



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Estudio del origen y características neuroquímicas de las poblaciones de
animales hemiparkinsonianos tratados con L-DOPA”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. Sacnite Albarrán Bravo

Para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de Tesis: Dr. Benjamín Florán Garduño

Ciudad de México

Junio, 2024

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México)
por la beca que me otorgó para realizar los estudios de Doctorado en el
Centro de Investigación y de Estudios avanzados del Instituto Politécnico
Nacional.**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Benjamín Floran por aceptarme en su laboratorio y darme la oportunidad de experimentar en el Laboratorio 4 de Neurociencias.

A su equipo de trabajo, auxiliares, técnicos de laboratorio por su apoyo diario en mi trabajo: Paco, Chelita y José Luis.

A mis sinodales Dr. Jorge Aceves, Dr. José Segovia, Dr. Hernán Cortes, Dr. Ismael Jiménez y al Dr. Ricardo Félix por todos los conocimientos impartidos y su constante asesoría en este trabajo.

DEDICATORIA

A mi familia, con mucho cariño por su apoyo incondicional y mostrarme que la de dedicación y compromiso siempre dan frutos.

Mi papá: Francisco Albarrán García

Mi mamá: Maricela Bravo Rojas

Hermanos: Tzitziki Albarrán Bravo, Xóchitl Albarrán Bravo y Francisco Albarrán Bravo

A mis sobrinos: Camila Monroy Albarrán, Ángel Jetzemaní Núñez Albarrán e Ian Said Núñez Albarrán. Los quiero con todo mi corazón♥♥♥

A mi tío Gregorio (Goyo) Albarrán García† que durante muchos años vivió con esta enfermedad y ahora ha trascendido.

Ya habíamos superado la ingenua etapa de creer que el sentido de la vida consiste en alcanzar un objetivo a través de la creación de algo valioso.

Víctor Frankl (El hombre en busca de sentido)

ÍNDICE	
ÍNDICE	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
I. INTRODUCCIÓN	14
1. ENFERMEDAD DE PARKINSON	14
1.1. Generalidades.....	14
1.2. Epidemiología	15
1.3. Etiología y Patogenia	16
1.4. Fisiopatología de la EP y los ganglios basales	28
1.5. La dopamina en los ganglios basales.....	32
1.6. Tratamiento de la Enfermedad de Parkinson y la L-DOPA	37
1.7. Discinesias inducidas por L-DOPA	38
II. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	40
2.1 Papel de los receptores dopaminérgicos D3 en la SNr y la modulación por la CaMKII.....	40
III. JUSTIFICACIÓN	42
IV. HIPÓTESIS.....	43
V. OBJETIVOS.....	44
5.1. Objetivo general.....	44
5.2. Objetivos particulares.....	44
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
6.1. Sujetos experimentales	45
6.2. Lesión unilateral con 6-hidroxi-dopamina	45
6.2.1. Prueba conductual (conducta de giro).....	45
6.3. Tratamiento con L-DOPA	46
6.3.1. Medición de discinesias inducidas por L-DOPA.....	46
6.4. Obtención de sinaptosomas.....	47
6.5. Formación de [3H]-AMPc en sinaptosomas	47
6.6. Determinación de proteínas por Western-Blot.....	48
6.7. Estudios de liberación de [3H]-GABA.....	49
6.8. qRT-PCR.....	51
VII. RESULTADOS.....	52

7.1. Generación de animales discinéticos y no discinéticos en el tratamiento con L-DOPA.....	52
7.2. Diferencias en la respuesta terapéutica a L-DOPA en animales con discinesias moderadas y severas.....	55
7.3. Cambios en la acumulación de [3H]AMPC por los D3R inducidos por la denervación en animales tratados con L-DOPA.	57
7.4. Cambios inducidos por la denervación en la liberación de [3H]-GABA estimulada por K ⁺ en animales tratados con L-DOPA.....	59
7.5. Regulación de la actividad de los receptores dopaminérgicos D1 y D3 por el sistema CaM-CaMKII en ratas tratadas con L-DOPA	61
VIII. DISCUSIÓN	67
8.1. Poblaciones con discinesias inducidas por L-DOPA (LID) obtenidas de ratas con el mismo grado de lesión.....	67
8.2. Discinesias inducidas por L-DOPA (LID) y respuesta terapéutica a L-DOPA.....	68
8.3. Los cambios en la formación de AMPc determinan las discinesias inducidas por L-DOPA (LID)	69
8.4. Cambios del D3R y discinesias inducidas por L-DOPA (LID).....	70
8.5. Modulación por CaMKII.....	71
IX. CONCLUSIONES	74
X. BIBLIOGRAFÍA	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etiología de la enfermedad de Parkinson.....	17
Figura 2. Alelos de riesgo en la EP	19
Figura 3. Heterogeneidad alélica de α -sinucleína (SNCA)	19
Figura 4. Factores ambientales que afectan la homeostasis del sistema inmunológico e incrementan el riesgo de la EP idiopática	23
Figura 5. Reacción de Fenton Haber-Weiss.....	24
Figura 6. Cuerpos de Lewy y reducción de neuromelanina.....	26
Figura 7. Circuito de los ganglios basales.....	30
Figura 8. Vía directa e indirecta de los ganglios basales.....	31
Figura 9. La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico.....	33
Figura 10. Vías de señalización de los receptores dopaminérgicos de la familia D1 y D2	35
Figura 11. Limitaciones del modelo clásico de los ganglios basales	37
Figura 12. Ratas lesionadas con 6-OHDA con discinesias bajas y ratas discinéticas altas durante el tratamiento con L-DOPA.....	54
Figura 13. Respuesta terapéutica a la L-DOPA determinada por el índice de asimetría de la extremidad y el puntaje de AIMS en animales discinéticos leves severos.....	56
Figura 14. Cambios en la acumulación de AMPc en la SNr de animales que desarrollaron discinesia leve o severa durante el tratamiento con L-DOPA	58
Figura 15. Efectos de la activación de D3R en la estimulación de D1R en la liberación de [3H]-GABA inducida por despolarización con K ⁺ en cortes de SNr.....	60
Figura 16. Efectos de la activación de D3R en la estimulación de D1R en la liberación de [3H]-GABA inducida por despolarización con K ⁺ en cortes de SNr.....	62
Figura 17. Fosforilación de CaMKII α en sinaptosomas de la SNr en condiciones basales y con alto K ⁺ en sinaptosomas de SNr provenientes de ratas discinéticas y no discinéticas tratadas con L-DOPA	63
Figura 18. Cambios en la expresión de la CaM en sinaptosomas de SNr, provenientes de ratas hemiparkinsonicas tratadas con L-DOPA con discinesia moderada y severa	64
Figura 19. Efecto de la denervación y el tratamiento con L-DOPA en la expresión del ARNm de CaM en rebanadas de estriado.....	65

ABREVIATURAS

AADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
[³ H]-AMPc	Adenosín monofosfato cíclico tritiado
ATP	Adenosín trifosfato
CaMKII	Cinasa dependiente de calcio calmodulina II
COMT	Catecol –O – metiltransferasa
DA	Dopamina
D1R	Receptor dopaminérgico D1
D2R	Receptor dopaminérgico D2
D3R	Receptor dopaminérgico D3
D4R	Receptor dopaminérgico D4
D5R	Receptor dopaminérgico D5
D3nf	Isoforma trunca del D3R no funcional
EP	Enfermedad de Parkinson
GABA	Ácido γ aminobutírico
[³ H]-GABA	Ácido γ aminobutírico tritiado
GB	Ganglios Basales
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GPe	Globo Pálido Externo
GPi	Globo Pálido Interno
i.p.	Intraperitoneal
L-DOPA	Levodopa, L-3,4 dihidroxifenilalanina
MAO	Monoamino oxidasa
ml	Mililitros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
ns	No significativo
NST	Núcleo subtalámico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RTq-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real

SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SNc	Sustancia Nigra Compacta
SNr	Sustancia Nigra Reticulada
SPNs	Neuronas Espinosas de Proyección
TH	Tirosina Hidroxilasa
6-OHDA	6-hidroxidopamina
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
°C	Grados Centígrados

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer y se debe a la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNpc) del mesencéfalo. El resultado de dicha neurodegeneración es la denervación dopaminérgica de las proyecciones de la SNpc hacia el núcleo estriado, lo que causa una alteración en la fisiología normal de los ganglios basales (GB) que origina las principales manifestaciones de la enfermedad.

La EP se caracteriza clínicamente por la presencia de la tríada motora: acinesia o lentitud de movimientos, temblor de reposo e inestabilidad postural y rigidez y por ello ha sido clásicamente considerada y estudiada como un trastorno motor. No existe tratamiento curativo, sin embargo, se dispone de una variedad de tratamientos terapéuticos que permiten un buen control sintomático en cada fase de progresión de la enfermedad. A la fecha, el tratamiento más eficaz es la administración de levodopa (L-DOPA) para aumentar el tono dopaminérgico, activar los receptores dopaminérgicos y de esta manera recuperar el control del movimiento. Este tratamiento produce efectos que varían ampliamente entre los pacientes, desde efectos puramente terapéuticos hasta la aparición de complicaciones derivadas de su uso crónico como lo es la inducción de movimientos incapacitantes y anormales denominados discinesias inducidas por L-DOPA. Tanto los efectos terapéuticos como las discinesias se han mostrado en modelos animales en grados diferentes. En estos modelos y en los pacientes, se sugiere que el grado de lesión dopaminérgica, determina las diferencias terapéuticas. En este proyecto reproducimos un modelo de Parkinson experimental mediante la inyección unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en el haz medial del prosencéfalo (MFB) y seleccionamos los animales con más del 90% de depleción de dopamina. El análisis poblacional mostró que el total de animales se podían agrupar en una sola población. Cuando esta población de animales fue tratada con L-DOPA se produjo una separación de individuos en dos subpoblaciones, una con discinesias moderadas y otra con discinesias severas, a pesar de tener el mismo grado de depleción dopaminérgica, estas dos nuevas poblaciones también presentan diferentes respuestas terapéuticas a la L-DOPA. Finalmente, se estudió si la gravedad de las discinesias inducida por L-DOPA (LID) se correlacionaba con cambios en la señalización del receptor dopaminérgico D3, el cual se asocia con la discinesia. Los resultados indican que el tratamiento con L-DOPA normalizó los cambios inducidos por la denervación de estos receptores dopaminérgicos solo en animales con discinesia

moderada, mientras que se mantuvieron y potenciaron en la discinesia severa, lo mismo ocurre con la regulación del receptor D3 por el sistema calcio calmodulina cinasa II (CaM-CaMKII). Estos datos sugieren que el desarrollo de discinesias ante el tratamiento con L-DOPA sea debida a condiciones inherentes a los individuos y que impactan a los marcadores de discinesia, como es el caso de la funcionalidad del receptor dopaminérgico D3.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease, and it is due to the progressive death of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNPc) in the midbrain. The result of this neurodegeneration is the denervation of the projections of the SNPc through the striated nucleus, conditioning the alteration in the normal physiology of basal ganglia and producing the principal manifestations of the disease.

PD is clinically characterized by the presence of motor triad akinesia or slowness in movement, tremor at rest, postural instability, and rigidity. Due to this, it is classically considered and studied as a motor disorder. There is no curative treatment. However, a variety of therapeutic treatments lead to symptomatic control in each stage of the disease. To date, the most effective treatment is the administration of levodopa (L-DOPA) to increase dopaminergic tone, activate dopamine receptors, and thus regain control of movement. This treatment produces effects that vary widely between patients, from purely therapeutic effects to the induction of disabling and abnormal movements called L-DOPA induced dyskinesias due to chronic use. Both therapeutic effects and dyskinesias have been shown in animal models to varying degrees. In these models and in patients, it is suggested that differences in the degree of dopaminergic injury determine therapeutic differences. In this project, we reproduce an experimental Parkinson's model by unilateral injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the medial forebrain bundle (MFB) and select animals with more than 90% dopamine depletion. Population analysis showed that they could all be grouped into a single population. When the animals were treated with L-DOPA, there was the separation of individuals into two subpopulations, one with moderate dyskinesias and the other with severe dyskinesias; despite having the same degree of dopaminergic depletion. Also, these two new populations present different therapeutic responses to L-DOPA. Finally, it was studied whether the severity of L-DOPA induced dyskinesias (LID) correlated with changes in D3 dopaminergic receptor signaling related to dyskinesia. We found that treatment with L-DOPA normalized the changes induced by the denervation of these receptors only in animals with moderate dyskinesia, while they were maintained and potentiated in severe dyskinesia. The same goes for the regulation of the D3 receptor by the calcium calmodulin kinase (CaM-CaMKII) system. These data suggest that the development of dyskinesia by treatment with L-DOPA is due to conditions inherent to individuals that affect markers of dyskinesia, such as the functionality of the dopaminergic D3 receptor.

I. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.1. Generalidades

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo y progresivo del sistema nervioso central, provocado por la muerte de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de la Sustancia Negra parte compacta (SNc), lo que conlleva a una disminución en los niveles de dopamina (DA) en los ganglios basales (Obeso et al., 2000; Poewe et al., 2017). La enfermedad de Parkinson fue descrita inicialmente en el ensayo el médico inglés James Parkinson en 1817 (Parkinson, 1817), donde la llamó “Parálisis agitante” y en el que escribió:

“Movimientos temblorosos involuntarios con una disminución de la fuerza muscular, en zonas que no están en actividad e incluso cuando se les ayuda, con propensión a inclinar el tronco hacia adelante y a pasar de la marcha a la carrera, mientras que los sentidos y el intelecto permanecen inalterados”.

La EP se caracteriza clínicamente por su inicio focal, afectando principalmente una extremidad, presentando temblor en reposo, lentitud en la realización de actividades manuales, tales como escribir; arrastrar una pierna al andar y, con menor frecuencia, disminución de la expresión facial, hipofonía, disartria, espasmos distónicos de una extremidad, síntomas sensitivos como dolor o parestesias en un miembro o trastornos del estado de ánimo. El proceso neurodegenerativo que caracteriza a la enfermedad de Parkinson progresa lentamente (Dickson, 2018). En la EP no hay una correlación conocida con una etiología específica, por lo que se define como idiopática. Algunos otros padecimientos que presentan sintomatología parecida y de los que debe hacerse diagnóstico diferencial, quedan englobados dentro del Síndrome de Parkinson o parkinsonismo (Fahn, 2003), tal es el caso del parkinsonismo de etiología conocida como lo son: el Parkinson inducido por drogas, el Parkinson postencefalitis, el Parkinson de origen tóxico; así como también el pseudoparkinsonismo del temblor (Titova et al., 2017). También es importante reconocer los términos como el de Enfermedad de Parkinson familiar que engloba a los casos de la enfermedad asociada claramente a una mutación genética (Ye et al., 2023).

Un aspecto fundamental para la perspectiva terapéutica de la EP consiste en elucidar las causas y mecanismos implicados en el origen de la pérdida selectiva y focal de neuronas dopaminérgicas en la SNc. Su etiología es desconocida y probablemente multifactorial. Pueden estar implicados factores genéticos, ambientales, daño oxidativo y envejecimiento acelerado y apoptosis (Stayte & Vissel, 2014).

1.2. Epidemiología

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo multisistémico y multisintomático, para el que actualmente no se dispone de medidas curativas o preventivas. A medida que la población ha cambiado para incluir una mayor proporción de adultos mayores, las cargas económicas y de salud pública de las enfermedades neurodegenerativas asociadas con la edad han aumentado, con un costo económico estimado de 52 mil millones de dólares por año solo en los Estados Unidos de América (Yang et al., 2020). La EP es el segundo trastorno neurodegenerativo más común después de la enfermedad de Alzheimer (De Lau & Breteler, 2006) y, de hecho, el mayor factor de riesgo individual para la EP es la edad avanzada (Reeve et al., 2014). En estimaciones basadas en el uso de la atención médica, la incidencia de la enfermedad de Parkinson varía de 5 a más de 35 en 100,000 casos nuevos cada año (Twelves et al., 2003). La incidencia aumenta de 5 a 10 veces desde la sexta hasta la novena década de vida. La prevalencia de la EP también aumenta con la edad, en un metaanálisis de 4 poblaciones de América del Norte, la prevalencia aumentó de menos del 1% de hombres y mujeres de 45 a 54 años a 4 y 2% de hombres y mujeres de 85 años o más, respectivamente. En Estados Unidos se calcula que esta enfermedad la padecen un millón de habitantes, uno de cada 100 mayores de 60 años y sólo del 5 al 10% de los diagnosticados la desarrollan antes de los 40 años (Marras et al., 2018). El número de casos se ha ido incrementando conforme transcurren los años, de modo que para 2022 los datos de cohorte arrojaron 6.7 millones de adultos de 45 años o más y 9.3 millones de 65 años o más (Willis et al., 2022). Las estimaciones de la incidencia de la EP ajustada por edad y sexo variaron de 108 a 212 por 100,000 entre personas de 65 años o más, y de 47 a 77 por 100,000 entre personas de 45 años o más. La incidencia de la EP aumenta con la edad y es mayor en hombres. Para personas mayores de 65 años osciló entre 108 y 212 casos por cada 100,000 individuos, mientras que, con base en el sexo, se encontró

entre 162 y 277 para los hombres y de 66 a 161 casos en mujeres por cada 100,000 individuos (Willis et al., 2022).

En México, al igual que a nivel mundial, se ha reportado que la incidencia de la EP aumenta con la edad y es más frecuente en hombres (Rodríguez-Violante et al., 2019). La frecuencia reportada en centros del tercer nivel de atención sugiere una incidencia de 50 por cada 100,000 habitantes, como es el caso del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. La tasa de prevalencia se incrementa hasta los 80 años. La enfermedad ocupa el lugar 18 como causa de mortalidad en personas de más de 65 años (Ramírez-Jirano et al., 2007). Es muy probable que, con el aumento en la expectativa de vida de la población, la incidencia de la EP aumente. En el transcurso del año 2014 al 2018, se observó un incremento exponencial en la incidencia después de los 60 años de edad, donde la incidencia anual fue de 3.5 en adultos menores de 60 años, de 26.9 en aquéllos entre 60 y 64 años, y de 65.9 por 100 000 habitantes en mayores de 65 años (Martínez-Ramírez et al., 2020). Los factores de riesgo que se han asociado directamente con el aumento en los casos de la EP desde el punto de vista epidemiológico son la edad, la predisposición genética y la exposición a tóxicos, mientras que otros factores requieren más estudios para ser adecuadamente validados (Simon et al., 2020).

1.3. Etiología y Patogenia

La causa de la EP es aún desconocida. De acuerdo con las hipótesis etiopatogénicas, la muerte de las neuronas dopaminérgicas en grados variables que van desde un 60 a 85 %, es la consecuencia final de un proceso degenerativo progresivo iniciado años antes y que culmina con la aparición de la sintomatología. La EP es una condición neurodegenerativa que tradicionalmente ha sido reconocida clínicamente por un fenotipo motor distintivo (parkinsonismo) y patológicamente por la presencia de cuerpos de Lewy y pérdida neuronal de la sustancia negra. Sin embargo, muchos de los principios centrales que clásicamente han definido el trastorno han sido cuestionados recientemente (Ye et al., 2023). Actualmente, el concepto “idiopático” para la enfermedad de Parkinson como entidad única ha cambiado, puesto que se han identificado varios subtipos clínicos, genes patogénicos y agentes ambientales causales putativos. Además de los síntomas motores clásicos, las manifestaciones no motoras (como el trastorno del sueño con movimientos

oculares rápidos, anosmia, estreñimiento y depresión) aparecen en la etapa prodrómica/premotora y evolucionan, junto con el deterioro cognitivo y la disautonomía, a medida que la enfermedad progresa, representando los estadios avanzados de la enfermedad (Jankovic & Tan, 2020).

El proceso degenerativo ocurre en las neuronas de la sustancia negra compacta de manera selectiva, sin embargo, los factores inherentes a este grupo de neuronas causantes de su muerte se desconocen (Costa et al., 2023). Al respecto, factores genéticos (Dawson & Dawson, 2003) y ambientales (Paolini et al., 2004) podrían dar luz sobre lo que eventualmente podría ser la causa de la enfermedad (Delamarre & Meissner, 2017). Se ha debatido la contribución relativa de los genes y los factores ambientales/estilo de vida en la patogénesis de la EP (Figura 1). Con una mediana de edad de inicio de 60 años, la edad es el factor de riesgo más importante para la enfermedad de Parkinson (Ascherio & Schwarzschild, 2016).

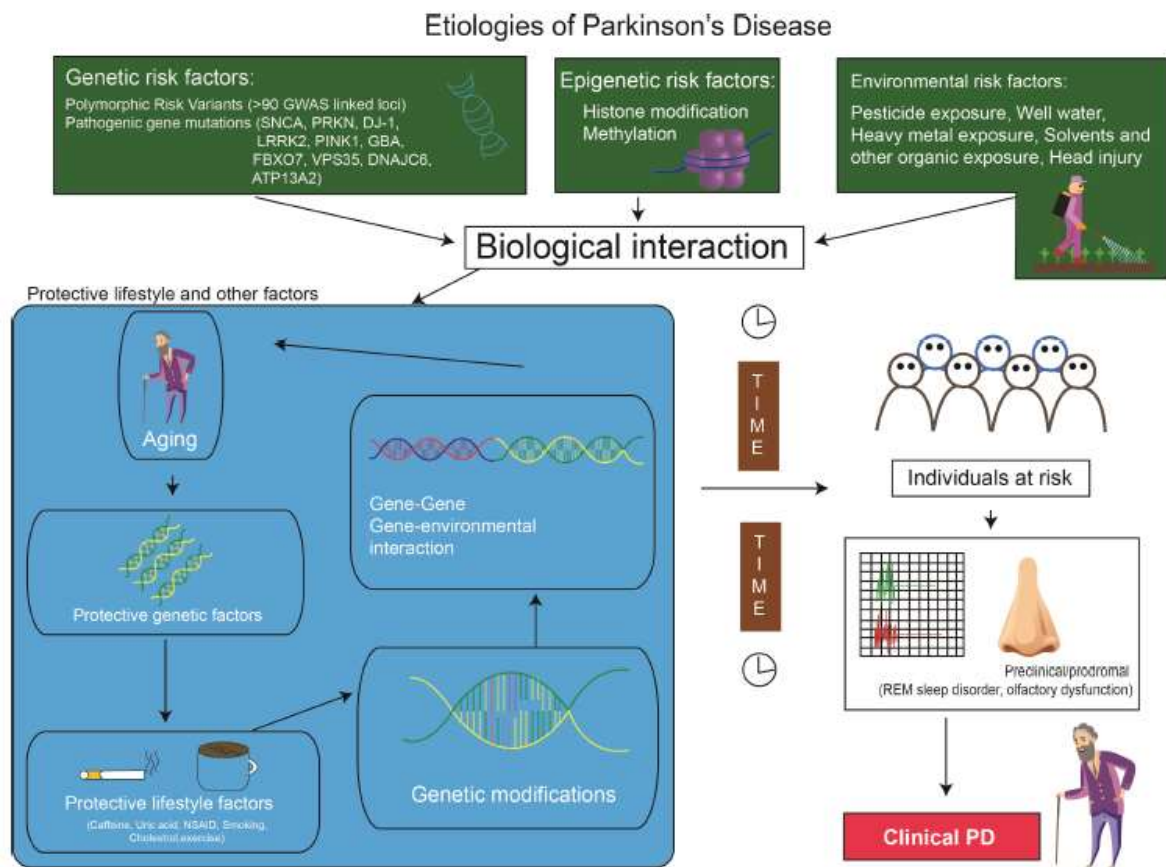


Figura 1. Etiología de la enfermedad de Parkinson

Se muestra la integración de los principales factores de riesgo epigenéticos, genéticos y ambientales, así como la interacción biológica que se puede dar entre estos (Ascherio & Schwarzschild, 2016).

1.3.1. Factores genéticos

El riesgo genético en la EP fue controvertido hasta hace relativamente poco tiempo, y los antecedentes familiares positivos, incluso se consideraron excluyentes en los criterios diagnósticos anteriores. Sin embargo, a partir del descubrimiento de las mutaciones en el gen de la α -sinucleína (*SNCA*) (Polymeropoulos et al., 1997), aproximadamente 100 genes o *locis* distintos se han relacionado con la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad de Parkinson (Blauwendraat et al., 2020). Aproximadamente entre el 15 y 25% de los pacientes con EP informan antecedentes de otros miembros de la familia afectados, y los resultados de varios meta-análisis recientes, sugieren un aumento de cuatro veces más riesgo de padecer la EP entre dichos individuos (Noyce et al., 2012). Además, varios estudios de cohorte realizados en todo el genoma han permitido estimar entre el 16 y 36% de los casos heredables de la enfermedad de Parkinson. Las estimaciones del incremento a 99,000 casos seguirán revelando información adicional sobre la genética de esta enfermedad.

Aunque estas variantes de riesgo tengan efectos pequeños o sean bastante raras, ayudarán a ampliar el conocimiento de los genes y las vías que impulsan el riesgo de la enfermedad de Parkinson (Nalls et al., 2019). Esto es la base de dos formas de parkinsonismo, uno hereditario o familiar y otro esporádico, en donde el factor genético es particularmente importante en casos de pacientes jóvenes y determinante en las formas familiares. La manifestación de la enfermedad de Parkinson familiar versus no familiar depende de la penetración alélica, la edad y la presencia de modificadores genéticos y ambientales (Figura 2).

La EP familiar, también conocida comúnmente como EP mendeliana o monogénica, se reconoce generalmente cuando las variantes raras de alta penetración influyen en el riesgo de la enfermedad (Jia et al., 2022). Existen tanto formas autosómicas dominantes (*SNCA*^{A53T}, *VPS35*^{D620N}) como autosómicas recesivas (*PRKN* y *PINK1*). Por otro lado, las variantes genéticas comunes con efectos de baja penetración se asocian más frecuentemente a la EP esporádica, y tales variantes se han descubierto en gran medida a través de estudios de asociación del genoma completo (Genome-wide association studies; GWAS) (Blauwendraat et al., 2020).

