



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

Unidad Zacatenco

Departamento De Fisiología, Biofísica Y Neurociencias

**“Envío dirigido de genes por vía intranasal y sanguínea a
neuronas dopaminérgicas utilizando las nanopartículas de NTS-
poliplex y ultrasonido focalizado en la sustancia negra”**

TESIS

Que presenta

M. en C. Juan Uriel Mascotte Cruz

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de

Fisiología Celular y Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Daniel Martínez Fong

Ciudad de México

Julio, 2024



El presente trabajo se realizó en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Daniel Martínez Fong.



El trabajo experimental de la presente tesis fue subvencionado en parte por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT).

Proyecto No. 254686 Convocatoria de CB-2015-01.

Durante el desarrollo de esta tesis el alumno fue becado por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT). Beca No. 483606.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Daniel Martínez Fong, director de este proyecto de investigación, por haberme apoyado, orientado y corregido en mi labor científica.

A cada uno de mis asesores: Dr. Arturo Vera Hernández, Dr. Benjamín Florán Garduño, Dr. Lorenzo Leija Salas, Dr. Porfirio Nava Domínguez y Dr. Bismark Gatica García, gracias por sus consejos y correcciones realizadas a esta tesis.

A mis compañeros e integrantes de laboratorio: David Reyes Corona, Bismark Gatica García, C. Paola Rodríguez O., Irais E. Valenzuela A., Lourdes Escobedo, Ignacio Araoz, Minerva Maldonado, gracias por brindarme su amistad y agradezco también su invaluable colaboración para la realización de la parte experimental de este proyecto.

A mi familia, porque siempre he contado con su apoyo en todas las decisiones que he tomado, siempre guiándome para no darme por vencido y apoyándome en cada paso de mi vida, sin ellos no habría podido llegar tan lejos.

Agradezco que en cada etapa de mi vida cuando llega un obstáculo, siempre aparece alguien para ayudarme y guiarme.

“The size of your dreams must always exceed your current capacity to achieve them. If your dreams do not scare you, they are not big enough.”

Ellen Johnson Sirleaf

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

Contenido

1. Antecedentes.....	9
1.1 La terapia génica y sus abordajes.....	9
1.4 Principio físico.....	15
1.5 Ventajas y desventajas del ultrasonido focalizado	16
1.6 Importancia del ultrasonido focalizado en el envío dirigido de genes por las nanopartículas NTS-poliplex	21
1.7 Tratamientos de la enfermedad de Parkinson.....	22
2. Justificación	23
3. Hipótesis	24
4. Objetivo general.....	24
5. Objetivos particulares	24
6. Material y métodos.....	25
6.1 Plásmido	25
6.2 Ensamblaje de las NPs de poliplex de neurotensina	25
6.3 Crio microscopía electrónica de barrido (Cryo-SEM)	26
6.4 Dispersión de luz dinámica (DLS)	26
6.5 Medición del tamaño de las nanopartículas NTS-polyplex con software Fiji.....	27
6.6 Animales	27
6.7 Craneotomía y aplicación de FUS.....	29
6.8 Diseño de catéter y disección de la arteria carótida interna derecha.....	31
6.9 Azul de Evans y nanopartículas de NTS poliplex con el plásmido PVF	31
6.10 Disección cerebral	32
6.11 Inmunofluorescencia	33
6.12 Ensayos de inmunohistoquímica.....	35
6.13 Densitometría y recuento de neuronas	36
6.14 Prueba de la viga	37
6.15 Prueba de colocación de extremidades anteriores evocadas por vibrisas.....	37
6.16 Prueba de asimetría del uso de las extremidades anteriores en un cilindro. .	37

6.17 Análisis Estadístico	38
7. Resultados y discusión	38
7.1 Características físicas de las NP NTS-Polyplex	38
7.2 Apertura de la barrera hematoencefálica en la sustancia negra por ultrasonido focalizado	40
7.3 El ultrasonido focalizado permite la transfección de neuronas dopaminérgicas nigrales a través de vías sanguíneas y nasales	42
7.3 Activación transitoria de la neuroinflamación	49
7.4 Efecto de FUS y transfección sobre el sistema nigroestriatal y la conducta sensoriomotora.	64
8. Conclusión	71
9. Perspectivas	71
10. Referencias.....	72

RESUMEN

En ensayos preclínicos de la enfermedad de Parkinson, se ha demostrado que las nanopartículas de poliplex de neurotensina actúan como vectores eficientes para la transfección genética en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Sin embargo, este proceso solo ocurre tras la inyección intracerebral, dado que las nanopartículas no logran cruzar la barrera hematoencefálica (BHE). Por lo tanto, en este estudio, nuestro objetivo fue abrir la BHE utilizando ultrasonido focalizado (FUS) en la sustancia negra. Esta metodología nos permitirá realizar transfecciones sistémicas e intranasales con un impacto mínimo en las ratas. La administración sistémica del azul de Evans demostró que dos pulsos de FUS lograron abrir la BHE en la sustancia negra. Posteriormente, administramos nanopartículas de poliplex de neurotensina conteniendo el plásmido de la proteína verde fluorescente a través de la arteria carótida interna, el seno retro-orbital venoso y la mucosa nasal después de la aplicación de FUS, lo que permitió la expresión de la proteína verde en neuronas dopaminérgicas (células tirosina hidroxilasa positivas) en ambas sustancias negras. La administración intracarotídea mostró la mayor expresión transgénica, seguida por la administración intranasal y venosa. Además, observamos que la aplicación de FUS causó neuroinflamación, evidenciada por la infiltración de linfocitos, activación de microglía, y la presencia de astrocitos neurotóxicos A1 y neurotróficos A2. Estos marcadores de neuroinflamación desaparecieron 15 días después de la aplicación de FUS. Las neuronas dopaminérgicas y sus proyecciones axonales mostraron una disminución temporal en asociación con alteraciones en el comportamiento locomotor, pero estos valores se recuperaron a los 15 días posteriores a la aplicación de FUS. En conclusión, aunque este procedimiento causó neuroinflamación transitoria y afectación neuronal reversible, permitió la transfección sistémica e intranasal de neuronas dopaminérgicas en ambas sustancias negras. Por lo tanto, la aplicación de FUS podría facilitar la transición de la nanotecnología de poliplex de neurotensina hacia ensayos clínicos para la enfermedad de Parkinson.

ABSTRACT

Neurotensin-polyplex nanoparticles prove effective gene transfection in nigral dopaminergic neurons following intracerebral administration in preclinical Parkinson's disease models, due to their inability to cross the blood-brain barrier (BBB). Therefore, this study aimed to transiently open the BBB using focused ultrasound (FUS) targeted at the substantia nigra, enabling systemic and intranasal nanoparticle delivery and evaluating associated rat neurotoxicity. Systemic administration of Evans Blue confirmed that two FUS pulses effectively opened the nigral BBB. Subsequently, 35 μ L of neurotensin-polyplex nanoparticles containing a green fluorescent protein plasmid (mean size: 79.6 nm, Zeta-potential: +1.3 mV) induced transgene expression in tyrosine hydroxylase-positive dopaminergic neurons of both substantiae nigrae when delivered via the internal carotid artery, retro-orbital venous sinus, or nasal mucosa 30 minutes post-FUS. Intracarotid delivery yielded the highest transfection efficacy, followed by intranasal and venous routes. However, FUS induced neuroinflammation evidenced by infiltrating lymphocytes (CD45-positive), activated microglia (ionized calcium-binding adaptor molecule 1-positive), neurotoxic A1 astrocytes (glial fibrillary acidic protein and complement component 3-positive), and neurotrophic A2 astrocytes (glial fibrillary acidic protein and S100 calcium-binding protein A10-positive), which resolved within 15 days post-FUS. Dopaminergic neuron counts and axonal projections initially decreased but returned to baseline values by day 15, paralleling locomotor behavior changes. In conclusion, despite transient neuroinflammatory responses and reversible neuronal effects, FUS facilitated systemic and intranasal transfection of nigral dopaminergic neurons. This underscores FUS's potential in advancing neurotensin-polyplex nanotechnology toward clinical trials for Parkinson's disease.

1. Antecedentes

1.1 Terapia génica

La terapia génica dirigida representa un enfoque novedoso para la entrega de material genético exógeno (ADN/ARN) a una población celular específica para corregir un defecto genético o sobre expresar una proteína de interés fisiológico [1]. La terapia génica requiere tres elementos necesarios: un gen de interés el cual será expresado por células cuya proteína realizará un efecto terapéutico, una población celular blanco donde se llevarán a cabo las modificaciones, y un vector encargado de transportar el material genético a la célula blanco. El principal desafío de esta tecnología es desarrollar vectores altamente específicos, eficientes y seguros. Actualmente los vectores adenovirales y retrovirales, utilizados en ensayos clínicos, proporcionan una alta eficiencia de transfección y una rápida expresión del material genético [2]. Sin embargo, estos vectores presentan algunas desventajas inherentes a su naturaleza viral tales como mutagénesis por inserción, arresto celular e inmunogenicidad relativamente alta [2, 3]. Además, se ha observado en ensayos clínicos que pueden inducir cáncer o causar inclusive la muerte del paciente [4].

Los vectores no virales que introducen el material genético a las células blanco mediante métodos químicos (ej. fosfato cálcico, liposomas) y físicos (ej. biobalística, electroporación, microinyección) no ofrecen ninguna ventaja para utilizarse en la terapia génica pues no se pueden aplicar sistémicamente. En contraste, los vectores no virales de naturaleza catiónica son capaces de compactar los ácidos nucleicos polianiónicos por interacciones electrostáticas y se les pueden unir ligandos para dirigirlos a las células blanco. El principal problema de estos vectores es que no atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) y por esto se tienen que inyectar en el cerebro en estudios preclínicos de terapia génica para enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson [5]. Los polímeros policatiónicos más comúnmente utilizados son la polietilenimina (PEI), los dendrímeros y la poli-L-lisina (Ej. poliplex) [6, 7]. Las ventajas de los vectores no virales sobre los vectores virales incluyen una menor inmunogenicidad, fabricación más fácil, modificaciones moleculares para aumentar su eficiencia y una mayor

capacidad de empaquetamiento del transgén. Sin embargo, la deficiente transferencia de genes ha limitado su uso hasta la fecha.

1.2 Barrera hematoencefálica

El principal obstáculo para aplicar la terapia génica por vía sistémica en enfermedades neurológicas es la BHE, la cual está encargada de controlar la comunicación bidireccional entre el cerebro y el resto de los órganos a través de la circulación sanguínea. De manera particular, restringe la entrada de moléculas y células, principalmente las inmunológicas circulantes, que pudieran alterar la homeostasis cerebral [8, 9]. La BHE es una estructura compleja constituida por células endoteliales de la red capilar, la lámina basal de la pared capilar, los pericitos localizados en la parte exterior de la lámina basal, y los astrocitos perivasculares (figura 1).

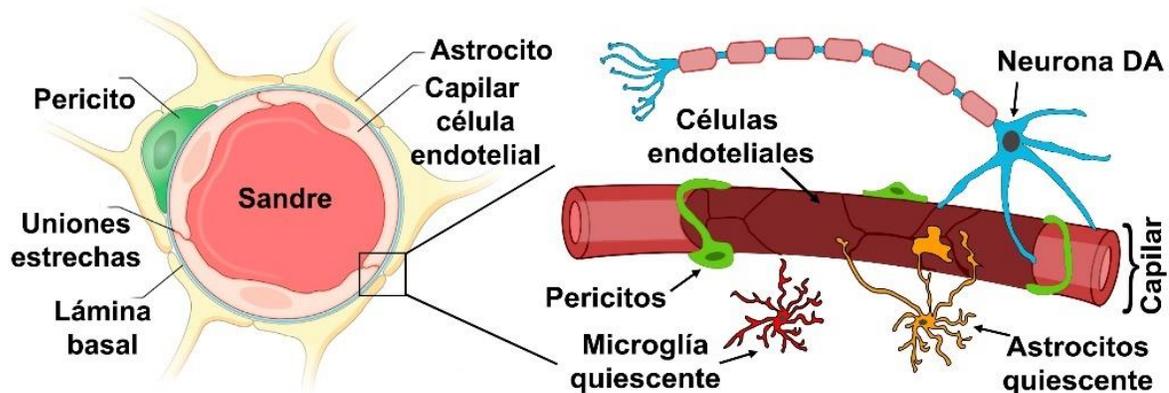


Figura 1. Las células endoteliales cerebrales forman uniones estrechas en su periferia que sellan la vía de difusión paracelular acuosa entre las células. Los pericitos se distribuyen de forma discontinua a lo largo de los capilares cerebrales y rodean parcialmente el endotelio. La permeabilidad de la BHE puede regularse mediante la liberación de péptidos vasoactivos y otros agentes de las células asociadas con el endotelio. La microglía son las células inmunocompetentes residentes del cerebro. El movimiento de solutos a través de la BHE es pasivo, impulsado por un gradiente de concentración desde el plasma al cerebro, donde entran más sustancias liposolubles con mayor facilidad, o puede ser facilitado por transportadores pasivos o activos en las membranas de las células endoteliales. Los transportadores de eflujo en el endotelio limitan la penetración en el SNC de una amplia variedad de solutos.

La transcitosis de macromoléculas a través de la BHE por mecanismos endocíticos proporciona la ruta principal por la cual solutos de gran peso molecular, como proteínas y péptidos, pueden ingresar intactos al SNC. Aunque la presencia de la barrera hematoencefálica y las uniones estrechas impide físicamente que la mayoría de las moléculas grandes transportadas por la sangre entren al cerebro, existen mecanismos de transcitosis específicos y algunos no específicos para transportar una variedad de moléculas y complejos grandes a través de la BHE (figura 2).

La BHE, además de permitir el acceso a nutrientes, favorece la excreción de los productos de desecho [10]. En resumen, son tres los mecanismos que participan en la permeabilidad selectiva de la BHE (figura 2):

- Difusión transmembranal o a través de las uniones estrechas del endotelio vascular cerebral, que permite el paso de compuestos como el oxígeno, glucosa, aminoácidos (L-glutamato) y otros nutrientes [6, 10, 11].
- Transporte selectivo o facilitado desde el sistema circulatorio cerebral dependiente de ATP o penetración por caveolas y transcitosis [6, 8, 10].
- Metabolización de productos de la sangre hacia el tejido nervioso y viceversa [10].

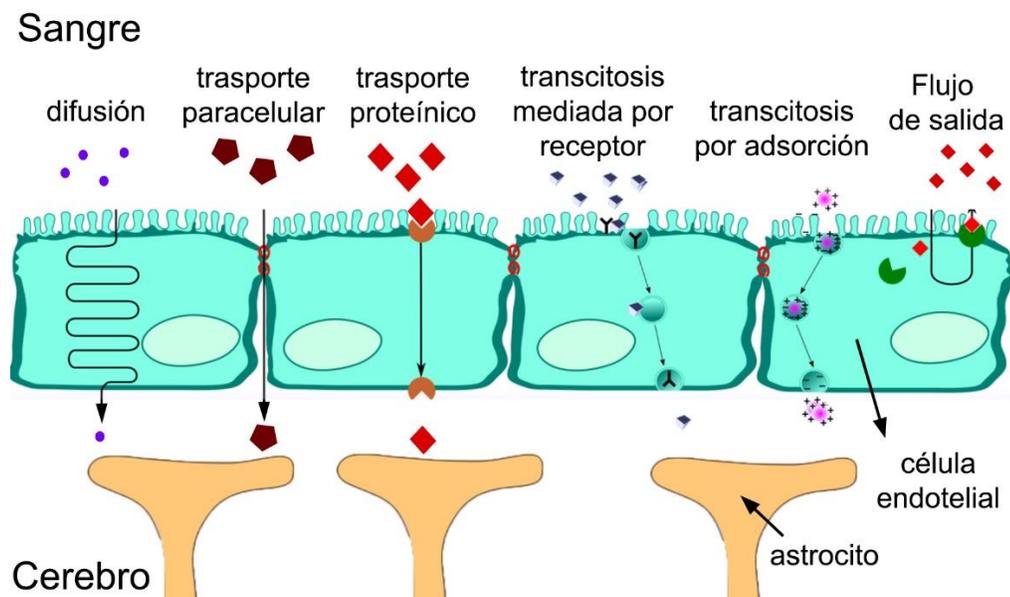


Figura 2. Diferentes tipos de transporte de sustancias desde la sangre al cerebro a través de la BHE.

A pesar de la permeabilidad de la BHE, existen varias alternativas para eludirla específicamente en el envío dirigido de genes al cerebro; por ejemplo, el transporte retrógrado del flujo axónico para enviar genes a regiones cerebrales específicas a través de vectores lentivirales y el envío transvascular a través de un péptido corto derivado de la glicoproteína del virus de la rabia. Sin embargo, estos abordajes no han progresado a la clínica debido a los problemas inherentes a los vectores virales [12, 13].

Se ha propuesto, por lo tanto, que para lograr que los nanomedicamentos lleguen a las zonas afectadas se debe abrir la BHE con la finalidad de aumentar la permeabilidad endotelial. Por ello en este trabajo proponemos el uso de la aplicación de FUS como una estrategia viable para abrir la BHE en la sustancia negra de manera reversible, lo que permitiría el paso de moléculas de mayor tamaño al parénquima cerebral.

1.3 Apertura de la barrera hematoencefálica con ultrasonido focalizado

En 1935, Gruetzmacher colocó una superficie cóncava sobre el transductor piezoeléctrico y observó que las ondas ultrasónicas podían focalizarse [14]. A partir de ese descubrimiento, la aplicación de Ultrasonido Focalizado (FUS) se propuso como una herramienta no invasiva para la destrucción de tejidos dentro del cuerpo. En 1954, William y Francis Fry desarrollaron un dispositivo de aplicación de ultrasonido focalizado para el sistema nervioso central de animales y, poco tiempo después, realizaron experimentos en mamíferos, específicamente estudiando los efectos del ultrasonido en el cerebro de gatos. En 1958, Francis Fry propuso el uso del dispositivo para cirugías en seres humanos debido a su aplicación focalizada.

Entre las diversas aplicaciones del Ultrasonido Focalizado (FUS) se encuentra el tratamiento del glaucoma. En 1986, se reportaron los resultados de 170 pacientes con glaucoma refractario que fueron tratados con ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU, por sus siglas en inglés) [15]. La aplicación de ultrasonido focalizado también se ha utilizado para tratar la fibrilación auricular en la cirugía cardíaca, demostrando la seguridad y eficacia del tratamiento. [16].

En 2005 el grupo de Hynynen reportó cómo reaccionan las células de la BHE por la aplicación de FUS y el uso de medios de contraste ultrasónico, también conocidos como microburbujas. El resultado obtenido demostró la apertura de la BHE. Un año más tarde, Hynynen trabajó en el envío de anticuerpos al cerebro de ratones, utilizando el mismo tipo de microburbujas y un transductor con una frecuencia de 0.69 MHz. La disrupción de la BHE se confirmó por la presencia del azul de tripano en el cerebro después de su administración intravenosa, corroborando los resultados de otros estudios desarrollados durante la primera década del siglo XXI [17].

Los mecanismos de acción del ultrasonido focalizado en conjunto con medios de contraste ultrasónicos (MCU) aún no son del todo comprendidos. Existen distintas variables que influyen en la disrupción de la BHE; por ejemplo, el tiempo de aplicación, la longitud y el ciclo útil del pulso. Estas investigaciones dieron la pauta para el uso del ultrasonido focalizado como herramienta en el envío de fármacos al cerebro para tratar enfermedades neurodegenerativas como la EP [18, 19].

Desde 2009, en el laboratorio LAREMUS (Laboratorio de Radiación Electromagnética y Ultrasónica) del Cinvestav, se han llevado a cabo investigaciones pioneras. Estos estudios se centran en la modelación de señales aplicadas y dirigidas a un transductor para terapias de ultrasonido, analizando la propagación de la onda y los efectos celulares de la energía de ultrasonido emitida [20]. En 2015, Martínez Valdez R. desarrolló un aplicador de potencia ultrasónica, basándose en una geometría híbrida focalizada, mejorando el rendimiento energético en aplicaciones térmicas como la ablación y la hemostasia, probadas en modelos in vivo y phantom. Contreras Machado y su equipo lograron abrir la barrera hematoencefálica (BHE) en ratones al aplicar ultrasonido focalizado (FUS) a través del cráneo, aumentando la temperatura en ocho grados centígrados. Sin embargo, este procedimiento no alcanzó la sustancia negra y produjo ablación del tejido circundante [21, 22]. En 2017, Hernández Chávez D. demostró la apertura de la BHE en la sustancia negra administrando azul de Evans (AE) por vía intravenosa después de aplicar FUS a través de una craneotomía de 1 cm², sin manifestaciones aparentes de cambios en el parénquima cerebral [23]. Finalmente, en 2019,

Rodríguez J.A. y su equipo lograron abrir transitoriamente la BHE en la sustancia negra mediante la aplicación de FUS a bajas potencias (3 W) y la administración sistémica de microburbujas. Este desarrollo reciente permitirá el envío dirigido de fármacos que no atraviesan la BHE, mejorando el tratamiento de la enfermedad de Parkinson [24]. La Tabla 1 resume los grupos que han aportado ventajas a la aplicación de FUS para modificar la permeabilidad de la BHE y facilitar el envío de fármacos al cerebro.

Tabla 1. Evolución de la aplicación de FUS para la apertura de la BHE

Año	Autor	Técnica	Características
2001	E.A. Hynnen	US	Ultrasonido para apertura de la BHE en conejos
			Laboratorio LAREMUS-BIOELECTRÓNICA
2016	Contreras Machado V.	FUS	Aumentos de 8°C de temperatura para la apertura de la BHE
2017	Hernández Chávez D.	FUS	Apertura reversible de la BHE en la sustancia negra
2018	Claudia, Reyes	FUS	Apertura reversible de la BHE con focalización en la sustancia negra y microburbujas
2018	Jerzy Szablowski	FUS	Envío dirigido de un gen hacia la sustancia negra mediante la aplicación de ultrasonido focalizado
2020	Chung-Yin Lin	FUS	Envío dirigido de genes con microburbujas hacia la sustancia negra mediante la aplicación de ultrasonido focalizado
2023	Rodríguez, Jorge	FUS	Protocolo para inducir la apertura temporal de la barrera hematoencefálica con ultrasonido focalizado de corta duración en ratas

1.4 Principio físico

El sonido se transmite como energía mecánica mediante ondas de presión en distintos medios: sólidos, líquidos o gaseosos. Estas ondas se caracterizan por ser periódicas y viajar a una frecuencia determinada. La propagación de las ondas depende de la forma en que se generan, los medios por los que viajan y su geometría. Las ondas acústicas que superan el umbral audible (>20 kHz) se clasifican como ultrasonido (US).

Para aplicar el ultrasonido se requiere el uso de un transductor o transductores, dispositivos que convierten una forma de energía en otra. En consecuencia, un transductor convierte la energía eléctrica en energía ultrasónica y viceversa. Su funcionamiento se basa en el efecto piezoeléctrico, que ciertos cristales manifiestan en respuesta a una presión aplicada, generando un voltaje. De igual manera, al aplicar un voltaje a un cristal, este se deforma; estas deformaciones pueden ser de compresión o extensión, dependiendo de la polaridad del voltaje. Esta deformación se conoce como efecto piezoeléctrico inverso y se utiliza para generar un haz de ultrasonido mediante un transductor [22].

Los transductores están diseñados para tener una sensibilidad máxima a una frecuencia específica, conocida como frecuencia de resonancia del transductor. Esta frecuencia depende del tipo de cristal piezoeléctrico y su espesor. Los cristales gruesos generan frecuencias de resonancia bajas y viceversa (figura 3) [25].

