



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

---

---

ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

*Tesis Doctoral*

**“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA Y CRÓNICA DE L-DOPA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *fosB* EN EL ESTRIADO DE RATAS HEMIPARKINSONIANAS, ASOCIADO A LA INDUCCIÓN DE DISCINESIAS”**

**Tesis presentada para obtener el título de:**

Doctora en Ciencias Químicas en el  
área de Bioquímica y Biología Molecular

**Nombre de la alumna:**

M.C. Victoria Palafox Sánchez

**Nombre de Asesores de Tesis:**

Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León  
Facultad de Ciencias Químicas-Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Dr. José Aguilera Ávila  
Institut de Neurociències - Universitat Autònoma de Barcelona

Noviembre del 2017



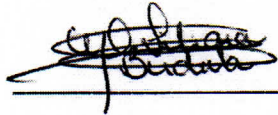
**BUAP**

**A QUIEN CORRESPONDA:**

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Liliana Martínez Mendieta, Dra. Virginia Sedeño Monge, Dra. María Isabel Martínez García, Dr. José Luis Góngora Alfaro y el Dr. Thomas Scior, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Efecto de la administración aguda y crónica de L-DOPA sobre la expresión del gen fosb en el estriado de ratas hemiparkinsonianas, asociado a la inducción de discinesias”**, que presenta la alumna **M.C. Victoria Palafox Sánchez** para obtener el grado de Doctorado en Ciencias Químicas.

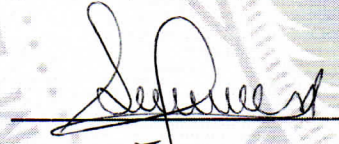
Se extiende la presente a los tres días del mes de octubre del año dos mil diecisiete.

**ATENTAMENTE**



---

Dra. Liliana Martínez Mendieta



---

Dra. Virginia Sedeño Monge



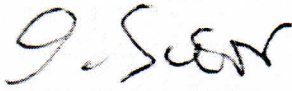
---

Dra. María Isabel Martínez García



---

Dr. José Luis Góngora Alfaro



---

Dr. Thomas Scior

**80**  **AÑOS**  
**DE UNIVERSIDAD**

Posgrado en Ciencias Químicas  
Facultad de Ciencias Químicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio PCQ 10,  
Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 7397  
posgrado.quimica@correo.buap.mx



# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	VI
RESUMEN.....	IX
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Sistema nigroestriatal.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Organización neuroanatomica y funcional de los ganglios basales .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Los receptores dopaminérgicos en los ganglios basales.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 La enfermedad de Parkinson.....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Terapéutica de la enfermedad de Parkinson.....	20
1.4.2 Discinesias: Mecanismos presinápticos.....	20
1.4.3 Discinesias: Mecanismos Postsinápticos.....	22
<b>1.5 El gen <i>fosB</i> y sus implicaciones en el desarrollo de las discinesias .....</b>	<b>24</b>
1.5.1 <i>El factor de respuesta a suero</i> .....	27
1.5.2 <i>Activación y Regulación de SRF</i> .....	28
<b>1.6 El fragmento C-terminal de la toxina tetánica como alternativa terapéutica.....</b>	<b>31</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>37</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Objetivos Particulares .....</b>	<b>37</b>
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>38</b>
5.1 Cultivos primarios estriatales tratados con dopamina.....	38
5.2 Inmunocitoquímica por fluorescencia .....	38
5.1.4 Obtención y preparación de muestras para Western-blot .....	39
<b>5.2 Experimentos in vivo.....</b>	<b>40</b>
5.2.1 Sujetos de experimentación .....	41
5.2.2 Cirugía estereotáxica.....	41
5.2.3 Asimetría motora: Prueba del cilindro.....	41
5.2.4 Tratamiento Benzeracida/Levodopa.....	42
5.2.5 Análisis de Movimientos Involuntarios Anormales.....	42
5.2.6 Obtención y preparación de muestras para qRT-PCR .....	42
5.2.7 Diseño de primers .....	43
5.2.8 Evaluación de la concentración optima de primers – Ensayo de especificidad experimental .....	44
5.2.9 Análisis de curva de disociación de DNA.....	44
5.2.10 Ensayo de eficiencia y validación.....	45
5.2.11 Extracto nuclear y citoplásmico .....	46
5.2.12 Western-blot .....	47
5.2.13 Preparación del tejido para inmunohistoquímicas.....	47
5.2.14 Identificación de TH y FosB por inmunohistoquímica .....	47
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>6.1 Estudio de la expresión de FosB y <math>\Delta</math>FosB en un cultivo primario neuronal de estriado de rata tratados con dopamina.....</b>	<b>49</b>
<b>6.2 Estudio de la expresión del ARNm de FosB y <math>\Delta</math>FosB en estriado de ratas hemiparkinsonianas con tratamiento agudo y crónico de Levodopa .....</b>	<b>53</b>
6.2.1 La inyección unilateral de 6-OHDA en la vía nigroestriatal induce asimetría motora .....	53

6.2.2 La administración aguda de L-DOPA en ratas hemiparkinsonianas induce de forma transitoria el ARNm de FosB y $\Delta$ FosB.....	54
6.2.3 La administración sub-crónica de L-DOPA disminuye la transcripción del gen fosB en el estriado de ratas hemiparkinsonianas .....	55
6.2.4 La administración crónica de L-DOPA induce la transcripción del gen fosB en el estriado de ratas discinéticas.....	56
<b>6.3 Evaluación de la expresión de SRF en estriado después de un tratamiento agudo de Levodopa en ratas hemiparkinsonianas .....</b>	<b>60</b>
<b>6.4 Evaluación de la expresión de SRF en estriado después de un tratamiento crónico de Levodopa en ratas discinéticas .....</b>	<b>62</b>
<b>6.5 Pre-tratamiento con el fragmento Hc-TeTx en un modelo de discinesias en rata .....</b>	<b>65</b>
6.5.1 El fragmento Hc-TeTx no atenúa la asimetría motora en ratas con inyección unilateral de 6-OHDA en la vía nigroestriatal.....	65
6.5.2 El fragmento Hc-TeTx no atenúa la inducción de discinesias en ratas .....	66
6.5.3 El fragmento Hc-TeTx no previene la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc de ratas discinéticas.....	67
6.5.4 El fragmento Hc-TeTx disminuye la expresión de FosB/ $\Delta$ FosB en estriado de ratas discinéticas .....	68
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>71</b>
7.1 Experimentos <i>in-vitro</i> .....	71
7.2 Experimentos <i>in-vivo</i> .....	73
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>80</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>81</b>

## Índice de Figuras

<i>Figura 1. Esquema de las poblaciones neuronales dopaminérgicas.</i>	11
<i>Figura 2. Esquema de los ganglios basales.</i>	13
<i>Figura 3. Esquema de la organización topográfica de las proyecciones corticoestriatales de rata.</i>	15
<i>Figura 4. Señalización de los receptores dopaminérgicos.</i>	18
<i>Figura 5. Las isoformas del ARNm del gen fosB.</i>	25
<i>Figura 6. Estructura de los factores de transcripción FosB y <math>\Delta</math>FosB.</i>	26
<i>Figura 7. Vías de señalización que activan a SRF.</i>	29
<i>Figura 8. Estructura en 3D de la toxina tetánica.</i>	31
<i>Figura 9. Unión e internalización del fragmento Hc-TeTx en la placa neuromuscular.</i>	32
<i>Figura 10. Vías de señalización inducidas por el fragmento Hc-TeTx.</i>	34
<i>Figura 11. Curvas de disociación del producto amplificado.</i>	45
<i>Figura 12. Eficiencia y validación.</i>	46
<i>Figura 13. Cultivo primario neuronal de estriado de rata.</i>	49
<i>Figura 14. La dopamina no incrementa la expresión de FosB/FosB en un cultivo primario estriatal de forma temprana.</i>	50
<i>Figura 15. La dopamina no incrementa la expresión de FosB/FosB en un cultivo primario estriatal de forma tardía.</i>	52
<i>Figura 16. La inyección de la 6-OHDA en la vía nigroestriatal induce asimetría motora.</i>	53
<i>Figura 17. La administración aguda de Levodopa induce la expresión del ARNm de <math>\Delta</math>FosB y FosB.</i>	55
<i>Figura 18. La administración sub-crónica de Levodopa disminuye la expresión de <math>\Delta</math>FosB y FosB.</i>	56
<i>Figura 19. La administración crónica de Levodopa mantiene la expresión de <math>\Delta</math>FosB y FosB en ratas discinéticas.</i>	57
<i>Figura 20. Los niveles de ARNm de <math>\Delta</math>FosB se correlacionan con la severidad de las discinesias en ratas.</i>	59
<i>Figura 21. La inyección de la 6-OHDA en la vía nigroestriatal induce la asimetría motora y disminución de la TH en el estriado ipsilateral.</i>	60
<i>Figura 22. La denervación dopaminérgica en el estriado induce disminución en la expresión de SRF.</i>	62
<i>Figura 23. La inyección de la 6-OHDA en la vía nigroestriatal induce asimetría motora y disminución de la TH en el estriado ipsilateral.</i>	63
<i>Figura 24. La administración crónica de levodopa recupera los niveles de p-SRF en estriado de ratas discinéticas.</i>	64
<i>Figura 25. El pre-tratamiento con el fragmento Hc-TeTx no disminuye la asimetría motora inducida con la inyección de la 6-OHDA.</i>	66
<i>Figura 26. El pre-tratamiento con el fragmento Hc-TeTx no atenúa las discinesias en rata.</i>	67



*Figura 27. El pre-tratamiento con el fragmento Hc-TeTx no previene la muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc en ratas discinéticas. .... 69*

*Figura 28. El pre-tratamiento con el fragmento Hc-TeTx disminuye los núcleos positivos a FosB/DeltaFosB en el estriado de ratas discinéticas..... 70*

*Figura 29. Señalización postsináptica estriatal involucrada en el desarrollo de las discinesias. .... 79*

## ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
5,7-DHT	5,7-dihidroxitriptamina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AC5	Adenilato Ciclasa tipo V
Akt	Cinasa serina/treonina
ALDH1	Aldehido deshidrogenasa
AMPA	alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
APMc	Adenosin monofosfato cíclico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CAMKII	Proteína cinasa II dependiente de $Ca^{2+}$ y calmodulina
CR	Calretinina
CRE	Elemento de respuesta a CREB
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a CRE
DA	Dopamina
DAB	Diaminobenzidina
DAG	Diacilglicerol
DARPP-32	Fosfoproteína de 32 kDa regulada por DA y AMPc
DAT	Transportador de dopamina
DDC	Dopamina descarboxilasa
DIV	Días <i>in vitro</i>
DOPAC	3,4-Dihidroxifenilacético
EP	Enfermedad de Parkinson
ERK ½	Cinasas reguladas por señales externas
FTs	Factores de transcripción
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GB	Ganglios basales
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GPe	Porción externa del Globo pálido
GPi	Porción interna del Globo Pálido
GSK3-β	

H3	Histona 3
Hc-TeTx	Región C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica
IEGs	Genes de expresión rápida
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
KRE	Elemento de respuesta a krox
Levodopa	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPS	Lipopolisacarido
LTD	Depresión sináptica a largo plazo
LTP	Potenciación sináptica a largo plazo
MAPK	Cinasas activadas por mitogénos
MIAs	Movimientos Involuntarios Anormales
MPP <sup>+</sup>	1-metil-4-fenilperidino
MRTF	Factor de transcripción relacionado con miocardina
MSK-1	Proteína cinasa-1 activada por mitogénos y estrés
NEMs	Neuronas espinosas medianas
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Sintasa del Oxido Nitrico
NPY	Neuropeptido Y
PB	Buffer de fosfatos
PC12	Línea celular de feocromocitoma-12
PI-3K	Cinasa 3-fosfatidilinositol
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C.
PLC	Fosfolipasa C
PP1	Proteína fosfatasa-1
PV	Parvalbumina
RD1	Receptores dopaminérgicos de tipo D1
RD2	Receptores dopaminérgicos de tipo D2
RRF	Área retrorubral



SNc	Sustancia Nigra Pars compacta
SNr	Sustancia Nigra pars reticular
SOM	Somatostatina
SRE	Elemento de Respuesta a Suero
SRF	Factor de respuesta a suero
STN	Núcleo subtalamico
TCF	Ternary complex factor
TH	Tirosina Hidroxilasa
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
Trk	Receptores tirosina-cinasa
VMAT	Transportador vesicular-2 de monoaminas
VTA	Área ventral tegmental

## RESUMEN

El principal reto en el manejo de la terapéutica de la enfermedad de Parkinson son el estudio de los movimientos involuntarios anormales o discinesias generadas por el tratamiento crónico con levodopa, el fármaco ortodoxo antiparkinsoniano. En el presente proyecto se evaluó la expresión del gen *fosB* en cultivos estriatales y en un modelo de discinesias en rata inducido por un tratamiento crónico con levodopa. Los resultados de los experimentos *in vitro* revelan que es posible inducir a FosB y  $\Delta$ FosB en un cultivo neuronal de estriado de rata con dopamina, como se estaría expresando *in vivo* por la dopamina que se obtiene a partir de la levodopa exógena. El estudio de la proteína  $\Delta$ FosB en relación a las discinesias ha sido muy amplio, sin embargo en el presente proyecto mostramos los cambios a nivel del ARNm de ambas isoformas  $\Delta$ FosB y FosB en el estriado de ratas hemiparkinsonianas que recibieron un tratamiento agudo, sub-crónico y crónico de levodopa y a tres diferentes tiempos después de la última administración de levodopa. Los resultados indican que la primera y única dosis de levodopa induce altos niveles de ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB a los 60 minutos en el estriado denervado de rata, mientras que a las 3 horas se detectaron niveles menores de ARNm y a las 24 h los niveles de ambas isoformas regresaron a los niveles basales como los grupos controles. Este mismo patrón de expresión del ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB se observó después de un tratamiento sub-crónico y crónico aunque el pico máximo de ARNm de  $\Delta$ FosB es menor con respecto al tratamiento agudo. Estos datos apoyan la idea de que la proteína  $\Delta$ FosB se acumula en el estriado después de un tratamiento crónico, por que posee una estabilidad inusual, más que por una estabilidad del ARNm. Además se mostró una expresión diferencial del ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB en el estriado, durante el curso temporal de la administración de levodopa hasta que se desarrollan las discinesias en un tratamiento crónico, y se mostró que existe una correlación positiva con la severidad de las discinesias en las ratas y los niveles del ARNm de  $\Delta$ FosB. En la región promotora del gen *fosB*, se localiza un elemento de respuesta a suero y podría regular la actividad del gen *fosB*, al evaluar la expresión del factor de respuesta a suero (SRF) se encontró que la propia denervación dopaminérgica afecta de forma temporal a SRF, sin embargo mostramos que la administración crónica de levodopa restablece la actividad de SRF la cual podría favorecer la expresión de  $\Delta$ FosB en el estriado, aunque aún no se conoce el mecanismo. Como hemos determinado en los anteriores experimentos, los cambios moleculares inician desde la primera administración de levodopa condicionados por la denervación dopaminérgica, por lo que se evaluó el efecto del fragmento Hc-TeTx administrado previo a la lesión dopaminérgica y al tratamiento crónico con levodopa en un modelo de discinesias. Los resultados indican que este fragmento no es capaz de prevenir la muerte de neuronas dopaminérgicas como se revela por la pérdida de las neuronas positivas a TH en la SNC, esto se correlaciona a nivel conductual al observar que las ratas no mejora la ejecución en la prueba del cilindro y no se observa una disminución en la conducta de giro. Por lo tanto al evaluar las discinesias no hubo una mejoría significativa, aunque la expresión de  $\Delta$ FosB disminuye significativamente en el estriado dorsal, considerado este un marcador discinetogénico. Por lo que es necesario más estudios para dilucidar la participación de la ruta de señalización que activa el Hc-TeTx en un modelo de discinesias.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Sistema nigroestriatal

En roedores se han estimado 20.000 neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio y cerca de un millón en el cerebro humano, esto representa una fracción muy pequeña del total de células que conforman el sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, las neuronas dopaminérgicas poseen un árbol axonal tan grande que alcanza a inervar ampliamente áreas subcorticales y corticales (Fig. 1).

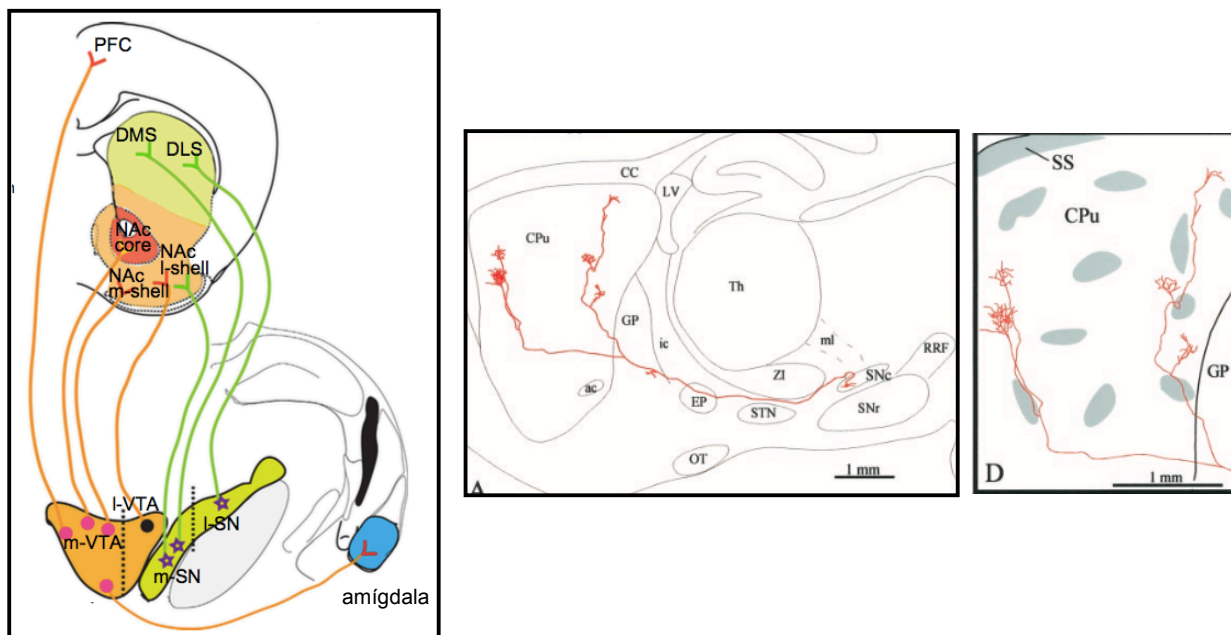
La apropiada delineación de neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio se inició inmediatamente después del descubrimiento de la dopamina (DA) como un genuino neurotransmisor. Los estudios inmunohistoquímicos realizados inicialmente por Fuxe y cols. en 1960, para las enzimas de síntesis de la DA, como la enzima tirosina hidroxilasa (TH), la enzima L-DOPA descarboxilasa (DDC), la proteína para el almacenamiento vesicular (transportador vesicular-2 de monoaminas, VMAT2) y la proteína de recaptura (transportador de DA, DAT), revelaron poblaciones de neuronas dopaminérgicas en tres núcleos del cerebro medio, la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc, A9), el área ventral tegmental (VTA, A10) y el área retrorubral (RRF, A8) (Fuxe et al., 2010).

La mayoría de lo que se sabe al respecto de la conectividad de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio se deriva de diferentes estudios anatómicos con trazadores (Fu et al., 2012, Yetnikoff et al., 2014) los cuales han delimitado tres principales sistemas en roedores, nombrados mesoestriatal, mesolímbico y proyecciones mesocorticales en roedores (Fig. 1).

Se han dilucidado una serie de genes regulatorios que codifican para diferentes factores de transcripción (FTs) que participan en la diferenciación terminal de la población neuronal dopaminérgica (Blaess and Ang, 2015, Veenvliet and Smidt, 2014). PITX3 es un FT que se expresa en todas las neuronas dopaminérgicas pero es esencial únicamente en la región rostral lateral de la SNpc, PITX3 induce la expresión de la aldehído deshidrogenasa (ALDH1A1), la cual metaboliza 3,4-dihidroxifenilacetaldehído en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) un metabolito de la DA. Además genera ácido retinoico, el cual induce la expresión de genes neuronales dopaminérgicos como lo



que codifican para la TH y para el receptor D2 en la etapa tardía del desarrollo.



**Figura 1. Esquema de las poblaciones neuronales dopaminérgicas.**

A la izquierda se muestra un esquema sobre las proyecciones específicas-funcionales de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y VTA. Las neuronas dopaminérgicas de VTA medial (m-VTA, círculos rosas) proyectan hacia la corteza frontal, amígdala, el core y el shell medial del NAc. Las neuronas de la región lateral de VTA (l-VTA, círculo negro) y las neuronas de la SNpc medial (m-SN, estrellas violeta) proyectan al shell lateral del NAc y las neuronas de la SNpc lateral (l-SN) proyectan hacia el estriado dorsolateral (DLS) (Lammel et al., 2008). A la derecha se muestra un esquema de un corte en plano sagital de cerebro de rata y en rojo se muestra el dibujo de un solo axón de una neurona dopaminérgica de la capa dorsal de la SNc que proyecta hacia el estriado, como se muestra en la ampliación, obtenido a partir de la inyección de BDA en la SNpc dorsal (Prensa and Parent, 2001).

El FT PITX3 también induce la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la región dorsolateral de la SNpc y establece una particular dependencia de esta neurotrofina en la etapa adulta y durante el envejecimiento. Por otra parte, PITX3 además interacciona con un regulador maestro de las neuronas dopaminérgicas, NURR1 (Nr4a2), el cual es esencial para mantener un fenotipo dopaminérgico induciendo y manteniendo la expresión de TH, DAT (Slc6a3), y VMAT2 (Slc18a2).

Además de las neuronas dopaminérgicas positivas a ALDH1A1 en la SNpc rostralateral, la expresión de OTX2 durante la diferenciación tardía es crucial para establecer otro subtipo de neuronas dopaminérgicas. Además OTX2 reduce la expresión de DAT e incrementa la expresión de factores de guía axonal como

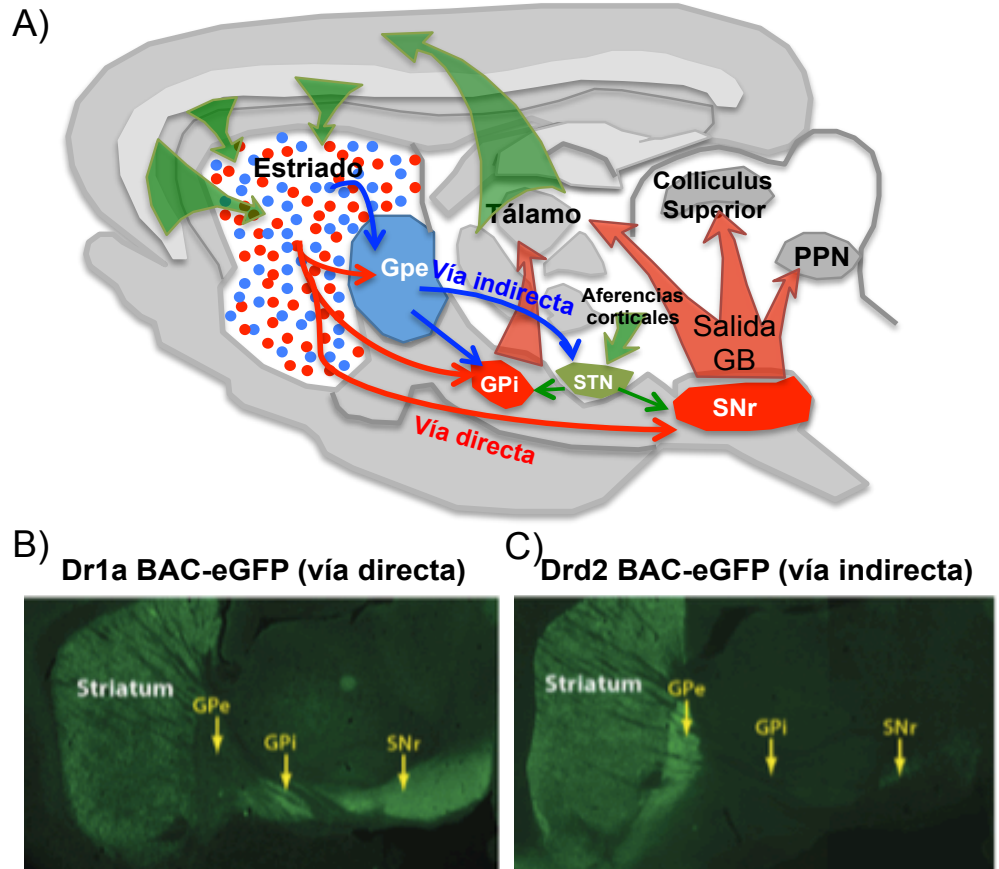
neuropilina 1/2 y slit2 (Lammel et al., 2008). Con estas características es muy probable que las neuronas dopaminérgicas mesocorticales en la región caudomedial de VTA se encuentren dentro de la subpoblación que expresen OTX-2. La segregación espacial entre estos dos tipos de neuronas dopaminérgicas positivas a ALDH1A1 y OTX2 es muy clara y respeta los límites entre la SNpc y VTA respectivamente. Sin embargo, poco se sabe sobre la ontogenia y segregación de RRF.

Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc inervan todos los núcleos de los ganglios basales (GB), aunque predominantemente al estriado, por lo que, la DA participa en la modulación de las señales de la corteza y el tálamo. Además la DA no solo es importante para la modulación de la selección de acciones o el aprendizaje de hábitos, también esta implicada en una serie de enfermedades como la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington, la esquizofrenia, la distonia, el desorden de déficit de atención, la hiperactividad y la depresión.

## **1.2 Organización neuroanatomica y funcional de los ganglios basales**

Los GB son un grupo de núcleos que están interconectados con la corteza cerebral, el tálamo y la medula espinal. Sus componentes son la neocorteza, el estriado (caudado y putamen en humanos), el *core* del núcleo *accumbens*, la porción externa del globo pálido (GPe), el núcleo subtalámico (STN), la porción interna del globo pálido (GPi), la sustancia nigra *pars reticular* (SNr) y la sustancia nigra *pars compacta* (SNpc) (Albin et al., 1989).

La principal entrada de información a este sistema viene de neuronas glutamatérgicas de la capa V de la mayoría de las áreas de la neocorteza. La salida de información es a través de las neuronas GABAérgicas del GPi y la SNr que envían sus proyecciones en primer lugar al tálamo, el cual se conecta con áreas corticales implicadas en la planeación y ejecución del movimiento, en segundo lugar al *colliculus* superior el cual regula los movimientos de la cabeza y los ojos, y en tercer lugar envían sus proyecciones al núcleo *pedunculopontine* el cual esta involucrado en la orientación de los movimientos corporales (Fig. 2). Entre las aferencias corticales y las eferencias GABAérgicas se encuentra el circuito neuroanatómico que comprende el prototipo de los GB.



**Figura 2. Esquema de los ganglios basales.**

En A, se muestra un esquema de un corte sagital de cerebro de ratona, donde se esquematiza el circuito de los ganglios basales (GB), el estriado recibe aferencias excitatorias corticales y talámicas. Las salidas de información de los GB son a través de las neuronas del GPI y la SNr, las cuales envían sus proyecciones hacia el tálamo, el colliculus superior y el núcleo pedunculopontino (PPN). Del estriado emergen dos vías neuronales hacia el GPI y la SNr. La vía directa está formada por neuronas espinosas medianas que expresan al receptor dopaminérgico D1 (NEMs-D1), que proyectan directamente hacia el núcleo de salida (GPI y SNr). La vía indirecta formada por NEMs-D2 proyecta al GPe, el cual junto con el STN conecta a los núcleos de salida de los GB. En B, se muestra una imagen de un corte sagital de cerebro de ratón que expresa a la proteína GFP bajo la regulación del promotor del receptor Drd1a, por lo que evidencia a NEMs-D1 que proyectan sus axones hasta GPI/SNr. En C, se muestra una imagen de un corte sagital de cerebro de ratón Drd2-eGFP y se evidencia en verde a las NEMs-D2 y envían sus proyecciones al GPe. Tomado y modificado de Gerfen y Surmeier, 2011.

El estriado es la principal estructura de entrada dentro del circuito de los GB y el 95%-97% de las células que lo conforman son neuronas de proyección espinosas medianas (NEMs) de naturaleza GABAérgica, mientras que del 3%-5% de la población neuronal corresponde a interneuronas. Se han identificado diferentes tipos de interneuronas en el estriado, las de naturaleza colinérgica y varios subtipos de

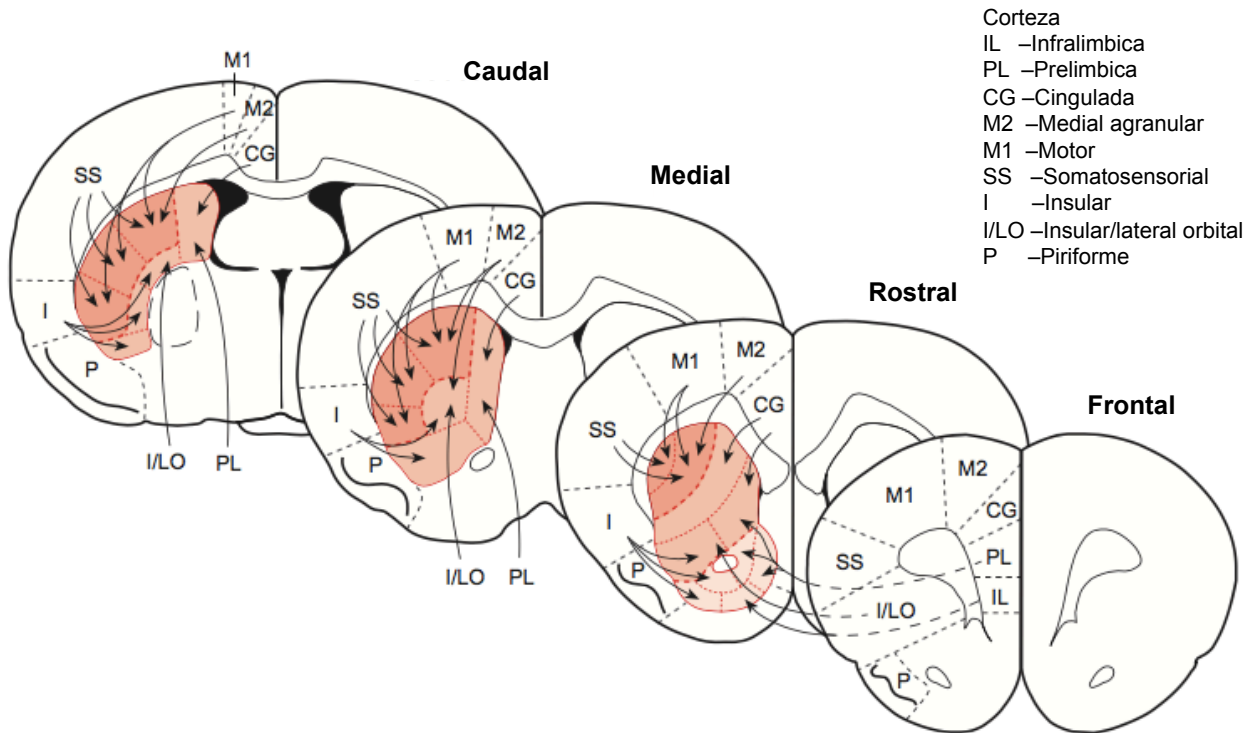


naturaleza GABAérgica que son identificadas por la expresión diferencial de proteínas de unión a calcio, la parvalbumina (PV) o la calretinina (CR), la expresión de neuropeptidos como la somatostatina (SOM), el neuropeptido Y (NPY) o la sintasa del oxido nítrico (NOS) (Kubota and Kawaguchi, 1993, Tepper et al., 2010) .

Las NEMs están divididas en dos sub-poblaciones de aproximadamente igual número y que forman las vías de proyección hacia los núcleos de salida de los GB en el GPi y SNr. Un subtipo extiende sus axones colaterales menores en el GPe y principales colaterales hacia el GPi y SNr. Este subtipo es referido como neuronas de la vía directa (d-NEMs) ya que proveen una innervación directa a los núcleos de salida de los GB. El segundo subtipo neuronal provee un axón que se extiende en el GPe, por lo que determina la vía indirecta (i-NEMs) hacia los núcleos de salida de los GB a través del GPe y STN (Fig. 2B, 2C).

Las vías d-NEMs e i-NEMs expresan a los subtipos de receptores dopaminérgicos D1 y D2 respectivamente, por lo que el ARNm para el receptor D1 está localizado selectivamente en neuronas que proyectan a la SNr y es co-localizado con la sustancia P y la dinorfina. En contraste el ARNm para el receptor D2 esta localizado selectivamente en neuronas que proyectan al GPe y es co-localizado con encefalina.

La actividad del estriado está determinada por las aferencias excitatorias de la corteza y el tálamo, las neuronas corticoestriatales son piramidales de la capa III y V del área cortical primaria y áreas sensitivas como la motora, premotora y prefrontal, así como áreas corticales límbicas. Se ha establecido que las conexiones corticoestriatales están organizadas de una manera topográfica (Ebrahimi et al., 1992, Brown et al., 1998), este patrón de organización topográfica de las proyecciones provenientes de la corteza se forjó en el concepto de regiones funcionales en el estriado. La región dorsal del estriado recibe aferencias de la corteza premotora y motora por lo que esta región es clasificada como “*motora*”, mientras que las regiones ventrales reciben aferencias del área cortical límbica y es nombrada como “*límbica*” (Fig. 3).



