



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Efectos del entorno enriquecido en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson basado en la sobreexpresión de α -sinucleína

TESIS DOCTORAL

Andrea Vaquero Rodríguez

Leioa, 2024

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	13
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Enfermedad de Parkinson	1
1.1.1. Signos clínicos, síntomas y diagnóstico	2
1.1.2. Patogénesis de la enfermedad de Parkinson.....	4
1.1.3. Etiología de la enfermedad de Parkinson	13
1.1.4. Tratamiento de la enfermedad de Parkinson.....	16
1.2. Base anatómica de la enfermedad de Parkinson: ganglios basales.....	19
1.2.1. Circuito motor de los ganglios basales en condiciones fisiológicas	21
1.2.2. Circuito motor de los ganglios basales en la enfermedad de Parkinson	22
1.3. Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson	23
1.3.1. Modelos neurotóxicos.....	24
1.3.2. Modelos genéticos.....	26
1.3.3. Modelos basados en vectores virales	27
1.4. Entorno enriquecido (EE)	30
1.4.1. El entorno enriquecido y los factores neurotróficos	32
1.4.2. El entorno enriquecido en la enfermedad de Parkinson.....	34
1.4.3. Papel de los factores neurotróficos en la enfermedad de Parkinson	35
2. HIPÓTESIS.....	39
3. OBJETIVOS.....	43
3.1. Objetivo principal	45
3.2. Objetivos específicos	45
4. MATERIAL Y MÉTODOS	47
4.1. Animales	49
4.2. Condiciones de cría.....	49
4.3. Procedimiento quirúrgico.....	49
4.4. Grupos experimentales.....	50
4.5. Pruebas comportamentales	51
4.5.1. Prueba de Campo Abierto (OF)	52
4.5.2. Representación de mapas de calor	53
4.6. Ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	53

4.6.1. Procesamiento del material para estudios histológicos.....	53
4.6.2. Inmunofluorescencia	54
4.6.3. Inmunohistoquímica	55
4.7. Procedimientos de cuantificación para los ensayos inmunohistoquímicos.....	56
4.7.1. Estereología	56
4.7.2. Densitometría óptica	58
4.7.3. Cuantificación de la superficie ocupada por las degeneraciones axonales (“axonal swellings”)	59
4.8. Western Blot	59
4.8.1. Procesamiento del material para el Western blot	59
4.8.2. Ensayo de Bradford para cuantificación de proteínas.....	60
4.8.3. Electroforesis	61
4.8.4. Transferencia de proteínas desde el gel a la membrana.....	61
4.8.5. Inmunoblotting.....	61
4.8.6. Adquisición y análisis de datos.....	62
4.9. Análisis estadístico y preparación de figuras.....	63
5. RESULTADOS	65
BLOQUE I: Validación del modelo experimental de la enfermedad de Parkinson	67
5.1. Efecto de la sobreexpresión de la α-sinucleína sobre la actividad motora.....	67
5.2. Análisis de la sobreexpresión de α-sinucleína en la vía nigroestriatal	71
5.2.1. Colocalización de α -sin y tirosina hidroxilasa (TH)	71
5.2.2. Colocalización de α -sin y marcadores gliales	76
5.2.3. Análisis de la difusión de la α -sin	76
5.2.4. Análisis de la expresión de la α -sin fosforilada.....	78
5.3. Análisis de la degeneración dopaminérgica de la vía nigroestriatal.....	79
5.3.1. Cuantificación estereológica de neuronas dopaminérgicas en la SNpc	79
5.3.2. Análisis de las fibras dopaminérgicas en el estriado	82
5.3.3. Cuantificación estereológica de fibras dopaminérgicas en la SNpr	84
5.4. Evaluación cualitativa de la activación glial tras la sobreexpresión de α-sin	86
BLOQUE II: Efecto del entorno enriquecido sobre la degeneración de la vía nigroestriatal inducido por la sobreexpresión de α-sin.....	91
5.5. Efecto del entorno enriquecido sobre la actividad motora	91
5.6. Análisis de la sobreexpresión de α-sinucleína en la vía nigroestriatal tras la cría en EE	97