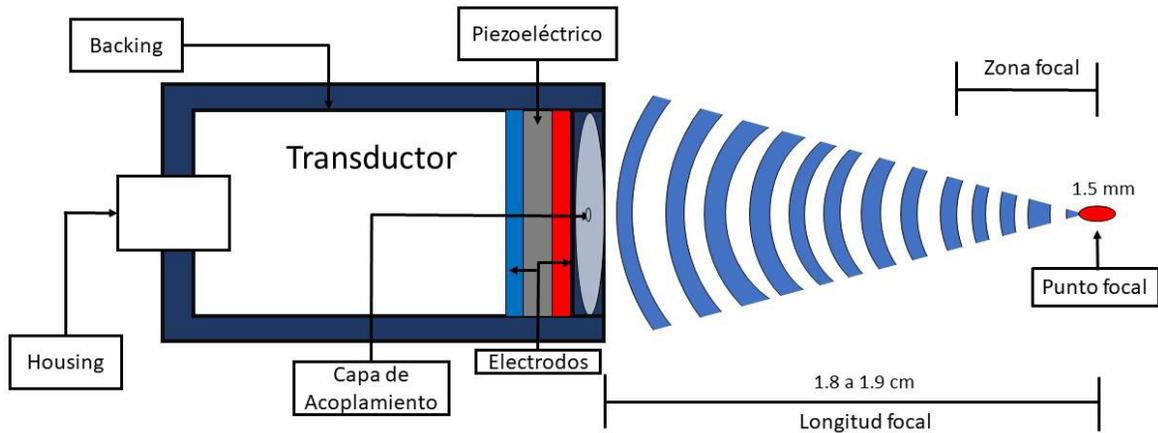


Figura 3. Las ondas de ultrasonido son generadas al aplicar un campo eléctrico a un conjunto de cristales piezoeléctricos. Se utiliza un elemento piezoeléctrico cóncavo, montado en una caja cilíndrica. Housing: chasis con el conector, backing: material para aumentar el ancho de banda del transductor que reduce la respuesta vibratoria, capa de acoplamiento: ayuda a acoplar la impedancia acústica entre el piezoeléctrico y el medio, electrodos: alimentan al piezoeléctrico, piezoeléctrico, convierte la energía eléctrica en energía mecánica. Transductor (2-20-20/4, Onda Corporation con una frecuencia de trabajo 2Mhz, y un espesor de 1.02 mm), piezoeléctrico PTZ-8 (Exelis, EC-67). Tamaño del punto focal 1.5 mm, distancia al foco 1.8 a 1.9 cm.

1.5 Ventajas y desventajas del ultrasonido focalizado

Investigaciones recientes han demostrado que el ultrasonido focalizado (FUS) es una técnica mínimamente invasiva que puede abrir la barrera hematoencefálica (BHE) en un sitio específico y de manera reversible para permitir que el fármaco atraviese el parénquima cerebral después de su administración intravenosa [16]. Aunque aún se están investigando los mecanismos celulares y moleculares exactos de la apertura de la BHE mediante FUS, se ha sugerido que el esfuerzo cortante (FSS, por sus siglas en inglés) en la BHE desencadena el transporte transcelular y paracelular [26]. El FSS implica la aplicación de una fuerza sobre un material, clasificada según la dirección de la superficie sobre la que actúa: normal y cortante. En condiciones de esfuerzo cortante disruptivo, las plaquetas se

activan y liberan metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9, aumentando la permeabilidad de la BHE mediante la degradación de la matriz extracelular (ECM) y las uniones estrechas. Además, el receptor acoplado a proteínas G (GPCR) detecta el esfuerzo cortante, activando la vía de señalización Src/ERK1/2 y regulando negativamente los marcadores de las uniones estrechas (Figura 4) [27].

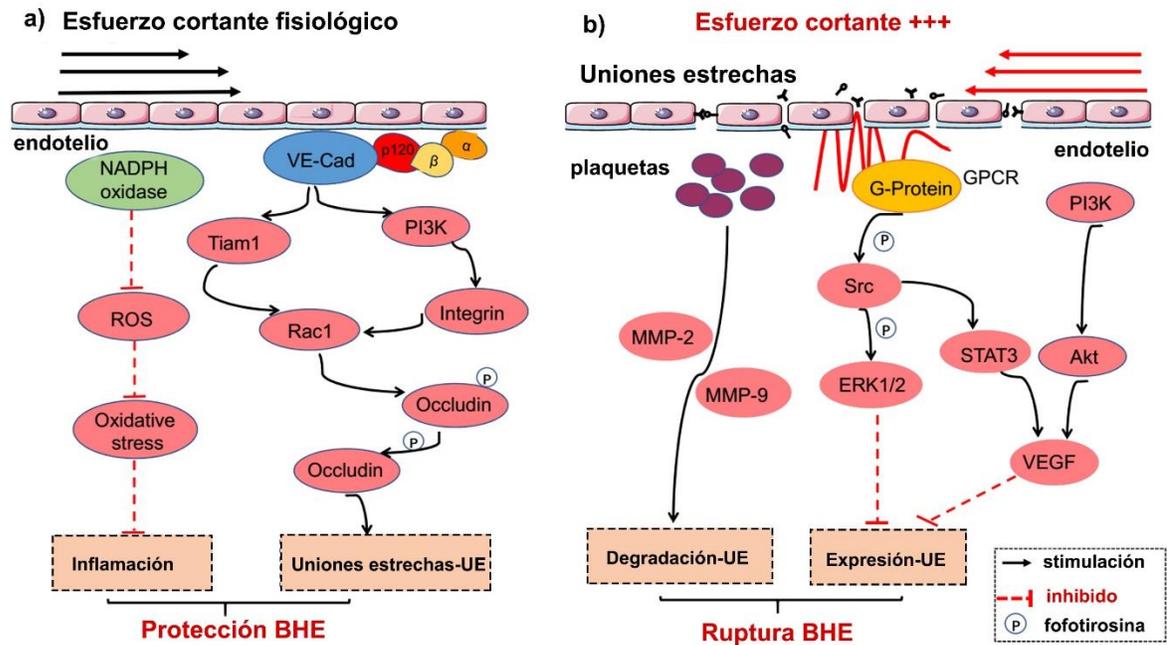


Figura 4. Esfuerzo cortante dentro de los capilares de la barrera hematoencefálica en condiciones fisiológicas normales y con aumento del esfuerzo cortante. a) mecanismos protectores de la BHE. El esfuerzo cortante fisiológico atenúa los efectos nocivos de las citocinas proinflamatorias sobre la integridad de la BHE, en parte mediante la supresión de la activación de NADPH y la generación de ROS, promoviendo así la expresión y el ensamblaje de proteínas de las uniones estrechas interendoteliales. Además, el esfuerzo cortante de tipo capilar promueve el ensamblaje de las UE a través de la vía VE-cadherina/Tiam1/Rac1, lo que aumenta la tensión de la BHE., b) Los mecanismos disruptivos de la BHE frente al aumento de esfuerzo cortante. En condiciones patológicas, el aumento del FSS activa las plaquetas para liberar MMP-2 y MMP-9, que aumentan la permeabilidad de la BHE a través de la degradación de la ECM y las UE. Además, el receptor acoplado a proteína G (GPCR) detecta un nivel alto de FSS en la microvasculatura cerebral, que en consecuencia activa la vía de señalización Src/ERK1/2, induciendo así la regulación negativa de los marcadores de las uniones estrechas [27].

A pesar de las lagunas en el conocimiento sobre este tema, la aplicación de FUS se ha utilizado con éxito para la entrega dirigida de material genético sin especificidad a la región cerebral deseada después de la administración intravenosa en roedores de tipo salvaje, como un plásmido codificante de luciferasa que utiliza nanopartículas (NPs) que penetran el cerebro, ARNm de luciferasa encapsulado en NPs lipídicas, o receptores de diseño activados exclusivamente por medicamentos de diseño (DREADD) administrados por el vector del virus adenoasociado (AAV) serotipo-9 [28-30]. La aplicación de FUS también ha permitido administrar factores neurotróficos, ya sean proteínas o genes, a regiones cerebrales específicas, transportadas sistémicamente por diferentes vehículos en roedores sanos; por ejemplo, el plásmido BDNF encapsulado en burbujas catiónicas, microburbujas cargadas con pBDNF-EGFP, o solo NRTN [31-34]. De relevancia para esta tesis, la aplicación de FUS ha incrementado el envío intranasal de la proteína BDNF a cerebros de roedores sanos y del plásmido hGDNF compactado con polietilenglicol-polilisina [35, 36]. Desde el punto de vista terapéutico, la aplicación de FUS también ha permitido el acceso al cerebro de las proteínas BDNF administradas por vía intranasal y NRTN inyectada por vía intravenosa en modelos animales de EP inducida por neurotoxinas [34, 37]. La aplicación de FUS también ha permitido obtener efectos terapéuticos mediante la administración del gen GDNF a través de AAV, liposomas, microburbujas catiónicas y NPs de polietilenimina-polietilenglicol [34, 38-41]. La transfección de Nrf2 mediante la aplicación de FUS y la posterior administración de nano o microburbujas guiadas por resonancia magnética en ratas también protege a las neuronas dopaminérgicas de la lesión inducida por 6-OHDA [42]. Estos estudios pioneros se han centrado en demostrar la prueba de concepto de la terapia con un factor neurotrófico basada en la aplicación de FUS, ya sea como proteína o gen. Sin embargo, hasta ahora ningún trabajo ha abordado si tal enfoque puede inducir efectos adversos en el sujeto de estudio, como la neuroinflamación en la sustancia negra, donde residen las neuronas dopaminérgicas. Por lo tanto, es crucial investigar si la aplicación de FUS puede provocar neuroinflamación y evaluar qué impacto tiene dicho proceso en la función de las neuronas dopaminérgicas. Esta evaluación es necesaria, considerando que la neuroinflamación contribuye

significativamente al desarrollo de la EP, principalmente por el efecto letal que ejercen los astrocitos neurotóxicos A1 sobre las neuronas y los oligodendrocitos [43, 44].

El aumento transitorio de la temperatura en el cerebro es la principal preocupación de la aplicación del FUS destinada a abrir la BHE en la sustancia negra [45]. Recientemente, el laboratorio Laremus del CINVESTAV desarrolló un protocolo de aplicación de FUS de dos pulsos (3 watts, 1,965 MHz, durante 2 min con 30 s de intermitencia) que provoca un aumento de temperatura de 4 °C en el área de enfoque durante 2.5 min durante la exposición a las ondas ultrasónicas [25]. Aunque este incremento es bien tolerado en otras regiones del cerebro [46, 47], puede ser perjudicial en la sustancia negra, ya que las neuronas dopaminérgicas de este núcleo son altamente vulnerables a insultos internos y externos [48]. De hecho, uno de los insultos internos más conocidas son los productos de oxidación no enzimática de la dopamina, que son tóxicos para las neuronas dopaminérgicas [49]. Además, la respuesta insuficiente del sistema antioxidante causada por los bajos niveles de glutatión en las neuronas dopaminérgicas nigrales y la alta densidad de la población de microglía en la sustancia negra sana son otros factores internos que pueden favorecer la neuroinflamación [50, 51]. En cuanto a la entrega de genes, el portador del gen puede considerarse un insulto externo cuya estructura y cantidad podrían causar daño físico. Además, algunos de sus componentes pueden resultar antigénicos y, por ende, podrían desencadenar neuroinflamación. Estas cuestiones críticas siguen sin estar claras y deben investigarse para determinar el verdadero alcance de las NPs NTS-poliplex y la aplicación de FUS en la terapia génica de la EP.

1.5 Nanotecnología NTS-poliplex

Las nanopartículas (NPs) poliplex de neurotensina (NTS) constituyen un sistema específico para dirigir genes. En el caso de las neuronas dopaminérgicas presentes en la sustancia negra, se utilizan NPs resultantes de la compactación de un ADN plasmídico (pADN) que contiene la secuencia codificante de un gen de un factor neurotrófico. Este gen está bajo el control del promotor del gen transportador

de dopamina (DAT) o el promotor sintético NBRE3x [52-54]. Como resultado, el factor neurotrófico se expresará específicamente en las neuronas dopaminérgicas [55]. Este enfoque ha demostrado ser altamente eficiente y prometedor para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson [56].

Brevemente, la compactación del pADN (polianión) se lleva a cabo principalmente mediante la unión electrostática de poli-L-lisina lineal (polication) conjugada con NTS y un péptido fusogénico [57]. Las NPs de NTS-polyplex se internalizan mediante endocitosis mediada por el receptor de neurotensina tipo 1 (NTSR1), el cual se expresa mayoritariamente en las neuronas dopaminérgicas del cerebro [56-58]. El péptido fusogénico de las NPs desempeña un papel crucial en la liberación de las NPs que se alojan en el endosoma, permitiéndoles pasar al citoplasma y evitando así la degradación del ADN plasmídico (pADN) en ese compartimento [57, 59]. Por otro lado, el péptido cariofílico catiónico, que se une electrostáticamente al pADN, no solo contribuye a la compactación de este, sino que, debido a su dominio de translocación nuclear, dirige al pADN hasta el núcleo celular a través del sistema importina α/β , permitiendo así la expresión de la secuencia codificante [60].

La caracterización física de las NPs NTS-polyplex, realizada mediante microscopía electrónica de transmisión de barrido y dispersión dinámica de la luz, muestra que el tamaño de las partículas varía de 50 a 150 nm y que poseen una carga superficial eléctrica de 22 ± 7 mV [53, 55, 59, 61, 62]. Se ha postulado que estas características físicas probablemente impiden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) para llegar al cerebro [62, 63], pero también han servido para establecer su perfil farmacéutico para uso clínico [61]. Estas NPs permanecen estables en suero bovino y humano después de 60 minutos de incubación, y los productos de degradación de su parte peptídica se eliminan principalmente por la orina. Además, las NPs liofilizadas permanecen funcionales durante al menos seis meses almacenados a 25 °C y 60% de humedad relativa [61]. La seguridad de las NPs NTS-polyplex es una ventaja competitiva para su uso en humanos, ya que no activan la respuesta inmune innata, ni a nivel sistémico ni local [64]. Además, cuando se administran junto con genes terapéuticos, estas NPs muestran un efecto

anti-neuroinflamatorio [54, 55]. Su alta especificidad permite inducir la expresión de genes en neuronas dopaminérgicas, incluso mediante sistemas inducibles regulados por doxiciclina. Por lo tanto, podemos afirmar que la capacidad de transfección dual y la administración unilateral refuerzan la idea de que el sistema de NPs NTS-polyplex es atractivo para su uso clínico en la enfermedad de Parkinson (EP) [52-54, 57, 58, 65-68].

1.6 Importancia del ultrasonido focalizado en el envío dirigido de genes por las nanopartículas NTS-poliplex

Dado que las NPs NTS-polyplex no cruzan la BHE [62, 63], el primer objetivo de este trabajo fue la aplicación de FUS en la sustancia negra, con la finalidad de abrir transitoriamente la BHE y permitir la transfección de las neuronas dopaminérgicas con NPs administradas por la mucosa nasal y la circulación sanguínea [25]. Debido a que las NPs NTS-polyplex son seguras, el segundo objetivo fue determinar si la transfección facilitada por la aplicación de FUS podría agravar la neuroinflamación que ocurre por la aplicación de FUS y evaluar su impacto en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra [54, 59, 64, 69]. Se utilizó el colorante Evans Blue (EB) como control positivo de la apertura de BHE [70]. Inmediatamente después de la aplicación de FUS, se administró a través de la arteria carótida interna, el seno venoso retroorbitario o la mucosa nasal, la misma cantidad de NPs NTS-polyplex que albergan al plásmido pEGFP-N1, que codifica la proteína verde fluorescente (PVF), para demostrar la expresión de PVF en neuronas dopaminérgicas nigrales y proyecciones axonales [59, 60, 64, 70]. El efecto nocivo de este procedimiento se evaluó a través de variables de la neuroinflamación celular y el estado estructural y funcional del sistema nigroestriatal dopaminérgico a lo largo del tiempo. La importancia de este estudio radica en aplicar por primera vez el protocolo de FUS desarrollado por el Laboratorio Laremus del CINVESTAV para superar la limitación de la BHE para las transfecciones sistémicas de las NPs NTS-polyplex desarrolladas por el grupo de Nanomedicina del CINVESTAV. De resultar exitosas, las tres vías de administración exploradas (intracarotídea, intravenosa e

intranasal) darían una ventaja competitiva sin precedentes a la nanotecnología NTS-polyplex para usos clínicos futuros. Nuestro protocolo de aplicación de FUS puede beneficiar a otros vectores genéticos y utilizar nuestra contribución al conocimiento sobre la neuroinflamación para evaluar su grado de seguridad.

1.7 Tratamientos de la enfermedad de Parkinson

La EP es una enfermedad neurodegenerativa causada por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas y que tiene un tratamiento sintomático, pero no curativo [56]. Debido a las limitaciones de la terapia de reemplazo dopaminérgico, basada en fármacos o entrega de genes, la terapia con un factor neurotrófico mediante inyecciones locales de la proteína o de genes neurotróficos permite detener la neurodegeneración y restaurar el sistema nigroestriatal dopaminérgico [71, 72]. Por eso, la administración de la proteína del factor neurotrófico de dopamina cerebral (CDNF) o el gen codificante para CDNF constituye una terapia novedosa que se usa en modelos preclínicos de EP [73]. Otros factores neurotróficos, como el factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF) y la neurturina (NRTN), se evalúan actualmente en ensayos clínicos mediante inyecciones de proteínas purificadas o entrega de genes al cerebro mediada por vectores virales [74]. Hasta la fecha, dichas terapias se han aplicado mediante inyección intracerebral o por infusión en el ventrículo cerebral lateral.

Por otro lado, el potencial terapéutico de las NPs NTS-polyplex depende de su capacidad para entregar cargas genéticas a través de la internalización mediada por NTSR1 a neuronas dopaminérgicas in vitro e in vivo [57, 67]. Los estudios preclínicos en parkinsonismo temprano inducido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) han demostrado que la administración dirigida de genes que codifican factores neurotróficos como el GDNF humano (hGDNF) [75], factor neurotrófico derivado del cerebro de rata (rBDNF) [66], o hCDNF [54] rescata a las neuronas dopaminérgicas de la neurodegeneración. Además, la administración del gen de hCDNF, rBDNF o mNRTN en ratas con parkinsonismo avanzado inducido por 6-OHDA es capaz de restaurar la estructura y función del sistema nigroestriatal dopaminérgico [52, 68,

76]. Un estudio reciente en un nuevo modelo de EP muestra que la transfección del gen *nurr1* mediada por NPs NTS-polyplex en neuronas dopaminérgicas reduce significativamente la neuroinflamación, la propagación similar a priones de agregados patológicos de α -sinucleína y la degeneración del sistema nigroestriatal dopaminérgico, mejorando así la actividad locomotora [55]. No obstante, la inyección intracerebral invasiva sigue siendo el principal obstáculo para la traslación de las NPs NTS-polyplex a la clínica, ya que no atraviesan la BHE cuando se administran a través de la circulación sanguínea [63].

2. Justificación

La administración intracerebral de NPs de NTS-polyplex ha demostrado ser un abordaje específico, eficiente y seguro en la terapia neurotrófica usada en ensayos preclínicos de la EP. Sin embargo, su aplicación clínica en pacientes de edad avanzada, que generalmente presentan aterosclerosis, resulta inviable y, en ocasiones, incluso letal debido a los riesgos asociados con la inyección intracerebral de estas NPs, como hemorragias, accidentes cerebrovasculares e infecciones. Para superar esta limitación, se ha propuesto una estrategia prometedora: el uso de ultrasonido focalizado (FUS) para abrir temporalmente la BHE en la sustancia negra, permitiendo la administración sistémica de las NPs de NTS-polyplex sin la necesidad de inyección intracerebral. Sin embargo, es importante destacar que la aplicación de FUS en el cerebro para abrir la BHE es un enfoque relativamente nuevo, y aún no se han evaluado completamente los posibles efectos adversos de esta terapia. Dado que las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra son altamente susceptibles a factores intrínsecos y extrínsecos, como la neuroinflamación o la neurodegeneración, planteamos la hipótesis de que esta estrategia podría tener consecuencias no deseadas en esta región cerebral. Creemos que es fundamental seguir investigando y evaluando cuidadosamente los riesgos y beneficios antes de implementar esta terapia en pacientes clínicos.

3. Hipótesis

La aplicación de FUS en la sustancia negra abrirá temporalmente la BHE, permitiendo la transfección de nanopartículas génicas de NTS-polyplex a las neuronas dopaminérgicas nigrales por vía sistémica. Sin embargo, este proceso podría estimular la neuroinflamación (Figura 5).

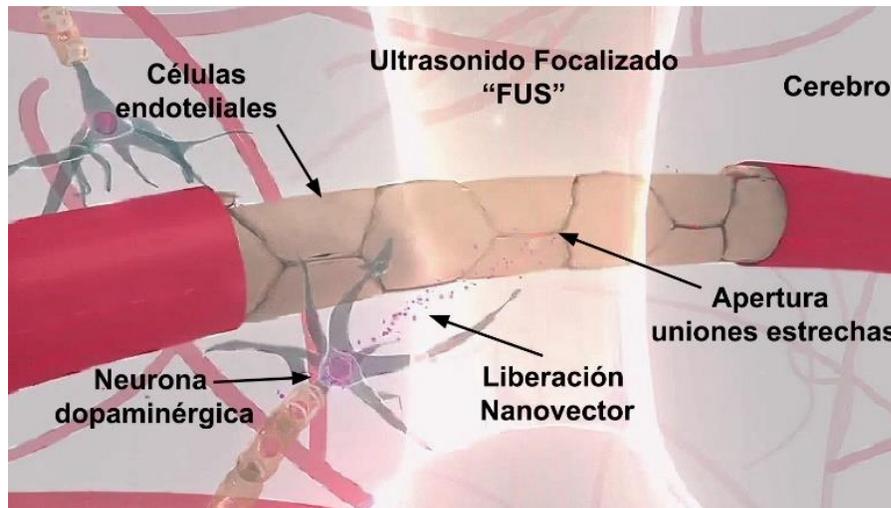


Figura 5. Simplificación de la barrera hematoencefálica representada por un capilar que irriga la sustancia negra donde al aumentar la presión y la temperatura por las ondas del ultrasonido focalizado se produce la apertura de las uniones estrechas permitiendo la difusión de las NPs NTS-poliplex al cerebro.

4. Objetivo general

Investigar la factibilidad de utilizar ultrasonido focalizado (FUS) para el envío dirigido de genes a las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra mediante diferentes vías de administración sistémica (intraarterial, intravenosa e intranasal), y explorar los posibles efectos adversos inducidos por este proceso.

5. Objetivos particulares

1. Conocer las características físicas de las NPs del NTS-poliplex.
2. Demostrar la apertura de la BHE por la aplicación de FUS y encontrar la vía de administración sistémica más eficiente para introducir sustancias al cerebro.

3. Explorar si la aplicación de FUS permite la transferencia del gen reportero PVF por las NPs NTS-poliplex a neuronas dopaminérgicas nigrales a través de tres rutas sistémicas.
4. Explorar si la aplicación de FUS en la sustancia negra ocasiona neuroinflamación aguda evaluando la inmunorreactividad a:
 - Microglía activa
 - Astrocitos neurotóxicos A1
 - Leucocitos Infiltrados
 - Astrocitos neurotróficos A2
5. Explorar si la aplicación de FUS en la sustancia negra ocasiona neurodegeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal mediante:
 - Inmunohistoquímica contra TH
 - Conducta sensoriomotora

6. Material y métodos

6.1 Plásmido

El plásmido pEGFP-N1 (4733 pb) expresa la PVF bajo el control del promotor CMV (Clontech Laboratories, Inc; East Meadow Circle, Palo Alto, CA, USA).

6.2 Ensamblaje de las NPs de poliplex de neurotensina

Las NPs NTS-poliplex resultan de la compactación de un pADN por un péptido cariofílico (PC) y el portador NTS en dos pasos sucesivos de unión electrostática ampliamente descritos en otros lugares [57, 59]. Se ensamblaron NPs de poliplex NTS con el plásmido pEGFP-N1, el portador de NTS y el KPRa (Ac-KMAPKKRK) o KPSV40 (Ac-MAPTKRKGSCPGAAPNKPK en medio Dulbecco Eagle modificado (DMEM; Thermo Fisher Scientific-MX, Ciudad de México, MX). Las NPs de NTS-polyplex también se ensamblaron sin un KP como control de la caracterización física. La selección de las NPs adecuadas se realizó utilizando los ensayos de retardo y retención y el criterio de la relación molar óptima. Primero, se

unió electrostáticamente un KP (9 μM) al plásmido pEGFP-N1 (18 nM) para formar el complejo plásmido-KP. En segundo lugar, este complejo se compactó en NPs uniendo electrostáticamente el portador NTS (432 nM), el cual se sintetizó previamente mediante el entrecruzamiento del péptido fusogénico HA2 (PF) y NTS con poli-L-lisina [57, 59]. La cantidad total de pADN utilizado fue 1.69 μg en 35 μl de DMEM por rata y fue similar para las transfecciones a través de la arteria carótida interna, el seno retroorbitario y la mucosa nasal.

6.3 Crio microscopía electrónica de barrido (Cryo-SEM)

La forma y el tamaño de las NPs de NTS-poliplex se examinaron utilizando un microscopio electrónico de barrido criogénico de alta resolución (Cryo-SEM; Hitachi S-4800; Tokio, Japón). Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se fracturaron en la cámara criogénica a $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después del proceso de grabado a $-98\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 s, las muestras se pulverizaron durante 120 s con platino en la cámara de preparación criogénica GATAN Alto 2500 y se transfirieron al Cryo-SEM. Las fotografías fueron tomadas con objetivos 20X y 80X.