**Figura 3. Esquema de la organización topográfica de las proyecciones corticoestriatales de rata.**

Se muestran cuatro esquemas de cortes coronales de cerebro de rata, frontal (+2.7 mm con respecto a bregma), rostral (+1.6), medial (+0.4) y caudal (-0.8), las flechas indican las aferencias de las distintas regiones de la corteza hacia el estriado en la región motora, asociativa o límbica sobre el núcleo *accumbens* que están denotadas por la degradación del color respectivamente. Tomado y modificado de (Yano and Steiner, 2005a, Yano and Steiner, 2005b).

El modelo predominante de la función de los GB propone que la actividad en la vía directa e indirecta tienen efectos opuestos sobre la conducta motora. Los hallazgos de la segregación de los receptores D1 y D2 en las vías d-NEMs e i-NEMs respectivamente provee las bases celulares y moleculares para la regulación diferencial de las dos vías (Gerfen et al., 1990).

Recientemente se ha usado a la optogenética como una herramienta para la activación directa de poblaciones específicas de neuronas y un análisis de sus efectos sobre la conducta. La aplicación de esta técnica en un modelo de Parkinson demuestra que la selectiva activación de la vía indirecta resulta en la inhibición de la conducta motora, mientras que la selectiva activación de la vía directa incrementa la actividad motora (Kravitz et al., 2010). Sin embargo, en estudios donde examinan la participación de la actividad de estas vías en animales normales sugieren una relación más compleja entre estas rutas y la generación de la conducta motora.

Se propone que la actividad de la vía directa e indirecta esta coordinada para seleccionar un programa motor en particular y para inhibir los demás programas motores (Mink, 2003). Este modelo predice que durante el desarrollo de una conducta motora se incrementará la actividad neuronal tanto de la vía directa y de la indirecta, más que una u otra. La ejecución de una secuencia de movimientos debería generar un patrón complejo de actividad en específicos ensamblajes neuronales.

Ha sido demostrado que hay una simultánea activación de la vía directa e indirecta durante la iniciación de acciones (Cui et al., 2013). El actual modelo propone que el estriado realiza una selección sobre la información sensitivomotora, cognitiva y emocional enviada por la corteza y probablemente del tálamo para facilitar la selección de una apropiada acción dentro de una gama de posibilidades (Balleine et al., 2007, Cisek and Kalaska, 2010, Nambu, 2008), por lo que distintas conexiones cortico-ganglios basales están propuestas para realizar diferentes aspectos de la selección.

Además diferentes conexiones cortico-ganglios basales podrían tener diferentes papeles en la adquisición y estabilización de la selección de una acción dependiendo del contexto. La conexión entre el estriado dorsomedial y la corteza asociativa participa en las fases tempranas de la adquisición de la habilidad, mientras que entre el estriado dorsolateral y corteza sensorimotora esta más involucrada sobre las actividades que han sido ya establecidas y el programa de la acción es más autómata e inflexible (Yin et al., 2009).

### **1.3 Los receptores dopaminérgicos en los ganglios basales**

El estriado es la estructura de entrada primaria de los GB, sirviendo como un lugar de integración de información (Wall et al., 2013). La DA modula la conexión sináptica de las aferencias glutamatérgica y las NEMs en el estriado, la vía d-NEMs y la vía i-NEMs responden de forma contraria a la DA en virtud de su expresión diferencial de los receptores dopaminérgicos acoplados a proteína G (Gerfen and Surmeier, 2011). Las neuronas de la vía directa expresan a los receptores dopaminérgicos de tipo D1 (RD1), el cual a través de su activación promueve la potenciación sináptica a largo plazo (LTP) en la sinapsis glutamatérgica corticoestriatal. Mientras que las neuronas de la vía indirecta expresan a los receptores dopaminérgicos de tipo D2 (RD2) y tras su activación

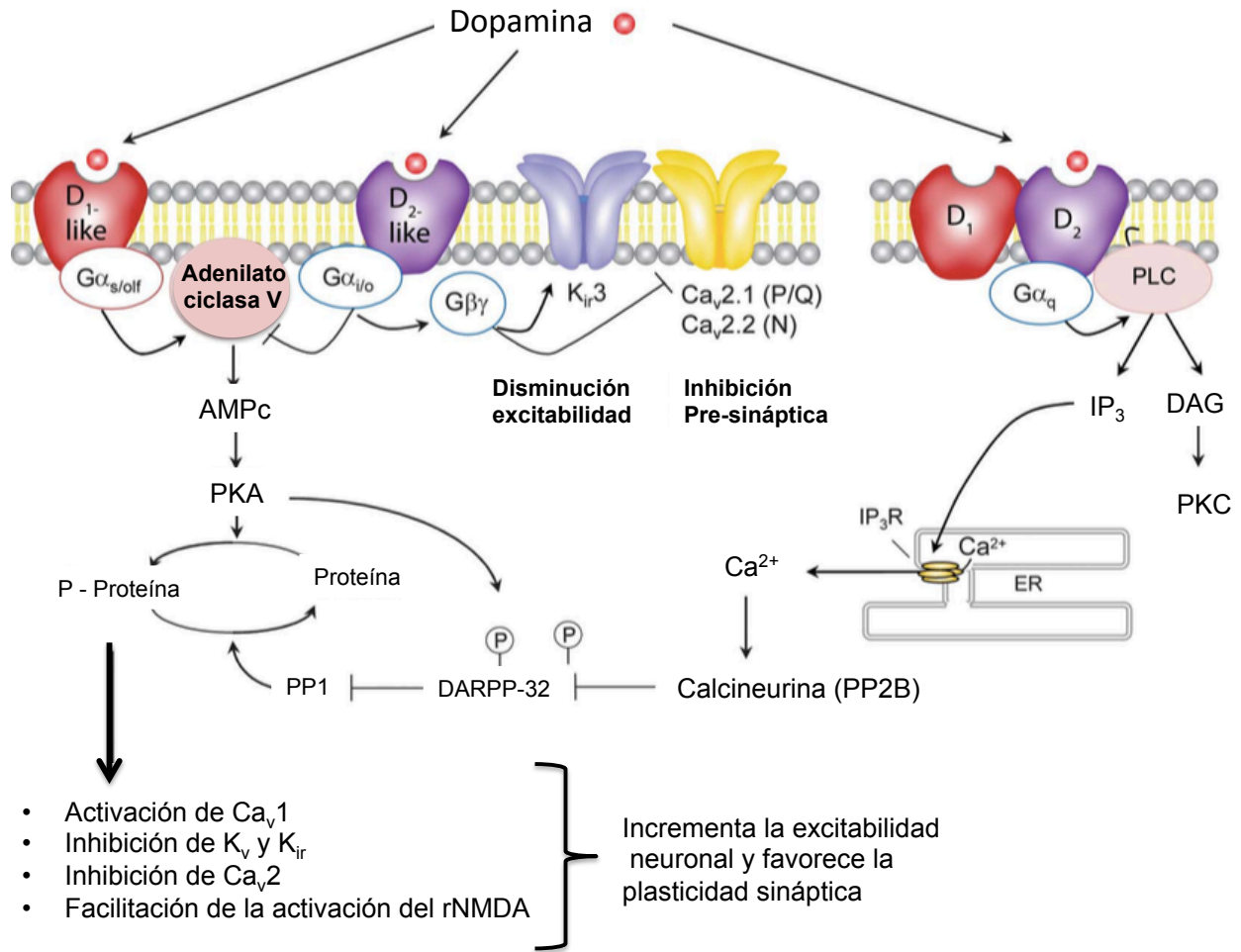
disminuye su excitabilidad intrínseca y promueve la depresión sináptica a largo plazo (LTD).

A través de la inhibición de las neuronas GABAérgicas en los núcleos de salida de los GB (sustancia nigra pars reticulata y segmento interno del globo pálido), la vía directa facilita la actividad tálamo-cortical y la selección de acciones. Mientras que la desinhibición de los núcleos de salida a través de la vía indirecta suprime la selección de acciones.

Las neuronas de la vía directa expresan altos niveles de los RD1s, estos receptores están acoplados a proteínas  $G_{s/olf}$ , y la subunidad  $\alpha_{olf}$  activa a la adenilato ciclasa tipo V (AC5) (Hervé et al., 1993). El incremento de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) permite la activación de la proteína cinasa A (PKA), la cual tiene una serie de blancos intracelulares que afectan la excitabilidad y señalización glutamatérgica (Fig. 4).

Diferentes estudios sugieren que la vía de señalización RD1/PKA tiene efectos directos sobre la función y movilización del receptor alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) y el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). La activación de PKA a través de la activación del D1R promueve la expresión en la superficie membranal de los receptores AMPA y NMDA a través de un proceso que es dependiente de la fosfoproteína de 32 kDa regulada por DA y AMPC (DARPP-32) (Svenningsson et al., 2004). El RD1 podría favorecer la expresión membranal de la subunidad GluN2B del receptor NMDA a través de la fosforilación por PKA en Ser<sup>1166</sup> sobre GluN2B (Murphy et al., 2014).

Los receptores D2 están expresados en altos niveles en las neuronas de la vía indirecta, estos receptores están acoplado a una proteína  $G_{i/o}$ , la cual media la inhibición de AC5 a través de la subunidad  $G_{\alpha i}$ , al mismo tiempo la liberación de las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  son capaces de reducir la apertura de los canales de calcio Cav2 y la activación de isoforma  $\beta$  de la fosfolipasa C, permitiendo la activación de la proteína cinasa C (PKC) mediado por diacilglicerol (DAG) y la movilización de calcio de los sitios de almacenamiento intracelulares a través de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) (Hernandez-Lopez et al., 2000) (Fig. 4).



**Figura 4. Señalización de los receptores dopaminérgicos.**

En el esquema se muestra la vía de señalización de los receptores D1 y D2 activados por DA, los cuales están diferencialmente acoplados a proteínas G $\alpha_{s/olf}$  y G $\alpha_{i/o}$  en las NEMs en el estriado, tras la activación de la PKA por AMPc se promueve la potenciación a largo plazo a través de la activación de DARPP-32 e inactivación de la fosfatasa-1 (PP1). Tomado y modificado de (Savica and Benarroch, 2014).

La activación de los RD2 disminuyen las corrientes de AMPA en NEMs (Cepeda et al., 1993, Hernández-Echeagaray et al., 2004), además la señalización de los RD2 permiten la defosforilación de la subunidad GluA1 en Ser<sup>845</sup>, lo cual favorece la movilización de los receptores AMPA fuera de la membrana sináptica (Håkansson et al., 2006).

Los estudios de los canales dependientes de voltaje son bastante consistente con la propuesta de que los receptores D2 actúan para reducir la excitabilidad de iNEMs y su respuesta a la señalización glutamatérgica que reciben. Los RD2 que median la movilización del Ca<sup>2+</sup>, permite la modulación negativa de los canales de Ca<sup>2+</sup> Ca 1.3 a

través de un mecanismo dependiente de calcineurina (Hernandez-Lopez et al., 2000, Olson et al., 2005). La activación de los receptores D2 además reducen la apertura de los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Surmeier and Kitai, 1993). Además los RD2 promueven la apertura de canales de K<sup>+</sup> (Kir3) en NEMs (Greif et al., 1995) (Fig. 4). Esta modulación coordinada de los canales iónicos provee un mecanismo por la cual la activación de los RD2 reducen la respuesta de la NEMs (Hernandez-Lopez et al., 2000).

#### **1.4 La enfermedad de Parkinson**

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo que afecta a neuronas de la SNc (Lang and Lozano, 1998a, Lang and Lozano, 1998b). La etiología de la EP es multifactorial, la mayoría de los casos están clasificados como de tipo esporádicos y menor al 5% son de carácter genético.

La pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas induce una desregulación dopaminérgica en la actividad fisiológica de los ganglios basales y una subsecuente alteración en el fino balance de la actividad de los núcleos de salida, los cuales son esenciales para la regulación normal de la función motora. Esto resulta en la aparición de los síntomas motores como el temblor en reposo, bradicinesia, rigidez y pérdida de la postura (Lang and Lozano, 1998a, Lang and Lozano, 1998b). En el modelo clásico, la falta de DA induce a una hipoactividad en la d-NEMs e hiperactividad en i-NEMs, lo cual resulta en la desinhibición de los núcleos de salida de los ganglios basales y la inhibición del movimiento (Albin et al., 1989, Alexander et al., 1986).

Diferentes estudios usando modelos animales o pacientes han puntualizado que hay más de un factor que contribuye al desarrollo y progresión de la enfermedad, como el estrés oxidativo, el mal plegamiento de proteínas y la inflamación, los cuales se han reconocido como importantes características que podrían contribuir al proceso neurodegenerativo (Hirsch and Hunot, 2009, Sanders and Greenamyre, 2013, Xilouri et al., 2013).

### **1.4.1 Terapéutica de la enfermedad de Parkinson**

El descubrimiento que la deficiencia de DA era la causa central de la aparición de los síntomas motores en la EP, resultó en la subsecuente introducción de la terapia de reemplazo con el precursor de DA, la L-3,4-dihidroxifenil-L-alanina (Levodopa) (Birkmayer and Hornykiewicz, 1961, Hornykiewicz, 2015). Inicialmente este fármaco revolucionó el tratamiento de este desorden neurodegenerativo, desafortunadamente en la mayoría de los pacientes (90%), el tratamiento con Levodopa se complica dentro de los primeros 5 años, por la aparición de fluctuaciones motoras y movimientos involuntarios anormales (MIAs), denominados discinesias (Calabresi et al., 2010).

Los factores de riesgo para desarrollar discinesias se han identificado a través de diferentes estudios epidemiológicos y clínicos, los cuales son, la severidad de la EP y su duración, las dosis iniciales altas y acumulativas de Levodopa y el desarrollo de EP a temprana edad (Manson et al., 2012). Estos mismos factores se han demostrado en todos los modelos animales en los que se han desarrollado el modelo de discinesias (Cenci, 2014).

Se ha descrito también que después del tratamiento crónico con Levodopa, el desarrollo de discinesias puede estar asociado con una alteración de la forma fisiológica de plasticidad sináptica en la sinapsis corticoestriatal y en particular en la pérdida de la depresión sináptica (Calabresi et al., 2008, Picconi et al., 2003). En el modelo de 6-OHDA la LTP se pierde, sin embargo esta puede ser restablecida por el tratamiento crónico con Levodopa (Picconi et al., 2003).

Actualmente la mayoría de las investigaciones enfocadas en las discinesias se basan en dos preguntas centrales: ¿A través de qué mecanismos la denervación dopaminérgica predispone al desarrollo de las discinesias y cuáles son los mecanismos moleculares por los que la Levodopa causa discinesias?.

### **1.4.2 Discinesias: Mecanismos presinápticos**

La mayoría de los modelos de discinesias en roedores ya sean ratas o ratones utilizan la lesión unilateral con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en la vía nigro-estriatal. Los animales son tratados diariamente con Levodopa durante 15 días para inducir movimientos con características hiperkinéticas y distónicas, que afectan la extremidad contralateral a la lesión, el dorso y la musculatura orofacial, por lo que ha sido validado como un modelo de discinesias (Winkler et al., 2002, Lundblad et al., 2002).

En el cerebro intacto, en las terminales dopaminérgicas se convierte la Levodopa en DA, es almacenada en vesículas sinápticas y liberada cuando es necesario. Además, la DA tiene auto-receptores y el DAT en la membrana presináptica, lo que hace que las concentraciones de DA extracelulares se mantengan siempre en un rango fisiológico. Sin embargo, cuando hay denervación dopaminérgica y se administra Levodopa, no hay regulación de la liberación de DA ni su metabolismo, predisponiendo esta denervación a grandes fluctuaciones en los niveles de DA en el estriado. Este concepto fue desarrollado en los años 90's basándose en los resultados de microdiálisis realizado en ratas lesionadas con 6-OHDA; donde se observó una disminución de DA en el estriado de animales lesionados, mientras que se encontró un incremento de DA de forma anormal después de la administración de levodopa (Abercrombie et al., 1990). Además, en estudios recientes se ha demostrado mediante microdiálisis en estriado de ratas discinéticas, mayores niveles de DA en comparación con ratas no-discinéticas (Lindgren et al., 2010, Meissner et al., 2006).

La Levodopa es internalizada y metabolizada a DA por células no dopaminérgicas, como los astrocitos y las neuronas serotoninérgicas ya que pueden captar a la Levodopa a través del transportador de aminoácidos aromáticos, contienen a la enzima DDC y también expresan el VMAT2, el cual permite el almacenamiento de DA en vesículas para su protección de la degradación citosólica.

A través de diferentes estudios se ha mostrado que las neuronas serotoninérgicas son el principal recurso de liberación de DA en el estriado de animales lesionados y tratados con Levodopa (Navailles et al., 2010, Tanaka et al., 1999), por lo que este fenómeno podría ser parte crucial en el desarrollo de las discinesias. Tal es el caso que en ratas lesionadas con 6-OHDA que son sometidas a una lesión adicional para dañar a neuronas serotoninérgicas usando la neurotoxina 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT) no



desarrollan discinesias por el tratamiento crónico con Levodopa (Carta et al., 2007). Además los agonistas de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> disminuyen la liberación de serotonina (5-HT) y se observa un efecto antidiscinético en modelos animales de discinesias (Bishop et al., 2006, Carta et al., 2007, Iderberg et al., 2015).

A pesar de que se le ha dado una gran importancia a los mecanismos presinápticos, se debe enfatizar que los agonistas de los receptores dopaminérgicos pueden inducir movimientos discinéticos en animales con una severa denervación dopaminérgica (Blanchet et al., 2004, Delfino et al., 2007, Lindgren et al., 2009) y en pacientes con EP (Rascol et al., 2001). Sin embargo, estos fármacos no requieren algún tipo de metabolismo o liberación por la maquinaria presináptica, por lo que se le ha asignado un papel crítico en el desarrollo de las discinesias a la respuesta postsináptica estriatal causada por el tratamiento con Levodopa.

#### **1.4.3 Discinesias: Mecanismos Postsinápticos**

La pérdida de DA en el estriado induce la sensibilización de los receptores dopaminérgicos, ya que con cada dosis de Levodopa se incrementa la estimulación de los RD1 y RD2, lo cual resulta en la sobreactivación e inhibición respectivamente, sobre la ruta de señalización dependiente de AMPc en las NEMs.

Sin embargo, aún no se ha dilucidado cual es la participación del receptor D2 (vía indirecta) sobre el desarrollo de las discinesias, a diferencia de la sobreactivación del RD1 que juega un papel crítico en el desarrollo de las discinesias, como se mostró en un estudio con ratones *knock-out* a RD1, estos no desarrollan discinesias mientras que en los ratones *knock-out* a RD2 desarrollan discinesias como la cepa silvestre de ratones con un tratamiento con Levodopa (Darmopil et al., 2009). Además el tratamiento con antagonistas de los RD1 inhiben el desarrollo de los MIAs en ratas (Westin et al., 2007). En un modelo de discinesias en primates no humanos la severidad de las discinesias correlacionan con cambios en la eficiencia de acoplamiento de la proteína G con el RD1, pero no con el RD2 (Aubert et al., 2005). Además en un estudio en ratones donde se hace un perfil de expresión de genes, se observó que en la vía directa existen cambios prominentes, mientras que en la vía indirecta existen cambios ligeros con respecto a la expresión de genes (Heiman et al., 2014).

La señalización río abajo después de la activación del RD1 por la administración de levodopa incrementa la fosforilación en DARPP-32 sobre el residuo de Thr<sup>34</sup> (Santini et al., 2007). Debido a que P-Thr<sup>34</sup>-DARPP-32 es un potente inhibidor de la proteína fosfatasa-1 (PP-1), es de esperarse que los niveles de fosforilación en diversas proteínas se encuentre incrementado en animales discinéticos, como algunas subunidades del receptor NMDA y AMPA (Dunah et al., 2004, Santini et al., 2007, Fieblinger et al., 2014), proteínas de la familia de las MAPKs cinasas (Santini et al., 2007, Westin et al., 2007) y del complejo mTOR (Santini et al., 2009, Santini et al., 2010).

La activación estriatal de las cinasas ERK 1 y 2 pertenecientes a la familia de las MAPKs (Segger and Krebs, 1995) parece actuar como un importante regulador para muchos cambios moleculares que se han asociado al desarrollo de las discinesias (Charbonnier-Beupel et al., 2015, Fasano et al., 2010).

En animales lesionados tanto el tratamiento agudo como el tratamiento crónico de Levodopa induce altos niveles de fosforilación en Thr<sup>202</sup> y Tyr<sup>204</sup> en ERK ½, en neuronas de proyección estriatal (Westin et al., 2007), aunque con el tratamiento agudo induce la fosforilación de ERK en todos los animales denervados, mientras que la respuesta al tratamiento crónico de Levodopa difiere significativamente entre los animales discinéticos y no discinéticos (Pavón et al., 2006, Santini et al., 2007, Westin et al., 2007). Por otro lado en un estudio en ratones se ha mostrado que la activación de ERK ½ disminuye en las NEMs e incrementa en las interneuronas colinérgicas después de un tratamiento crónico con Levodopa (Ding et al., 2011).

El papel causal de la señalización de ERK ½ en los MIAs ha sido demostrado en ratas, ratones y primates no humanos, a través del antagonismo farmacológico de la activación de las cinasas (Ding et al., 2011, Lindgren et al., 2009, Santini et al., 2007, Schuster et al., 2008) o la inactivación genética de la señalización Ras-ERK ½ (Fasano et al., 2010). Sin embargo los mecanismos por los cuales la activación de la señalización de ERK ½ persiste en el estriado y participa en el desarrollo de las discinesias, es aún poco entendida.

La función de ERK ½ es fosforilar para la regulación de diferentes proteínas blanco en la membrana plasmática, en el citosol y en el núcleo (Segger and Krebs, 1995, Sweatt,

2001). Estudios realizados en modelos animales se han enfocado en los componentes nucleares río abajo de la señalización de ERK  $\frac{1}{2}$ , y se ha determinado la activación de la cinasa para la histona 3 (H3), la proteína cinasa-1 activada por mitógenos y estrés (MSK-1), la cual es coregulada en neuronas estriatales de ratas discinéticas (Santini et al., 2007, Westin et al., 2007), lo cual induce una modificación de las histonas (Nicholas et al., 2008, Santini et al., 2007) modificándose la transcripción de genes (Nowak and Corces, 2000). Las ERK  $\frac{1}{2}$  regulan la activación de MSK-1 y contribuyen al desarrollo de las discinesias y al concomitante incremento en la expresión de  $\Delta$ FosB (Feyder et al., 2016).

### **1.5 El gen *fosB* y sus implicaciones en el desarrollo de las discinesias**

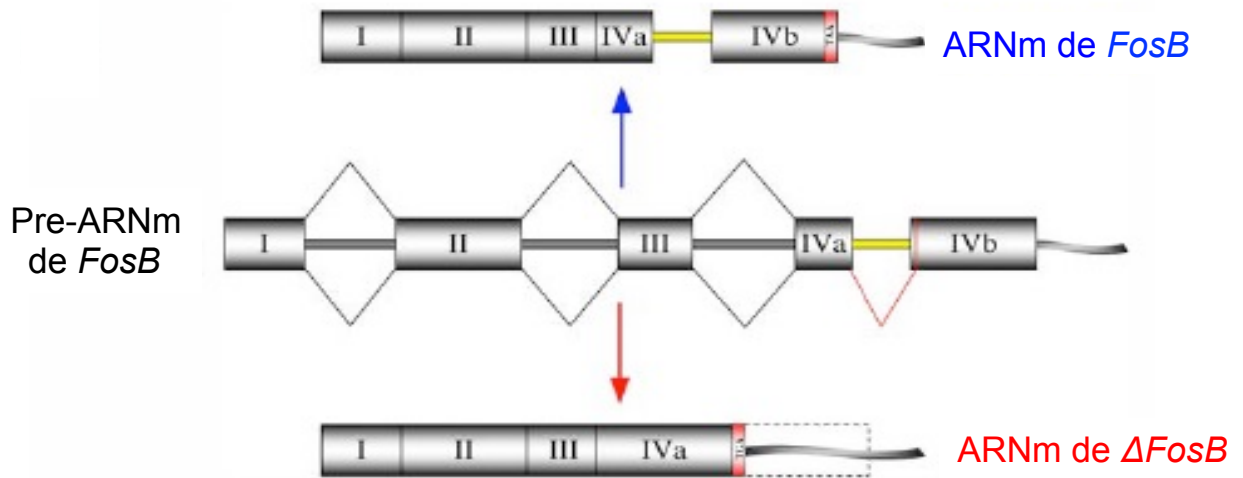
El gen *fosB* pertenece a la familia de los genes de expresión rápida (IEGs, *immediately early genes*). Estos genes responden de forma rápida y transitoria a un estímulo externo que podría ser de diferente índole y que a través de la señalización intracelular es capaz de modificar la actividad transcripcional.

El mapeo del gen *fosB* reveló que en la región promotora las primeras 500 bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *fosB* contiene elementos con secuencias consenso donde podrían unirse FT con motivos de unión al ADN. Contiene un elemento de respuesta a Krox (KRE), un sitio AP-1, un elemento de respuesta a suero (SRE), un elemento de respuesta a CREB (CRE), cuatro sitios de unión a Sp-1 y un sitio a NF-1 (Lazo et al., 1992).

A través de la delección en la región del CRE se observa una disminución en la estimulación de la expresión del gen *fosB*, esto indica que este elemento contribuye para la inducción del gen. Sin embargo la mayor disminución de la estimulación del gen se lleva a cabo cuando el SRE es eliminado, por lo que se sugiere que este elemento tiene una participación importante en la inducción de este gen. Además, aunque los sitios AP-1, Sp-1 y KRE permanezcan cuando se eliminan el CRE o el SRE, estos no son suficiente para inducir la expresión del gen *fosB* (Lazo et al., 1992).

La estructura genómica en la región codificante del gen *fosB* consiste en 4 exones y 3 intrones, que generan dos isoformas de ARNm maduros *FosB* y  $\Delta$ *FosB* a través de

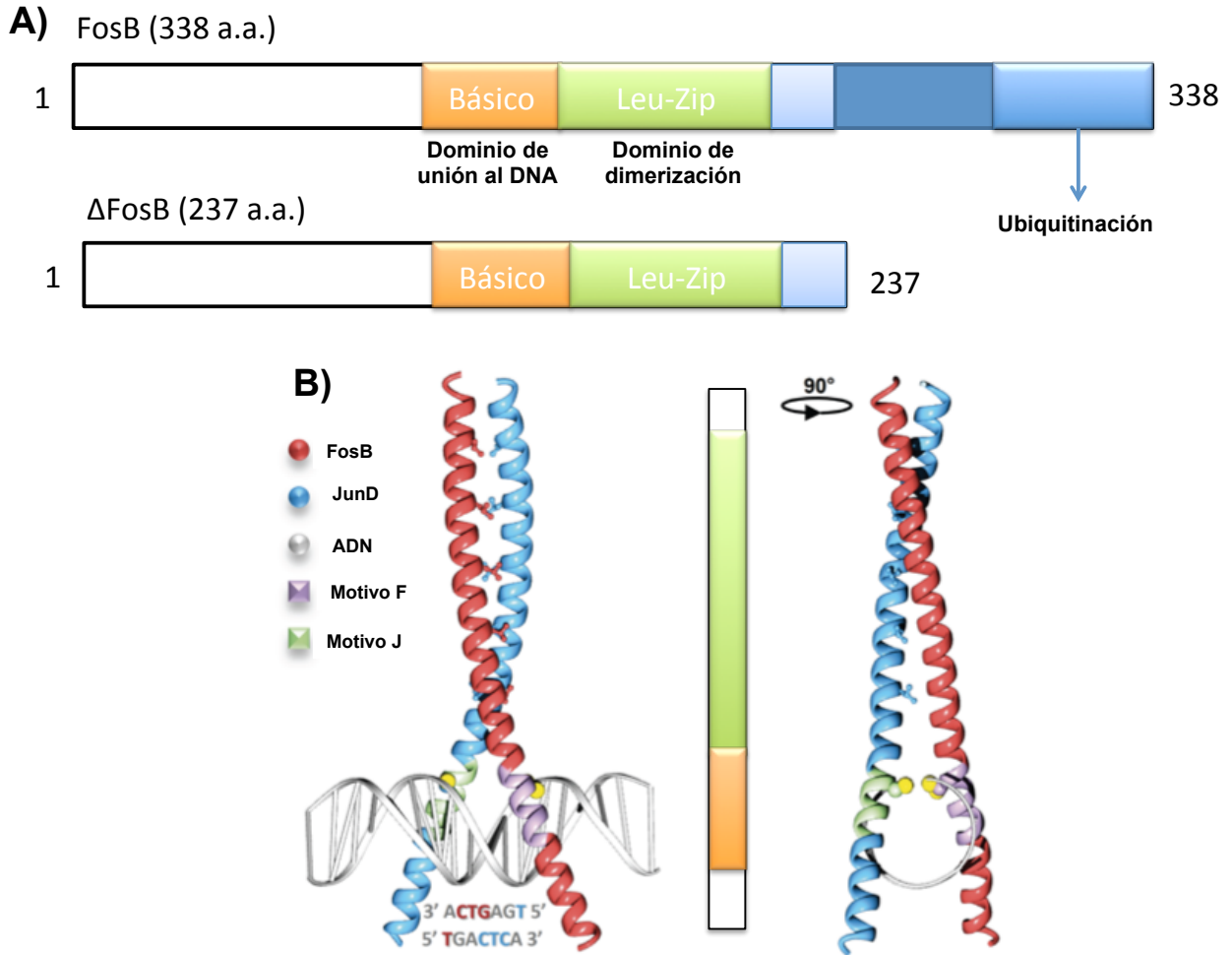
*alternative splicing* del gen *fosB* (Dobrazanski et al., 1991) (Fig. 5). Se producen las proteínas FosB y  $\Delta$ FosB, aunque se han identificado otras isoformas que se conocen como vFosB y  $\Delta 2\Delta$ FosB (Nomaru et al., 2014).



**Figura 5. Las isoformas del ARNm del gen *fosB*.**

El gen *fosB* codifica para dos isoformas FosB y  $\Delta$ FosB, las cuales son generadas a partir de un proceso de *splicing* alternativo del ARNm inmaduro. Este proceso es generado por el corte de la secuencia intrónica de 140 nucleótidos, que se encuentra en el marco de lectura abierto que codifica para la proteína completa (338 aa). Este evento de *splicing* genera una fragmentación de nucleótidos que crea un codón de paro (TGA) y se genera el ARNm de  $\Delta$ FosB, una isoforma más corta (237 aa) (Alibhai et al., 2007).

Las proteínas FosB y  $\Delta$ FosB son FTs que heterodimerizan con proteínas de la familia Jun (c-Jun, JunB o JunD), para formar el complejo proteína activadora-1 (AP-1), que se uniría a los sitios AP-1 (TGAC/GTCA) presentes en los promotores de genes blanco para regular su transcripción. La dimerización entre FosB y JunD ocurre a través del dominio que se le conoce como cremallera de Leucinas (Leu-Zipper) que está formada por una región donde se encuentra una Leucina cada siete aminoácidos (Leu-X6-Leu-X6-Leu-X6, X puede ser cualquier aa) y recientemente se ha mostrado que también podría participar en la dimerización un puente disulfuro a través de los residuos de cisteína (Yin et al., 2017) (Fig. 6).



**Figura 6. Estructura de los factores de transcripción FosB y  $\Delta$ FosB.**

En A se muestra una representación lineal de la estructura proteica de FosB (338 aa) y se representa el dominio de unión al DNA, el dominio de dimerización (*Leu-Zipper*) donde contiene Leucinas en ambas proteínas, mientras que  $\Delta$ FosB no contiene el dominio de ubiquitinación en la región C-terminal, a diferencia de la proteína FosB. En B se muestra una representación en 3D del complejo AP-1 formado por el heterodimero entre FosB y JunD y la interacción con el ADN, PDB: 5VPA. Tomado y modificado de (Yin et al., 2017).

La isoforma  $\Delta$ FosB posee una vida media más grande respecto a las otras proteínas de su familia (Ulery et al., 2006, Ulery and Nestler, 2007, Ulery-Reynolds et al., 2009, Carle et al., 2007). Su mayor tiempo de vida media produce su acumulación en diferentes regiones del cerebro ante estímulos crónicos, lo que sugiere que esta molécula podría ser mediadora de cambios a largo plazo o plasticidad sináptica.

Existen evidencias experimentales, tanto en roedores como en primates que el tratamiento crónico con L-DOPA induce cambios transcripcionales a largo plazo focalizando la atención en el gen de expresión temprana *fosB*, el cual codifica para los

factores de transcripción FosB y  $\Delta$ FosB (Cenci et al., 1998, Andersson et al., 1999, Valastro et al., 2007, Berton et al., 2009, Ebihara et al., 2011). Estas evidencias también han sido observadas en los núcleos caudado y putamen en cerebros *post-mortem* de pacientes con la EP que desarrollaron discinesias por un tratamiento crónico con L-DOPA (Tekumalla et al., 2001, Lindgren et al., 2011). Sin embargo, no se conoce la regulación transcripcional del ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB en el estriado denervado y un tratamiento con Levodopa y que factores de transcripción se encuentran modulando la actividad del gen *fosB* en las discinesias.