5.6.1. Análisis de la sobreexpresión de α -sin y su colocalización con tirosina hidroxilasa en la SNpc	97
5.6.2. Análisis de la expresión de la α -sin fosforilada en la SNpc	98
5.7. Efecto del entorno enriquecido sobre la degeneración dopaminérgica de la vía nigroestriatal	99
5.7.1. Cuantificación estereológica de neuronas dopaminérgicas en la SNpc	99
5.7.2. Análisis de fibras dopaminérgicas en el estriado	101
5.7.3. Cuantificación estereológica de fibras dopaminérgicas en la SNpr	104
5.8. Impacto del EE sobre el estrés oxidativo inducido por la sobreexpresión de α-sin.....	106
5.9. Evaluación cualitativa de la activación glial tras la sobreexpresión de α-sin y la cría en EE	108
5.10. Evaluación de la expresión de proteínas clave en la vía de regulación del EE.....	111
5.10.1. Análisis de la expresión de BDNF	112
5.10.2. Análisis de la expresión de p-TrkB/TrkB	114
5.10.3. Análisis de la activación de la vía de señalización de ERK.....	116
5.10.4. Análisis de la expresión de GDNF.....	118
5.10.5. Análisis de la expresión de Nf- κ B.....	120
5.11. Análisis de correlación de las variables histológicas y moleculares	121
6. DISCUSIÓN.....	125
6.1. Validación del modelo experimental de la EP basado en la sobreexpresión de α-sin mediado por el rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE	127
6.1.1. La inyección de rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE produce una sobreexpresión de α -sin en las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal	128
6.1.2. Difusión de la α -sin	129
6.1.3. La sobreexpresión de α -sin mediante el vector rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn induce la fosforilación del residuo S129 en la <i>substantia nigra</i>	130
6.1.4. La sobreexpresión de α -sin provoca una degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriatal.....	131
6.1.5. Aumento de la reactividad glial en la vía nigroestriatal como consecuencia de la sobreexpresión de α -sin.....	136
6.1.6. Deterioro de la actividad motora causada por la sobreexpresión de α -sin.....	138
6.2. El entorno enriquecido como estrategia neuroprotectora en el modelo animal de EP inducido por el vector rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE	140

6.2.1. La cría en EE reduce la sobreexpresión de α -sin y su fosforilación en las neuronas de la vía nigroestriatal sin alterar la capacidad de difusión	140
6.2.2. El entorno enriquecido aumenta la supervivencia de las neuronas en proceso de degeneración en la vía nigroestriatal tras la sobreexpresión de α -sin	142
6.2.3. El entorno enriquecido revierte la disminución de los niveles de BDNF-TrkB-ERK causado por la sobreexpresión de α -sin	145
6.2.4. Papel del EE sobre las células gliales: disminución de la neuroinflamación y aumento de la expresión del GDNF	150
6.2.5. El entorno enriquecido modula el estrés oxidativo causado por la expresión de α -sin ..	154
6.2.6. Cambios en la sintomatología motora debido a la cría en EE	156
7. CONCLUSIONES	159
8. BIBLIOGRAFÍA	163
ANEXOS	198
Anexo 1: Soluciones	200
Anexo II: Resultados test de Campo Abierto.....	204
Anexo III: Resultados de las cuantificaciones de la vía nigroestriatal	206
Anexo IV: Resultados de las cuantificaciones de la expresión de proteínas (WB)	208

ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
α-sin	α -sinucleína
AAV	Vector viral adenoasociado
Acb	Núcleo accumbens
ADH1	Alcohol deshidrogenasa 1
ADN	Ácido desoxirribunucleico
ALP	Vía autofagia-lisosoma
ANOVA	Análisis de la varianza
ARE	Elementos de respuesta a antioxidantes
ARN	Ácido ribonucleico
asf	Fracción de muestreo de área
ATP	Trifosfato de adenosina
BBB	Barrera hematoencefálica
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca²⁺	Calcio
CE	Condiciones estándar
CK	Quinasa de la caseína
CL	Cuerpos de Lewy
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
COX	Ciclooxigenasa
CPC	Complejo caudado putamen
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta cAMP
CTEM	Cadena de transporte de electrones mitocondrial

Abreviaturas

CYP1A2	Citocromo P450 familia 1 subfamilia A miembro 2 (CYP1A2)
D1	Receptor de dopamina 1
D2	Receptor de dopamina 2
DA	Dopamina
DAB	3,3 diaminobenzidina
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
DAT	Transportador de dopamina
DBS	Deep Brain Stimulation
DJ-1	Proteína deglicasa
DLR	Región locomotora diencefálica
DO	Densidad óptica
DPX	Medio de montaje de resina sintética
dSPNs	Neuronas de proyección directa
EE	Entorno enriquecido
EGR1	Proteína de respuesta de crecimiento temprano 1
EP	Enfermedad de Parkinson
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GFRα1	Núcleoceptor anclado por glicosil-fosfatidilinositol
GP	Globo pálido
GPe	Segmento externo del globo pálido
GPI	Segmento interno del globo pálido