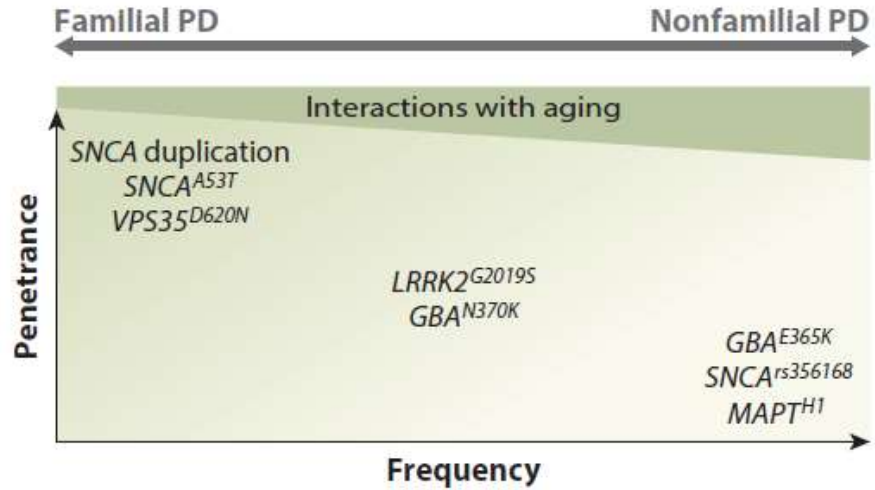


Figura 2. Alelos de riesgo en la EP

Los alelos tienen un amplio espectro de frecuencias y tamaños de efecto (penetrancia genética). Muchos alelos de riesgo de la EP también muestran penetrancia dependiente de la edad. La manifestación de la enfermedad de Parkinson familiar versus no familiar depende de la penetración alélica, la edad y la presencia de modificadores genéticos y ambientales. Tomado de Ye et al., 2022.

Sin embargo, existen mecanismos genéticos y biológicos compartidos que no se pueden clasificar de manera independiente, por ejemplo, las variantes genéticas raras y comunes tales como la *SNCA*^{A53T} están asociadas con el riesgo de EP, lo que proporciona un ejemplo importante de heterogeneidad alélica (Figura 3).

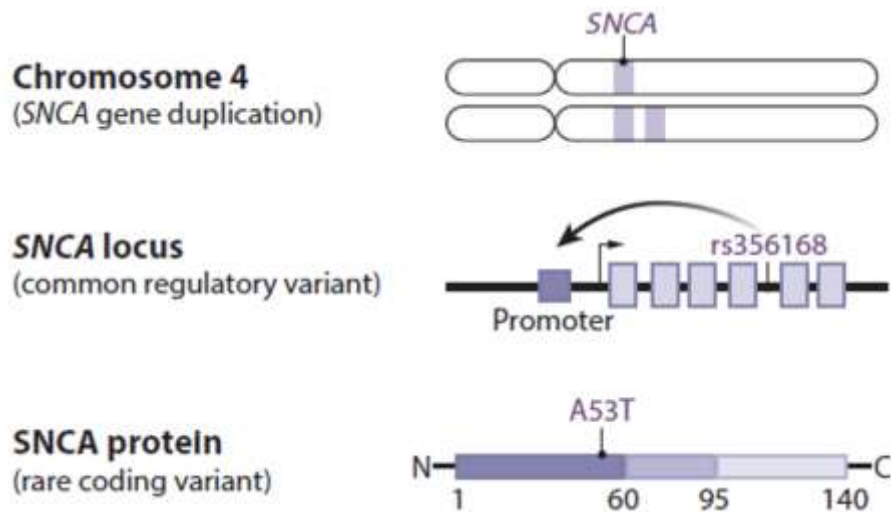


Figura 3. Heterogeneidad alélica de α -sinucleína (SNCA)

Las variantes del número de copias correspondientes a la duplicación del gen *SNCA* en el cromosoma 4, las variantes comunes en el *locus SNCA* (rs356168) y las variantes raras que codifican la proteína α -sinucleína (A53T) están asociadas con el riesgo de padecer la EP.

Las variantes en las regiones que codifican la proteína α -sinucleína (A53T, A30P, E46K), causan la EP familiar autosómica dominante, caracterizada por un inicio joven de la enfermedad y progresión más rápida (Trinh et al., 2018).

Se conocen mutaciones en 8 diferentes *locus* cromosómicos denominados *PARK1* a *PARK8*, los cuales contienen los genes de las proteínas α -sinucleína y parkina, que representan los genes más estudiados (Nussbaum & Ellis, 2003). Además, se han relacionado otros *locus* que predisponen al desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Farrer et al., 1999) (Funayama et al., 2002) autosómica dominante como el que contiene el gen de la ubiquitina hidrolasa, y autosómica recesiva como el gen Dj-1 (Bonifati et al., 2003) (Tabla 1).

Table 1. Mutations in Single Genes That Lead to Parkinson's Disease.				
Locus	Gene	Location	Mode of Inheritance	Where Found
PARK1	α -Synuclein	4q21	Autosomal dominant	Greece, Italy, and Germany
PARK2	Parkin	6q25–27	Autosomal recessive; may also be autosomal dominant	Ubiquitous
PARK3	Unknown	2p13	Autosomal dominant	Germany
PARK4	Unknown	4p15	Autosomal dominant	United States
PARK5	Ubiquitin C-terminal hydrolase	4p14	May be autosomal dominant	Germany
PARK6	Unknown	1p35	Autosomal recessive	Italy
PARK7	DJ-1	1p36	Autosomal recessive	Netherlands
PARK8	Unknown	12p11.2–q13.1	Autosomal dominant	Japan

Tabla 1.- Mutaciones en el gen *PARK* que conducen al desarrollo de la EP.

El análisis genético de las formas esporádicas más comunes de la enfermedad de Parkinson sugiere que hay un componente heredable en rasgos autosómicos dominantes o recesivos (Bonifati et al., 2003).

La α -sinucleína es una proteína de localización presináptica, codificada en el cromosoma 4q21.3-q22 y que se asocia al Parkinson familiar autosómico dominante. Esta proteína es el principal componente de los cuerpos de Lewy, un hallazgo frecuentemente observado *post-mortem* (Polymeropoulos et al., 1997). La formación de agregados de esta proteína cuando presenta mutaciones, parece ser el primer paso del proceso, lo cual conlleva a la pérdida de su función normal y a su acumulación. La α -sinucleína es una proteína que regula la función de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima de la vía sintética de la dopamina, a la cual se une e inhibe la tasa de síntesis del neurotransmisor. En caso de mutación y/o acumulación, un exceso en la síntesis de dopamina provocaría efectos citotóxicos indeseables (Perez & Hastings, 2004). La misma proteína ha sido involucrada en el transporte de dopamina (Sidhu et al., 2004) y su almacenamiento vesicular (Lotharius & Brundin, 2002), de tal manera que una alteración de estos procesos por causa de la mutación es capaz de inducir la acumulación de dopamina y sus metabolitos en el citoplasma de la neurona. La dopamina (DA) y sus metabolitos son capaces de generar especies reactivas de oxígeno (ROS), que provocan estrés oxidativo y neurotoxicidad. Modelos experimentales de la EP en los que se induce sobreexpresión y/o mutación de la α -sinucleína, apoyan este mecanismo etiopatogénico (Maries et al., 2003). Recientemente se ha sugerido también que su acumulación produce daño mitocondrial (Beal, 2003).

Otro tipo de evidencias del origen genético de la EP provienen de los hallazgos relacionados con una mutación en el gen de la parkina (6q25-27) y el Parkinson juvenil autonómico recesivo (Abbas et al., 1999). En este tipo de la enfermedad de Parkinson no se presenta la formación de cuerpos de Lewy. La parkina es una ligasa de ubiquitina, la cual, es una proteína encargada de dar la señal para degradación proteica mediada por el sistema del proteosoma. Esto hace pensar que la acumulación de algunas proteínas probablemente causa disfunción de las neuronas dopaminérgicas a nivel presináptico, incrementa los niveles de dopamina y sus metabolitos, así como sus efectos neurotóxicos y degeneración (Imai & Takahashi, 2004). Por otro lado, también se ha detectado una mutación del genoma mitocondrial, con un defecto del complejo I, generando fallas en la acción detoxificadora de los radicales libres. Esto indica, por un lado, un patrón materno en la herencia de la EP y, por otro, una susceptibilidad a toxinas, estrés oxidativo y excitotoxicidad de las neuronas dopaminérgicas (Olanow & Tatton, 1999).

1.3.2. Factores ambientales

Se han involucrado a diversos factores de riesgo en el desarrollo de la EP, incluidos la exposición a pesticidas, metales pesados, la vida rural, la ocupación agrícola, y alguna lesión traumática en la cabeza, entre otros (Ascherio & Schwarzschild, 2016). Algunos factores ambientales, principalmente pesticidas y metales pesados, pueden aumentar el riesgo de EP, modificando y alterando la integridad y expresión de genes de riesgo. En este sentido, se cree que los factores genéticos y ambientales actúan de manera sinérgica en la patogénesis de la EP (Kline et al., 2021). Varios de los genes asociados con el riesgo en la EP, están asociados con el sistema inmunológico. La activación de la respuesta inmune periférica, así como la neuroinflamación en el cerebro, están relacionadas con la EP idiopática y se cree que contribuyen a la neuropatología y, en última instancia, a la neurodegeneración (Hirsch & Standaert, 2021).

Los estímulos para la activación de la respuesta inmune periférica pueden incluir productos químicos, virus y bacterias. Los factores ambientales pueden alterar la regulación del sistema inmune mediante un proceso denominado mimetismo molecular, alterando la función de las células inmunitarias o causando daño tisular directo que libera patrones moleculares asociados al daño, conocidos como DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns), que luego son reconocidos por los receptores dopaminérgicos de reconocimiento de patrones de células inmunitarias (Figura 4).

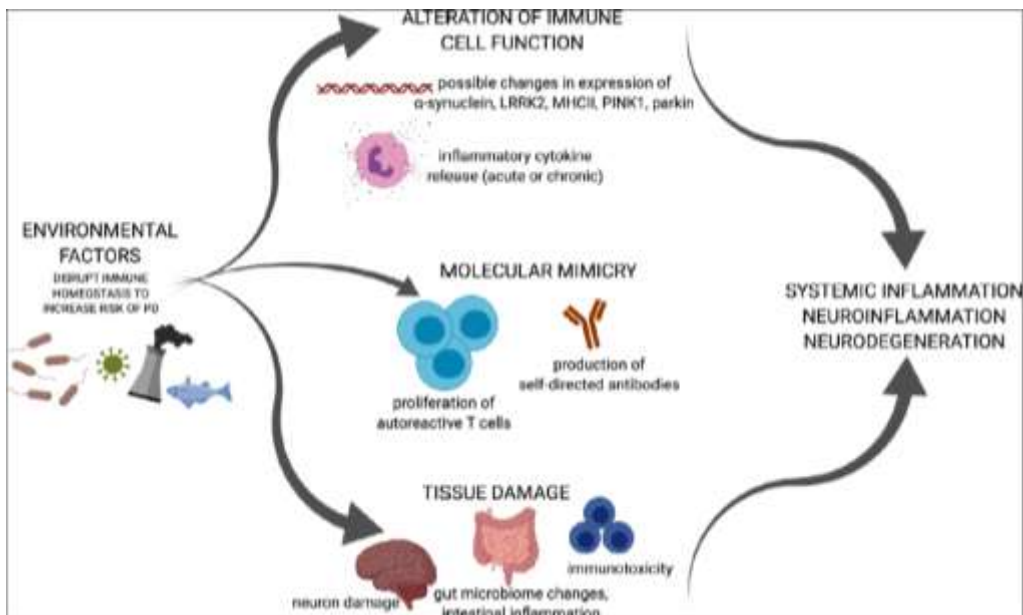


Figura 4. Factores ambientales que afectan la homeostasis del sistema inmunológico e incrementan el riesgo de la EP idiopática

Las infecciones y los pesticidas son ejemplos de factores ambientales que pueden influir en la función del sistema inmunológico, alterando la expresión génica de las células inmunes y la liberación de citocinas, lo que podría promover la patogénesis de la EP idiopática o dañar directamente los tejidos (Kline et al., 2021).

La idea de que factores ambientales representan una variable importante en la etiología de la EP se apoya en estudios sobre el efecto de toxinas como el MPTP (1,2,3,6-métil-fénil-tetrahidropiridina). Esta droga es un subproducto resultado de la síntesis ilegal de la heroína. Al ser administrada produce un síndrome clínico igual a la EP en animales de experimentación. El MPTP es incorporado por los astrocitos y convertido a su derivado ionizado el MPP⁺, en una reacción catalizada por la monoamino oxidasa B (MAO-B). Posteriormente, es capturado por las neuronas dopaminérgicas causando un desacople del complejo I en la cadena respiratoria mitocondrial y la muerte neuronal por falta de formación de ATP (Orth & Schapira, 2002).

Cualquier factor ambiental que se quiera relacionar con la EP parece llevar a falla mitocondrial (Di Filippo et al., 2006). Las neurotoxinas en el cerebro pueden provocar estrés oxidativo y alteración de la neurotransmisión afectando la función de los ganglios basales (Caudle et al., 2012). La generación de especies reactivas de oxígeno ocurre cuando se producen radicales libres de hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno bajo la

reacción de Fenton-Haber-Weiss (Hellman & Gitlin, 2002) (Figura 5). Esta reacción puede provocar estrés oxidativo y neurotoxicidad (Bhat et al., 2015), causando daño a numerosos aspectos de la célula principalmente a las mitocondrias. Al igual que el hierro, el cobre contribuye al estrés oxidativo, sin embargo, el cobre tiene dos modos de acción; la reacción de Fenton-Haber-Weiss (Paris et al., 2009) y el ciclo redox de la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Cruces-Sande et al., 2017). La acumulación de cobre en el cerebro ocasiona la reducción química de la dopamina, la agregación de α -sinucleína y la reducción del factor protector para la supervivencia neuronal; la superóxido dismutasa 1 (Yu et al., 2008). Así, la misma dopamina y sus metabolitos conducen a la formación de peróxido de hidrógeno. También ha sido encontrada una acumulación anormal de hierro en pacientes con EP, mismo que reaccionaría con el peróxido de hidrógeno, permitiendo la acumulación de los radicales libres (Olanow & Tatton, 1999).

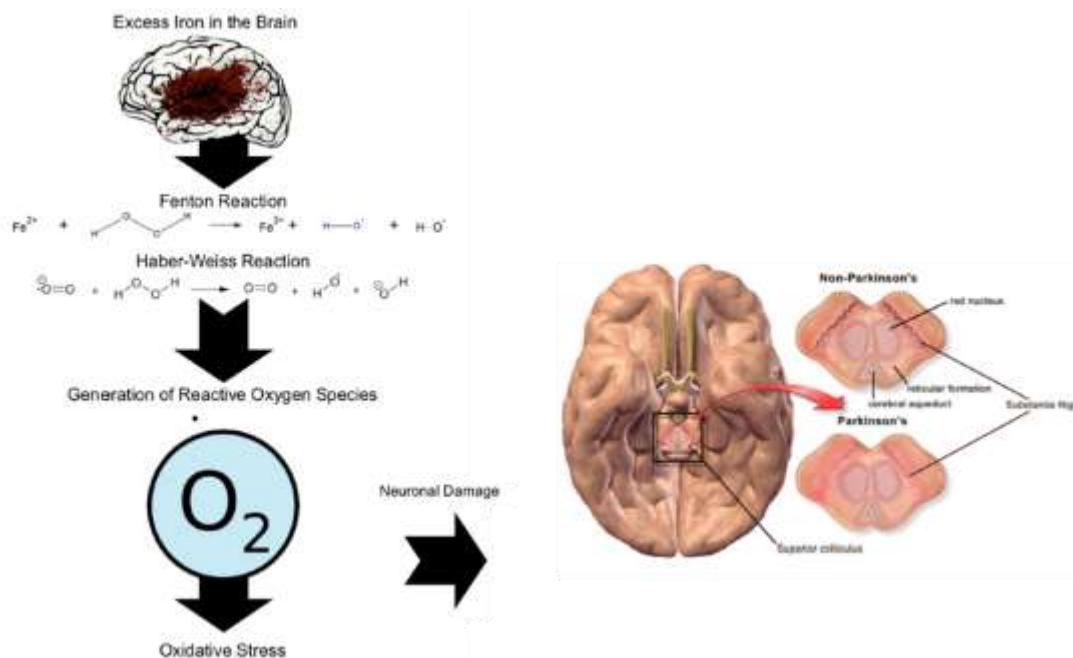


Figura 5. Reacción de Fenton Haber-Weiss

La presencia de Fe^{2+} en el cerebro genera especies reactivas de oxígeno que conducen al daño neuronal, mediante el radical anión superóxido. (Tomado de Ball et al., 2019)

La susceptibilidad neuronal debida a estos factores puede estar relacionada con la expresión de altos niveles de transportadores de DA (DAT), a través de los cuales, los

tóxicos podrían ingresar a las neuronas (Uhl, 1998). Recientemente se ha sugerido que el estrés oxidativo podría también desencadenar el proceso apoptótico, ya que se ha mostrado que la sobreexpresión inducida de moléculas anti-apoptóticas confiere resistencia a la muerte de neuronas dopaminérgicas en situaciones experimentales en las que se exponen a tóxicos (Offen et al., 1998). El envejecimiento prematuro puede estar relacionado con una pérdida de los mecanismos antioxidativos protectores, incluyendo aquellos relacionados al sistema inmune, teniendo en cuenta que la edad es el principal factor de riesgo para enfermedades neurodegenerativas, el envejecimiento del sistema inmunológico es un factor clave y poco estudiado en el campo de la neurodegeneración (Tansey et al., 2022) y en la *EP* estos mecanismos de protección se pierden de manera acelerada (Mehler & Gokhan, 2001).

Tanto los factores genéticos como los ambientales podrían conducir al desarrollo de la *EP* y ambos parecen converger en el estrés oxidativo (Ball et al., 2019) (Olanow & Tatton, 1999). Las evidencias experimentales sugieren que la causa de la *EP* es la combinación de factores en un mosaico multifactorial que determina el inicio del proceso neurodegenerativo irreversible (Lozano et al., 1998), por tres vías posibles: estrés oxidativo, apoptosis y crisis energética (Bhat et al., 2015).

Hay dos características histopatológicas principales en la *EP* en las neuronas dopaminérgicas en degeneración: la aparición de cuerpos de Lewy y la reducción de neuromelanina en la sustancia negra parte compacta (Figura 6). Los oligómeros fibrilares de α -sinucleína producidos por el mal plegamiento de la proteína son el principal componente de los cuerpos de Lewy, los cuales son neurotóxicos y causan la muerte neuronal. Por otro lado, de manera fisiológica, la neuromelanina (NM) disminuye el estrés oxidativo funcionando como neuroprotector, por lo que su disminución en la patología está relacionada con la neurodegeneración (Nagatsu et al., 2022).

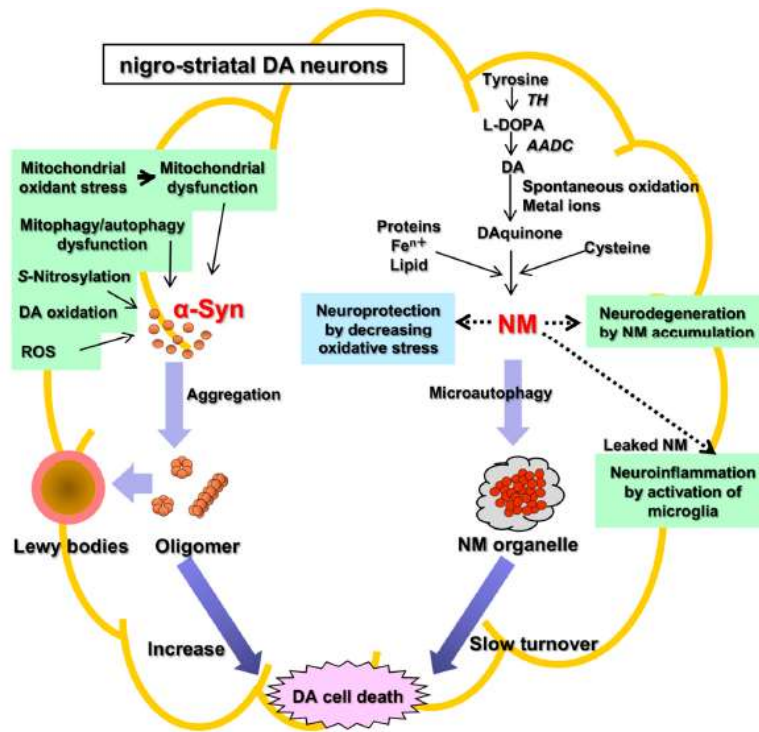


Figura 6. Cuerpos de Lewy y reducción de neuromelanina

Principales características histopatológicas en la EP. Se observa cómo los cuerpos de Lewy y la disminución en la neuromelanina (NM), conllevan a la neurodegeneración y muerte neuronal (Nagatsu et al., 2022).

También relacionado a estos eventos, existe la presencia de gliosis reactiva, lo que hace suponer un componente inflamatorio importante en la patogénesis de la enfermedad. La muerte de las neuronas dopaminérgicas y la desaparición de la neuromelanina provoca la reacción inflamatoria intensa que también contribuye a la muerte neuronal (Zecca et al., 2003). Tanto el sistema inmune innato como el adaptativo pierden efectividad con el envejecimiento y también se alteran notablemente en la EP (Calabrese et al., 2018).

Se ha llegado a proponer el uso de antiinflamatorios como adyuvantes en el tratamiento de la EP (Gao et al., 2003). Dada la evidencia de que la activación inmunitaria y la inflamación son características de la enfermedad, no sorprende que los medicamentos antiinflamatorios y las intervenciones dirigidas al sistema inmunológico hayan avanzado en la clínica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. En la tabla 2, se muestran algunos ensayos clínicos que involucran inmunoterapias contra la α -sinucleína y enfoques inmunomoduladores o antiinflamatorios que se han completado o están en progreso.

Drug type	Drug name	Clinical trial phase (year valuate)	Status of clinical trial	Enrolment criteria	Immune outcomes collected/reported	Clinical trial ID
Recombinant GM-CSF	Sargramostim (Leukine)	Phase I (2013)	Completed	PD (diagnosis >3 years)	PBMC and T cell sorting; T _{reg} cell function	NCT01882010
		Phase Ib (2019)	Active, not recruiting	PD (diagnosis >3 years)	Immunophenotype PBMC; lymphocyte immune cell number and function; antibodies to GM-CSF	NCT03790670
GLP1 analogue	Exenatide	Phase II (2013)	Completed	PD (H&Y <2.5 on medication)	No immune-specific treatment outcomes; motor and non-motor outcomes	NCT01971242
PPAR γ agonist	Pioglitazone	Phase II (2015)	Completed	Early PD (H&Y <2 and diagnosis <5 years)	No immune-specific treatment outcomes; motor and non-motor outcomes	NCT01280123
Cannabinoid system agonists	Nabilone	Phase II (2018)	Completed	PD	No immune-specific treatment outcomes; motor and non-motor outcomes	NCT03769896
		Phase III (2018)	Recruiting	PD (previous NMS-Nab study participant)	No immune-specific treatment outcomes; motor and non-motor outcomes	NCT03773796
	GWP42003-P (cannabidiol)	Phase II (2019)	Completed	Idiopathic PD	No immune-specific treatment outcomes; motor and non-motor outcomes	NCT02818777
mAb targeting carboxy-terminal epitope of α -synuclein	Prasinezumab (PRX002)	Phase I (2014)	Completed	PD (H&Y 1–3)	Immunogenicity determined by anti-PRX002 antibodies	NCT02157714
		Phase II (2017)	Active, not recruiting	Early PD (H&Y 1–2)	Immunogenicity determined by anti-PRX002 antibodies	NCT03100149
mAb targeting amino-terminal epitope of α -synuclein	BIB054	Phase I (2015)	Completed	Early idiopathic PD	Immunogenicity determined by anti-BIB054 antibodies	NCT02459886
		Phase II (2017)	Active, not recruiting	Early PD (H&Y <2.5 and diagnosis <3 years)	Immunogenicity determined by anti-BIB054 antibodies	NCT03318523

Tabla 2.- Candidatos a fármacos en el tratamiento de la EP

Ensayos clínicos en la enfermedad de Parkinson con terapias inmunomoduladoras y antiinflamatorias (Gao et al., 2003).

Continuando con la descripción de las alteraciones histológicas en la EP, se ha observado que en las neuronas remanentes y el lugar de la lesión se presentan las inclusiones intracitoplasmáticas eosinofílicas conocidas como cuerpos de Lewy, los cuales contienen los agregados filamentosos de α -sinucleína. La relación precisa entre los cuerpos de Lewy como dato patognomónico de la EP continua sin aclararse debido a que otros procesos patológicos muestran la aparición de estos agregados, como la demencia con cuerpos de Lewy, por lo que se propone el concepto de *sinucleopatías* como grupo de padecimientos con esta lesión (Manzanza et al., 2021). También se ha propuesto el término “Patología de Lewy” que englobaría a todas esas enfermedades con esta alteración y en los que la EP sería una más (Borghammer et al., 2021; Lee et al., 2004). La aparición de cuerpos de Lewy en el núcleo pedúnculo pontino, el locus coeruleus, el bulbo olfativo y el sistema nervioso autónomo, precede aparentemente a la aparición en la sustancia negra y correlaciona con una serie de síntomas asociados a la α -sinucleopatía en sus estadios

tempranos (Stiasny-Kolster et al., 2005). Como ya se mencionó, la patología de la α -sinucleína es predominante en los sistemas dopaminérgicos, pero afecta a muchos otros sistemas neuronales (Sian-Hulsmann & Riederer, 2023). Estas relaciones han llevado a preguntarse si la EP es un proceso iniciado fuera de la sustancia negra y cuya sintomatología aparece claramente hasta que alcanza los ganglios basales. Los estudios *post-mortem* revelan que mientras avanza la edad, los hallazgos anatomopatológicos relacionados con otros padecimientos son frecuentes, como lo es el caso de la enfermedad de Alzheimer. La relación precisa entre estos padecimientos y la EP no se entiende, pero parecen contribuir al cuadro clínico. La abundancia de cuerpos de Lewy en la EP se correlaciona con el grado de demencia de los pacientes. Clínicamente, la EP es una enfermedad sistémica, y es difícil explicar los procesos degenerativos, por lo pronto, existe evidencia de que la patogenia de la EP es compleja e involucra trastornos del metabolismo energético, estrés oxidativo, anomalías proteosómicas, acumulación de α -sinucleína, pérdida de neuromelanina y neuroinflamación (More & Choi, 2015; Nagatsu et al., 2022).

