NeuroReport*, 9(9), 1959–1962.

- Altar, C. A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J. M., Wiegand, S. J. et al. (1997). Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*, 389(6653), 856–860. <https://doi.org/10.1038/39885>.
- Álvarez-maya, I., Navarro-Quiroga, I., Meraz-ríos, M. A., Aceves, J., Martínez-Fong, D. (2001). In Vivo Gene Transfer to Dopamine Neurons of Rat Substantia Nigra via the High-Affinity Neurotensin Receptor. *Molecular Medicine*, 7(3), 186–192.
- Alvin, R. L., Young, A. B., Penney, J. B., Roger, L. A., Young, B. B. (1989). Perspectives on disease: The functional anatomy of basal ganglia disorders. Elsevier, 12(10).
- Amano, T., Matsubayashi, H., Momiyama, T., Sasa, M. (1994). Inhibitory effects of 7-OH-DPAT, dopamine D3-receptor agonist, on nucleus accumbens neurons. *Japanese Journal of Pharmacology*, 65, 293–295.
- Anaya-Martinez, V., Martinez-Marcos, A., Martinez-Fong, D., Aceves, J., and Erlij, D. (2006). Substantia nigra compacta neurons that innervate the reticular thalamic nucleus in the rat also project to striatum or globus pallidus: implications for abnormal motor behavior. *Neuroscience*, 143 (2), 477.
- Andersen, J. K. (2004). Iron dysregulation and Parkinson's disease. *Journal of Alzheimer's disease, JAD* 6, S47-52.
- Arango-Rodríguez, M. L., Navarro-Quiroga, I., González-Barrios, J. A., Martínez-Arguelles, D. B., Bannon, M. J., Kouri, J., Forgez, P., Rostene, W., García-Villegas, R., Jiménez, I., Martínez-Fong, D. (2006). Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection. *Biochimica et Biophysica*, 1760, 1009-1020.
- Ávila-Costa, M. R., Montiel Flores, E., Colín-Barenque, L., Ordoñez, J. L., Gutiérrez, A. L., Niño-Cabrera, H. G. Fortoul, T. I. (2004). Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. *Neurochemical Research*, 29(7), 1365–9.

- Baker, S. A., Baker, K. A., & Hagg, T. (2004). Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *The European journal of neuroscience*, *20*(2), 575–9.
- Baquet, Z. C., Gorski, J. A., & Jones, K. R. (2004). Early striatal dendrite deficits followed by Neuron Loss with Advanced Age in the Absence of Anterograde Cortical Brain-Derived Neurotrophic Factor. *The Journal of Neuroscience*, *24*(17), 4250–4258. doi:10.1523/JNEUROSCI.3920-03.2004
- Baquet, Z. C., Bickford, P. C., Jones, K. R. (2005). Brain-derived neurotrophic factor is required for the establishment of the proper number of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. *The Journal of neuroscience*, *25*, 6251-6259.
- Bartholini, G., Burkard, W. P., Pletscher, A. (1967). Increase of cerebral catecholamines caused by 3, 4-dihydroxyphenylalanine after inhibition of peripheral decarboxylase. *Nature*, *215*, 852-853.
- Beal, M. F. (2003). Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *991*, 120-131.
- Beato, R., Levy, R., Pillon, B., Vidal, C., Tezenas Du Montcel, S., Cardoso, F. et al. (2008). Working memory in Parkinson's disease Patients Clinical features and response to levodopa. *Arq Neuropsiquiatr*, *66*(2), 147–151. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2008000200001>.
- Beck, K. D., Valverde, J., Alexi, T., Poulsen, K., Moffat, B., Vandlen, R. A., Rosenthal, A., Hefti, F. (1995). Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature*, *373*, 339-341.
- Beeler, J. A., Cao, Z. F. H., Kheirbek, M. A., Ding, Y., Koranda, J., Murakami, M., Zhuang, X. (2010). Dopamine-dependent motor learning insight into levodopa's long-duration response. *Annals of Neurology*, *67*(5), 639–647.

- Benisty, S., Boissiere, F., Faucheux, B., Agid, Y., Hirsch, E. C. (1998). TrkB messenger RNA expression in normal human brain and in the substantia nigra of parkinsonian patients: an in situ hybridization study. *Neuroscience*, *86*, 813-826.
- Benitez, A. N., Reyna, P., Espadas, A., Sierra, A., Anaya, V., Florán, B., et al., Pramipexole combined with transfection of the BDNF gene restores motor coordination in bilateral model of Parkinson's disease in the rat. Program 602.4 2016 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: SFN, 2016 Online.
- Berendse, H. W., Galis-De Graaf, Y., G. H. J. (1992). Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *316*(3), 314–347.
- Berger, K., Przedborski, S., Cadet, J. L. (1991). Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats. *Brain Research Bull*, *26*(2), 301–307.
- Berlyne, D. E. (1950). Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. *British Journal of Psychology*, *41*, 68–80.
- Binder, E. B., Kinkead, B., Owens, M. J., & Nemeroff, C. B. (2001). Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacology Review*, *53*(4), 453–486. <http://pharmrev.aspetjournals.org>.
- Blandini, F., Porter, R. H., Greenamyre, J. T. (1996). Glutamate and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, *12*, 73-94.
- Blesa, J., Pifl, C., Sánchez-González, M. A., Juri, C., García-Cabezas, M. A., Adánez, R., Obeso, J. A. (2012). The nigrostriatal system in the presymptomatic and symptomatic stages in the MPTP monkey model: a PET, histological and biochemical study. *Neurobiology of Disease*, *48*(1), 79–91.

- Bloch, A., Sirrenberg, C. (1996). Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk and p75L<sub>nt</sub>r receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 21100-21107.
- Bolan, E. A., Kivell, B., Jaligam, V., Oz, M., Jayanthi, L. D., Han, Y., Sen, N., Urizar, E., Gomes, I., Devi, L. A., Ramamoorthy, S., Javitch, J. A., Zapata, A., Shippenberg, T. S. (2007). D2 receptors regulate dopamine transporter function via an extracellular signal-regulated kinases 1 and 2-dependent and phosphoinositide 3 kinase-independent mechanism. *Molecular Pharmacology*, 71, 1222-1232.
- Bossy-Wetzel, E., Schwarzenbacher, R., Lipton, S. A. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Medicine*, 10, Suppl:S2-9.
- Bowery, B., Rothwell, L. A., Seabrook, G. R. (1994). Comparison between the pharmacology of dopamine receptors mediating the inhibition of cell firing in rat brain slices through the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. *British Journal of Pharmacology*, 112(3), 873–80.
- Bourn, W. M., Chin, L., Picchioni, A. L. (1972). Enhancement of audiogenic seizure by 6-hydroxydopamine. *Journal Pharm. Pharmacology*, 24, 913–914.
- Brotchie, J. M., Lee, J., Venderova, K. (2005). Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 112(3), 359–91.
- Bustos, G., Abarca, J., Bustos, V., Riquelme, E., Noriega, V., Campusano, J. *et al.* (2009). NMDA receptors mediate an early up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in substantia nigra in a rat model of presymptomatic Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research*. 87(10), 2308–2318. <https://doi.org/10.1002/jnr.22063>.
- Caine, S. B., Koob, G. F. (1993). Modulation of cocaine self-administration in the rat through D-3 dopamine receptors. *Science*, 260(5115), 1814–6.