6.4 Dispersión de luz dinámica (DLS)

El diámetro hidrodinámico y la carga superficial de las NPs de NTS-poliplex se determinaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un aparato Litesizer™ 500 equipado con un láser de 658 nm (Anton Paar; Graz, Austria). El tamaño se midió en muestras recién preparadas de 700 μl en cubetas de poliestireno previamente enjuagadas utilizando un ángulo de retrodispersión de 175° . Cada medición incluyó 60 corridas con intervalos de 10 s a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; la densidad del filtro óptico y el enfoque se seleccionaron automáticamente. Además, la carga superficial de las NPs NTS-polyplex se calculó mediante mediciones de potencial zeta utilizando dispersión de luz electroforética (ELS). Las mediciones se realizaron en 300 μL de muestras frescas en cubetas omega que contenían electrodos de oro. El aparato Litesizer™ 500 se configuró para 60 ejecuciones a 200 V y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.5 Medición del tamaño de las nanopartículas NTS-polyplex con software Fiji

Las imágenes tomadas por Cryo-SEM se convirtieron a código binario y se procesaron utilizando el software ImageJ. Inicialmente, el tamaño de escala se designa usando el comando “straight”, que indica la escala de calibración de la imagen, y esto se procesa con el comando establecer “scale” para obtener un valor de píxeles/nm. Luego de este procedimiento, se realiza un ajuste de umbral para delimitar las áreas de cada NP. Se utilizó la herramienta “straight” para delimitar la longitud de cada NP para luego proceder con la medición para obtener los valores [77].

6.6 Animales

El trabajo con animales se realizó en base al protocolo #162-15 (autorización No. 162-15; fecha de aprobación: 9 de junio de 2019), autorizado y supervisado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) siguiendo la legislación mexicana vigente, NOM-062-ZOO-1999, y NOM-087-ECOL-1995 (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; SAGARPA). Se utilizaron Ratas Wistar macho con un peso entre 210 y 230 g fueron suministradas por la Unidad de Experimentación y Producción Animal del CINVESTAV y mantenidas a 22 °C, 60 ± 5% de humedad, con acceso a alimento y agua “ad libitum”. Se utilizaron un total de 66 animales, que fue el número mínimo según el diseño experimental y la validez estadística de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health, 2011) y considerando las tres R (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) para la experimentación con animales [78]. Además, se hicieron todos los esfuerzos posibles para evitar el sufrimiento de los animales.

Los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia general utilizando una mezcla de xilazina y ketamina (9 mg y 120 mg/kg; Laboratorios PISA; Ciudad de México, MX). Los animales (n = 66 en total) se separaron aleatoriamente en dos

grupos con subgrupos cada uno: 1) FUS + AE, 18 ratas para la administración del AE después de la aplicación de FUS distribuidos según la vía de administración: arteria carótida interna, 3 ratas; seno venoso retroorbitario, 3 ratas; vena caudal, 3 ratas; mucosa nasal, 3 ratas, cortes de mesencéfalo fresco de 300 μm de espesor, 3 ratas (Figura 6).

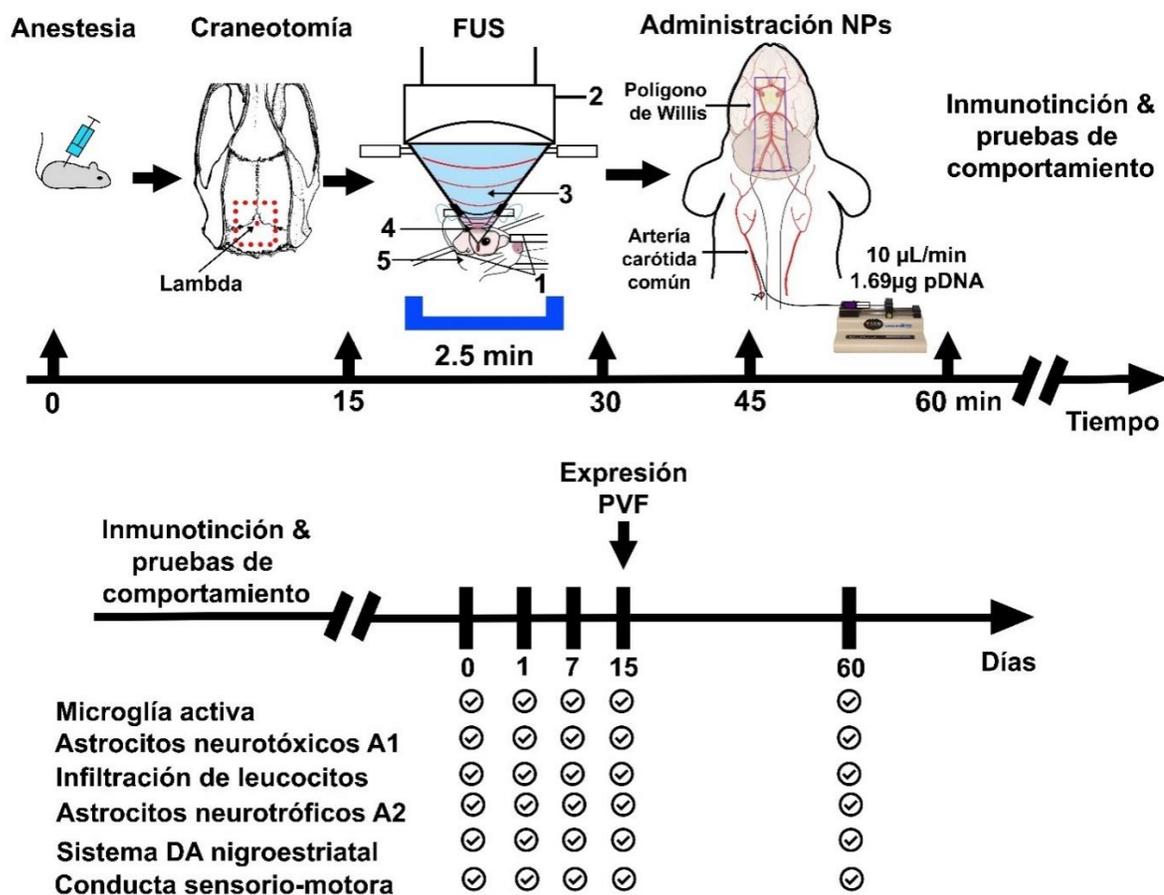


Figura 6. Diseño experimental para la aplicación de ultrasonido focalizado (FUS), administración de genes mediada por nanopartículas (NPs) a través de la arteria carótida interna y evaluación de neuroinflamación y neurodegeneración en la sustancia negra de ratas Wistar. Se siguió un protocolo similar para evaluaciones de parámetros biológicos y FUS para la administración de genes intravenosos e intranasales. Diagrama de aplicación de FUS: 1. estereotáxico, 2. transductor, 3. cono con agua, 4. gel de transmisión de ultrasonidos (Aquasoinc, Parker Laboratories; EE. UU.), 5. la rata. PVF = proteína verde fluorescente. DA = dopaminérgico.

Además, 3 ratas inyectadas con AE a través de la vena caudal sin FUS formaron el grupo de control negativo. 2) FUS + Transfección, 48 ratas transfectadas con plásmido pEGFP-N1 después de la aplicación de FUS. Se utilizaron doce ratas para la expresión de la PVF después de la administración por la arteria carótida interna (3 ratas), la mucosa nasal (3 ratas) y el seno venoso retroorbitario (3 ratas). Además, se utilizaron 3 ratas transfectadas por la arteria carótida interna como controles de tinción por inmunofluorescencia. Para los estudios de la evolución temporal de la neuroinflamación, el daño neuronal y el comportamiento después de la transfección por la arteria carótida interna, se utilizaron 36 ratas distribuidas en los siguientes grupos: 1 día (6 ratas), 7 días (6 ratas), 15 días (6 ratas), 60 días (6 ratas). CTRL (6 ratas no transfectadas sin FUS), SHAM (6 ratas con craneotomía sin FUS).

6.7 Craneotomía y aplicación de FUS

Las ratas anestesiadas se fijaron con un dispositivo estereotáxico (Stoelting; Wood Dale, ILL, EE. UU.), se limpiaron sus cráneos con peróxido de hidrógeno y se realizó una craneotomía cuadrada de 1 cm² en el lado izquierdo del cráneo después de diseccionar los tejidos de la cabeza. Se retiró la pieza ósea correspondiente luego de realizar el corte cuadrado con un mini taladro (Dremel®, Multipro™, modelo 395) y broca de 1 mm para colocar el cono del transductor del FUS sobre la duramadre en las coordenadas +2 mm del eje transversal y +2,1 mm en el eje anteroposterior, tomando como referencia el punto lambda. Se aplicó un gel ultrasónico entre el cono y el área expuesta del cerebro para evitar burbujas de gas y permitir la transmisión más eficiente de las ondas ultrasónicas. La pieza de hueso del cráneo, conservada en una solución fría y estéril de Hartmann, se reposicionó y se unió con cera para huesos (Atramat; Ciudad de México, MX) después de completar la aplicación de FUS y se prosiguió a suturar la piel. El ultrasonido focalizado se aplicó a través de un cono (poliuretano termoplástico, TPU) lleno de agua mediante el uso de un transductor cóncavo monoelemental de 2 MHz (frecuencia nominal) (Onda Corporation; Sunnyvale, CA, EE. UU.) con una longitud focal de 20 mm y un radio de 10 mm. Se utilizó un gel acústico como acoplador intermedio entre el cono y la cabeza de la rata para transmitir ultrasonido de manera

eficiente. El transductor FUS fue accionado por un generador de señal (2052, Teledyne LeCroy; Nueva York, EE. UU.) y un amplificador de potencia (500A250, Amplifier Research; Souderton, PA, EE. UU.), proporcionando una onda sinusoidal de 1.965 MHz (frecuencia de trabajo) modulada con una ráfaga de tono de 10 Hz. El transductor fue monitoreado por un medidor de potencia (PM2002, Amplifier Research, Gainesville, GA, EE. UU.). Se utilizó un osciloscopio (600A, LeCroy; Lake Mary, EE. UU.) para monitorear la señal de salida. La intensidad de la señal se aplicó siguiendo el protocolo establecido previamente [25] para la apertura temporal de la BHE en la sustancia negra (Figura 7).

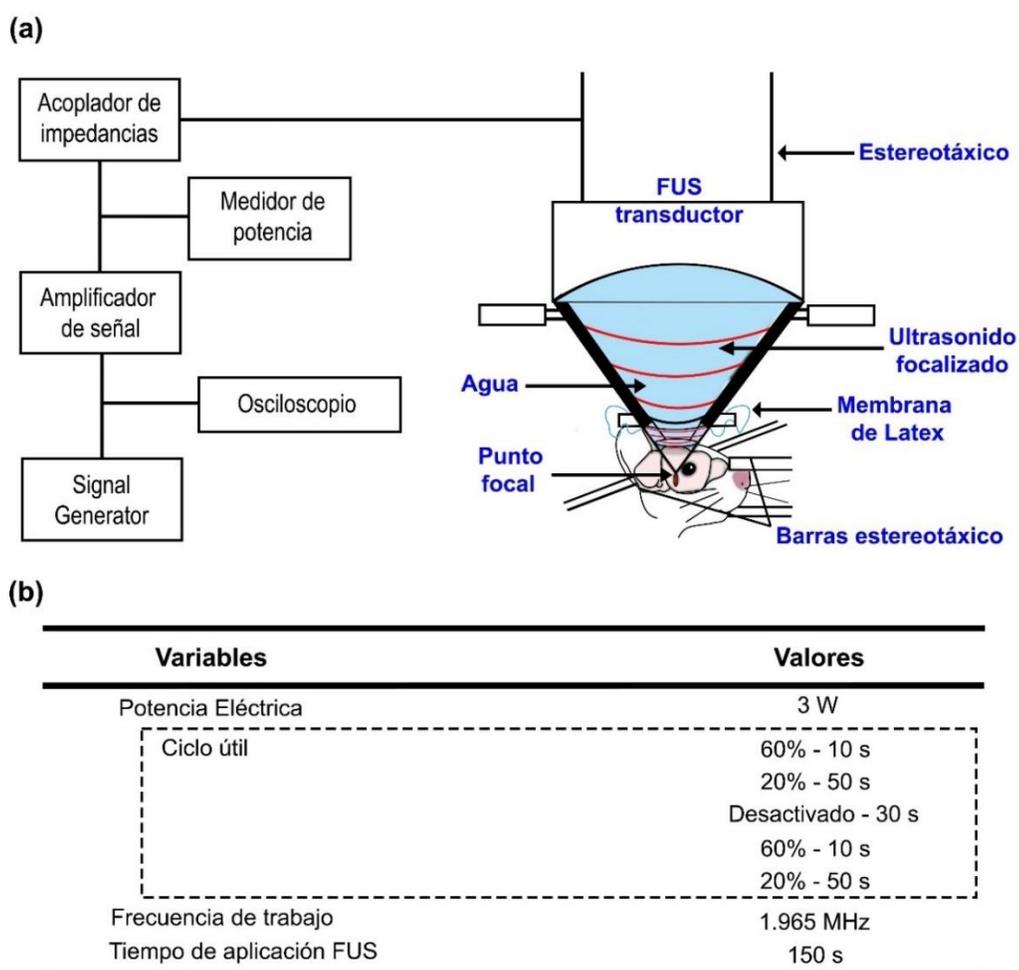


Figura 7. Arreglo experimental y parámetros para abrir transitoriamente la barrera hematoencefálica en la sustancia negra de ratas Wistar macho adultas. (a) Configuración de ultrasonido enfocado (FUS), (b) Parámetros de ultrasonido focalizado para la apertura transitoria de la barrera hematoencefálica en la sustancia negra.

6.8 Diseño de catéter y disección de la arteria carótida interna derecha

La arteria carótida interna de ratas Wistar tiene un diámetro externo de 0.95 mm y un diámetro interno de 0.71 mm [79]. Por lo tanto, se fabricaron catéteres adecuados de 15 cm de largo con un tubo de PTFE STT-28 con un diámetro interno de 0.38 mm (Light Wall; Sparta, TN, EE. UU.) estirando los extremos con la ayuda de unas pinzas mientras se calentaba la parte media con un mechero Bunsen. A continuación, se realizó un corte diagonal con una hoja de acero inoxidable en la región adelgazada para obtener un ángulo agudo de 0.38 ± 5 mm de espesor. Finalmente, se pasó rápidamente la punta del catéter sobre la llama del encendedor para eliminar las imperfecciones del corte [80].

La arteria carótida interna derecha quedó expuesta en ratas anestesiadas. Primero se realizó una incisión de 1 cm en la línea media del cuello. Luego, se diseccionó el tejido graso y el músculo alrededor de la tráquea para exponer el músculo esternocleidohioideo utilizando la glándula submandibular como referencia, ya que la arteria carótida interna corre paralela al nervio vago y la vena yugular interna dentro del haz neurovascular. Una vez identificada la arteria carótida interna a través de su latido constante, se separó el nervio vago utilizando unas pinzas de pico y se insertó el catéter en la arteria carótida interna. Después de infundir el volumen adecuado de las soluciones de prueba mediante una bomba de microperfusión (10 $\mu\text{L}/\text{min}$), se ocluyó la arteria carótida interna durante 5 s en ambos extremos para retirar el catéter y sellar la herida con electro cauterizador (Weller; GS Deventer, NL). Al confirmar la correcta cauterización, se retiraron las pinzas de oclusión, se suturaron los planos quirúrgicos y se dejó a la rata bajo una fuente de calor hasta su completa recuperación.

6.9 Azul de Evans y nanopartículas de NTS poliplex con el plásmido PVF

Se utilizó una solución de colorante AE al 2% (960,81 Da; Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EE. UU.) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para evaluar la apertura transitoria de la BHE debido a que su adherencia a la albúmina sérica evita el cruce de la BHE y ofrece un alto margen de seguridad en

evaluaciones a corto plazo vía circulación sanguínea [81]. Además, se utilizaron diferentes volúmenes de AE para seleccionar la ruta que proporcione una mayor concentración en la sustancia negra con un volumen de inyección menor para ser utilizado para la administración de las NPs NTS-polyplex. Los volúmenes inyectados coincidieron con “the Refining Procedures for The Administration of Substances through the caudal vein, retro-orbital venous sinus, internal carotid artery, and intranasally” [82]. 30 minutos después de la aplicación de FUS, se inyectó AE durante 3 minutos en un bolo de 300 μL a través de la vena caudal, 150 μL a través del seno venoso retroorbitario derecho [25], 100 μL por vía intranasal [70], y 75 μL a través de la arteria carótida interna [82]. Treinta minutos después de la inyección de AE, se perfundió a las ratas para obtener cortes cerebrales de 30 μm , como se describe a continuación: se inyectaron treinta y cinco μL de NPs NTS-polyplex que albergan el plásmido pEGFP-N1 a través de una bomba de microperfusión (Mod. 100; Stoelting; Wood Dale, IL, EE. UU.) a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ equipado con una jeringa Hamilton de 50 μL . Dos semanas después de la administración, se utilizó doble inmunofluorescencia contra TH y PVF para mostrar la expresión de la proteína verde fluorescente en neuronas dopaminérgicas y proyecciones axonales. En todas las inyecciones, se llenaron 5 μL de solución de heparina 10 U/mL (Laboratorios Pisa; Guadalajara, JAL, MX) en la punta del catéter después de cargar la solución AE o las nanopartículas de NTS-polyplex para evitar la coagulación.

6.10 Disección cerebral

Los cerebros se extrajeron inmediatamente de las ratas, se anestesiaron con pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) y se cortaron en secciones coronales de 300 μm con un vibratomo a 4 °C (Leica VT 1200; Heidelberg, Alemania) para una detección rápida de AE. Para una ubicación detallada del colorante, se anestesió otro lote de ratas con pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) y se perfundió a través de la aorta ascendente con 100 ml de PBS frío, seguido de 100 ml de paraformaldehído al 4 % en PBS al día siguiente de la administración de AE. Luego, el cerebro se cortó en secciones coronales de 30 μm utilizando un micrótomo de deslizamiento a -18 °C (Leica SM2010R; Heidelberg, GER).

Para los ensayos de inmunotinción, los cerebros se extrajeron y se mantuvieron en paraformaldehído durante 24 h a 4 °C y luego se crioprotegieron en PBS que contenía 30% de sacarosa a 4 °C durante la noche. El cerebro se cortó en secciones coronales en serie de 30 µm de espesor al nivel de la sustancia negra y el cuerpo estriado utilizando un micrótopo deslizante a -18 °C (Leica SM2010R; Heidelberg, Alemania). Las secciones se recogieron consecutivamente en una placa de 24 pocillos que contenía PBS, se lavaron con PBS durante 5 min, se permeabilizaron con Tritón al 0,1 % en PBS durante 20 min y se incubaron con albúmina al 1 % de suero bovino (BSA) en Tritón al 0,1 % en PBS durante 30 min para bloquear los sitios de unión no específicos. Después de la incubación en cada paso del procedimiento descrito anteriormente, las muestras se lavaron tres veces con PBS durante 5 minutos. Finalmente, los cortes se utilizaron para inmunohistoquímica y tinción por inmunofluorescencia.

6.11 Inmunofluorescencia

La microglía activada, la astrogliosis y las células CD45 se evaluaron mediante inmunofluorescencia doble con neuronas dopaminérgicas para localizar esas células en la sustancia negra. El tipo de astrocito se identificó mediante inmunofluorescencia doble contra epítomos específicos utilizando una combinación adecuada de anticuerpos primarios y secundarios (Tabla 2). Las rebanadas se incubaron durante la noche a 4 °C con uno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-TH monoclonal de ratón (1:1000; Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA), anti-TH policlonal de conejo (1:1000; Millipore; Temecula, CA, USA), anti-Iba1 policlonal de cabra (1:500; Abcam; Cambridge, UK), anti-GFAP monoclonal de ratón (1:500; Clone GA5; Cell Signaling Technology; Danvers, MA, USA), anti-CD45 de ratón (1:50; BD Bioscience; Sparks Glencoe, MD, USA), proteína A10 policlonal de unión a calcio anti-S100 de conejo (S100A10; 1:100; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anti-C3 policlonal de conejo (1:100; Abcam; Cambridge, UK) y anti-GFAP policlonal de conejo (1:1000; Abcam; Cambridge, UK). Finalmente, los cortes se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado: Alexa Fluor 488 anti-ratón H+L de pollo IgG (1:300; Invitrogen Molecular Probes; Eugene,

OR, USA), Alexa Fluor 488 anti-conejo H+L de pollo IgG (1:300; Invitrogen Molecular Probes; Eugene, Oregón), Alexa Fluor 555 de burro anti-cabra H+L IgG (1:300; Abcam; Cambridge, MA, USA), rojo de Texas de caballo anti-ratón H+ L IgG (1:500; Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) y roja de Texas de cabra anti-conejo H+L IgG (1:500; Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA). Finalmente, las secciones se lavaron con PBS y se montaron en portaobjetos de vidrio y cubreobjetos usando VECTASHIELD (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA). Los cortes se analizaron bajo un microscopio de barrido láser confocal multiespectral (TCS SPE; Leica; Heidelberg, GER) en longitudes de onda de excitación-emisión de 405 a 510 nm (Hoechst 33258), 488 a 522 nm (Alexa 488) y 596 a 620 nm (Rojo de Texas). Se utilizó el software LAS AF a 20x, 40x y 63x (Leica Microsystems; Nussloch, GER) para adquirir imágenes de la sustancia negra en cuatro niveles anatómicos diferentes (uno rostral, dos mediales y uno caudal) por rata (n = 3). ratas independientes por grupo y tiempo).

Tabla 2. Combinaciones de anticuerpos para las inmunofluorescencias

<i>Epítipo</i>	<i>Anticuerpos primarios</i>	<i>Anticuerpos secundarios</i>	<i>Objetivo</i>
<i>TH</i>	anti-TH monoclonal de ratón	caballo Texas rojo anti-ratón	Ubicación de la microglía en la sustancia negra.
<i>Iba1</i>	anti-Iba1 policlonal de cabra	pollo Alexa Fluor 488 anti-cabras	
<i>TH</i>	anti-TH policlonal de conejo	cabra Texas rojo anti-conejo	Ubicación de los astrocitos en la sustancia negra.
<i>GFAP</i>	anti-GFAP monoclonal de ratón	pollo Alexa 488 anti-ratón	
C3	anti-C3 policlonal de conejo	pollo Alexa 488 anti-conejo	Activación de los astrocitos A1
<i>GFAP</i>	anti-GFAP monoclonal de ratón	caballo Texas rojo anti-ratón	

<i>S100a10</i>	anti-S100a10 policlonal de conejo	pollo Alexa 488 anti-conejo	Activación de los astrocitos A2
<i>GFAP</i>	anti-GFAP monoclonal de ratón	caballo Texas rojo anti-ratón	
<i>TH</i>	anti-TH policlonal de conejo	cabra Texas rojo anti-conejo	Infiltración de leucocitos en la sustancia negra.
<i>CD45</i>	anti-CD45 monoclonal de ratón	pollo Alexa 488 anti-ratón	
<i>TH</i>	anti-TH monoclonal de ratón	caballo Texas rojo anti-ratón	Expresión de PVF en neuronas dopaminérgicas.
<i>GFP</i>	anti-GFP policlonal de conejo	pollo Alexa 488 anti-conejo	

6.12 Ensayos de inmunohistoquímica

Se realizó inmunohistoquímica para contar con precisión las neuronas dopaminérgicas, la microglía activada y los astrocitos reactivos. Primero, la peroxidasa endógena se eliminó con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% que contenía Tritón X-100 al 0,3% en PBS y metanol al 10% a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios a 4 °C (Tabla 3).

Tabla 3. Anticuerpos para ensayos de inmunohistoquímica

<i>Epítopo</i>	<i>Anticuerpos primarios</i>	<i>Anticuerpos secundarios</i>	<i>Objetivo</i>
TH	anti-TH monoclonal de ratón	IgG anti-ratón de caballo biotinilado	Neuronas dopaminérgicas
Iba1	anti-Iba1 policlonal de cabra	IgG anti-cabra de caballo biotinilado	Microglía activada
GFAP	anti-GFAP monoclonal de ratón	IgG anti-ratón de caballo biotinilado	Astrocitos

Los anticuerpos primarios fueron: anti-TH monoclonal hecho en ratón (1:1000; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), anti-Iba1 policlonal hecho en cabra (1:1000; Abcam; Cambridge, UK), anticuerpo monoclonal anti-GFAP Clon GA5 de ratón (1:500; Cell Signaling Technology; Danvers, MA, USA). Luego, los cortes se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con uno de los siguientes anticuerpos secundarios: anti-ratón IgG biotinilado de caballo (1:300; Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE. UU.), anti-cabra IgG biotinilado hecho en caballo (1:300; Laboratorios de vectores; Burlingame, CA, EE. UU.). Después de lavar con PBS, los cortes se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el kit del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) (1:10; Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE. UU.). El color se desarrolló añadiendo una solución de diaminobencidina que contenía H₂O₂ (DAB; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.). Las secciones se montaron en portaobjetos de vidrio usando Entellan (Merck KGaA; Darmstadt; GER) y se examinaron con un microscopio Leica DMIRE2 (Leica Microsystems; Nussloch, GER) en un campo brillante equipado con objetivos de 5x, 20x y 40x. Las imágenes se digitalizaron con una cámara Leica DC300F (Leica Microsystems; Nussloch, GER). Los controles negativos se obtuvieron omitiendo el anticuerpo primario o usando la sustancia negra contralateral sin transfección.