1.4. Fisiopatología de la EP y los ganglios basales

El principal hallazgo fisiopatológico de la EP es el incremento anormal en la actividad de las neuronas subtalámicas y palidales, como resultado de la pérdida de la acción dopaminérgica (Lozano et al., 1998). Consistentemente, existe una disminución significativa de los niveles de dopamina y sus metabolitos en el núcleo caudado y el putamen, cuya inervación dopaminérgica depende exclusivamente de la sustancia negra compacta (DeLong & Wichmann, 2015). Esto es lo que hace pensar que la sintomatología de la enfermedad, como actualmente se conoce, es producida exclusivamente por la muerte de este sistema neuronal (German et al., 1983). Existe una correlación directa entre la disminución de los niveles de dopamina y la severidad de la sintomatología. Los modelos experimentales de organización anatomofuncional de los ganglios basales (sustrato anatómico del control extrapiramidal del movimiento) y de Parkinson experimental, reproducen esta condición y han permitido entender los aspectos básicos de la acción de la DA que explican la aparición de bradicinesias, principal síntoma de la EP (Poston et al., 2020).

Los ganglios basales (GB) son una red compleja y altamente organizada que forma parte de un amplio sistema neuronal, el cual incluye la corteza cerebral y el tálamo (Lanciego et al., 2012). Este circuito neuronal se encarga principalmente del procesamiento de las señales para coordinar e integrar la actividad motora (Haber & Calzavara, 2009). Estos núcleos en conjunto con el cerebelo reciben información desde la corteza cerebral, después de integrarla y procesarla la envían al tálamo, el cual la transmite de vuelta a áreas específicas de la corteza cerebral para así mediar el control motor (Obeso et al., 2002). Los GB forman parte de la sustancia gris y se encuentran localizados en el telencéfalo, están conformados por el estriado (caudado y putamen), globo pálido interno (GPi); globo pálido externo (Gpe), núcleo subtalámico (NST) y la sustancia negra parte compacta (SNc) y reticulada (SNr) (Fig. 7) (Rommelfanger & Wichmann, 2010).

El núcleo estriado (EST) constituye la entrada al circuito de los GB y recibe múltiples aferencias, la mayoría de ellas glutamatérgicas de la corteza cerebral. A su vez, el Gpi y la SNr representan los principales núcleos de salida del circuito. Estas dos últimas estructuras ejercen una influencia inhibitoria GABAérgica sobre las neuronas premotoras excitatorias localizadas en el tálamo. Entre el núcleo de entrada (EST) y las estructuras de salida (Gpi y SNr) existen dos sistemas paralelos de proyección originados en diferentes poblaciones neuronales del EST denominados como “vía directa” y “vía indirecta” (Blandini et al., 2000) (Figura 7).

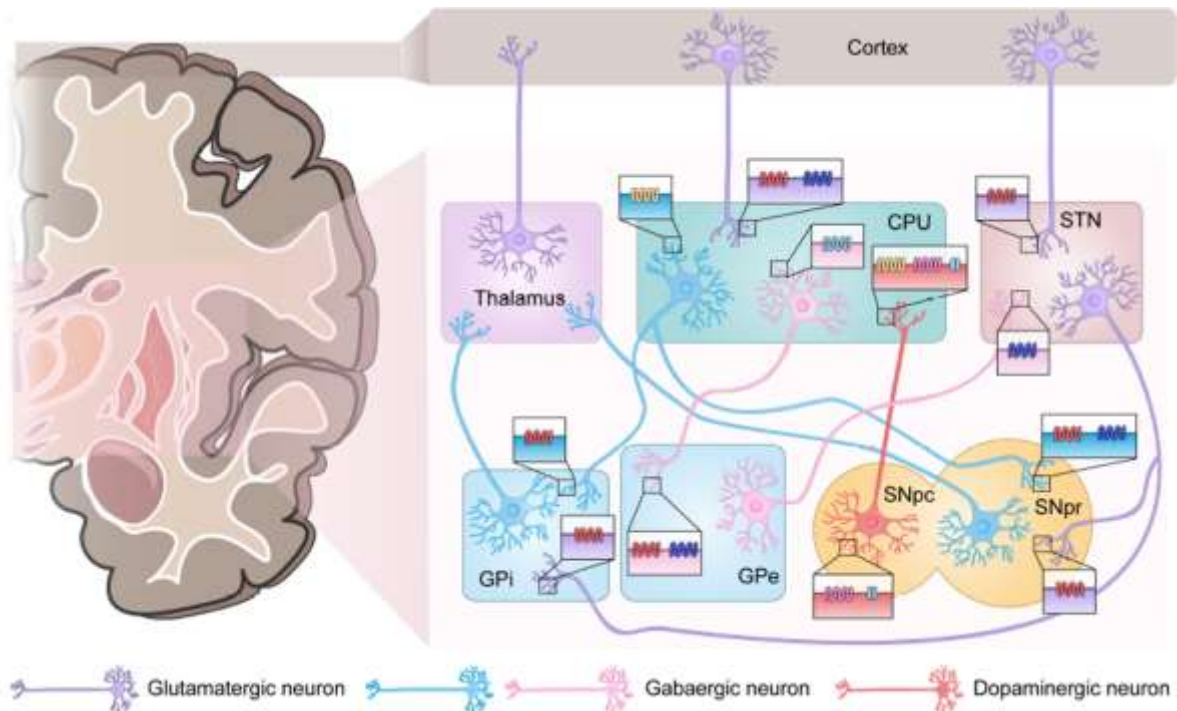


Figura 7. Circuito de los ganglios basales

Vías de señalización y receptores dopaminérgicos asociados a la transducción de señales que inician desde la corteza cerebral hasta los núcleos de salida (GPI y SNr) por medio de la vía directa y la vía indirecta a través de los núcleos de entrada de los ganglios basales (CPU), que a su vez regulan la función motora talámica (Wang et al., 2022).

La vía directa originada de neuronas GABAérgicas estriales (inhibitorias) y que expresan principalmente receptores dopaminérgicos a dopamina de la familia D1 y coliberan sustancia P (SP) y dinorfina, se proyecta monosinápticamente sobre el complejo GPI/SNr. La vía indirecta originada de subpoblaciones GABAérgicas estriales que expresan principalmente receptores dopaminérgicos de la familia D2 y coliberan encefalinas, se proyecta polisinápticamente sobre el complejo GPI/SNr pasando previamente por el GPe y núcleo subtalámico (NST). Esta secuencia indirecta está dada inicialmente por eferencias inhibitorias GABAérgicas del EST sobre el GPe, de este último sobre el NST y una eferencia final excitatoria glutamatérgica sobre el complejo GPI/SNr (Rommelfanger y Wichmann, 2010). A nivel del EST la dopamina (DA) aparece como facilitadora de la transmisión sobre la vía directa e inhibitoria sobre la vía indirecta, y este efecto aparentemente opuesto está mediado por la activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 respectivamente (Fig. 8) (Cerovic et al., 2013).

La salida GABAérgica de las neuronas espinosas medianas (MSN) que expresan los receptores dopaminérgicos D2 llega al globo pálido externo (GPe), que a su vez envía proyecciones GABAérgicas al núcleo subtalámico (NST). Desde el NST, las neuronas glutamatérgicas transmiten al GPi y sustancia negra reticulada (SNr), representando la vía indirecta y como resultado la disminución de la actividad locomotora. Las MSN del estriado que expresan receptores dopaminérgicos D1, se proyectan directamente a los núcleos de salida (GPi y SNr) y tienen un efecto inhibitorio, dando como resultado aumento en el movimiento por medio de la vía directa. Desde el GPi y la SNr, la información se envía a través del tálamo de regreso a la corteza (Fig. 8) (Cerovic et al., 2013).

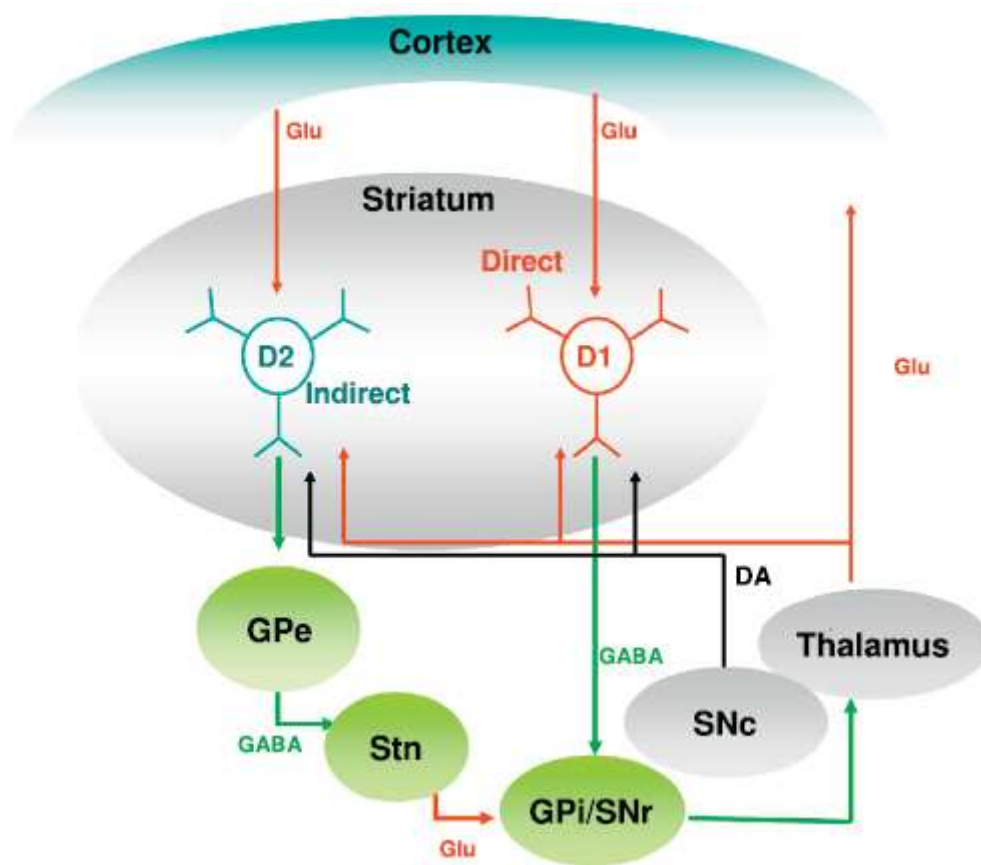


Figura 8. Vía directa e indirecta de los ganglios basales

El estriado recibe entradas glutamatérgicas (GLU) de la corteza y aferentes dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta, para transmitir la información mediante neuronas espinosas medianas que activan la

vía directa e indirecta a través de receptores dopaminérgicos D1 y D2.

El desbalance en la activación de ambos circuitos resultaría en alteraciones en la transmisión a los núcleos de salida GPi/SNr, dando lugar a la aparición de bradicinesia o hipercinesia. La bradicinesia o acinesia serían el resultado de una inhibición GABAérgica aumentada de las neuronas premotoras talámicas resultante de una excesiva activación del GPi/SNr. Ello ocurre luego de la degeneración estriadonigral con consecuente disminución de DA estriatal y posterior desinhibición de las neuronas GABAérgicas y encefalinérgicas de la vía indirecta, con consecuente hipoactividad del GPe y posterior hiperactividad del NST, siendo esta alteración un proceso clave en la enfermedad de Parkinson (Calabrese et al., 2018), mientras que la hipercinesia asociada a movimientos discinéticos aparece por el mecanismo opuesto.

1.5. La dopamina en los ganglios basales

La dopamina (DA) es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del sistema nervioso central (SNC) y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad, cognición, reforzamiento positivo, ingesta de alimento, la afectividad, así como en la comunicación neuroendocrina (Costa & Schoenbaum, 2022). La síntesis de dopamina se ha estudiado más ampliamente en las neuronas dopaminérgicas del SNC, en las que la dopamina se sintetiza a partir del aminoácido L-tirosina, existiendo diversos mecanismos que regulan de manera muy precisa su síntesis y liberación (Channer et al., 2023). La síntesis del neurotransmisor ocurre en las terminales nerviosas dopaminérgicas en donde se encuentran en alta concentración las enzimas responsables, la tirosina hidroxilasa (TH), que cataliza la adición de un grupo hidroxilo a la posición meta de la tirosina para producir levodopa (L-DOPA) y posteriormente la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o L-DOPA descarboxilasa (AADC) cataliza la reacción para dar como resultado la dopamina (Figura 9A). Este proceso se considera el paso limitante de la velocidad de esta vía de síntesis y es susceptible a la inhibición del producto final por altos niveles de catecolaminas (Meiser et al., 2013).

En los estudios de Nagatsu y colaboradores, (2022) se mostró que la hidroxilación de la L-tirosina es el punto de regulación de la síntesis de catecolaminas en el SNC, por lo que en consecuencia la TH es la enzima limitante de la síntesis de la dopamina, la noradrenalina

y la adrenalina. En un experimento de gran relevancia, estos autores bloquearon farmacológicamente toda la neurotransmisión de dopamina en conejos con reserpina, un bloqueador del transportador de dopamina VMAT2, lo que los paralizó por completo, recuperando el movimiento posteriormente con una inyección del precursor de dopamina, L-DOPA, resultado que demostró la importancia de la dopamina para el inicio y control del movimiento (Figura 9B) (Benes, 2001).

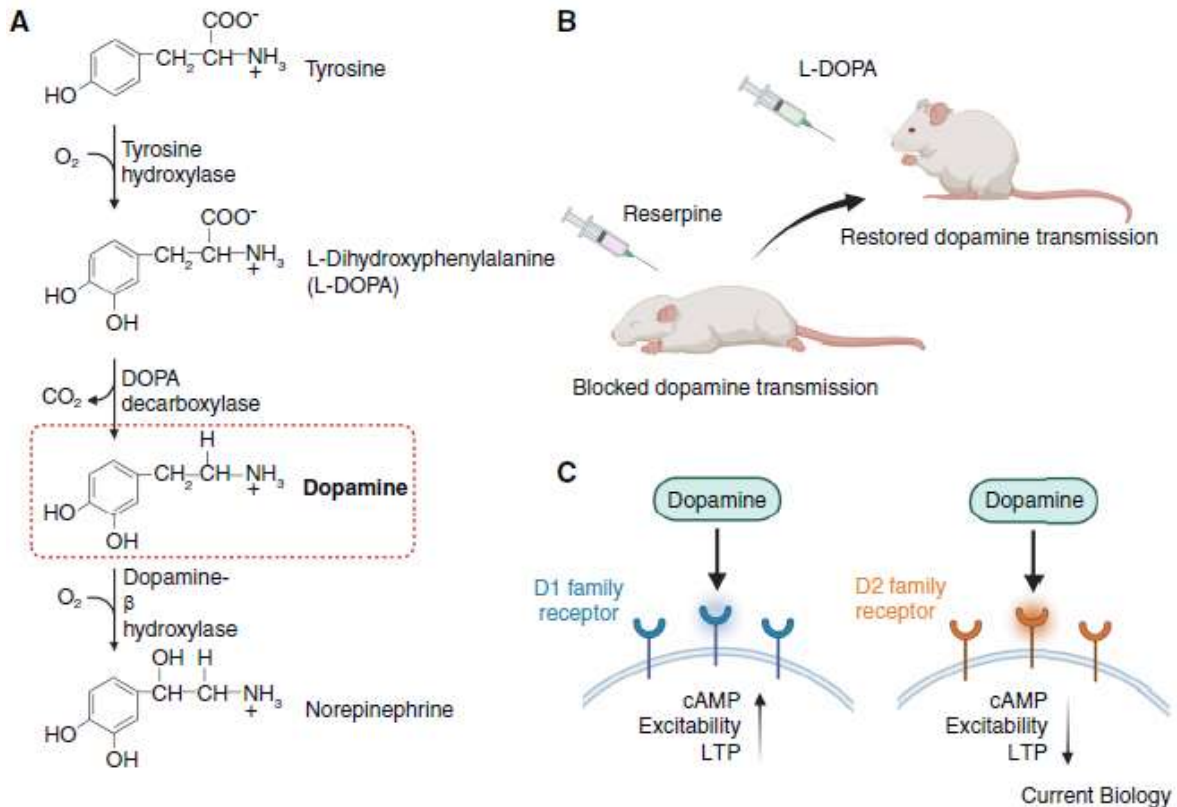


Figura 9. La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico

A) Síntesis de dopamina por la acción de la tirosina hidroxilasa (la enzima limitante de la velocidad para la producción de dopamina) y DOPA descarboxilasa. B) Depleción de la dopamina por acción de la reserpina y restauración de la transmisión dopaminérgica por la administración de L-DOPA. C) La dopamina lleva a cabo sus acciones a través de dos familias de receptores dopaminérgicos: Receptores dopaminérgicos D1-Like y D2-Like.

El estudio de los sistemas y receptores dopaminérgicos del SNC ha generado un gran interés, debido a que diversas alteraciones en la transmisión dopaminérgica han sido relacionadas, directa o indirectamente, con trastornos severos como la enfermedad de

Parkinson y la esquizofrenia, así como los efectos inmunomoduladores de las drogas adictivas. Todas las sustancias adictivas, incluidos los estimulantes como la cocaína, la metanfetamina, alcohol, cannabis o heroína, actúan incrementando los niveles de dopamina en el SNC (Volkow et al., 2009).

La dopamina se empaqueta en vesículas por el transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2) y se transporta a sus sitios de liberación celular (Blandini et al., 2000), ejerciendo su acción mediante la unión a receptores sinápticos dopaminérgicos, los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs) (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Estructuralmente se componen de un extremo amino terminal extracelular, siete dominios transmembranales y un extremo carboxilo terminal intracelular. Una vez liberada, la dopamina puede interactuar con al menos cinco subtipos diferentes de receptores dopaminérgicos: D1, D2, D3, D4 y D5, agrupados en dos familias principales en función de sus propiedades bioquímicas: la familia de tipo D1, compuesta por los receptores dopaminérgicos D1 y D5, los cuales se acoplan a proteínas Gs, Gq o G_{oif}; y la familia de tipo D2, compuesta por D2, D3 y D4, que se acoplan a proteínas Gi/Go. Esta clasificación depende de su capacidad para la activación o inhibición de la adenilil ciclasa (AC). La activación de los receptores dopaminérgicos de la familia D1 aumenta el monofosfato de adenosina cíclico intracelular (cAMP), que tiende a promover la plasticidad sináptica y aumentar la excitabilidad neuronal, mientras que la activación de los receptores dopaminérgicos de la familia D2 tiene los efectos opuestos (Figura 10) (Channer et al., 2023). Los receptores dopaminérgicos D1 y D5 por medio de proteínas G del tipo G_{s/off}, activan la AC, que a su vez se encarga de convertir el ATP en AMP cíclico (cAMP) (Vallone et al., 2000). En las vías neuronales de los ganglios basales se ha encontrado que los receptores dopaminérgicos D1 están asociados a las neuronas del putamen de la vía directa (Gerfen et al., 1990), en tanto que los receptores dopaminérgicos D2 lo hacen sobre las neuronas de la vía indirecta (Gerfen et al., 1990). La activación de los receptores dopaminérgicos D1 estimula el disparo neuronal del putamen y la liberación de su neurotransmisor a nivel presináptico en el GPi y/o SNr. La activación de los receptores dopaminérgicos D2 inhibe el disparo de las neuronas de la vía indirecta del putamen y la liberación de GABA a nivel presináptico en el GPe. Durante la activación del circuito motor, la dopamina facilita la activación de la vía directa e inhibe la vía indirecta, coordinando la función de ambas vías y facilitando el movimiento. En ausencia de dopamina, existe hiperactividad de la vía

indirecta en comparación con la vía directa, lo que explica el incremento de actividad de las neuronas subtalámicas y del GPi y/o SNr (Mahlon R DeLong, 1990).

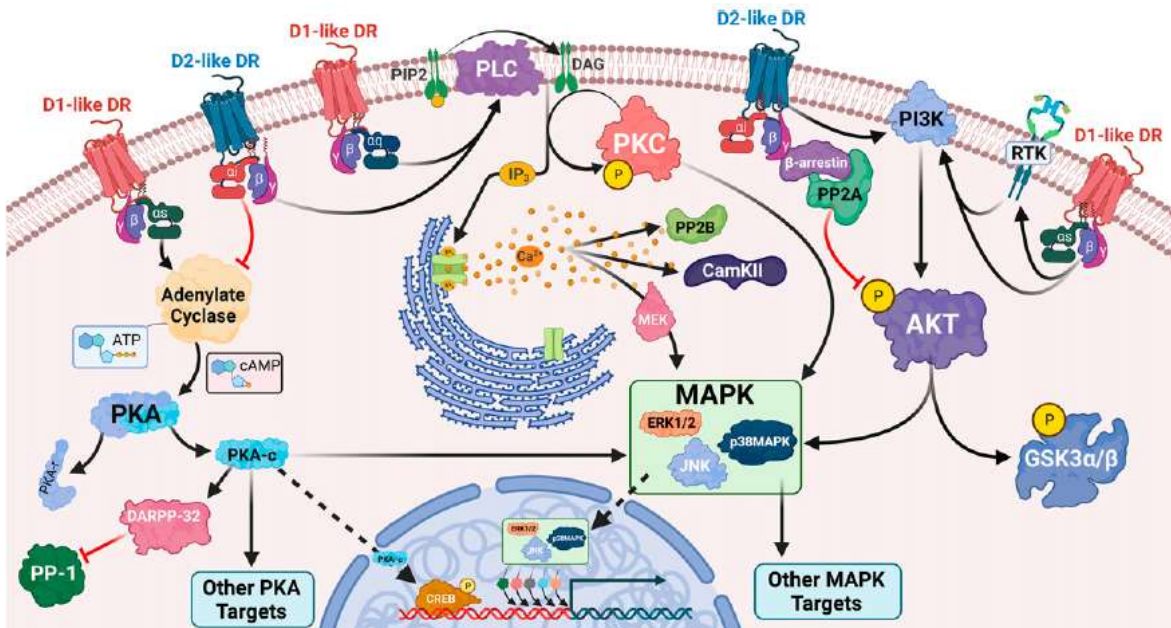


Figura 10. Vías de señalización de los receptores dopaminérgicos de la familia D1 y D2

Los receptores dopaminérgicos de la familia D1 de manera general estimulan la actividad neuronal a través de la adenilil ciclasa y la fosfolipasa C, mientras que los receptores dopaminérgicos de la familia D2 se consideran inhibitorios, ya que regulan negativamente la actividad de estas enzimas en la señalización.

Sin embargo, la organización anatómica de los ganglios basales parece ser más compleja que la mostrada en el modelo clásico (véase la Figura 8). Otros núcleos relacionados con los ganglios basales, que participan en el control motor y tienen receptores dopaminérgicos a DA deben ser tomados en cuenta, tal es el caso del núcleo reticular del tálamo (Pinault, 2004), el núcleo pedúnculo pontino (Mena-Segovia et al., 2004) y el núcleo parafascicular (Nakamura et al., 2006). Por otra parte, la dopamina media su acción a través de más subtipos de receptores dopaminérgicos. Por estudios de clonación se conoce que la familia D2 se encuentra conformada de los subtipos D2short, D2long, D3, D3nf y D4.

Estudios en donde se han producido animales modificados genéticamente que carecen de algún subtipo de receptor (*knockout*), han mostrado patrones de deficiencias motoras diferentes para cada subtipo (Sibley, 1999). De esta manera se podría sugerir que la

acción de la dopamina es más compleja que la sugerida en el modelo experimental. La asociación específica de un circuito neuronal con un tipo particular de receptor daría un matiz a la actividad motora. Estudios recientes han mostrado que una subpoblación de neuronas espinosas medianas que expresan el receptor D1, también expresan el receptor D3, el cual al ser coactivado de manera selectiva potencia los efectos del D1 sobre su señalización y sobre la actividad motora (Cruz-Trujillo et al., 2013; Fiorentini et al., 2008; Marcellino et al., 2008). También se han mostrado en menor proporción neuronas espinosas medianas que expresan receptores dopaminérgicos D1 y D2 y en mucho menor cantidad neuronas que expresan D2 y D3 (Moreno et al., 2022). La denervación dopaminérgica y el tratamiento con L-DOPA en modelos de Parkinson han mostrado que el número de neuronas con esta coexpresión de receptores dopaminérgicos aumenta de manera significativa (Moreno et al., 2022; Solís et al., 2017), lo que implica una modificación substancial de los circuitos neuronales de los GB en la condición patológica.

El modelo actual necesita ser replanteado asumiendo que la acción de la dopamina depende de circuitos específicos asociados a un tipo particular de receptor, además de que sus efectos dependen de que el circuito esté o no activo (Obeso et al., 2010; Rodríguez-Sánchez et al., 2019). También se debe tomar en cuenta que la organización anatómica de la innervación dopaminérgica es más compleja (Parent et al., 2001). No obstante, también debemos que reconocer que el modelo de DeLong ha mostrado tener un valor lo suficientemente predictivo para el entendimiento de la acción de la dopamina y la propuesta de alternativas terapéuticas conocidas para la EP, sin embargo, en la actualidad se sabe que muchas de las características planteadas en el modelo clásico ya no son del todo correctas, por ejemplo, se pensaba que el inicio del movimiento empezaba con la activación únicamente de la vía directa, mientras que el mecanismo que ocurre es una activación coordinada de ambas vías modulada por la dopamina proveniente de la sustancia negra parte compacta (Figura 11) (Eisinger et al., 2019).