### **1.5.1 El factor de respuesta a suero**

En 1984, Greenberg en la Universidad de Harvard en Boston descubrió que la adición de suero a células quiescentes en cultivo podrían rápidamente estimular la transcripción del gen *c-fos* (Greenberg and Ziff, 1984). *c-fos* es un homólogo celular del gen transformante del osteosarcoma viral murino FBJ. Debido a la inmediata activación sin la síntesis de proteínas, *c-fos* fue clasificado como un IEG. Posteriormente se descubrió que además del suero, los factores de crecimiento y otros mitogénos podrían activar a *c-fos* (Rollins and Stiles, 1989). Posteriormente se logró explicar porque el suero puede activar a *c-fos*. Se identificaron diferentes elementos en la región promotora del gen *c-fos*, pero llamó la atención una secuencia corta localizada 300 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Treisman nombró esta secuencia como elemento de respuesta a suero (SRE) con la siguiente secuencia CCATATTAGG (Treisman, 1986). A la fecha, se han identificado cerca de 30 genes que contienen esta secuencia CC(A/T)<sub>6</sub>GG en su región promotora (Arsenian et al., 1998). Estos genes incluyen varios IEGs como *c-fos*, *fosB*, JunB, *egr-1*, *egr-2*; genes neuronales como *nurr77*, *nurr1*; genes del tejido muscular como  $\alpha$ -actina, la cadena pesada de  $\alpha$ -miosina, la cadena pesada de  $\beta$ -miosina, la cadena ligera de miosina, troponina, tropomiosina, y la ATPasa-Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplásmico. Debido a su secuencia, el SRE es referido también como *CArG box*. Treisman también identificó al factor de transcripción, la proteína que se une a este elemento para regular la expresión de genes fue nombrada factor de respuesta a suero (SRF).

En humanos, el gen *srf* está localizado en el cromosoma 6p21.1 y tiene 10607 pb. El ARNm está constituido de 4201 pb, con siete exones: exón 1 (1-871), exón 2 (872-1138), exón 3 (1139-1400), exón 4 (1401-1520), exón 5 (1521-1712), exón 6 (1713-1789), exón 7 (1790-4201). A través de *alternative splicing* se generan cuatro transcriptos, convencionalmente dos especies una de 4.5 kb y 2.5 kb. En ratón se ha reportado que las cuatro isoformas se pueden indentificar, dependiendo del tejido (Kemp and Metcalfe, 2000). La isoforma SRF-L contiene los siete exones, la isoforma SRF-M pierde el exón 5 y funciona como un represor de la transcripción dependiente de SRF (Belaguli et al., 1999). El SRF-S pierde el exón 5 y 4, fue identificado en la aorta. La isoforma SRF-I es la más corta, contiene únicamente los axones 1, 2, 6 y 7 y fue detectada únicamente en tejido embrionario.

La proteína SRF esta conformada por 508 aminoácidos y es visualizada como una banda de 67 kDa en un Western blot. Esta estructurado en tres dominios: 1) dominio de unión al ADN (SRE), 2) Dominio de trasactivación, 3) Región de diferentes sitios de fosforilación. El dominio de unión al DNA y dimerización se encuentra entre el aminoácido 133 y 222 (Norman et al., 1988). Este dominio de 90 aa es suficiente para la unión al DNA y dimerización e interacción con proteínas accesorias y ha sido designado como la *MADS box*.

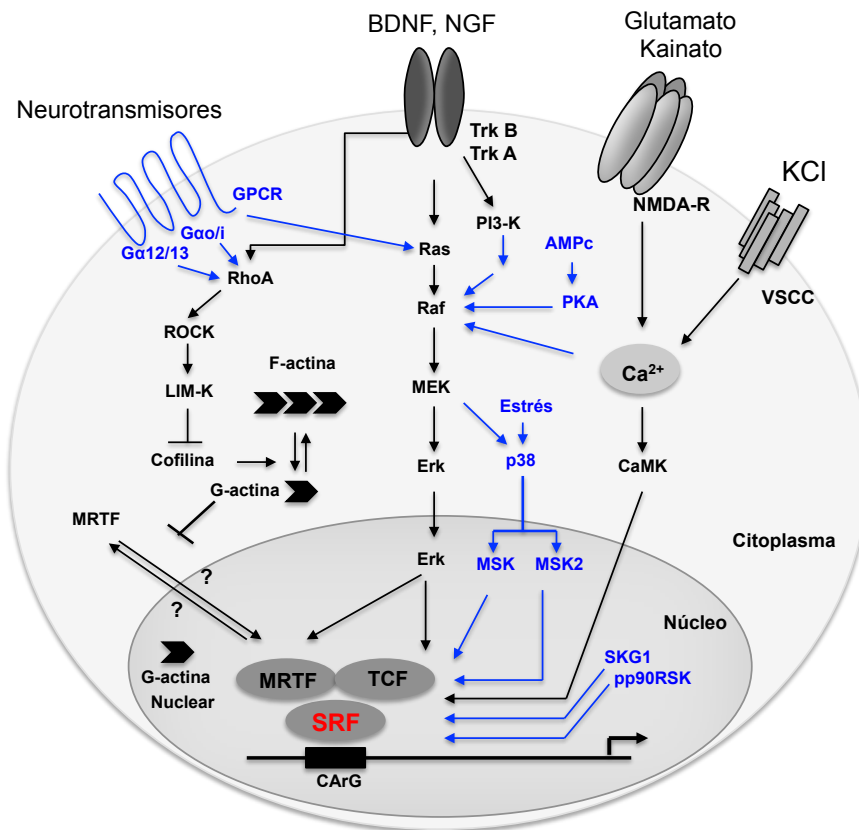
### **1.5.2 Activación y Regulación de SRF**

La transcripción dependiente de SRF ocurre a través de la interacción de por lo menos un co-activador un miembro del TCF (*ternary complex factor*) o algún miembro de la familia del factor de transcripción relacionado con miocardina (MRTF). La miocardina sirve como un poderos co-activador de SRF en genes específicos de tejido muscular liso y cardíaco, pero no es expresado en neuronas (Wang et al., 2001, Wang et al., 2003).

SRF puede ser activado por una serie de agentes, que incluye suero, ácido lisofosfatidico (LPA), anisomicina, mitógenos, lipopolisacarido (LPS), 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), citocinas, factor de necrosis tumoral -  $\alpha$ , y agentes que incrementan los niveles de calcio intracelular.

SRF está regulado por rutas de transducción de señales y por la interacción de otros factores de transcripción como Sp1, ATF6, GATA4, Nkx2.5 y mitógenos. La actividad de SRF se regula por diferentes mecanismos como a) la asociación con co-factores (Treisman, 1994), b) unión al ADN dependiente de fosforilación (Manak and Prywes, 1991), c) *Splicing alternative* de ARN (Belaguli et al., 1999).

Hay dos rutas importantes para la regulación de la actividad del SRE por SRF, la vía ras-raf-MAPK-ERK (Johansen and Prywes, 1994). Tanto la fosforilación de TFCs y la unión de TFCs a SRF se requieren para la activación de SRE para esta ruta. Una vía independiente de TCF involucra a proteínas de la familia Rho de GTPasas (Hill et al., 1995) y la vía de la MAPK cinasas. Como la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) que fosforila TFCs a través de la vía Ras-Raf-MEK1/MEK2 (Fig. 7).



**Figura 7. Vías de señalización que activan a SRF**

SRF es activado en neuronas por factores de crecimiento (BDNF, NGF activando a los receptores Trk) y por actividad neuronal mediada por glutamato o KCl. La propagación de la vía de señalización involucra MAPKs, la cinasa CaM y la cascada de señalización de Rho/actina. Estas cascadas resultan en la activación directa de SRF y/o activación de los cofactores MRTF o TCF. La señalización que se muestra en azul no se ha mostrado propiamente en neuronas. Tomado y modificado de (Knöll and Nordheim, 2009).



Para entender como ejerce SRF sus diversos efectos en las neuronas es importante saber bajo que circunstancias la transcripción dirigida por SRF se activa. Son varios los estímulos postsinápticos a los cuales SRF responde como la actividad sináptica inducida por glutamato (Johnson et al., 1997) o por kainato (Herdegen et al., 1997) a través de la activación de los receptores NMDA o por la activación de canales de calcio sensibles a voltaje (Misra et al., 1994). La propagación río abajo de la actividad sináptica involucra la estimulación de expresión de genes por  $Ca^{2+}$  intracelular, el cual activó a SRF (Morgan and Curran, 1986). El  $Ca^{2+}$  activa cinasas dependientes de  $Ca^{2+}$  y calmodulina lo cual resulta en una activación directa de SRF o indirecta a través de activación de cofactores como TCF o MRTF (Herdegen et al., 1997). Además de la actividad sináptica, los factores de crecimiento neuronales también estimulan la actividad de SRF (Wickramasinghe et al., 2008).

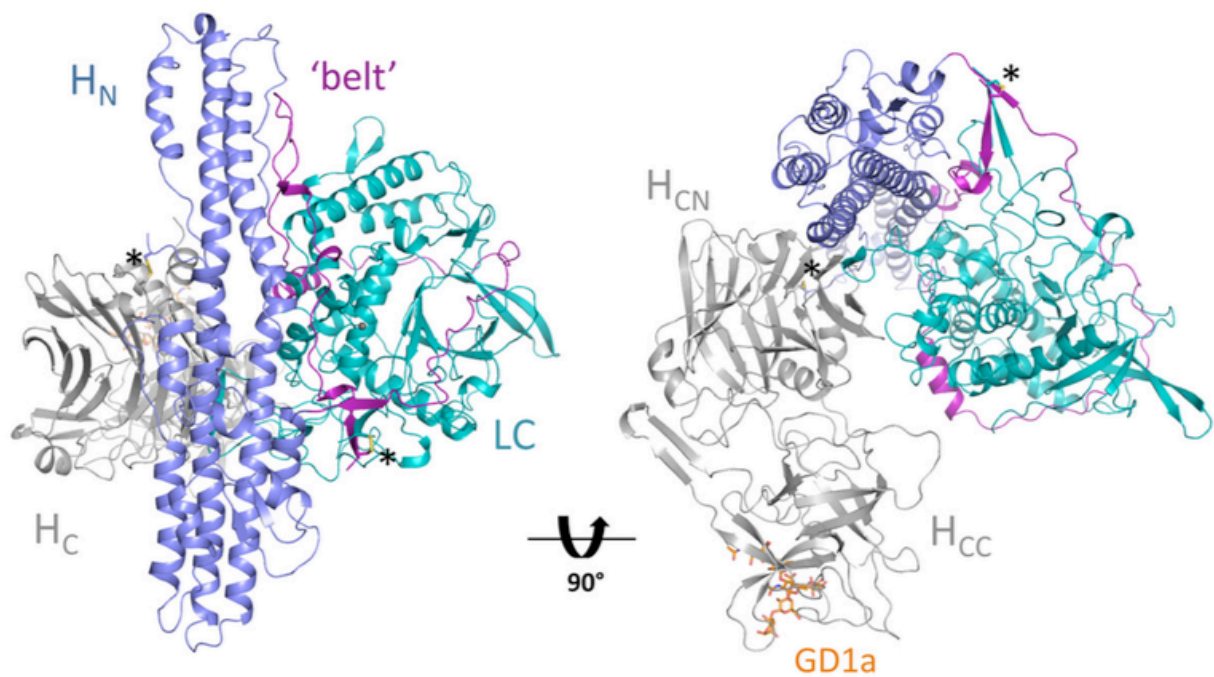
Los FTs como la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) y SRF se han nombrado como reguladores centrales de la respuesta por la activación de los IEG en neuronas. CREB representa una gran familia de los factores de transcripción ZIP, heterodimerizando en varias combinaciones (Lonze and Ginty, 2002). A diferencia de SRF actúa como un homodímero codificado en un sólo gen (Norman et al., 1988).

En la misma línea sobre el estudio de regulación del gen *fosB* y de prevenir el desarrollo de las discinesias, es importante puntualizar que los IEGs contienen un SRE y un CRE en su región promotora. De hecho el primer análisis *in-vivo* de SRE demostró una interdependencia funcional del factor de respuesta a suero (SRF) y sitios de unión a CREB en el promotor del gen *c-fos* (Robertson et al., 1995).

Sin embargo, se ha mostrado que al interrumpir la expresión de CREB, no disminuye la expresión de FosB/ $\Delta$ FosB y tampoco disminuyen las discinesias en roedores (Andersson et al., 2001). En este mismo sentido, se ha mostrado en procesos de adicción que SRF es necesario para la inducción de  $\Delta$ FosB en el *núcleo accumbens* (Vialou et al., 2012). Sin embargo, hasta el momento no se ha explorado si SRF participa en expresión del gen *fosB* en el estriado ya que de resultar así, SRF se convertiría en un blanco terapéutico para prevenir la sobre-expresión de las proteínas FosB/ $\Delta$ FosB en un tratamiento con L-DOPA.

## 1.6 El fragmento C-terminal de la toxina tetánica como alternativa terapéutica

Las toxinas clostridiales son sintetizadas por la bacteria como una única cadena polipéptica de 150 kDa, con tres dominios con diferentes papeles en el proceso de intoxicación: El dominio L (cadena ligera) sería el responsable del bloqueo de la exocitosis. El dominio H<sub>N</sub> (parte N-terminal de la cadena pesada, 50 kDa) controlaría la internalización y translocación al interior del citosol. Y el dominio H<sub>c</sub> (región C-terminal de la cadena pesada, 50 kDa, H<sub>c</sub>-TeTx) sería el responsable del reconocimiento específico de unión a la terminal nerviosa y la internalización en la vesícula endocítica (Fig. 8).

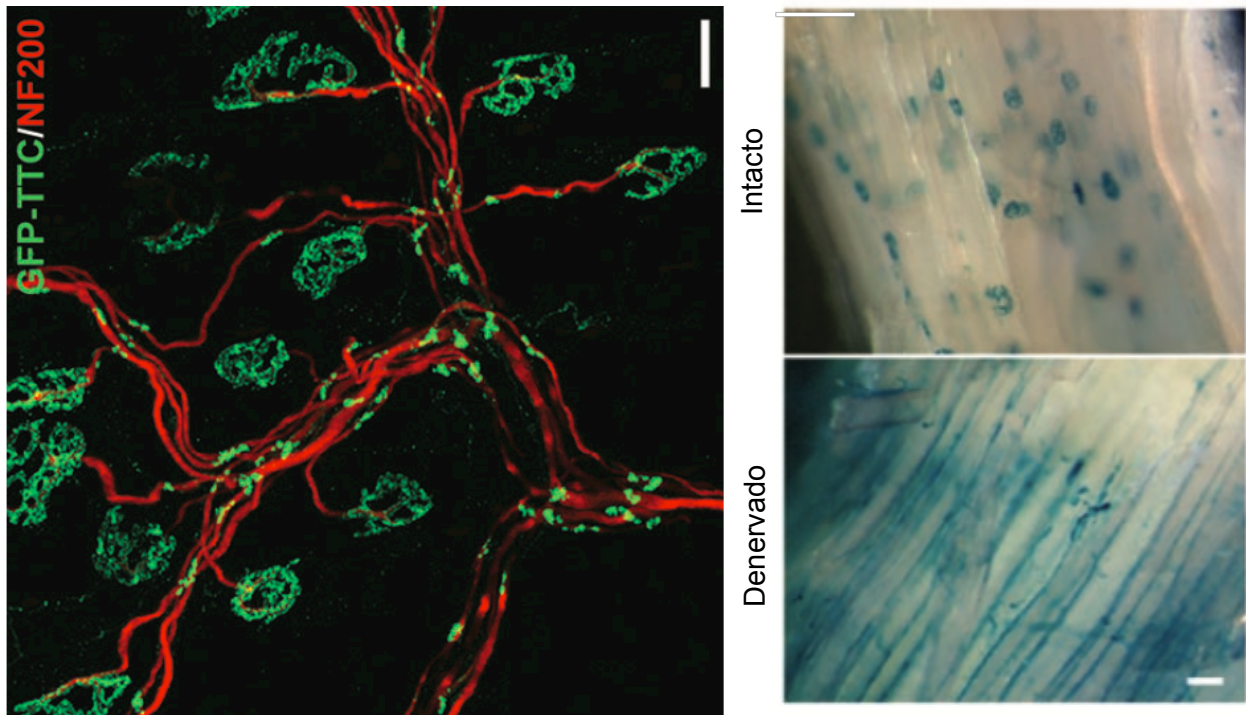


**Figura 8. Estructura en 3D de la toxina tetánica.**

Estructura cristalizada de la TeTx, en azul se muestra el dominio catalítico (L), el dominio de translocación en lila (H<sub>N</sub>) y el dominio de unión en gris (H<sub>C</sub>), en naranja se muestra el polisacárido GD1a que se une al dominio H<sub>C</sub> (Masuyer et al., 2017).

Se ha mostrado que el fragmento H<sub>c</sub>-TeTx recombinante mantiene la capacidad de unión e internalización en la terminal nerviosa de la placa (Fig. 9) (Roux et al., 2006, Miana-Mena et al., 2002) para emplear la maquinaria de transporte neuronal retrógrado y transitar a neuronas de orden superior, incluso usan la misma maquinaria en el

transporte axonal de las neurotrofinas y sus receptores, tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y su receptor TrkB y el  $p75^{NTR}$  (Deinhardt et al., 2006b, Deinhardt et al., 2006a), de tal forma que el Hc-TeTx se ha perfilado como una molécula con acción similares a los factores de crecimiento.



**Figura 9. Unión e internalización del fragmento Hc-TeTx (TTC) en la placa neuromuscular.**

A la izquierda se muestra una fotomicrografía del músculo *levator auris longus* (LAL) de un ratón al que se le administró GFP-TTC. Dos horas después de la inyección con GFP-TTC en la vecindad del músculo LAL, se marcó en rojo a los axones con un anticuerpo contra los neurofilamentos (NF200) y se observa como la GFP-TTC es concentrada en terminales nerviosas de la placa neuromuscular. Barra de escala 20  $\mu\text{m}$ . Tomado y modificado de (Roux et al., 2006). A la derecha se muestran fotomicrografías de la placa neuromuscular de un ratón que se administró la proteína fusionada ( $\beta$ -galactosidasa-Hc-TeTx) en el músculo *gastrocnemius*, se observó 6 h después, a través de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa usando X-Gal para generar coloración azul, en el músculo intacto se observa la morfología típica de la terminal nerviosa en azul, mientras que en el músculo denervado se observa una distribución difusa del Hc-TeTx en la superficie, escala 40  $\mu\text{m}$ . Tomado de (Miana-Mena et al., 2002).

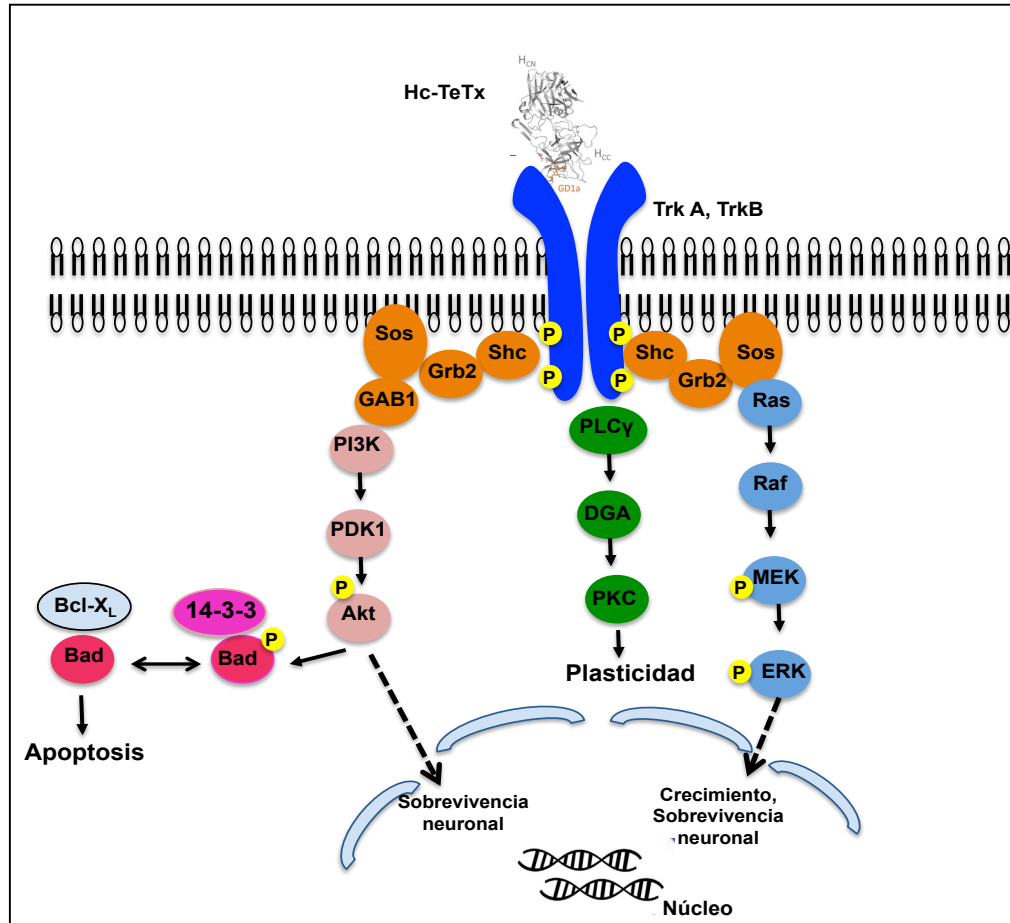
La neuroprotección por factores tróficos deriva de su potencial para inducir rutas de señalización a través de sus receptores tirosina-cinasa (Trk). La señalización de la enzima 3-fosfatidilinositol cinasa (PI-3K) media la activación de la cinasa serina/treonina (Akt), la cual es clave en la regulación de la sobrevivencia neuronal, adicionalmente la protección del daño y toxicidad celular, puede ser controlada por las proteínas activadas

por mitógenos (MAPK) y por las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK ½) (Kaplan and Miller, 2000).

Estudios realizados en sinaptosomas y en cultivos primarios de neuronas corticales de cerebro de rata, mostraron que el fragmento Hc-TeTx actúa como el BDNF y el NGF sobre los receptores TrkB y TrkA respectivamente, mediante mecanismos de transducción asociados a MAPK/ERK1/ERK2 y PLC $\gamma$ /PKC (Gil et al., 2001, Gil et al., 2003). Además se mostró que el Hc-TeTx tiene potentes efectos neurotróficos a través de la activación de PI3-K y de ERK ½, en un cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo al inhibir la muerte por apoptosis inducida por una baja de potasio (Chaïb-Oukadour et al., 2004), también protegió de la neurotoxicidad causada por 1-metil-4-fenilperidinio (MPP<sup>+</sup>), promoviendo la fosforilación de la proteína BAD para evitar su interacción con Bcl-X<sub>L</sub> y la liberación de Bax para favorecer la liberación del citocromo c en la mitocondria y consecuentemente la activación de la caspasa-3 en un cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo (Chaïb-Oukadour et al., 2009) (Fig. 10).

En estudios *in vivo* se ha observado que disminuye la asimetría motora inducida por la inyección unilateral de MPP<sup>+</sup> o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y mantiene las concentraciones de dopamina en el núcleo estriado (Mendieta et al., 2009, Mendieta et al., 2012, Sánchez-González et al., 2014). Sí se considera a este fragmento como un péptido neuroprotector y se coadministra con dosis bajas de Levodopa, se aportarán evidencias de que ésta estrategia podría disminuir los MIAs en ratas lesionadas con 6-OHDA asociado a una menor denervación dopaminérgica en la SNpc y una disminución en la expresión de  $\Delta$ FosB en el estriado.

Los principales factores predisponentes a desarrollar discinesias son el grado de lesión dopaminérgica y la dosis diaria de L-DOPA. Estos factores logran modificar la expresión de genes relacionados directamente con el factor de transcripción  $\Delta$ FosB en el área denervada del estriado (Darmopil et al., 2009). Estas evidencias conducen a que la estrategia terapéutica para disminuir las discinesias, podría ser la coadministración de dosis bajas de L-DOPA y sustancias que induzcan supervivencia neuronal dopaminérgica.



**Figura 10. Vías de señalización inducidas por el fragmento Hc-TeTx**

El fragmento Hc-TeTx activa a los receptores Trk y tres principales vías de señalización: la de Ras/ERK, la cual promueve el crecimiento y supervivencia neuronal; la vía de la PLC $\gamma$ /PKC y la vía PI3K/Akt, la cual induce la supervivencia neuronal a través de la fosforilación de Bad y evitar la muerte celular por apoptosis.

Se ha mostrado que al coadministrar la Levodopa y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) a primates no humanos con lesión dopaminérgica se disminuyen las discinesias y mejora la actividad motora, relacionado con la capacidad del GDNF de restablecer la neurotransmisión dopaminérgica o modular los cambios que se dan en el núcleo estriado después de un estímulo crónico con Levodopa (Irvani et al., 2001). Sin embargo, hasta el momento no se han evaluado marcadores discinetogénicos como  $\Delta$ FosB cuando se coadministra Levodopa con agentes tróficos que han mostrado efectos neuroprotectores dopaminérgicos como el BDNF o el Hc-TeTx.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La EP afecta entre el 1% y 3 % de la población mundial mayores de 50 años y se ha estimado que para el año 2030 esta cifra se duplicará, lo que conducirá a un problema de salud pública. Hasta la fecha en México no se cuenta con estudios epidemiológicos acerca de la prevalencia e incidencia de la EP. Sin embargo, *el Registro Mexicano de Enfermedad de Parkinson (ReMePARK)* es un estudio anidado en una cohorte multicéntrica que permitió conocer los parámetros motores, no motores y genéticos de la EP en la población mexicana en comparación a la poblacional internacional. En cuanto a la utilización de medicamentos antiparkinsonianos de acuerdo con el tiempo de evolución, destaca el uso de Levodopa y amantadina en pacientes con EP avanzada. La utilización de dosis mayores de Levodopa conlleva a una mayor incidencia de discinesias, que se manejan habitualmente con amantadina, hasta el momento es el único fármaco anti-discinético, lo cual explica su mayor uso, en este grupo de pacientes mexicanos, al igual que en la población mundial (Cervantes-Arriaga y cols., 2013). Las discinesias resultan ser más incapacitantes que la propia EP, y solo existe un fármaco anti-discinético que pierde su eficacia cuando la enfermedad avanza, lo que hace necesario el estudio de discinesias a nivel experimental y probar nuevas moléculas con potencial acción anti-discinética.

La inducción de discinesias por la administración crónica de Levodopa en pacientes con la EP, se ha relacionado con la expresión y acumulación de la proteína  $\Delta$ FosB en el caudado putamen (Tekumalla et al., 2001, Lindgren et al., 2011). En modelos experimentales se ha mostrado que la administración crónica de Levodopa induce la sobre-expresión de la proteína  $\Delta$ FosB en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA (Cenci et al., 1998), por lo tanto este modelo de discinesias *in vivo* ha sido muy útil para estudiar los mecanismos celulares y moleculares de las discinesias y probar nuevos fármacos antidiscinéticos.

Hasta el momento las interferencias moleculares para el ARNm de  $\Delta$ FosB con oligonucleótidos “*antisense*” disminuyen los MIAs (Andersson et al., 1999) demostrando así que la interrupción de la activación transcripcional del gen *fosB* atenúa el desarrollo de las discinesias. Sin embargo, se desconoce cual es la regulación del gen *fosB* y como influye la administración de Levodopa para su expresión en el estriado de ratas.

Inclusive es posible que los cambios moleculares que inducen las discinesias se gesten desde el inicio del tratamiento con Levodopa aunque aún no se manifiesten las discinesias. Por lo tanto, en el presente proyecto proponemos evaluar los cambios transcripcionales a nivel del ARNm de  $\Delta$ fosB y fosB después de un tratamiento agudo, sub-crónico y crónico de Levodopa en un modelo de hemiparkinsonismo en rata. Al igual que evaluar la expresión y activación del factor de respuesta a suero (SRF) ya que este podría regular la expresión del gen fosB y aún no se ha investigado su participación en un modelo de discinesias. Además, evaluamos al fragmento Hc-TeTx como neuroprotector en el modelo de discinesias en ratas, con el interés de mostrar si es capaz de modular la expresión de la proteína  $\Delta$ fosB, a través de la neuroprotección de células dopaminérgicas en la SNpc.

### 3. HIPÓTESIS

El tratamiento agudo, subcrónico y crónico de Levodopa induce cambios sobre los transcriptos del gen *fosB* y la activación de SRF en el estriado, lo cual se correlaciona con la aparición de discinesias en rata. Y el tratamiento con el fragmento Hc-TeTx protege a las neuronas dopaminérgicas en la SNpc y disminuye las discinesias en ratas tratadas crónicamente con Levodopa.

### 4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del tratamiento agudo, subcrónico y crónico de Levodopa sobre los niveles de ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB, la activación de SRF en estriado dorsal de ratas hemiparkinsonianas. Y evaluar el efecto del pre-tratamiento con el fragmento Hc-TeTx sobre la inducción de discinesias inducidas por un tratamiento crónico con Levodopa en rata.

#### 4.1 Objetivos Particulares

1. Evaluar la expresión de  $\Delta$ FosB y FosB en un cultivo primario estriatal de rata, con un tratamiento de dopamina a diferentes concentraciones.
2. Evaluar la asimetría motora a través del modelo del cilindro y la expresión de TH por Western-Blot en estriado.
3. Evaluar el ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB en el estriado de ratas hemiparkinsonianas después de un tratamiento agudo, sub-crónico y crónico con Levodopa.
4. Evaluar el factor de respuesta a suero en el estriado dorsal de ratas hemiparkinsonianas después de un tratamiento agudo y crónico con Levodopa.
5. Evaluar los movimientos involuntarios anormales en ratas durante el tratamiento crónico con Levodopa.
6. Evaluar el efecto del fragmento Hc-TeTx sobre los movimientos involuntarios anormales inducidos por el tratamiento crónico con Levodopa en ratas.
7. Evaluar el efecto del fragmento Hc-TeTx sobre la inmunorreactividad a la TH en la SNpc en un modelo de discinesias en rata.
8. Evaluar el efecto del fragmento Hc-TeTx sobre la inmunorreactividad a FosB/ $\Delta$ FosB en el estriado dorsal de ratas.



## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Cultivos primarios estriatales tratados con dopamina

Se usaron ratas hembras preñadas de la cepa *Sprague-Dawley*, procedentes del Bioterio de la Universitat Autònoma de Barcelona. Para la obtención de los embriones (17 días de gestación), a las ratas se les realizó eutanasia con CO<sub>2</sub> y posterior decapitación. Después se obtuvieron los embriones y se procedió a la obtención del encéfalo. La disección del estriado se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad. Se realizó una disociación enzimática y mecánica del tejido, se realizó el conteo de células vivas con azul de tripano, para posteriormente sembrar a una densidad de 200.000 células/mL en placas de 24 pozos o placas de Petri de 60 mm, y se incubaron a 37°C/5% CO<sub>2</sub> hasta el día 5 *in vitro* (5 DIV) para realizar el tratamiento.

A los 5 DIV, los cultivos primarios estriatales fueron incubados con DA (Sigma-Aldrich) con las siguientes concentraciones (0,1 nM, 1 nM y 10 nM) durante 30 min y 24 h.

Los cultivos que fueron desarrollados sobre cubreobjetos, una vez que cumplieron con el tiempo establecido con DA, se les retiró el medio y se fijaron las células con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min, posteriormente se realizaron dos lavados con PBS y se almacenaron a 4°C.

Los cultivos desarrollados en placas de Petri, una vez que cumplieron con el tiempo establecido con DA, se les retiró el medio y se les adicionó 500 µL de solución de lisis celular, se les dejó incubar 20 min en hielo, y se recolectaron las células con ayuda de una espátula. La suspensión de células se pasó a un microtubo para sonicarlas dos veces durante 10 s, posteriormente se centrifugaron durante 20 min a 12.000 rpm a 4°C y se separó el sobrenadante para almacenarlo a -20°C.