6.13 Densitometría y recuento de neuronas

Se utilizó el software ImageJ-win64 1.52p (Institutos Nacionales de Salud; Bethesda, MD, EE. UU.) para medir la densidad de tinción total de TH, Iba1 y GFAP en ensayos de inmunohistoquímica. Se eliminó toda la intensidad de fondo del área teñida inmunohistoquímicamente para cuantificar solo la intensidad media de las células TH+ en la sustancia negra y las fibras TH+ en el cuerpo estriado. La densidad de Iba1 y GFAP se midió solo en la sustancia negra. La medición final fue el valor medio por núcleo y rata (n = 3 ratas para cada condición experimental).

La densidad del área de inmunofluorescencia (IFAD) se midió en los ensayos de fluorescencia utilizando el software ImageJ (Institutos Nacionales de Salud; Bethesda, MD, EE. UU.) en seis niveles por núcleo y por rata (n = 6 ratas

independientes por condición experimental). El valor final fue el valor medio calculado a partir del promedio de la cuantificación de seis niveles por núcleo y rata.

6.14 Prueba de la viga

Este estudio evalúa la coordinación motora y la velocidad al caminar cuando la rata viaja sobre una viga estrecha (2 m de largo, 1 cm de ancho, 30° de inclinación). Todas las ratas fueron entrenadas 1 semana antes de la prueba de comportamiento en una viga ancha (2 m de largo, 2 cm de ancho, 30° de inclinación) para adquirir una línea base de conducta de 6 s para atravesar la viga. Las ratas fueron videograbadas durante el ensayo para contar el tiempo a través de la viga y los resbalones [83, 84].

6.15 Prueba de colocación de extremidades anteriores evocadas por vibrisas

Las vibrisas izquierda y derecha de las ratas se frotaron por separado contra el borde de una mesa para evocar la respuesta de posicionamiento de las extremidades anteriores. Las dos extremidades anteriores se probaron de forma independiente durante diez ensayos sosteniendo a la rata por el torso para permitir que las extremidades colgaran libremente, de modo que ni las extremidades ni la cola soportaran ningún peso. La respuesta motora típica consistió en un movimiento rápido y preciso de la extremidad anterior del lado estimulado que termina en la mesa. El comportamiento se calificó como un porcentaje de colocación exitosa de la extremidad (ipsilateral o contralateral a la aplicación de FUS) por rata. La puntuación = "0" significa la ausencia de respuesta. El comportamiento basal corresponde a las ratas control no tratadas [76].

6.16 Prueba de asimetría del uso de las extremidades anteriores en un cilindro.

Se evaluaron ratas control, simuladas y transfectadas en un cilindro acrílico transparente (30 cm de altura, 20 cm de diámetro) para grabar en vídeo los 20 primeros contactos en la pared del cilindro realizados con las extremidades anteriores izquierda y derecha y ambas (simultáneamente) [85]. La asimetría se

calculó como el porcentaje de contactos con la extremidad anterior ipsilateral + 1/2 de contactos simultáneos, dividido por el número total de contactos (ipsilateral + contralateral + simultáneo) y el cociente multiplicado por 100. El comportamiento inicial corresponde al control no tratado ratas [83, 84, 86].

6.17 Análisis Estadístico

Todos los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes ($n = 3$). La diferencia entre los grupos se analizó con medidas repetidas de ANOVA unidireccional seguidas de una prueba post hoc de Tukey para resultados de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica para Iba1 y GFAP. Además, se utilizó ANOVA de dos vías seguido de la prueba post hoc de Tukey para analizar las diferencias entre los grupos en células TH+, proyecciones axonales TH+ y pruebas de comportamiento. Para el análisis estadístico se utilizó el software Graph Pad Prism 9.0.0 (GraphPad Software Inc; La Jolla, CA, EE. UU.). La significación aceptada fue $p < 0,05$.

7. Resultados y discusión

7.1 Características físicas de las NP NTS-Polyplex

Estudios previos sugieren que el tamaño de las NPs NTS-polyplex, de aproximadamente 100 nm, así como su carga eléctrica neta positiva y la falta de transportadores específicos en la barrera hematoencefálica, son las características que impiden su paso a través de la BHE cuando se inyectan por vía sanguínea [52, 53, 59, 61, 63]. Por ello, exploramos el tamaño y la carga eléctrica superficial de las NPs NTS-polyplex resultantes de la compactación del plásmido pEGFP-N1 con el portador NTS y distintos péptidos cariofílicos: KPRa, KPSV40 y sin KP. Los estudios de crio-SEM mostraron NPs preferentemente esféricas con un diámetro medio de 79.6 nm para KPRa, 102.7 nm para KPSV40 y 95.1 nm para NP sin KP (figura 8 (a) y tabla 4). El análisis de DLS mostró radios hidrodinámicos promedio de 65.0 nm para las NPs con KPRa, 165.4 nm para KPSV40 y 130.9 nm sin KP (figura 8 (b) y tabla 4). El análisis de ELS mostró valores medios de potencial Zeta de NP de

polipect NTS de +1.3 mV con KPRa, +7.9 mV con KPSV40 y +16.5 mV sin KP, observándose un aumento sistemático de carga positiva en estos complejos (figura 8 (c) y tabla 4). Los resultados obtenidos confirman lo reportado previamente en la literatura; sin embargo, también muestran que las NPs con KPRa son más pequeñas y tienen una menor carga electrostática positiva que aquellas con KPSV40. Por lo tanto, decidimos usar dichas partículas en los experimentos subsiguientes.

Tabla 4. Resumen del análisis dinámico de dispersión de luz

NTS-polipept NPs	Radio hidrodinámico (nm)	Índice de polidispersidad (%)	Intensidad máxima 1	Media Potencial zeta (mV)	Valor pico de distribución (mV)
+ KPRa	65.0	52.8	93.5	+1.3	+3.4
+ KPSV40	165.4	23.8	115.4	+7.9	+3.4
sin KPs	130.9	29.5	103.3	+16.5	

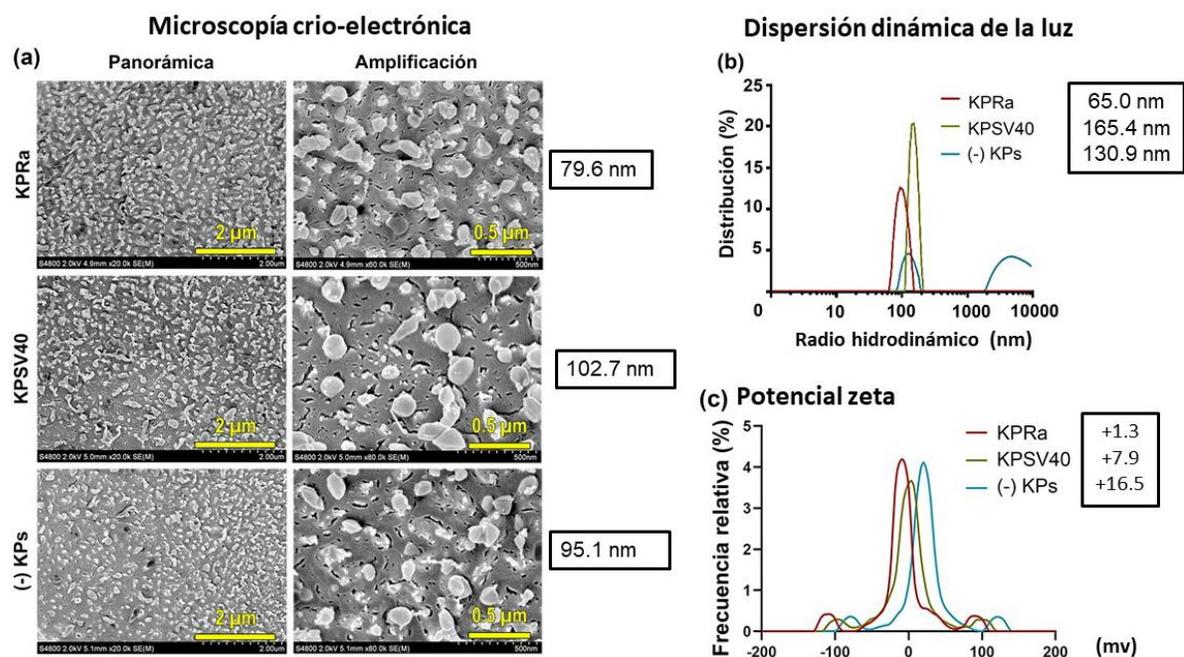


Figura 8. Tamaño y potencial Z de nanopartículas de NTS-polipept que albergan el plásmido pEGFP-N1. Las nanopartículas se prepararon con pADN 6 nM, portador NTS 144

nM y péptidos cariofílicos 3 μ M (KPRa o KPSV40) o sin péptido cariofílico (-KP). (a) Micrografías representativas de microscopía crioelectrónica (Cryo-SEM) de NPs NTS-poliplex. (b) Distribución del tamaño del radio hidrodinámico obtenido por dispersión dinámica de luz (DLS) y (c) Potencial Zeta medido por dispersión electroforética de luz (ELS).

7.2 Apertura de la barrera hematoencefálica en la sustancia negra por ultrasonido focalizado

Evaluamos la integridad de la BHE administrando Azul de Evans (AE) a través de diferentes vías sanguíneas en ratas a las que se les aplicó FUS. Este aproximamiento experimental reveló que efectivamente se forma un área azul en la sustancia negra donde se aplicó FUS, demostrando la extravasación de AE debido a la apertura de la BHE (figura 9). Este resultado se observó independientemente de la vía de administración. Sin embargo, la arteria carótida interna representa una mejor ruta de administración de AE en la sustancia negra tratada con FUS, ya que se necesitó un menor volumen de AE (75 μ L) para obtener los mismos resultados que cuando se administró AE por el seno retroorbitario (150 μ L) y la vena caudal (300 μ L). Las rutas de inyección intravenosa fueron igualmente efectivas y produjeron una densidad comparable de AE en la sustancia negra, como se demostró previamente [87]. No se produjo extravasación de AE en el cerebro cuando el colorante se administró a través de la mucosa nasal después de FUS, posiblemente debido a la ausencia de un mecanismo de transporte para AE, según informes previos en ratas sanas [88]. Además, no se observó color azul cuando se administró AE sin FUS [25]. Estos experimentos indican que la arteria carótida interna es la ruta más corta y óptima para administrar las NP que servirán para la entrega de genes hacia la sustancia negra en ratas a las que se les aplicó FUS.

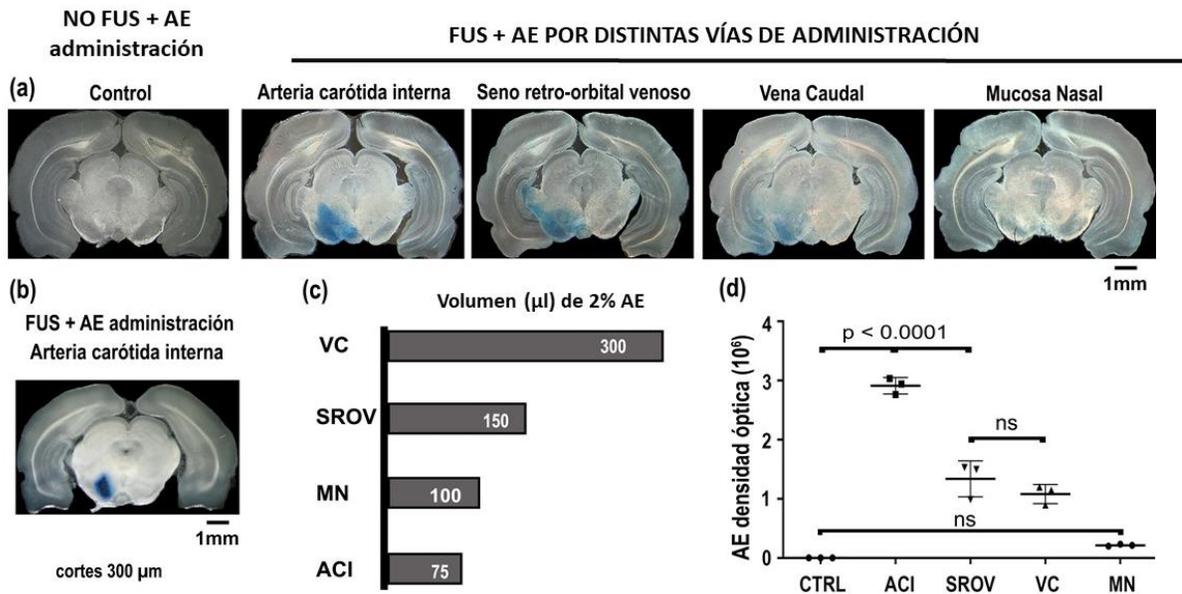


Figura 9. La apertura de la barrera hematoencefálica inducida por ultrasonido focalizado (FUS) en la sustancia negra permite la extravasación del colorante azul de Evans (AE) después de su administración sistémica. Los cerebros se extrajeron 30 minutos después de la administración del colorante AE al 2%. (a) Micrografías representativas de campo brillante de cortes coronales de 30 μ m de espesor a través del mesencéfalo (Bregma - 6,04 mm, Paxinos & Watson Rat Atlas) de ratas tratadas con FUS o sin FUS (Control; CTRL) tomadas de cerebros fijos. (b) Micrografías representativas de mesencéfalo fresco de 300 μ m de espesor tomadas 30 minutos después de FUS. El valor de la barra de calibración es válido para todas las micrografías. (c) Gráfico que indica los volúmenes de AE inyectados en una arteria carótida interna (ICA), un seno venoso retroorbitario (ROVS) o una vena caudal (CV) o depositados a través de un tubo capilar en la mucosa nasal (NM). (d) Gráfico de densidad de AE utilizando el software ImageJ. Los valores son la media \pm SD de un nivel anatómico (n = 3 ratas independientes por condición experimental). One-way ANOVA and post hoc Tukey tests. ns = no significativo.

Esta hipótesis se exploró administrando una cantidad igual de NP de NTS-polyplex-PVF (1,69 µg de pADN/35 µl de DMEM) a través de la arteria carótida interna, el seno venoso retroorbital o la mucosa nasal. Quince días después de la administración de las NP, los animales fueron sacrificados y la expresión de la PVF fue analizada mediante inmunofluorescencia. En dichos ensayos, además de la PVF, se utilizaron marcadores específicos para las poblaciones celulares presentes en la sustancia negra. Los resultados mostraron que la expresión de PVF ocurre principalmente en neuronas dopaminérgicas. Además, se observó la presencia de PVF tanto en la sustancia negra tratada con FUS como en la sustancia negra contralateral (CONTRA), que no fue tratada con FUS. Es importante destacar que la expresión de PVF en los diferentes tratamientos muestra un grado diferente de eficiencia que depende claramente de la ruta de administración (figura 9).

7.3 El ultrasonido focalizado permite la transfección de neuronas dopaminérgicas nigrales a través de vías sanguíneas y nasales

La administración de NP de NTS-polyplex-PVF a través de la arteria carótida interna o del seno venoso retroorbitario permitió la expresión de la PVF en las células TH+, no solo en la sustancia negra ipsilateral, sino también en la contralateral (Figura 10). Al comparar el porcentaje de neuronas dopaminérgicas que expresan la PVF en la sustancia negra ipsilateral y contralateral entre las tres vías de administración, se encontró que la mayor transfección se produjo mediante la administración por la arteria carótida interna (FUS, 87.5%, área tegmental ventral (VTA), 97.2%, CONTRA, 73.3%), seguida de la vía intranasal (FUS, 61.3%, VTA, 30.5%, CONTRA, 24.4%), y luego por la vía retroorbital (FUS, 47.1%, VTA, 28.0%, CONTRA, 13.6%) (figura 10). Estos resultados concuerdan con la irrigación arterial más corta a la sustancia negra, ya que la arteria carótida interna la irriga inmediatamente a través de las ramas arteriales basilar y cerebral posterior. En cambio, la sangre del seno venoso retroorbitario llega a la sustancia negra como sangre arterial luego de pasar por la vena cava superior, el corazón y los pulmones para regresar al corazón y luego continuar por la arteria carótida interna y sus ramas [89]. Al pasar por estos órganos, algunas NPs NTS-polyplex quedan atrapadas,

disminuyendo así la concentración efectiva [63]. Las tres posibilidades de recorrido propuestas pudieran mediar el envío de las NPs al cerebro por la administración intranasal porque estudios hemodinámicos ofrecen esas tres posibilidades. En este sentido, la entrega de las NPs al cerebro pudo haberse llevado a cabo por la circulación del sistema linfático submaxilar o de las venas nasales, que van hacia la vena cava superior a través de los respectivos vasos colectores para finalmente llegar a la sustancia negra por las colaterales de la arteria carótida interna similar al seno venoso retro oftálmico. Puesto que no se observó expresión de la PVF en ratas sin tratamiento con FUS, se puede descartar el transporte retrógrado de NPs NTS-polyplex por los nervios olfatorio y trigémino (figura 11) [90].

La ruta de la arteria carótida interna también condujo a una alta expresión de la PVF, que se extendió a los núcleos de inervación, incluido el cuerpo estriado, el globo pálido interno y externo y la zona subventricular del tercer ventrículo de ambos hemisferios cerebrales (Figura 12 y Figura 13).

Dado que el FUS se aplicó solo en la sustancia negra ipsilateral, la expresión de la PVF en el lado contralateral no puede explicarse por la apertura de la BHE. Además, dado que la PVF se expresa diferencialmente en las neuronas TH+ de la sustancia negra, siendo la expresión contralateral un 63% menor que la expresión del lado ipsilateral, y considerando que la AE solo penetra en el lado ipsilateral de las ratas sometidas a FUS, se refuerza nuestra teoría de que la permeabilidad de la BHE no es responsable de la expresión bilateral en el cerebro (Figura 10). Por eso postulamos que la expresión bilateral de PVF inducida por las NPs NTS-polyplex-PVF en las ratas tratadas con FUS sea probablemente una característica intrínseca de las NPs y que esto implique que dichas partículas puedan difundir hacia el lado contralateral después de la administración unilateral, similar a lo ya reportado en otros experimentos realizados en ratas sanas y parkinsonianas [55].

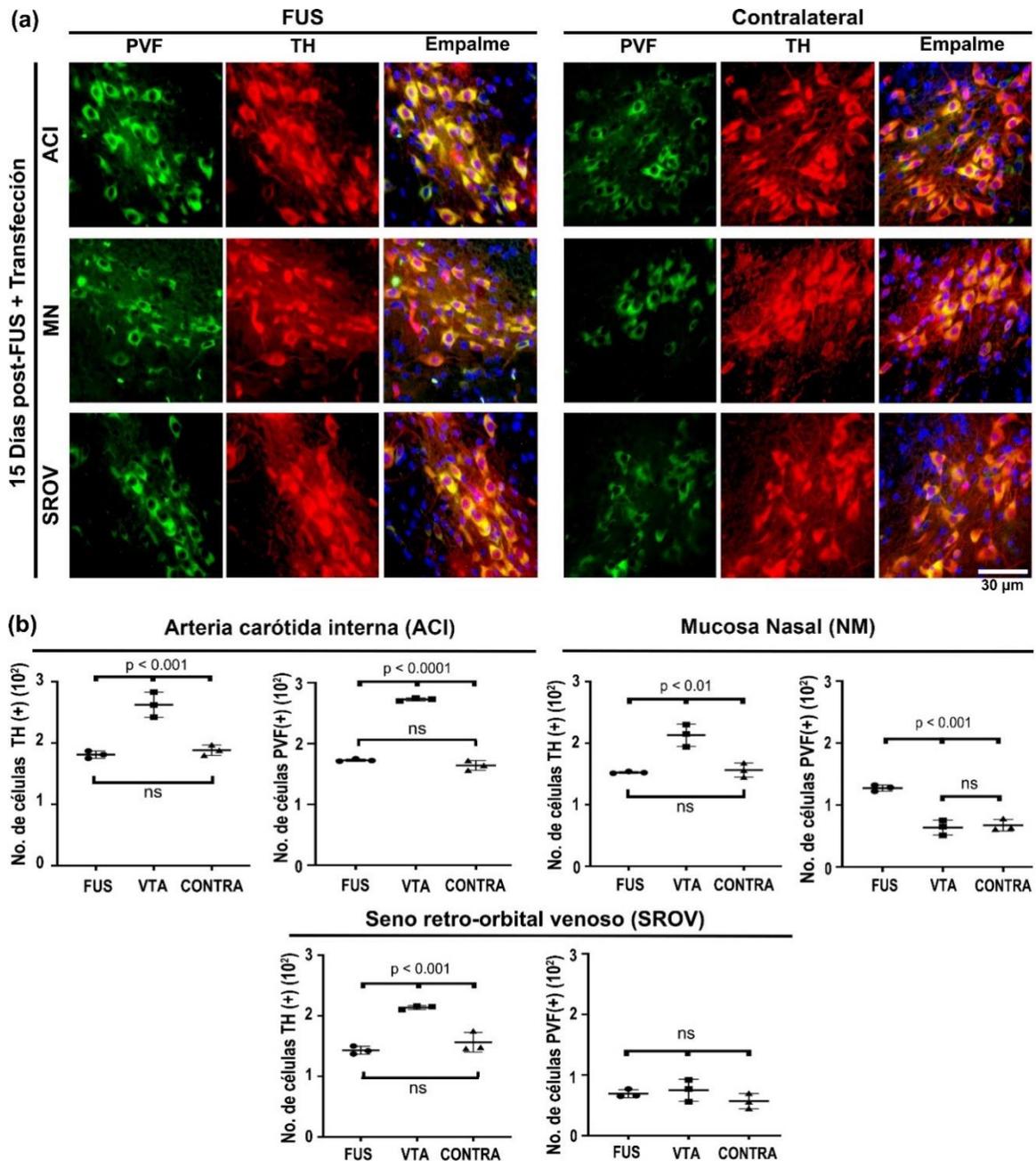


Figura 10. El ultrasonido focalizado (FUS) permite la entrega del gen de la proteína fluorescente verde (PVF) a las neuronas de dopamina nigral a través de diferentes rutas de administración. Treinta minutos después de la aplicación de FUS, se inyectaron 35 μ L de NP que albergaban el plásmido pEGFP-N1 en la arteria carótida interna, el seno venoso retroorbitario o depositado a través de un tubo capilar en la mucosa nasal. (a) Micrografías representativas de la sustancia negra 15 días después de la transfección. Las micrografías fusionadas también incluyen la contratinción nuclear de Hoechst. El valor de la barra de calibración es válido para todas las micrografías. (b) Cuantificación de células PVF+ y

células TH+ utilizando el software ImageJ en las condiciones mostradas en las micrografías del panel a). Los valores son la media \pm SD de tres niveles anatómicos ($n = 3$ ratas independientes por condición experimental). Inmunorreactividad de la PVF (verde) en células TH (rojas) con contratinción nuclear de Hoechst (azul) en la sustancia negra. One-way ANOVA and post hoc Tukey tests. ns = no significativo.