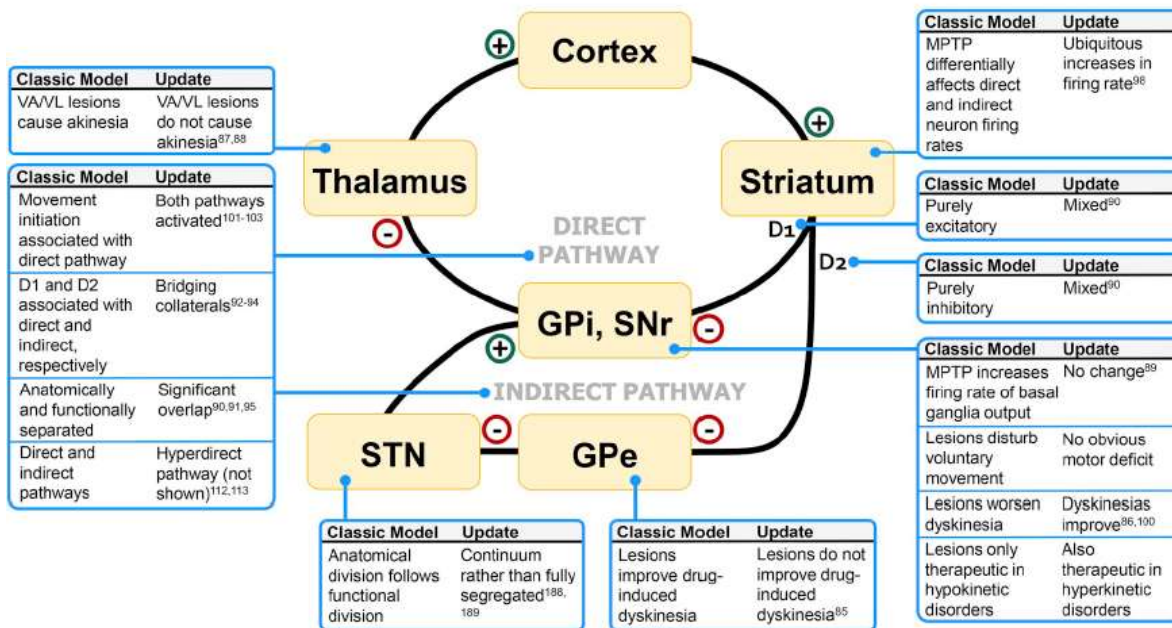


Figura 11. Limitaciones del modelo clásico de los ganglios basales

Aunque el modelo clásico original demostró ser fundamental para explicar el movimiento y mecanismo de las enfermedades de los ganglios basales, las observaciones recientes han demostrado varios cambios en el funcionamiento del circuito (Eisinger et al., 2019).

1.6. Tratamiento de la Enfermedad de Parkinson y la L-DOPA

El tratamiento de la EP difiere en función de la situación del paciente, cuando se trata de una EP inicial el interés es mantener la autonomía e independencia del paciente el mayor tiempo posible mediante el control de los síntomas. Hasta el momento, ningún fármaco ha demostrado tener propiedades neuroprotectoras que puedan detener el curso de la enfermedad. Tampoco es claro cuál es el mejor fármaco para iniciar el tratamiento ni cuando es el momento preciso para realizarlo. El tratamiento de elección hasta el momento sigue siendo la L-DOPA, un precursor de la DA, que revierte su disminución por causa de la muerte de las neuronas dopaminérgicas. El uso de coadyuvantes que inhiben la dopa Descarboxilasa hepática funcionan únicamente en la periferia. La dopa Descarboxilasa pertenece al grupo de enzimas conocidas como Descarboxilasas de los aminoácidos aromáticos (AADC por sus siglas en inglés). Sus inhibidores logran que se alcancen concentraciones importantes de DA en el cerebro lo que supone la causa de su efecto terapéutico. Aproximadamente entre el 40 y 50% de los pacientes desarrollan

complicaciones motoras poco después de 10 años bajo este tratamiento (Ahlskog & Muentner, 2001), pero tal porcentaje incrementa a 90% posterior a este tiempo (Rascol et al., 2000). A pesar de su frecuencia y su importancia clínica, la fisiopatología y los factores de riesgo que causan las discinesias en la EP todavía no se han determinado del todo. Algunos pacientes exhiben discinesias severas muy rápidamente, mientras que otros no la desarrollan a pesar de pasar varios años bajo tratamiento. Se ha reportado que el desarrollo de las discinesias depende de varios factores de riesgo, tales como la duración de la enfermedad, duración del tratamiento, severidad de la enfermedad o dosis de L-DOPA acumulada. Además se conoce que su aparición es el resultado de la combinación de la severidad de la lesión dopaminérgica y la administración crónica de L-DOPA (Barroso-Chinea & Bezard, 2010).

1.7. Discinesias inducidas por L-DOPA

Las discinesias en la EP parecen estar mediadas por alteraciones en la actividad de los GB (Obeso et al., 2000). Se sugiere que cuando existe una disminución en la actividad del GPi, se genera desinhibición del tálamo y la corteza generando un incremento anormal de la actividad de esta última y por lo tanto un incremento en los movimientos motores (Barroso-Chinea & Bezard, 2010). A nivel celular, en las discinesias se presenta una sensibilización de los receptores dopaminérgicos del tipo D1 (Cai et al., 2002), sobreactivando la vía directa sobre la vía indirecta, lo que en consecuencia genera el aumento en la actividad de la corteza estimulada por la desinhibición del tálamo, incrementando así la actividad motora. La supersensibilización de los receptores dopaminérgicos D1 produce un incremento en la liberación de GABA de la sustancia negra compacta y en la actividad de la adenilil ciclasa en la vía de señalización (Rangel-Barajas et al., 2008) (Rangel-Barajas et al., 2011). Los mecanismos por los cuales sucede este fenómeno son aún desconocidos, pero están asociados a la aparición de discinesias. De manera importante se ha reportado que el tratamiento crónico con L-DOPA incrementa la expresión del receptor D3 en ratas lesionadas con 6-OHDA (Bordet et al., 1997), lo que indica que estos receptores dopaminérgicos juegan un papel importante en el desarrollo de discinesias (Barroso-Chinea & Bezard, 2010) .

Se ha demostrado que los receptores dopaminérgicos D1 y D3 colocalizan en una población de neuronas estriadonigrales (Solís et al., 2017; Lanza et al., 2021; Moreno et al., 2022), así como también en neuronas del núcleo accumbens, teniendo un efecto sinérgico sobre la excitabilidad neuronal y la liberación de neurotransmisor (Cruz-Trujillo et al., 2013). La respuesta que se genera de la interacción de los receptores dopaminérgicos D1/D3 en las neuronas de la vía estriadonigral se le conoce como señalización atípica y se asume que estos receptores dopaminérgicos forman heterodímeros (Fiorentini et al., 2008; Marcellino et al., 2008), en donde el receptor D3 proporciona un aumento de afinidad al receptor D1. Se ha sugerido que la activación del receptor D3 tiene un efecto protector sobre la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Joyce & Millan, 2007). Algunas evidencias experimentales han mostrado que el 7-OH-DPAT, un agonista del receptor D, favorece la neurogénesis y tiene efectos neuroprotectores (Van Kampen & Robertson, 2005) (Van Kampen & Eckman, 2006). Actualmente el uso de antagonistas de receptores dopaminérgicos D3 en discinesias inducidas con L-DOPA atenúan las acinesias-bradicinesias y que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos D3 moderan la discapacidad motora parkinsoniana, pero no disminuyen los movimientos involuntarios anormales (Mela et al., 2010).

II. ANTECEDENTES DIRECTOS

2.1 Papel de los receptores dopaminérgicos D3 en la SNr y la modulación por la CaMKII

El papel de los receptores dopaminérgicos D3 en la transmisión GABAérgica estriadonigral ha sido estudiado por nuestro grupo de trabajo, observando que, en ratas normales, el receptor D3 potencia la actividad del receptor D1 sobre la formación de AMPc, sin embargo, este efecto no se ve reflejado en la liberación de GABA inducida por alto K⁺. Esta ausencia de efecto es atribuida al control inhibitorio que la CaMKII, activada durante la despolarización, tiene sobre los receptores dopaminérgicos D3, ya que el bloqueo farmacológico de esta cinasa previene su efecto inhibitorio sobre el receptor D3 y deja ver su efecto potenciador (Avalos-Fuentes et al., 2015). Esta condición de potenciación D3→D1 desaparece en la denervación dopaminérgica, incluso volviéndose antagónica, puesto que, en esta condición, el receptor D3 inhibe la liberación de GABA estimulada por los receptores dopaminérgicos D1, así como la formación de AMPc, sin aparente participación de la CaMKII, ya que no es necesario su bloqueo para que se manifieste la respuesta. Esto sugiere que la denervación dopaminérgica produce cambios significativos en la interacción D1/D3 sobre la transmisión GABAérgica estriadonigral y que forman parte de la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson.

En animales de experimentación la aparición de discinesias en el tratamiento con L-DOPA, también es variable (Cenci et al., 1998; Carta et al., 2006; Fiorentini et al., 2006; Gardoni et al., 2006; Munoz et al., 2008; Rangel-Barajas et al., 2011; Alcacer et al., 2012; Fiorentini et al., 2013; Bastide et al., 2014; Sancesario et al., 2014), lo mismo que los parámetros neuroquímicos que los diferentes estudios han asociado a las mismas (Cenci et al., 1998; Fiorentini et al., 2006; Gardoni et al., 2006; Rangel-Barajas et al., 2011; Alcacer et al., 2012; Fiorentini et al., 2013; Bastide et al., 2014; Sancesario et al., 2014; Fiorentini et al., 2016). Se ha sugerido que la frecuencia de administración, la dosis y duración del tratamiento, así como el grado de denervación dopaminérgica de los individuos está relacionado con la aparición de las discinesias. Nuestro grupo de trabajo ha sugerido que los animales de experimentación que desarrollan discinesias se segregan en dos grupos, uno con muy bajo puntaje de discinesia y otro con alto puntaje. Estos grupos también se relacionan con cambios neuroquímicos en la actividad de receptores dopaminérgicos D1 y de la adenilil ciclasa en la vía estriadonigral (Rangel-Barajas et al., 2011). Sin embargo, ni este ni otros estudios, han demostrado si tales diferencias en los

puntajes se deben a que son poblaciones que antes del tratamiento, tenían un mismo o diferente nivel de denervación dopaminérgica y si esto estaba asociado a los mismos cambios neuroquímicos de los receptores dopaminérgicos D1 y otros parámetros.

En este trabajo, determinamos si tales subpoblaciones de animales (discinéticos vs. no discinéticos) se generan a partir de dos o de una población de ratas con el mismo grado de denervación dopaminérgica. Además, evaluamos en estos grupos, la funcionalidad de los receptores dopaminérgicos D1, cuya supersensibilidad ha sido relacionada con la discinesia (Feyder et al., 2011; Rangel-Barajas et al., 2011) y estudiamos la interacción con los receptores dopaminérgicos D3, cuyo aumento en la expresión se relaciona con la aparición de las discinesias (Bezard et al., 2003; Cote et al., 2014; Cote & Kuzhikandathil, 2015) y que interactúan con los receptores dopaminérgicos D1 (Bordet et al., 1997; Cruz-Trujillo et al., 2013), interacción regulada por el sistema CaM-CaMKII (Avalos-Fuentes et al., 2013; Avalos-Fuentes et al., 2015).

A pesar del éxito terapéutico de la L-DOPA en la enfermedad de Parkinson, la limitación de su uso, debido a la aparición de las discinesias, continúa siendo un tema de estudio, puesto que de no aparecer o controlarse este fenómeno, el tratamiento se podría prolongar por más tiempo, mejorando la calidad de vida del paciente. Para la mayor parte de los pacientes, la terapia substitutiva con L-DOPA produce al inicio una mejora importante de la sintomatología motora (Obeso et al., 2010), sin embargo, a medida que se prolonga su uso, la aparición de discinesias en diferente grado y temporalidad de aparición, contrarresta la eficacia terapéutica y por consecuencia la sustitución del tratamiento.

III. JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente, la L-DOPA continúa siendo el mejor tratamiento para la enfermedad de Parkinson, a pesar de la aparición del fenómeno discinético, aunque este representa la mayor limitante para su uso. Es probable que, de controlar el fenómeno discinético, la utilidad de la L-DOPA podría prolongarse y mantener más tiempo lo que aportaría una mejor calidad de vida a los pacientes. En este sentido, el entendimiento de los factores que determinan la aparición de las discinesias, así como de los mecanismos neurobiológicos involucrados resulta de vital importancia para tal fin. A la fecha, se ha observado que la respuesta a la L-DOPA es variable entre los individuos con enfermedad de Parkinson, en cuanto al desarrollo de discinesias, su intensidad y su curso temporal, lo que sugiere la existencia de factores inherentes a los individuos que determinan su aparición.

Con la idea de generar nuevos conocimientos que ayuden a comprender la neurobiología de la discinesia inducida por L-DOPA, en esta tesis nos propusimos estudiar, si el desarrollo de discinesias está dado por el grado de denervación dopaminérgica que tienen los individuos y por otro lado establecer si tales respuestas diferentes corresponden a cambios en la actividad de los receptores dopaminérgicos D1 y D3 y su regulación por las proteínas CaM-CaMKII de la vía estriado-nigral involucradas en la fisiopatología del fenómeno discinético.

IV. HIPÓTESIS

Las poblaciones de animales discinéticos y no discinéticos en el Parkinson experimental tratados con L-DOPA tienen el mismo grado de lesión dopaminérgica.

El tratamiento con L-DOPA reestablece el comportamiento motor en los animales no discinéticos, así como la interacción entre receptores dopaminérgicos D1 y D3 y su regulación por el sistema CaM-CaMKII.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar si los animales discinéticos y no discinéticos generados por el tratamiento con L-DOPA en el Parkinson experimental provienen de una población de animales con el mismo grado de lesión, así como determinar las diferencias que existen en la interacción entre los receptores dopaminérgicos D1/D3 y su regulación por la CaM-CaMKII.

5.2. Objetivos particulares

- Determinar si la lesión dopaminérgica unilateral uniforme produce dos poblaciones de animales con distinto grado de actividad locomotora medida por conducta de giro y grado de denervación dopaminérgica.
- Definir si el tratamiento con L-DOPA produce dos poblaciones de animales con diferencias en la actividad locomotora y discinesias inducidas.
- Estudiar la respuesta terapéutica de la L-DOPA a través de la recuperación de la asimetría motora en animales discinéticos y no discinéticos.
- Determinar si el tratamiento con L-DOPA en animales hemiparkinsonianos recupera el patrón de actividad de los receptores dopaminérgicos D1 y D3 en la formación de AMPc y liberación de GABA en la vía estriado nigral.
- Determinar si el tratamiento con L-DOPA recupera el control del sistema CaM-CaMKII sobre la interacción de los receptores dopaminérgicos D1 y D3.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Sujetos experimentales

En todos los experimentos, los sujetos experimentales fueron ratas macho de la cepa Wistar, con un rango de peso de 200-220 g, los cuales fueron mantenidos en condiciones controladas hasta la realización de los experimentos: alimento y agua *ad libitum*, ciclos luz/oscuridad de 12 h cada uno y temperatura $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

6.2. Lesión unilateral con 6-hidroxi-dopamina

El modelo de Parkinson experimental utilizado fue el de lesión unilateral con 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), neurotoxina que selectivamente genera la muerte de neuronas dopaminérgicas, la cual fue inyectada directamente en el haz del cerebro medio (MFB). Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina/xilacina (80/10 mg/kg) por medio de inyección intraperitoneal (i.p.). Una vez anestesiados los sujetos experimentales, fueron colocados en un aparato estereotáxico (Kopf; Tujunga, Ca. USA), donde fueron localizadas las coordenadas del haz del cerebro medio (MFB), sugeridas por el atlas de cerebro de la rata de Paxinos y Watson (1998), y se tomaron a partir de bregma, resultando las siguientes coordenadas: anteroposterior -0.180 mm; lateral 0.240 mm y profundidad de -0.700 mm., donde fue realizada la administración unilateral con 1 μl de 6-OHDA (16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ disuelta en solución inyectable con ácido ascórbico al 0.1%), durante un periodo de 10 min (velocidad de perfusión 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$). Todas las ratas sujetas a la cirugía estereotáxica fueron administradas con un pretratamiento con desipramina (10 mg/kg i.p.) 45 min antes de la lesión, para proteger al sistema noradrenérgico de la toxina.

6.2.1. Prueba conductual (conducta de giro)

Ocho días posteriores a la cirugía estereotáxica, se realizó la prueba conductual de giro para corroborar el grado de lesión dopaminérgica (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970) . La conducta de giro fue inducida mediante la inyección de anfetamina (10 mg/kg

intraperitoneal), todas aquellas ratas que dieron 8 o más giros ipsilaterales (hacia el lado de la lesión) por minuto, fueron incluidas en los experimentos.

6.3. Tratamiento con L-DOPA

El tratamiento crónico con L-DOPA fue iniciado 16 días posteriores a la lesión con 6-OHDA. La L-DOPA metilester (10 mg/kg) concomitante con benzeracida (15 mg/kg), fue inyectada intraperitonealmente. Después de 21 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados y utilizados para diferentes ensayos.

6.3.1. Medición de discinesias inducidas por L-DOPA

Después del tratamiento con L-DOPA, los animales fueron separados en dos grupos: aquellos que fueron altamente discinéticos y animales ligeramente discinéticos, por medio de la evaluación conductual propuesta por Cenci et al., (1998) y modificada por Rangel et al., (2011). Posterior a la inyección con L-DOPA, los animales fueron observados diariamente y de manera individual en periodos de 3 min, cada 20 min por un tiempo total de 3 h. Los movimientos fueron reconocidos como discinéticos cuando: a) fuesen inducidos por L-DOPA; b) solo fue afectado el lado contralateral al lado lesionado y c) fuesen repetitivos, sin ser atribuidos a ningún patrón de comportamiento normal. Ahora, dependiendo del número de discinesias, los animales obtuvieron diferentes puntajes basados en los siguientes criterios: 0 = no presentes; 1 = ocasionales (presentes por menos de la mitad del tiempo de observación); 2 = frecuentes (presentes por más de la mitad de tiempo de observación); 3 = continuos (presentes todo el tiempo de observación, pero interrumpibles o suspendidos por una distracción sensorial); 4 = severamente continuos (presentes todo el tiempo de la observación, pero no interrumpibles o suspendidos por una distracción sensorial). Aquellos animales que cruzaron el umbral de 32 puntos fueron considerados como altamente discinéticos.

6.4. Obtención de sinaptosomas

Para la purificación de sinaptosomas, se obtuvo el tejido de rebanadas de sustancia negra reticulada (SNr). Una vez obtenidas las rebanadas, fueron sometidas a una homogenización (10 golpes a una velocidad de 400-500 rpm) en una solución HEPES-sacarosa (0.32M). El homogenado fue centrifugado a 800 x g durante 10 min a una temperatura de 4-7 °C. Terminada la centrifugación, el sobrenadante fue recuperado y sometido a ultra-centrifugación a 20,000 x g durante 20 min. Posteriormente, la pastilla (P1) fue recuperada y resuspendida en el mismo *buffer* de sacarosa (0.32M) que se colocó sobre una solución HEPES-sacarosa (0.8 M), formando una cama de gradientes de sacarosa, para ser centrifugado nuevamente a 20, 000 G durante 20 min. El resultado de la segunda centrifugación fue la fracción sinaptosomal o pastilla (P2), la cual fue resuspendida en *buffer* Krebs- HEPES en presencia de la marca radioactiva para los experimentos de AMPc ($[^3\text{H}]$ -Adenina), o bien, se resuspende en *buffer* RIPA-SDS en presencia de inhibidores de proteasas, para los experimentos de expresión de proteínas por el método de *Western blot*.

6.5. Formación de $[^3\text{H}]$ -AMPc en sinaptosomas

Una vez obtenidos los sinaptosomas, fueron incubados con $[^3\text{H}]$ -adenina (130 nM) en un volumen total de 3 ml de solución Krebs-HEPES a 37 °C durante 60 min. Pasado este tiempo, los sinaptosomas fueron centrifugados nuevamente por 5 min a 4000 rpm, para desechar el exceso de marca radioactiva. La pastilla obtenida (sinaptosomas), fue resuspendida en Krebs-HEPES en presencia de IBMX (1 mM), un inhibidor de las fosfodiesterasas, utilizado para evitar la degradación del AMPc formado. La acumulación de AMPc fue estimulada con los diferentes fármacos de interés. Alícuotas de la fracción sinaptosomal fueron distribuidas en diferentes tubos teniendo un volumen final de reacción de 250 μl , las muestras fueron mantenidas a una temperatura de 37 °C, posteriormente fueron incubadas con los fármacos de estudio por un periodo de 15 min. El periodo de incubación de los sinaptosomas con los fármacos fue detenido con 100 μl de una reacción de paro (mezcla fría de AMPc (4.5 mM), ATP (2.5 mM) y TCA (6%)). Pasados 20 min con la reacción de paro, los sinaptosomas fueron centrifugados por 10

min a 4000 rpm., y el sobrenadante de cada tubo fue recuperado para la obtención de AMPc y ATP.

La obtención de AMPc y ATP fue realizada por medio de cromatografía de intercambio iónico. Para esto, se utilizaron columnas de intercambio iónico con resina DOWEX 50W X-4 para la separación del [³H]-ATP y columnas con alúmina neutra para la separación del [³H]-AMPc. Un volumen de 300 µl de cada muestra fue colocado primeramente dentro de las columnas DOWEX y se dejó que se eluyeran las muestras, una vez eluidas, se adiciona individualmente a cada columna 3 ml de H₂O destilada y es colectado el [³H]-ATP. Posteriormente se colocan las columnas DOWEX sobre las columnas de alúmina y se adiciona individualmente a cada columna 5 ml de agua destilada, una vez que se eluyen las muestras de las columnas DOWEX a las columnas de alúmina, se retiran las columnas DOWEX y a las columnas de alúmina se le adicionan 4 ml de solución Tris-HCl (50 mM) y es colectado el [³H]-AMPc.

A cada muestra colectada, tanto de [³H]-ATP como de [³H]-AMPc se le adicionaron 14 ml de líquido de centelleo, y fueron contadas en un contador de centelleo líquido. La formación porcentual de [³H]-AMPc fue calculada de la siguiente manera:

$$\% \text{ } [^3\text{H}]\text{-AMPc} = \frac{[^3\text{H}]\text{-AMPc}}{[^3\text{H}]\text{-ATP} + [^3\text{H}]\text{-AMPc}} \times 100$$

6.6. Determinación de proteínas por *Western-Blot*

La determinación de proteínas fue realizada en sinaptosomas de la SNr. Para algunos casos los sinaptosomas fueron incubados con una solución alta en K⁺ 15 mM durante 15 min. Al término de este tiempo fueron colocados en hielo para finalizar la incubación. Los sinaptosomas fueron tratados con *buffer* RIPA 1 ml (Tris-HCl 40mM, NaCl 150mM, EDTA 2mM, glicerol 10%, Tritón X-100 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.2%, pH 7.6) junto con inhibidores de proteasas (Complete 20 µl y PMSF [100 mM] 5 µl) y se colocaron en hielo por 15 min. Pasado este tiempo los sinaptosomas fueron ultra sonicados y se cuantificó la proteína por el método de Bradford. Posteriormente se adicionó por cada ml de homogenizado 200 µl de *buffer* de muestra (Tris-Base 0.3125M, SDS 10%, glicerol 50%, β-mercaptoetanol 25%, azul de bromofenol 0.5%, pH 6.8) y la mezcla fue hervida

por 10 min y congelada para su posterior estudio. Para la electroforesis, se preparó un gel de poliacrilamida al 10 % y se cargó el equivalente a 50 µg de proteína en cada pozo del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 120 V en un *buffer* de corrida (Tris-Base 0.025M, glicina 0.192M, SDS 0.1%, pH 8.3). Pasado el tiempo de corrida, el gel fue desmontado y se colocó en una membrana de nitrocelulosa previamente hidratada, dentro de un casete de transferencia. El casete fue montado en una cámara de transferencia húmeda con *buffer* de transferencia (Tris Base 0.05M, glicina 0.38 M, metanol 20%, pH 8.3), se corrió a 250 mA por 120 min. Terminado este período, la membrana se incubó con solución bloqueadora (leche Svelty 7-10% y TBS-tween al 0.1%) durante mínimo 2 h. Transcurrido el tiempo de bloqueo, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario 1:1000 (anti-CaMKII α ; anti CaM) toda la noche a 4° C. Para lavar el anticuerpo primario, se realizaron 5 lavados de 7 min con TBS-tween y posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo secundario 1:10,000 (anti-ratón-HRP para CaMKII; anti-conejo-HRP para CaM) por 2 h, finalmente se realizaron 5 lavados de 7 min con TBS-tween. La membrana se tiñó con ECL-plus (General Electric) durante 5 min (0.5 ml de solución A; 0.5 ml de solución B). Se reveló por quimioluminiscencia. La membrana se analizó por densitometría de pixeles con el programa Image J.

6.7. Estudios de liberación de [³H]-GABA

Soluciones

- Krebs-Henseleit normal: NaCl (124.5 mM), KCl (3 mM), MgSO₄ (1 mM), KH₂PO₄ (1.2 mM), CaCl₂ (1.8 mM), NaHCO₃ (16.5 mM), glucosa (11 mM) a un pH de 7.4.
- Krebs-Henseleit alto potasio: NaCl (107.5 mM), KCl (15 mM), MgSO₄ (1 mM), KH₂PO₄ (1.2 mM), CaCl₂ (1.8 mM), NaHCO₃ (16.5 mM), Glucosa (11 mM) a un pH de 7.4.

Los experimentos de liberación de [³H]-GABA fueron realizados en rebanadas de la sustancia negra reticulada de ratas con Parkinson experimental y ratas tratadas con L-DOPA divididas en dos grupos: ratas con alta discinesia y ratas con baja discinesia.

Obtención de las Rebanadas de la SNr

El día del experimento, las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical, posteriormente fueron decapitadas y el cerebro fue extraído rápidamente, y fijado en una

caja de Petri a la cual se le agregó solución Krebs-Henseleit fría (4°C). Posteriormente, la caja de Petri se colocó en un vibrátomo (CAMPDEN Instruments Ltd, USA), para realizar cortes coronales de 300 µm de espesor y así obtener la sustancia negra reticulada por micro disección de ambos hemisferios cerebrales de las ratas utilizadas. Las rebanadas obtenidas fueron colocadas en un tubo de ensayo con solución Krebs-Henseleit normal. Una vez obtenidas las rebanadas, fueron estabilizadas en solución Krebs-Henseleit a 37°C con burbujeo constante de O₂/CO₂ (95%/5%), por 30 min.