- Camacho-Ochoa, M., Walker, E. L., Evans, D. L., Piercey, M. F. (1995). Rat Brain binding sites for pramipexole, a clinically useful D3-preferring dopamine agonist. *Neuroscience*, 97–100.
- Camp, D. M., Browman, K. E., Robinson, T. E. (1994). The effects of methamphetamine and cocaine on motor behavior and extracellular dopamine in the ventral striatum of Lewis versus Fischer 344 rats. *Brain research*, 668(1-2), 180–93.
- Canudas, A. M., Pezzi, S., Canals, J. M., Pallas, M., Alberch, J. (2005). Endogenous brain-derived neurotrophic factor protects dopaminergic nigral neurons against transneuronal degeneration induced by striatal excitotoxic injury. *Brain Research Molecular Brain Research*, 134, 147-154.
- Carvey, P. M., McGuire, S. O., Ling, Z. D. (2001). Neuroprotective effects of D3 dopamine receptor agonists. *Parkinsonism & Related Disorders*, 7(3), 213–223.
- Casarrubea, M., Sorbera, F., Crescimanno, G. (2006). Effects of 7-OH-DPAT and U 99194 on the behavioral response to hot plate test, in rats. *Physiology & Behavior*, 89, 552-562.
- Cepeda, C., Buchwald, N. A., Levine, M. S. (1993). Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 9576-9580.
- Chevalier, G., Deniau, J. M. (1990). Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 277–80.
- Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2005). Dopaminergic neurons. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37, 942-946.
- Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2008). Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1780,1362-1367.

- Chio, C. L., Lajiness, M. E., Huff, R. M. (1994). Activation of heterologously expressed D3 dopamine receptors: comparison with D2 dopamine receptors. *Molecular pharmacology*, 45:51-60.
- Cohen, G., Heikkila. R. (1984). Alloxan and 6-Hydroxydopamine: Cellular toxins. *Methods Enzymology*, 105(C), 510–516.
- Collo, G., Zanetti, S, Missale, C., & Span, P. (2008). Dopamine D3 receptor-preferring agonists increase dendrite arborization of mesencephalic dopaminergic neurons via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *European Journal of Neuroscience*, 28, 1231-40. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06423.x
- Collo, G., Cavalleri, L., & Spano, P. (2014). Structural plasticity in mesencephalic dopaminergic neurons produced by drugs of abuse: critical role of BDNF and dopamine. *Frontiers Pharmacology*, 5, 259, 1-7. doi: 10.3389/fphar.2014.00259.
- Connor, B., Dragunow, M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain research Brain research reviews* 27, 1-39.
- Cooper, J. R., Blomm, F. E., Roth, R. H. (1996). The biochemical basis of Neuropharmacology. *Oxford University Press*, N. Y, USA.
- Cooper, J. A., Sagar, H. J., Jordan, N., Harvey, N. S., Sullivan, E. V. (1991). Cognitive Impairment in Early, Untreated Parkinson's Disease and Its Relationship to Motor Disability. *Brain*, 114, 2095–2122.
- Coronas, V., Bantubungi, K., Fombonne, J., Krantic, S., Schiffmann, S. N., Roger, M. (2004). Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the post-natal subventricular zone. *Journal of neurochemistry*, 91(6), 1292–301.

- Cotzias, G. C., Van Woert, M. H., Schiffer, L. M. (1967). Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *The New England journal of medicine*, 276, 374-379
- Crespo, P., Cachero, T. G., Xu, N., Gutkind, J. S. (1995). Dual Effect of-Adrenergic Receptors on Mitogen-activated Protein Kinase: Evidence for A-dependent activation and A Gs-camp-mediated inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 270(42), 25259–25265.
- Cussac, D., Newman-Tancredi, A., Pasteau, V., Millan, M. J. (1999). Human dopamine D(3) receptors mediate mitogen-activated protein kinase activation via a phosphatidylinositol 3-kinase and an atypical protein kinase C-dependent mechanism. *Molecular pharmacology*, 56, 1025-1030.
- Curtze, C., Nutt, J. G., Carlson-Kuhta, P., Mancini, M., Horak, F. B. (2015). Levodopa Is a Double-Edged Sword for Balance and Gait in People with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 30(10), 1361–1370.
- Dahlström, A., Fuxe, K. (1964). Evidences of the existence of monoaminescontaining neurons in the central nervous system. I Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiology. Scand.*, 62, Suppl. 232:1-55.
- Datla, K., Blunt, S., Dexter, D. (2001). Chronic L-DOPA administration is not toxic to the remaining dopaminergic nigrostriatal neurons, but instead may promote their functional recovery, in rats with partial 6-OHDA or FeCl (3) Nigrostriatal lesions. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 16(3), 424–434.
- David, C., Fishburn, C., Monsma, F., Sibley, D., Fuchs, S. (1993). Synthesis and processing of D2 Dopamine receptors. *Biochemistry*, 32(32), 8179-8183.
- Davis, G., Williams, A., Markey, S., Ebert, M., Caine, E., Reichert, C., Kopin, I. (1979). Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Research*, 1(3), 249–54.



- Davies, A. M. (1996). Paracrine and autocrine actions of neurotrophic factors. *Neurochemical Research*, 21(7), 749-753.
- Dawson, T. M., Dawson, V. L. (2003). Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *The Journal of clinical investigation*, 111, 145-151.
- Day, M., Wang, Z., Ding, J., An, X., Ingham, C.A., Shering, A.F. *et al.* (2006). Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nature Neurosciences*, 9(2), 251-9.
- Debeir, T., Ginestet, L., François, C., Laurens, S., Martel, J., Chopin, P., Raisman-Vozari, R. (2005). Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. *Experimental Neurology*, 193(2), 444–54.
- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 281–5.
- Devoto, P., Collu, M., Muntoni, A., Pistis, M., Serra, G., Gessa, G., Diana, M. (1995). Biochemical and electrophysiological effects of 7-OH-DPAT on the mesolimbic dopaminergic system. *Synapse*, 20, 153–155.
- Deumens, R., Blokland, A., Prickaerts, J. (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Experimental Neurology*, 175(2), 303–17.
- Deutch, A. Y. (2006). Striatal plasticity in parkinsonism: dystrophic changes in medium spiny neurons and progression in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission*, Supplementum 67-70.
- a) Dexter, D. T., Carter, C. J., Wells, F. R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P., Marsden, C. D. (1989). Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 52, 381-389.