### 5. 2 Inmunocitoquímica por fluorescencia

A las placas de 24 pozos, que contienen un cubre-objeto en cada pozo, se les realizó dos lavados de 5 min con PBS, se incubaron una hora con solución de bloqueo en PBS (5% suero de caballo, 0,3% Triton X-100), se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con PBS y se dejaron incubando las células con el anticuerpo primario para FosB/ΔFosB (1:100, Santa Cruz, sc-28213), NeuN (1:1000, Millipore) durante toda la

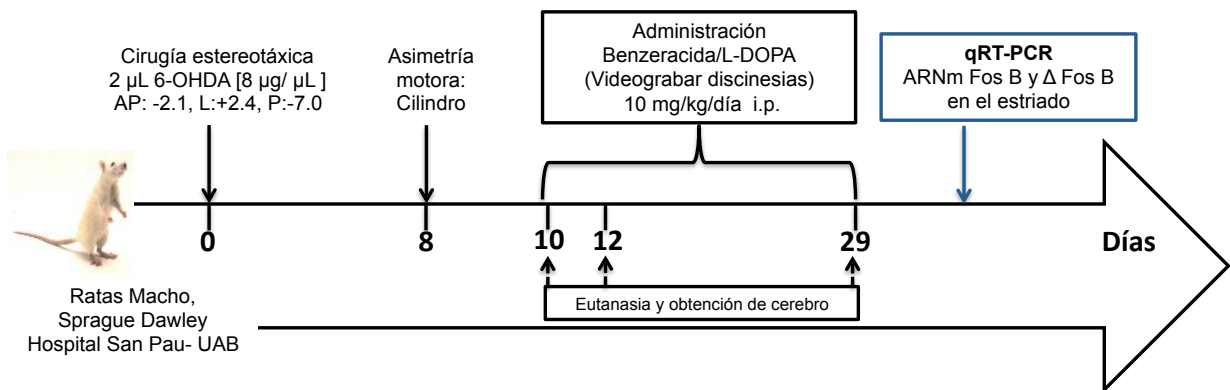
noche. Al día siguiente se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0,2% y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor<sup>555</sup> *goat anti-rabbit* (1:1000, Life Technologies) y Alexa Fluor<sup>488</sup> *goat anti-mouse* (1:1000, Life Technologies) respectivamente, durante una hora en condiciones de oscuridad. Posteriormente se lavaron las células tres veces con PBS-Tween 0,2% y se incubaron 5 min con DAPI (4'-diamino-2-fenilindol, SIGMA), se lavaron tres veces antes de montar los cubreobjetos sobre los portaobjetos con la resina Fluoromont-G. Se mantuvieron siempre en condiciones de oscuridad. Las laminillas fueron observadas en el microscopio de epifluorescencia.

#### **5.1.4 Obtención y preparación de muestras para Western-blot**

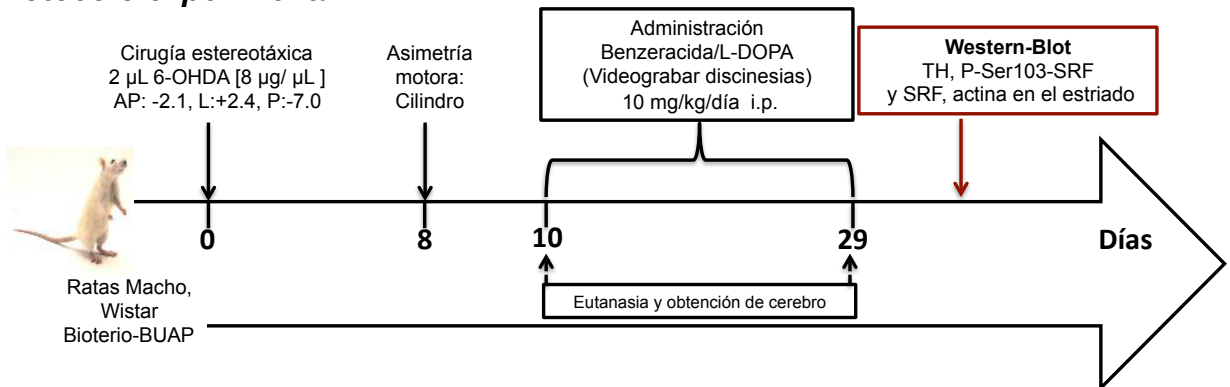
Se determinó la concentración de proteínas de los extractos celulares con el sistema BCA (Thermo Scientific). Alícuotas de 20 µg de proteína se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) en condiciones desnaturizantes, posterior se realizó la transferencia de proteínas en membrana de nitrocelulosa. Se usó el anticuerpo primario para FosB/ $\Delta$ FosB (1:100, Santa Cruz, sc-28213), GADPH (1:1000, Cell Signaling) y se usaron anticuerpos secundarios *goat anti-rabbit (HRP)* (1:3000, Thermo Scientific), *goat anti-mouse (HRP)* (1:5000, BioRad), para revelar se usó el sistema ECL1 (Thermo Scientific) y se obtuvieron imágenes digitalizadas a través del software GeneGNOME (Syngene).

## 5.2 Experimentos in vivo

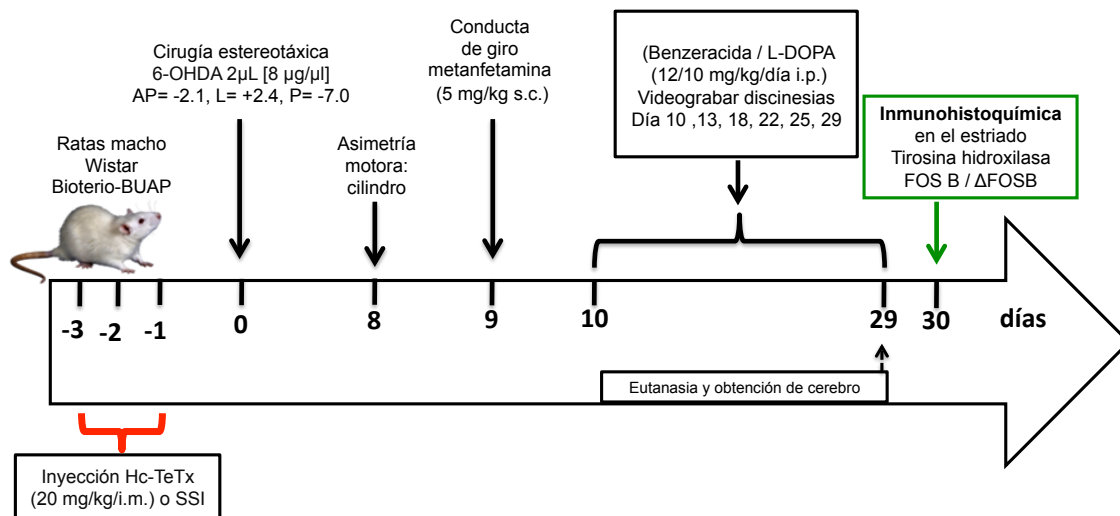
### Protocolo experimental 1



### Protocolo experimental 2



### Protocolo experimental 3



### **5.2.1 Sujetos de experimentación**

Para el *protocolo experimental 1* se usaron ratas macho adultas de la cepa *Sprague Dawley*, de un peso aproximado de 250 g. Se mantuvieron en el Bioterio del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, en cajas de acrílico transparente, con libre acceso a agua y alimento, a una temperatura de 24°C y un ciclo de luz-oscuridad de 12 h/12 h.

Para el *protocolo experimental 2 y 3*, se usaron ratas macho adultas de la cepa *Wistar* de un peso aproximado a 280 g procedentes del Bioterio Claude Bernard de la BUAP. Las ratas se mantuvieron en cajas de acrílico transparente con libre acceso a agua y alimento a una temperatura de 24°C y un ciclo de luz oscuridad de 12 h, se mantuvieron con los cuidados de acuerdo al comité de ética de la BUAP (NOM-062-ZOO-1999). °

### **5.2.2 Cirugía estereotáxica**

Todas las ratas fueron sometidas a cirugía estereotáxica, previamente se anestesiaron con ketamina/medetomidina (75:0,5 mg/Kg de peso) con coordenadas para la vía nigroestriatal: AP= -0,45 L= -0,12, P= -0,78 (mm) en relación al atlas de Paxinos y Watson (1998). Se inyectaron unilateralmente 2 µL de ácido ascórbico (0,01%) como vehículo y 2 µL de 6-OHDA [8 µg/µL], en la vía nigroestriatal, para inducir la lesión dopaminérgica. Los animales recibieron los cuidados post-operatorios necesarios y Atipamezol 1 mg/kg, i.p.

### **5.2.3 Asimetría motora: Prueba del cilindro**

Para evaluar el grado de lesión dopaminérgica se utilizó la prueba del cilindro (Schallert y cols., 2000), todas las ratas fueron evaluadas un día antes de la cirugía estereotáxica, y el día 8 post-cirugía. En esta prueba se evaluó el uso independiente de cada una de las extremidades anteriores en el contexto de una conducta exploratoria cuando se encuentran en un ambiente nuevo. Esta acción se manifiesta cuando la rata toma una posición erguida sobre sus extremidades posteriores y usa sus extremidades anteriores para apoyarse sobre las paredes del cilindro.

Las ratas fueron colocadas individualmente en un cilindro de acrílico transparente y se observaron durante 5 min, para cuantificar el número de toques ejecutados por cada rata tanto con la extremidad ipsilateral, contralateral o ambas.

#### **5.2.4 Tratamiento Benzeracida/Levodopa**

Benzeracida (Sigma-Aldrich) y Levodopa (Sigma-Aldrich) se disolvieron en soluciones fisiológicas previa a su administración. La Benzeracida (12 mg/kg) se administró 20 min previos a la administración de Levodopa (10 mg/kg) y se administraron por vía intraperitoneal (i.p.). **1.** Control+SSI ( $n = 15$ ), **2.** 6-OHDA+SSI ( $n = 15$ ), **3.** 6-OHDA+Levodopa ( $n = 50$ ).

#### **5.2.5 Análisis de Movimientos Involuntarios Anormales**

Después de la administración de SSI o Levodopa se observaron cada una de las ratas los días 1, 3, 9 y 15 post-tratamiento, las ratas fueron colocadas en un cilindro de acrílico y se analizaron durante 1 min en intervalos de 20 min, hasta completar 2 h posteriores a la inyección de Levodopa.

Se identificaron y cuantificaron tres tipos de movimientos involuntarios anormales: movimiento axial, de miembro y orolingual. Se asignó un puntaje de acuerdo al tiempo en que estos movimientos se presentan con una escala de 0 a 4 (Cenci y cols., 1998, Winkler y cols., 2002).

#### **5.2.6 Obtención y preparación de muestras para qRT-PCR**

La obtención de las muestras se realizó según los tiempos establecidos después de las administraciones de benzeracida y de Levodopa. Los animales fueron anestesiados y decapitados para extraer el cerebro, disecar el estriado y mantenerlo en nitrógeno líquido y posterior almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El aislamiento de ARN total del tejido estriatal se realizó con PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies). Durante el aislamiento, las muestras se sometieron a un tratamiento con DNasa I para eliminar el DNA residual. Posteriormente, las muestras se utilizarán para amplificar por RT-PCR en tiempo real para las dos especies FosB y  $\Delta$ FosB. El protocolo a utilizar fue el de cuantificación relativa, para lo cual se amplificó en las mismas muestras el gen de expresión constitutiva para gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*). Los

iniciadores se diseñaron usando las herramientas de GenBank, PerlPrimer y BLAST, y fueron sintetizados por Invitrogen, Life Technologies. Las enzimas, los reactivos y los consumibles se obtuvieron de la casa comercial Applied Biosystems. Se utilizó el termociclador 7500 Fast Real-Time PCR system.

### 5.2.7 Diseño de primers

El diseño de los primers se realizó usando el programa Perl primer y la herramienta de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), la secuencia de nucleótidos del gen *fosB* y de los genes constitutivos *gapdh*, *actb* y *hrp1* se obtuvieron del Gen Bank, una base de datos que pertenece al NCBI-NIH (*National Center for Biotechnology Information- National Institutes of Health, USA*). En la tabla 1 se muestra el número de identificación de cada una de las secuencias de nucleótidos para el gen y el ARNm, y en la tabla 2 se muestra la secuencia de los *primers* que se enviaron para síntesis (Invitrogen) y sus características.

	Gen FosB	ARNm FosB	Gen Gapdh	ARNm Gapdh	Gen Actb	ARNm Actb	Gen Hrp1	ARNm Hrp1
I.D	14282	XM_006539543	24383	NM_017008.4	81822	NM_031144	24465	XM_343829

**Tabla 1.** Número de identificación (I.D) del Gen Bank para los genes *fosB*, *gapdh*, *actb* y *hrp1* y de su respectivo ARNm.

	<b>ΔFosB</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Tamaño (bases)</b>	<b>GC %</b>	<b>Producto (bases)</b>
Sentido	5'-AGGCAGAGCTGGAGTCGGAGAT-3'	67,48	22	59	150
Anti-sentido	5'-GCCGAGGACTTGAACCTCACTCG-3'	65,88	23	56	
<b>FosB</b>					
Sentido	5'-GTGAGAGATTTGCCAGGGTC-3'	60,88	20	55	130
Anti-sentido	5'-AGAGAGAAGCCGTCAGGTTG-3'	62,03	20	55	
<b>Gapdh</b>					
Sentido	5'-GAAACCTGCCAAGTATGATGAC-3'	59,81	22	45	120
Anti-sentido	5'-GGAGTTGCTGTTGAAGTCAC-3'	59,52	20	50	
<b>Actb</b>					
Sentido	5'-CCACACTTTCTACAATGAGCTG-3'	59,75	22	45	116
Anti-sentido	5'-GTCTCAAACATGATCTGGGTC-3'	58,85	21	47	
<b>Hrp1</b>					
Sentido	5'-TGAAGAGCTACTGTAATGACCA-3'	59,07	22	40	145
Anti-sentido	5'-GACCAAGGAAAGCAAAGTCTG-3'	59,88	21	47	

**Tabla 2.** Se muestra la secuencia de los *primers* que se diseñaron y mandaron a sintetizar (Invitrogen)

### **5.2.8 Evaluación de la concentración óptima de primers – Ensayo de especificidad experimental**

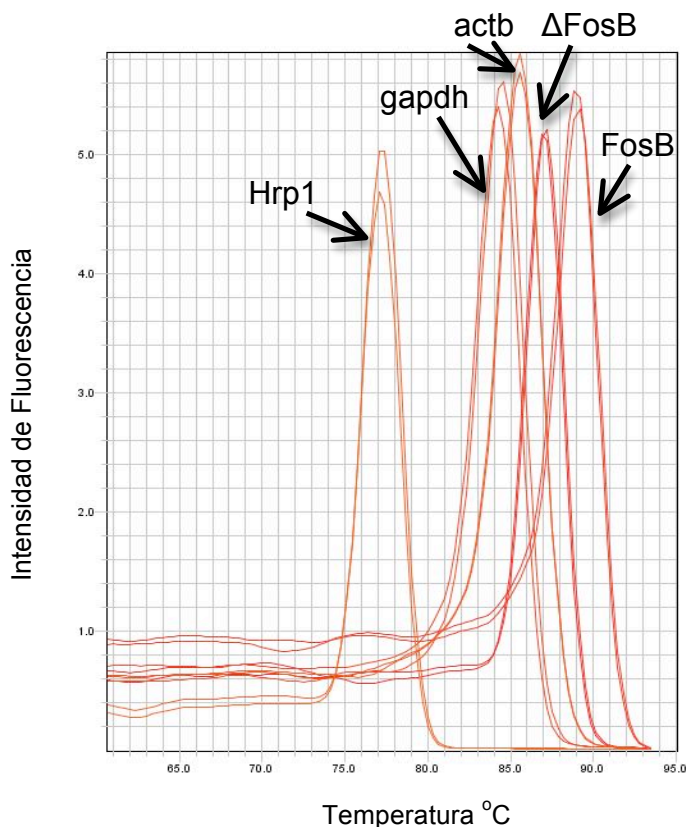
Se realizó un ensayo de qPCR con SYBERGreen, a diferentes concentraciones de los primers sentido y antisentido 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  usando una dilución 1:25 de ADNc (mezcla de todas las muestras). La concentración que se eligió fue de 0,1  $\mu\text{M}$  para el primer sentido y de 0,1  $\mu\text{M}$  para el primer antisentido para cada uno de los genes, ya que fue la concentración más baja a la cual amplificaron.

### **5.2.9 Análisis de curva de disociación de DNA**

Los equipos para PCR en tiempo real permiten realizar el análisis de las curvas de disociación (curvas de *melting*) de los productos amplificados por PCR. Este análisis se basa en la aplicación de un gradiente de temperatura creciente realizado a continuación de la PCR, obteniéndose una gráfica que se corresponde con la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante esta aplicación se puede determinar la temperatura de *melting* ( $T_m$ , temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado) de los productos de PCR.

Cada fragmento amplificado tiene una  $T_m$  característica, que depende principalmente de la longitud del fragmento y de su composición en nucleótidos. Esta prueba permite diferenciar la fluorescencia correspondiente a la amplificación de un producto de PCR ( $T_m$  superior a  $80^\circ\text{C}$ ) de la fluorescencia debida a la formación de dímeros de los oligonucleótidos, cuya  $T_m$  es más baja (entre  $70^\circ\text{C}$  y  $80^\circ\text{C}$ ).

En la Fig. 11 se muestra la curva de disociación para cada uno de los productos amplificados, se observa que no hay subproductos y que los *primers* amplifican de forma específica.



**Figura 11. Curvas de disociación del producto amplificado.**

La  $T_m$  de los productos amplificados presentan una  $T$  de 75 °C a 90°C, aproximadamente.

### 5. 2.10 Ensayo de eficiencia y validación

Existen dos métodos diferentes de presentar la cuantificación de expresión génica, la cuantificación absoluta y relativa. La cuantificación absoluta calcula el número de copias del gen, relacionando la señal de la PCR a una curva estándar, mientras que la expresión génica relativa presenta los datos del gen de interés relativo a algún gen control, el método más usado para presentar la expresión génica relativa es el método comparativo  $C_T$ . Para usar este método es necesario evaluar la eficiencia para las reacciones de amplificación de los genes de interés y los de referencia.

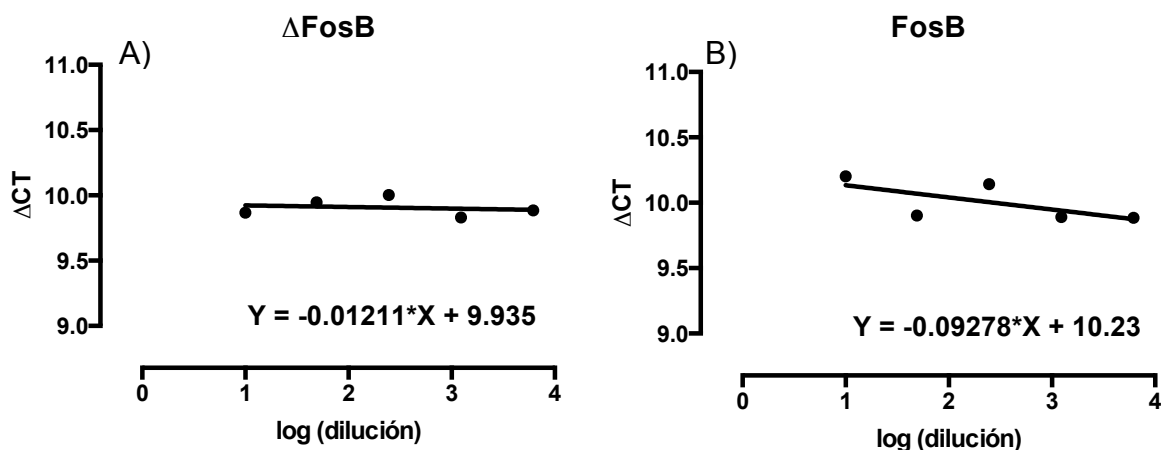
Se realizó una curva estándar relativa de  $\Delta$ FosB, FosB y los genes de referencia (*gapdh*, *actb* y *hrp1*), usando 5 diluciones de la mezcla de muestras de ADNc (1:10, 1:50, 1:250, 1:1250, 1:6250).

Para calcular la eficiencia se tomaron los valores de  $C_T$  de cada uno de los puntos de la curva estándar y se realizó la diferencia del  $C_T$  del gen de interés con respecto al gen de referencia para obtener el valor de  $\Delta C_T$ , este valor se grafica contra el logaritmo de las diluciones, se hace una regresión lineal. Si ambos genes tienen la misma



eficiencia, la pendiente de la curva debe ser  $< 0,1$ , por lo tanto es valido el experimento y es posible usar el método comparativo  $C_T$  para determinar los niveles de ARNm de los genes de interés.

En la siguiente gráfica (Fig.12) se muestra la eficiencia de  $\Delta C_T$  para  $\Delta$ FosB y FosB contra *gapdh*. La pendiente para cada una de las curvas (Fig. 12A y 12B) es  $< 0,01$ .



**Figura 12. Eficiencia y validación.**

Se muestra en la grafica A el  $\Delta C_T$  para  $\Delta$ FosB y *gapdh* contra el logaritmo de la dilución de DNAC, la pendiente de la recta es de 0,012, y en la gráfica B se muestra el  $\Delta C_T$  para FosB y *gapdh* contra el logaritmo de la dilución de DNAC, la pendiente de la recta es de 0,092.

### 5.2.11 Extracto nuclear y citoplásmico

La disección del estriado dorsal se llevo acabo en hielo y su almacenamiento en hielo seco para su posterior homogenización. Se realizó la separación del extracto nuclear y citoplásmico bajo el siguiente protocolo: se homogenizó el tejido estriatal en 200  $\mu$ L del buffer A (10 mM HEPES, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl, 0.05 % glicerol, pH = 7,9), se mantuvo en hielo y constante agitación durante dos horas, posteriormente se centrifugó 30 min a 5.000 rpm a 4°C, se obtuvo el sobrenadante que corresponde al extracto citoplásmico y se almacenó a -80 °C. La pastilla se resuspendió y homogenizó en 55.9  $\mu$ L del buffer B ( 5 mM HEPES, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM EDTA, 26% glicerol, pH = 7,9) y 4,1  $\mu$ L NaCl [4,6 M], se mantuvo en hielo y constante agitación durante una hora, posteriormente se centrifugó 30 min a 15.000 rpm a 4°C, se separó el sobrenadante que

corresponde al extracto nuclear y se almaceno a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La cantidad de proteínas se determinó por el método de Bradford.

#### **5.2.12 Western-blot**

Se sometieron 10  $\mu\text{g}$  de proteínas nucleares y 20  $\mu\text{g}$  de proteínas citoplásmicas a un SDS-PAGE (12%) y la posterior transferencia de proteínas a membranas PVDF (Millipore). Se usaron anticuerpos para P-SRF (Cell Signaling, 1:250, BSA1%), SRF (Santa Cruz, 1:1000), TH ( Millipore 1:1000), FosB (Santa Cruz, 1:200, BSA1%), Actina (Santa cruz, 1:1000). Para la detección se usaron anticuerpos secundarios acoplados a HRP Anti-mouse (Millipore, 1:3000) o Anti-Rabbit (Bio systems, 1:3000) y luminol (Immobilon, Millipore). El revelado se hizo a través de placas fotográficas (Kodak) y para la cuantificación se digitalizaron las imágenes para un posterior análisis densitométrico en el programa FIJI.

#### **5.2.13 Preparación del tejido para inmunohistoquímicas**

El día 30 post-cirugía se anestesiaron las ratas con una sobredosis de pentobarbital i.p., para realizar la perfusión del cerebro por una punción intracardiaca con 50 mL de PB (buffer de fosfatos, 0,1 M, pH 7,4) y 20 mL de paraformaldehído al 4% en PB. Se decapitaron las ratas para extraer el cerebro depositándolo en paraformaldehído al 4% en PB por 24 h y posteriormente se almacenaron en una solución PB-Sacarosa (15%). Los cerebros fueron cortados en un vibratomo en el área del estriado y la SNpc. Se obtuvieron cortes de 70  $\mu\text{m}$  de grosor y se almacenaron en placas de 24 pozos a  $4^{\circ}\text{C}$  en solución de PB.

#### **5.2.14 Identificación de TH y FosB por inmunohistoquímica**

La identificación de TH y FosB se realizó en cortes de SNc y estriado por la técnica de flotación usando el sistema biotin-estreptavidina-peroxidasa, usando los siguientes anticuerpos primarios (TH-Millipore, Monoclonal, Cat. MAB5280, 1:1000; FosB H-237,sc-28213-Santa Cruz, Policlonal, 1:100).

Los cortes cerebrales se colocaron en laminillas silanizadas en PBS para que se lleve a cabo la reacción con 50  $\mu\text{L}$  de diaminobenzidina (DAB, 0,5 %) hasta que la tinción sea visible y se torne de un color café (3-5 min) en el área del estriado y SNc.

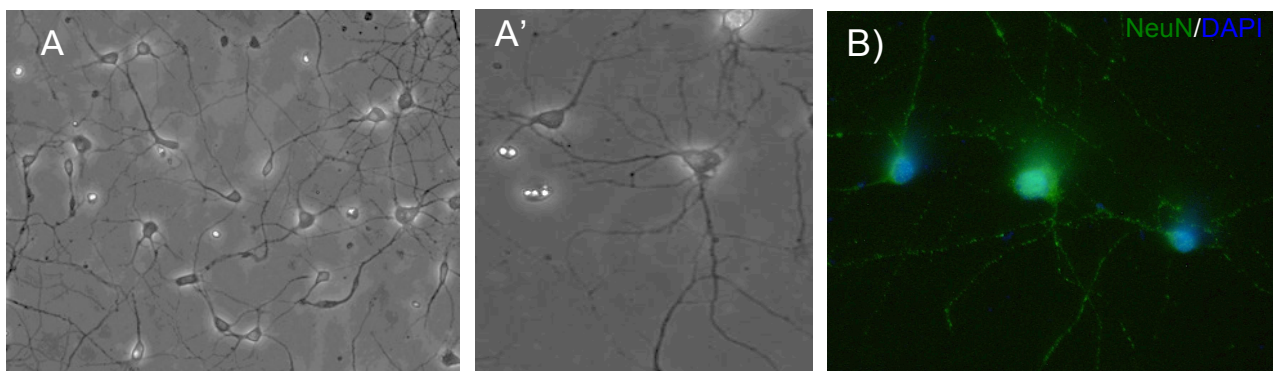
Posteriormente se hicieron varios lavados con PB para retirar los residuos de DAB manteniendo los cuidados pertinentes.

Se dejaron secar las laminillas, para posteriormente pasarlas por la batería de alcoholes (2 min x cubeta) 70°, 80°, 100° y xileno, para finalmente sellar con resina y colocar los cubreobjetos, y esperar a que se sequen para poder observar al microscopio de campo claro.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Estudio de la expresión de FosB y $\Delta$ FosB en un cultivo primario neuronal de estriado de rata tratados con dopamina

Se estandarizó el cultivo primario estriatal embrionario (E17) de rata y se caracterizó como cultivo primario neuronal a los 5 DIV, se muestra en la figura 13 A y A' fotografías del cultivo neuronal tomadas en microscopía de contraste de fases y en la figura 13 B se muestra una fotografía donde se observa la inmunofluorescencia para la proteína NeuN en verde, lo cual nos permitió identificar a las células de tipo neuronal en el cultivo estriatal, y en azul se marco el núcleo utilizando DAPI. Estimando que el cultivo primario esta conformado por un 80 % de neuronas a los 5 DIV.



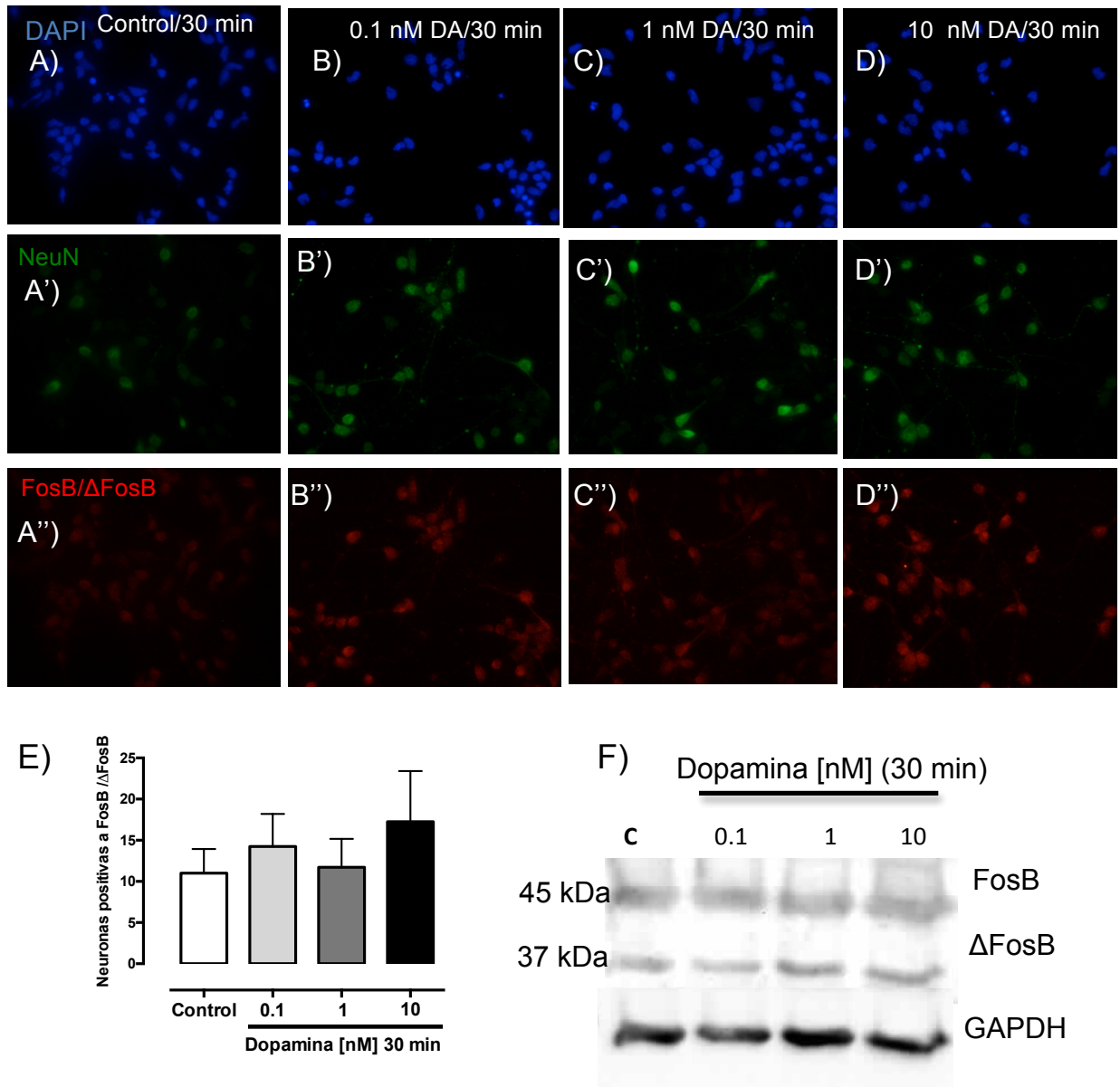
**Figura 13. Cultivo primario neuronal de estriado de rata.**

En A y A' se muestra un cultivo primario estriatal embrionario (E17) a los 5 días *in vitro* (5 DIV). Las fotografías fueron tomadas en microscopía de contraste de fases. En B) se muestra una fotografía de neuronas en cultivos primarios estriatales pre-natales. En azul se encuentran los núcleos teñidos con DAPI y en verde la proteína específica neuronal NeuN.

En algunos reportes se muestra que los cultivos primarios estriatales, tanto pre-natales como post-natales, expresan ambos tipos de receptores dopaminérgicos, D1 y D2 (Penrod et al., 2011, Fasano et al., 2013), por lo tanto sugerimos que es a través de estos receptores que se podría inducir la expresión de  $\Delta$ FosB después del tratamiento con DA en los cultivos primarios.

Por lo tanto, nos preguntamos si al tratar estos cultivos estriatales directamente con DA se podría inducir FosB/ $\Delta$ FosB y probar que su expresión depende del grado de estimulación dopaminérgica al tratar los cultivos con diferentes concentraciones de DA. En el cultivo se probaron si diferentes concentraciones de DA inducen la expresión de FosB y  $\Delta$ FosB, y se observó la respuesta de las neuronas a los 30 min de incubación

con DA. En la Figura 14 se muestran fotografías de neuronas con una doble inmunotinción con fluorescencia para identificar FosB/ $\Delta$ FosB (Fig. 14A''-D'') y la proteína neuronal NeuN (Fig. 14A'-D'), contrastadas con la tinción de los núcleos con DAPI (Fig. 14 A-D).