Marca Radioactiva con [³H]-GABA

Una vez transcurrido el periodo de estabilización, las rebanadas fueron re-suspendidas en solución fisiológica con [³H]-GABA (2 x 10⁻⁸ M, actividad específica 95 Ci/nmol) por 30 min en presencia de ácido aminoxiacético para evitar su degradación. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con Krebs normal, para retirar el exceso de marca radioactiva no capturada. A las rebanadas de SNr ya incubadas con [³H]-GABA se les adicionó ácido nipecótico [10 µM] para evitar la recaptura, posteriormente las rebanadas fueron transferidas a cámaras de perfusión acopladas a un colector de fracciones, donde se incubaron las rebanadas con los fármacos a estudiar para cada condición experimental. Las cámaras fueron perfundidas de forma constante con solución Krebs-Henseleit a 37°C con burbujeo constante, a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Después de un periodo de estabilización y de un lavado de 20 min, se colectaron 4 fracciones de 4 min cada una, de liberación basal (16 min), posteriormente se aplicó un pulso despolarizante de alto K⁺ para inducir la liberación de [³H]-GABA por despolarización de la terminal, elevando las concentraciones de K⁺ de 3 mM a 15 mM durante 24 min, logrando la colecta de 6 fracciones más. Al despolarizar las terminales, se logra la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, con lo que se logra el influjo de calcio a la terminal y posteriormente la fusión de las vesículas a la membrana sináptica, liberando el neurotransmisor por exocitosis. Los fármacos fueron perfundidos 2 fracciones antes del pulso despolarizante con alto K⁺ y durante la duración de este, en los grupos indicados. En cada experimento se corrieron 20 muestras en paralelo, para cada caso experimental se hicieron cuando menos 4 experimentos, con mínimo de 3 réplicas de cada uno. Al término de cada experimento, las rebanadas fueron extraídas de las cámaras de perfusión y les fue adicionado 1 ml de HCl 1 N, con el fin de desintegrar la membrana y cuantificar la radioactividad remanente en el tejido.

Cuantificación de [³H]-GABA liberado

Para cuantificar la radioactividad, se adiciono a cada fracción colectada 7 ml de líquido de centelleo. La radioactividad fue determinada mediante un contador de centelleo líquido. Los resultados fueron obtenidos como liberación fraccional, la cual se obtuvo de la siguiente relación:

$$F.R. = \frac{R.P.F.}{R.P.T}$$

Donde F.R. es la fracción de liberación, calculada mediante el cociente de la radioactividad presente por fracción (R.P.F.), sobre la radioactividad remanente presente en el tejido (R.P.T.). La F.R. se expresó en las gráficas como el cociente de la fracción "X" entre la fracción 4 (fracción inmediata anterior al pulso de K⁺), esto con la finalidad de expresar la fracción de liberación por arriba del valor basal en la curva.

6.8. qRT-PCR

El ARN total se extrajo de los tejidos estriatales utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA) según el protocolo sugerido por el fabricante. El ARN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop Technologies; Wilmington, DE, EUA), y su integridad se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa. El ADNc se obtuvo a partir de 5 µg de ARN total utilizando 1 µL de transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA), 1 µL de Oligo dT (50 µM), 1 µL de mezcla de dNTP (10 mM) y biología molecular de grado acuoso a 13 µL. Las condiciones de transcripción inversa fueron: desnaturalización a 70° C durante 10 min, hibridación a 42° C durante 5 min, síntesis de ADNc a 55° C durante 50 min y luego a 70° C durante 15 min, y eliminación de ARN a 37° C durante 20 min. Finalmente, se añadió 1 µL de RNasa H (Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA) y las muestras se incubaron a 37 ° C durante 20 min. Se utilizó ADNc fresco para amplificar cada gen utilizando sondas TaqMan para calmodulina

VII. RESULTADOS

7.1. Generación de animales discinéticos y no discinéticos en el tratamiento con L-DOPA.

Para determinar si contábamos con una población de animales uniformemente lesionados con la metodología usada, en un grupo de 60 ratas denervadas medimos los cambios en el contenido de dopamina entre el lado control y el tratado con 6-OHDA, 21 d después de la lesión. Como se puede observar en la Figura 12A, en el lado lesionado, tanto en la substancia negra reticulada como en el estriado, se encontró una significativa disminución del contenido de dopamina con respecto al lado control (estriado control: 866 ± 16 vs estriado denervado 108 ± 7.43 ng/mg proteína, $p < 0.001$, prueba t de Student no pareada. SNr control 240 ± 9 vs SNr denervada 25 ± 2 ng/mg proteína, $p < 0.001$, prueba t de Student no pareada). El grado de depleción de la dopamina fue similar en ambos núcleos 90% en promedio. Luego se analizaron los datos rata por rata para determinar la distribución poblacional del porcentaje de depleción de la dopamina, utilizando un ajuste no lineal a un modelo de distribución gaussiana simple y se comparó con el ajuste a la suma de dos poblaciones gaussianas. Los resultados indicaron que los datos corresponden a una sola población, ya que los intentos de ajustarlos a una suma de dos poblaciones mostraron resultados ambiguos en el ajuste. El uso de la prueba de criterios de información de Akaike (AICc) para comparar dos modelos de ajuste, indicó que el modelo más simple de una sola distribución gaussiana tiene una mayor probabilidad de ser el correcto (Figura 12B) (mejor ajuste: media poblacional 94 ± 0.07 , amplitud 21.16 ± 0.64 , desviación estándar (DE) 2.14 ± 0.07 , $r^2 = 0.98$. Comparación de ajustes: diferencia en AICc $-6,37$, probabilidad de distribución gaussiana del modelo de una sola población: 96.03%).

Con el fin de probar si la denervación dopaminérgica produce dos poblaciones diferentes con respecto al giro inducido por anfetamina (Hudson, 1993), también realizamos un análisis poblacional, como hicimos para la depleción de la dopamina (Figura 12C). Los resultados también indican que los datos corresponden a una sola población (mejor ajuste: media poblacional 14.14 ± 0.25 , amplitud 16.85 ± 1.36 , DE 2.74 ± 0.25 , $r^2 = 0.94$ ($r=0.97$). Comparación de ajustes: diferencia en AICc $-36,13$, probabilidad de distribución gaussiana del modelo de una sola población: 99%). La linealidad en la relación entre el grado de denervación medido por el porcentaje de lesión y los giros inducidos por anfetamina se probó mediante un ajuste de regresión lineal simple (Figura 12D) (pendiente 0.52 ± 0.07 , $r^2 = 0.45$, ($r=0.67$) $F = 47.47$, $df = 1.58$, $p < 0.001$). En todos los

experimentos; utilizamos animales con 12 giros por min o más, lo que corresponde a una depleción del 90% o más, garantizando la homogeneidad de la lesión dopaminérgica.

En experimentos llevados a cabo por separado por diferentes estudiantes del laboratorio para diferentes proyectos de estudios de discinesia, se compilaron todos los datos conductuales de conducta de giro inducida por amfetamina y los puntajes de discinesia determinados durante el tratamiento con L-DOPA. Los animales se lesionaron con la misma técnica y se analizaron para determinar si se distribuyen en una o dos poblaciones. En la Figura 12E se muestra la distribución poblacional de los puntajes de AIMS determinados después de tratar a 260 ratas hemiparkinsonianas con L-DOPA durante 20 d. Los resultados se ajustaron a una suma de dos curvas gaussianas (población uno: media 11 ± 1 , amplitud 30 ± 4 y SD 8.6 ± 1.5 ; población dos: media 54 ± 2 , amplitud 22 ± 3 y SD 13 ± 2 , $r^2 = 0.88$). También probamos ajustar los datos a un modelo gaussiano simple; sin embargo, el ajuste cayó a un r^2 de 0.16 ($r=0.4$) y la comparación de ajustes indicó una probabilidad del 97.91% para la suma de dos poblaciones gaussianas frente al 2.09% para el modelo gaussiano simple. Cuando realizamos el análisis poblacional y la tasa de giro inducida por amfetamina reportado, los sujetos se comportaron como si fueran una sola población (Figura 12F) (media poblacional 15 ± 0.15 , amplitud 67 ± 7 y DE 1.25 ± 0.15 , $r^2 = 0.87$ ($r=0.93$)).

La comparación del ajuste frente a un modelo doble gaussiano mostró una probabilidad del 88.91% para el modelo simple en comparación con el 11.09% para la suma de dos gaussianas, indicando que este es el mejor modelo. Por lo tanto, los animales se dividieron de manera muy similar entre los dos grupos: la discinesia severa con 134 animales y la discinesia leve con 126 animales.

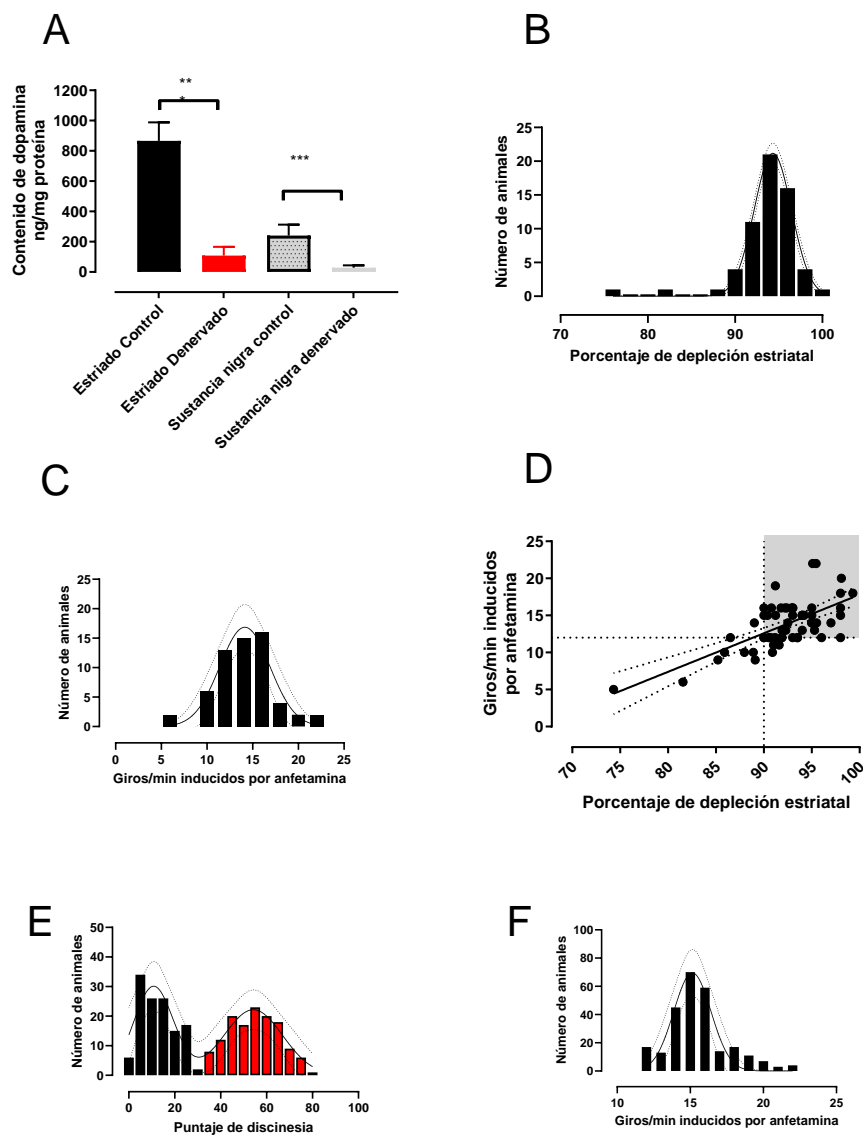


Figura 12. Ratas lesionadas con 6-OHDA con discinesias bajas y ratas discinéticas altas durante el tratamiento con L-DOPA.

A) Se muestra el efecto de la 6-OHDA inyectada en el haz medial del prosencéfalo sobre el contenido de dopamina estriatal y nigral en el lado ipsilateral y contralateral 17 d después de la lesión (media y desviación estándar). **B)** Distribución poblacional del porcentaje de depleción estriatal. **C)** Distribución poblacional de estas ratas agrupadas por giros ipsilaterales/min inducidos por una dosis única de 10 mg/kg de amfetamina intraperitoneal (i.p.) 16 d después de la lesión. **D)** Relación del porcentaje de depleción de dopamina contra los giros inducidos por la amfetamina. **E)** Distribución de la población de un conjunto de 260 animales seleccionados para el reto con amfetamina con más de 12 giros/min y tratados con L-DOPA 10 mg/kg i.p. durante 20 d, agrupados con su score de movimientos involuntarios anormales (AIMs). Las barras negras indican una población correspondiente a un puntaje bajo de discinesias y las barras rojas corresponden a la

segunda población con un score alto. **F)** La distribución poblacional de este mismo conjunto de 260 animales agrupados por giros ipsilaterales/min inducidos por una dosis única de amfetamina (10 mg/kg i.p.) 16 d después de la lesión. *** $p < 0.001$ con respecto al lado control.

7.2. Diferencias en la respuesta terapéutica a L-DOPA en animales con discinesias moderadas y severas.

Para investigar si las discinesias están relacionadas con la diferencia en la respuesta terapéutica a L-DOPA, analizamos el curso temporal del efecto de la administración de una dosis de L-DOPA (10 mg/kg i.p.) en el índice de asimetría de la extremidad, es decir, en el efecto terapéutico (en la sesión conductual los días 4, 9 y 19) y en el puntaje de AIMs, es decir, el efecto discinético (en la sesión conductual los días 5, 10 y 20). Esto se analizó en un conjunto de 17 ratas lesionadas previamente seleccionadas por giro inducido con amfetamina, y luego se separaron en discinéticas moderadas y severas al final del tratamiento con L-DOPA. Los datos del curso temporal del índice de asimetría y las puntuaciones de AIM se compararon en un día de sesión contiguo (es decir, el día 4 para índice de asimetría frente al día 5 para la puntuación AIMs, ya que las medidas se tomaron en diferentes sets de experimentación). En la Figura 13A, C, E, podemos observar que en animales que tuvieron puntajes de discinesia moderada durante la sesión de 180 min (no más de 30 en el puntaje total de la sesión; círculos negros, ejes izquierdos de la Figura 13A, C, E), también mostraron una recuperación en el índice de asimetría de uso de extremidades de 20 a 100 min (círculos rojos, ejes derechos de la Figura 13A, C, E). Este comportamiento se observó los días 4, 9 y 19.

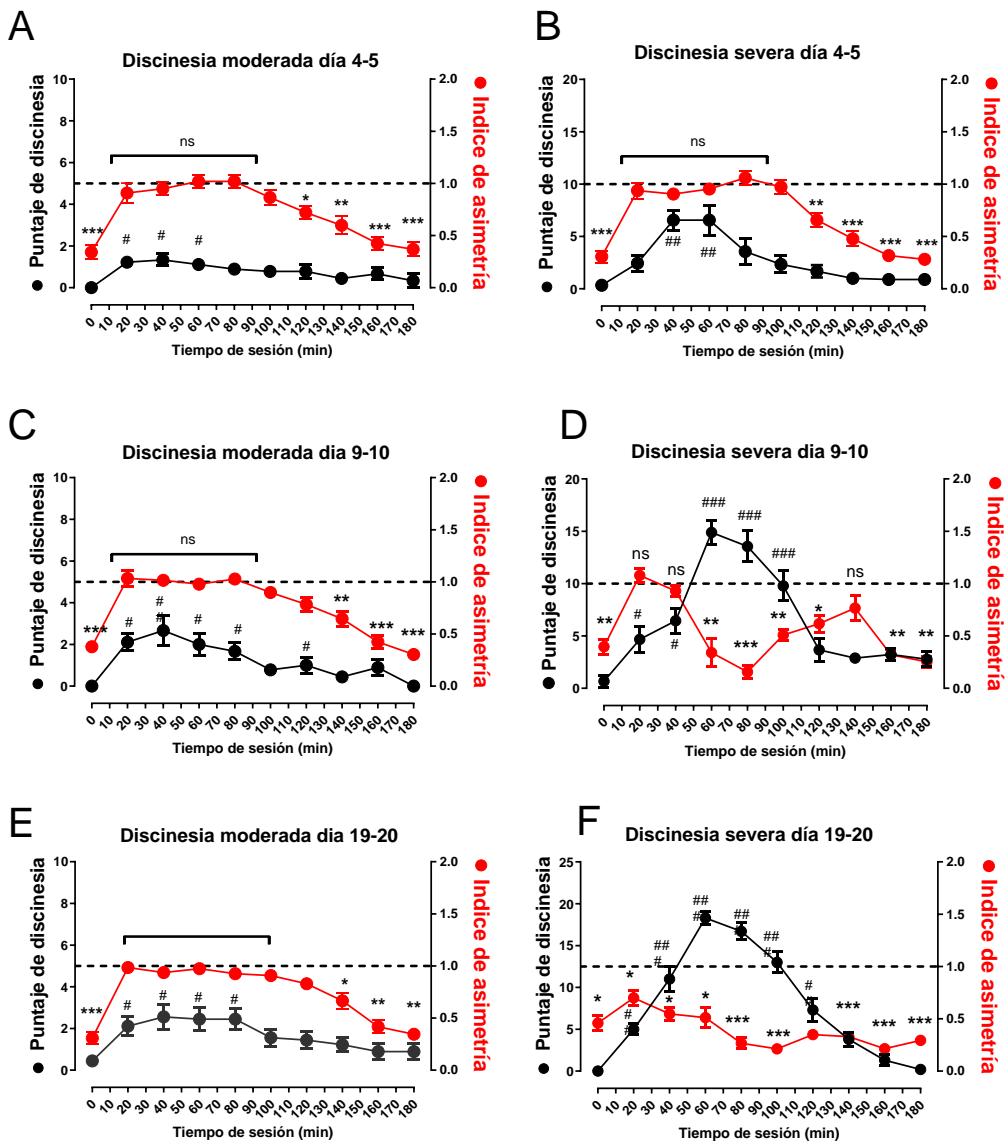


Figura 13. Respuesta terapéutica a la L-DOPA determinada por el índice de asimetría de la extremidad y el puntaje de AIMS en animales discinéticos leves severos

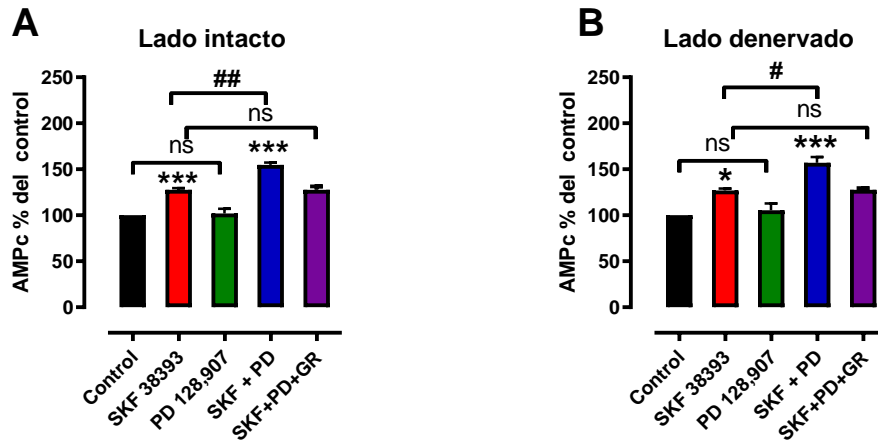
(A, C y E) Los gráficos muestran el curso temporal del índice de asimetría de las extremidades (ejes derechos) y el score AIMS (ejes izquierdos) durante dos sesiones continuas de evaluación del comportamiento (180 min) de una dosis única de L-DOPA en ratas discinéticas moderadas. (B, D y F) Efecto en estos mismos días en un grupo de ratas severamente discinéticas. Los datos representan la media y el error estándar de ocho animales levemente discinéticos contra nueve animales severamente discinéticos. ns= diferencia no significativa, diferencia significativa= *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001, entre los valores del índice de asimetría comparado a 1: #p < 0.05, ##p < 0.01, and ###p < 0.001, con respecto al puntaje de discinesia inicial.

En animales que desarrollaron discinesia severa (>30 en la puntuación total de la sesión; círculos negros, ejes izquierdos de la Figura 13B, D, F) al final del tratamiento con L-DOPA, se puede observar que al inicio del tratamiento (día 5), los animales presentan la respuesta terapéutica adecuada (Figura 13B), mientras que las puntuaciones de discinesia permanecen <10. Este efecto terapéutico se pierde conforme aumenta la puntuación de discinesia. De hecho, hay una pérdida de respuesta terapéutica cuando la discinesia alcanza puntuaciones superiores a 10 y es más evidente en los días 10 y 20 (Figura 13D, F). Curiosamente, las puntuaciones de discinesia se mantuvieron constantes durante la sesión de 180 min en animales con discinesia moderada, pero en animales clasificados como severamente discinéticos, se observa un valor máximo en las puntuaciones casi 60 min después de la inyección. Además, las puntuaciones totales de la sesión se mantuvieron constantes a lo largo de los diferentes días de tratamiento en animales con discinesias moderadas, mientras que las puntuaciones aumentaron con un valor máximo cerca del día 10 en animales con discinesia grave (Figura 13).

7.3. Cambios en la acumulación de [³H]AMPc por los D₃R inducidos por la denervación en animales tratados con L-DOPA.

Los efectos del agonista selectivo de receptores dopaminérgicos D1 (D₁R), SKF38393 (1 μM) y el agonista de receptores dopaminérgicos D3 (D₃R), PD 128,907 (100 nM) sobre la acumulación de [³H]AMPc en sinaptosomas de la SNr de animales pretratados con L-DOPA durante 20 d se muestran en la Figura 14. En ratas en las que el tratamiento con L-DOPA indujo discinesia moderada, los efectos de la coadministración del SKF38393 y el PD 128,907 en los sinaptosomas obtenidos del lado lesionado y no lesionado fueron casi idénticos (Figura 14A, B). SKF38393 estimuló la producción de [³H]AMPc y la coadministración del PD 128,907 potenció aún más la estimulación de la acumulación de [³H]AMPc (p <0.01 en el lado no lesionado; p <0.05 en el lado lesionado). El efecto potenciador producido por PD 128,907 fue prevenido por la administración de 10 nM de GR 103,691, un antagonista selectivo de los receptores dopaminérgicos D3.

Discinesia moderada



Discinesia severa

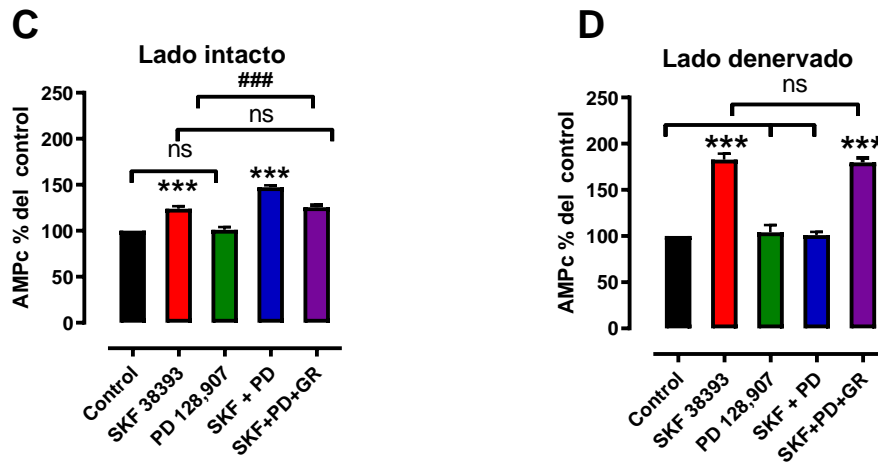


Figura 14. Cambios en la acumulación de AMPc en la SNr de animales que desarrollaron discinesia leve o severa durante el tratamiento con L-DOPA

(A, B) Sinaptosomas obtenidos de animales en los que el tratamiento con L-DOPA produjo discinesia leve. (C, D) Sinaptosomas obtenidos de animales en los que el tratamiento con L-DOPA produjo discinesia severa. ***p < 0,001, comparación con el control; # p < 0.05, ## p < 0,01 y ### p < 0,001, comparación con SKF38393; ns= no significativo entre grupos. Los valores representan la media y el error estándar, n= 3 experimentos, cuatro repeticiones por experimento.

Por otro lado, en los animales que desarrollaron discinesia severa, la estimulación causada por SKF38393 fue significativamente mayor en el lado denervado comparado con el lado no lesionado (acumulación de $[^3\text{H}]\text{AMPc}$ por encima de la del control, $24 \pm 3\%$ en el lado no lesionado vs. $83 \pm 3\%$ en lado lesionado, $p < 0.001$; Figura 14C, D). Además,

el tratamiento conjunto con el agonista del D₃R, PD 128,907 inhibió el efecto estimulante de SKF38393 en el lado lesionado (Figura 14D). El efecto inhibitor producido por PD 128,907 sobre la estimulación de D₁R fue prevenido por el antagonista selectivo de D₃R GR 103,691 (Figura 14D). En el lado no lesionado de animales con discinesia severa, el SKF38383 estimuló significativamente la acumulación de [³H]AMPC ($p < 0,001$) y el co-tratamiento posterior con PD 128,907 aumentó aún más la acumulación de [³H]AMPC (Figura 14C). El efecto potenciador producido por PD 128,907 fue prevenido por el antagonista selectivo de D₃R (Figura 14D).

7.4. Cambios inducidos por la denervación en la liberación de [³H]-GABA estimulada por K⁺ en animales tratados con L-DOPA.

Las respuestas en la liberación de [³H] GABA estimulada por alto K⁺ en rebanadas de la SNr del lado lesionado y no lesionado de los animales tratados con 6-OHDA que recibieron L-DOPA durante 20 d se representan en la Figura 15. En rebanadas obtenidas del lado no lesionado (Figuras 15B y 15E), el agonista del D₃R, PD 128,907, no potenció la liberación de [³H] GABA por arriba del nivel observado en las tratadas solo con SKF 38393 (área relativa, en ratas con discinética moderada: control = 3.54 ± 0.16 vs SKF 38393 = 5.52 ± 0.10 y SKF 38393 + PD 128,907 = 5.03 ± 0.30 , $p < 0,001$ con respecto al control y ns, entre SKF 38393 y SKF 38393 + PD 128,907, $F = 36,64$, grados de libertad = 3, ANOVA seguida de la prueba de Tukey. En ratas con discinesia severa: control = 3.83 ± 0.15 vs. a SKF 38393 = 5.18 ± 0.40 y SKF 38393 + PD 128,907 = 5.17 ± 0.31 , $p < 0,05$ con respecto control y sin diferencia estadística entre SKF 38393 y SKF 38393 + PD 128,907, $F = 8.23$, $df = 3$, ANOVA seguida de la prueba de Tukey, Figura 15B y 15E).