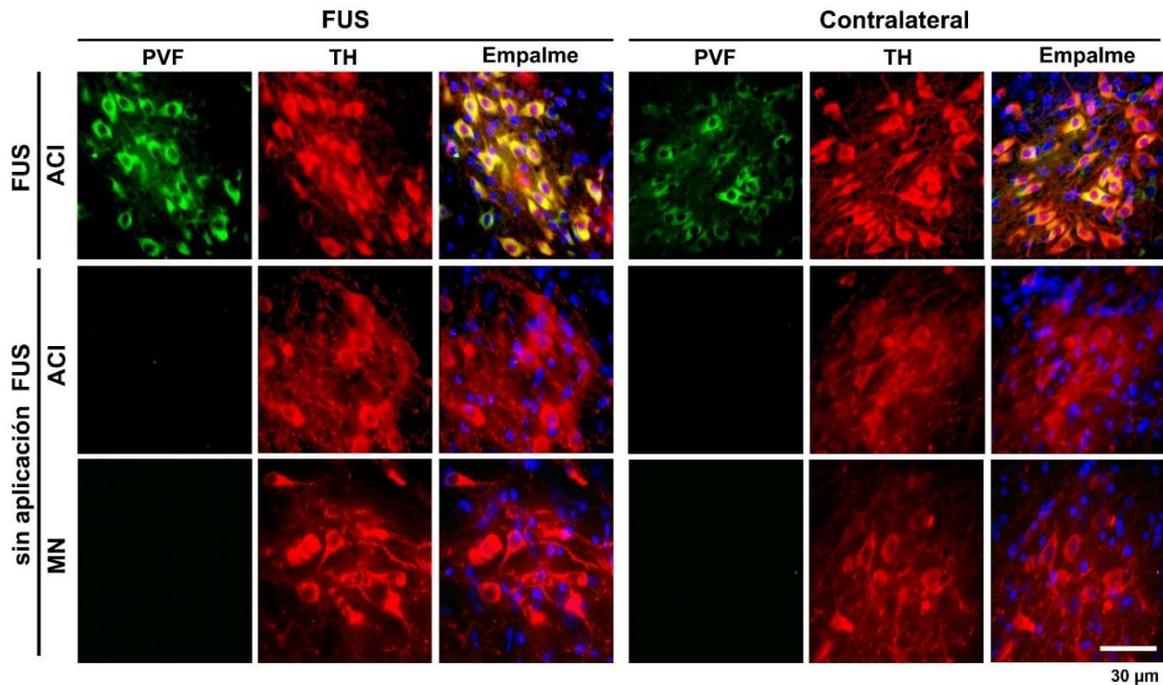


Figura 11. Ausencia de fluorescencia de PVF en la sustancia negra en animales a los que se les administró NPs NTS-polyplex a través de la arteria carótida y la mucosa nasal (MN) sin aplicación de FUS. Las micrografías son representativas de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las micrografías de la fila superior corresponden a la condición de la fila superior (ACI) de la figura 10 de ratas transfectadas a través de una arteria carótida (ACI) después de la aplicación de FUS utilizada para comparación.

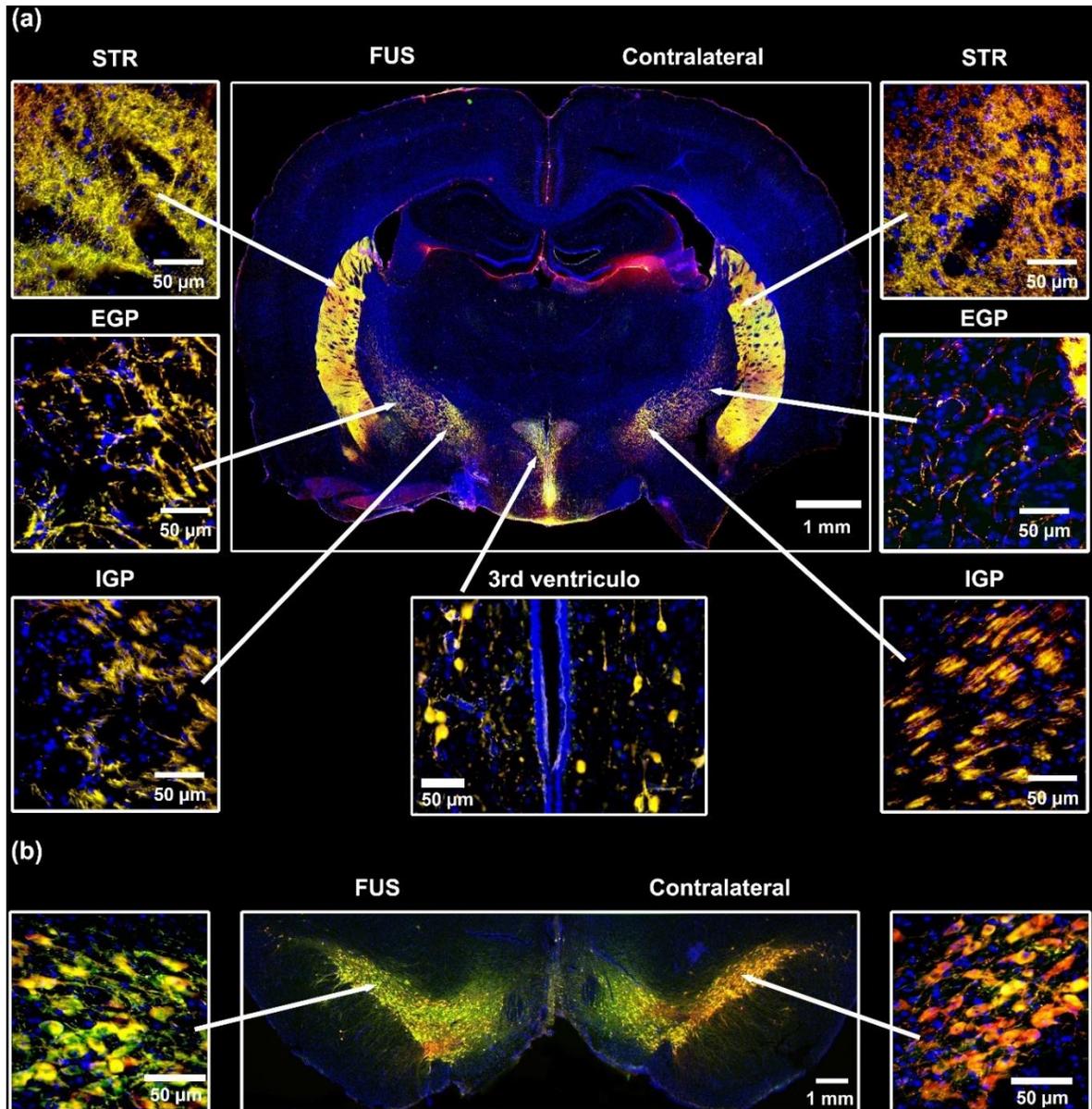


Figura 12. Distribución bilateral de la proteína verde fluorescente (PVF) en células dopaminérgicas y ramificaciones axonales en sus núcleos de inervación objetivo después de la transfección a través de la arteria carótida interna en ratas tratadas con FUS. Micrografías representativas 15 días después de la transfección de (a) corte coronal de cerebro a -2.16 mm de bregma y (b) corte de mesencéfalo inmunoteñido contra la PVF y la TH y contrateñido con Hoechst. Las ampliificaciones muestran detalles de la expresión de la PVF en células y proyecciones axonales. STR = cuerpo estriado, EGP = globo pálido externo, IGP = globo pálido interno. Inmunorreactividad de PVF (verde) en células TH+ (rojas) con contrateñido nuclear de Hoechst (azul). El valor de la escala es igual para el respectivo conjunto de micrografías.

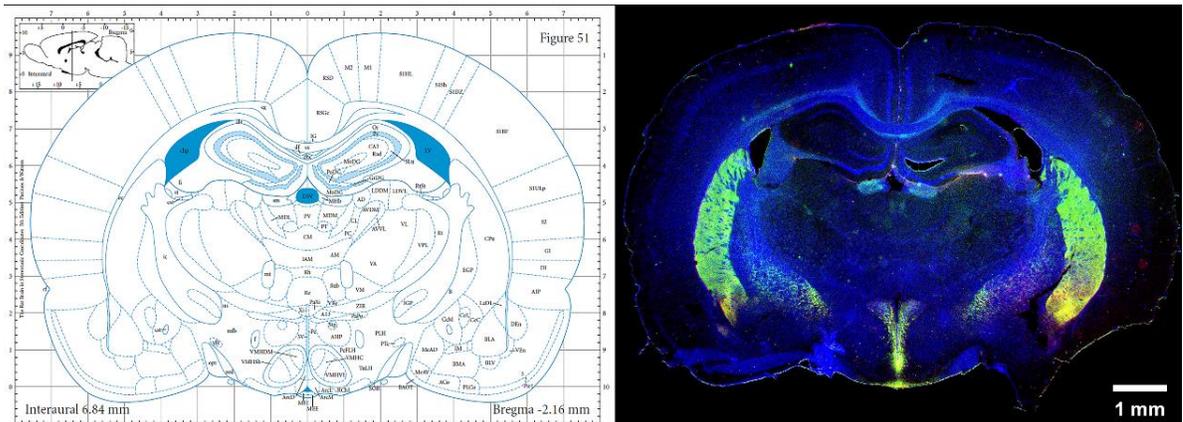


Figura 13. Identificación de los núcleos inervados por terminales axonales que poseen a la proteína verde fluorescente. Comparación de la micrografía que se muestra en la figura 12 con la ilustración de Paxinos & Watson Rat Atlas en las coordenadas interaurales 6.84 o Bregma -2.16 para localizar los núcleos donde está presente la proteína verde fluorescente. Abreviaturas de núcleos de interés: CPu = putamen caudado (estriado), IGP = globo pálido interno. EGP = globo pálido externo. 3V = Área subventricular del tercer ventrículo. Inmunorreactividad de PVF (verde) en células tirosina hidroxilasa (TH) (rojas) con contratinción nuclear de Hoechst (azul).

Los controles adecuados de inmunofluorescencia para la PVF y TH garantizan la validez y confiabilidad de los resultados (figura 14). Por lo tanto, la presencia de la PVF en neuronas dopaminérgicas y proyecciones axonales demuestra que la aplicación de FUS superó el bloqueo de la BHE y conservó la especificidad de las NPs NTS-polyplex para las neuronas dopaminérgicas [52, 54, 68, 75, 76]. Dado que el plásmido pEGFP-N1 carece de un promotor específico de la célula, la especificidad de la transfección la proporciona el ligando NTS, que internaliza las NPs NTS-polyplex mediante endocitosis del NTSR1, altamente expresado en neuronas dopaminérgicas, como se demostró previamente en cultivos de neuronas primarias y en animales [57, 58, 65-67]. La ausencia de fluorescencia de la PVF en la sustancia negra en animales sin aplicación de FUS, pero inyectados con NPs NTS-polyplex a través de la arteria carótida, descarta la posibilidad de autofluorescencia (figura 11). Además, nuestros resultados respaldan y amplían el

hallazgo de que FUS también puede facilitar la entrega dirigida de material genético a las neuronas dopaminérgicas, incluso cuando los vectores genéticos carecen de especificidad para estas neuronas [34, 39-41, 91].

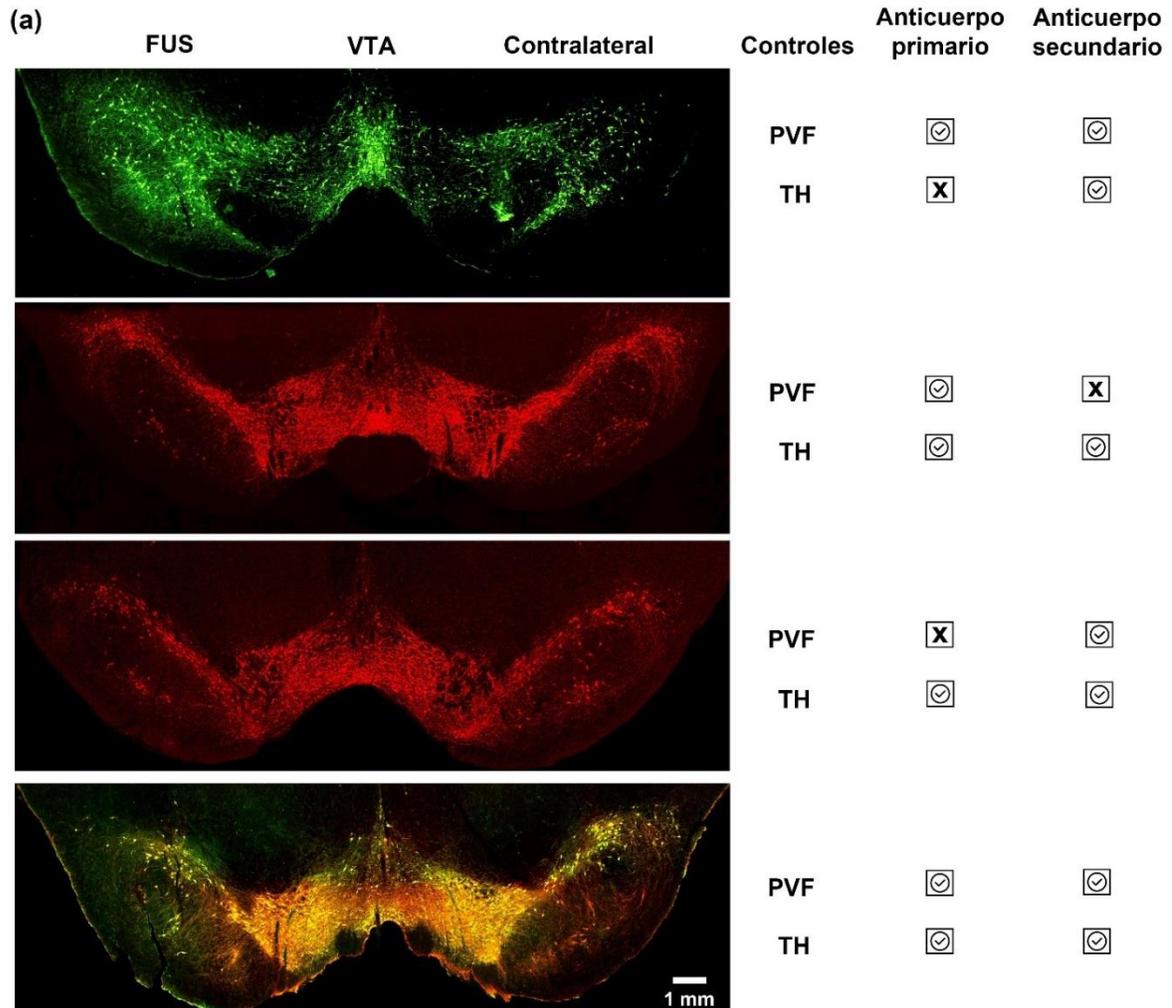


Figura 14. Controles de tinción de inmunofluorescencia después de la transfección vía arteria carótida (n = 3 ratas). Se incubaron micrografías representativas del mesencéfalo ventral con un par adecuado de anticuerpos o sólo con un anticuerpo primario o secundario. ☑ = Uso de anticuerpo primario o secundario. ☒ = Omisión de anticuerpo primario o secundario. El valor de la barra de calibración es válido para las tres micrografías. VTA = área ventral tegmental. FUS = Ultrasonido focalizado, PVF = Inmunorreactividad de la proteína fluorescente verde en células rojas teñidas contra tirosina hidroxilasa (TH+) en la sustancia negra.

La administración a través de la arteria carótida interna produjo la expresión génica más eficiente, seguida de las administraciones por la mucosa nasal y, finalmente, el seno retroorbital venoso con la misma dosis inyectada. En la primera modalidad de transfección, la alta expresión génica en las neuronas dopaminérgicas nigrales condujo a que las terminales axonales distribuyeran la PVF a los núcleos de innervación diana de las neuronas dopaminérgicas. Además, la transfección se produjo en neuronas dopaminérgicas nigrales de ambos lados del cerebro, en concordancia con la expresión génica bilateral causada por la transfección intracerebral unilateral [55]. Esta característica de las NPs NTS-polyplex representa una ventaja competitiva para la terapia génica en comparación con la administración de genes con vectores adenoasociados, que solo provoca la expresión génica en el lado tratado con FUS [30]. De manera similar, el colorante AE solamente permea en el lado tratado por FUS [25]. Estos resultados indican que las NPs tienen la capacidad de difundir en el cerebro. Los estudios en curso se dedican a explorar si el transporte mediado por exosomas o la circulación linfática es el mecanismo de difusión de NPs NTS-polyplex.

7.3 Activación transitoria de la neuroinflamación

Es razonable suponer que la apertura de la BHE después de la aplicación de FUS permita la entrada de componentes exógenos al cerebro, lo que podría desencadenar una respuesta inmune exacerbada o neuroinflamación. Por lo tanto, es probable que se induzca un proceso neuroinflamatorio en el cerebro de las ratas sometidas a FUS, lo cual sería sin lugar a duda un efecto indeseado. Aunque esta posibilidad es real, aún se ha investigado poco, especialmente en términos de su impacto a largo plazo en la población neuronal de la sustancia negra, un núcleo enriquecido con células de microglía en condiciones fisiológicas [92]. Al respecto, trabajos previos han mostrado que la aplicación de FUS provoca neuroinflamación temporal en la corteza cerebral, comparable a la observada en una isquemia o en una lesión cerebral traumática leve [93]. En este trabajo, hicimos un estudio más metódico que nos permitió evaluar la neuroinflamación generada por la aplicación de FUS en la sustancia negra ipsilateral, mientras usamos el lado contralateral como

control negativo. Además, la comparación de la sustancia negra contralateral con la obtenida de ratas control también nos sirvió para examinar cualquier daño que pueda ser infligido por la transfección del plásmido ya que allí hay una expresión de PVF independiente de la aplicación de FUS. De acuerdo con el efecto nocivo previamente reportado [93], encontramos en la sustancia negra tratada que la aplicación de FUS aumentó transitoriamente los valores basales de Iba1+ hasta un máximo de 184.8% en el día 7, los cuales disminuyeron más tarde y se normalizaron en el día 60 después de FUS en comparación con el grupo control y simulado (figura 15 y figura 16). Estos resultados muestran que FUS produjo una activación reversible de la microglía. Por el contrario, el IFAD para las células TH+ disminuyó en un 80% 24 h después de FUS en comparación con los grupos control y simulado, pero alcanzó los valores basales en el día 60 post-FUS (figura 15). Estos resultados indican que la aplicación de FUS afectó la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas, pero no hubo muerte neuronal debido al corto tiempo de recuperación neuronal. En la sustancia negra contralateral, también hubo un aumento en los valores basales de Iba1+, pero un 50% menor que en el lado tratado con FUS y también fue reversible a partir del día 7 después de la aplicación de FUS. Sin embargo, las células TH+ no se vieron afectadas, lo que sugiere que la transfección no tiene efectos perjudiciales sobre las neuronas dopaminérgicas (figura 15). Este resultado apoya la seguridad de las NPS NTS-poliplex demostrada en estudios in vivo e in vitro [59, 64].

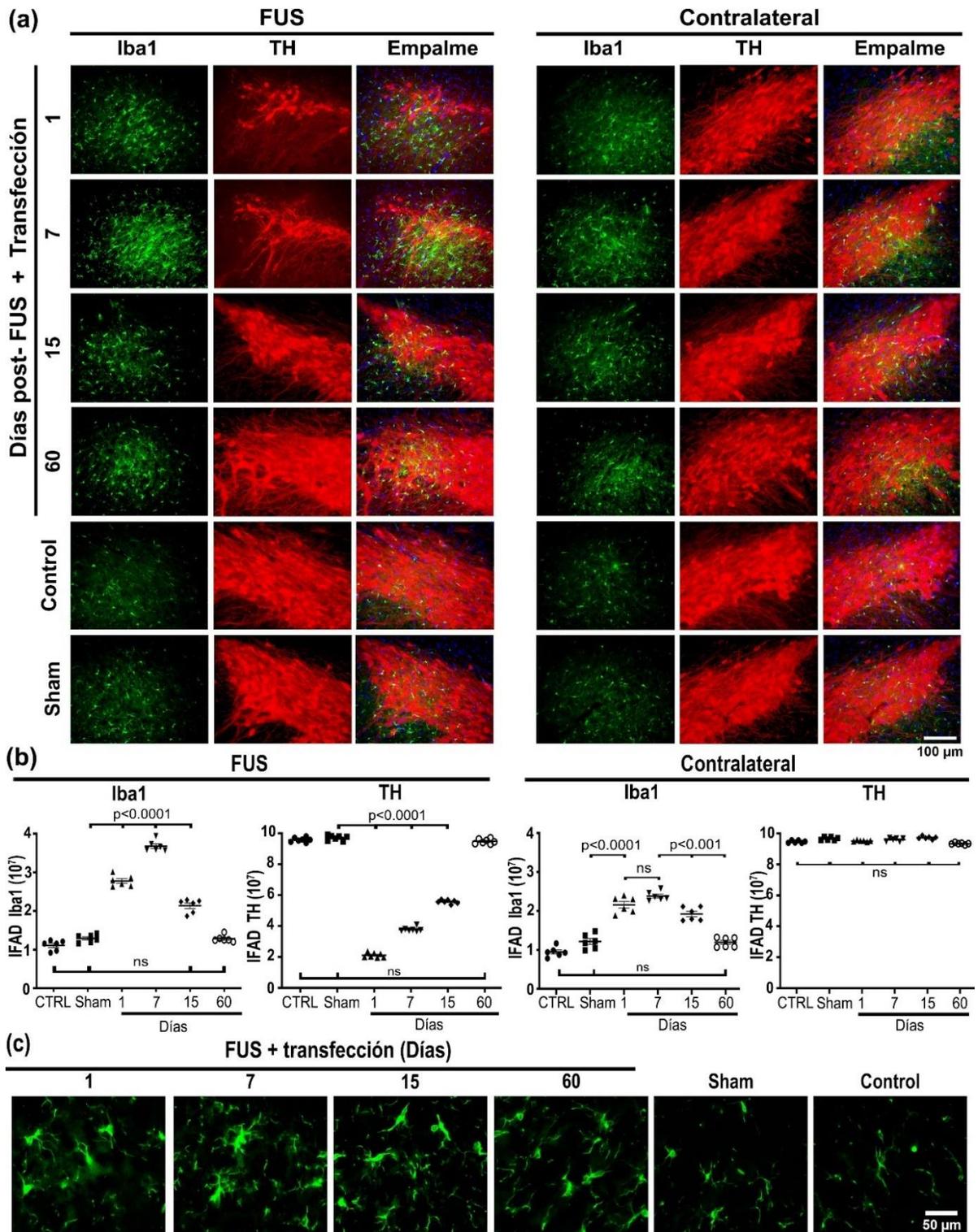


Figura 15. El ultrasonido focalizado (FUS) provoca una activación transitoria de la microglía en la sustancia negra. (a) Micrografías representativas del sitio más lesionado (donde se aplicó FUS) de la sustancia negra doblemente inmunoteñida contra la molécula adaptadora

de unión a calcio ionizada 1 (Iba1) y tirosina hidroxilasa (TH) a lo largo del tiempo después de FUS. Las micrografías fusionadas también incluyen la contratinción nuclear de Hoechst. (b) Densidad de área (IFAD) para inmunofluorescencia de Iba1 y TH medida a partir de micrografías del panel (a) utilizando el software ImageJ. Los valores son la media \pm DE de las mediciones de tres niveles anatómicos (n = 6 ratas independientes por condición experimental). ANOVA unidireccional y pruebas de Tukey post hoc. ns = no significativo. Inmunorreactividad de Iba1 (verde) en células TH (rojas) con contratinción nuclear de Hoechst (azul) en la sustancia negra a lo largo del tiempo. (c) Las micrografías amplificadas muestran células Iba1+ con cambios fenotípicos según su estado de activación. El valor de escala es igual para el respectivo conjunto de micrografías.

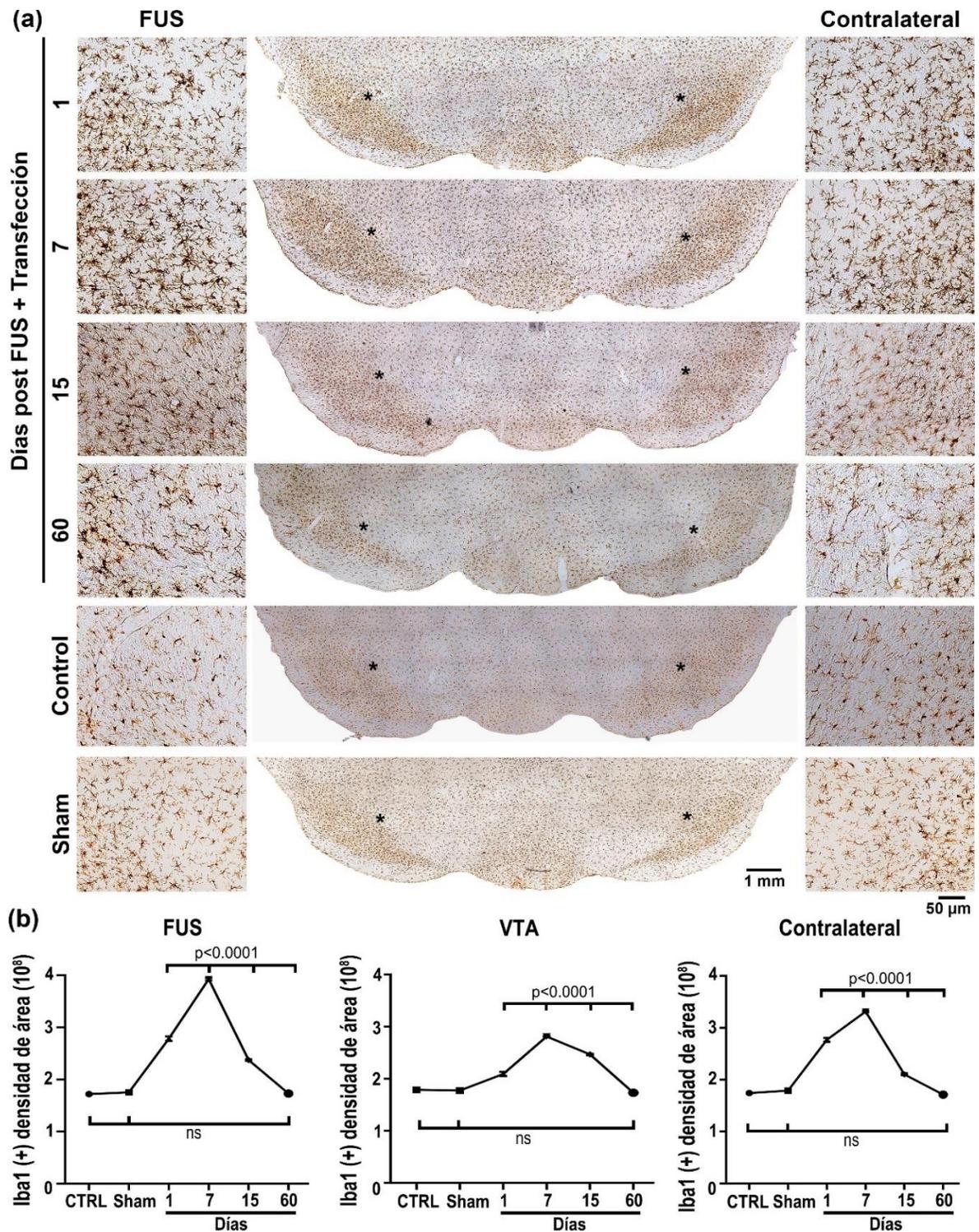


Figura 16. Activación reversible de la microglía después del ultrasonido focalizado (FUS) y la administración intraarterial de NPs NTS-poliplex. (a) Micrografías representativas del mesencéfalo con inmunohistoquímica de la molécula adaptadora de unión al calcio ionizada 1 (Iba1). El valor de escala es igual para el respectivo conjunto de micrografías. (b) Gráficos

de la densidad de Iba1+ medida en toda el área de la sustancia negra y el área tegmental ventral (VTA) a partir de micrografías del panel (a) utilizando el software ImageJ. Los valores son la media \pm DE de un nivel anatómico (n = 3 ratas independientes por condición experimental). ANOVA unidireccional y pruebas de Tukey post hoc. ns = no significativo.