- b)Dexter, D. T., Wells, F. R., Lees, A. J., Agid, F., Agid, Y., Jenner, P., Marsden, C. D. (1989). Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 52, 1830-1836.
- De Camilli, P., Macconi, D., Spada, A. (1979). Dopamine inhibits adenylate cyclase in human prolactin-secreting pituitary adenomas. *Nature*, 278, 252-254.
- De Rijk, M. C., Launer L. J., Berger, K., Breteler, M. M., Dartigues, J. F., Baldereschi, M., Fratiglioni, L., Lobo, A., Martinez-Lage, J., Trenkwalder, C., Hofman, A. (2000). Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*, 54(11), S21-3.
- Díaz J., Levesque, D., Lammers, C. H., Griffon, N., Martres, M. P., Schwartz, J. C., Sokoloff, P. (1995). Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine d 3 receptor in the rat brain. *Neurosciences*, 65(3), 731-745.
- Díaz, J., Ridray, S., Mignon, V., Griffon, N., Schwartz, J. C., Sokoloff, P. (1997) Selective expression of dopamine D3 receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 17, 4282-4292.
- Díaz, J., Pilon, C., Le Foll, B., Gros, C., Triller, a, Schwartz, J. C., Sokoloff, P. (2000). Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(23), 8677-84.
- Donnan, G. A., Kaczmarczyk, S. J., McKenzie, J. S., Rowe, P. J., Kalnins, R. M., Mendelsohn, F. A. (1987). Regional and temporal effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on dopamine uptake sites in mouse brain. *Journal of the Neurological Sciences*, 81, 261-271.

- Dooley, M., Markham, A. (1998). Pramipexole. A review of its use in the management of early and advanced Parkinson's disease. *Drugs and Aging, 12*, 495-514.
- Double, K. L., Crocker, A. D. (1995). Dopamine receptors in the substantia nigra are involved in the regulation of muscle tone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92*:1669-1673.
- Drucker-Colín, R., y García-Hernández, F. (1991). A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function. *Journal of Neuroscience Methods, 39*(2), 153–161.
- Du, F., Li, R., Huang, Y., Li, X., Lee, W. (2005). Dopamine D<sub>3</sub> receptor-preferring agonists induce neurotrophic effects on mesencephalic dopamine neurons. *The European Journal of Neuroscience, 22*(10), 2422–30.
- Durieux, P. F., Schiffmann, S. N., De Kerchove d'Exaerde, A. (2012). Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions. *The EMBO journal, 31*, 640-653.
- Elsworth, J. D., & Roth, R. H. (1997). Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Experimental Neurology, 144*, 4-9.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1" Behavioral data. *Behavioral Brain Research, 31*, 47-59. doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X
- Eskow-Jaunarajs, K. L., Dupre, K. B., Ostock, C. Y., Button, T., Deak, T., Bishop, C. (2010). Behavioral and neurochemical effects of chronic L-DOPA treatment on non-motor sequelae in the hemiparkinsonian rat. *Behavioral Pharmacology, 21*(7), 627–637.

- Feldman, R. S., Meyer, J. S., Quenzer, L. F. (1997). Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Capítulo 20. Principles of neuropsychopharmacology, Sinauer, MA, USA.*
- Filipe, V. M., Pereira, J. E., Costa, L. M., Mauricio, A. C., Couto, P. A., Melo-Pinto, P., Varejao, A. S. (2006). Effect of skin movement on the analysis of hindlimb kinematics during treadmill locomotion in rats. *Journal of Neuroscience Methods, 153*, 55-61.
- Fishburn, C. S., Bedford, M., Lonai, P., & Fuchs, S. (1996). Early expression of D3 dopamine receptors in murine embryonic development. *FEBS Letters, 381*(3), 257–261. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00119-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00119-6)
- Fiskum, G., Starkov, A., Polster, B. M., Chinopoulos, C. (2003). Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences, 991*, 111-119.
- Freund, T. F., Powell, J. F., Smith, A. D. (1984). Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neurosciences Journal, 13*(4), 1189–1215.
- Fumagalli, F., Racagni, G., Riva, M. (2006). Shedding light into the role of BDNF in the pharmacotherapy of Parkinson's disease. *The Pharmacogenomics Journal, 6*(2), 95–104.
- Gallagher, D. A., Schapira, A. H. (2009). Etiopathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry, 9*, 860e868.
- Galván, A., Florán, B., Erlij, D., Aceves, J. (2001). Intrapallidal dopamine restores motor deficits induced by 6-hydroxydopamine in the rat. *Journal of Neural Transmission, 108*, 153-166.

- Gerfen, C. R., Surmeier, D. J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 441–66.
- a) Gerlach, M., Riederer, P. (1996). Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *Journal of Neural Transmission*, 103, 987-1041.
- b) Gerlach, M., Riederer, P. (1996). Pathogenesis and neuroprotective therapy trial in chronic degenerative diseases. Status of antioxidants. *Med Klin (Munich)*, 91, 163-170.
- Glinka, Y., Gassen, M., Youdim, M. B. (1997). Mechanism of 6-Hydroxydopamine neurotoxicity. *Journal Neural Transmission Supplement*, 50, 55–66.
- Goma, M., & Tobeña, A. (1978). Reliability of various measures obtained in open-field test. *Psychology Report*. 43, 1123-1128. doi.org/10.2466%2Fpr0.1978.43.3f.1123.
- González-Barrios, J. A., Lindahl, M., Bannon, M. J., Anaya-Martínez, V., Flores, G., Navarro-Quiroga, I. et al. (2006). Neurotensin polyplex as an efficient carrier for delivering the human GDNF gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats. *Molecular Therapie*, 14, 857–865. doi:10.1016/j.ymthe.2006.09.001
- Griffon, N., Pilon, C., Sautel, F., Schwartz, J. C., Sokoloff, P. (1997). Two intracellular signaling pathways for the dopamine D3 receptor: opposite and synergistic interactions with cyclic AMP. *Journal of neurochemistry*. 68:1-9.
- Graybiel, A. M. (2005). The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Current Opinion in Neurobiology*, 15, 638-644.
- Greenamyre, J. T., Hastings, T. G. (2004). Biomedicine. Parkinson's--divergent causes, convergent mechanisms. *Science*, 304, 1120-1122.

- Guillin, O., Diaz, J., Carroll, P., Griffon, N., Schwartz, J. C., Sokoloff, P. (2001). BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature*, *411*(6833), 86–9.
- Guillin, O., Griffon, N., Bezard, E., Leriche, L., Diaz, J., Gross, C., Sokoloff, P. (2003). Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: therapeutic implications in Parkinson's disease. *European Journal of Pharmacology*, *480*, 89-95.
- Hagg, T. (1998). Neurotrophins prevent death and differentially affect tyrosine hydroxylase of adult rat nigrostriatal neurons in vivo. *Experimental Neurology*, *149*, 183-192.
- Hallman, H., Lange, J., Stromberg, I., Jonsson, G. (1985). Neurochemical and histochemical characterization of neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholaminic neurons in the mouse. *Journal of Neurochemistry*, *44*, 113-127.
- Heikkila, R. E., Hess, A., Duvoisin, R. C. (1984). Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science*, *224*(4656), 1451-1453.
- Heikkila, R. E., Hess, A., Duvoisin, R. C. (1985). Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse: relationships between monoamine oxidase, MPTP metabolism and neurotoxicity. *Life sciences*, *36*(3), 231-6.
- Heikkila, R., Cohen, G. (1984). Alloxan and 6-Hydroxydopamine: Cellular toxins. *Methods of Enzymology*, 510–516.
- Hernández-Baltazar, D., Martínez-Fong, D., Trudeau, L. E. (2012). Optimizing NTS-polyplex as a tool for gene transfer to cultured dopamine neurons. *PloS one*, *7*, e51341.