La ausencia de una respuesta a la estimulación de D₃R es probablemente la consecuencia de la activación de CaMKII α inducida por la despolarización con K⁺ que a su vez bloquea los efectos de la activación de D₃R (Figura 15) (Avalos-Fuentes et al., 2015).

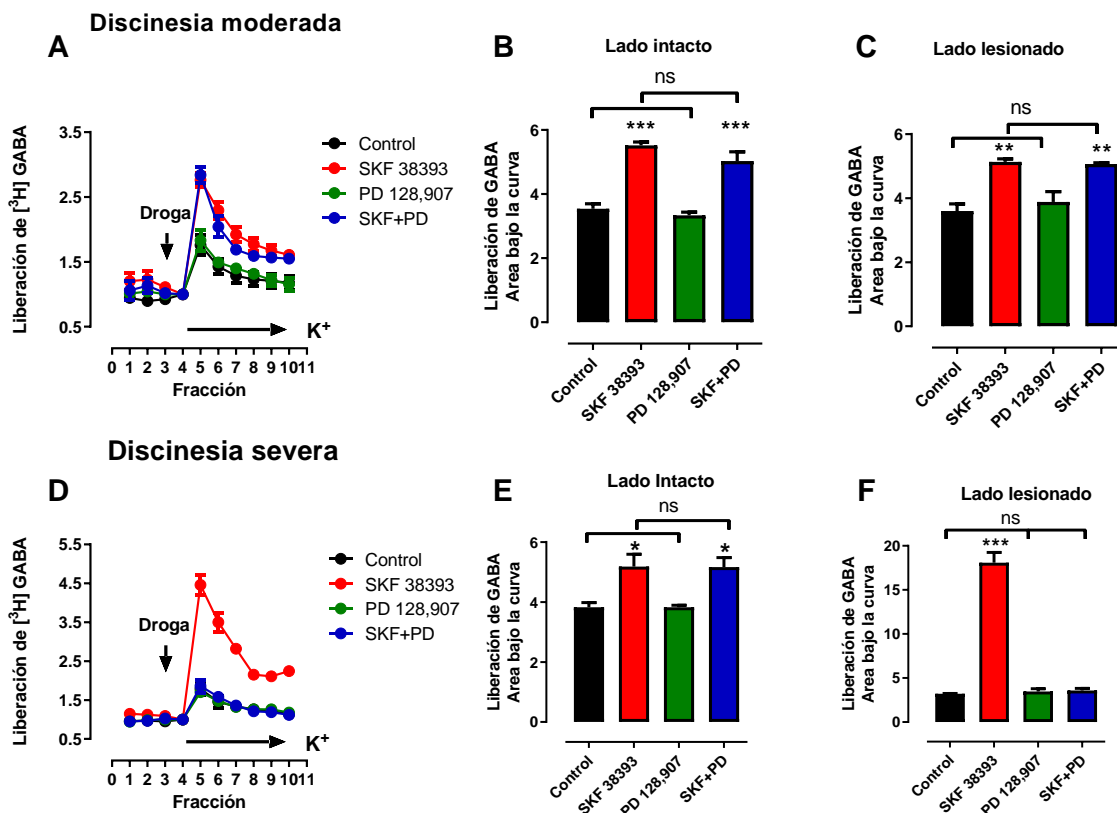


Figura 15. Efectos de la activación de D3R en la estimulación de D1R en la liberación de [³H]-GABA inducida por despolarización con K⁺ en cortes de SNr

(A, D) Curso temporal de la respuesta inducida por despolarización con K⁺. La flecha vertical indica el momento en que se inició la perfusión con los fármacos, mientras que la flecha horizontal representa el tiempo en que se perfundió con 20 mM de la solución de K⁺. (B, E) Liberación de GABA en el lado intacto de animales con discinesias moderadas y severas respectivamente. (C, F) Liberación de GABA en el lado lesionado de animales con discinesias moderadas y severas respectivamente.

En ratas en las que el tratamiento con L-DOPA indujo discinesia moderada, los efectos del cotratamiento con SKF 38393 y PD 128,907 en rebanadas del lado lesionado y no lesionado fueron casi idénticos (Figuras 15B y 15C), es decir, el tratamiento previene los efectos de la denervación. En estos experimentos, el SKF 38393 aumentó la liberación de GABA, mientras que la coadministración con PD 128,907 no potenció la estimulación (área relativa, en el lado no lesionado: control = 3.54 ± 0.16 frente a SKF 38393 = 5.52 ± 0.10 y SKF 38393 + PD 128,907 = 5.03 ± 0.30, p <0,001 con respecto al control y ns entre SKF 38393 y SKF 38393 + PD 128,907, F = 36,64, gl = 3, ANOVA unidireccional seguido de Tukey. En el lado lesionado: control = 3,60 ± 0,22 frente a SKF 38393 = 5,13 ± 0,09 y

SKF 38393 + PD 128,907 = $5,08 \pm 0,03$, $p < 0,01$ SKF 38393 frente al control y ns entre SKF 38393 y SKF 38393 + PD 128,907, $F = 15,73$, $df = 3$, ANOVA unidireccional seguido de Tukey, Figura 15B y 15C).

En rebanadas del lado denervado de animales con discinesia severa, SKF 38393 solo potenció la liberación de [3 H]-GABA estimulada por K^+ hasta un nivel aproximadamente 3 veces mayor que el observado en el nivel de control. Esta estimulación es significativamente mayor que la encontrada en el lado no lesionado (área relativa SKF 38393 = $5,18 \pm 0,40$ en el lado no lesionado vs SKF 38393 = $18,08 \pm 1,19$ en el lado desnervado, $p < 0,001$, prueba t de Student, Figura 15E y 15F). Esta estimulación se evitó por completo cuando se administró el PD 128,907 simultáneamente (área relativa SKF 38393 = $18,08 \pm 1,19$ vs SKF 38393+ PD 128,907 = $3,58 \pm 0,25$, $p < 0,001$, $F = 139,2$, $gl = 3$, ANOVA de una vía seguido de Tukey, Figura 15F).

7.5. Regulación de la actividad de los receptores dopaminérgicos D1 y D3 por el sistema CaM-CaMKII en ratas tratadas con L-DOPA

Previamente, demostramos que los efectos estimulantes de la activación de D_3R sobre la liberación de [3 H]-GABA estaban ausentes durante la despolarización de K^+ en tejidos no lesionados, en un proceso mediado por la activación dependiente de fosforilación de CaMKII α (Avalos-Fuentes et al., 2013). Por lo tanto, con el fin de estudiar sólo el papel de D_3R en la liberación de GABA, la inhibición de la acción del D_3R mediada por CaMKII α se evitó mediante el inhibidor selectivo KN-62 (4 μ M) en este conjunto de experimentos.

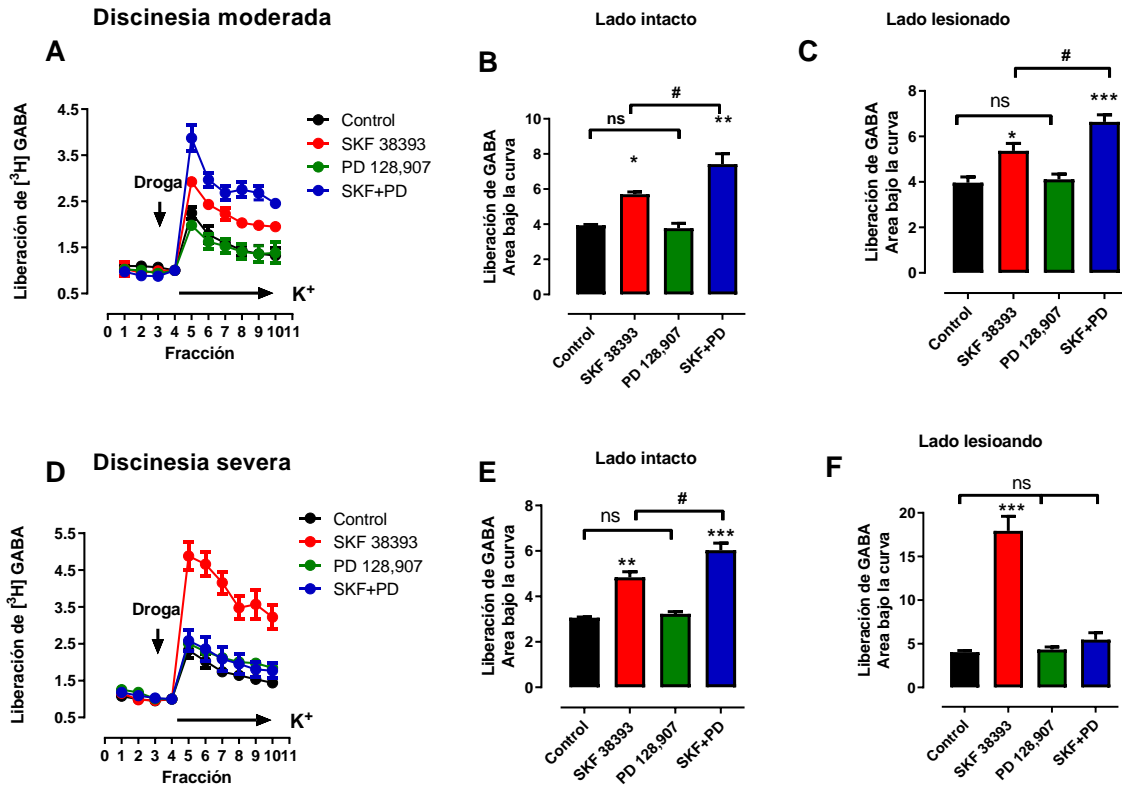


Figura 16. Efectos de la activación de D3R en la estimulación de D1R en la liberación de [³H]-GABA inducida por despolarización con K⁺ en cortes de SNr

(A, D) Curso temporal de la respuesta inducida por despolarización con K⁺. La flecha vertical indica el momento en que se inició la perfusión con los fármacos, mientras que la flecha horizontal representa el tiempo en que se perfundió con 20 mM de la solución de K⁺. (B, E) Liberación de GABA en el lado intacto de animales con discinesias moderadas y severas respectivamente. (C, F) Liberación de GABA en el lado lesionado de animales con discinesias moderadas y severas respectivamente.

En el lado no lesionado de los animales con discinesia leve (Figura 16E) o severa (Figura 16F), la estimulación de D₃R con PD 128,907 potenció los efectos del agonista de D₁R el SKF38393 en un grado similar. Así mismo, en el lado lesionado de animales con discinesia leve, la estimulación de D₃R con PD 128,907 también potenció los efectos del agonista D₁R, SKF38393 (Figura 16C). Sin embargo, en el lado denervado de los animales con discinesia severa, la administración del agonista de D₃R PD 128,907 previno los efectos estimulantes de la activación de D₁R con SKF38393 (Figura 16D).

La comparación de la Figura 16C y 16D reveló que, en animales con discinesia severa,

los efectos de SKF38393 fueron significativamente mayores ($p < 0,001$) en las rebanadas obtenidas del lado lesionado ($17.94 \pm 1,65$) comparado con los cortes del lado no lesionado ($4.84 \pm 0,20$).

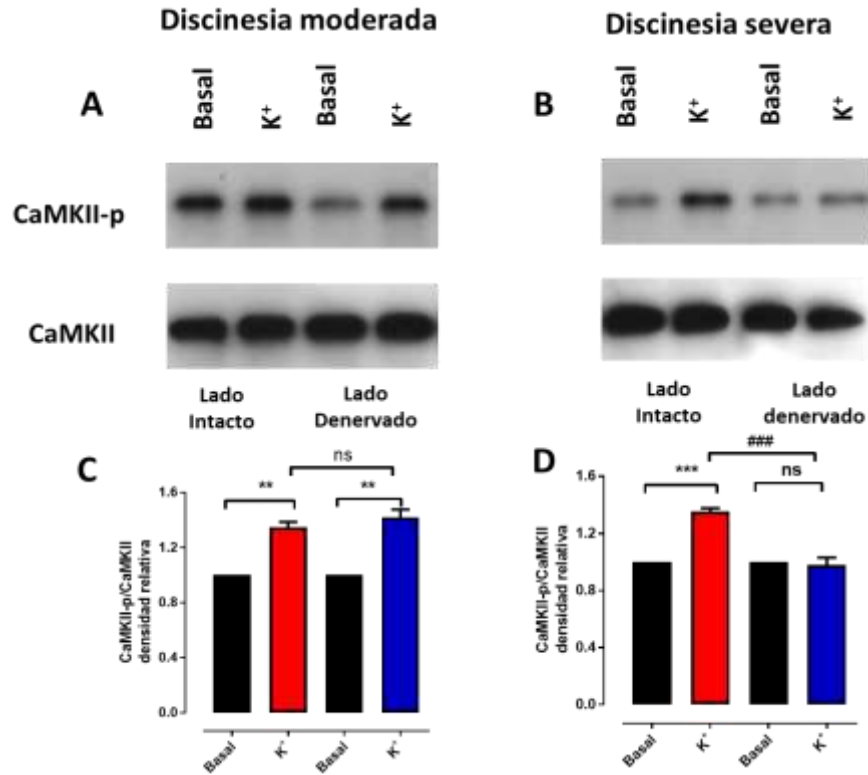


Figura 17. Fosforilación de CaMKII α en sinaptosomas de la SNr en condiciones basales y con alto K⁺ en sinaptosomas de SNr provenientes de ratas discinéticas y no discinéticas tratadas con L-DOPA

(A y B) *Western blots* representativos de la expresión de la CAMKII fosforilada y total en sinaptosomas de SNr provenientes del lado denervado de ratas hemiparkinsonicas moderada y severamente discinéticas, respectivamente. (C y D), es el análisis densitométrico de 4 determinaciones.

Avalos-Fuentes et al., en el 2015, encontraron que los mecanismos de señalización que involucran a los receptores dopaminérgicos D1 y D3, incluyendo los complejos heterodiméricos que forman, están influenciados por el incremento de Ca²⁺ en las terminales nerviosas, en donde participa todo un sistema completo de macro complejos proteicos modulados por proteínas sensoras de Ca²⁺, principalmente la calmodulina (CaM) y su principal efector la CaMKII α . Mediante experimentos de *Western blot*, mostraron que la fosforilación de CaMKII α no se modifica por la despolarización con alto K⁺ durante la denervación. Para determinar si el grado de discinesias influye sobre la

fosforilación de CaMKII α , se realizaron experimentos de *Western blot* en sinaptosomas de la SNr de ratas con discinesias moderadas y en sinaptosomas de ratas con discinesias severas. En la Figura 17 se observa en la población de ratas con discinesias severas, que la despolarización de los sinaptosomas aislados del lado no lesionado durante 10 min con 20 mM de K⁺ aumentó notablemente la fosforilación de CaMKII α (DO relativa 1 frente a 1.35 ± 0.02 pulg. discinesia leve, $p < 0.01$, $t = 8.905$, $gl = 3$, prueba t de Student; y 1 vs. 1.34 ± 0.04 en discinesia severa, $p < 0.001$, $t = 15.25$, $gl = 3$, prueba t de Student). En los sinaptosomas obtenidos del lado lesionado de animales con discinesias leves, la despolarización de K⁺ produjo incrementos en la fosforilación de CaMKII α que fueron similares en los no lesionados (DO relativa 1 vs. 1.42 ± 0.06 , $p < 0.01$, $t = 7.367$, $gl = 3$, prueba t de Student). En los sinaptosomas obtenidos de animales con discinesia severa, la despolarización de K⁺ no aumentó la fosforilación de CaMKII α en el lado lesionado (DO relativa 1 frente a 0.98 ± 0.05 , ns, $t = 0.3910$, $gl = 3$, prueba t de Student).

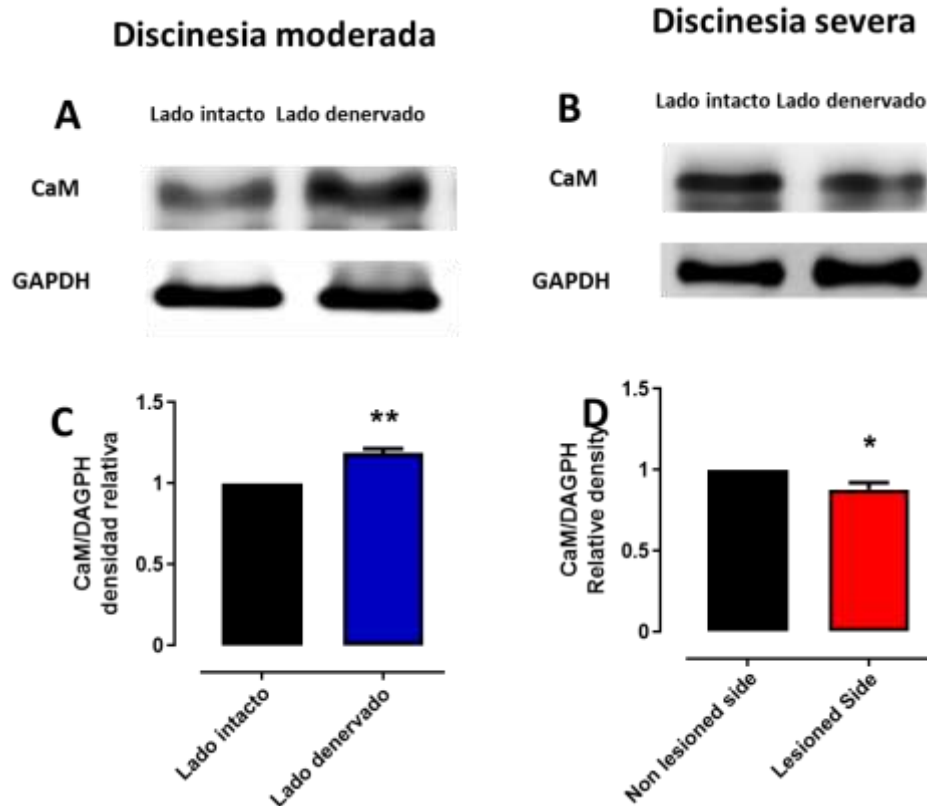


Figura 18. Cambios en la expresión de la CaM en sinaptosomas de SNr, provenientes de ratas hemiparkinsonicas tratadas con L-DOPA con discinesia moderada y severa

A y B *Western blots* representativos de la expresión de la CaM en sinaptosomas de SNr provenientes del lado denervado de ratas hemiparkinsonicas moderada y severamente discinéticas respectivamente. **C y D**,

Análisis densimétrico de 4 determinaciones. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 3$ determinaciones. Prueba t de Student.

Debido a que el aumento de Ca^{2+} citoplasmático estimula la unión de Ca^{2+}/CaM al dominio regulador de $CaMKII\alpha$, y esto aumenta la fosforilación del dominio regulador y un sitio de autofosforilación dentro de la enzima, analizamos si la denervación también afecta la expresión de la CaM en sinaptosomas de la SNr de ratas con discinesias moderadas y ratas con discinesias severas, observando que un incremento significativo en la expresión de la proteína CaM en el lado lesionado, comparado con el lado intacto de las ratas con discinesias moderadas (Figura 18 A y C). Contrario a esto, en las ratas con discinesias severas, en el lado denervado se observó una menor expresión de la CaM comparado con el lado intacto (Figura 18 B y D). De este modo, es probable que la disminución en la expresión de la CaM en el lado denervado de ratas con discinesias severas, provocara un menor grado de fosforilación de la $CaMKII\alpha$ (Figura 17 B y D), como en el caso de las ratas con discinesias moderadas (Figura 17 A y C).

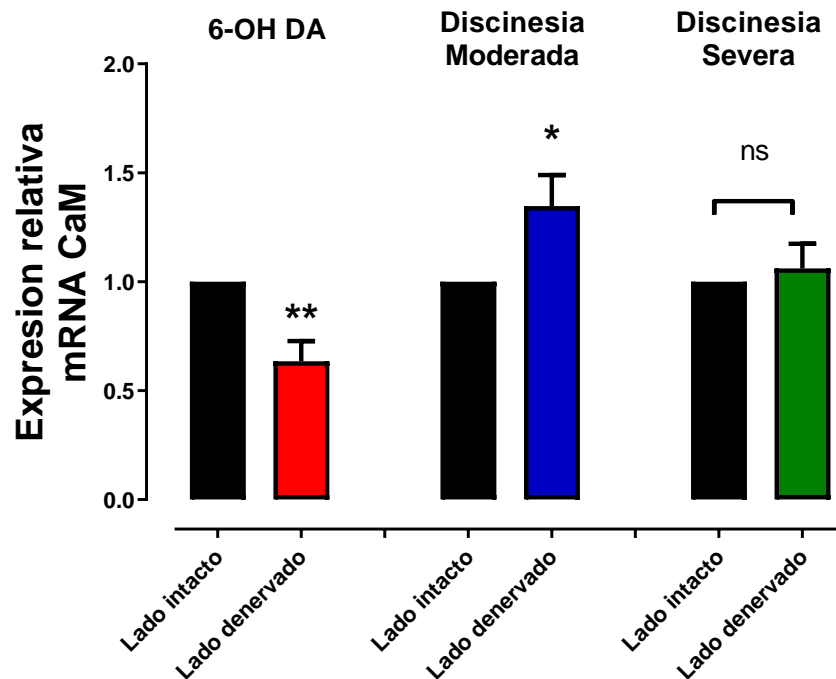


Figura 19. Efecto de la denervación y el tratamiento con L-DOPA en la expresión del ARNm de CaM en rebanadas de estriado

Se muestra la expresión relativa del ARNm de la CaM en estriado del lado control y del lado denervado de ratas hemiparkinsonicas tratadas con L-DOPA y separadas en moderada y severamente discinéticas. * $p < 0.05$,

**<0.01, ns, sin diferencia estadística. n= 4 determinaciones. Prueba t de Student.

Por último, para ver si la disminución de la CaM fue a nivel de la traducción a proteína o a nivel de la transcripción, determinamos los niveles de expresión del ARNm de la CaM en ratas lesionadas con 6-OHDA, en ratas con discinesias moderadas y en ratas con discinesias severas. Observamos que en las ratas lesionadas con 6-OHDA, se manifiesta una disminución significativa de los niveles de expresión del ARNm, mientras que, en las ratas con discinesias moderadas, al igual que a nivel de proteína (Figura 18 A y C), hay un incremento en el ARNm de la CaM. Solo en el grupo de ratas con discinesias severas, no se presentan diferencias en los patrones de expresión del mensajero (Figura 19).

VIII. DISCUSIÓN

8.1. Poblaciones con discinesias inducidas por L-DOPA (LID) obtenidas de ratas con el mismo grado de lesión.

Nuestros datos muestran que al utilizar un protocolo uniforme de lesión y tratamiento con L-DOPA en ratas hemiparkinsonianas, del grupo de animales experimentales se obtuvieron dos subpoblaciones: una con discinesias leves y otras con discinesias severas (Figura 12E). En nuestro modelo, la uniformidad de las lesiones inducidas por 6-OHDA se determinó mediante la depleción de la dopamina y su correlación con los giros inducidos por anfetamina (Figura 12D). De acuerdo con estudios previos (Putterman et al., 2007; Przedbroski et al., 1995; Hudson et al., 1993; Boix et al., 2015; Iancu et al., 2005), la tasa de giros inducidos por la anfetamina y el nivel de lesión dopaminérgica se relacionan linealmente, lo que nos permitió la selección de animales con los grados más altos de lesiones (Figura 12D), más del 90% de los animales tuvieron el mismo comportamiento por lo que se considera un grupo homogéneo. Además, el análisis poblacional de ambos parámetros, la conducta de giro y la depleción de dopamina, mostró una sola población de estudio (Figura 12B, C).

La variabilidad en la gravedad de la LID se ha reconocido previamente tanto en pacientes como en estudios experimentales (Bastide et al., 2015; O'Sullivan et al., 2008; Ahlskog & Muentner, 2001). En nuestro caso los datos se ajustan bien a la suma de dos modelos gaussianos, lo que indica dos poblaciones diferentes y sugiere límites para que los individuos puedan clasificarse. Estas diferencias cualitativas entre las dos poblaciones se presentan ante un mismo esquema de tratamiento, por lo que la diferencia en la severidad de la LID probablemente está vinculada a la diferente expresión de los mecanismos moleculares y no a las diferencias en el protocolo de tratamiento, lo que concuerda con reportes anteriores (Nadjar et al., 2009). Por ejemplo, los cambios en la expresión de los receptores dopaminérgicos D3 reportados y sus efectos sobre la acumulación de AMPc y la liberación de GABA observados previamente en la denervación (Avalos-Fuentes et al., 2015) continúan y aumentan en animales que desarrollan discinesia severa, apoyando la idea de que los cambios moleculares iniciados previamente aumentan solo en estos animales (Figuras 14D y 15D). Por lo que consideramos que la LID también se encuentra relacionada con factores intrínsecos, los cuales posiblemente sean genéticos (Sharma et al., 2010). Esta noción está respaldada por estudios que han mostrado que las características genéticas son los principales factores que influyen en la susceptibilidad a

las discinesias en pacientes con la enfermedad de Parkinson (Dos Santos et al., 2019; Martín-Flores et al., 2019) y están asociados con los receptores dopaminérgicos y vías de señalización que se alteran en el proceso.

8.2. Discinesias inducidas por L-DOPA (LID) y respuesta terapéutica a L-DOPA

Nuestros datos también mostraron una respuesta terapéutica diferente a la L-DOPA relacionada con animales con discinesia leve y discinesia severa; las ratas con discinesia severa perdieron la recuperación del uso de las extremidades cerca del día 10 de tratamiento, mientras que las ratas con discinesia leve la retuvieron. Esto indica que los animales con puntuaciones discinéticas leves mantienen una ventana terapéutica en respuesta al tratamiento con L-DOPA que permanece constante durante todo el tratamiento, tal y como ocurre en los pacientes que no desarrollan discinesia (Cerasa et al., 2013), mientras que, en animales con discinesias graves, esta ventana se pierde a medida que continúa el tratamiento y las puntuaciones LID continúan aumentando. A este respecto, se ha demostrado que los síntomas parkinsonianos están presentes durante la LID de dosis máxima (Luquin et al., 1992; Fox & Lang, 2008; Goubault et al., 2018). Esto también ocurre en el modelo animal aquí empleado, lo que sugiere que la pérdida del efecto terapéutico comprende otra característica de las diferencias entre animales con discinesia moderada y severa.