El análisis de inmunohistoquímica de Iba1 mostró un perfil de activación similar a los resultados de inmunofluorescencia, pero con recuentos más altos porque la cuantificación incluyó la sustancia negra completa (Figura 16). Las ampliaciones no mostraron evidencia de etapas avanzadas de activación microglial, como formas fagocíticas, en el pico de activación (Figura 15 (c) y Figura 16). Por lo tanto, se puede descartar daño parenquimatoso severo por neuroinflamación, el cual ocurre cuando la microglía activada adquiere un estado fagocítico [94-97]. No obstante, se exploró la inducción de astrocitos A1 neurotóxicos a partir de la población de astrocitos reactivos, ya que este fenómeno sigue a la activación microglial [44]. FUS también causó astrogliosis reactiva en la sustancia negra, exhibida por una mayor inmunorreactividad de GFAP (Figura 17).

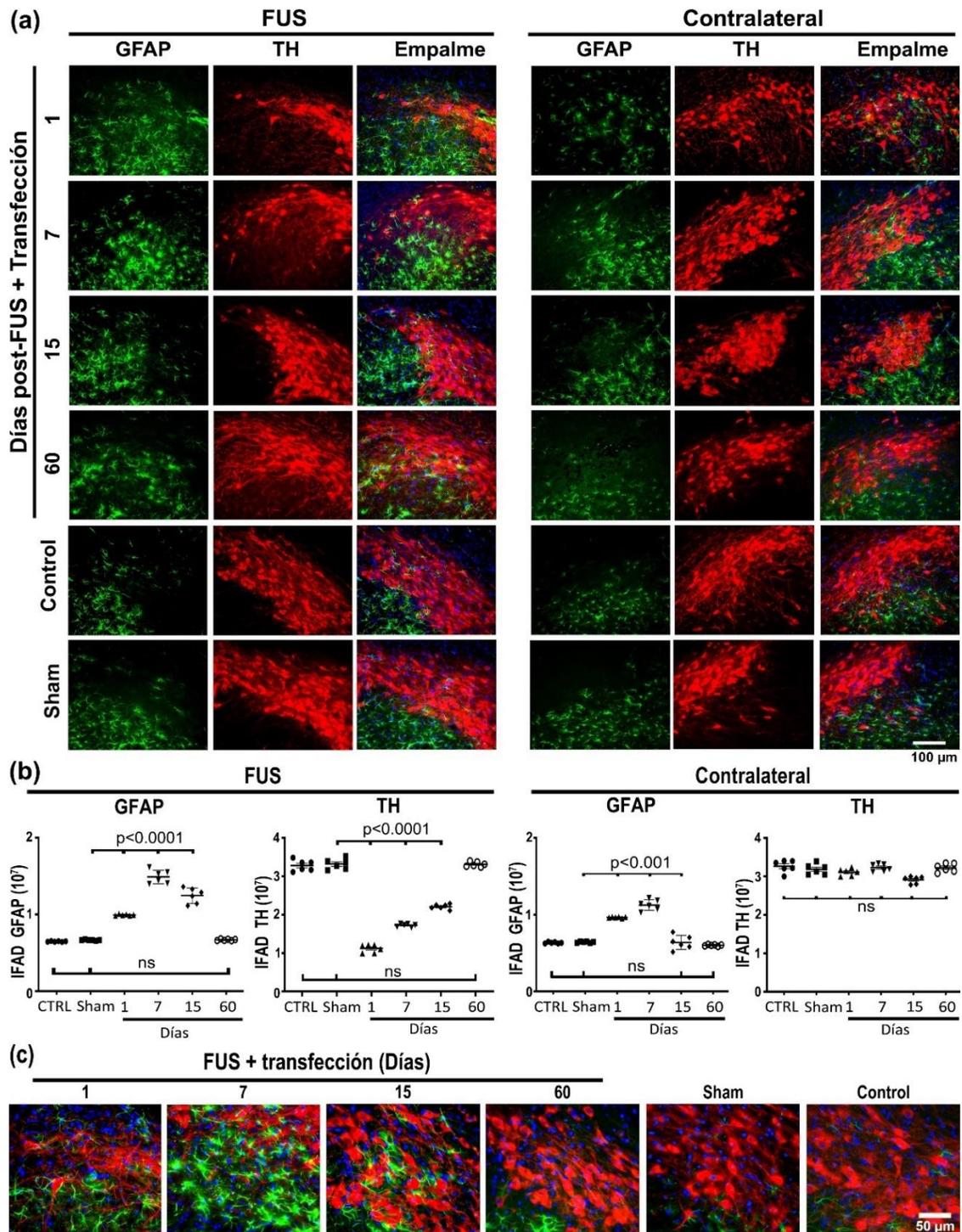


Figura 17. El ultrasonido focalizado (FUS) provoca astrogliosis reactiva transitoria en la sustancia negra. (a) Micrografías representativas del sitio más lesionado de la sustancia negra doblemente inmunoteñidas contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la tirosina hidroxilasa (TH) a lo largo del tiempo después de FUS. Las micrografías fusionadas también incluyen la contratinción nuclear de Hoechst. (b) Densidad del área de inmunofluorescencia

(IFAD) de GFAP y TH medida en las micrografías del panel A utilizando el software ImageJ. Los valores son la media \pm DE de las mediciones en tres niveles anatómicos ($n = 6$ ratas independientes por condición experimental). ANOVA unidireccional y pruebas de Tukey post hoc. ns = no significativo. (c) Las micrografías amplificadas muestran células GFAP+ con cambios fenotípicos según su estado de activación [55-57]. El valor de la escala es igual para el respectivo conjunto de micrografías. Inmunorreactividad de GFAP (verde) en células TH (rojas) con contratinción nuclear de Hoechst (azul) en la sustancia negra a lo largo del tiempo.

Dado que la inmunorreactividad de GFAP es imperceptible en la sustancia negra pars compacta en condiciones saludables [94-96], primero se tuvo que localizar esta región utilizando inmunofluorescencia contra TH para poder explorar la respuesta glial en la sustancia negra pars compacta (Figura 17) y posteriormente determinar los subtipos de astrocitos que se pudieran inducir por la aplicación de FUS.

El ultrasonido focalizado aumentó la población de células GFAP-C3+, que siguió un curso temporal similar al de la microglía activada en la sustancia negra tratada y en el lado contralateral no tratado, demostrando que la inducción de astrocitos A1 neurotóxicos también fue reversible (Figura 18). Sin embargo, la magnitud de la activación de los astrocitos A1 neurotóxicos fue un 173.1% mayor en el lado ipsilateral que en la sustancia negra contralateral, lo que sugiere que la transfección tuvo un efecto insignificante en la inducción de astrocitos A1 neurotóxicos (Figura 18). También se indujo un aumento transitorio significativo en las células S100A10-GFAP+ en la sustancia negra tratada y contralateral después de FUS (Figura 19) que siguió el curso temporal de las células dobles C3-GFAP+, mostrando así que también se indujeron astrocitos neurotróficos A2. Nuevamente, el aumento en las células S100A10-GFAP+ fue significativamente mayor (453.2%) en la sustancia negra tratada con FUS que en el lado contralateral no tratado (Figura 19). El hallazgo de que la activación de los astrocitos neurotóxicos A1 fue reversible y el aumento contrario de los astrocitos neurotróficos A2 sugiere que el daño neuronal fue menor y podría ser reparable mediante la acción de factores neurotróficos liberados por los astrocitos neurotróficos [54, 98, 99].

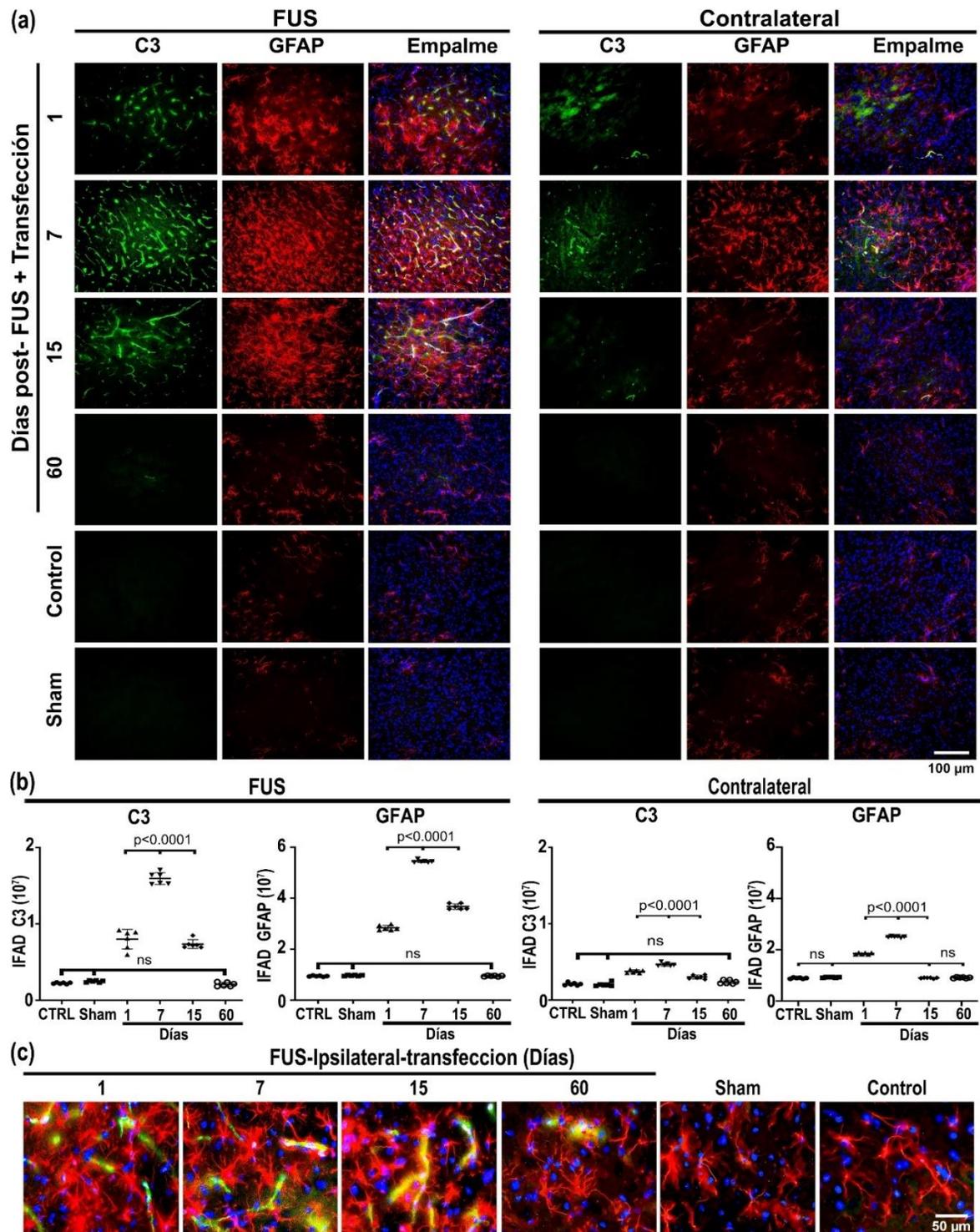


Figura 18. Inducción transitoria de astrocito A1 neurotóxico después de FUS y administración intraarterial de las NPs NTS-políplex. (a) Micrografías representativas del sitio más lesionado de la sustancia negra con doble inmunotinción con complemento 3 (C3) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP) a lo largo del tiempo después de FUS. Las micrografías

fusionadas también incluyen la contratinción nuclear de Hoechst. (b) Densidad del área de inmunofluorescencia (IFAD) de C3 y GFAP medida a partir de micrografías del panel A utilizando el software ImageJ. Los valores son la media \pm DE de la medición de tres niveles anatómicos (n = 6 ratas independientes por condición experimental). ANOVA unidireccional y pruebas de Tukey post hoc. ns = no significativo. (c) Las imágenes fusionadas amplificadas muestran la reducción de la inmunoreactividad de C3 (verde) en células GFAP+ (rojas) con contratinción nuclear de Hoechst (azul) en la sustancia negra a lo largo del tiempo. El valor de escala es igual para el respectivo conjunto de micrografías.

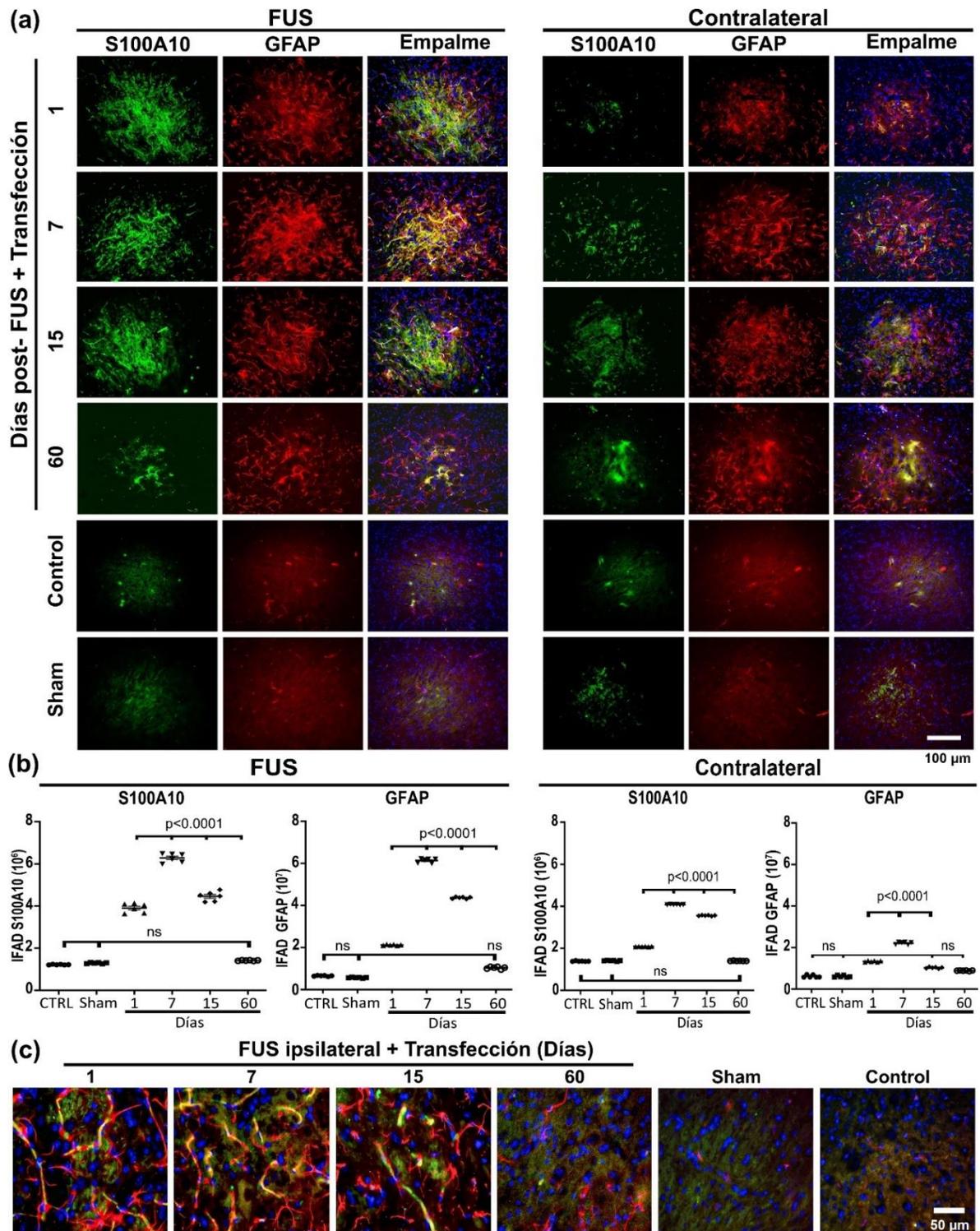


Figura 19. Activación neurotrófica transitoria de A2 después de la ecografía focalizada (FUS) y la administración intraarterial de NPs NTS-políplex. (a) Micrografías representativas del sitio más lesionado de la sustancia negra doblemente inmunoteñidas contra la proteína de unión a calcio A10 (S100A10) y GFAP a lo largo del tiempo después de FUS. Las

micrografías fusionadas también incluyen la contratinción nuclear de Hoechst. (b) Densidad del área de inmunofluorescencia (IFAD) de S100A10 y GFAP medida a partir de micrografías del panel A utilizando el software ImageJ. Los valores son la media \pm DE de las mediciones de tres niveles anatómicos (n = 6 ratas independientes por condición experimental). ANOVA unidireccional y pruebas de Tukey post hoc. ns = no significativo. (c) Las imágenes fusionadas amplificadas muestran la reducción de la inmunorreactividad S100A10 (verde) en células GFAP (rojas) con contratinción nuclear de Hoechst (azul) en la sustancia negra a lo largo del tiempo. El valor de escala es igual para el conjunto de micrografías respectivo.

El análisis de inmunohistoquímica de las células GFAP+ muestra nuevamente el desarrollo de astrogliosis reactiva provocada por FUS que siguió el curso temporal de los astrocitos neurotóxicos A1 y los astrocitos neurotróficos A2 revelados por inmunofluorescencia (Figuras 17, 18, 19 y 20). Esta coincidencia en el curso temporal sugiere que las subpoblaciones de astrocitos A1 y A2 pudieran provenir de los astrocitos reactivos, como se mostró previamente en cultivos de astrocitos purificados [44].

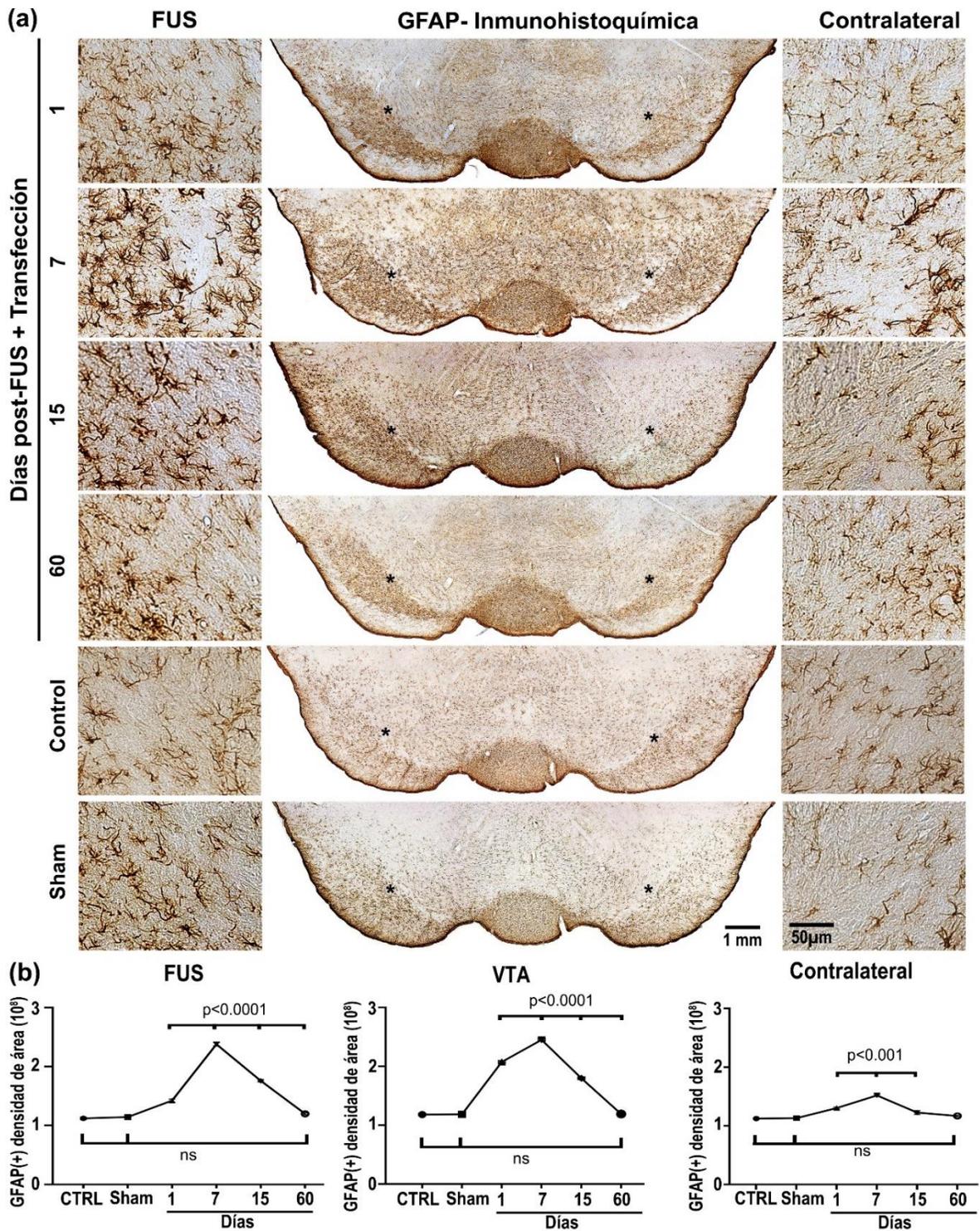


Figura 20. Astrogliosis reactiva reversible después de ultrasonido focalizado (FUS) y administración intraarterial de las NPs NTS-poliplex. Micrografías representativas de mesencéfalo con inmunohistoquímica GFAP. (a) Micrografías representativas del mesencéfalo con inmunohistoquímica de la proteína ácido fibrilar glial (GFAP). El valor de

escala es igual para el respectivo conjunto de micrografías. (b) Gráficos de dispersión de la densidad de GFAP+ medida en toda el área de la sustancia negra y el área tegmental ventral (VTA) de micrografías del panel A utilizando el software ImageJ. Los valores son la media \pm DE de un nivel anatómico (n = 6 ratas independientes por condición experimental). ANOVA unidireccional y pruebas de Tukey post hoc. ns = no significativo.