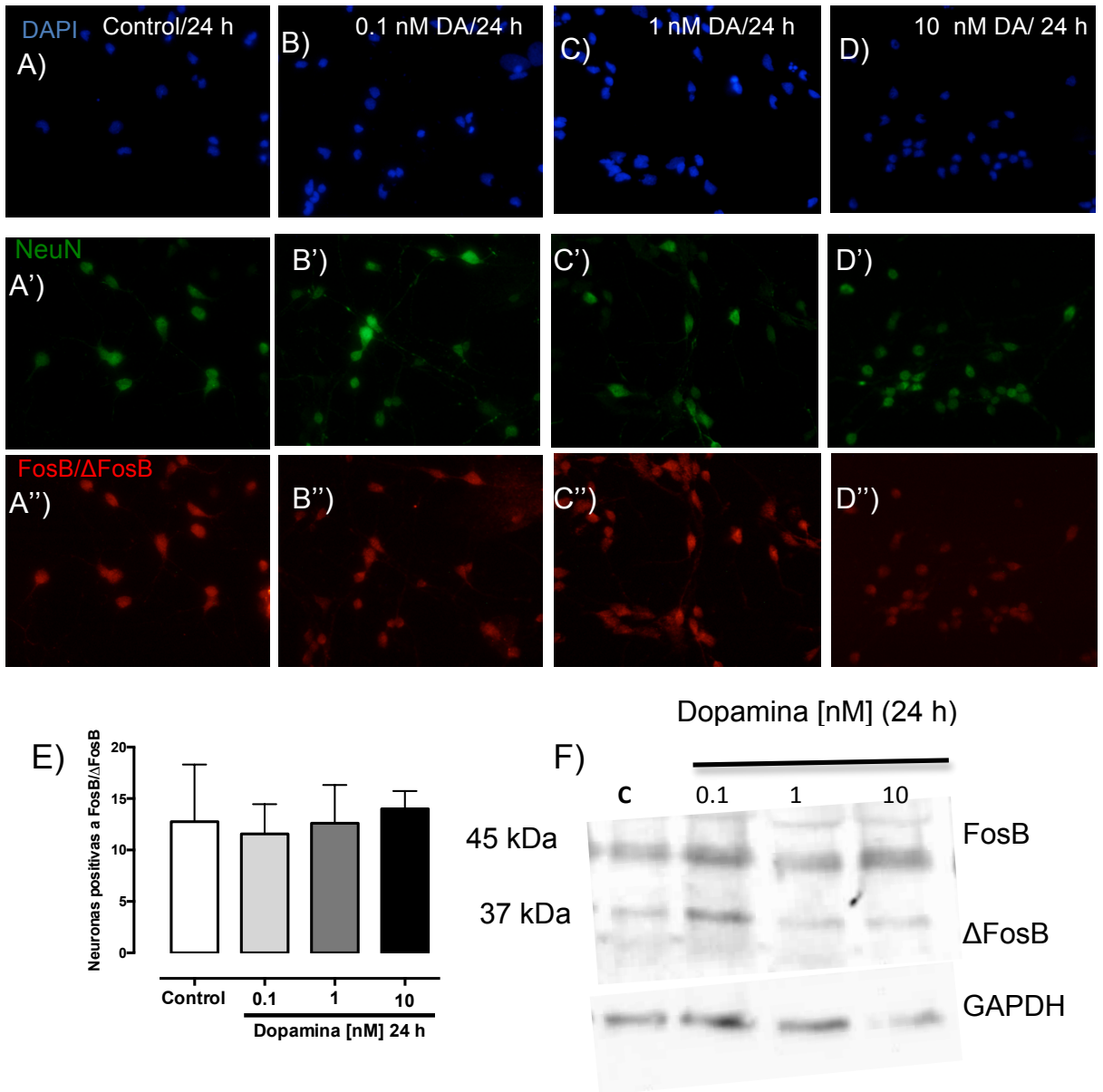
**Figura 14. La dopamina no incrementa la expresión de FosB/FosB en un cultivo primario estriatal de forma temprana.**

En el panel de fotografías (A'' - D'') se muestran en rojo a las células positivas a FosB y/o  $\Delta$ FosB a los 30 min después del tratamiento con DA a diferentes concentraciones (0.1 nM, 1 nM y 10 nM) en cultivos primarios estriatales. En azul se encuentran los núcleos teñidos con DAPI (A - D) y en verde la proteína neuronal NeuN (A' - D'). La cuantificación de neuronas positivas a FosB y/o  $\Delta$ FosB se muestra en la grafica (E), ANOVA de una vía  $p > 0.05$ . En la imagen del *Western blot* (E) se muestran a las proteínas

FosB (45 kDa) y  $\Delta$ FosB (37 kDa) en cultivo primario estriatal (7DIV), 30 min después del tratamiento con DA a diferentes concentraciones. C: Control.

La cuantificación del número de neuronas positivas a FosB/ $\Delta$ FosB, se muestra en la Figura 14 E), al comparar los cultivos tratados con DA respecto al Control observamos que no hay diferencia significativa a los 30 min después de tratar con DA, esto se corroboró al determinar las proteínas FosB/ $\Delta$ FosB a través de WB (Fig. 14F) en el cual observamos que no hay diferencia entre las bandas que corresponden a FosB y  $\Delta$ FosB a los 30 min después de tratar con DA respecto al Control.

Para observar el efecto de la DA de forma tardía, se incubaron los cultivos durante 24 h con DA. En la Figura 15 se muestran fotografías de neuronas con doble inmunotinción con fluorescencia para identificar FosB/ $\Delta$ FosB (Fig. 15 A''-D''), la proteína neuronal NeuN (Fig. 15 A'-D'), y contrastadas con la tinción de los núcleos con DAPI (Fig. 15 A-D). Al cuantificar el número de neuronas positivas a FosB (Fig. 15 E) se muestra que el tratamiento con DA a las diferentes concentraciones no induce mayor expresión de FosB con respecto al control, este mismo efecto se observa por WB (Fig. 15E), donde se observa que las bandas que corresponden a las proteínas FosB y  $\Delta$ FosB de las células tratadas con DA no muestran mayor expresión que las células control.



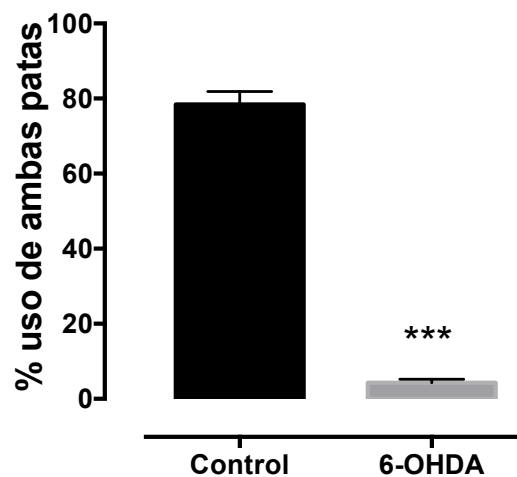
**Figura 15. La dopamina no incrementa la expresión de FosB/FosB en un cultivo primario estriatal de forma tardía.**

En el panel de fotografías (A'' – D'') se muestra la inmunofluorescencia para FosB y/o ΔFosB a las 24 h después del tratamiento con DA a diferentes concentraciones (0.1 nM, 1 nM y 10 nM) en cultivos primarios estriatales pre-natales. En azul se encuentran los núcleos teñidos con DAPI (A - D) y en verde la proteína neuronal NeuN (A' – D'). La cuantificación de neuronas positivas a FosB y/o ΔFosB se muestra en la grafica (E), ANOVA de una vía  $p > 0.05$ . En la imagen del *Western blot* (E) se muestran a las proteínas FosB (45 kDa) y ΔFosB (37 kDa) inducidas por dopamina en un cultivo primario estriatal (E17). El WB se determinó a las 24 h después del tratamiento con dopamina a diferentes concentraciones. C: Control.

## 6.2 Estudio de la expresión del ARNm de FosB y $\Delta$ FosB en estriado de ratas hemiparkinsonianas con tratamiento agudo y crónico de Levodopa

### 6.2.1 La inyección unilateral de 6-OHDA en la vía nigroestriatal induce asimetría motora.

La lesión con 6-OHDA en la vía nigro-estriatal se usó para reproducir un estado de hemiparkinsonismo en rata, debido a que induce la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas residentes en la SNpc. En la Figura 16 se muestra el porcentaje de uso de ambas patas en la prueba del cilindro a los 8 días post-cirugía. El grupo 6-OHDA mostró una disminución significativa del 95 % (\*\* $p < 0.001$ ) en el porcentaje de uso de ambas patas, con respecto al grupo control. Lo cual indica que se ha establecido un daño dopaminérgico de forma unilateral presentando asimetría motora.



**Figura 16.** La inyección de la 6-OHDA en la vía nigroestriatal induce asimetría motora. En la gráfica se muestra el porcentaje de uso de ambas patas de las ratas evaluadas 8 días post-cirugía en la prueba del cilindro. Control ( $n=15$ ), 6-OHDA ( $n=60$ ), t-student \*\*\* $p < 0.001$ .

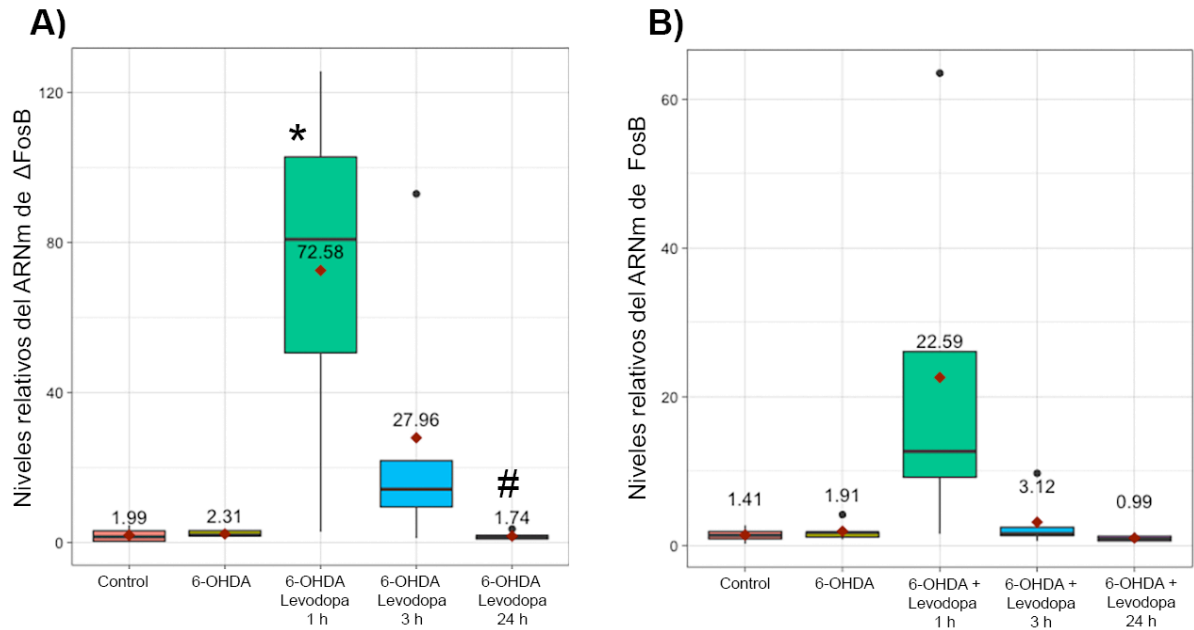


### **6.2.2 La administración aguda de L-DOPA en ratas hemiparkinsonianas induce de forma transitoria el ARNm de FosB y $\Delta$ FosB**

Una vez establecida la lesión dopaminérgica se evaluó la respuesta a la primera administración de L-DOPA sobre los niveles del ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB en el estriado de ratas hemiparkinsonianas.

Los niveles del ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB se reportan con respecto al gen de referencia *gapdh*, para representar los niveles relativos del ARNm se usaron *box-plot*, esto permite evidenciar la distribución de los valores a través de sus diferentes elementos, la caja es un rectángulo que abarca el rango intercuartílico (RIC) de la distribución; o sea el valor de la escala que va desde el primer cuartil ( $C_1$ ) al tercer cuartil ( $C_3$ ), esto incluye el 50 % de las observaciones. La posición de la línea horizontal que se encuentra dentro la caja corresponde al valor de la media del conjunto de observaciones. Y los bigotes son líneas que salen a los costados de la caja y que sirven como referencia para ubicar las observaciones que están por fuera del 50 % central de la distribución. Además numéricamente se colocó el valor del promedio y esta denotado por un rombo rojo.

En la Fig. 17 A) se observa que la primera administración de L-DOPA produce un incremento significativo del ARNm de  $\Delta$ FosB en el estriado ipsilateral de ratas hemiparkinsonianas desde la primera hora (\*  $p < 0.05$  vs control) y se mantiene hasta las 3 h mientras que a las 24 h post-inyección los niveles del ARNm han disminuido hasta sus niveles basales (#  $p < 0.05$  vs 6-OHDA + Levodopa (1h)). En la Fig. 17 B) se muestran los niveles del ARNm de FosB, no se observa incremento significativo 1 h post-inyección de L-DOPA, mientras que a las 3 h y 24 h los valores son comparables a los del control.

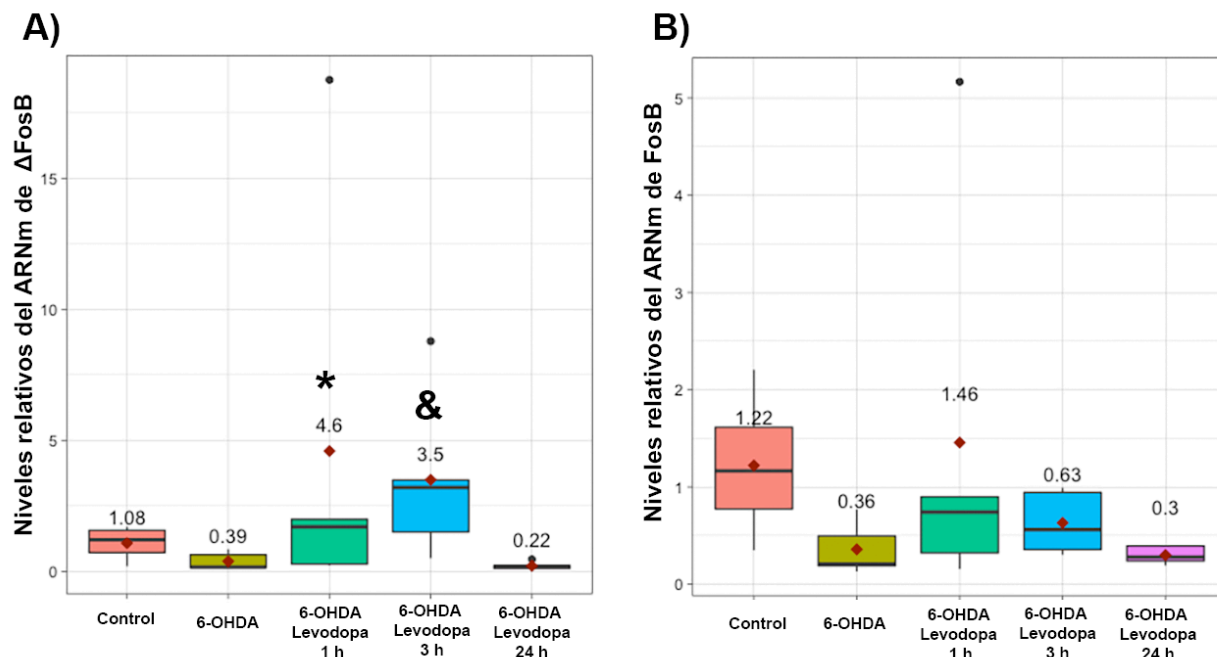


**Figura 17. La administración aguda de Levodopa induce la expresión del ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB.**

En el *box-plot* A) se muestran los niveles relativos del ARNm de  $\Delta$ FosB y en el *box-plot* B) se muestran los niveles relativos del ARNm de FosB en el estriado de ratas hemiparkinsonianas a 1 h, 3 h y 24 h, después de la administración aguda de Levodopa (10 mg/kg; i.p.). Kruskal–Wallis, Benjamini–Hochberg,  $p < 0.05$ , \* vs control, # vs 6-OHDA+L-DOPA (1h), ( $n = 4-7$  animales para cada grupo).

### 6.2.3 La administración sub-crónica de L-DOPA disminuye la transcripción del gen fosB en el estriado de ratas hemiparkinsonianas

Se evaluó los niveles de ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB en el estriado ipsilateral de ratas hemiparkinsonianas después de tres días de administración de L-DOPA, en la Fig. 18 A) se muestra que 1 h ( $*p < 0.05$ ) y 3 h ( $\& p < 0.05$ ) post-inyección se incrementa el ARNm de  $\Delta$ FosB con respecto al grupo 6-OHDA. Con respecto al ARNm de FosB en la Fig. 18 B) se muestra que no hay cambio significativo entre los grupos controles y 1 h, 3 h y 24 h post-inyección de la última dosis de L-DOPA.

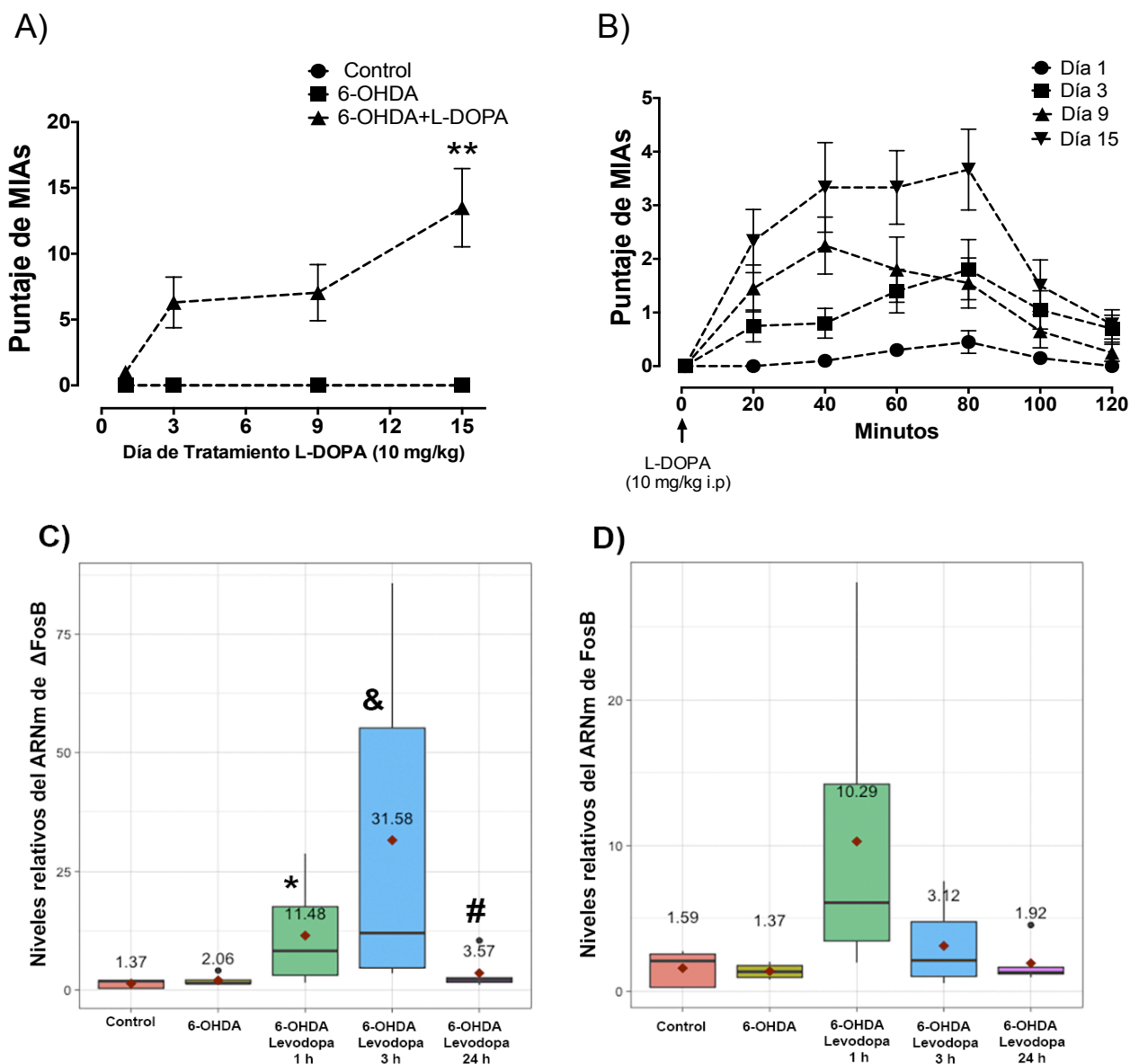


**Figura 18. La administración sub-crónica de Levodopa disminuye la expresión de  $\Delta$ FosB y FosB.**

En el *box-plot* A) se muestran los niveles relativos del ARNm de  $\Delta$ FosB y en el *box-plot* B) del ARNm de FosB en el estriado de ratas hemiparkinsonianas a 1 h, 3 h y 24 h, después de la última administración de L-DOPA (10 mg/kg; i.p.) del tratamiento sub-crónico. Kruskal –Wallis, Benjamini–Hochberg,  $P < 0.05$ , \* vs 6-OHDA, & vs 6-OHDA+L-DOPA (1h), ( $n = 4-7$  animales para cada grupo).

#### 6.2.4 La administración crónica de L-DOPA induce la transcripción del gen *fosB* en el estriado de ratas discinéticas.

Las ratas hemiparkinsonianas que reciben un tratamiento crónico con L-DOPA inducen movimientos involuntarios anormales (MIAs), en la Fig. 19 A) se muestra progresivamente la inducción de los tres movimientos cuantificados (de miembro, orolingual y torsión axial) hasta el día 15 de administración de L-DOPA. En la Fig. 19 B) se muestra por cada sesión de evaluación la cinética de aparición de los MIAs durante los 120 minutos post-inyección de L-DOPA



**Figura 19. La administración crónica de Levodopa mantiene la expresión de ΔFosB y FosB en ratas discinéticas.**

En la gráfica A) se muestra la progresión de la inducción de discinesias a través del tiempo por la administración de Levodopa a ratas hemiparkinsonianas, y en la gráfica B se muestra el perfil cinético de discinesias por períodos de 20 minutos después de la inyección de Levodopa. ANOVA de dos vías de medidas repetidas \*\*  $p < 0.01$ . En el *box-plot* C) se muestra la distribución de los niveles relativos del ARNm de ΔFosB y en el *box-plot* D) se muestra la distribución de los niveles relativos del ARNm de FosB en el estriado ipsilateral de ratas hemiparkinsonianas a 1 h, 3 h y 24 h, después de la administración crónica de Levodopa (10 mg/kg; i.p.). Kruskal –Wallis, Benjamini–Hochberg, \*  $p < 0.05$ , &  $p < 0.05$  vs 6-OHDA, # vs 6-OHDA+L-DOPA (1h), ( $n = 4-7$  animales para cada grupo).

Con respecto a los niveles de ARNm de ΔFosB y FosB en el estriado ipsilateral después de un tratamiento crónico con Levodopa (16 días) en la Fig. 19 C) se muestra

que 1 h post-inyección de la última dosis de Levodopa se incrementan los niveles de ARNm de  $\Delta$ FosB estadísticamente significativo (\*  $p < 0.05$  vs 6-OHDA), al igual que a las 3 h post-inyección se muestra un incremento significativo (&  $p < 0.05$  vs 6-OHDA) y además se observa que los niveles de ARNm de  $\Delta$ FosB retornan a sus niveles basales a las 24 h post-inyección (#  $p < 0.05$  vs 6-OHDA + Levodopa (3 h)).

En la Fig. 19 D) se muestra los niveles de ARNm de FosB en el estriado ipsilateral de ratas hemiparkinsonianas, a 1 h post-inyección se observa un incremento en los niveles de ARNm sin ser estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ) mientras que a 3 h y 24 h post-inyección los niveles regresan a un estado basal comparables al grupo control.

Para conocer si existe alguna relación con los niveles del ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB y el grado de severidad de discinesias, se realizó una correlación de Spearman con los niveles de ARNm de  $\Delta$ FosB (Fig. 20 A-C) y FosB (Fig. 20 D-F) a los diferentes tiempos y el puntaje de los MIAs obtenidos en la última sesión de evaluación (día 15 de tratamiento). El valor de  $r$  puede ser de -1 a +1, cuando el valor de  $r$  es muy cercano a cero, no existe correlación, mientras que el valor de  $r$  se aleja del cero existe correlación y el signo, indica la dirección de dicha correlación. En la Fig. 20 A) se muestra que hay una correlación positiva y significativa ( $p = 0.02$ ) entre los niveles de ARNm de  $\Delta$ FosB a 1 h post-inyección de la última dosis de Levodopa y el puntaje de MIAs. En la Fig. 20 D) se muestra que hay correlación positiva y significativa ( $p = 0.02$ ) entre los niveles de ARNm de FosB a 1 h post-inyección de la última dosis de Levodopa y el puntaje de MIAs. Mientras que no hay correlación entre los niveles de ARNm de  $\Delta$ FosB a las 3 h y 24 h (Fig. 20 B-C), este mismo efecto se encontró entre los niveles de ARNm de FosB a las 3 h y 24 h y el puntaje de MIAs (Fig. 20 E-F).

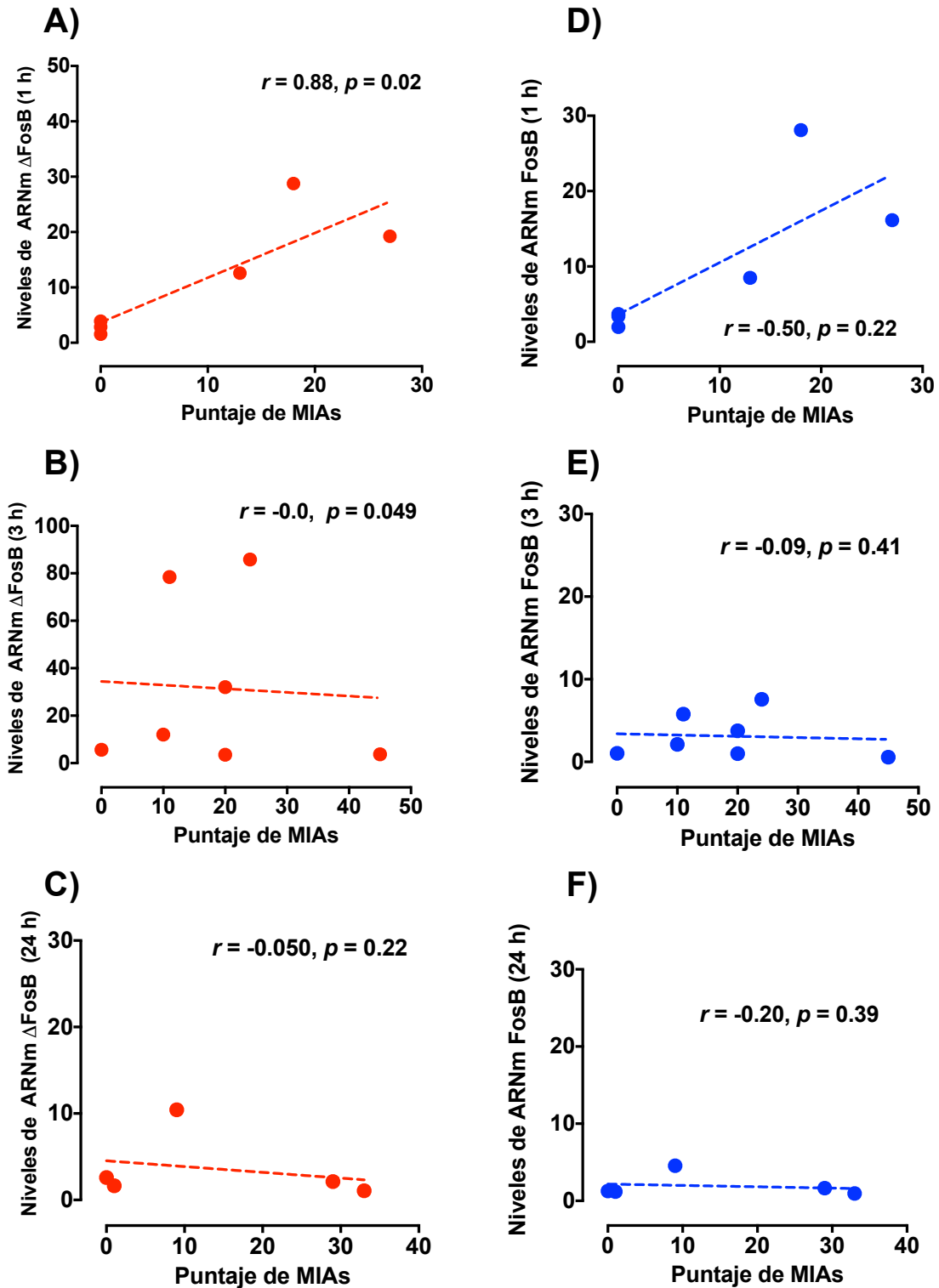
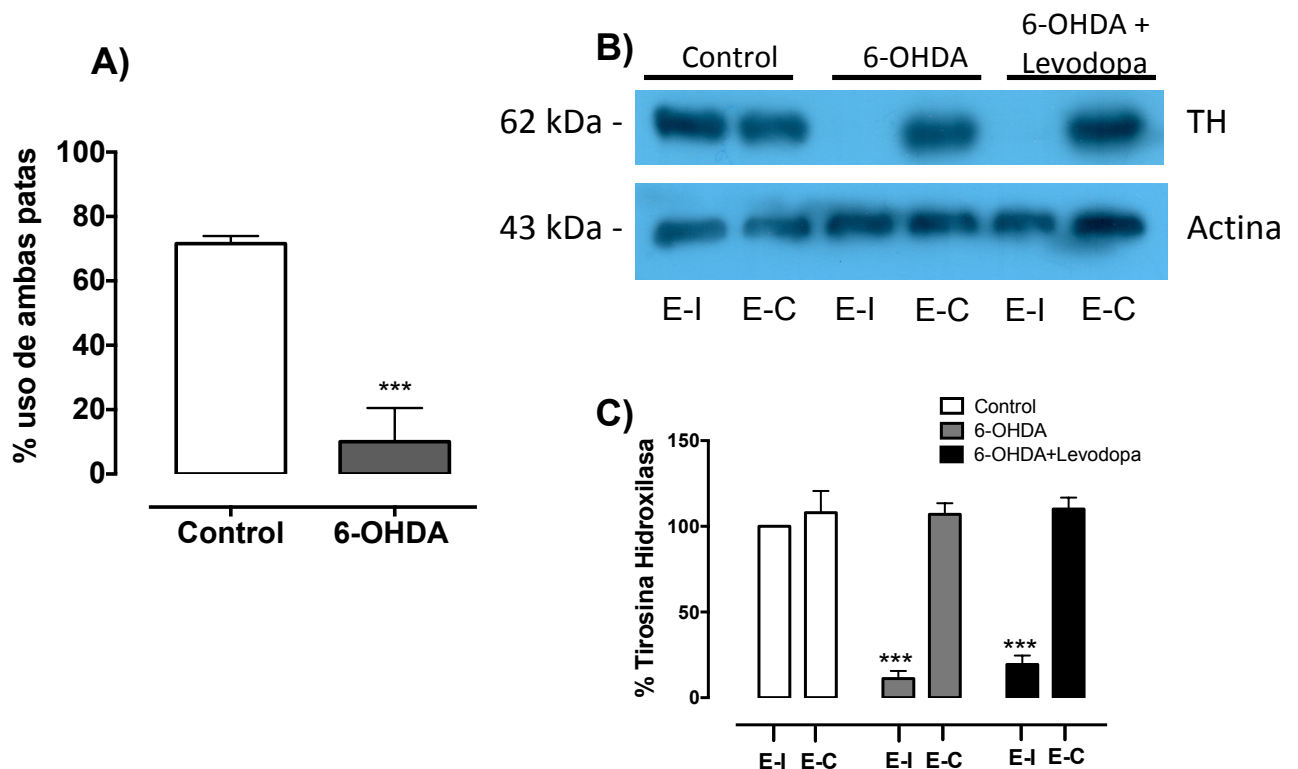


Figura 20. Los niveles de ARNm de  $\Delta$ FosB se correlacionan con la severidad de las discinesias en ratas. Se muestra en A) - C) la correlación con los niveles del ARNm de  $\Delta$ FosB a las diferentes horas y el puntaje de los movimientos involuntarios anormales (MIAs) y la relación entre los niveles del ARNm de FosB y los MIAs en D) - F). Correlación de Spearman, correlación significativa  $p < 0.05$ .

### 6.3 Evaluación de la expresión de SRF en estriado después de un tratamiento agudo de Levodopa en ratas hemiparkinsonianas

A los 8 días post-inyección de la 6-OHDA en la vía nigroestriatal, las ratas se evaluaron en el modelo del cilindro para determinar el grado de lesión dopaminérgica, se cuantificó el % de uso de ambas patas. En la Fig. 21 A) se muestra que el grupo 6-OHDA ejecuta un 10 % en el uso de ambas patas, mientras que el grupo control presenta un 71 % en el uso de ambas patas ( $***p < 0.001$ ), indicando que el grupo 6-OHDA presenta un 90 % de muerte neuronal en la sustancia nigra *pars compacta* de forma unilateral según (Decressac y cols., 2012), por lo tanto estos animales cumplen con el criterio de inclusión para la fase de tratamiento con Levodopa (10 mg/kg i.p) que inicio el día 10 post-cirugía.



**Figura 21. La inyección de la 6-OHDA en la vía nigroestriatal induce la asimetría motora y disminución de la TH en el estriado ipsilateral.**

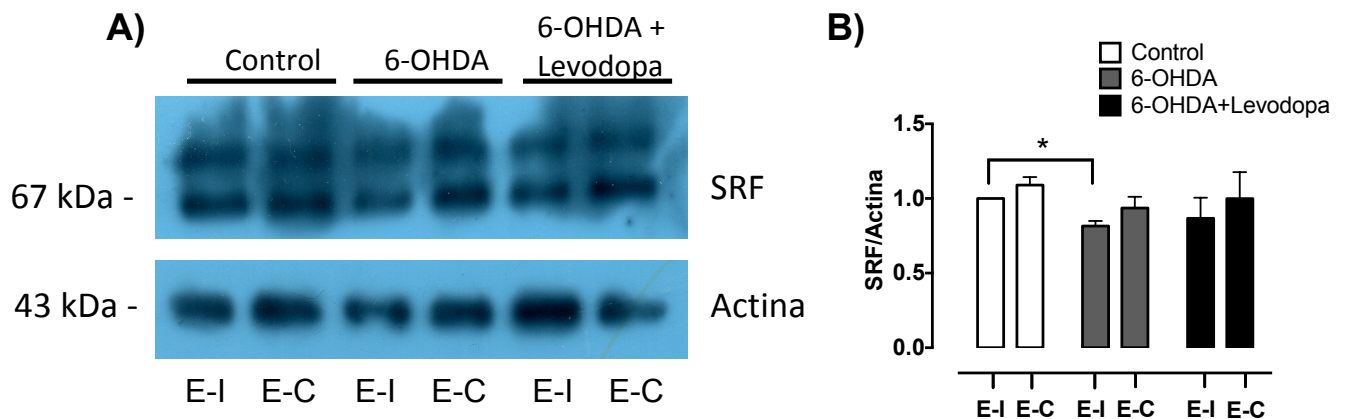
La gráfica A) muestra el % de uso de ambas patas 8 días post-cirugía tanto en el grupo control (n=5) como en el grupo 6-OHDA (n=8) y en B se muestra la expresión de tirosina hidroxilasa determinada por Western-Blot en extractos citoplásmicos de estriado dorsolateral de ratas y en C la cuantificación de TH tanto en el estriado ipsilateral y contralateral en los tres grupos experimentales (n = 4) (Kruskall-Wallis test,  $*** p < 0.001$ ).