- Hernández-Chan, N. G., Bannon, M. J., Orozco-Barrios, C. E., Escobedo, L., Zamudio, S., Martínez-Fong, D., et al. (2015). Neurotensin-polyplex-mediated brain-derived neurotrophic factor gene delivery into nigral dopamine neurons prevents nigrostriatal degeneration in a rat model of early Parkinson's disease. *J Biomed Sci*, 22(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0166-7>.
- Herzog, C. D., Dass, B., Gasmi, M., Bakay, R., Stansell, J. E., Tuszynski, M., Bankiewicz, K., Chen, E. Y., Chu, Y., Bishop, K., Kordower, J. H., Bartus, R. T. (2008). Transgene expression, bioactivity, and safety of CERE-120 (AAV2-neurturin) following delivery to the monkey striatum. *Molecular therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 16, 1737-1744.
- Hilal-Dandal, R., Brunton, L. L. (2015). *Goodman & Gilman Manual de farmacología y terapéutica*, (2a edición). Mc Graw Hill.
- Höglinger, G. U., Rizk, P., Muriel, M. P., Duyckaerts, C., Oertel, W. H., Caille, I., & Hirsch, E. C. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nature Neurosciences*, 7(7), 726–735. <https://doi.org/10.1038/nn1265>.
- Hornykiewicz, O., (1974). The mechanism of action of L-dopa in Parkinson's disease. *Life Sciences*, 15(7), 1249-59.
- Howells, D. W., Porritt, M. J., Wong, J. Y., Batchelor, P. E., Kalnins, R., Hughes, J., Donnan, G. (2000). Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Experimental Neurology*, 166(1), 127–35.
- Huang, E. J., Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neurosciences*, 24, 677-736.
- a)Huang, X., Chen, P. C., Poole, C. (2004). APOE-[epsilon]2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease. *Neurology*, 62, 2198-2202.

- b)Huang, Y., Cheung, L., Rowe, D., Halliday, G. (2004). Genetic contributions to Parkinson's disease. *Brain research Brain research reviews*, 46, 44-70.
- Hughes, P. E., Alexi, T., Walton, M., Williams, C. E., Dragunow, M., Clark, R. G., Gluckman, P. D. (1999). Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 57, 421-450.
- Hutchison, W. D., Allan, R. J., Opitz, H., Levy, R., Dostrovsky, J. O., Lang, A. E., Lozano, A. M. (1998). Neurophysiological identification of the subthalamic nucleus in surgery for Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 44, 622-628.
- 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, 230-232
- Ingham, C. A., Hood, S. H., Van Maldegem, B., Weenink, A., Arbuthnott, G. W. (1993). Morphological changes in the rat neostriatum after unilateral 6-hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway. *Experimental Brain Research*, 93(1), 17-27.
- Ingham, C. A., Hood, S. H., Taggart, P., Arbuthnott, G. W. (1998). Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Journal of Neuroscience*, 18(12), 4732-43.
- Issidorides, M. R., Mytilineou, C., Panayotacopoulou, M. T., Yahr, M. D. (1991). Lewy bodies in parkinsonism share components with intraneuronal protein bodies of normal brains. *Journal of Neural Transmission Parkinson's Disease and dementia section*, 3, 49-61.
- Jan, C., Francois, C., Yelnik, J., Tande, D., Agid, Y., Hirsch, E.C., (2000). Dopaminergic innervation of the pallidum in the normal state, MPTP treated monkeys and Parkinsonian patients. *Europe Journal of Neurosciences*, 12, 4525–4535.



- Johannessen, J. N., Chiueh, C. C., Burns, R. S., Markey, S. P. (1985). Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects. *Life Science*, 36(3), 219–24.
- Jolicoeur, F. B., Rivest, R., Drumheller, A. (1991). Hypokinesia, rigidity, and tremor induced by hypothalamic 6-OHDA lesions in the rat. *Brain research bulletin*, 26(2), 317–20.
- Jonsson, G., Sachs, Charlotte. (1975). Mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Biochemical Pharmacology*, 24, 1–8.
- Joyce, J. N., Der, T. C., Renish, L., Osredkar, T., Hagner, D., Renfermedad de Parkinsonloga, M., Sakakibara, S., Ueda, S. (2004). Loss of D3 receptors in the zitter mutant rat is not reversed by L-dopa treatment. *Experimental Neurology*, 187, 178-189.
- Joyce, J. N., Ryoo, H. L., Beach, T. B., Caviness, J. N., Stacy, M., Gurevich, E. V., Reiser, M., Adler, C. H. (2002). Loss of response to levodopa in Parkinson's disease and co-occurrence with dementia: role of D3 and not D2 receptors. *Brain research*, 955, 138-152.
- Kaplan, D. R. & Stephens, R. M. (1994). Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *Wiley Online Library*, 25(11), 1404–1417. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/neu.480251108>.
- Kim, H., Li, Q., Hempstead, B. L., Madri, J. A. (2004). Paracrine and Autocrine Functions of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Nerve Growth Factor (NGF) in Brain-derived Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 33538-33546.
- Kirik, D., Rosenblad, C., Bjorklund, A. (1998). Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Experimental neurology* 152, 259-277.

- 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, 314-320.
- Kovalchuk, Y., Hanse, E., Kafitz, K. W., Konnerth, A. (2002). Postsynaptic Induction of BDNF-Mediated Long-Term Potentiation. *Science*, 295, 1729-1734.
- Koshimizu, H., Hazama, S., Hara, T., Ogura, A., Kojima, M. (2010). Distinct signaling pathways of precursor BDNF and mature BDNF in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience letters*, 473, 229-232.
- Kreiss, D. S., Bergtrom, D. A., Gonzalez, A. M., Huang, K. X., Sibley, D. R., Walters, J. R. (1995). Dopamine receptor agonist potencies for inhibition of cell firing correlate with dopamine D3 receptor binding affinities. *European Journal of Pharmacology*, 209–214.
- Küppers, E., Beyer, C. (2001). Dopamine regulates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in cultured embryonic mouse striatal cells. *Neuroreport*, 12(6), 1175–9.
- Lajiness, M. E., Chio, C. L., Huff, R. M. (1993). D2 dopamine receptor stimulation of mitogenesis in transfected Chinese hamster ovary cells: relationship to dopamine stimulation of tyrosine phosphorylations. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 267, 1573-1581.
- Lane, E. L., Winkler, C., Brundin, P., Cenci, M. A. (2006). The impact of graft size on the development of dyskinesia following intrastriatal grafting of embryonic dopamine neurons in the rat. *Neurobiology Disease*, 22(2), 334–345.
- Lang, A. E. (2007). The progression of Parkinson disease: a hypothesis. *Neurology*, 68, 948–952.
- Lang, A. E., Lozano, A. M. (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *The New England journal of medicine*, 339, 1044-1053.