La presencia de células CD45+ anormal en la sustancia negra tratada con FUS demostró infiltración de células inmunes (incluyendo linfocitos, monocitos y granulocitos) (Figura 21), reforzando la evidencia de que la aplicación de FUS abre temporalmente la BHE mostrada por la administración de AE (Figura 9). En comparación con los valores del grupo control, el aumento de células CD45+ fue del 1,022.1% el primer día y alcanzó el aumento máximo del 1,421.2% el día 7 después de FUS. Posteriormente, las células CD45+ disminuyeron al 105.1% el día 15 y alcanzaron valores basales al final del estudio (60 días). Además, en la sustancia negra contralateral no tratada también se observó un incremento en el infiltrado de células CD45+, pero en menor porcentaje comparado con el lado tratado con FUS; de hecho, el incremento máximo alcanzado fue de tan solo 880.4% al día 7. Las células TH+ también disminuyeron a partir del día 7 hasta alcanzar valores basales el día 60 post-FUS. La población de células TH+ presentó el mismo perfil de afectación y recuperación en el lado tratado con FUS, mientras que la del lado contralateral permaneció sin alteraciones significativas (Figura 21), de acuerdo con los resultados mostrados en la figura 15 y 17. Sobre la base de que CD45 se expresa preferentemente en células del sistema inmunitario, incluyendo los linfocitos (como los linfocitos T,B y NK), monocitos, granulocitos y células dendríticas [100], su disminución después del día 60 sugiere que la neuroinflamación activada por la aplicación de FUS no se convierte en crónica debido a la implicación de la respuesta inmune adaptativa, lo que concuerda con tiempos tempranos de aplicación [101].

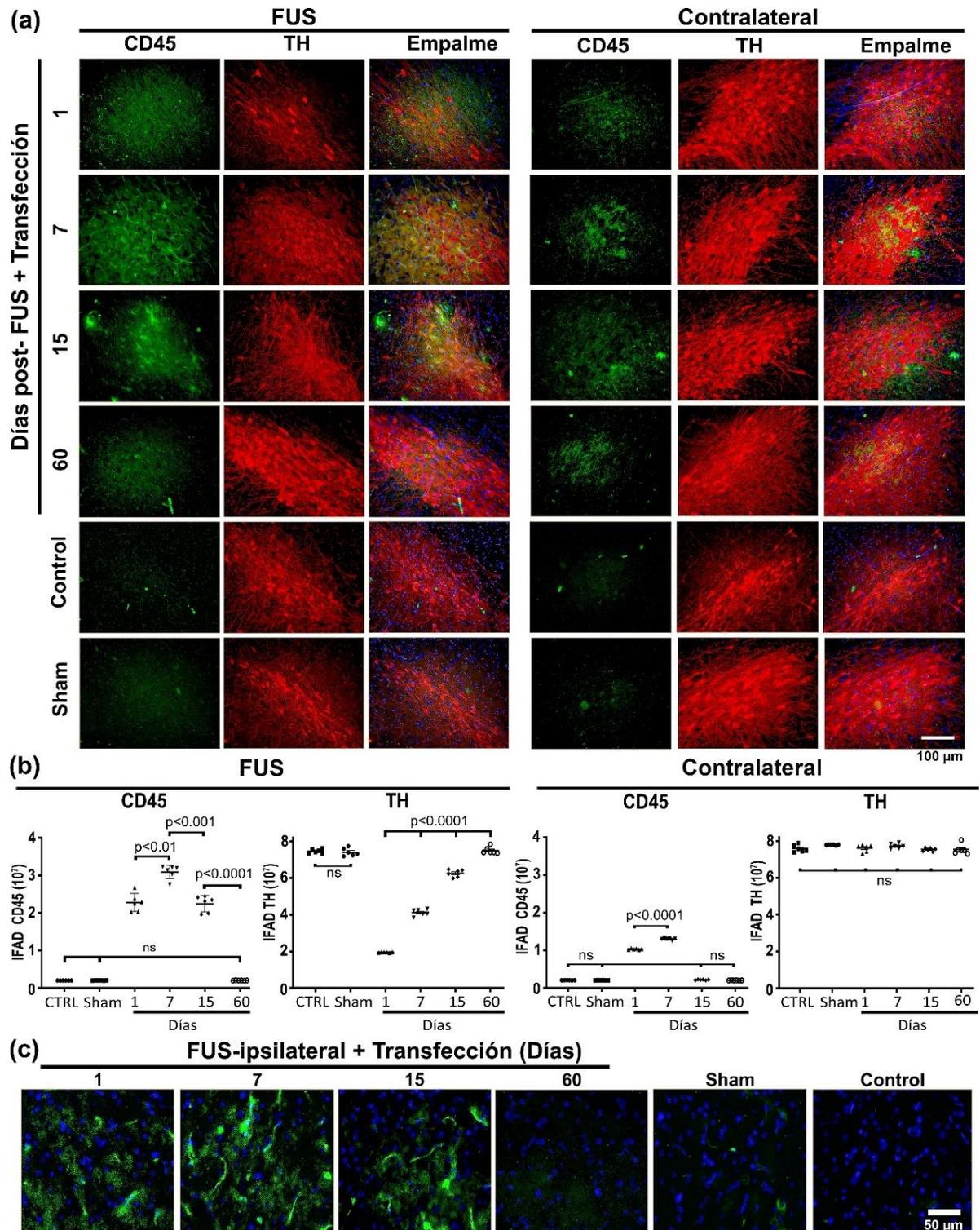


Figura 21. Infiltración transitoria de leucocitos después del ultrasonido focalizado (FUS) y la administración intraarterial de NPs NTS-poliplex. (a) Micrografías representativas de la sustancia negra con doble inmunotinción contra el grupo de diferenciación CD45 y tirosina hidroxilasa (TH) a lo largo del tiempo después de FUS. Las micrografías fusionadas también

incluyen la contratinción nuclear de Hoechst. (b) Densidad del área de inmunofluorescencia (IFAD) de CD45 y TH medida a partir de micrografías del panel A utilizando el software ImageJ. Los valores son la media \pm DE de mediciones de tres niveles anatómicos ($n = 6$ ratas independientes por condición experimental). ANOVA unidireccional y pruebas de Tukey post hoc. ns = no significativo. Inmunorreactividad de CD45 (verde) en células TH (rojas) con contratinción nuclear de Hoechst (azul) en la sustancia negra a lo largo del tiempo. (c) Las micrografías amplificadas muestran detalles morfológicos de las células CD45+ con contratinción nuclear y su desaparición después de 60 días después de la aplicación de FUS. El valor de escala es igual para el conjunto de micrografías respectivamente.

7.4 Efecto de FUS y transfección sobre el sistema nigroestriatal y la conducta sensoriomotora.

Aunque la aplicación de FUS se considera un enfoque no invasivo o mínimamente invasivo, se han informado efectos colaterales no deseados incluso con FUS de baja intensidad, como hemorragia cerebral, que surgen principalmente por el aumento térmico intracerebral durante el viaje de la onda y que son más significativos en el sitio del foco [102-105]. Por lo tanto, en este trabajo se hicieron ensayos de inmunohistoquímica para cuantificar con mayor precisión y confirmar los resultados de inmunofluorescencia sobre el impacto de FUS en las neuronas dopaminérgicas nigrales y sus proyecciones axonales estriatales (Figuras 15 y 19). El primer día, la sustancia negra tratada con FUS tuvo una disminución del 37.5% en la población celular TH+ y sus arborizaciones (Figura 22). Luego, las células TH+ y sus ramificaciones se recuperaron gradualmente hasta el día 15 post-FUS (Figura 22). Sin embargo, se produjo una caída significativa del 40% en la densidad de TH+ en el cuerpo estriado ipsilateral el primer día después de la aplicación de FUS (Figura 23). No hubo efectos perjudiciales evidentes sobre la vía nigroestriatal dopaminérgica del lado contralateral no tratado, como lo demuestra la falta de cambios significativos en las células TH+ y sus arborizaciones de la sustancia negra (Figura 22) y la densidad de TH+ en el cuerpo estriado (Figura 23). Las neuronas dopaminérgicas nigrales son particularmente vulnerables a la neuroinflamación

debido a sus bajos niveles de glutatión y actividad reducida de la glutamincisteína ligasa, defensas antioxidantes naturales en las células neuronales [106], así como una gran densidad de la población microglial [92].

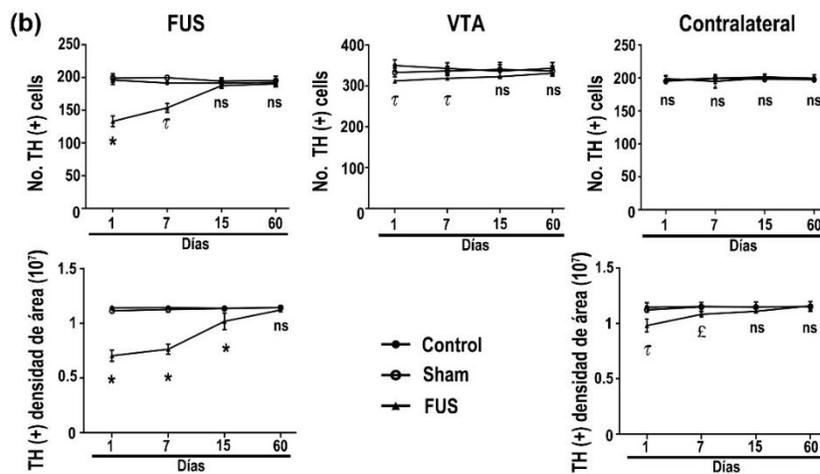
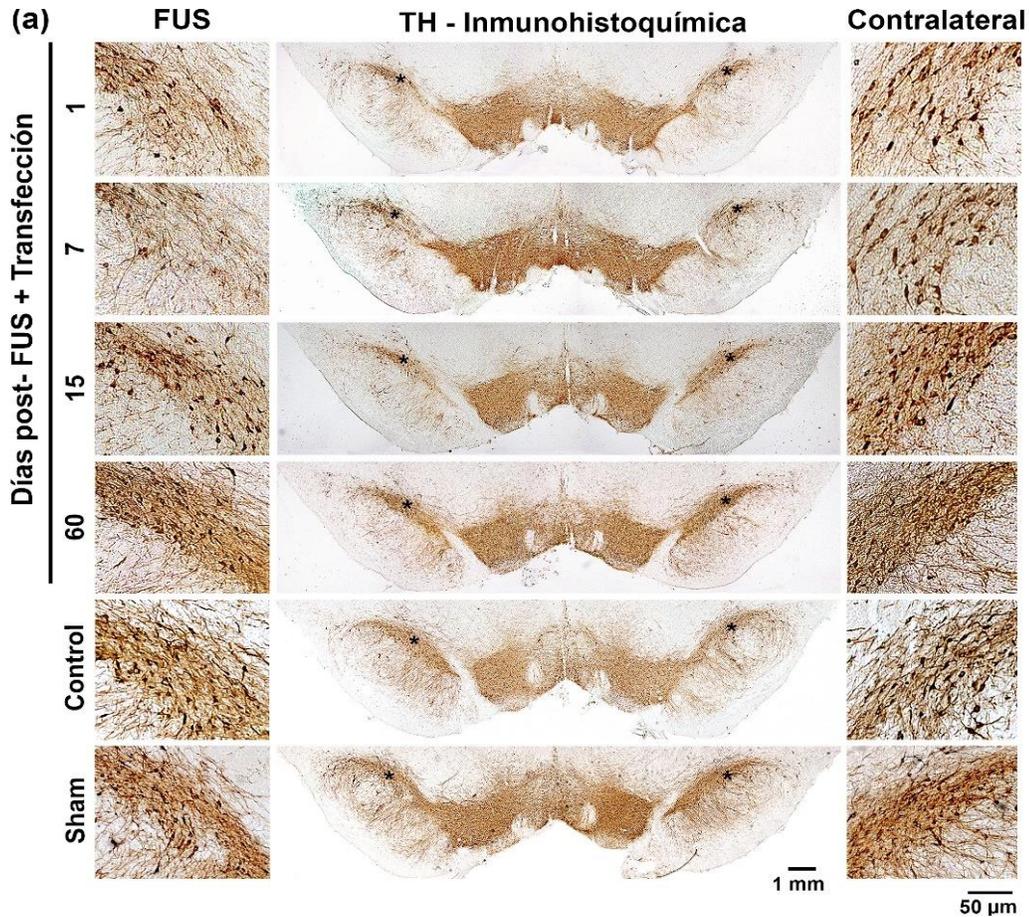


Figura 22. Pérdida reversible de la población de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra después del ultrasonido focalizado (FUS) y la administración intraarterial de las NPs

NTS poliplex. (a) Micrografías representativas de la sustancia negra con inmunohistoquímica de tirosina hidroxilasa (TH) a lo largo del tiempo después de FUS. El valor de escala es igual para el respectivo conjunto de micrografías. (b) recuento de células TH+ y (c) densidad del área de Inmunorreactividad medida a partir de micrografías del panel (a) utilizando el software ImageJ. Los valores son la media \pm DE de las mediciones promedio en cinco niveles anatómicos ($n = 3$ ratas independientes por condición experimental. $p < 0,0001 = *$, $p < 0,001 = \tau$ y $p < 0,01 = \text{£}$ en comparación con los grupos control y simulado en cada uno punto temporal. ANOVA de dos vías y pruebas de Tukey post hoc ns = no significativo.

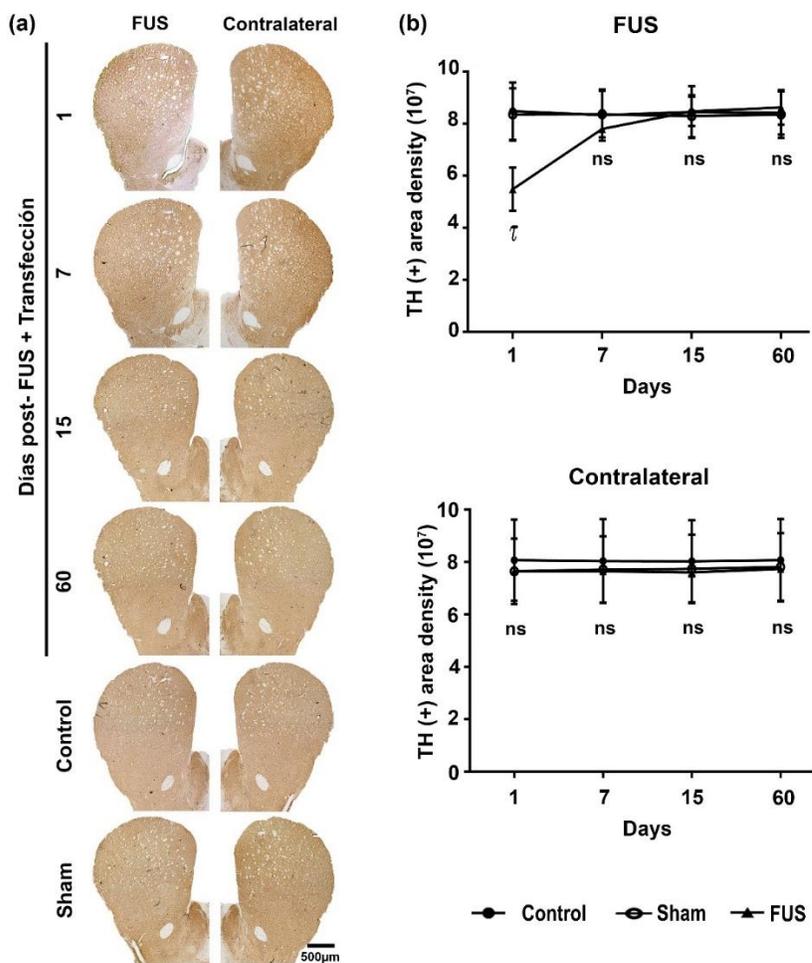


Figura 23. Disminución reversible de la inervación dopaminérgica del cuerpo estriado después de la aplicación del ultrasonido focalizado (FUS) y la administración intraarterial de las NPs NTS poliplex. (a) Micrografías representativas del cuerpo estriado con inmunohistoquímica de tirosina hidroxilasa (TH) a lo largo del tiempo después de FUS. El valor de escala es igual para todas las micrografías. (b) Densidad de inmunorreactividad

TH+ de micrografías del panel (a) utilizando el software ImageJ. Los valores son la media \pm DE de las mediciones promedio en cinco niveles anatómicos por rata ($n = 3$ ratas independientes por condición experimental). $p < 0,001 = \tau$, en comparación con los grupos control y simulado en cada momento. ANOVA de dos vías y pruebas de Tukey post hoc. ns = no significativo.

La pobre defensa antioxidante de las neuronas dopaminérgicas en condiciones fisiológicas conduce a una ineficiente depuración de los productos oxidados no enzimáticamente de la dopamina y de las moléculas oxidantes resultantes de la reacción de Fenton dependiente del hierro [107]. Entonces, un desequilibrio mínimo del estrés oxidativo ocasionado por cualquier insulto favorece la respuesta rápida de la microglía, la cual se encuentra en alta densidad en la sustancia negra [94-96]. Estas dos condiciones pueden explicar que el aumento transitorio de la temperatura de 4 °C durante 2.5 minutos producido en nuestra condición FUS [25] sea un estímulo suficiente para detonar la respuesta neuroinflamatoria, pero no tan intenso o sostenido como para prolongar la neuroinflamación a un estado crónico. Sobre esta base, podemos proponer que la disminución reversible en la población de neuronas dopaminérgicas pueda provenir de una pérdida temporal de la función metabólica causada por el desequilibrio de la homeostasis inducido por el calor en lugar de los efectos nocivos de la neuroinflamación a través de astrocitos neurotóxicos A1 y mediadores proinflamatorios. Además, los factores neurotróficos como BDNF [98], GDNF [99] y CDFN [54], que se sabe que se liberan de los astrocitos, también pueden contribuir a la recuperación del sistema nigroestriatal dopaminérgico.

Los resultados de varios trabajos donde se utilizan diversos parámetros de sonicación con o sin microburbujas coinciden en que la neuroinflamación aguda mostrada por microglia activada, astrocitos reactivos, leucocitos infiltrados, citocinas proinflamatorias y quimiocinas ocurre en diferentes áreas del cerebro, particularmente en la corteza cerebral y el hipocampo. También se ha profundizado en los mecanismos moleculares de la neuroinflamación aguda detonada por FUS, demostrando que se activan las vías de señalización intracelular, incluidas la señalización de AKT y NF- κ B [104, 108, 109]. Sin embargo, el efecto a largo plazo

de la neuroinflamación sobre la supervivencia neuronal se encuentra poco caracterizado. Nuestros resultados en la sustancia negra mostraron una activación reversible de la microglía sin presentar formas ameboides fagocíticas, lo que podría explicar la ausencia de agravamiento del daño de las neuronas dopaminérgicas en el sitio de aplicación de FUS. Esta sugerencia se ve respaldada por el hallazgo de que no sucede afectación neuronal en ausencia de la forma fagocítica de la microglía [94-96]. Además, el aumento de la microglía activada, pero sin forma fagocítica, en la sustancia negra contralateral tampoco produjo un daño neuronal significativo. En concordancia con el curso temporal de la activación microglial, se observó la inducción de los astrocitos reactivos A1 neurotóxicos también en mayor densidad en la sustancia negra tratada con FUS y menos en el lado contralateral. Estos resultados sugieren que la microglía activada indujo los astrocitos A1 a través de la liberación de citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-1 α y la proteína del complemento C1q [44, 95]. Se podría pensar que los astrocitos neurotóxicos A1 son los responsables de la disminución de neuronas dopaminérgicas debido a su conocida capacidad para matar neuronas [44, 95, 96]. Sin embargo, el aumento máximo de astrocitos neurotóxicos A1 se produjo cuando las neuronas dopaminérgicas se estaban recuperando. Por el contrario, los astrocitos neurotróficos A2, que también aumentaron progresivamente desde el primer día después de FUS, podrían ayudar a superar el efecto nocivo de los astrocitos neurotóxicos A1 mediante la liberación de factores neurotróficos como el BDNF [98]. Esta sugerencia está respaldada por hallazgos de que la estimulación con FUS en ratones sanos puede aumentar los niveles de BDNF, conocido por su potente efecto reparador sobre las neuronas dopaminérgicas nigrales [52, 55, 66, 68, 110].

El análisis de las cuatro pruebas de comportamiento mostró que las ratas sometidas a tratamiento con FUS presentaban déficits sensoriomotores, específicamente durante la fase de disminución del sistema nigroestriatal dopaminérgico, en comparación con el grupo control (Figura 24). Las ratas tratadas con FUS recorrieron la viga más lentamente que el grupo control, con retrasos del 27.5% el día 1 y del 68.6% el día siete, y con mayor tropiezo en la marcha los días 1 (314.3%) y 7 (187.5%) (Figura 24 (a) y (b)). En comparación con el grupo de

control, la prueba de vibrisas mostró una reducción en la respuesta de las extremidades anteriores del 10% en el lado ipsilateral y del 35.9% en el lado contralateral a la aplicación de FUS, alcanzando valores basales al día 60 después del tratamiento (Figura 24 (c) y (d)). Finalmente, la prueba del cilindro reveló asimetría en el uso de las extremidades anteriores para tocar la pared del cilindro al día 1 (30.4%) y día 7 (24.1%), en comparación con los grupos control (Figura 24 (e)). Todas las ratas mostraron un comportamiento normal desde el día 15 después de la aplicación de FUS, lo que indica que los déficits de comportamiento fueron espontáneamente reversibles y correlacionaron con la recuperación del sistema nigroestriatal dopaminérgico (Figuras 22 y 23). Por lo tanto, la disminución reversible del comportamiento motor podría estar asociada con la disminución del metabolismo de la dopamina y una respuesta neuronal ineficaz más que con la muerte neuronal, como se demostró en otro estudio [111]. Esta propuesta recibe respaldo adicional por el hallazgo de que las alteraciones motoras fueron reversibles y menores que las causadas por la muerte de neuronas dopaminérgicas inducida por neurotoxinas [52, 96].

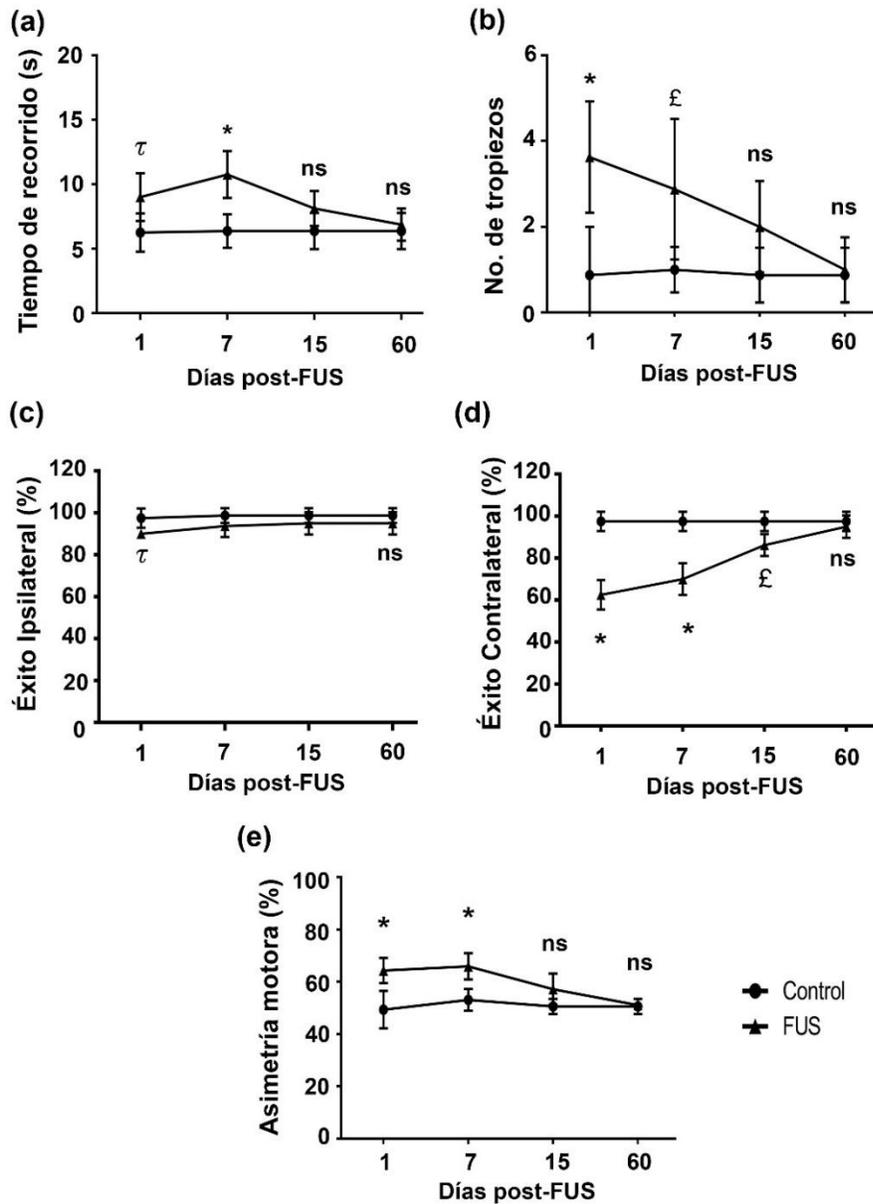


Figura 24. Déficits sensoriomotores reversibles después de la aplicación de FUS y administración intraarterial de las NPs NTS-poliplex. Las ratas fueron transfectadas con las NPs NTS-poliplex conteniendo el plásmido pEGFP-N1 30 minutos después de FUS y se evaluaron a lo largo del tiempo con las pruebas de comportamiento: (a) y (b) Prueba de marcha en la viga, (c) y (d) Prueba de colocación de extremidades anteriores evocadas por vibrisas, (e) Prueba del cilindro. Los valores se expresan como la media \pm DE de 6 ratas independientes para cada condición experimental. $p < 0,001 = \text{£}$, $p < 0,01 = \tau$ y $p < 0,05 = *$. Grupo de control comparado con el grupo FUS. ANOVA de dos vías y prueba post hoc de Tukey. ns = no significativo.