El tratamiento agudo consta de una sola inyección de Benzeracida (12 mg/kg, i.p.) 20 minutos antes de la única dosis de Levodopa (10 mg/kg, i.p.) o SSI al día 10 post-cirugía. Se les realizó eutanasia 60 min después de la administración de Levodopa para extraer el cerebro y diseccionar la porción dorsolateral del estriado ipsilateral y contralateral. Con el tejido se realizó un extracto citoplásmico y nuclear para la determinación de tirosina hidroxilasa (TH) y el factor de respuesta a suero (SRF) respectivamente por western-blot.

Se muestra en la Fig. 21 B-C) la expresión de TH (62 kDa) en la porción dorsolateral del estriado ipsilateral y contralateral. En el grupo control se muestra expresión de TH en ambos estriados, mientras que en el grupo 6-OHDA se encontró que en el estriado ipsilateral disminuyó un 90% la expresión de TH mientras en comparación al estriado contralateral, este efecto se observa también en el grupo 6-OHDA+Levodopa, la expresión de TH disminuye un 85 % en el estriado ipsilateral (\*\* $p < 0.001$ ), lo que indica una denervación dopaminérgica en el estriado dorsolateral 10 días post-inyección de la 6-OHDA en la vía nigroestriatal y se correlaciona con la asimetría motora que se evidenció con la prueba del cilindro (Fig. 21 A).

En la Fig. 22 A-B) se muestra la determinación de SRF (67 kDa) en extractos nucleares de la porción dorsolateral del estriado ipsilateral y contralateral de ratas hemiparkinsonianas que se les administró una única dosis de L-DOPA. Se observa que SRF se expresa en el grupo Control tanto en el estriado ipsilateral y contralateral, mientras que en el grupo 6-OHDA en el estriado ipsilateral se observa disminución del 19 % de SRF con respecto al lado ipsilateral del grupo control (\*  $p < 0.05$ ), este mismo efecto se observa en el grupo 6-OHDA+Levodopa en el estriado ipsilateral aunque no es estadísticamente significativo.



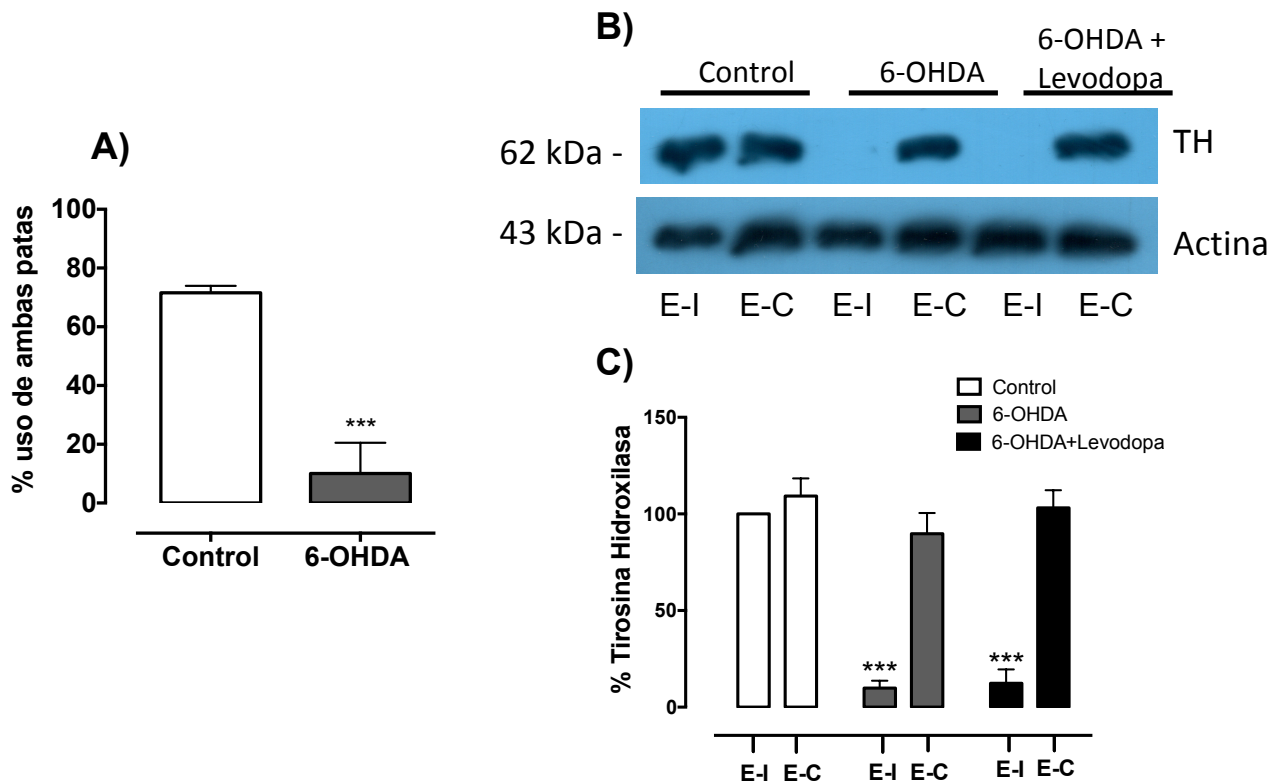


**Figura 22. La denervación dopaminérgica en el estriado induce disminución en la expresión de SRF.** En A se muestra la expresión de el factor de respuesta a suero (SRF, 67 kDa) en extractos nucleares del estriado dorsolateral a 1 h posteriores a la única inyección de L-DOPA (10 mg/kg, i.p) o SSI, y en B se muestra el índice de expresión de SRF con respecto a actina ( $n = 4$ ) (Mann-Whitney test,  $*p < 0.05$ ).

#### 6.4 Evaluación de la expresión de SRF en estriado después de un tratamiento crónico de Levodopa en ratas discinéticas

El día 16 se administró Levodopa y a los 60 minutos posteriores se realizó eutanasia a las ratas para extraer el cerebro y disecar la porción dorsolateral del estriado. Con el tejido se realizó un extracto citoplásmico para la determinación de TH y un extracto nuclear para determinar pSer103-SRF y SRF total. En la Fig. 23 A) se muestra que el grupo 6-OHDA tiene un 13 % de uso de ambas patas, mientras que el grupo control presenta un 75 % en el uso de ambas patas ( $***p < 0.001$ ),

En la Fig. 23 B-C se muestra la expresión de TH en la porción dorsolateral del estriado ipsilateral y contralateral. Se observa que en los grupos 6-OHDA+SSI y 6-OHDA+Levodopa disminuye la expresión de TH un 89 % y 88 % respectivamente en el estriado ipsilateral con respecto al lado contralateral ( $*** p < 0.001$ ). Estos resultados indican que las ratas discinéticas presentan denervación dopaminérgica de la porción dorsolateral del estriado ipsilateral.



**Figura 23. La inyección de la 6-OHDA en la vía nigroestriatal induce asimetría motora y disminución de la TH en el estriado ipsilateral.**

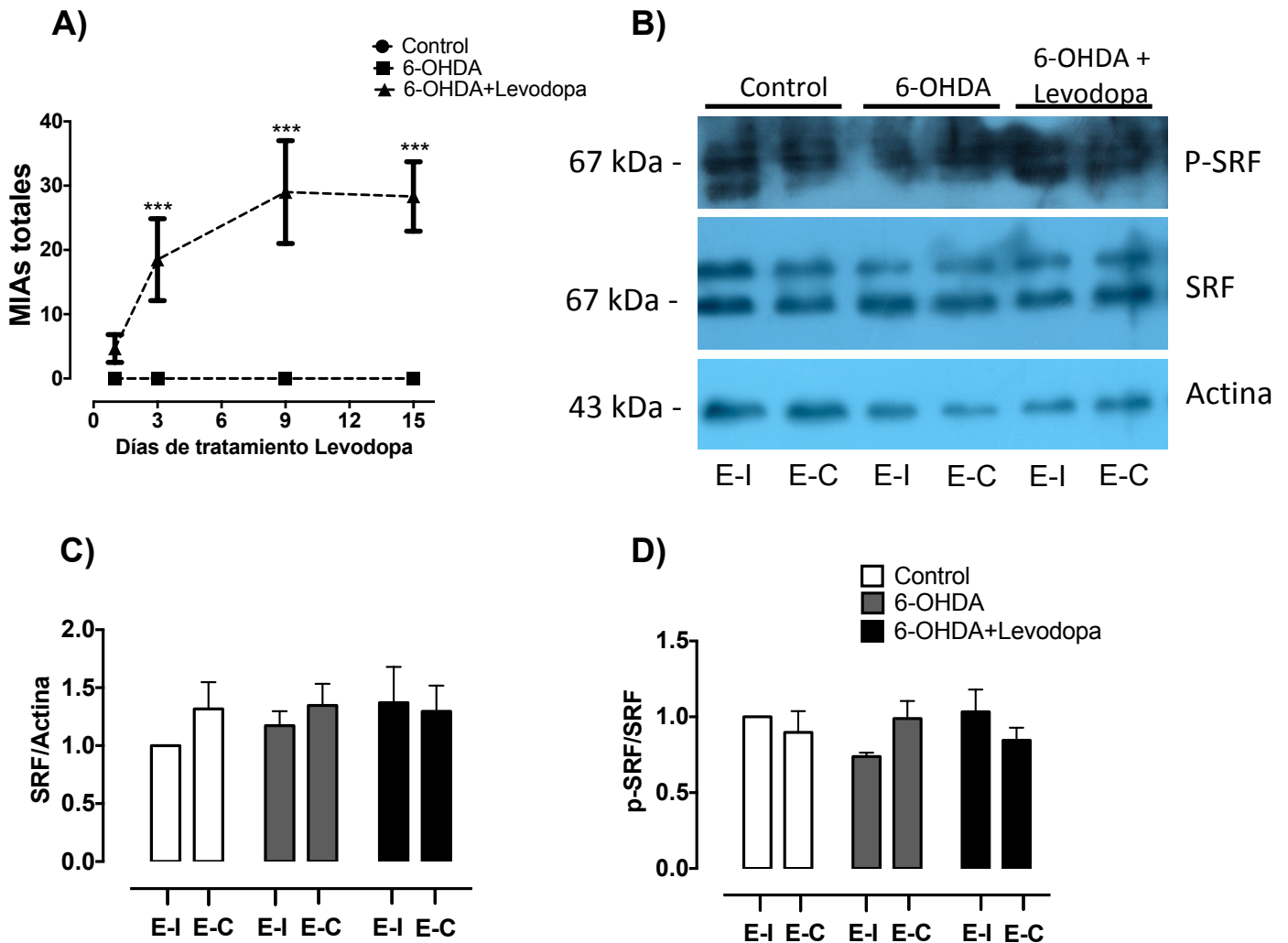
La gráfica A) muestra el % de uso de ambas patas 8 días post-cirugía tanto en el grupo control (n=5) como en el grupo 6-OHDA (n=8). En B se muestra la expresión de TH y en C se muestra la cuantificación de TH en el estriado dorsolateral ipsilateral y contralateral de cada uno de los grupos experimentales (n = 4) (Kruskal-Wallis test, \*\*\* p < 0.001).

El tratamiento crónico con levodopa inicio el día 10 post-cirugía con una administración diaria de Benzeracida (12 mg/kg, i.p.) 20 minutos antes de la dosis de L-DOPA (10 mg/kg, i.p.) o SSI. Se registraron los MIAs los días 1, 3, 9 y 15 de tratamiento.

En la Fig. 24 A) se muestra los MIA totales (suma del puntaje de los movimientos orolingual + axial + miembro) por cada sesión de evaluación, se observa que desde el día 3 el puntaje de los MIAs incrementa con respecto al grupo 6-OHDA que solo recibió SSI (\*\*p<0.001) y en la última sesión (día 15) se muestra el grado máximo de severidad de MIAs (\*\*p<0.001) con respecto al grupo 6-OHDA.

En la Fig. 24 B) se muestra una fotografía del WB para la determinación de p-SRF en Ser 103 y SRF total en el estriado ipsilateral y contralateral para los tres grupos experimentales. Además en la Figura 24 C) se muestra el índice de expresión entre SRF y actina, se observa que no existe cambios significativos en la expresión de SRF en

el estriado dorsolateral entre los diferentes grupos experimentales. En la Fig. 24 D) se muestra el índice de expresión entre p-SRF y SRF, el grupo Control revela un grado de fosforilación basal en ambos estriados, mientras que en el grupo 6-OHDA+SSI se observa disminución del 26 % del índice p-SRF/SRF en el estriado ipsilateral con respecto al lado contralateral. En el grupo 6-OHDA+Levodopa se observa una recuperación de la actividad de SRF en el estriado ipsilateral.



**Figura 24. La administración crónica de levodopa recupera los niveles de p-SRF en estriado de ratas discinéticas.**

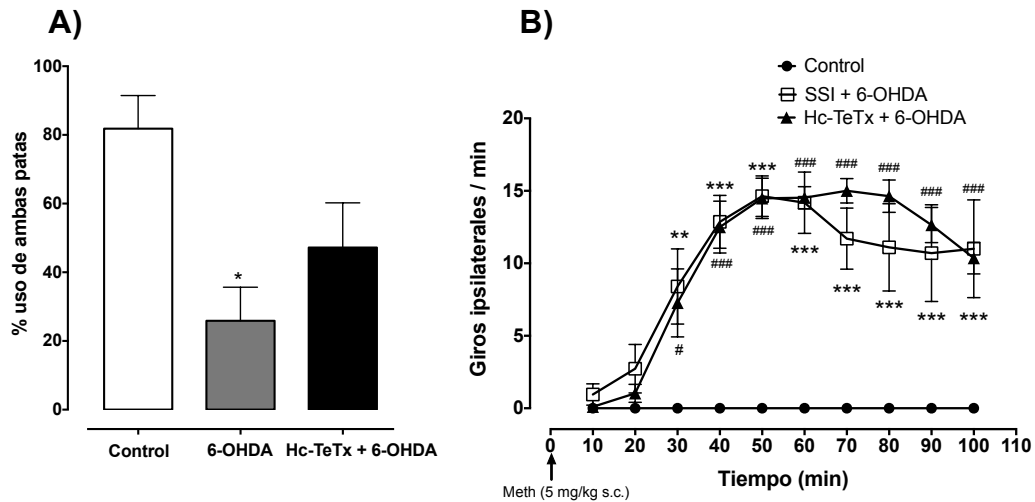
En la gráfica A se muestra los MIAs totales (suma del puntaje de los tres movimientos: orolingual, axial y de miembro) por cada sesión de evaluación (2 h posteriores a la inyección de L-DOPA (10 mg/kg i.p)). ANOVA de dos vías, \*\*\* $p < 0.001$  vs 6-OHDA ( $n = 7$ ). En A) se muestra la fotografía de la determinación de pSer103-SRF y SRF total por WB (67 kDa) en extractos nucleares de estriado dorsolateral ipsilateral y contralateral de ratas discinéticas. En la gráfica B) se muestra el promedio  $\pm$ ESM del índice de expresión entre pSer103-SRF y SRF total para cada uno de los grupos experimentales ( $n=3$ ), en la gráfica C) se muestra el promedio  $\pm$ ESM del índice de expresión entre SRF y actina total para cada uno de los grupos experimentales ( $n=3$ ).

## **6.5 Pre-tratamiento con el fragmento Hc-TeTx en un modelo de discinesias en rata**

### **6.5.1 El fragmento Hc-TeTx no atenúa la asimetría motora en ratas con inyección unilateral de 6-OHDA en la vía nigroestriatal.**

Se realizó la administración intramuscular del fragmento Hc-TeTx tres días previos a la inyección de la neurotoxina 6-OHDA, a los 8 días post-cirugía se evaluó en el modelo del cilindro la asimetría motora, como se observa en la Fig. 25 A) el grupo 6-OHDA disminuye significativamente el porcentaje de uso de ambas patas hasta un 25 %, mientras que el grupo vehículo mantiene un porcentaje de uso de ambas patas de un 80 %. En el grupo Hc-TeTx + 6-OHDA se observa una tendencia a recuperar el porcentaje de uso de ambas patas alcanzando el 40 %, aunque no es estadísticamente significativo al compararse con el grupo 6-OHDA.

Por otra parte, a los 9 días post-cirugía se evaluó la conducta de giro inducida con metanfetamina, esta prueba evidencia si hay una lesión dopaminérgica unilateral, ya que a través del mecanismo de acción de la metanfetamina induce liberación de dopamina en el hemisferio no lesionado induciendo una conducta rotatoria ipsilateral. En la Fig. 25 B) se observa que el grupo vehículo no mostró giros ipsilaterales durante el periodo de observación, mientras que el grupo 6-OHDA muestra en promedio 15 giros ipsilaterales entre los 40-60 min posteriores a la administración de metanfetamina. Con lo que respecta el grupo Hc-TeTx+6-OHDA no se observó una disminución de número de giros con respecto al grupo SSI+6-OHDA.

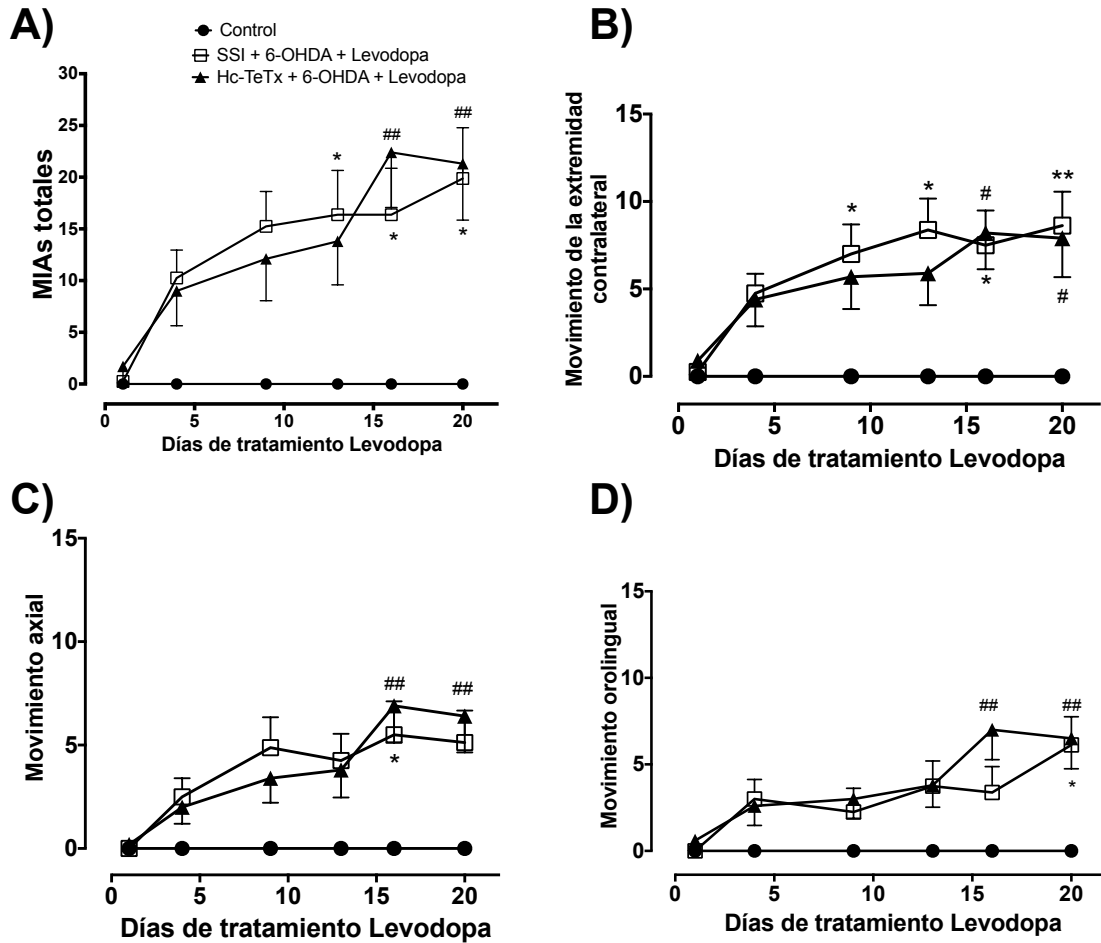


**Figura 25. El pre-tratamiento con el fragmento Hc-TeTx no disminuye la asimetría motora inducida con la inyección de la 6-OHDA.**

En la figura A) se muestra el porcentaje de uso de ambas patas evaluada en el cilindro 8 días post-inyección de la 6-OHDA. ANOVA de una vía, Post-Bonferroni  $*p < 0.05$ . En la gráfica B) se muestra el número de giros ipsilaterales inducidos con la administración de metanfetamina (5 mg/kg s.c) 9 días post-cirugía. ANOVA de dos vías, Post-Tukey  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  vs control,  $#p < 0.05$ ,  $###p < 0.001$  vs control,  $n=7$ .

### 6.5.2 El fragmento Hc-TeTx no atenúa la inducción de discinesias en ratas

El día 10 post-cirugía se inicio la administración de Levodopa diaria durante 20 días y se registró la severidad de los movimientos involuntarios anormales (MIAs) durante el tratamiento con Levodopa. En la Fig. 26 A) se muestra la suma de los tres MIAs y su progresión con respecto a los días de administración de Levodopa, se observa que el grupo Hc-TeTx presenta una disminución de la severidad de los MIAs sin embargo no es estadísticamente significativo con respecto al grupo que solo recibió Levodopa. En la Fig. 26 B) se muestra de forma individual la progresión en el movimiento de la extremidad contralateral, en la Fig. 26 C) se muestra el movimiento axial y en la Fig. 26 D) se muestra el movimiento orolingual del grupo SSI+6-OHDA+Levodopa mostrando incremento significativo con respecto al grupo control ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ) y del grupo Hc-TeTx+6-OHDA+Levodopa ( $#p < 0.05$ ,  $##p < 0.01$  vs Control), sin embargo no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre estos dos grupos experimentales.



**Figura 26. El pre-tratamiento con el fragmento Hc-TeTx no atenúa las discinesias en rata.** En la grafica A) se muestra el curso temporal de la inducción de los tres movimientos (axial, extremidad y orolingual) con respecto a los días de administración de Levodopa (10 mg/kg i.p), en la gráfica B) se muestra el movimiento de la extremidad contralateral, en la grafica C) se muestra la expresión del movimiento axial y en la grafica D) se muestra el desarrollo del movimiento orolingual. ANOVA de dos vías, Post-Tukey \* $p < 0.05$  vs Control, # $p < 0.05$  vs Control, ## $p < 0.01$  vs Control,  $n=7$ .

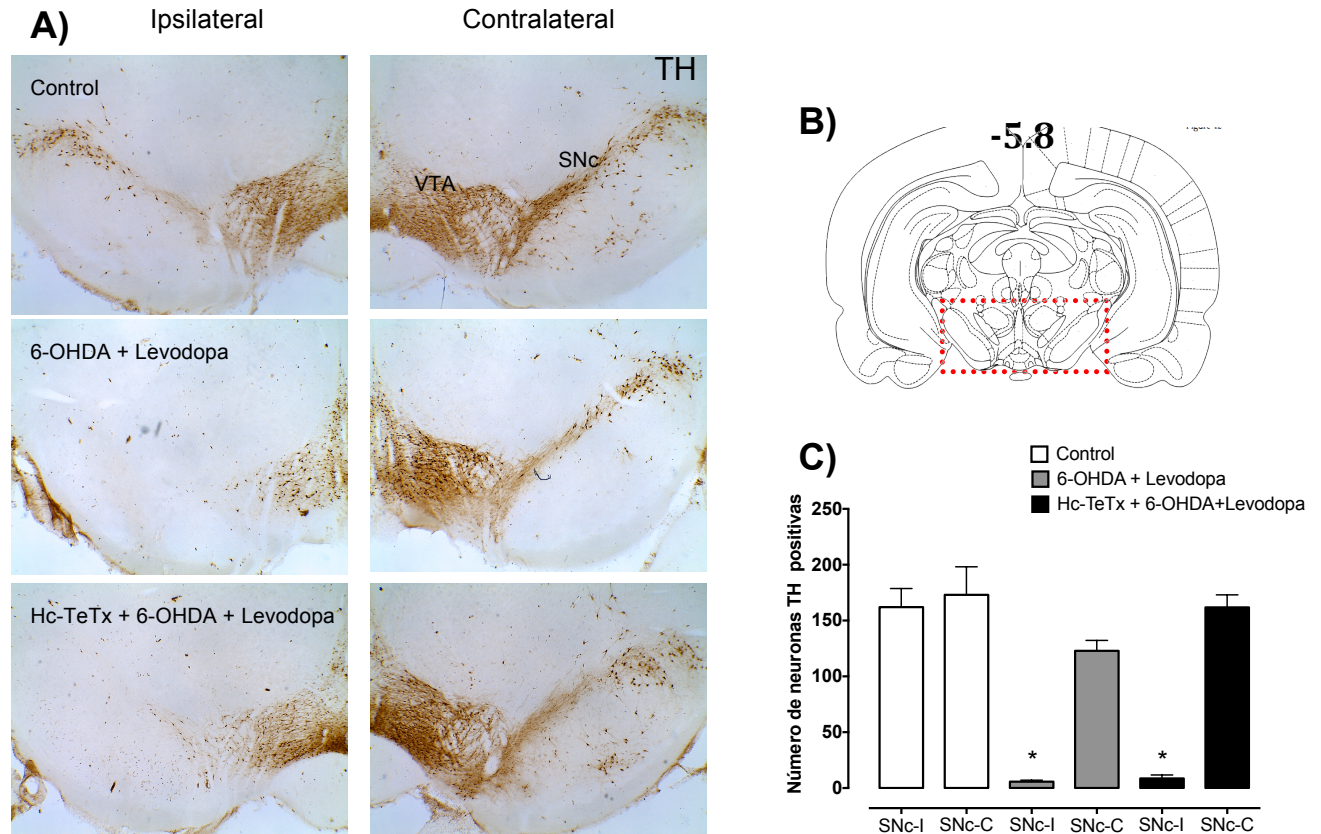
### 6.5.3 El fragmento Hc-TeTx no previene la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc de ratas discinéticas

Al día 30 post-cirugía los animales recibieron la última administración de Levodopa o SSI y se sacrificaron 60 minutos después de la administración, para la obtención del cerebro y realizar los cortes para realizar la inmunohistoquímica para TH y FosB/ $\Delta$ FosB. En la Figura 27 A) se muestra un panel de fotomicrografías de la sustancia nigra pars compacta (SNpc) con inmunotinción para la enzima tirosina hidroxilasa (TH), las neuronas que se tiñen de color marrón son positivas a TH y se consideran que tienen

un fenotipo dopaminérgico, por lo que es una forma de saber si el fragmento Hc-TeTx ejerció algún efecto trófico sobre este sistema. En las fotomicrografías del grupo SSI+6-OHDA+L-DOPA se observa del lado contralateral a la lesión neuronas positivas a TH e incluso se observa fibras en marrón, sin embargo en el lado ipsilateral a la lesión no se logra identificar neuronas positivas a TH en la SNpc, con lo que respecta al grupo Hc-TeTx+6-OHDA+L-DOPA se observa de igual forma en el lado contralateral que hay neuronas positivas a TH, mientras que en el lado ipsilateral se identifican muy pocas neuronas, lo que indica que a pesar de que el fragmento se administró previo a la inyección de la neurotoxina no es capaz de proteger la muerte de neuronas dopaminérgicas. En la figura 27 B) se muestra la cuantificación del número de neuronas positivas a TH en la SNc-I ( $162.0 \pm 16.70$ ) y SNc-C ( $173.0 \pm 25.15$ ) del grupo control sin mostrar cambios estadísticamente significativos, mientras que se observa una disminución estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) en la SNc-I ( $5.71 \pm 1.3$ ,  $8.6 \pm 3.1$ ) con respecto a la SNc-C ( $122.9 \pm 9.3$ ,  $161.8 \pm 11.24$ ) en los grupos 6-OHDA+Levodopa y Hc-TeTx+6-OHDA+Levodopa respectivamente.

#### **6.5.4 El fragmento Hc-TeTx disminuye la expresión de FosB/ $\Delta$ FosB en estriado de ratas discinéticas**

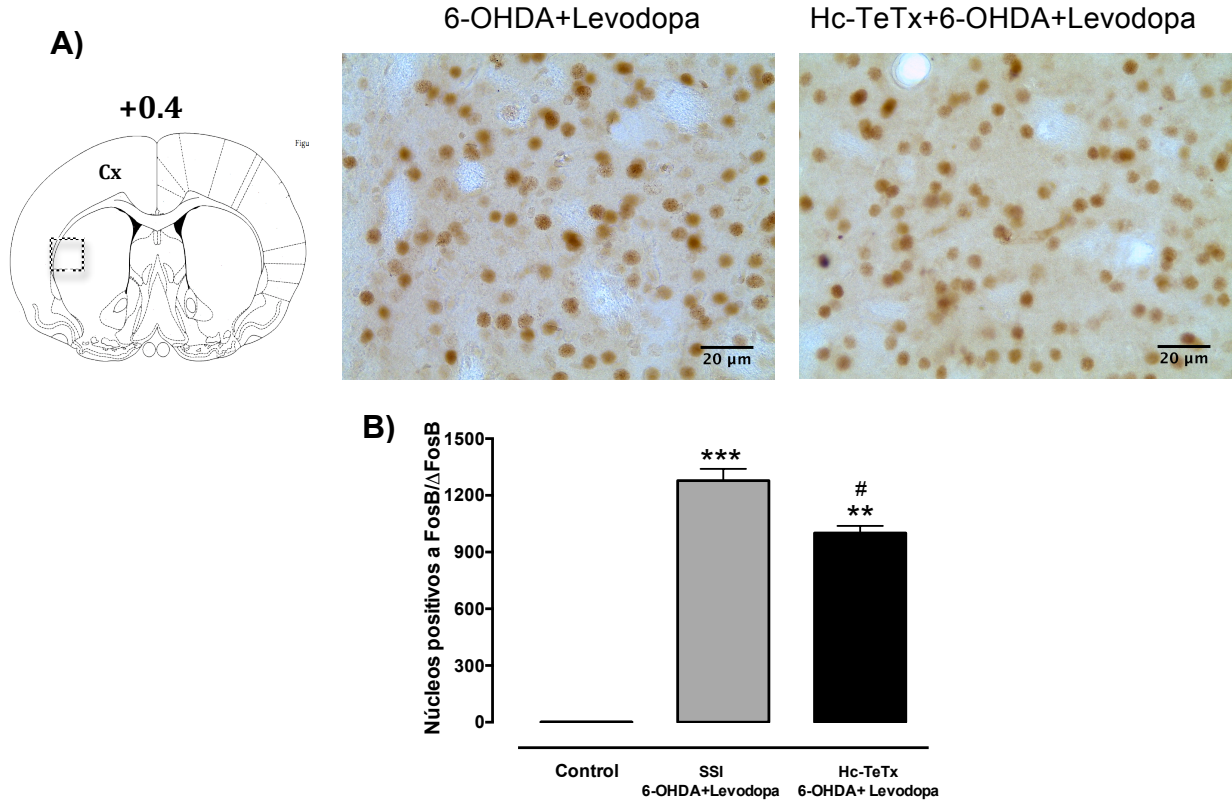
En la figura 28 A) se muestran las fotomicrografías en el estriado dorsal ipsilateral con la inmunohistoquímica FosB/ $\Delta$ FosB la cual es una proteína nuclear y se observa como puntos en color marrón que corresponde a los grupos que recibieron el fragmento Hc-TeTx o SSI, al cuantificar en un área de  $1.27 \text{ mm}^2$  en el estriado dorsal se encontró que el número de núcleos positivos a FosB/ $\Delta$ FosB en el grupo Hc-TeTx+6-OHDA+Levodopa ( $1001 \pm 37$ ) disminuye significativamente ( $\# p < 0.05$ ) con respecto al grupo 6-OHDA+Levodopa ( $1278 \pm 61.65$ ). Aunque los dos grupos experimentales que recibieron Levodopa se observó un incremento significativo ( $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ) con respecto al grupo control como lo muestra la Fig. 28 B.



**Figura 27. El pre-tratamiento con el fragmento Hc-TeTx no previene la muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc en ratas discinéticas.**

En A) se muestra el panel de fotomicrografías de neuronas inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa (TH), que se observan como neuronas en color marrón tanto del lado ipsilateral (SNc-I) y contralateral (SNc-C), en B) se muestra un esquema de un corte coronal de cerebro de rata, en el recuadro en rojo se encuentra la Sustancia nigra compacta (SNc), en la gráfica C) se muestra la cuantificación de neuronas positivas a TH en el área de la SNc, para cada uno de los grupos experimentales. Kruskal- Wallis, Dunn's post-test \*  $p < 0.05$  vs SNc-C. Magnificación 4X.