- Langston, J. W., Irwin I., DeLanney L. E. (1983). The biotransformation of MPTP and disposition of MPP<sup>+</sup>: the effects of aging. *Life Science*, 40(8), 749-54.
- Lee, J., Duan, W., Mattson, M. P. (2002). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *Journal of Neurochemistry*, 82(6), 1367–1375.
- Lejeune, F., Millan, M. J. (1995). Activation of dopamine. *European Journal of Pharmacology*, 275, 7–9.
- Levant, B., Bancroft, G. N., Selkirk, C. M. (1996). In vivo occupancy of D2 dopamine receptors by 7-OH-DPAT. *Synapse*, 24, 60-64.
- Levant, B. (1997). The D3 Dopamine Receptor : Neurobiology and Potential Clinical Relevance. *Pharmacological Reviews*, 49(3), 231–252.
- Levesque, D., Martres, M. P., Díaz, J., Griffon, N., Lammers, C. H., Sokoloff, P., Schwartz, J. C. (1995). A paradoxical regulation of the dopamine D3 receptor expression suggests the involvement of an anterograde factor from dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 1719-1723.
- Le Foll, B., Díaz, J., Sokoloff, P. (2005). A single cocaine exposure increases BDNF and D3 receptor expression: implications for drug-conditioning. *Neuroreport*, 16, 175-178.
- a) Li, C., Biswas, S., Li, X., Dutta, A. K., Le, W. (2010). Novel D<sub>3</sub> dopamine receptor-preferring agonist D-264: Evidence of neuroprotective property in Parkinson's disease animal models induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and lactacystin. *Journal of Neuroscience Research*, 88(11), 2513–23.

- b) Li, C., Guo, Y., Xie, W., Li, X., Janokovic, J., & Le, W. (2010). Neuroprotection of pramipexole in UPS impairment induced animal model of Parkinson's disease. *Neurochem Research*, 35(10), 1546-56. doi:10.1007/s11064-010-0214-3.
- Li, C., Dabrowska, J., Hazra, R., Rainnie, D. G. (2011). Synergistic activation of dopamine D1 and TrkB receptors mediate gain control of synaptic plasticity in the basolateral amygdala. *PloS one*, 6:e26065.
- Lie, D. C., Dzievczapolski, G., Willhoite, A. R., Kaspar, B. K., Shults, C. W., & Gage, F. H. (2002). The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci*, 22(15), 6639–6649. <https://doi.org/20026700>.
- Lindsay, R. M. (1995). Neuron saving schemes. *Nature*, 373, 289-290.
- Livingstone, C. D., Strange, P. G., Naylor, L. H. (1992). Molecular modelling of D2-like dopamine receptors. *The Biochemical Journal*, 287, Pt 1, 277–82.
- Liu, J. C., Cox, R. F., Greif, G. J., Freedman, J. E., Waszczak, B. L. (1994). The putative dopamine D3 receptor agonist 7-OH-DPAT: lack of mesolimbic selectivity. *European Journal of Pharmacology*, 264, 269–278.
- Lorenc-Koci, E., Wolfarth, S. (1999). Efficacy of pramipexole, a new dopamine receptor agonist, to relieve the parkinsonian-like muscle rigidity in rats. *European Journal of Pharmacology*, 385, 39-46.
- a)Lotharius, J., Brundin, P. (2002). Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, 11, 2395-2407.
- b)Lotharius, J., Brundin, P. (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nature reviews Neuroscience*, 3, 932-942.
- Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, Q. John., Lee, V. M. Y. (2012). Pathological  $\alpha$ -Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like

- Neurodegeneration in Non-transgenic Mice. *Science*, 16; 338 (6109): 949:953.  
doi:10.1126/science.1227157.
- Luquin, M. R. (2000). Experimental models of Parkinson disease. *Revista de Neurologia*, 31, 60-66.
- Maia, T. V., Frank, M. J. (2011). From reinforcement learning models to psychiatric and neurological disorders. *Nature Neuroscience*, 14: 154–162.
- Maj, J., Skuza, G., Kor, K. (1997). Antidepressant effects of pramipexole, a novel dopamine receptor agonist. *Neural Transmission*, 525–533.
- Mancilla-Díaz, J. M., Escartín-Pérez, R. E., López-Alonso, V. E., Florán-Garduño, B., Romano-Camacho, J. B. (2005). Role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the hypophagic effect of 5-HT on the structure of feeding behavior. *Medical Science Monitor*, 11(3), 74–9.
- Marks, W. J. Jr., 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., Starr, P. A., Larson, P. S., Ostrem, J. L., Nutt, J., Kieburtz, K., Kordower, J. H., Olanow, C. W. (2010). Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurology*, 9, 1164-1172.
- Marsden, C. D., Parkes. J. (1976). Bromocriptine in Parkinsonism. *British Medical Journal*, 1, 1402.
- Martínez-Fong, D., Bannon, M. J., Trudeau, L. E., González-Barrios, J. A., Arango-Rodríguez, M. L., Hernández-Chan, N. G., Reyes-Corona, D., Armendariz-Borunda, J., Navarro-Quiroga, I. (2012). NTS-Polyplex: a potential nanocarrier for neurotrophic therapy of Parkinson's disease. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8, 1052-1069.

- Martínez-Fong, D., Navarro-Quiroga, I. (2000). Synthesis of a non-viral vector for gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor. *Brain Research Brain Research Protocols*, 6, 13-24.
- Martínez-Fong, D., Navarro-Quiroga, I., Ochoa, I., Álvarez-Maya, I., Meraz, M. A., Luna, J., Arias-Montano, J. A. (1999). Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells. *Brain Research Molecular Brain Research*, 69, 249-262.
- Martínez-Fong, D., Rosales, M. G., Góngora-Alfaro, J. L., Hernández, S., & Aceves, J. (1992). NMDA receptor mediates dopamine release in the striatum of unanesthetized rats as measured by brain microdialysis. *Brain Res*, 595(2), 309–315. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91065-M](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91065-M).
- McGeorge, A. J. & Faull, R. L. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29: 503–537.
- McNeill, T. H., Brown, S. A., Rafols, J. A., Shoulson, I. (1988). Atrophy of medium spiny I striatal dendrites in advanced Parkinson's disease. *Brain Research*, 455, 148-152.
- Mengod, G., Villaró, M. T., Landwehrmeyer, G. B., Martinez-Mir, M. L., Niznik, H. B., Sunahara, R. K., Seeman, P., O'dowd, B. F., Probst, A., Palacios, J. M. (1992). Visualization of dopamine D1, D2 and D3 receptor mRNAs in human and rat brain. *Neurochemistry International*, 20, 3s-43s.
- Merlo, S., Canonico, P. L., Sortino, M. A. (2011). Distinct effects of pramipexole on the proliferation of adult mouse sub-ventricular zone-derived cells and the appearance of a neuronal phenotype. *Neuropharmacology*, 60, 892-900.
- Metz, G. A., Tse, A., Ballermann, M., Smith, L. K., Fouad, K. (2005). The unilateral 6-OHDA rat model of Parkinson's disease revisited: an electromyographic and behavioural analysis. *The European Journal of Neuroscience*, 22, 735-744.