En los estudios de Fiorentini y colaboradores también se identificaron dos poblaciones de animales tratados con L-DOPA mediante la evaluación de los efectos terapéuticos de L-DOPA sobre la acinesia unilateral de ratas lesionadas con 6-OHDA y las puntuaciones de AIM inducidas por L-DOPA (Fiorentini et al., 2006, 2008). Estos criterios relacionan la respuesta terapéutica medida por la pérdida de la recuperación de la asimetría en el uso de las extremidades con puntuaciones discinéticas altas y viceversa, es decir, la mejora de la asimetría en el uso de las extremidades con puntuaciones discinéticas bajas. En nuestro estudio, la puntuación de AIM también identificó dos poblaciones de ratas tratadas con L-DOPA, que fueron notablemente similares a las descritas por Fiorentini et al. Las puntuaciones para determinar animales no discinéticos y discinéticos también fueron similares a las obtenidas en el presente estudio cuando se ajustaron a períodos de observación más cortos (120 min frente a 180 min en este estudio). Además, la dosis de L-DOPA empleada fue la misma (10 mg/kg) y la proporción relativa de animales no discinéticos encontrados fue aproximadamente del 39% (correspondiente a nuestro grupo levemente discinético) frente al 46% en nuestro estudio. Esto indica que ambos ensayos

con grados similares de lesión (95% frente a 94%) y una dosis similar de L-DOPA permiten separar a los dos grupos. Por tanto, la pérdida del efecto terapéutico asociado con puntuaciones discinéticas altas y viceversa podría representar la expresión de factores intrínsecos relacionados con la terapia con L-DOPA. En apoyo de esta hipótesis, otros estudios en los que se emplearon diferentes medidas de daño dopaminérgico de más del 90%, obtuvieron animales con discinesias severas y no discinéticos o levemente discinéticos en proporciones similares con protocolos de tratamiento similares (Carta et al., 2006; Cenci et al., 1998; Giorgi et al., 2008; Picconi et al., 2003; Rangel-Barajas et al., 2011; Sancesario et al., 2014). Por lo tanto, hasta donde tenemos conocimiento por la búsqueda en la literatura, nuestro estudio demostró por primera vez que estos grupos representan diferentes poblaciones de sujetos.

8.3. Los cambios en la formación de AMPc determinan las discinesias inducidas por L-DOPA (LID)

En su estado normal, el D₃R potencia el efecto del D₁R sobre la liberación de GABA y AMPc en las neuronas estriado-nigrales durante la denervación (Cruz-Trujillo et al., 2013), esta interacción se vuelve antagónica (Avalos-Fuentes et al., 2015), y se supone que el tratamiento con L-DOPA debería restaurarla. Sin embargo, en nuestro estudio, esto solo ocurrió en animales levemente discinéticos, mientras que, en animales severamente discinéticos, la interacción antagonista fue mayor.

Se han identificado muchas anomalías neuroquímicas durante la generación de LID (Bastide et al., 2015). Quizás la más relevante de esas anomalías, en términos de los presentes hallazgos, son los cambios en la vía de señalización D₁R-cAMP-PKA, porque la señalización D₃R depende de las interacciones con D₁R. Los LID se asocian con un mayor reclutamiento de D₁R en la superficie celular (Feyder et al., 2011) y con la sobreexpresión de adenilil ciclasa tipo 5 (ACV) en neuronas de la vía directa (Fisone & Bezard, 2011; Rangel-Barajas et al., 2011). En el presente estudio y en datos experimentales obtenidos anteriormente (Rangel-Barajas et al., 2011), se ha encontrado un aumento en la producción de AMPc estimulada por D₁R en animales denervados con discinesia severa que fue superior al producido en animales con discinesia leve. Esta vía adicional a través de la transducción de señales mediada por D₁R-cAMP-PKA, puede ser una anomalía subyacente importante implicada en la generación de LID, ya que está relacionada con la liberación de GABA.

8.4. Cambios del D₃R y discinesias inducidas por L-DOPA (LID)

Las dos poblaciones LID también se correlacionaron con diferentes respuestas en la señalización D₃R. Los cambios en la liberación de GABA inducidos por la activación de D₃R fueron muy diferentes en los dos grupos (Figura 15). La activación de D₃R en la SNr se transformó durante la denervación de una respuesta potenciadora "atípica" a una respuesta inhibitora "típica" (Avalos-Fuentes et al., 2015), mientras que el tratamiento con L-DOPA fue capaz de revertir este cambio solo en los animales con discinesia leve. Por tanto, en animales tratados con L-DOPA con discinesia grave, la activación de D₃R inhibió la estimulación provocada por la activación de D₁R (Figura 15D). Este cambio drástico en la respuesta sugiere que puede ser un marcador adecuado para analizar los cambios moleculares subyacentes inducidos por la denervación y la L-DOPA. Esta señalización típica de D₃R en la liberación de GABA es un resultado contradictorio cuando se intenta explicar el comportamiento motor y la discinesia. Se trata de movimientos exagerados e incontrolados que podrían entenderse mejor si asumiéramos la señalización atípica.

Durante bastante tiempo se ha aceptado que los LID se generan por la depresión de la descarga neuronal en las principales estructuras de salida de los ganglios basales (GPi y SNr), lo que conduce a un aumento del tráfico de impulsos a través de los núcleos del tálamo (Albin et al., 1989; DeLong, 1990). En este sentido, tanto los estudios *in vitro* como las determinaciones de microdiálisis *in vivo* (Mela et al., 2007) (Mela et al., 2012) han demostrado que la LID se asocia a un aumento de la liberación de GABA inducida por L-DOPA en la SNr. Nuestro trabajo muestra que la estimulación a los D₃R deprime la liberación de GABA inducida por la estimulación por D₁R en la SNr cuando hay discinesia severa. Se espera que tal liberación reducida de GABA aumente la activación de las neuronas SNr y deprima los núcleos de retransmisión del tálamo, inhibiendo así el movimiento y el LID (Deniau et al., 2007; Windels & Kiyatkin, 2004). Es decir, la activación de D₃R en terminales GABAérgicas de la SNr de animales con LID grave debería ejercer un efecto antidiscinético. De acuerdo con este punto de vista, se ha observado que los agonistas D₃R deprimen la LID (Bezard et al., 2003; Kumar et al., 2009; Riddle et al., 2011). Sin embargo, otros reportes han demostrado que los antagonistas de D₃R (Riddle et al., 2011; Kumar et al., 2005; Kumar et al., 2009; Visanji et al., 2009) y la delección de D₃R (Solís et al., 2017) también reducen la LID. El único hallazgo diferente está en el informe de Mela y colaboradores (2010), quienes mostraron que el antagonista S33084 no disminuye la LID. Algunas de las inconsistencias entre los estudios podrían explicarse

parcialmente por las diferencias en el diseño experimental y la falta de especificidad adecuada de los ligandos D₃R probados. Por lo tanto, otros circuitos o cambios neuroquímicos también pueden estar involucrados críticamente en el proceso. Por ejemplo, los D₃R también se expresan en proyecciones subtalámicas al SNr (Flores et al., 1999), donde deprimen la liberación del transmisor (Briones-Lizardi et al., 2019; Ibanez-Sandoval et al., 2006). Esta vía subtalámico-nigral podría jugar un papel importante en la generación y manejo de LID, porque el bloqueo de D₃R aumentaría la liberación de glutamato que, a su vez, activaría los receptores ionotrópicos en los cuerpos celulares y las dendritas de las neuronas en la SNr, aumentando su tasa de activación. (Deniau et al., 2007). Este aumento de la velocidad de disparo deprimiría la actividad motora, un efecto que estaría de acuerdo con el efecto antidiscinético de los antagonistas D₃R (Riddle et al., 2011; Kumar et al., 2005; Kumar et al., 2009; Visanji et al., 2009).

Finalmente, observaciones recientes sugieren que la generación de LID está relacionada con la activación de los D₁R y los D₃R de forma independiente, y que la coactivación potencia su efecto sobre LID, lo que indica que diferentes tipos de interacciones entre D₁R y D₃R pueden ocurrir a nivel de señalización y que ello podría estar relacionado con la discinesia (Lanza et al., 2018). La señalización de ERK podría desempeñar un papel importante, ya que D₁R y D₃R sinergizan y potencian la señalización a través de esta cinasa (Feyder et al., 2011) y se sobreexpresan en animales discinéticos (Farré et al., 2015). Desde nuestro punto de vista, varios circuitos, receptores dopaminérgicos o interacciones entre receptores podrían ser responsables de la liberación aumentada en la discinesia, por lo que sería factible el medir niveles bajos de AMPc. Este cambio en el segundo mensajero, junto con los cambios en la expresión de proteínas relacionados con su síntesis, como la AC V (Rangel-Barajas et al., 2011), son algunos de los factores intrínsecos relacionados con la expresión de discinesia en animales.

8.5. Modulación por CaMKII.

El papel de CaMKII en la regulación de la transmisión sináptica en los ganglios basales es complejo. Cuando se recluta CaMKII en sitios sinápticos en respuesta al influjo de Ca²⁺, se modifica la función de al menos dos tipos de receptores. El primer receptor que se identificó como diana de CaMKII fue el receptor a NMDA (Gardoni et al., 1998; Colbran & Brown, 2004; Bayer et al., 2006). Más recientemente, también se ha demostrado la modulación del D₃R por CaMKII (Liu et al., 2009; Avalos-Fuentes et al., 2015; Avalos-Fuentes et al., 2013).

Los resultados de los experimentos mostrados en la Figura 15 revelan que en la SNr la depresión inducida por la denervación de la fosforilación de CaMKII dependiente de la despolarización se revirtió mediante el tratamiento con L-DOPA en animales con discinesia leve pero no en animales con discinesia grave. Por el contrario, diversos estudios en los que se analiza el control del receptor de NMDA por la CaMKII (Yang et al., 2013; Zhang et al., 2014) muestran que la actividad de CaMKII y la fosforilación aumenta durante la producción de LID. Además, en algunos de estos estudios se encontró que los antagonistas de CaMKII disminuyen la generación de LID, lo que implica que la actividad alta de CaMKII está implicada en la generación de LID (Yang et al., 2013).

Paradójicamente, los hallazgos de los estudios de modulación del receptor NMDA por CaMKII α durante la privación de dopamina conducen a hallazgos contrastantes. Moriguchi y colaboradores (2012) muestran que después del tratamiento con MPTP, la autofosforilación de CaMKII y la inducción de LTP disminuyen significativamente en el hipocampo del ratón. La autofosforilación de CaMKII en el cuerpo estriado de los ratones también disminuyó significativamente (Moriguchi et al., 2012). Por el contrario, Picconi y colaboradores (2004) encontraron que después de la denervación, los niveles de autofosforilación de CaMKII en la fracción insoluble de tritón obtenida del cuerpo estriado aumentaron mientras que la inducción de LTP disminuyó (Picconi et al., 2004). También encontraron que la administración intra-estriatal del inhibidor de CaMKII, KN-93 revirtió los efectos fisiológicos de la denervación.

Las discrepancias entre los diferentes estudios podrían deberse a diferencias en la expresión y el reclutamiento de CaMKII en diferentes sitios neuronales. CaMKII se encuentra en gran abundancia en sitios sinápticos (Colbran & Brown, 2004) y puede ser reclutada de manera diferencial por diferentes receptores sinápticos (Avalos-Fuentes et al., 2015; Avalos-Fuentes et al., 2013; Colbran & Brown, 2004; Liu et al., 2009). Por ejemplo, cuando se consideran las interacciones con D₃R, la fosforilación de CaMKII inhibe la función de D₃R en las sinapsis del núcleo accumbens, pero no en la sustancia negra compacta (Liu et al., 2009). En la SNr los efectos de la activación de CaMKII son heterogéneos, por una parte, inhibe la modulación D₃R de la liberación de GABA por proyecciones estriadonigrales (Avalos-Fuentes et al., 2015; figuras 4 y 5 del estudio actual) pero no la liberación de glutamato por proyecciones subtalomonigrales (Briones et al., 2016). Evidentemente, la identificación de la gama completa de cambios en la función de CaMKII en diferentes sitios y su contribución a la inducción de LID requiere más

investigación. Probablemente la respuesta se encuentre en los cambios de expresión de la CaM. En nuestro estudio los animales con discinesia severa tienen menor expresión tanto de la proteína, como del mensajero de la CaM, lo que es similar a la denervación y que implica menor estimulación de la actividad de la CAMKII, lo cual conduce a una menor regulación de la actividad de los receptores dopaminérgicos D₃R que escapan de su control.

IX. CONCLUSIONES

1. Las dos poblaciones de animales moderada y severamente discinéticos provienen de animales con un mismo grado de denervación dopaminérgica.
2. Los animales severamente discinéticos pierden el efecto terapéutico de la L-DOPA durante la crisis discinética.
3. La actividad de los receptores dopaminérgicos D1, D3, la adenilil ciclasa y la CaMKII son diferentes a la condición normal y exacerbada en la discinesia severa con respecto a la denervación dopaminérgica, lo que indica que son factores alterados intrínsecamente a los individuos de esta población de animales severamente discinéticos y no al tratamiento con L-DOPA.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, N., Lucking, C. B., Ricard, S., Durr, A., Bonifati, V., De Michele, G., Bouley, S., Vaughan, J. R., Gasser, T., Marconi, R., Broussolle, E., Brefel-Courbon, C., Harhangi, B. S., Oostra, B. A., Fabrizio, E., Bohme, G. A., Pradier, L., Wood, N. W., Filla, A., . . . Brice, A. (1999). A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Hum Mol Genet*, *8*(4), 567-574. 10072423
- Ahlskog, J. E., & Muentner, M. D. (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), 448-458.
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, *12*(10), 366-375. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2479133>
- Alcacer, C., Santini, E., Valjent, E., Gaven, F., Girault, J. A., & Herve, D. (2012). Galpha(olf) mutation allows parsing the role of cAMP-dependent and extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *J Neurosci*, *32*(17), 5900-5910. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0837-12.2012>
- Ascherio, A., & Schwarzschild, M. A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology*, *15*(12), 1257-1272.
- Avalos-Fuentes, A., Albarran-Bravo, S., Loya-Lopez, S., Cortes, H., Recillas-Morales, S., Magana, J. J., Paz-Bermudez, F., Rangel-Barajas, C., Aceves, J., Erlij, D., & Floran, B. (2015). Dopaminergic denervation switches dopamine D3 receptor signaling and disrupts its Ca(2+) dependent modulation by CaMKII and calmodulin in striatonigral projections of the rat. *Neurobiol Dis*, *74*, 336-346. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.12.008>
- Avalos-Fuentes, A., Albarrán-Bravo, S., Loya-López, S., Cortés, H., Recillas-Morales, S., Magaña, J. J., Paz-Bermúdez, F., Rangel-Barajas, C., Aceves, J., & Erlij, D. (2015). Dopaminergic denervation switches dopamine D3 receptor signaling and disrupts its Ca²⁺ dependent modulation by CaMKII and calmodulin in striatonigral projections of the rat. *Neurobiol Dis*, *74*, 336-346.
- Avalos-Fuentes, A., Loya-Lopez, S., Flores-Perez, A., Recillas-Morales, S., Cortes, H., Paz-Bermudez, F., Aceves, J., Erlij, D., & Floran, B. (2013). Presynaptic

- CaMKII α modulates dopamine D3 receptor activation in striatonigral terminals of the rat brain in a Ca(2)(+) dependent manner. *Neuropharmacology*, 71, 273-281. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.010>
- Ball, N., Teo, W.-P., Chandra, S., & Chapman, J. (2019). Parkinson's disease and the environment. *Frontiers in neurology*, 218.
- Barroso-Chinea, P., & Bezard, E. (2010). Basal ganglia circuits underlying the pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia. *Frontiers in Neuroanatomy*, 4, 131.
- Bastide, M. F., Dovero, S., Charron, G., Porras, G., Gross, C. E., Fernagut, P. O., & Bezard, E. (2014). Immediate-early gene expression in structures outside the basal ganglia is associated to L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiol Dis*, 62, 179-192. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.09.020>
- Bastide, M. F., Meissner, W. G., Picconi, B., Fasano, S., Fernagut, P.-O., Feyder, M., Francardo, V., Alcacer, C., Ding, Y., & Brambilla, R. (2015). Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 132, 96-168.
- Bastide, M. F., Meissner, W. G., Picconi, B., Fasano, S., Fernagut, P. O., Feyder, M., Francardo, V., Alcacer, C., Ding, Y., Brambilla, R., Fisone, G., Jon Stoessl, A., Bourdenx, M., Engeln, M., Navailles, S., De Deurwaerdere, P., Ko, W. K., Simola, N., Morelli, M., . . . Bezard, E. (2015). Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 132, 96-168. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.07.002>
- Bayer, K. U., LeBel, E., McDonald, G. L., O'Leary, H., Schulman, H., & De Koninck, P. (2006). Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B. *J Neurosci*, 26(4), 1164-1174. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3116-05.2006>
- Beal, M. F. (2003). Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 120-131. 12846981
- Beaulieu, J.-M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 182-217.
- Benes, F. M. (2001). Carlsson and the discovery of dopamine. *Trends in pharmacological sciences*, 22(1), 46-47.

- Bezard, E., Ferry, S., Mach, U., Stark, H., Leriche, L., Boraud, T., Gross, C., & Sokoloff, P. (2003). Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. *Nat Med*, 9(6), 762-767. <https://doi.org/10.1038/nm875>
- Bhat, A. H., Dar, K. B., Anees, S., Zargar, M. A., Masood, A., Sofi, M. A., & Ganie, S. A. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 74, 101-110.
- Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C., & Martignoni, E. (2000). Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 62(1), 63-88.
- Blauwendraat, C., Nalls, M. A., & Singleton, A. B. (2020). The genetic architecture of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 19(2), 170-178.
- Boix, J., Padel, T., & Paul, G. (2015). A partial lesion model of Parkinson's disease in mice—characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. *Behav Brain Res*, 284, 196-206.
- Bonifati, V., Rizzu, P., Squitieri, F., Krieger, E., Vanacore, N. a., Van Swieten, J., Brice, A., Van Duijn, C., Oostra, B., & Meco, G. (2003). DJ-1 (PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurological sciences*, 24, 159-160.
- Bordet, R., Ridray, S., Carboni, S., Diaz, J., Sokoloff, P., & Schwartz, J. C. (1997). Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(7), 3363-3367. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096399>
- Borghammer, P., Horsager, J., Andersen, K., Van Den Berge, N., Raunio, A., Murayama, S., Parkkinen, L., & Myllykangas, L. (2021). Neuropathological evidence of body-first vs. brain-first Lewy body disease. *Neurobiol Dis*, 161, 105557.
- Briones-Lizardi, L. J., Cortes, H., Avalos-Fuentes, J. A., Paz-Bermudez, F. J., Aceves, J., Erlij, D., & Floran, B. (2019). Presynaptic control of [(3)H]-glutamate release by dopamine receptor subtypes in the rat substantia nigra. Central role of D1 and D3 receptors. *Neuroscience*, 406, 563-579. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.051>
- Cai, G., Wang, H. Y., & Friedman, E. (2002). Increased dopamine receptor signaling and dopamine receptor-G protein coupling in denervated striatum. *J Pharmacol Exp Ther*, 302(3), 1105-1112. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.036673>
- Calabrese, V., Santoro, A., Monti, D., Crupi, R., Di Paola, R., Latteri, S., Cuzzocrea, S., Zappia, M., Giordano, J., & Calabrese, E. J. (2018). Aging and Parkinson's

- Disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 115, 80-91.
- Carta, M., Lindgren, H. S., Lundblad, M., Stancampiano, R., Fadda, F., & Cenci, M. A. (2006). Role of striatal L-DOPA in the production of dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *J Neurochem*, 96(6), 1718-1727. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03696.x>
- Caudle, W. M., Guillot, T. S., Lazo, C. R., & Miller, G. W. (2012). Industrial toxicants and Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 33(2), 178-188.
- Cenci, M. A., Lee, C. S., & Bjorklund, A. (1998). L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur J Neurosci*, 10(8), 2694-2706. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767399>
- Cerasa, A., Salsone, M., Morelli, M., Pugliese, P., Arabia, G., Gioia, C. M., Novellino, F., & Quattrone, A. (2013). Age at onset influences neurodegenerative processes underlying PD with levodopa-induced dyskinesias. *Parkinsonism & Related Disorders*, 19(10), 883-888.
- Cerovic, M., d'Isa, R., Tonini, R., & Brambilla, R. (2013). Molecular and cellular mechanisms of dopamine-mediated behavioral plasticity in the striatum. *Neurobiology of learning and memory*, 105, 63-80.
- Channer, B., Matt, S. M., Nickoloff-Bybel, E. A., Pappa, V., Agarwal, Y., Wickman, J., & Gaskill, P. J. (2023). Dopamine, Immunity, and Disease. *Pharmacological Reviews*, 75(1), 62-158.
- Colbran, R. J., & Brown, A. M. (2004). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, 14(3), 318-327. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.05.008>
- Costa, H. N., Esteves, A. R., Empadinhas, N., & Cardoso, S. M. (2023). Parkinson's disease: a multisystem disorder. *Neuroscience Bulletin*, 39(1), 113-124.
- Costa, K. M., & Schoenbaum, G. (2022). Dopamine. *Current Biology*, 32(15), R817-R824.
- Cote, S. R., Chitravanshi, V. C., Bleickardt, C., Sapru, H. N., & Kuzhikandathil, E. V. (2014). Overexpression of the dopamine D3 receptor in the rat dorsal striatum induces dyskinetic behaviors. *Behav Brain Res*, 263, 46-50. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.011>

- Cote, S. R., & Kuzhikandathil, E. V. (2015). Chronic levodopa treatment alters expression and function of dopamine D3 receptor in the MPTP/p mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, *585*, 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.11.023>
- Cruces-Sande, A., Méndez-Álvarez, E., & Soto-Otero, R. (2017). Copper increases the ability of 6-hydroxydopamine to generate oxidative stress and the ability of ascorbate and glutathione to potentiate this effect: potential implications in Parkinson's disease. *J Neurochem*, *141*(5), 738-749.
- Cruz-Trujillo, R., Avalos-Fuentes, A., Rangel-Barajas, C., Paz-Bermudez, F., Sierra, A., Escartin-Perez, E., Aceves, J., Erlij, D., & Floran, B. (2013). D3 dopamine receptors interact with dopamine D1 but not D4 receptors in the GABAergic terminals of the SNr of the rat. *Neuropharmacology*, *67*, 370-378. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.11.032>
- Cruz-Trujillo, R., Avalos-Fuentes, A., Rangel-Barajas, C., Paz-Bermúdez, F., Sierra, A., Escartín-Perez, E., Aceves, J., Erlij, D., & Florán, B. (2013). D3 dopamine receptors interact with dopamine D1 but not D4 receptors in the GABAergic terminals of the SNr of the rat. *Neuropharmacology*, *67*, 370-378.
- Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2003). Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*, *302*(5646), 819-822. 14593166
- De Lau, L. M., & Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, *5*(6), 525-535.
- Delamarre, A., & Meissner, W. G. (2017). Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *La Presse Médicale*, *46*(2), 175-181.
- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*, *13*(7), 281-285. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1695404>
- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*, *13*(7), 281-285.
- DeLong, M. R., & Wichmann, T. (2015). Basal ganglia circuits as targets for neuromodulation in Parkinson disease. *JAMA neurology*, *72*(11), 1354-1360.
- Deniau, J. M., Mailly, P., Maurice, N., & Charpier, S. (2007). The pars reticulata of the substantia nigra: a window to basal ganglia output. *Prog Brain Res*, *160*, 151-172. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60009-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60009-5)
- Di Filippo, M., Picconi, B., Costa, C., Bagetta, V., Tantucci, M., Parnetti, L., & Calabresi, P. (2006). Pathways of neurodegeneration and experimental models of basal ganglia

- disorders: downstream effects of mitochondrial inhibition. *Eur J Pharmacol*, 545(1), 65-72. 16854409
- Dickson, D. W. (2018). Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 46, S30-S33.
- Dos Santos, E. U. D., Duarte, E. B. C., Miranda, L. M. R., Asano, A. G. C., Asano, N. M. J., Maia, M. d. M. D., & de Souza, P. R. E. (2019). Influence of DRD1 and DRD3 polymorphisms in the occurrence of motor effects in patients with sporadic Parkinson's disease. *NeuroMolecular Medicine*, 21, 295-302.
- Eisinger, R. S., Ramirez-Zamora, A., Carbutaru, S., Ptak, B., Peng-Chen, Z., Okun, M. S., & Gunduz, A. (2019). Medications, deep brain stimulation, and other factors influencing impulse control disorders in Parkinson's disease. *Frontiers in neurology*, 10, 86.
- Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 1-14. 12846969
- Farré, D., Muñoz, A., Moreno, E., Reyes-Resina, I., Canet-Pons, J., Dopeso-Reyes, I. G., Rico, A. J., Lluís, C., Mallol, J., & Navarro, G. (2015). Stronger Dopamine D 1 Receptor-Mediated Neurotransmission in Dyskinesia. *Molecular Neurobiology*, 52, 1408-1420.
- Farrer, M., Gwinn-Hardy, K., Muenter, M., DeVrieze, F. W., Crook, R., Perez-Tur, J., Lincoln, S., Maraganore, D., Adler, C., & Newman, S. (1999). A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor. *Human molecular genetics*, 8(1), 81-85.
- Feyder, M., Bonito-Oliva, A., & Fisone, G. (2011). L-DOPA-Induced Dyskinesia and Abnormal Signaling in Striatal Medium Spiny Neurons: Focus on Dopamine D1 Receptor-Mediated Transmission. *Front Behav Neurosci*, 5, 71. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00071>
- Fiorentini, C., Busi, C., Gorruso, E., Gotti, C., Spano, P., & Missale, C. (2008). Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Mol Pharmacol*, 74(1), 59-69. <https://doi.org/10.1124/mol.107.043885>
- Fiorentini, C., Rizzetti, M. C., Busi, C., Bontempi, S., Collo, G., Spano, P., & Missale, C. (2006). Loss of synaptic D1 dopamine/N-methyl-D-aspartate glutamate receptor complexes in L-DOPA-induced dyskinesia in the rat. *Mol Pharmacol*, 69(3), 805-812. <https://doi.org/10.1124/mol.105.016667>

- Fiorentini, C., Savoia, P., Savoldi, D., Barbon, A., & Missale, C. (2013). Persistent activation of the D1R/Shp-2/Erk1/2 pathway in L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-hydroxy-dopamine rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, *54*, 339-348. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.01.005>
- Fiorentini, C., Savoia, P., Savoldi, D., Bono, F., Busi, C., Barbon, A., & Missale, C. (2016). Shp-2 knockdown prevents L-dopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Mov Disord*, *31*(4), 512-520. <https://doi.org/10.1002/mds.26581>
- Fisone, G., & Bezard, E. (2011). Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Int Rev Neurobiol*, *98*, 95-122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381328-2.00004-3>
- Flores, G., Liang, J. J., Sierra, A., Martinez-Fong, D., Quirion, R., Aceves, J., & Srivastava, L. K. (1999). Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography. *Neuroscience*, *91*(2), 549-556. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10366012>
- Fox, S. H., & Lang, A. E. (2008). Levodopa-related motor complications—Phenomenology. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, *23*(S3), S509-S514.
- Funayama, M., Hasegawa, K., Kowa, H., Saito, M., Tsuji, S., & Obata, F. (2002). A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11. 2–q13. 1. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, *51*(3), 296-301.
- Gao, H. M., Liu, B., Zhang, W., & Hong, J. S. (2003). Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*, *24*(8), 395-401. 12915048
- Gardoni, F., Caputi, A., Cimino, M., Pastorino, L., Cattabeni, F., & Di Luca, M. (1998). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with NR2A/B subunits of NMDA receptor in postsynaptic densities. *J Neurochem*, *71*(4), 1733-1741. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751209>
- Gardoni, F., Picconi, B., Ghiglieri, V., Polli, F., Bagetta, V., Bernardi, G., Cattabeni, F., Di Luca, M., & Calabresi, P. (2006). A critical interaction between NR2B and MAGUK in L-DOPA induced dyskinesia. *J Neurosci*, *26*(11), 2914-2922. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5326-05.2006>
- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma Jr, F. J., & Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, *250*(4986), 1429-1432.