**Figura 28. El pre-tratamiento con el fragmento Hc-TeTx disminuye los núcleos positivos a FosB/DeltaFosB en el estriado de ratas discineticas.**

En A) se muestra un esquema de un corte coronal de cerebro de rata donde se localiza el estriado, el recuadro en rojo indica el estriado dorsolateral. En las fotomicrografías se muestra la inmunorreactividad para la proteína FosB/ $\Delta$ FosB como núcleos teñidos en café en la región del estriado dorsolateral ipsilateral como lo indica el recuadro en rojo en el esquema del estriado. Magnificación 40X. En B) se muestra la grafica de la cuantificación de los núcleos positivos a FosB/ $\Delta$ FosB en un área de 1.27 mm<sup>2</sup> del estriado dorsal. Kruskal Wallis, Dunn's test, \*\*p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 vs Control. t-student # p<0.05 vs SSI+6-OHDA+Levodopa.

## 7. DISCUSIÓN

El estudio de las discinesias en modelos experimentales se puede abordar de distintas formas: observando los cambios neuroquímicos que pudieran dar origen a las discinesias, tanto *in vivo* como *in vitro*. A través de diversos estudios ahora se conocen que se alteran los sistemas de neurotransmisión dopaminérgico, glutamatérgico, GABAérgico, endocanabinoide y nitrérgico en el desarrollo de las discinesias, estableciendo cambios neuronales estables, lo que se correlaciona ampliamente con cambios transcripcionales principalmente en el estriado (Heiman et al., 2014).

En el presente estudio se evaluó el gen *fosB* a nivel del ARNm en el estriado después de un tratamiento agudo, sub-crónico y crónico con levodopa en ratas hemiparkinsonianas, se encontró que la expresión a nivel del ARNm tanto de la isoforma de  $\Delta$ FosB y FosB en el estriado es de forma diferencial, y que los niveles de ARNm en el estriado después de un tratamiento crónico correlacionan positivamente con la severidad de las discinesias. En el mismo sentido, a pesar de que la expresión de la proteína  $\Delta$ FosB se ha considerado como un marcador discinetogénico se ha abordado muy poco sobre sus reguladores transcripcionales, por lo que se evaluó la expresión de SRF en el estriado durante un tratamiento agudo y crónico, se mostró que la denervación dopaminérgica afecta la expresión de SRF de forma transitoria, además mostramos que después de un tratamiento crónico con levodopa se restablece la actividad de SRF mediada a través de la fosforilación en Ser103 en el estriado de ratas discinéticas.

Con estos resultados se dan evidencias de que los cambios neuroquímicos se inician desde la primera administración de la levodopa, por lo que se evaluó el efecto del fragmento recombinante del Hc-TeTx administrado previo a la lesión dopaminérgica y el tratamiento crónico con levodopa, en este experimento se mostró que la actividad trófica del Hc-TeTx no es suficiente para atenuar completamente la aparición de las discinesias, aunque si se observa una disminución en la expresión de  $\Delta$ FosB en el estriado dorsal.

### 7.1 Experimentos in-vitro

La idea principal de inducir  $\Delta$ FosB *in vitro* en cultivos neuronales de estriado, sin alejarnos del estudio del papel de  $\Delta$ FosB en el fenómeno *in vivo* de las discinesias inducidas por L-DOPA, es disponer de una herramienta útil que nos permita describir

cuales son los posibles mecanismos moleculares implicados en la regulación de la expresión de FosB/ $\Delta$ FosB en etapas temprana.

La inducción *in vivo* de  $\Delta$ FosB en el estriado se ha atribuido en mayor parte al estímulo postsináptico de receptores dopaminérgicos (RD1) por el tratamiento crónico con levodopa (Darmopil et al., 2009). Mientras que *in vitro* se ha descrito la expresión de FosB/ $\Delta$ FosB a través de un vector en la línea celular PC12 (Ulery et al., 2006, Ulery and Nestler, 2007), o en cultivos primarios estriatales, donde se estimula la expresión de FosB a través de un agonista dopaminérgico (SKF-82958) (Engeln et al., 2016).

Sin embargo, con el presente experimento *in vitro* tratamos de inducir la expresión de FosB/ $\Delta$ FosB de una forma homologa a lo que ocurre *in vivo*, es decir incubar el cultivo neuronal con DA. Los resultados del doble marcaje (NeuN y FosB/ $\Delta$ FosB) en los cultivos tratados a diferentes concentraciones de DA, revelan que no solo en las neuronas se expresa FosB/ $\Delta$ FosB, lo cual indica que otras células como la microglia podría expresar FosB/ $\Delta$ FosB como lo muestra (Nomaru et al., 2014). No obstante no encontramos una diferencia significativa entre el número de neuronas positivas a FosB/ $\Delta$ FosB tratadas y las Control, a los 30 minutos posteriores a la incubación con las diferentes concentraciones de DA. Aunque a través de western-blot de forma cualitativa podemos observar una tendencia a incrementar la expresión de ambas isoformas FosB y  $\Delta$ FosB dependiente de la concentración de DA.

Al evaluar la respuesta de los cultivos incubados con DA a diferentes concentraciones y 24 h después, se encontró que no hay cambios significativos en el número de neuronas positivas a FosB/ $\Delta$ FosB, sin embargo se observó afectada la citoarquitectura de las células tratadas con la concentración más alta de DA (10 nM), lo cual podría indicar un efecto citotóxico de la DA a esa concentración y 24 h después. Mientras que de forma cualitativa se observa en el correspondiente WB, como en la concentración más baja de DA (0.1 nM) hay una mayor expresión de ambas isoformas FosB y  $\Delta$ FosB. A pesar de que se estimuló con DA en este sistema *in vitro*, la respuesta post-sináptica al tratamiento con Levodopa *in vivo*, esta condicionada por una denervación dopaminérgica inicial que en este tipo de cultivo no es posible realizarlo.

## 7.2 Experimentos *in-vivo*

Se ha determinado *in-vivo*, en modelos de discinesias que uno de los marcadores discinetogénicos más prominentes es la sobre expresión de la proteína  $\Delta$ FosB en el estriado e incluso en otras estructuras cerebrales después de un tratamiento crónico (Bastide et al., 2014, Bastide et al., 2016), dependiente de la activación del receptor D1 en el estriado (Darmopil et al., 2009, Corvol et al., 2004), de la sensibilización de la adenilato ciclasa V/VI (Rangel-Barajas et al., 2011), la activación de la PKA (Lebel et al., 2010), la fosforilación de proteínas como DARPP-32, ERK 1/2 y la activación de factores de transcripción como CREB (Fig. 29), sin embargo no se han descrito del todo los mecanismos moleculares que subyacen el desarrollo de las discinesias causadas por el tratamiento con levodopa.

En este estudio se evaluó los niveles del ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB bajo tres regímenes de tratamiento con levodopa; agudo, sub-crónico y crónico, a diferentes tiempos 1 h, 3 h y 24 h post-inyección, con esto se pretende conocer como es la cinética de transcripción del ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB *in vivo* después de la administración de Levodopa y relacionarla si es posible con la aparición de las discinesias.

Los resultados indican que a los 60 minutos después de la única dosis de levodopa se induce la transcripción del ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB de forma exacerbada en el estriado denervado de ratas hemiparkinsonianas. Mientras que a las 3 h se muestra una disminución de los niveles del ARNm con respecto a la primera hora y a las 24 h post-inyección, los niveles del ARNm son muy similares al grupo control. Estos datos concuerdan con que el mayor flujo de DA en el estriado inducido por la administración de Levodopa exógena es entre los 40-60 minutos post-inyección, mientras que a los 180 minutos no es detectable la DA en el estriado ipsilateral de ratas con lesión dopaminérgica (Lindgren et al., 2010). Por lo que se sugiere que a las 3 horas ha cesado el estímulo para la síntesis del ARNm, es decir la DA sintetizada a partir de la levodopa exógena, incluso es probable que el sistema degradación del ARNm se encuentre participando en la regulación de los niveles del ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por (Valastro et al., 2007), donde se muestra que tres horas después de una administración aguda de Levodopa induce un incremento del ARNm de  $\Delta$ FosB en el estriado denervado, observado por hibridación *in*

*situ*, mientras que en la administración crónica es ligeramente detectable el ARNm en el estriado denervado. Esto sugiere que el efecto de la re-perfusión de DA inducida por la administración de Levodopa exógena, en un sistema sensibilizado debido a la pérdida de fibras nigro-estriatales condiciona a una hiper-respuesta de las neuronas dopaminocéptivas.

Sin embargo el efecto sobre los niveles del ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB después de una administración sub-crónica con Levodopa cambian con respecto a la administración aguda de Levodopa, se observó una ligera inducción del ARNm de  $\Delta$ FosB en las primeras 3 horas que aunque es significativo, la respuesta no es de la misma magnitud, que en la primera administración de levodopa. Este mismo efecto de atenuación a la respuesta de Levodopa en un tratamiento sub-crónico se ha observado sobre la transcripción del ARNm de Zif-268, el cual también pertenece a la familia de los IEGs (Carta et al., 2005).

Aunque aún no es claro el mecanismo por el cual hay un efecto de atenuación, se han observado niveles altos de la proteína  $G_{\alpha\text{olf}}$  en pacientes con EP y en el estriado ipsilateral de ratas hemiparkinsonianas, sin embargo el tratamiento con Levodopa o agonistas D1 normalizan los niveles de la proteína  $G_{\alpha\text{olf}}$  en ratas hemiparkinsonianas (Corvol et al., 2004, Rangel-Barajas et al., 2011). Esto podría explicar porque después de un tratamiento sub-crónico con Levodopa, la respuesta dependiente de la señalización del receptor D1 no es la misma y los niveles de ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB se encontraron disminuidos con respecto a la primera administración.

Por otra parte después de un tratamiento crónico con Levodopa encontramos que en las primeras tres horas los niveles de ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB están incrementados significativamente aunque lo interesante es que no se encontraron en la misma magnitud que con una sola administración de Levodopa. Esto sugiere que la acumulación de proteínas que se ha reportado ampliamente en un tratamiento crónico no se debe a la estabilidad sostenida del ARNm, si no a la síntesis de la proteína cada vez que se administra Levodopa. Porque independientemente del tratamiento ya sea agudo, sub-crónico o crónico de Levodopa los niveles del ARNm 24 h después de la última dosis regresan a los niveles basales como los grupos controles.

Con la administración crónica de Levodopa dentro de una población total de ratas no todas manifiestan el mismo grado de severidad de MIAs a pesar de que tengan el mismo grado de denervación dopaminérgica (Rangel-Barajas et al., 2011), este mismo fenómeno sucede en los pacientes parkinsonianos tratados con Levodopa (Manson et al., 2012). Por lo tanto realizamos una correlación de *Spearman* para saber si los niveles de ARNm detectados después de un tratamiento crónico con Levodopa correlacionan con la severidad de las discinesias de las ratas, los resultados muestran una correlación positiva entre los niveles de ARNm  $\Delta$ FosB detectados 1 h post-inyección con el puntaje de MIAs cuantificado en la última sesión el día 15 de tratamiento con Levodopa.

Al analizar estos datos se puede observar que las ratas que presentan bajo puntaje en los MIAs que se consideran como no-discinéticas presentan muy bajos niveles de ARNm de  $\Delta$ FosB mientras que en las ratas discinéticas se detectan los mayores niveles de ARNm de  $\Delta$ FosB. Según evidencias clínicas (de la Fuente-Fernández et al., 2004, Pavese et al., 2006) se ha establecido que la Levodopa induce un flujo de DA mayor en sujetos discinéticos en comparación a los casos no-discinéticos, y a nivel experimental se ha sugerido que lo que contribuye predominantemente a esta diferencia es la cantidad de DA liberada de axones serotoninérgicos (Lindgren et al., 2010).

Estos resultados revelan el potencial clínico de alguna intervención que tenga como objetivo reducir la actividad del gen *fosB* y sobre todo desde el inicio del tratamiento, las discinesias se manifiestan en etapas crónicas del tratamiento con Levodopa, sin embargo es desde las etapas iniciales que se gestan cambios neuroquímicos que podrían condicionar la aparición y severidad de las discinesias a largo plazo. Prevenir la expresión de  $\Delta$ FosB desde el inicio del tratamiento evitaría alteraciones de cada una de las proteínas que se ven afectadas por el factor de transcripción  $\Delta$ FosB.

Además falta aún por describir los factores que regulan la síntesis del ARNm de  $\Delta$ FosB y FosB, se sabe que en la región promotora del *gen fosB* se localizan por lo menos dos elementos importantes de respuesta, el CRE y SRE (Lazo et al., 1992), en el presente proyecto se evaluó si la denervación dopaminérgica y el tratamiento agudo o crónico con Levodopa podría modular la actividad o expresión de SRF en la porción dorsal del estriado de ratas.

Encontramos que SRF se expresa de forma constitutiva en el estriado como lo revela el grupo control, sin embargo en el grupo 6-OHDA a los 10 días post-inyección, se observa una disminución en la expresión de SRF en el estriado denervado. Se ha mostrado en cultivos neuronales que el BDNF y el propio SRF regula positivamente su expresión (Kalita et al., 2006). También se ha mostrado que la denervación causada por 6-OHDA disminuye la expresión de BDNF lo cual se correlaciona con la disminución que encontramos en la expresión de SRF total en el estriado denervado del grupo 6-OHDA.

Además se sabe que el déficit de dopamina en el estriado altera la señalización glutamatérgica, incluso se ha descrito que existe retracción dendrítica en ambos tipos de neuronas espinosas medianas en el estriado (Solis et al., 2007, Suarez et al., 2016, Suárez et al., 2014). Se ha descrito en otras regiones cerebrales como el hipocampo y núcleo *accumbens* que SRF participa en la génesis de espinas dendrítica (Ramanan et al., 2005, Cahill et al., 2017) esto sugiere que la denervación dopaminérgica altera la expresión de SRF y por lo tanto podría afectar la plasticidad sináptica en el estriado.

Por otra parte en el grupo que recibió la única dosis de Levodopa observamos que no se modificó la expresión de SRF, sin embargo se sugiere que al restablecerse por primera vez la transmisión dopaminérgica por la Levodopa exógena podría inducirse la fosforilación en Ser 103 en SRF para incrementar la afinidad por el ADN y se correlacionaría con el incremento en la síntesis del ARNm de  $\Delta$ FosB que encontramos en el estriado denervado a los 60 min posteriores a la primera inyección de Levodopa.

Sin embargo cuando determinamos el ARNm de  $\Delta$ FosB en el estriado de ratas discinéticas encontramos que se sigue produciendo el ARNm de  $\Delta$ FosB después de la administración de Levodopa, aunque no en la misma magnitud de la primera dosis. Al evaluar la actividad de SRF determinada la pSer103-SRF en el grupo lesionado se observa una disminución en el estriado denervado, sin embargo en el grupo que recibió el tratamiento crónico de Levodopa observamos un restablecimiento de la pSer103-SRF en el estriado denervado. Esto sugiere que la señalización post-sináptica activada por DA participa en la fosforilación de SRF y por lo tanto incrementa la afinidad por el DNA para regular la expresión de genes como *FosB* como se ha mostrado en el núcleo *accumbens* que en procesos de adicción, SRF es necesario para la inducción de  $\Delta$ FosB (Vialou et al., 2012). Mientras que la expresión de SRF total en las ratas lesionadas y en

las ratas discinéticas es muy similar al de el grupo control tanto en el lado ipsilateral como contralateral, 26 días post-inyección de 6-OHDA.

Con estos experimentos mostramos que la fosforilación de SRF esta modulada por la administración crónica de Levodopa en el estriado denervado, sin embargo desconocemos cual es la cinasa que fosforila a SRF, podrían ser la proteína GSK3- $\beta$  o la proteína cinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina (CaMKII), las cuales se ha mostrado que fosforilan a SRF en Ser 103 en hipocampo y en células PC12 respectivamente (Li et al., 2014, Misra et al., 1994), sin embargo se desconoce si estas cinasas son capaces de fosforilar a SRF en el estriado aunque sí se sabe que estas cinasas participan en el desarrollo de las discinesias (Morissette et al., 2010, Ba et al., 2011) (Fig. 29).

Por otra parte, si la actividad del gen *fosB* se altera desde la primera administración de levodopa, es necesario que las alternativas terapéuticas consideren dicho aspecto. A través de varios estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha determinado que el fragmento Hc-TeTx ejerce un efecto trófico en modelos de toxicidad dopaminérgica, y podría ser administrado como terapia adjunta con Levodopa para retardar la aparición de MIAs en ratas con lesión dopaminérgica y al mismo tiempo mejora la actividad motora.

Estudios *in-vivo* mostraron que el fragmento Hc-TeTx administrado en el estriado (Mendieta et al., 2009) y periféricamente en el músculo *gastrocnemius* previo al daño dopaminérgico, mejora la actividad motora y se correlaciona con la preservación de DA en el estriado (Mendieta et al., 2012). Por otra parte, cuando este fragmento se administra en el músculo *gastrocnemius* posterior a una lesión dopaminérgica en el estriado, evita la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la SNc causada por la 6-OHDA, y el déficit motor en las ratas (Sánchez-González et al., 2014).

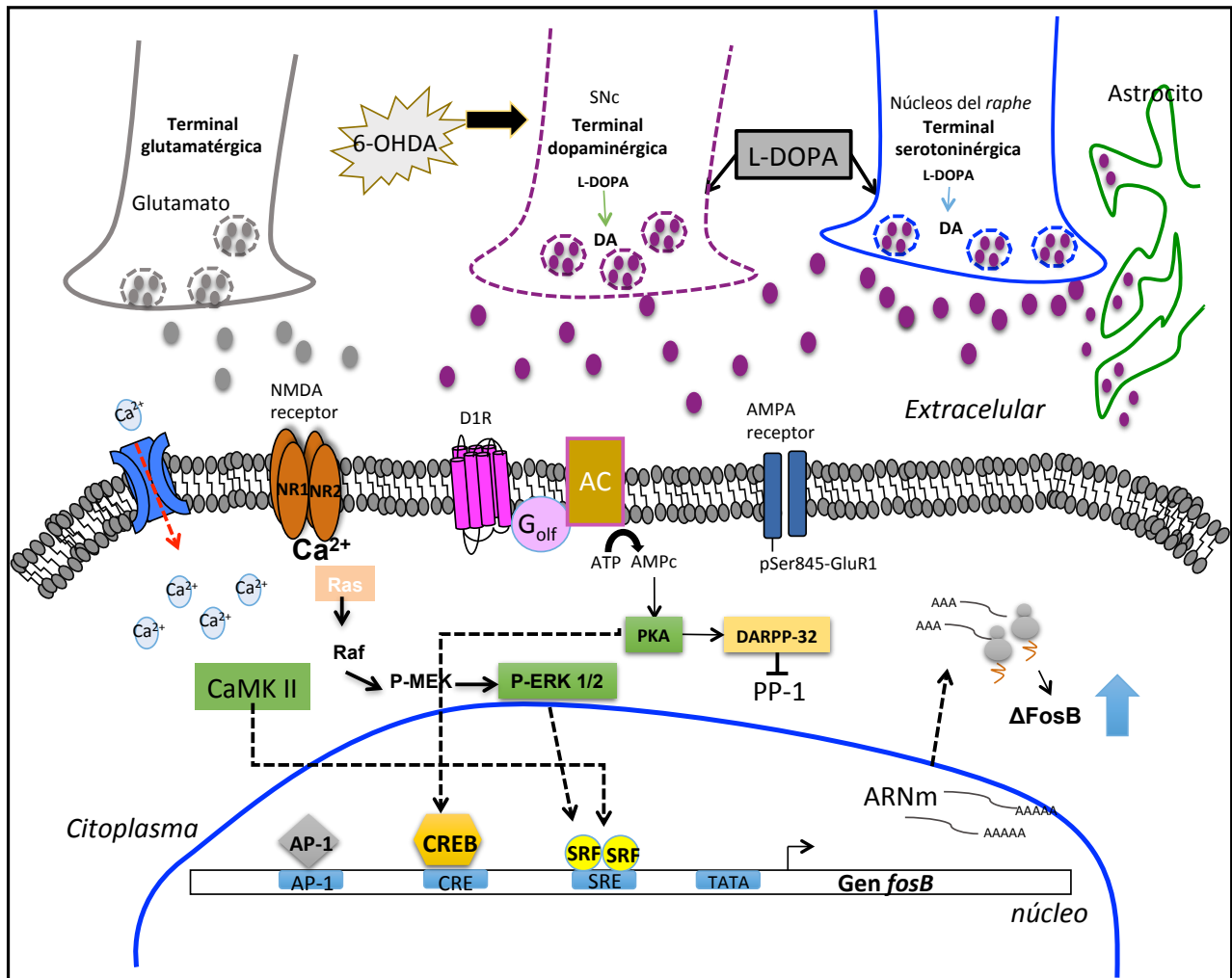
Sin embargo, nuestros resultados indican que cuando evaluamos la asimetría motora en el modelo del cilindro observamos una tendencia a recuperar el porcentaje de uso de ambas patas, sin embargo la conducta de giro inducida con anfetamina no nos indica algún grado de neuroprotección por parte del fragmento Hc-TeTx. Estos resultados diferentes a lo reportado por el grupo de investigación se pueden explicar por el tipo de lesión dopaminérgica, ya que la inyección de la 6-OHDA en la vía nigroestriatal



es mas severa con respecto a la administración de 6-OHDA en el estriado (Deumens et al., 2002, Chang et al., 1999).

Por lo tanto no se observó una disminución significativa en el grado de severidad de las discinesias, sin embargo en las sesiones iniciales se observa una ligera atenuación de los movimientos, pero al finalizar el tratamiento con levodopa los dos grupos experimentales alcanzan el mismo grado de discinesias. Estos datos conductuales se correlacionan con la perdida masiva de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc ya que en el grupo Hc-TeTx no se encontraron neuronas positivas a TH en la SNpc ipsilateral, aunque de forma contrastante al evaluar la expresión de FosB/ $\Delta$ FosB se observó una disminución significativa en el grupo Hc-TeTx.

Sin embargo habrá que evaluar otras condiciones experimentales como disminuir la concentración de 6-OHDA o incrementar las dosis del fragmento Hc-TeTx y evaluar los MIAs. Ya que se han reportado experimentos con efectos opuestos sobre las discinesias usando factores de crecimiento, desde la disminución de los MIAs con la administración de GDNF en primates no-humanos (Iravani et al., 2001) hasta un incremento en la vulnerabilidad a desarrollar discinesias cuando se sobre-expresa BDNF en el estriado de ratas, asociado a un incremento en la innervación serotoninérgica (Tronci et al., 2017) o al papel que tiene el BDNF sobre la expresión del receptor D3 (Guillin et al., 2003) el cual se ha reportado que tienen una importante participación en la generación de las discinesias (Solís et al., 2017). Este mismo efecto de incrementar la severidad de las discinesias se observo cuando se administra el fragmento Hc-TeTx en ratas discinéticas (Palafox-Sanchez V, 2010). Por lo que es muy factible que la vía de las MAPK cinasas estén implicadas en el desarrollo de las discinesias, favoreciendo la expresión de  $\Delta$ FosB, lo cual contribuiría a la plasticidad sináptica aberrante en el estriado que se ha mostrado por lo menos en modelos animales de discinesias.



**Figura 29. Señalización postsináptica estriatal involucrada en el desarrollo de las discinesias.**

Se muestra un esquema de la señalización post-sináptica causada por la liberación de dopamina al espacio sináptico que proviene de L-DOPA exógena en el estriado denervado por la inyección de 6-OHDA. En las neuronas espinosas medianas se activa al receptor D1, el cual está acoplado a una proteína Golf, la subunidad  $\alpha$  activa la adenilato ciclasa (AC) para la producción de AMPc y activar a la proteína-quinasa A (PKA), la cual fosforila a DARPP-32 para inhibir a la fosfatasa-1 (PP-1), también PKA puede fosforilar a CREB en Ser 133. Además contribuye a mantener abiertos los canales AMPA y los canales de calcio dependientes de voltaje, para favorecer la apertura de los receptores a NMDA, el incremento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular promueve la activación de Ras y como consecuencia la activación de las proteínas ERK 1/2, esta cinasa podría fosforilar a Elk el cual forma un complejo con SRF y se unen en el elemento de respuesta a suero (SRE) en la región promotora del gen *fos B*, para inducir la expresión de FosB y  $\Delta$ FosB. CaMK-II es activada por el incremento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular y esta podría fosforilar a SRF en Ser103 y favorecer la expresión de FosB. La sobre-expresión del gen *fos B* se ha asociado a los cambios neuronales que podrían generar las discinesias inducidas por un tratamiento crónico.

## 8. CONCLUSIONES

1. En los cultivos primarios de estriado de ratas pre-natales no se observa inducción de la expresión de FosB y de  $\Delta$ FosB a los 30 minutos y 24 h después del tratamiento con dopamina.
2. La administración aguda, subcrónica y crónica de Levodopa induce la síntesis del ARNm de FosB y  $\Delta$ FosB de forma transitoria en el estriado de ratas hemiparkinsonianas.
3. Los niveles del ARNm de FosB y  $\Delta$ FosB en el estriado de ratas hemiparkinsonianas disminuyen con la administración sub-crónica de L-DOPA.
4. El tratamiento crónico con L-DOPA induce nuevamente los niveles del ARNm de FosB y  $\Delta$ FosB en el estriado de ratas discinéticas.
5. Los niveles de ARNm de  $\Delta$ FosB a 1 h post-inyección se correlacionan con la severidad de los MIAs inducidos en ratas hemiparkinsonianas con un tratamiento crónico con L-DOPA.
6. La lesión dopaminérgica disminuye la expresión del factor de respuesta a suero en estriado de ratas hemiparkinsonianas.
7. La administración aguda de L-DOPA no modifica la expresión del factor de respuesta a suero en estriado de ratas hemiparkinsonianas.
8. La administración crónica de L-DOPA restablece el índice de fosforilación del factor de respuesta a suero en estriado de ratas discinéticas, sin modificar la expresión total de SRF.
9. La administración del fragmento Hc-TeTx previo a una lesión en la vía nigroestriatal no previene la asimetría motora evaluada en el modelo del cilindro y en la prueba de conducta de giro en ratas.
10. La administración del fragmento Hc-TeTx previo a una lesión en la vía nigroestriatal no previene la expresión de los MIAs inducidos por la administración crónica de L-DOPA en ratas.
11. La administración del fragmento Hc-TeTx previo a una lesión en la vía nigroestriatal no previene la muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc de ratas discinéticas, pero sí disminuye la expresión de FosB/ $\Delta$ FosB en el estriado dorsal de ratas discinéticas.

## 9. REFERENCIAS

- Abercrombie, E. D., Bonatz, A. E. and Zigmond, M. J. (1990) 'Effects of L-dopa on extracellular dopamine in striatum of normal and 6-hydroxydopamine-treated rats', *Brain Res*, 525(1), pp. 36-44.
- Albin, R. L., Young, A. B. and Penney, J. B. (1989) 'The functional anatomy of basal ganglia disorders', *Trends Neurosci*, 12(10), pp. 366-75.
- Alexander, G. E., DeLong, M. R. and Strick, P. L. (1986) 'Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex', *Annu Rev Neurosci*, 9, pp. 357-81.
- Alibhai, I. N., Green, T. A., Potashkin, J. A. and Nestler, E. J. (2007) 'Regulation of fosB and DeltafosB mRNA expression: in vivo and in vitro studies', *Brain Res*, 1143, pp. 22-33.
- Andersson, M., Hilbertson, A. and Cenci, M. A. (1999) 'Striatal fosB expression is causally linked with L-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease', *Neurobiol Dis*, 6(6), pp. 461-74.
- Andersson, M., Konradi, C. and Cenci, M. A. (2001) 'cAMP response element-binding protein is required for dopamine-dependent gene expression in the intact but not the dopamine-denervated striatum', *J Neurosci*, 21(24), pp. 9930-43.
- Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschläger, M., Rütger, U. and Nordheim, A. (1998) 'Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis', *EMBO J*, 17(21), pp. 6289-99.
- Aubert, I., Guigoni, C., Håkansson, K., Li, Q., Dovero, S., Barthe, N., Bioulac, B. H., Gross, C. E., Fisone, G., Bloch, B. and Bezard, E. (2005) 'Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia', *Ann Neurol*, 57(1), pp. 17-26.
- Ba, M., Kong, M., Yu, G., Sun, X., Liu, Z. and Wang, X. (2011) 'GluR1 phosphorylation and persistent expression of levodopa-induced motor response alterations in the Hemi-Parkinsonian rat', *Neurochem Res*, 36(6), pp. 1135-44.
- Balleine, B. W., Delgado, M. R. and Hikosaka, O. (2007) 'The role of the dorsal striatum in reward and decision-making', *J Neurosci*, 27(31), pp. 8161-5.
- Bastide, M. F., de la Crompe, B., Doudnikoff, E., Fernagut, P. O., Gross, C. E., Mallet, N., Boraud, T. and Bézard, E. (2016) 'Inhibiting Lateral Habenula Improves L-DOPA-Induced Dyskinesia', *Biol Psychiatry*, 79(5), pp. 345-53.
- Bastide, M. F., Dovero, S., Charron, G., Porras, G., Gross, C. E., Fernagut, P. O. and Bézard, E. (2014) 'Immediate-early gene expression in structures outside the basal ganglia is associated to L-DOPA-induced dyskinesia', *Neurobiol Dis*, 62, pp. 179-92.
- Belaguli, N. S., Zhou, W., Trinh, T. H., Majesky, M. W. and Schwartz, R. J. (1999) 'Dominant negative murine serum response factor: alternative splicing within the activation domain inhibits transactivation of serum response factor binding targets', *Mol Cell Biol*, 19(7), pp. 4582-91.
- Berton, O., Guigoni, C., Li, Q., Bioulac, B. H., Aubert, I., Gross, C. E., Dileone, R. J., Nestler, E. J. and Bezard, E. (2009) 'Striatal overexpression of DeltaJunD resets L-DOPA-induced dyskinesia in a primate model of Parkinson disease', *Biol Psychiatry*, 66(6), pp. 554-61.
- BIRKMAYER, W. and HORNYKIEWICZ, O. (1961) '[The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]', *Wien Klin Wochenschr*, 73, pp. 787-8.
- Bishop, C., Taylor, J. L., Kuhn, D. M., Eskow, K. L., Park, J. Y. and Walker, P. D. (2006) 'MDMA and fenfluramine reduce L-DOPA-induced dyskinesia via indirect 5-HT1A receptor stimulation', *Eur J Neurosci*, 23(10), pp. 2669-76.
- Blaess, S. and Ang, S. L. (2015) 'Genetic control of midbrain dopaminergic neuron development', *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 4(2), pp. 113-34.

- Blanchet, P. J., Calon, F., Morissette, M., Hadj Tahar, A., Bélanger, N., Samadi, P., Grondin, R., Grégoire, L., Meltzer, L., Di Paolo, T. and Bédard, P. J. (2004) 'Relevance of the MPTP primate model in the study of dyskinesia priming mechanisms', *Parkinsonism Relat Disord*, 10(5), pp. 297-304.
- Brown, L. L., Smith, D. M. and Goldbloom, L. M. (1998) 'Organizing principles of cortical integration in the rat neostriatum: corticostriate map of the body surface is an ordered lattice of curved laminae and radial points', *J Comp Neurol*, 392(4), pp. 468-88.
- Cahill, M. E., Walker, D. M., Gancarz, A. M., Wang, Z. J., Lardner, C. K., Bagot, R. C., Neve, R. L., Dietz, D. M. and Nestler, E. J. (2017) 'The dendritic spine morphogenic effects of repeated cocaine use occur through the regulation of serum response factor signaling', *Mol Psychiatry*.
- Calabresi, P., Di Filippo, M., Ghiglieri, V. and Picconi, B. (2008) 'Molecular mechanisms underlying levodopa-induced dyskinesia', *Mov Disord*, 23 Suppl 3, pp. S570-9.
- Calabresi, P., Di Filippo, M., Ghiglieri, V., Tambasco, N. and Picconi, B. (2010) 'Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to bedside gap', *Lancet Neurol*, 9(11), pp. 1106-17.
- Carle, T. L., Ohnishi, Y. N., Ohnishi, Y. H., Alibhai, I. N., Wilkinson, M. B., Kumar, A. and Nestler, E. J. (2007) 'Proteasome-dependent and -independent mechanisms for FosB destabilization: identification of FosB degron domains and implications for DeltaFosB stability', *Eur J Neurosci*, 25(10), pp. 3009-19.
- Carta, A. R., Tronci, E., Pinna, A. and Morelli, M. (2005) 'Different responsiveness of striatonigral and striatopallidal neurons to L-DOPA after a subchronic intermittent L-DOPA treatment', *Eur J Neurosci*, 21(5), pp. 1196-204.
- Carta, M., Carlsson, T., Kirik, D. and Björklund, A. (2007) 'Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats', *Brain*, 130(Pt 7), pp. 1819-33.
- Cenci, M. A. (2014) 'Presynaptic Mechanisms of L-DOPA-Induced Dyskinesia: The Findings, the Debate, and the Therapeutic Implications', *Front Neurol*, 5, pp. 242.
- Cenci, M. A., Lee, C. S. and Björklund, A. (1998) 'L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA', *Eur J Neurosci*, 10(8), pp. 2694-706.
- Cervantes-Arriaga, A., Rodriguez-Violante, M., López-Ruiz M., Estrada-Bellman, I., Zuñiga-Ramirez, C., Otero-Cardeira, E., Camacho-Ordoñez, A., Gonzales-Latapi, P., Morales-Briceño, H., Martinez-Ramirez, D. (2013) 'Caracterización de la enfermedad de Parkinson en México: estudio ReMePARK', *Gaceta Médica de Mexico*, 149, pp.497-501.
- Cepeda, C., Buchwald, N. A. and Levine, M. S. (1993) 'Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(20), pp. 9576-80.
- Chang, J. W., Wachtel, S. R., Young, D. and Kang, U. J. (1999) 'Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions', *Neuroscience*, 88(2), pp. 617-28.
- Charbonnier-Beaupel, F., Malerbi, M., Alcacer, C., Tahiri, K., Carpentier, W., Wang, C., During, M., Xu, D., Worley, P. F., Girault, J. A., Hervé, D. and Corvol, J. C. (2015) 'Gene expression analyses identify Narp contribution in the development of L-DOPA-induced dyskinesia', *J Neurosci*, 35(1), pp. 96-111.
- Chaïb-Oukadour, I., Gil, C. and Aguilera, J. (2004) 'The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurones from apoptotic death: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways', *J Neurochem*, 90(5), pp. 1227-36.