8. Conclusión

Este estudio demuestra que la ventana de apertura de la barrera hematoencefálica de hasta 6 horas que ocurre tras la aplicación de FUS es un método viable para la entrega de genes a la sustancia negra mediante NPS NTS-polyplex administradas a través de las vías sanguínea y nasal [25]. Además, podemos afirmar que es un método altamente eficiente que permite la expresión génica en neuronas dopaminérgicas nigrales, incluso cuando las NPS NTS-polyplex se suministran en momentos en los que la aplicación induce neuroinflamación aguda (60 minutos después de FUS). De las tres vías exploradas en este trabajo, consideramos que la administración intracarotídea es la más eficaz. Por otro lado, podemos afirmar que, aunque la neuroinflamación inducida por la aplicación de FUS es reversible, ya que todos los parámetros analizados vuelven a niveles normales a los 15 días, durante su fase crítica disminuye significativamente la viabilidad de las células dopaminérgicas, induciendo consecuentemente déficits en el comportamiento sensoriomotor. Estos resultados sugieren que la aplicación de FUS ocasiona una pérdida temporal del fenotipo dopaminérgico en lugar de muerte neuronal. En conclusión, nuestros datos demuestran la seguridad de la aplicación de FUS en transfecciones sistémicas de un gen reportero inocuo. Sin embargo, es necesario confirmar la seguridad de la expresión de genes terapéuticos en modelos animales parkinsonianos antes de llevar este procedimiento a la clínica, especialmente en trastornos neurodegenerativos relacionados con la disfunción dopaminérgica.

9. Perspectivas

- Evaluar el estado de las uniones estrechas en el cerebro de ratas tratadas con FUS, específicamente verificar la presencia y niveles de:
 - Uniones estrechas claudina 3 y 5, así como ocludina.
 - Evaluar la presencia y ubicación de los componentes de las uniones adherentes PECAM y VE-cadherina.

- Explorar la efectividad de terapia génica con un gen neurotrófico en un modelo de enfermedad de Parkinson por BSSG y evaluar el margen de seguridad de este procedimiento.

10. Referencias

1. Aravalli, R.N., J.D. Belcher, and C.J. Steer, *Liver-targeted gene therapy: Approaches and challenges*. Liver Transplantation, 2015. **21**(6): p. 718-737.
2. Ginn, S.L., et al., *Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update*. Journal of Gene Medicine, 2018. **20**(5).
3. Huang, X. and Y. Yang, *Innate immune recognition of viruses and viral vectors*. Human Gene Therapy, 2009. **20**(4): p. 293-301.
4. Piras, F., et al., *Lentiviral vectors escape innate sensing but trigger p53 in human hematopoietic stem and progenitor cells*. EMBO Molecular Medicine, 2017. **9**(9): p. 1198-1211.
5. Mashal, M., et al., *Non-viral vectors based on cationic niosomes as efficient gene delivery vehicles to central nervous system cells into the brain*. International Journal of Pharmaceutics, 2018. **552**(1-2): p. 48-55.
6. Kim, J., S.I. Ahn, and Y. Kim, *Nanotherapeutics engineered to cross the blood-brain barrier for advanced drug delivery to the central nervous system*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2019. **73**: p. 8-18.
7. Chen, W., et al., *Lipopolyplex for therapeutic gene delivery and its application for the treatment of Parkinson's disease*. Frontiers in Aging Neuroscience, 2016. **8**(APR).
8. Jackson, S., et al., *Model systems for studying the blood-brain barrier: Applications and challenges*. Biomaterials, 2019. **214**.
9. Haddad-Tóvolli, R., et al., *Development and function of the blood-brain barrier in the context of metabolic control*. Frontiers in Neuroscience, 2017. **11**(APR).
10. Abbott, N.J., et al., *Structure and function of the blood-brain barrier*. Neurobiology of Disease, 2010. **37**(1): p. 13-25.
11. Smith, Q.R. *Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier*. in *Journal of Nutrition*. 2000.
12. Kobayashi, K., et al., *Pseudotyped lentiviral vectors for retrograde gene delivery into target brain regions*. Frontiers in Neuroanatomy, 2017. **11**.
13. Kumar, P., et al., *Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system*. Nature, 2007. **448**(7149): p. 39-43.
14. Jung, N.Y. and J.W. Chang, *Magnetic resonance-guided focused ultrasound in neurosurgery: Taking lessons from the past to inform the future*. Journal of Korean Medical Science, 2018. **33**(44).
15. Hou, R., et al., *Pilot study: safety and effectiveness of simple ultrasound-guided high-intensity focused ultrasound ablating uterine leiomyoma with a diameter greater than 10 cm*. Br J Radiol, 2018. **91**(1082): p. 20160950.

16. Piper, R.J., et al., *Focused ultrasound as a non-invasive intervention for neurological disease: a review*. British Journal of Neurosurgery, 2016. **30**(3): p. 286-293.
17. Aryal, M., et al., *Ultrasound-mediated blood-brain barrier disruption for targeted drug delivery in the central nervous system*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. **72**: p. 94-109.
18. Baek, H., K.J. Pahk, and H. Kim, *A review of low-intensity focused ultrasound for neuromodulation*. Biomedical Engineering Letters, 2017. **7**(2): p. 135-142.
19. Gutiérrez, M.I., L. Leija, and A. Vera. *Modulation of the driven signal applied to an ultrasound therapy transducer*. in *2009 Pan American Health Care Exchanges - PAHCE 2009*. 2009.
20. Gutiérrez, M.I., et al., *Acoustic field modeling for physiotherapy ultrasound applicators by using approximated functions of measured non-uniform radiation distributions*. Ultrasonics, 2012. **52**(6): p. 767-77.
21. Contreras, V.H., et al. *Modeling of acoustic field patten in rat's bone with a HIFU transducer for medical experiments in delivery drugs in brain*. in *2016 Global Medical Engineering Physics Exchanges/Pan American Health Care Exchanges, GMEPE/PAHCE 2016*. 2016.
22. Hernandez, D.A., et al. *Simulation and in vivo validation of craniotomies in rats for the disruption of the blood brain barrier with focused ultrasound for drug delivery*. in *14th International Conference on Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control, CCE 2017*. 2017. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.
23. Rodríguez, J.A., et al. *Opening the Blood-Brain Barrier in the Substantia Nigra of Rat Brain with Focused Ultrasound and Microbubbles*. in *2019 Global Medical Engineering Physics Exchanges/ Pan American Health Care Exchanges, GMEPE/PAHCE 2019*. 2019. IEEE Computer Society.
24. Martínez-Fong, D. and I. Navarro-Quiroga, *Synthesis of a non-viral vector for gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor*. Brain Res Brain Res Protoc, 2000. **6**(1-2): p. 13-24.
25. Rodríguez, J.A., et al., *Protocol to Induce the Temporary Opening of the Blood-Brain Barrier with Short-Time Focused Ultrasound in Rats*. Pharmaceuticals, 2023.
26. Stamp, M.E.M., et al., *Breaking barriers: exploring mechanisms behind opening the blood-brain barrier*. Fluids Barriers CNS, 2023. **20**(1): p. 87.
27. Wang, X., et al., *Advances on fluid shear stress regulating blood-brain barrier*. Microvascular Research, 2020. **128**.
28. Mead, B.P., et al., *Targeted gene transfer to the brain via the delivery of brain-penetrating DNA nanoparticles with focused ultrasound*. J Control Release, 2016. **223**: p. 109-117.
29. Ogawa, K., et al., *Focused ultrasound/microbubbles-assisted BBB opening enhances LNP-mediated mRNA delivery to brain*. J Control Release, 2022. **348**: p. 34-41.
30. Szablowski, J.O., et al., *Acoustically targeted chemogenetics for the non-invasive control of neural circuits*. Nat Biomed Eng, 2018. **2**(7): p. 475-484.

31. Shen, Y., et al., *Non-invasive, targeted, and non-viral ultrasound-mediated brain-derived neurotrophic factor plasmid delivery for treatment of autism in a rat model*. *Front Neurosci*, 2022. **16**: p. 986571.
32. Huang, Q., et al., *Targeted gene delivery to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood-brain barrier disruption*. *Exp Neurol*, 2012. **233**(1): p. 350-6.
33. Samiotaki, G., et al., *Enhanced delivery and bioactivity of the neurturin neurotrophic factor through focused ultrasound-mediated blood-brain barrier opening in vivo*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015. **35**(4): p. 611-22.
34. Karakatsani, M.E., et al., *Amelioration of the nigrostriatal pathway facilitated by ultrasound-mediated neurotrophic delivery in early Parkinson's disease*. *J Control Release*, 2019. **303**: p. 289-301.
35. Chen, H., et al., *Focused ultrasound-enhanced intranasal brain delivery of brain-derived neurotrophic factor*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 28599.
36. Aly, A.E., et al., *Focused ultrasound enhances transgene expression of intranasal hGDNF DNA nanoparticles in the sonicated brain regions*. *J Control Release*, 2023. **358**: p. 498-509.
37. Ji, R., et al., *Focused ultrasound enhanced intranasal delivery of brain derived neurotrophic factor produces neurorestorative effects in a Parkinson's disease mouse model*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 19402.
38. Lin, C.Y., et al., *Ultrasound-responsive neurotrophic factor-loaded microbubble-liposome complex: Preclinical investigation for Parkinson's disease treatment*. *J Control Release*, 2020. **321**: p. 519-528.
39. Yue, P., et al., *Ultrasound-Triggered Effects of the Microbubbles Coupled to GDNF Plasmid-Loaded PEGylated Liposomes in a Rat Model of Parkinson's Disease*. *Front Neurosci*, 2018. **12**: p. 222.
40. Fan, C.H., et al., *Noninvasive, Targeted, and Non-Viral Ultrasound-Mediated GDNF-Plasmid Delivery for Treatment of Parkinson's Disease*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 19579.
41. Mead, B.P., et al., *Novel Focused Ultrasound Gene Therapy Approach Noninvasively Restores Dopaminergic Neuron Function in a Rat Parkinson's Disease Model*. *Nano Lett*, 2017. **17**(6): p. 3533-3542.
42. Long, L., et al., *Treatment of Parkinson's disease in rats by Nrf2 transfection using MRI-guided focused ultrasound delivery of nanomicrobubbles*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **482**(1): p. 75-80.
43. Acioglu, C., L. Li, and S. Elkabes, *Contribution of astrocytes to neuropathology of neurodegenerative diseases*. *Brain Research*, 2021. **1758**.
44. Liddelov, S.A., et al., *Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia*. *Nature*, 2017. **541**(7638): p. 481-487.
45. Bahniwal, M., E.B. Villanueva, and A. Klegeris, *Moderate increase in temperature may exacerbate neuroinflammatory processes in the brain: Human cell culture studies*. *Journal of Neuroimmunology*, 2011. **233**(1-2): p. 65-72.
46. Chen, K.T., K.C. Wei, and H.L. Liu, *Focused Ultrasound Combined with Microbubbles in Central Nervous System Applications*. *Pharmaceutics*, 2021. **13**(7).

47. Vykhodtseva, N.I., K. Hynynen, and C. Damianou, *Histologic effects of high intensity pulsed ultrasound exposure with subharmonic emission in rabbit brain in vivo*. *Ultrasound Med Biol*, 1995. **21**(7): p. 969-79.
48. Giguere, N., S. Burke Nanni, and L.E. Trudeau, *On Cell Loss and Selective Vulnerability of Neuronal Populations in Parkinson's Disease*. *Front Neurol*, 2018. **9**: p. 455.
49. Segura-Aguilar, J., et al., *Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease*. *J Neurochem*, 2014. **129**(6): p. 898-915.
50. Chinta, S.J., et al., *Inducible alterations of glutathione levels in adult dopaminergic midbrain neurons result in nigrostriatal degeneration*. *J Neurosci*, 2007. **27**(51): p. 13997-4006.
51. Grabert, K., et al., *Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging*. *Nat Neurosci*, 2016. **19**(3): p. 504-16.
52. Fernandez-Parrilla, M.A., et al., *Cerebral dopamine neurotrophic factor transfection in dopamine neurons using neurotensin-polyplex nanoparticles reverses 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal neurodegeneration*. *Neural Regen Res*, 2022. **17**(4): p. 854-866.
53. Espadas-Alvarez, A.J., et al., *Regulation of human GDNF gene expression in nigral dopaminergic neurons using a new doxycycline-regulated NTS-polyplex nanoparticle system*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2017. **13**(4): p. 1363-1375.
54. Nadella, R., et al., *Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced neuroinflammation in the rat substantia nigra*. *Journal of Neuroinflammation*, 2014. **11**(1).
55. Gatica-Garcia, B., et al., *Unilateral rNurr1-V5 transgene expression in nigral dopaminergic neurons mitigates bilateral neuropathology and behavioral deficits in parkinsonian rats with alpha-synucleinopathy*. *Neural Regen Res*, 2024. **19**(9): p. 2057-2067.
56. Martinez-Fong, D., et al., *NTS-Polyplex: A potential nanocarrier for neurotrophic therapy of Parkinson's disease*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2012. **8**(7): p. 1052-1069.
57. Navarro-Quiroga, I., et al., *Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 nuclear localization signal*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2002. **105**(1-2): p. 86-97.
58. Hernandez-Baltazar, D., D. Martinez-Fong, and L.E. Trudeau, *Optimizing NTS-polyplex as a tool for gene transfer to cultured dopamine neurons*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e51341.
59. Arango-Rodriguez, M.L., et al., *Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2006. **1760**(7): p. 1009-1020.
60. Lopez-Salas, F.E., et al., *Synthetic Monopartite Peptide That Enables the Nuclear Import of Genes Delivered by the Neurotensin-Polyplex Vector*. *Mol Pharm*, 2020. **17**(12): p. 4572-4588.
61. Aranda-Barradas, M.A.-O., et al., *Development of a Parenteral Formulation of NTS-Polyplex Nanoparticles for Clinical Purpose*. *LID - 10.3390/pharmaceutics10010005 [doi] LID - 5. (1999-4923 (Print))*.

62. Castillo-Rodriguez, R.A., et al., *Suicide HSVtk gene delivery by neurotensin-polyplex nanoparticles via the bloodstream and GCV Treatment specifically inhibit the growth of human MDA-MB-231 triple negative breast cancer tumors xenografted in athymic mice*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97151.
63. Rubio-Zapata, H.A., et al., *NT-polyplex: a new tool for therapeutic gene delivery to neuroblastoma tumors*. Cancer Gene Ther, 2009. **16**(7): p. 573-84.
64. Hernandez, M.E., et al., *Safety of the intravenous administration of neurotensin-polyplex nanoparticles in BALB/c mice*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2014. **10**(4): p. 745-754.
65. Alvarez-Maya, I., et al., *In vivo gene transfer to dopamine neurons of rat substantia nigra via the high-affinity neurotensin receptor*. Mol Med, 2001. **7**(3): p. 186-92.
66. Hernandez-Chan, N.G., et al., *Neurotensin-polyplex-mediated brain-derived neurotrophic factor gene delivery into nigral dopamine neurons prevents nigrostriatal degeneration in a rat model of early Parkinson's disease*. Journal of Biomedical Science, 2015. **22**(1).
67. Martinez-Fong, D., et al., *Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells*. Brain Res Mol Brain Res, 1999. **69**(2): p. 249-62.
68. Razgado-Hernandez, L.F., et al., *The transfection of BDNF to dopamine neurons potentiates the effect of dopamine D3 receptor agonist recovering the striatal innervation, dendritic spines and motor behavior in an aged rat model of Parkinson's disease*. PLoS ONE, 2015. **10**(2).
69. Jung, O., et al., *Neuroinflammation associated with ultrasound-mediated permeabilization of the blood-brain barrier*. Trends in Neurosciences, 2022. **45**(6): p. 459-470.
70. Dhuria, S.V., L.R. Hanson, and W.H. Frey II, *Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations*. Journal of pharmaceutical sciences, 2010. **99**(4): p. 1654-1673.
71. Kwon, D.K., et al., *Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease: Pathogenesis and Emerging Treatment Strategies*. Cells, 2022. **11**(23).
72. Nutt, J.G., et al., *Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Gene Therapy Enhances Levodopa Response in Parkinson's Disease*. Mov Disord, 2020. **35**(5): p. 851-858.
73. Lindholm, P. and M. Saarma, *Cerebral dopamine neurotrophic factor protects and repairs dopamine neurons by novel mechanism*. Mol Psychiatry, 2022. **27**(3): p. 1310-1321.
74. Kirik, D., et al., *Gene therapy for Parkinson's disease: Disease modification by GDNF family of ligands*. Neurobiol Dis, 2017. **97**(Pt B): p. 179-188.
75. Gonzalez-Barrios, J.A., et al., *Neurotensin polyplex as an efficient carrier for delivering the human GDNF gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats*. Molecular Therapy, 2006. **14**(6): p. 857-865.
76. Reyes-Corona, D., et al., *Neurturin overexpression in dopaminergic neurons induces presynaptic and postsynaptic structural changes in rats with chronic 6-hydroxydopamine lesion*. PLoS ONE, 2017. **12**(11).

77. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nature Methods*, 2012. **9**(7): p. 671-675.
78. Hampshire, V.A. and S.H. Gilbert, *Refinement, Reduction, and Replacement (3R) Strategies in Preclinical Testing of Medical Devices*. *Toxicologic Pathology*, 2019. **47**(3): p. 329-338.
79. Miyashiro, J.K., V. Poppa, and B.C. Berk, *Flow-induced vascular remodeling in the rat carotid artery diminishes with age*. *Circ Res*, 1997. **81**(3): p. 311-9.
80. Bidros, D.S. and M.A. Vogelbaum, *Novel Drug Delivery Strategies in Neuro-Oncology*. *Neurotherapeutics*, 2009. **6**(3): p. 539-546.
81. Manaenko, A., et al., *Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model*. *Journal of Neuroscience Methods*, 2011. **195**(2): p. 206-210.
82. Morton, D.B., et al., *Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVA/WF/FRAME/RSPCA/UFWA Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare*. *Lab Anim*, 2001. **35**(1): p. 1-41.
83. Soto-Rojas, L.O., et al., *Unilateral intranigral administration of β -sitosterol β -D-glucoside triggers pathological α -synuclein spreading and bilateral nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the rat*. *Acta Neuropathologica Communications*, 2020. **8**(1).
84. Soto-Rojas, L.O., et al., *A sequential methodology for integral evaluation of motor and non-motor behaviors in parkinsonian rodents*. *MethodsX*, 2020. **7**.
85. Anstrom, K.K., et al., *Repetitive vibrissae-elicited forelimb placing before and immediately after unilateral 6-hydroxydopamine improves outcome in a model of Parkinson's disease*. *Behavioural Brain Research*, 2007. **179**(2): p. 183-191.
86. Soto-Rojas, L.O., et al., *A single intranigral administration of β -sitosterol β -d-glucoside elicits bilateral sensorimotor and non-motor alterations in the rat*. *Behavioural Brain Research*, 2020. **378**.
87. Steel, C.D., et al., *Comparison of the lateral tail vein and the retro-orbital venous sinus as routes of intravenous drug delivery in a transgenic mouse model*. *Lab Anim (NY)*, 2008. **37**(1): p. 26-32.
88. Visweswaraiyah, A., et al., *Tracking the tissue distribution of marker dye following intranasal delivery in mice and chinchillas: a multifactorial analysis of parameters affecting nasal retention*. *Vaccine*, 2002. **20**(25-26): p. 3209-20.
89. Sonne, J., V. Reddy, and M.R. Beato, *Neuroanatomy, Substantia Nigra*, in *StatPearls*. 2024: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Vamsi Reddy declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Morris Beato declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
90. Koo, J., C. Lim, and K.T. Oh, *Recent Advances in Intranasal Administration for Brain-Targeting Delivery: A Comprehensive Review of Lipid-Based*

- Nanoparticles and Stimuli-Responsive Gel Formulations*. Int J Nanomedicine, 2024. **19**: p. 1767-1807.
91. Lin, C.Y., et al., *Non-invasive, neuron-specific gene therapy by focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening in Parkinson's disease mouse model*. J Control Release, 2016. **235**: p. 72-81.
 92. Wang, Q., et al., *Substance P enhances microglial density in the substantia nigra through neurokinin-1 receptor/NADPH oxidase-mediated chemotaxis in mice*. Clin Sci (Lond), 2015. **129**(8): p. 757-67.
 93. Kovacs, Z.I., et al., *Disrupting the blood-brain barrier by focused ultrasound induces sterile inflammation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017. **114**(1): p. E75-E84.
 94. Flores-Martinez, Y.M., et al., *Acute neuroinflammatory response in the substantia nigra pars compacta of rats after a local injection of lipopolysaccharide*. Journal of Immunology Research, 2018. **2018**.
 95. Luna-Herrera, C., et al., *Intranigral Administration of beta-Sitosterol-beta-D-Glucoside Elicits Neurotoxic A1 Astrocyte Reactivity and Chronic Neuroinflammation in the Rat Substantia Nigra*. J Immunol Res, 2020. **2020**: p. 5907591.
 96. Valenzuela-Arzeta, I.E., et al., *LPS Triggers Acute Neuroinflammation and Parkinsonism Involving NLRP3 Inflammasome Pathway and Mitochondrial CI Dysfunction in the Rat*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(5).
 97. Fu, R., et al., *Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases*. Mol Neurobiol, 2014. **49**(3): p. 1422-34.
 98. de Pins, B., et al., *Conditional BDNF Delivery from Astrocytes Rescues Memory Deficits, Spine Density, and Synaptic Properties in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer Disease*. J Neurosci, 2019. **39**(13): p. 2441-2458.
 99. Gava-Junior, G., et al., *High-frequency repetitive magnetic stimulation rescues ischemia-injured neurons through modulation of glial-derived neurotrophic factor present in the astrocyte's secretome*. J Neurochem, 2023. **164**(6): p. 813-828.
 100. Altin, J.G. and E.K. Sloan, *The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation*. Immunology and Cell Biology, 1997. **75**(5): p. 430-445.
 101. Poon, C., C. Pellow, and K. Hynynen, *Neutrophil recruitment and leukocyte response following focused ultrasound and microbubble mediated blood-brain barrier treatments*. Theranostics, 2021. **11**(4): p. 1655-1671.
 102. Kim, E., et al., *High Incidence of Intracerebral Hemorrhaging Associated with the Application of Low-Intensity Focused Ultrasound Following Acute Cerebrovascular Injury by Intracortical Injection*. Pharmaceutics, 2022. **14**(10).
 103. Todd, N., et al., *Secondary effects on brain physiology caused by focused ultrasound-mediated disruption of the blood-brain barrier*. Journal of Controlled Release, 2020. **324**: p. 450-459.
 104. Huang, L., et al., *Low-intensity focused ultrasound attenuates early traumatic brain injury by OX-A/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway*. Aging, 2022. **14**(18): p. 7455-7469.

105. Ren, L., et al., *Noninvasive measurement of local temperature using ultrasound-switchable fluorescence*. Biomedical Optics Express, 2023. **14**(9): p. 4406-4420.
106. Smeyne, M. and R.J. Smeyne, *Glutathione metabolism and Parkinson's disease*. Free radical biology and medicine, 2013. **62**: p. 13-25.
107. Sun, Y., A.N. Pham, and T.D. Waite, *Elucidation of the interplay between Fe (II), Fe (III), and dopamine with relevance to iron solubilization and reactive oxygen species generation by catecholamines*. Journal of neurochemistry, 2016. **137**(6): p. 955-968.
108. McMahon, D. and K. Hynynen, *Acute inflammatory response following increased blood-brain barrier permeability induced by focused ultrasound is dependent on microbubble dose*. Theranostics, 2017. **7**(16): p. 3989-4000.
109. Jalali, S., et al., *Focused ultrasound-mediated bbb disruption is associated with an increase in activation of AKT: Experimental study in rats*. BMC Neurology, 2010. **10**.
110. Benítez-Castañeda, A., et al., *Transfection of the BDNF Gene in the Surviving Dopamine Neurons in Conjunction with Continuous Administration of Pramipexole Restores Normal Motor Behavior in a Bilateral Rat Model of Parkinson's Disease*. Parkinsons Dis, 2024. **2024**: p. 3885451.
111. Chu, P.C., et al., *Neuromodulation accompanying focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening*. Scientific Reports, 2015. **5**.