- Mierau, J., Schneider, F. J., Ensinger, H. A., Chio, C. L., Lajiness, M. E., Huff, R. (1995). Pramipexole binding and activation of cloned and expressed dopamine D2, D3 and D4 receptors. *European Journal of Pharmacology*, 290(1), 29–36.
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 78, 189-225.
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., Nagatsu, T. (1999). Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, 270, 45-48.
- Muller, T., Kuhn, W., Przuntek, H. (1997). Current therapy of idiopathic Parkinson disease. 2: Recent and alternative therapies. *Fortschritte der Medizin*, 115, 37-41.
- Muller, T., & Ross, H. (2006). Levodopa, motor fluctuations and dyskinesia in Parkinson's disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 7(13), 1715-1730.
- Murer, M. G., Raisman-Vozari, R., Yan, Q., Ruberg, M., Agid, Y., & Michel, P. P. (1999). Survival factors promote BDNF protein expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurochemical Neuroreport*, 10(4), 801–805.
- Nair, V. D., Olanow, C. W., Sealfon, S. C. (2003). Activation of phosphoinositide 3-kinase by D2 receptor prevents apoptosis in dopaminergic cell lines. *The Biochemical Journal*, 373, 25-32.
- Navarro-Quiroga, I., Gonzalez-Barrios, A. J., Barron-Moreno, F., Gonzalez-Bernal, V., Martinez-Arguelles, D. B., Martínez-Fong, D. (2002). Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 nuclear localization signal. *Brain Research Molecular Brain Research*, 105, 86-97.

- Nicola, S. M., Surmeier, J., Malenka, R. C. (2000). Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 185-215.
- Nishi, K., Kondo, T., Narabayashi, H. (1989). Difference in recovery patterns of striatal dopamine content, tyrosine hydroxylase activity and total bioppterin content after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration: a comparison of young and older mice. *Brain Research*, 489(1), 157–162.
- Nishio, T., Furukawa, S., Akiguchi, I., Sunohara, N. (1998). Medial nigral dopamine neurons have rich neurotrophin support in humans. *Neuroreport*, 9, 2847-2851.
- Numan, S., Seroogy, K. B. (1999). Expression of trkB and trkC mRNAs by adult midbrain dopamine neurons: a double-label in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*, 403, 295-308.
- Obeso, J. A., Rodríguez-Oroz, M. C., Rodríguez, M., Lanciego, J. L., Artieda, J., Gonzalo, N., Olanow, C. W. (2000). Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 23(Box 1), 8–19.
- Okazawa, H., Murata, M., Watanabe, M., Kamei, M. (1992). Dopaminergic stimulation up-regulates the in vivo expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the striatum, 313(2), 138–142.
- O'Keeffe, G. C., Barker, R. A., Caldwell, M. A. (2009). Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain. *Cell Cycle*, 8, 2888-2894.
- Olanow, C. W., & Prusiner, S. B. (2009). Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12571–12572. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906759106>.



- Olson, P. A., Tkatch, T., Hernández-Lopez, S., Ulrich, S., Ilijic, E., Mugnaini, E., Zhang, H., Bezprozvanny, I., Surmeier, D. J. (2005). G-protein-coupled receptor modulation of striatal CaV1.3 L-type Ca<sup>2+</sup> channels is dependent on a Shank-binding domain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25:1050-1062.
- Otaegui, D., Paisan, C., Saenz, A., Marti, I., Ribate, M., Marti-Masso, J. F., Perez-Tur, J., Lopez de Munain, A. (2004). Mitochondrial polymorphisms in Parkinson's Disease. *Neuroscience letters*, 370, 171-174.
- Papa, S. M., Engber, T. M., Kask, A. M., Chase, T. N. (1994). Motor fluctuations in levodopa treated parkinsonian rats: relation to lesion extent and treatment duration. *Brain Research*, 662(1-2), 69-74.
- 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. *Neurorenfermedad de Parkinsonort*, 10, 557-561.
- Paxinos, G., Watson, C. (1998). The rat brain: academic press.
- Paxinos, G., Watson, C. (1986). The rat brain stereotactic coordinates. *Academic Press, Sydney*.
- Pérez, R. G., Hastings, T. G. (2004). Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk?. *Journal of Neurochemistry*, 89, 1318-1324.
- Piercey, M. F., Walker, E. L., Feldpausch, D. L., Camacho-Ochoa, M. (1996). High affinity binding for pramipexole, a dopamine D3 receptor ligand, in rat striatum. *Neuroscience Letters*, 216, 130-140.
- Pilon, C., Levesque, D., Dimitriadou, V., Griffon, N., Martres, M. P., Schwartz, J. C., Sokoloff, P. (1994). Functional coupling of the human dopamine D3 receptor in

a transfected NG 108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cell line. *European journal of Pharmacology*, 268,129-139.

Politis, M., Oertel, W. H., Wu, K., Quinn, N. P., Pogarell, O., Brooks, D. J., Piccini, P. (2011). Graft-induced dyskinesias in Parkinson's disease: High striatal serotonin/dopamine transporter ratio. *Movement Disorders*, 26(11), 1997–2003.

a)Porritt, M., Stanic, D., Finkelstein, D., Batchelor, P., Lockhart, S., Hughes, A., Kalnins, R., Howells, D. (2005). Dopaminergic innervation of the human striatum in Parkinson's disease. *Movement disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*. 20, 810-818.

b)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, 226-234.

Presgraves, S. P., Borwege, S., Millan, M. J., Joyce, J. N. (2004). Involvement of dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> receptors and BDNF in the neuroprotective effects of S32504 and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium in terminally differentiated SH-SY5Y cells. *Experimental Neurology*, 190, 157–170.

Prieto, G. A., Perez-Burgos, A., Palomero-Rivero, M., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., & Bargas, J. (2011). Upregulation of D<sub>2</sub>-class signaling in dopamine-denervated striatum is in part mediated by D<sub>3</sub> receptors acting on Cav2.1 channels via PIP<sub>2</sub> depletion. *Journal of Neurophysiology*. 105(5), 2260–2274. <https://doi.org/10.1152/jn.00516.2010>

Quik, M., Police, S., He, L., Di, Monte, D. A., Langston, J. W. (2000). Expression of D(3) receptor messenger RNA and binding sites in monkey striatum and substantia nigra after nigrostriatal degeneration: effect of levodopa treatment. *Neuroscience*, 98, 263-273.