- Chaïb-Oukadour, I., Gil, C., Rodríguez-Alvarez, J., Ortega, A. and Aguilera, J. (2009) 'Tetanus toxin H(C) fragment reduces neuronal MPP+ toxicity', *Mol Cell Neurosci*, 41(3), pp. 297-303.
- Cisek, P. and Kalaska, J. F. (2010) 'Neural mechanisms for interacting with a world full of action choices', *Annu Rev Neurosci*, 33, pp. 269-98.
- Corvol, J. C., Muriel, M. P., Valjent, E., Féger, J., Hanoun, N., Girault, J. A., Hirsch, E. C. and Hervé, D. (2004) 'Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease', *J Neurosci*, 24(31), pp. 7007-14.
- Cui, G., Jun, S. B., Jin, X., Pham, M. D., Vogel, S. S., Lovinger, D. M. and Costa, R. M. (2013) 'Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation', *Nature*, 494(7436), pp. 238-42.
- Darmopil, S., Martín, A. B., De Diego, I. R., Ares, S. and Moratalla, R. (2009) 'Genetic inactivation of dopamine D1 but not D2 receptors inhibits L-DOPA-induced dyskinesia and histone activation', *Biol Psychiatry*, 66(6), pp. 603-13.
- de la Fuente-Fernández, R., Sossi, V., Huang, Z., Furtado, S., Lu, J. Q., Calne, D. B., Ruth, T. J. and Stoessl, A. J. (2004) 'Levodopa-induced changes in synaptic dopamine levels increase with progression of Parkinson's disease: implications for dyskinesias', *Brain*, 127(Pt 12), pp. 2747-54.
- Deinhardt, K., Berninghausen, O., Willison, H. J., Hopkins, C. R. and Schiavo, G. (2006a) 'Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1', *J Cell Biol*, 174(3), pp. 459-71.
- Deinhardt, K., Salinas, S., Verastegui, C., Watson, R., Worth, D., Hanrahan, S., Bucci, C. and Schiavo, G. (2006b) 'Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway', *Neuron*, 52(2), pp. 293-305.
- Delfino, M., Kalisch, R., Czisch, M., Larramendy, C., Ricatti, J., Taravini, I. R., Trenkwalder, C., Murer, M. G., Auer, D. P. and Gershanik, O. S. (2007) 'Mapping the effects of three dopamine agonists with different dyskinesia potential and receptor selectivity using pharmacological functional magnetic resonance imaging', *Neuropsychopharmacology*, 32(9), pp. 1911-21.
- Deumens, R., Blokland, A. and Prickaerts, J. (2002) 'Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway', *Exp Neurol*, 175(2), pp. 303-17.
- Ding, Y., Won, L., Britt, J. P., Lim, S. A., McGehee, D. S. and Kang, U. J. (2011) 'Enhanced striatal cholinergic neuronal activity mediates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(2), pp. 840-5.
- Dobrazanski, P., Noguchi, T., Kovary, K., Rizzo, C. A., Lazo, P. S. and Bravo, R. (1991) 'Both products of the fosB gene, FosB and its short form, FosB/SF, are transcriptional activators in fibroblasts', *Mol Cell Biol*, 11(11), pp. 5470-8.
- Dunah, A. W., Sirianni, A. C., Fienberg, A. A., Bastia, E., Schwarzschild, M. A. and Standaert, D. G. (2004) 'Dopamine D1-dependent trafficking of striatal N-methyl-D-aspartate glutamate receptors requires Fyn protein tyrosine kinase but not DARPP-32', *Mol Pharmacol*, 65(1), pp. 121-9.
- Ebihara, K., Ishida, Y., Takeda, R., Abe, H., Matsuo, H., Kawai, K., Magata, Y. and Nishimori, T. (2011) 'Differential expression of FosB, c-Fos, and Zif268 in forebrain regions after acute or chronic L-DOPA treatment in a rat model of Parkinson's disease', *Neurosci Lett*, 496(2), pp. 90-4.
- Ebrahimi, A., Pochet, R. and Roger, M. (1992) 'Topographical organization of the projections from physiologically identified areas of the motor cortex to the striatum in the rat', *Neurosci Res*, 14(1), pp. 39-60.

- Engeln, M., Bastide, M. F., Toulmé, E., Dehay, B., Bourdenx, M., Doudnikoff, E., Li, Q., Gross, C. E., Boué-Grabot, E., Pisani, A., Bezard, E. and Fernagut, P. O. (2016) 'Selective Inactivation of Striatal FosB/ $\Delta$ FosB-Expressing Neurons Alleviates L-DOPA-Induced Dyskinesia', *Biol Psychiatry*, 79(5), pp. 354-61.
- Fasano, C., Bourque, M. J., Lapointe, G., Leo, D., Thibault, D., Haber, M., Kortleven, C., Desgroseillers, L., Murai, K. K. and Trudeau, L. (2013) 'Dopamine facilitates dendritic spine formation by cultured striatal medium spiny neurons through both D1 and D2 dopamine receptors', *Neuropharmacology*, 67, pp. 432-43.
- Fasano, S., Bezard, E., D'Antoni, A., Francardo, V., Indrigo, M., Qin, L., Doveró, S., Cerovic, M., Cenci, M. A. and Brambilla, R. (2010) 'Inhibition of Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) signaling in the striatum reverts motor symptoms associated with L-dopa-induced dyskinesia', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(50), pp. 21824-9.
- Feyder, M., Södersten, E., Santini, E., Vialou, V., LaPlant, Q., Watts, E. L., Spigolon, G., Hansen, K., Caboche, J., Nestler, E. J. and Fisone, G. (2016) 'A Role for Mitogen- and Stress-Activated Kinase 1 in L-DOPA-Induced Dyskinesia and  $\Delta$ FosB Expression', *Biol Psychiatry*, 79(5), pp. 362-71.
- Fieblinger, T., Sebastianutto, I., Alcacer, C., Bimpisidis, Z., Maslava, N., Sandberg, S., Engblom, D. and Cenci, M. A. (2014) 'Mechanisms of dopamine D1 receptor-mediated ERK1/2 activation in the parkinsonian striatum and their modulation by metabotropic glutamate receptor type 5', *J Neurosci*, 34(13), pp. 4728-40.
- Fu, Y., Yuan, Y., Halliday, G., Rusznák, Z., Watson, C. and Paxinos, G. (2012) 'A cytoarchitectonic and chemoarchitectonic analysis of the dopamine cell groups in the substantia nigra, ventral tegmental area, and retrorubral field in the mouse', *Brain Struct Funct*, 217(2), pp. 591-612.
- Fuxe, K., Dahlström, A. B., Jonsson, G., Marcellino, D., Guescini, M., Dam, M., Manger, P. and Agnati, L. (2010) 'The discovery of central monoamine neurons gave volume transmission to the wired brain', *Prog Neurobiol*, 90(2), pp. 82-100.
- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J. and Sibley, D. R. (1990) 'D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons', *Science*, 250(4986), pp. 1429-32.
- Gerfen, C. R. and Surmeier, D. J. (2011) 'Modulation of striatal projection systems by dopamine', *Annu Rev Neurosci*, 34, pp. 441-66.
- Gil, C., Chaib-Oukadour, I. and Aguilera, J. (2003) 'C-terminal fragment of tetanus toxin heavy chain activates Akt and MEK/ERK signalling pathways in a Trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons', *Biochem J*, 373(Pt 2), pp. 613-20.
- Gil, C., Chaib-Oukadour, I., Blasi, J. and Aguilera, J. (2001) 'HC fragment (C-terminal portion of the heavy chain) of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction', *Biochem J*, 356(Pt 1), pp. 97-103.
- Greenberg, M. E. and Ziff, E. B. (1984) 'Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene', *Nature*, 311(5985), pp. 433-8.
- Greif, G. J., Lin, Y. J., Liu, J. C. and Freedman, J. E. (1995) 'Dopamine-modulated potassium channels on rat striatal neurons: specific activation and cellular expression', *J Neurosci*, 15(6), pp. 4533-44.
- Guillin, O., Griffon, N., Bezard, E., Leriche, L., Diaz, J., Gross, C. and Sokoloff, P. (2003) 'Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: therapeutic implications in Parkinson's disease', *Eur J Pharmacol*, 480(1-3), pp. 89-95.
- Heiman, M., Heilbut, A., Francardo, V., Kulicke, R., Fenster, R. J., Kolaczyk, E. D., Mesirov, J. P., Surmeier, D. J., Cenci, M. A. and Greengard, P. (2014) 'Molecular adaptations of striatal spiny projection neurons during levodopa-induced dyskinesia', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(12), pp. 4578-83.

- Herdegen, T., Blume, A., Buschmann, T., Georgakopoulos, E., Winter, C., Schmid, W., Hsieh, T. F., Zimmermann, M. and Gass, P. (1997) 'Expression of activating transcription factor-2, serum response factor and cAMP/Ca response element binding protein in the adult rat brain following generalized seizures, nerve fibre lesion and ultraviolet irradiation', *Neuroscience*, 81(1), pp. 199-212.
- Hernandez-Lopez, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H. and Surmeier, D. J. (2000) 'D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca<sup>2+</sup> currents and excitability via a novel PLC[ $\beta$ ]<sub>1</sub>-IP<sub>3</sub>-calcineurin-signaling cascade', *J Neurosci*, 20(24), pp. 8987-95.
- Hernández-Echeagaray, E., Starling, A. J., Cepeda, C. and Levine, M. S. (2004) 'Modulation of AMPA currents by D2 dopamine receptors in striatal medium-sized spiny neurons: are dendrites necessary?', *Eur J Neurosci*, 19(9), pp. 2455-63.
- Hervé, D., Lévi-Strauss, M., Marey-Semper, I., Verney, C., Tassin, J. P., Glowinski, J. and Girault, J. A. (1993) 'G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase', *J Neurosci*, 13(5), pp. 2237-48.
- Hill, C. S., Wynne, J. and Treisman, R. (1995) 'The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF', *Cell*, 81(7), pp. 1159-70.
- Hirsch, E. C. and Hunot, S. (2009) 'Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?', *Lancet Neurol*, 8(4), pp. 382-97.
- Hornykiewicz, O. (2015) '50 years of levodopa', *Mov Disord*, 30(7), pp. 1008.
- Håkansson, K., Galdi, S., Hendrick, J., Snyder, G., Greengard, P. and Fisone, G. (2006) 'Regulation of phosphorylation of the GluR1 AMPA receptor by dopamine D2 receptors', *J Neurochem*, 96(2), pp. 482-8.
- Iderberg, H., McCreary, A. C., Varney, M. A., Cenci, M. A. and Newman-Tancredi, A. (2015) 'Activity of serotonin 5-HT(1A) receptor 'biased agonists' in rat models of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia', *Neuropharmacology*, 93, pp. 52-67.
- Iravani, M. M., Costa, S., Jackson, M. J., Tel, B. C., Cannizzaro, C., Pearce, R. K. and Jenner, P. (2001) 'GDNF reverses priming for dyskinesia in MPTP-treated, L-DOPA-primed common marmosets', *Eur J Neurosci*, 13(3), pp. 597-608.
- Johansen, F. E. and Prywes, R. (1994) 'Two pathways for serum regulation of the c-fos serum response element require specific sequence elements and a minimal domain of serum response factor', *Mol Cell Biol*, 14(9), pp. 5920-8.
- Johnson, C. M., Hill, C. S., Chawla, S., Treisman, R. and Bading, H. (1997) 'Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKs) signaling cascade', *J Neurosci*, 17(16), pp. 6189-202.
- Kalita, K., Kharebava, G., Zheng, J. J. and Hetman, M. (2006) 'Role of megakaryoblastic acute leukemia-1 in ERK1/2-dependent stimulation of serum response factor-driven transcription by BDNF or increased synaptic activity', *J Neurosci*, 26(39), pp. 10020-32.
- Kaplan, D. R. and Miller, F. D. (2000) 'Neurotrophin signal transduction in the nervous system', *Curr Opin Neurobiol*, 10(3), pp. 381-91.
- Kemp, P. R. and Metcalfe, J. C. (2000) 'Four isoforms of serum response factor that increase or inhibit smooth-muscle-specific promoter activity', *Biochem J*, 345 Pt 3, pp. 445-51.
- Knöll, B. and Nordheim, A. (2009) 'Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm', *Trends Neurosci*, 32(8), pp. 432-42.
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K. and Kreitzer, A. C. (2010) 'Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry', *Nature*, 466(7306), pp. 622-6.



- Kubota, Y. and Kawaguchi, Y. (1993) 'Spatial distributions of chemically identified intrinsic neurons in relation to patch and matrix compartments of rat neostriatum', *J Comp Neurol*, 332(4), pp. 499-513.
- Lammel, S., Hetzel, A., Häckel, O., Jones, I., Liss, B. and Roeper, J. (2008) 'Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system', *Neuron*, 57(5), pp. 760-73.
- Lang, A. E. and Lozano, A. M. (1998a) 'Parkinson's disease. First of two parts', *N Engl J Med*, 339(15), pp. 1044-53.
- Lang, A. E. and Lozano, A. M. (1998b) 'Parkinson's disease. Second of two parts', *N Engl J Med*, 339(16), pp. 1130-43.
- Lazo, P. S., Dorfman, K., Noguchi, T., Mattéi, M. G. and Bravo, R. (1992) 'Structure and mapping of the fosB gene. FosB downregulates the activity of the fosB promoter', *Nucleic Acids Res*, 20(2), pp. 343-50.
- Lebel, M., Chagniel, L., Bureau, G. and Cyr, M. (2010) 'Striatal inhibition of PKA prevents levodopa-induced behavioural and molecular changes in the hemiparkinsonian rat', *Neurobiol Dis*, 38(1), pp. 59-67.
- Li, C. L., Sathyamurthy, A., Oldenborg, A., Tank, D. and Ramanan, N. (2014) 'SRF phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 promotes axon growth in hippocampal neurons', *J Neurosci*, 34(11), pp. 4027-42.
- Lindgren, H. S., Andersson, D. R., Lagerkvist, S., Nissbrandt, H. and Cenci, M. A. (2010) 'L-DOPA-induced dopamine efflux in the striatum and the substantia nigra in a rat model of Parkinson's disease: temporal and quantitative relationship to the expression of dyskinesia', *J Neurochem*, 112(6), pp. 1465-76.
- Lindgren, H. S., Ohlin, K. E. and Cenci, M. A. (2009) 'Differential involvement of D1 and D2 dopamine receptors in L-DOPA-induced angiogenic activity in a rat model of Parkinson's disease', *Neuropsychopharmacology*, 34(12), pp. 2477-88.
- Lindgren, H. S., Rylander, D., Iderberg, H., Andersson, M., O'Sullivan, S. S., Williams, D. R., Lees, A. J. and Cenci, M. A. (2011) 'Putaminal upregulation of FosB/ $\Delta$ FosB-like immunoreactivity in Parkinson's disease patients with dyskinesia', *J Parkinsons Dis*, 1(4), pp. 347-57.
- Lonze, B. E. and Ginty, D. D. (2002) 'Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system', *Neuron*, 35(4), pp. 605-23.
- Lundblad, M., Andersson, M., Winkler, C., Kirik, D., Wierup, N. and Cenci, M. A. (2002) 'Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease', *Eur J Neurosci*, 15(1), pp. 120-32.
- Manak, J. R. and Prywes, R. (1991) 'Mutation of serum response factor phosphorylation sites and the mechanism by which its DNA-binding activity is increased by casein kinase II', *Mol Cell Biol*, 11(7), pp. 3652-9.
- Manson, A., Stirpe, P. and Schrag, A. (2012) 'Levodopa-induced-dyskinesias clinical features, incidence, risk factors, management and impact on quality of life', *J Parkinsons Dis*, 2(3), pp. 189-98.
- Masuyer, G., Conrad, J. and Stenmark, P. (2017) 'The structure of the tetanus toxin reveals pH-mediated domain dynamics', *EMBO Rep*, 18(8), pp. 1306-1317.
- Meissner, W., Ravenscroft, P., Reese, R., Harnack, D., Morgenstern, R., Kupsch, A., Klitgaard, H., Bioulac, B., Gross, C. E., Bezard, E. and Boraud, T. (2006) 'Increased slow oscillatory activity in substantia nigra pars reticulata triggers abnormal involuntary movements in the 6-OHDA-lesioned rat in the presence of excessive extracellular striatal dopamine', *Neurobiol Dis*, 22(3), pp. 586-98.
- Mendieta, L., Bautista, E., Sánchez, A., Guevara, J., Herrando-Grabulosa, M., Moran, J., Martínez, R., Aguilera, J. and Limón, I. D. (2012) 'The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin given by intramuscular injection causes neuroprotection and

- improves the motor behavior in rats treated with 6-hydroxydopamine', *Neurosci Res*, 74(2), pp. 156-67.
- Mendieta, L., Venegas, B., Moreno, N., Patricio, A., Martínez, I., Aguilera, J. and Limón, I. D. (2009) 'The carboxyl-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin prevents dopaminergic degeneration and improves motor behavior in rats with striatal MPP(+)-lesions', *Neurosci Res*, 65(1), pp. 98-106.
- Miana-Mena, F. J., Roux, S., Benichou, J. C., Osta, R. and Brûlet, P. (2002) 'Neuronal activity-dependent membrane traffic at the neuromuscular junction', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5), pp. 3234-9.
- Mink, J. W. (2003) 'The Basal Ganglia and involuntary movements: impaired inhibition of competing motor patterns', *Arch Neurol*, 60(10), pp. 1365-8.
- Misra, R. P., Bonni, A., Miranti, C. K., Rivera, V. M., Sheng, M. and Greenberg, M. E. (1994) 'L-type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway', *J Biol Chem*, 269(41), pp. 25483-93.
- Morgan, J. I. and Curran, T. (1986) 'Role of ion flux in the control of c-fos expression', *Nature*, 322(6079), pp. 552-5.
- Morissette, M., Samadi, P., Hadj Tahar, A., Bélanger, N. and Di Paolo, T. (2010) 'Striatal Akt/GSK3 signaling pathway in the development of L-Dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys', *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34(3), pp. 446-54.
- Murphy, J. A., Stein, I. S., Lau, C. G., Peixoto, R. T., Aman, T. K., Kaneko, N., Aromolaran, K., Saulnier, J. L., Popescu, G. K., Sabatini, B. L., Hell, J. W. and Zukin, R. S. (2014) 'Phosphorylation of Ser1166 on GluN2B by PKA is critical to synaptic NMDA receptor function and Ca<sup>2+</sup> signaling in spines', *J Neurosci*, 34(3), pp. 869-79.
- Nambu, A. (2008) 'Seven problems on the basal ganglia', *Curr Opin Neurobiol*, 18(6), pp. 595-604.
- Navailles, S., Bioulac, B., Gross, C. and De Deurwaerdère, P. (2010) 'Serotonergic neurons mediate ectopic release of dopamine induced by L-DOPA in a rat model of Parkinson's disease', *Neurobiol Dis*, 38(1), pp. 136-43.
- Nicholas, A. P., Lubin, F. D., Hallett, P. J., Vattem, P., Ravenscroft, P., Bezard, E., Zhou, S., Fox, S. H., Brotchie, J. M., Sweatt, J. D. and Standaert, D. G. (2008) 'Striatal histone modifications in models of levodopa-induced dyskinesia', *J Neurochem*, 106(1), pp. 486-94.
- Nomaru, H., Sakumi, K., Katogi, A., Ohnishi, Y. N., Kajitani, K., Tsuchimoto, D., Nestler, E. J. and Nakabeppu, Y. (2014) 'Fosb gene products contribute to excitotoxic microglial activation by regulating the expression of complement C5a receptors in microglia', *Glia*, 62(8), pp. 1284-98.
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R. and Treisman, R. (1988) 'Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element', *Cell*, 55(6), pp. 989-1003.
- Nowak, S. J. and Corces, V. G. (2000) 'Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci', *Genes Dev*, 14(23), pp. 3003-13.
- Olson, P. A., Tkatch, T., Hernandez-Lopez, S., Ulrich, S., Ilijic, E., Mugnaini, E., Zhang, H., Bezprozvanny, I. and Surmeier, D. J. (2005) 'G-protein-coupled receptor modulation of striatal CaV1.3 L-type Ca<sup>2+</sup> channels is dependent on a Shank-binding domain', *J Neurosci*, 25(5), pp. 1050-62.
- Palafox-Sanchez, V. (2010) 'Efecto de la administración del fragmento C-terminal de la toxina tetánica en un modelo de discinesias y asimetría motora en ratas, sobre los niveles de tirosina hidroxilasa en el estriado y sustancia nigra pars compacta. Tesis profesional, FCQ-BUAP.

- Pavese, N., Evans, A. H., Tai, Y. F., Hotton, G., Brooks, D. J., Lees, A. J. and Piccini, P. (2006) 'Clinical correlates of levodopa-induced dopamine release in Parkinson disease: a PET study', *Neurology*, 67(9), pp. 1612-7.
- Pavón, N., Martín, A. B., Mendiáldua, A. and Moratalla, R. (2006) 'ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice', *Biol Psychiatry*, 59(1), pp. 64-74.
- Penrod, R. D., Kourrich, S., Kearney, E., Thomas, M. J. and Lanier, L. M. (2011) 'An embryonic culture system for the investigation of striatal medium spiny neuron dendritic spine development and plasticity', *J Neurosci Methods*, 200(1), pp. 1-13.
- Picconi, B., Centonze, D., Håkansson, K., Bernardi, G., Greengard, P., Fisone, G., Cenci, M. A. and Calabresi, P. (2003) 'Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia', *Nat Neurosci*, 6(5), pp. 501-6.
- Prensa, L. and Parent, A. (2001) 'The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments', *J Neurosci*, 21(18), pp. 7247-60.
- Ramanan, N., Shen, Y., Sarsfield, S., Lemberger, T., Schütz, G., Linden, D. J. and Ginty, D. D. (2005) 'SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability', *Nat Neurosci*, 8(6), pp. 759-67.
- Rangel-Barajas, C., Silva, I., Lopéz-Santiago, L. M., Aceves, J., Erij, D. and Florán, B. (2011) 'L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats is associated with up-regulation of adenylyl cyclase type V/VI and increased GABA release in the substantia nigra reticulata', *Neurobiol Dis*, 41(1), pp. 51-61.
- Rascol, O., Nutt, J. G., Blin, O., Goetz, C. G., Trugman, J. M., Soubrouillard, C., Carter, J. H., Currie, L. J., Fabre, N., Thalamas, C., Giardina, W. W. and Wright, S. (2001) 'Induction by dopamine D1 receptor agonist ABT-431 of dyskinesia similar to levodopa in patients with Parkinson disease', *Arch Neurol*, 58(2), pp. 249-54.
- Robertson, L. M., Kerppola, T. K., Vendrell, M., Luk, D., Smeyne, R. J., Bocchiaro, C., Morgan, J. I. and Curran, T. (1995) 'Regulation of c-fos expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements', *Neuron*, 14(2), pp. 241-52.
- Rollins, B. J. and Stiles, C. D. (1989) 'Serum-inducible genes', *Adv Cancer Res*, 53, pp. 1-32.
- Roux, S., Saint Clément, C., Curie, T., Girard, E., Miana Mena, F. J., Barbier, J., Osta, R., Molgó, J. and Brûlet, P. (2006) 'Brain-derived neurotrophic factor facilitates in vivo internalization of tetanus neurotoxin C-terminal fragment fusion proteins in mature mouse motor nerve terminals', *Eur J Neurosci*, 24(6), pp. 1546-54.
- Sanders, L. H. and Greenamyre, J. T. (2013) 'Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model', *Free Radic Biol Med*, 62, pp. 111-20.
- Santini, E., Heiman, M., Greengard, P., Valjent, E. and Fisone, G. (2009) 'Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia', *Sci Signal*, 2(80), pp. ra36.
- Santini, E., Sgambato-Faure, V., Li, Q., Savasta, M., Dovero, S., Fisone, G. and Bezard, E. (2010) 'Distinct changes in cAMP and extracellular signal-regulated protein kinase signalling in L-DOPA-induced dyskinesia', *PLoS One*, 5(8), pp. e12322.
- Santini, E., Valjent, E., Usiello, A., Carta, M., Borgkvist, A., Girault, J. A., Hervé, D., Greengard, P. and Fisone, G. (2007) 'Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia', *J Neurosci*, 27(26), pp. 6995-7005.
- Savica, R. and Benarroch, E. E. (2014) 'Dopamine receptor signaling in the forebrain: recent insights and clinical implications', *Neurology*, 83(8), pp. 758-67.
- Schuster, S., Nadjar, A., Guo, J. T., Li, Q., Ittrich, C., Hengerer, B. and Bezard, E. (2008) 'The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor lovastatin reduces severity of L-DOPA-

- induced abnormal involuntary movements in experimental Parkinson's disease', *J Neurosci*, 28(17), pp. 4311-6.
- Seger, R. and Krebs, E. G. (1995) 'The MAPK signaling cascade', *FASEB J*, 9(9), pp. 726-35.
- Solis, O., Limón, D. I., Flores-Hernández, J. and Flores, G. (2007) 'Alterations in dendritic morphology of the prefrontal cortical and striatum neurons in the unilateral 6-OHDA-rat model of Parkinson's disease', *Synapse*, 61(6), pp. 450-8.
- Solís, O., Garcia-Montes, J. R., González-Granillo, A., Xu, M. and Moratalla, R. (2017) 'Dopamine D3 Receptor Modulates L-DOPA-Induced Dyskinesia by Targeting D1 Receptor-Mediated Striatal Signaling', *Cereb Cortex*, 27(1), pp. 435-446.
- Suarez, L. M., Solís, O., Aguado, C., Lujan, R. and Moratalla, R. (2016) 'L-DOPA Oppositely Regulates Synaptic Strength and Spine Morphology in D1 and D2 Striatal Projection Neurons in Dyskinesia', *Cereb Cortex*, 26(11), pp. 4253-4264.
- Surmeier, D. J. and Kitai, S. T. (1993) 'D1 and D2 dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons', *Prog Brain Res*, 99, pp. 309-24.
- Suárez, L. M., Solís, O., Caramés, J. M., Taravini, I. R., Solís, J. M., Murer, M. G. and Moratalla, R. (2014) 'L-DOPA treatment selectively restores spine density in dopamine receptor D2-expressing projection neurons in dyskinetic mice', *Biol Psychiatry*, 75(9), pp. 711-22.
- Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J. A., Nairn, A. C. and Greengard, P. (2004) 'DARPP-32: an integrator of neurotransmission', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, pp. 269-96.
- Sweatt, J. D. (2001) 'The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory', *J Neurochem*, 76(1), pp. 1-10.
- Sánchez-González, A., Mendieta, L., Palafox, V., Candalija, A., Luna, F., Aguilera, J. and Limón, I. D. (2014) 'The restorative effect of intramuscular injection of tetanus toxin C-fragment in hemiparkinsonian rats', *Neurosci Res*, 84, pp. 1-9.
- Tanaka, H., Kannari, K., Maeda, T., Tomiyama, M., Suda, T. and Matsunaga, M. (1999) 'Role of serotonergic neurons in L-DOPA-derived extracellular dopamine in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats', *Neuroreport*, 10(3), pp. 631-4.
- Tekumalla, P. K., Calon, F., Rahman, Z., Birdi, S., Rajput, A. H., Hornykiewicz, O., Di Paolo, T., Bédard, P. J. and Nestler, E. J. (2001) 'Elevated levels of DeltaFosB and RGS9 in striatum in Parkinson's disease', *Biol Psychiatry*, 50(10), pp. 813-6.
- Tepper, J. M., Tecuapetla, F., Koós, T. and Ibáñez-Sandoval, O. (2010) 'Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons', *Front Neuroanat*, 4, pp. 150.
- Treisman, R. (1986) 'Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors', *Cell*, 46(4), pp. 567-74.
- Treisman, R. (1994) 'Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators', *Curr Opin Genet Dev*, 4(1), pp. 96-101.
- Tronci, E., Napolitano, F., Muñoz, A., Fidalgo, C., Rossi, F., Björklund, A., Usiello, A. and Carta, M. (2017) 'BDNF over-expression induces striatal serotonin fiber sprouting and increases the susceptibility to L-DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats', *Exp Neurol*, 297, pp. 73-81.
- Ulery, P. G. and Nestler, E. J. (2007) 'Regulation of DeltaFosB transcriptional activity by Ser27 phosphorylation', *Eur J Neurosci*, 25(1), pp. 224-30.
- Ulery, P. G., Rudenko, G. and Nestler, E. J. (2006) 'Regulation of DeltaFosB stability by phosphorylation', *J Neurosci*, 26(19), pp. 5131-42.
- Ulery-Reynolds, P. G., Castillo, M. A., Vialou, V., Russo, S. J. and Nestler, E. J. (2009) 'Phosphorylation of DeltaFosB mediates its stability in vivo', *Neuroscience*, 158(2), pp. 369-72.
- Valastro, B., Andersson, M., Lindgren, H. S. and Cenci, M. A. (2007) 'Expression pattern of JunD after acute or chronic L-DOPA treatment: comparison with deltaFosB', *Neuroscience*, 144(1), pp. 198-207.

- Veenvliet, J. V. and Smidt, M. P. (2014) 'Molecular mechanisms of dopaminergic subset specification: fundamental aspects and clinical perspectives', *Cell Mol Life Sci*, 71(24), pp. 4703-27.
- Vialou, V., Feng, J., Robison, A. J., Ku, S. M., Ferguson, D., Scobie, K. N., Mazei-Robison, M. S., Mouzon, E. and Nestler, E. J. (2012) 'Serum response factor and cAMP response element binding protein are both required for cocaine induction of  $\Delta$ FosB', *J Neurosci*, 32(22), pp. 7577-84.
- Wall, N. R., De La Parra, M., Callaway, E. M. and Kreitzer, A. C. (2013) 'Differential innervation of direct- and indirect-pathway striatal projection neurons', *Neuron*, 79(2), pp. 347-60.
- Wang, D., Chang, P. S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J. A., Small, E., Krieg, P. A. and Olson, E. N. (2001) 'Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor', *Cell*, 105(7), pp. 851-62.
- Wang, Z., Wang, D. Z., Pipes, G. C. and Olson, E. N. (2003) 'Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(12), pp. 7129-34.
- Westin, J. E., Vercaamen, L., Strome, E. M., Konradi, C. and Cenci, M. A. (2007) 'Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia and the role of dopamine D1 receptors', *Biol Psychiatry*, 62(7), pp. 800-10.
- Wickramasinghe, S. R., Alvania, R. S., Ramanan, N., Wood, J. N., Mandai, K. and Ginty, D. D. (2008) 'Serum response factor mediates NGF-dependent target innervation by embryonic DRG sensory neurons', *Neuron*, 58(4), pp. 532-45.
- Winkler, C., Kirik, D., Björklund, A. and Cenci, M. A. (2002) 'L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function', *Neurobiol Dis*, 10(2), pp. 165-86.
- Xilouri, M., Brekk, O. R. and Stefanis, L. (2013) ' $\alpha$ -Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship', *Mol Neurobiol*, 47(2), pp. 537-51.
- Yano, M. and Steiner, H. (2005a) 'Methylphenidate (Ritalin) induces Homer 1a and zif 268 expression in specific corticostriatal circuits', *Neuroscience*, 132(3), pp. 855-65.
- Yano, M. and Steiner, H. (2005b) 'Topography of methylphenidate (ritalin)-induced gene regulation in the striatum: differential effects on c-fos, substance P and opioid peptides', *Neuropsychopharmacology*, 30(5), pp. 901-15.
- Yetnikoff, L., Lavezzi, H. N., Reichard, R. A. and Zahm, D. S. (2014) 'An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex', *Neuroscience*, 282, pp. 23-48.
- Yin, H. H., Mulcare, S. P., Hilário, M. R., Clouse, E., Holloway, T., Davis, M. I., Hansson, A. C., Lovinger, D. M. and Costa, R. M. (2009) 'Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill', *Nat Neurosci*, 12(3), pp. 333-41.
- Yin, Z., Machius, M., Nestler, E. J. and Rudenko, G. (2017) 'Activator Protein-1: redox switch controlling structure and DNA-binding', *Nucleic Acids Res*.