- German, D. C., Schlusberg, D. S., & Woodward, D. J. (1983). Three-dimensional computer reconstruction of midbrain dopaminergic neuronal populations: from mouse to man. *J Neural Transm*, 57(4), 243-254. 6140298
- Giorgi, M., D'Angelo, V., Esposito, Z., Nuccetelli, V., Sorge, R., Martorana, A., Stefani, A., Bernardi, G., & Sancesario, G. (2008). Lowered cAMP and cGMP signalling in the brain during levodopa-induced dyskinesias in hemiparkinsonian rats: new aspects in the pathogenetic mechanisms. *Eur J Neurosci*, 28(5), 941-950. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06387.x>
- Goubault, E., Nguyen, H. P., Bogard, S., Blanchet, P. J., Bézard, E., Vincent, C., Langlois, M., & Duval, C. (2018). Cardinal motor features of Parkinson's disease coexist with peak-dose choreic-type drug-induced dyskinesia. *Journal of Parkinson's Disease*, 8(2), 323-331.
- Guitart, X., Navarro, G., Moreno, E., Yano, H., Cai, N. S., Sanchez-Soto, M., Kumar-Barodia, S., Naidu, Y. T., Mallol, J., Cortes, A., Lluís, C., Canela, E. I., Casado, V., McCormick, P. J., & Ferré, S. (2014). Functional selectivity of allosteric interactions within G protein-coupled receptor oligomers: the dopamine D1-D3 receptor heterotetramer. *Mol Pharmacol*, 86(4), 417-429. <https://doi.org/10.1124/mol.114.093096>
- Haber, S. N., & Calzavara, R. (2009). The cortico-basal ganglia integrative network: the role of the thalamus. *Brain research bulletin*, 78(2-3), 69-74.
- Hellman, N. E., & Gitlin, J. D. (2002). Ceruloplasmin metabolism and function. *Annual review of nutrition*, 22(1), 439-458.
- Hirsch, E. C., & Standaert, D. G. (2021). Ten unsolved questions about neuroinflammation in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 36(1), 16-24.
- Hudson, J. L., van Horne, C. G., Strömberg, I., Brock, S., Clayton, J., Masserano, J., Hoffer, B. J., & Gerhardt, G. A. (1993). Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res*, 626(1-2), 167-174.
- Iancu, R., Mohapel, P., Brundin, P., & Paul, G. (2005). Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res*, 162(1), 1-10.
- Ibanez-Sandoval, O., Hernandez, A., Floran, B., Galarraga, E., Tapia, D., Valdiosera, R., Erlij, D., Aceves, J., & Bargas, J. (2006). Control of the subthalamic innervation of

- substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurophysiol*, 95(3), 1800-1811. <https://doi.org/10.1152/jn.01074.2005>
- Imai, Y., & Takahashi, R. (2004). How do Parkin mutations result in neurodegeneration? *Curr Opin Neurobiol*, 14(3), 384-389. 15194120
- Jankovic, J., & Tan, E. K. (2020). Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 91(8), 795-808.
- Jia, F., Fellner, A., & Kumar, K. R. (2022). Monogenic Parkinson's disease: genotype, phenotype, pathophysiology, and genetic testing. *Genes*, 13(3), 471.
- Joyce, J. N., & Millan, M. J. (2007). Dopamine D3 receptor agonists for protection and repair in Parkinson's disease. *Current opinion in pharmacology*, 7(1), 100-105.
- Kline, E. M., Houser, M. C., Herrick, M. K., Seibler, P., Klein, C., West, A., & Tansey, M. G. (2021). Genetic and Environmental Factors in Parkinson's Disease Converge on Immune Function and Inflammation. *Movement Disorders*, 36(1), 25-36.
- Kumar, N., Van Gerpen, J. A., Bower, J. H., & Ahlskog, J. E. (2005). Levodopa-dyskinesia incidence by age of Parkinson's disease onset. *Mov Disord*, 20(3), 342-344. <https://doi.org/10.1002/mds.20360>
- Kumar, R., Riddle, L., Griffin, S. A., Grundt, P., Newman, A. H., & Luedtke, R. R. (2009). Evaluation of the D3 dopamine receptor selective antagonist PG01037 on L-dopa-dependent abnormal involuntary movements in rats. *Neuropharmacology*, 56(6-7), 944-955. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.01.020>
- Kumar, R., Riddle, L. R., Griffin, S. A., Chu, W., Vangveravong, S., Neisewander, J., Mach, R. H., & Luedtke, R. R. (2009). Evaluation of D2 and D3 dopamine receptor selective compounds on L-dopa-dependent abnormal involuntary movements in rats. *Neuropharmacology*, 56(6-7), 956-969. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.01.019>
- Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(12), a009621.
- Lanza, K., Centner, A., Coyle, M., Del Priore, I., Manfredsson, F. P., & Bishop, C. (2021). Genetic suppression of the dopamine D3 receptor in striatal D1 cells reduces the development of L-DOPA-induced dyskinesia. *Exp Neurol*, 336, 113534.
- Lanza, K., Meadows, S. M., Chambers, N. E., Nuss, E., Deak, M. M., Ferré, S., & Bishop, C. (2018). Behavioral and cellular dopamine D1 and D3 receptor-mediated synergy: Implications for L-DOPA-induced dyskinesia. *Neuropharmacology*, 138, 304-314.

- Lee, V. M., Giasson, B. I., & Trojanowski, J. Q. (2004). More than just two peas in a pod: common amyloidogenic properties of tau and alpha-synuclein in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*, 27(3), 129-134. 15036877
- Liu, X. Y., Mao, L. M., Zhang, G. C., Papasian, C. J., Fibuch, E. E., Lan, H. X., Zhou, H. F., Xu, M., & Wang, J. Q. (2009). Activity-dependent modulation of limbic dopamine D3 receptors by CaMKII. *Neuron*, 61(3), 425-438. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.015>
- Lotharius, J., & Brundin, P. (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci*, 3(12), 932-942. 12461550
- Lozano, A. M., Lang, A. E., Hutchison, W. D., & Dostrovsky, J. O. (1998). New developments in understanding the etiology of Parkinson's disease and in its treatment. *Curr Opin Neurobiol*, 8(6), 783-790. 9914234
- Luquin, M., Scipioni, O., Vaamonde, J., Gershanik, O., & Obeso, J. A. (1992). Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: clinical and pharmacological classification. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 7(2), 117-124.
- Manzana, N. d. O., Sedlackova, L., & Kalaria, R. N. (2021). Alpha-synuclein post-translational modifications: Implications for pathogenesis of lewy body disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 690293.
- Marcellino, D., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Le Foll, B., Mazzola, C., Drago, F., Saur, O., Stark, H., & Soriano, A. (2008). Identification of dopamine D1–D3 receptor heteromers: indications for a role of synergistic D1–D3 receptor interactions in the striatum. *Journal of Biological Chemistry*, 283(38), 26016-26025.
- Marcellino, D., Ferre, S., Casado, V., Cortes, A., Le Foll, B., Mazzola, C., Drago, F., Saur, O., Stark, H., Soriano, A., Barnes, C., Goldberg, S. R., Lluís, C., Fuxe, K., & Franco, R. (2008). Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *J Biol Chem*, 283(38), 26016-26025. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710349200>
- Maries, E., Dass, B., Collier, T. J., Kordower, J. H., & Steece-Collier, K. (2003). The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nat Rev Neurosci*, 4(9), 727-738. 12951565
- Marras, C., Beck, J., Bower, J., Roberts, E., Ritz, B., Ross, G., Abbott, R., Savica, R., Van Den Eeden, S., & Willis, A. (2018). Prevalence of Parkinson's disease across North America. *npj Parkinson's Disease*, 4(1), 21.

- Martín-Flores, N., Fernández-Santiago, R., Antonelli, F., Cerquera, C., Moreno, V., Martí, M. J., Ezquerro, M., & Malagelada, C. (2019). MTOR pathway-based discovery of genetic susceptibility to L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease patients. *Molecular Neurobiology*, *56*, 2092-2100.
- Martínez-Ramírez, D., Rodríguez-Violante, M., Velázquez-Ávila, E. S., Cervantes-Arriaga, A., González-Cantú, A., Corona, T., & Velásquez-Pérez, L. (2020). Incidencia y distribución geográfica de la enfermedad de Parkinson en México. *salud pública de méxico*, *62*(6), 873-875.
- Mehler, M. F., & Gokhan, S. (2001). Developmental mechanisms in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol*, *63*(3), 337-363. 11115729
- Meiser, J., Weindl, D., & Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*, *11*(1), 1-18.
- Mela, F., Marti, M., Bido, S., Cenci, M. A., & Morari, M. (2012). In vivo evidence for a differential contribution of striatal and nigral D1 and D2 receptors to L-DOPA induced dyskinesia and the accompanying surge of nigral amino acid levels. *Neurobiol Dis*, *45*(1), 573-582. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.09.015>
- Mela, F., Marti, M., Dekundy, A., Danysz, W., Morari, M., & Cenci, M. A. (2007). Antagonism of metabotropic glutamate receptor type 5 attenuates L-DOPA-induced dyskinesia and its molecular and neurochemical correlates in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurochem*, *101*(2), 483-497. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04456.x>
- Mela, F., Millan, M. J., Brocco, M., & Morari, M. (2010). The selective D(3) receptor antagonist, S33084, improves parkinsonian-like motor dysfunction but does not affect L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine hemi-lesioned rats. *Neuropharmacology*, *58*(2), 528-536. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.08.017>
- Mena-Segovia, J., Bolam, J. P., & Magill, P. J. (2004). Pedunculo-pontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *Trends Neurosci*, *27*(10), 585-588.
- More, S. V., & Choi, D.-K. (2015). Promising cannabinoid-based therapies for Parkinson's disease: motor symptoms to neuroprotection. *Molecular neurodegeneration*, *10*(1), 1-26.

- Moreno, E., Casajuana-Martin, N., Coyle, M., Campos, B. C., Galaj, E., del Torrent, C. L., Seyedian, A., Rea, W., Cai, N.-S., & Bonifazi, A. (2022). Pharmacological targeting of G protein-coupled receptor heteromers. *Pharmacological Research*, 106476.
- Moriguchi, S., Yabuki, Y., & Fukunaga, K. (2012). Reduced calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus is associated with impaired cognitive function in MPTP-treated mice. *J Neurochem*, 120(4), 541-551. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07608.x>
- Munoz, A., Li, Q., Gardoni, F., Marcello, E., Qin, C., Carlsson, T., Kirik, D., Di Luca, M., Bjorklund, A., Bezard, E., & Carta, M. (2008). Combined 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia. *Brain*, 131(Pt 12), 3380-3394. <https://doi.org/10.1093/brain/awn235>
- Nadjar, A., Gerfen, C. R., & Bezard, E. (2009). Priming for l-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a feature inherent to the treatment or the disease? *Prog Neurobiol*, 87(1), 1-9.
- Nagatsu, T., Nakashima, A., Watanabe, H., Ito, S., & Wakamatsu, K. (2022). Neuromelanin in Parkinson's disease: Tyrosine hydroxylase and tyrosinase. *International journal of molecular sciences*, 23(8), 4176.
- Nakamura, Y., Otake, K., & Tokuno, H. (2006). The parafascicular nucleus relays spinal inputs to the striatum: an electron microscope study in the rat. *Neuroscience research*, 56(1), 73-79.
- Nalls, M. A., Blauwendraat, C., Vallerga, C. L., Heilbron, K., Bandres-Ciga, S., Chang, D., Tan, M., Kia, D. A., Noyce, A. J., & Xue, A. (2019). Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *The Lancet Neurology*, 18(12), 1091-1102.
- Noyce, A. J., Bestwick, J. P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C. H., Giovannoni, G., Lees, A. J., & Schrag, A. (2012). Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Annals of neurology*, 72(6), 893-901.
- Nussbaum, R. L., & Ellis, C. E. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 348(14), 1356-1364. 12672864
- O'Sullivan, S. S., Williams, D. R., Gallagher, D. A., Massey, L. A., Silveira-Moriyama, L., & Lees, A. J. (2008). Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study. *Movement Disorders*, 23(1), 101-106.
- Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Goetz, C. G., Marin, C., Kordower, J. H., Rodriguez, M., Hirsch, E. C., Farrer, M., Schapira, A. H., & Halliday, G. (2010). Missing pieces

- in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med*, 16(6), 653-661.
<https://doi.org/10.1038/nm.2165>
- Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Rodriguez, M., Lanciego, J. L., Artieda, J., Gonzalo, N., & Olanow, C. W. (2000). Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 23(10 Suppl), S8-19. 11052215
- Offen, D., Beart, P. M., Cheung, N. S., Pascoe, C. J., Hochman, A., Gorodin, S., Melamed, E., Bernard, R., & Bernard, O. (1998). Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(10), 5789-5794. 9576963
- Olanow, C. W., & Tatton, W. G. (1999). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*, 22, 123-144. 10202534
- Orth, M., & Schapira, A. H. (2002). Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochem Int*, 40(6), 533-541. 11850110
- Paolini, M., Sapone, A., & Gonzalez, F. J. (2004). Parkinson's disease, pesticides and individual vulnerability. *Trends Pharmacol Sci*, 25(3), 124-129. 15019266
- Parent, A., Levesque, M., & Parent, M. (2001). A re-evaluation of the current model of the basal ganglia. *Parkinsonism & Related Disorders*, 7(3), 193-198.
- Paris, I., Perez-Pastene, C., Couve, E., Caviedes, P., LeDoux, S., & Segura-Aguilar, J. (2009). Copper· dopamine complex induces mitochondrial autophagy preceding caspase-independent apoptotic cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13306-13315.
- Parkinson, J. (1817). *An essay on the shaking palsey*. Sherwood, Neely and Jones.
- Perez, R. G., & Hastings, T. G. (2004). Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *J Neurochem*, 89(6), 1318-1324. 15189334
- Picconi, B., Centonze, D., Hakansson, K., Bernardi, G., Greengard, P., Fisone, G., Cenci, M. A., & Calabresi, P. (2003). Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Neurosci*, 6(5), 501-506.
<https://doi.org/10.1038/nn1040>
- Picconi, B., Gardoni, F., Centonze, D., Mauceri, D., Cenci, M. A., Bernardi, G., Calabresi, P., & Di Luca, M. (2004). Abnormal Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II function mediates synaptic and motor deficits in experimental parkinsonism. *J Neurosci*, 24(23), 5283-5291. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1224-04.2004>

- Pinault, D. (2004). The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Research Reviews*, 46(1), 1-31.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A.-E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-21.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045-2047. 9197268
- Poston, K. L., Ua Cruadhlaich, M. A., Santoso, L. F., Bernstein, J. D., Liu, T., Wang, Y., Rutt, B., Kerchner, G. A., & Zeineh, M. M. (2020). Substantia nigra volume dissociates bradykinesia and rigidity from tremor in Parkinson's disease: A 7 Tesla imaging study. *Journal of Parkinson's Disease*, 10(2), 591-604.
- Przedbroski, S., Leviver, M., Jiang, H., Ferreira, M., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D., & Togasaki, D. (1995). Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*, 67(3), 631-647.
- Putterman, D. B., Munhall, A. C., Kozell, L. B., Belknap, J. K., & Johnson, S. W. (2007). Evaluation of levodopa dose and magnitude of dopamine depletion as risk factors for levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(1), 277-284.
- Ramirez-Jirano, L. J., Ruiz-Sandoval, J. L., Jimenez-Gil, F. J., Ramirez-Vega, J., Vargas-Frutos, E., & Gallegos-Arreola, M. P. (2007). [Frequency of the IVS4+66A-G polymorphism in the alpha-synuclein gene in patients with Parkinson's disease in north-western Mexico]. *Rev Neurol*, 44(1), 15-17. 17199224
- Rangel-Barajas, C., Silva, I., Garcia-Ramirez, M., Sanchez-Lemus, E., Floran, L., Aceves, J., Erlij, D., & Floran, B. (2008). 6-OHDA-induced hemiparkinsonism and chronic L-DOPA treatment increase dopamine D1-stimulated [(3)H]-GABA release and [(3)H]-cAMP production in substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology*, 55(5), 704-711.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.002>

- Rangel-Barajas, C., Silva, I., Lopez-Santiago, L. M., Aceves, J., Erlij, D., & Floran, 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. *Neurobiol Dis*, 41(1), 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.08.018>
- Rascol, O., Brooks, D. J., Korczyn, A. D., De Deyn, P. P., Clarke, C. E., & Lang, A. E. (2000). A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *New England Journal of Medicine*, 342(20), 1484-1491.
- Reeve, A., Simcox, E., & Turnbull, D. (2014). Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing research reviews*, 14, 19-30.
- Riddle, L. R., Kumar, R., Griffin, S. A., Grundt, P., Newman, A. H., & Luedtke, R. R. (2011). Evaluation of the D3 dopamine receptor selective agonist/partial agonist PG01042 on L-dopa dependent animal involuntary movements in rats. *Neuropharmacology*, 60(2-3), 284-294. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.09.011>
- Rodríguez-Sánchez, M., Escartín-Pérez, R. E., Leyva-Gómez, G., Avalos-Fuentes, J. A., Paz-Bermúdez, F. J., Loya-López, S. I., Aceves, J., Erlij, D., Cortés, H., & Florán, B. (2019). Blockade of intranigral and systemic D3 receptors stimulates motor activity in the rat promoting a reciprocal interaction among glutamate, dopamine, and GABA. *Biomolecules*, 9(10), 511.
- Rodríguez-Violante, M., Velásquez-Pérez, L., & Cervantes-Arriaga, A. (2019). Incidence rates of Parkinson's disease in Mexico: Analysis of 2014-2017 statistics. *Revista mexicana de neurociencia*, 20(3), 136-140.
- Rommelfanger, K. S., & Wichmann, T. (2010). Extrastriatal dopaminergic circuits of the basal ganglia. *Frontiers in Neuroanatomy*, 4, 139.
- Sancesario, G., Morrone, L. A., D'Angelo, V., Castelli, V., Ferrazzoli, D., Sica, F., Martorana, A., Sorge, R., Cavaliere, F., Bernardi, G., & Giorgi, M. (2014). Levodopa-induced dyskinesias are associated with transient down-regulation of cAMP and cGMP in the caudate-putamen of hemiparkinsonian rats: reduced synthesis or increased catabolism? *Neurochem Int*, 79, 44-56. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.10.004>
- Sharma, J., Bachmann, C., & Linazasoro, G. (2010). Classifying risk factors for dyskinesia in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 16(8), 490-497.

- Sian-Hulsmann, J., & Riederer, P. (2023). The 'α-synucleinopathy syndicate': multiple system atrophy and Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 1-11.
- Sibley, D. R. (1999). New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39(1), 313-341.
- Sidhu, A., Wersinger, C., Moussa, C. E., & Vernier, P. (2004). The role of alpha-synuclein in both neuroprotection and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, 1035, 250-270. 15681812
- Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology. *Clinics in geriatric medicine*, 36(1), 1-12.
- Solíis, O., Garcia-Montes, J. R., González-Granillo, A., Xu, M., & Moratalla, R. (2017). Dopamine D3 receptor modulates L-DOPA-induced dyskinesia by targeting D1 receptor-mediated striatal signaling. *Cereb Cortex*, 27(1), 435-446.
- Stayte, S., & Vissel, B. (2014). Advances in non-dopaminergic treatments for Parkinson's disease. *Frontiers in neuroscience*, 8, 113.
- Stiasny-Kolster, K., Doerr, Y., Moller, J. C., Hoffken, H., Behr, T. M., Oertel, W. H., & Mayer, G. (2005). Combination of 'idiopathic' REM sleep behaviour disorder and olfactory dysfunction as possible indicator for alpha-synucleinopathy demonstrated by dopamine transporter FP-CIT-SPECT. *Brain*, 128(Pt 1), 126-137. 15548552
- Tansey, M. G., Wallings, R. L., Houser, M. C., Herrick, M. K., Keating, C. E., & Joers, V. (2022). Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. *Nature Reviews Immunology*, 22(11), 657-673. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00684-6>
- Titova, N., Padmakumar, C., Lewis, S. J., & Chaudhuri, K. R. (2017). Parkinson's: a syndrome rather than a disease? *Journal of Neural Transmission*, 124, 907-914.
- Trinh, J., Zeldenrust, F. M., Huang, J., Kasten, M., Schaake, S., Petkovic, S., Madoev, H., Grünewald, A., Almuammar, S., & König, I. R. (2018). Genotype-phenotype relations for the Parkinson's disease genes SNCA, LRRK2, VPS35: MDSGene systematic review. *Movement Disorders*, 33(12), 1857-1870.
- Twelves, D., Perkins, K. S., & Counsell, C. (2003). Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 18(1), 19-31.
- Uhl, G. R. (1998). Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 43(5), 555-560. 9585349

- Ungerstedt, U., & Arbuthnott, G. W. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*, 24(3), 485-493. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5494536>
- Vallone, D., Picetti, R., & Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience & biobehavioral reviews*, 24(1), 125-132.
- Van Kampen, J., & Robertson, H. (2005). A possible role for dopamine D3 receptor stimulation in the induction of neurogenesis in the adult rat substantia nigra. *Neuroscience*, 136(2), 381-386.
- 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. *Journal of Neuroscience*, 26(27), 7272-7280.
- Visanji, N. P., Fox, S. H., Johnston, T., Reyes, G., Millan, M. J., & Brotchie, J. M. (2009). Dopamine D3 receptor stimulation underlies the development of L-DOPA-induced dyskinesia in animal models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 35(2), 184-192. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.010>
- Volkow, N. D., Fowler, J., Wang, G., Baler, R., & Telang, F. (2009). Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*, 56, 3-8.
- Wang, M., Liu, H., & Ma, Z. (2022). Roles of the cannabinoid system in the basal ganglia in parkinson's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 16.
- Willis, A., Roberts, E., Beck, J., Fiske, B., Ross, W., Savica, R., Van Den Eeden, S., Tanner, C., Marras, C., & M., P. s. F. P. G. A. R. S. M. R. B. C. H. C. T. W. B. D. J. (2022). Incidence of Parkinson disease in North America. *npj Parkinson's Disease*, 8(1), 170.
- Windels, F., & Kiyatkin, E. A. (2004). GABA, not glutamate, controls the activity of substantia nigra reticulata neurons in awake, unrestrained rats. *J Neurosci*, 24(30), 6751-6754. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1528-04.2004>
- Xu, L., & Pu, J. (2016). Alpha-synuclein in Parkinson's disease: from pathogenetic dysfunction to potential clinical application. *Parkinson's disease*, 2016.
- Yang, W., Hamilton, J. L., Kopil, C., Beck, J. C., Tanner, C. M., Albin, R. L., Ray Dorsey, E., Dahodwala, N., Cintina, I., & Hogan, P. (2020). Current and projected future economic burden of Parkinson's disease in the US. *npj Parkinson's Disease*, 6(1), 15.
- Yang, Y., Tao-Cheng, J. H., Bayer, K. U., Reese, T. S., & Dosemeci, A. (2013). Camkii-mediated phosphorylation regulates distributions of Syngap-alpha1 and -alpha2 at

the postsynaptic density. *PLoS One*, 8(8), e71795.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071795>

- Ye, H., Robak, L. A., Yu, M., Cykowski, M., & Shulman, J. M. (2023). Genetics and pathogenesis of Parkinson's syndrome. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 18, 95-121.
- Yu, W.-R., Jiang, H., Wang, J., & Xie, J.-X. (2008). Copper (Cu²⁺) induces degeneration of dopaminergic neurons in the nigrostriatal system of rats. *Neuroscience Bulletin*, 24(2), 73.
- Zecca, L., Zucca, F. A., Wilms, H., & Sulzer, D. (2003). Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci*, 26(11), 578-580. 14585596
- Zhang, S., Xie, C., Wang, Q., & Liu, Z. (2014). Interactions of CaMKII with dopamine D2 receptors: roles in levodopa-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned Parkinson's rats. *Sci Rep*, 4, 6811. <https://doi.org/10.1038/srep06811>