GRK	Quinasa de receptores acoplados a proteínas G
HO-1	Hemo oxigenasa 1
IκB	Inhibidor de kappa B
IL	Interleucina
iSPNs	Neuronas de proyección de la vía indirecta
Keap1	Proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch
L-Dopa	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LPS	Lipopolisacáridos
LRRK2	Quinasa 2 relacionada con leucina y rica en cisteína
LV	Vector lentiviral
MAO	Enzima monoaminooxidasa
MAPK	Familia de quinasas activadas por mitógenos
MLR	Región locomotora mesencefálica
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz-9
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NAC	Componente no amiloide
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NHS	Suero normal de caballo
NL	Neuritas de Lewy
NLRP3	Receptor de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
Nrf-2	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
NURR1	Receptor nuclear asociado 1
OF	Test de campo abierto

Abreviaturas

p-α-sin	α -sinucleína fosforilada
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-TX	PBS 0,1 M con Tritón X-100 al 0,5%
PFA	Paraformaldehído
PGC-1α	Coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas
PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinasa
PINK-1	Quinasa 1 inducida por PTEN
PLK	Quinasa de tipo polo
PNH	Primates no humanos
PON1	Paraoxonasa 1 (PON1)
ppp	Puntos por pulgada
PTEN	Fosfatasa y tensina homóloga
PVDF	Polivinilideno difluoruro
REM	Movimientos oculares rápidos
RET	Receptor tirosina quinasa reorganizado durante la transfección
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SC	Colículo superior
SDS	Sodio doecil sulfato
SEM	Error estándar de la media
SH2	Dominio de homología 2
SN	<i>Substantia nigra</i>
SNARE	Receptor de proteínas de fijación soluble del factor sensible a la N-etilmaleimida
SNC	Sistema nervioso central

SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SNpr	<i>Substantia nigra pars reticulata</i>
ssf	Factor de muestreo de secciones
STN	Núcleo subtalámico
SVZ	Zona subventricular
TH	Tirosina hidroxilasa
TLR	Receptor tipo <i>Toll</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
tPA	Activador del plasminógeno tisular
Trk	Receptor de tiroxina quinasa
TTBS	Tampón de solución salina tris-bicarbonato de sodio
UCH-L1	Ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1
UPS	Sistema ubiquitina-proteasoma
VMAT2	Transportador de monoaminas vesiculares 2
VTA	Área tegmental ventral
WB	Western blot
WPRE	Elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis del visón

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo que afecta al 1-5% de las personas mayores de 60 años, con una mayor incidencia en hombres. La EP se caracteriza patológicamente por la degeneración y pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* (SN), produciendo alteraciones motoras. La característica neuropatológica de la EP consiste en la agregación de α -sinucleína (α -sin) en cuerpos de Lewy (CL) y neuritas de Lewy (NL). A pesar de que la α -sin desempeña funciones fisiológicas vitales, el mal plegamiento de la misma conduce a su agregación, contribuyendo a las sinucleinopatías, como es el caso de la EP.

El estudio de esta enfermedad ha sido abordado mediante la utilización de diversos modelos animales. Sin embargo, ninguno de ellos ha conseguido explicar completamente los cambios fisiopatológicos observados en los enfermos de Parkinson. Por lo tanto, se desconoce el mecanismo subyacente a la acumulación patológica de α -sin en el cerebro de estos pacientes. En este sentido, el empleo de vectores adenovirales para sobreexpresar esta proteína en ratas está emergiendo como un modelo cada vez más utilizado para reproducir la sintomatología de la EP.

Asimismo, los tratamientos actuales para la EP carecen de eficacia a largo plazo, y no son capaces de reparar las áreas cerebrales dañadas. Por este motivo, las investigaciones actuales se centran en la búsqueda de estrategias neuroprotectoras para tratar de frenar el proceso neurodegenerativo. Una estrategia neuroprotectora y no invasiva es el entorno enriquecido (EE) que consiste en la combinación de estímulos somatosensoriales, motores y sociales, produciendo así una mejora de las funciones biológicas. Estudios previos han descrito que la exposición a EE induce mejoras relacionadas con la plasticidad neuronal y con los síntomas motores y cognitivos asociados a la EP.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, este estudio propone examinar los cambios morfológicos derivados de la sobreexpresión de α -sin y de la cría en EE en un modelo rata de EP. En primer lugar, con el fin de verificar la validez del modelo animal se indujo la sobreexpresión de α -sin mediante la inyección bilateral de un vector viral adenoasociado AAV9 en la SN. Se evaluó la idoneidad de este modelo animal analizando sus efectos a lo largo del tiempo. Se definieron tres intervalos temporales en función de la duración de la sobreexpresión de α -sin, con el propósito de describir el proceso patológico asociado a la expresión de esta proteína. Se examinaron los efectos de la expresión 1, 2 y 4 meses después de la inyección bilateral de 1 μ l del vector viral rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) de estos animales.