- Quinn, N. P., Marion, M. H., Marsden, C. D. (1987). Open study of Madopar HBS, a new formulation of levodopa with benserazide, in 13 patients with Parkinson's disease and "on-off" fluctuations. *European Journal of Neurology*, 27, 105–113.
- Quintero, L. R., Razgado, L. F., Espadas, A., Reyna, P. E., Sierra, A., Anaya, V., et al., Pramipexole combined with non-viral transfection of BDNF recovers motor behavior in unilateral 6-OHDAlesioned rats. Program 676.072015 *Neuroscience Meeting Planner*. Chicago, I: SFN, (2015) Online.
- Rangel-Barajas, C., Silva, I., Lopéz-Santiago, L. M., Aceves, J., Erij, D., Florán, B. (2011). L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats is associated with up-regulation of adenylyl cyclase type V/VI and increased GABA release in the substantia nigra reticulata. *Neurobiology of Disease*, 41(1), 51–61.
- Rascol, O. (2000). The pharmacological therapeutic management of levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, 247(S2), II51-II57.
- Razgado-Hernández, L. F., Espadas-Álvarez, A. J., Reyna-Velázquez, P., Sierra-Sánchez, A., Anaya-Martínez, V., Jiménez-Estrada, I., Aceves-Ruiz, J. (2015). The transfection of BDNF to dopamine neurons potentiates the effect of dopamine D3 receptor agonist recovering the striatal innervation, dendritic spines and motor behavior in an aged rat model of Parkinson's disease. *PloS One*, 10(2).
- Richfiel, E. K., Penney, J. B., Young, A. (1989). Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 767–777.
- Rinaldi, A., Romeo, S., Agustín-Pavón, C., Oliverio, A., Mele, A. (2010). Distinct patterns of Fos immunoreactivity in striatum and hippocampus induced by different kinds of novelty in mice. *Neurobiology of Learn Memory*, 94: 373–381
- Robbins, T. W. (1992) Introduction: Milestones in dopamine research. *Seminars Neurosciences*, 4, 93-97.

- Rodríguez-Oroz, M. C., Gorospe, A., Guridi, J., Ramos, E., Linazasoro, G., Rodríguez-Palmero, M., Obeso, J. (2000). Bilateral deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Neurology*, (2000) 55, S45-S5155.
- Roedter, A., Winkler, C., Samii, M., Walter, G. F., Brandis, A., & Nikkhah, G. (2001). Comparison of unilateral and bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine-induced axon terminal lesions: evidence for interhemispheric functional coupling of the two nigrostriatal pathways. *The Journal of Comparative Neurology*, 432(2), 217–29.
- Soto-Rojas, L. O., Martínez-Dávila, I. A., Luna-Herrera, C., Gutierrez-Castillo, M. E., Lopez-Salas, F. E., Gatica-Garcia, B., Martinez-Fong, D. (2020). Unilateral intranigral administration of  $\beta$ -sitosterol  $\beta$ -D-glucoside triggers pathological  $\alpha$ -synuclein spreading and bilateral nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the rat. *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00933-6>.
- Rosales, M. G., Martínez-Fong, D., Morales, R., Núñez, A., Flores, G., B., Aceves, J. et al. (1997). Reciprocal interaction between glutamate and dopamine in the pars reticulata of the rat substantia nigra: A microdialysis study. *Neuroscience*, 80(3), 803–810. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00160-7).
- Ross, C. A., Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine*, 10, Suppl:S10-17.
- Rozas, G., Guerra, M. J., Labandeira-García, J. L. (1997). An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain research. Brain research protocols*, 2(1), 75–84.
- Rozas, G., Lopez-Martín, E., Guerra, M. J., Labandeira-García, J. L. (1998). The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. *Journal of Neuroscience methods*, 83:165-175.

- Ryoo, H. L., Pierrotti, D., Joyce, J. N. (1998). Dopamine D3 receptor is decreased and D2 receptor is elevated in the striatum of Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 13, 788-797.
- Sacchetti, P., Brownschidle, L. A., Granneman, J. G., Bannon, M. J. (1999). Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene. *Brain Research Molecular Brain Research*, 74, 167-174.
- Sachs, Charlotte., & Jonsson, G., (1975). Mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Biochemical Pharmacology*, 24, 1-8.
- Saitoh, K., Isa, T., & Takakusaki, K. (2004). Nigral GABAergic inhibition upon mesencephalic dopaminergic cell groups in rats. *European Journal of Neuroscience*, 19, 2399-2409.
- 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. *Neuroscience*, 59(2), 401-15.
- Sauer, H., Fischer, W., Nikkhah, G., Wiegand, S. J., Brundin, P., Lindsay, R. M., Bjorklund, A. (1993). Brain-derived neurotrophic factor enhances function rather than survival of intrastriatal dopamine cell-rich grafts. *Brain Research*, 626, 37-44.
- Sautel, F., Griffon, N., Lévesque, D., Pilon, C., Schwartz, J. C., Sokoloff, P. (1995). A functional test identifies dopamine agonists selective for D3 versus D2 receptors. *Neuroreport*, 329-332.
- Schapira, A. H. V., Bezard, E., Brotchie, J., Calon, F., Collingridge, G. L., Ferger, B., Davidai, G. (2006). Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(10), 845-54.

- Seroogy, K. B., Lundgren, K. H., Tran, T. M., Guthrie, K. M., Isackson, P. J., Gall, C. M. (1994). Dopaminergic neurons in rat ventral midbrain express brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs. *The Journal of comparative Neurology*, 342, 321-334.
- Shen, R. Y., Altar, C. A., Chiodo, L. A. (1994). Brain-derived neurotrophic factor increases the electrical activity of pars compacta dopamine neurons in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 8920-8924.
- Shin, J. Y., Park, H. J., Ahn, Y. H., Lee, P. H. (2009). Neuroprotective effect of L-dopa on dopaminergic neurons is comparable to Pramipexole in MPTP-treated animal model of Parkinson's disease: A direct comparison study. *Journal of Neurochemistry*, 111(4), 1042–1050.
- Sibley, D. R., Monsma, F. J., Jr, S. Y. (1993). Molecular Neurobiology of dopaminergic Receptors. *International review of Neurobiology*, 391–415.
- Siegel, G. J., Chauhan, N. B., Service, N., Hines, E., Hospital, V. A., Rm, F. (2000). Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Research Reviews*, 33, 199–227.
- Sil'kis, I. G. (2002). A possible mechanism for the dopamine-evoked synergistic disinhibition of thalamic neurons via the "direct" and "indirect" pathways in the basal ganglia. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 32, 205-212.
- Skaper, S. D. (2012). The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods in Molecular Biology*, 846, 1-12.
- Soderstrom, K. E., O'Malley, J. A., Levine, N. D., Sortwell, C. E., Collier, T. J., Steece-Collier, K. (2010). Impact of dendritic spine preservation in médium spiny neurons on dopamine graft efficacy and the expression of dyskinesias in parkinsonian rats. *European Journal of Neuroscience*, 31, 478–490.

- Sofic, E., Riederer, P., Heinsen, H., Beckmann, H., Reynolds, G. P., Hebenstreit, G., Youdim, M. B. (1988). Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *Journal of Neural Transmission*, 74, 199-205.
- Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M. P., Bouthenet, M. L., Schwartz, J. C. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature*, 347(6289), 146-151.
- Sokoloff, P., Guillin, O., Diaz, J., Carroll, P., Griffon, N. (2002). Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: implications for neurodevelopmental psychiatric disorders. *Neurotoxicity Research*, 4(7-8), 671-678.
- Solís, O., Limon, D. I., Flores-Hernández, J., Flores, G. (2007). Alterations in dendritic morphology of the prefrontal cortical and striatum neurons in the unilateral 6-OHDA-rat model of Parkinson's disease. *Synapse*, 61, 450-8.
- Stephens, B., Mueller, A. J., Shering, A. F., Hood, S. H., Taggart, P., Arbuthnott, G. W., Ingham, C. A. (2005). Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 132(3), 741-54.
- a) Takakusaki, K., Saitoh, K., Harada, H., & Kashiwayanagi, M. (2004). Role of basal ganglia-brainstem pathways in the control of motor behaviors. *Neuroscience Research*, 50(2), 137-51.
- b) Takakusaki, K., Oohinata-Sugimoto, J., Saitoh, K., & Habaguchi, T. (2004). Role of basal ganglia-brainstem systems in the control of postural muscle tone and locomotion. *Progress in Brain Research*, 143(3), 231-7.
- Takakusaki, K. (2008). Forebrain control of locomotor behaviors. *Brain research reviews*, 57:192-198.

- Tanaka, J., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G. C., Kasai, H. (2008). Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science*, *319*, 1683-1687.
- Tranzer, J. P., Thoenen, H. (1968). An electron microscopic study of selective, acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administration of 6-hydroxydopamine. *Experientia*, *24*, 155
- Ugrumov, M. V., Khaindrava, V. G., Kozina, E. A., Kucheryanu, V. G., Bocharov, E. V., Kryzhanovsky, G. N., Kudrin, V. S., Narkevich, V. B., Klodt, P. M., Rayevsky, K. S., Pronina, T. S. (2011). Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice. *Neuroscience*, *181*, 175-188.
- Ungerstedt, U. (1968). Central induced degeneration of monoamine neurons  
Intracerebral injection of 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central dopamine and noradrenaline neurons. Injection into the substantia nigra produce. *European Journal of Pharmacology*, *5*, 107–110.
- Ungerstedt, U. (1971). Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiology Scand. Suppl.*, *367*, 95–122.
- Uhl, G. R., Hedreen, J., Price, C., Donald, L. (1985). Parkinson's disease: Loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions.[Miscellaneous]. *Neurology*, *35* (8), 1215–8.
- Unsicker, K. (1994). Growth factors in Parkinson's disease. *Progress in growth factor research*, *5*, 73-87.
- Van Biesen, T., Hawes, B. E., Luttrell, D. K., Krueger, K. M., Touhara, K., Porfiri, E., Sakaue, M., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J. (1995). Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature*, *376*, 781–784.



- Van Den Berge, N., Ferreira, N., Gram, H., Mikkelsen, T. W., Alstrup, A. K. O., Casadei, N., Borghammer, P. (2019). Evidence for bidirectional and trans-synaptic parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats. *Acta Neuropathologica*, 138(4), 535–550. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02040-w>
- Van Kampen, J. M., & Eckman, C. B. (2006). Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26, 7272-7280.
- Van Kampen, J. M., Hagg, T., Robertson, H. A. (2004). Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D3 receptor stimulation. *The European Journal of Neuroscience*, 19, 2377-2387.
- Van Kampen, J. M., Robertson, H. A. (2005). A possible role for dopamine D3 receptor stimulation in the induction of neurogenesis in the adult rat substantia nigra. *Neuroscience*, 136, 381-386.
- Van Tol, H. H. M., Bunzow, J. R., Guan, H. C., Sunahara, P. S., Niznik, H. B., Civelli, O. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350, 610–614.
- Venero, J. L., Beck, K. D., Hefti, F. (1994). 6-Hydroxydopamine lesions reduce BDNF mRNA levels in adult rat brain substantia nigra. *Neuroreport*, 5, 429-432.
- Voorn, P., Vanderschuren, L. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., Pennartz, C. M. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, 27, 468-474.
- Wang, L., Muramatsu, S., Lu, Y., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Urano, F., Ichinose, H., Nagatsu, T., Nakano, I., Ozawa, K. (2002). Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral

neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Therapy*, 9, 381-389.

Wang, X. H., Lu, G., Hu, X., Tsang, K. S., Kwong, W. H., Wu, F. X., Meng, H. W., Jiang, S., Liu, S. W., Ng, H. K., Poon, W. S. (2012). Quantitative assessment of gait and neurochemical correlation in a classical murine model of Parkinson's disease. *BMC Neuroscience*, 13, 142.

Waters, N., Lagerkvist, S., Lofberg, L., Piercey, M. F., Carlsson, A. (1993). The dopamine D3 receptor and autoreceptor preferring antagonists (+)-A J76 and (+)-UH232; a micro-dialysis. *European Journal of Pharmacology*, 242, 151-163.

Waters, N., Svensson, K., Haadsma-Svensson, S. R., Smith, M. W., Carlsson, A. (1994). The dopamine D3-receptor: a postsynaptic receptor inhibitory on rat locomotor activity. *Journal of Neural Transmission, [GenSect]*, 94, 11-19.

Weintraub, D., Comella, CL., Horn, S. (2008). Parkinson's disease: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *American Journal of Managed Care*, S40-8.

Winn P. (1991) Excitotoxins as tools for producing brain lesion. En: Conn, P.M. Lesions and transplantation. *Methods in Neurosciences*. Vol. 7. Academic Press, Inc.

Yañez-Bana, R. M. (2004). The pathophysiological foundations of the psychiatric disorders in Parkinson's disease. *Revista de Neurología*, 39, 636-639.

Yuan, H., Sarre, S., Ebinger, G., Michotte, Y. (2005). Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *Journal of Neurosciences Methods*, 144, 35-45.

- Yurek, D. M., Lu, W., Hipkens, S., & Wiegand, S. J. (1996). BDNF enhances the functional reinnervation of the striatum by grafted fetal dopamine neurons. *Experimental neurology*, *137*(1), 105–118.
- Zaja-Milatovic, S., Milatovic, D., Schants, A. M., Zhang, J., Montine, K. S., Samii, A., Montine, T. J. (2005). Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson disease. *Journal of Neurology*, *64*, 545-7.
- Zapata, A., Kivell, B., Han, Y., Javitch, J. A., Bolan, E. A., Kuruguntla, D., Jaligam, V., Oz, M., Jayanthi, L. D., Samuvel, D. J., Ramamoorthy, S., Shippenberg, T. S. (2007). Regulation of dopamine transporter function and cell surface expression by D3 dopamine receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*, 35842-35854.
- Zhao, M. (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(13), 7925–7930. <https://doi.org/10.1073/pnas.1131955100>.
- Zheng, J., Shen, W. H., Lu, T. J., Zhou, Y., Chen, Q., Wang, Z., Xiong, Z. Q. (2008). Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(19), 13280–13288.
- Zhou, Q. Y., Palmiter, R. D. (1995). Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell*, *83*(7), 1197–1209.
- Zhou, J., Bradford, H. F., Stern, G. M. (1994). The stimulatory effect of brain-derived neurotrophic factor on dopaminergic phenotype expression of embryonic rat cortical neurons in vitro. *Brain research Developmental brain research*, *81*, 318-324.
- Zhou, J., Bradford, H. F., Stern, G. M. (1997). Influence of BDNF on the expression of the dopaminergic phenotype of tissue used for brain transplants. *Brain research Developmental brain research*, *100*, 43-51.

Zigmond, M. J., Stricker., E. (1989). Animal models of Parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications. *International Review of Neurobiology*, 31, 1–79.