Asimismo, para estudiar el efecto neuroprotector del EE en este modelo animal, los animales fueron criados en estas condiciones de estabulación durante un periodo de 2 meses postinyección, y fueron comparados con aquellos criados en condiciones estándar (CE).

Las alteraciones motoras se evaluaron mediante el test de campo abierto, y las alteraciones morfológicas y moleculares asociadas a la sobreexpresión de α -sin y la cría en EE se estudiaron mediante inmunohistoquímica, estereología y un análisis de la expresión de proteínas que permitiera dilucidar las vías moleculares involucradas en el proceso de degeneración y en la estrategia neurorescatadora aplicada.

Los resultados obtenidos revelaron que el modelo experimental de EP inducido por la sobreexpresión de α -sin mediante vectores adenovirales logró replicar la progresión de la EP a lo largo del tiempo. Este fenómeno se manifestó tanto a nivel conductual como histológico, evidenciando un aumento progresivo en la sobreexpresión de α -sin y una disminución de células y fibras dopaminérgicas a lo largo de la vía nigroestriatal. Además, esta degeneración se correlacionó con la aparición de agregados axonales, que son indicadores de la degeneración de las mismas, semejantes a las observadas en las neuritas de Lewy (NL) de los pacientes con EP.

La cría en EE durante los 2 meses posteriores a la inyección del virus promovió mejoras tanto funcionales como morfológicas. De hecho, se observó una reducción de la degeneración de la vía nigroestriatal, es decir, los animales criados en EE mostraron una menor pérdida neuronal y de fibras dopaminérgicas estriatales que aquellos criados en CE. Además, este entorno también desencadenó un incremento en la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), de su receptor tirosina quinasa B (TrKB), de la vía de señalización neuroprotectora aguas abajo (ERK). Por otro lado, la cría en EE resultó en una disminución de la reactividad glial, y una tendencia al aumento del factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) y una disminución en la expresión del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf-2) y del factor nuclear kappa B (NF- κ B).

En conclusión, nuestros hallazgos sugieren que la activación de mecanismos protectores y/o restauradores impulsados por el EE desencadenan una marcada reducción en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc inducida por la sobreexpresión de α -sin. Asimismo, el EE produce una mayor preservación de las proyecciones nigroestriatales, y una disminución en la formación de agregados axonales, acompañados de un incremento en la expresión de factores neurotróficos. Además, induce una reducción de la neuroinflamación y actúa sobre el estrés oxidativo, dos características relevantes de la EP. Por lo tanto, estos resultados destacan la capacidad de la cría en EE para modular positivamente las alteraciones asociadas a la sobreexpresión de α -sin en este modelo experimental de la EP.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más común después de la enfermedad de Alzheimer (Poewe et al., 2017), afectando aproximadamente a 10 millones de personas a nivel mundial (Ou et al., 2021). James Parkinson, en su obra "An Essay on the Shaking Palsy" (Un Ensayo sobre la Parálisis Agitante), describió los síntomas motores de la enfermedad que posteriormente llevaría su nombre (Parkinson, 1817). Parkinson identificó síntomas como temblores en reposo, lentitud, postura encorvada y marcha arrastrada (Kempster et al., 2007). Además, hizo referencia a aspectos no motores como la perturbación del sueño y el estreñimiento. Curiosamente, en su descripción, no mencionó la demencia, ya que, en el siglo XIX, las personas con EP rara vez lograban alcanzar la edad suficiente para experimentar el declive cognitivo que ocurre alrededor de los 80 años en estos enfermos (Kempster et al., 2007). En la actualidad, la EP se describe como una enfermedad neurodegenerativa progresiva con disfunción motora, no motora y conductual.

La EP está experimentando un aumento en su prevalencia, convirtiéndola en un grave problema de salud pública (Ou et al., 2021). Este incremento se asocia con el envejecimiento de la población (GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators, 2018), la predisposición genética (Wirdefeldt et al., 2011), así como el estilo de vida y la contaminación ambiental (Kasdagli et al., 2019). Además, la mejora en los métodos de diagnóstico está contribuyendo a una mayor identificación de casos (Alcalay et al., 2020).

La EP afecta al 0,1% de la población mundial. Las tasas de incidencia comienzan a aumentar a partir de los 50 años, alcanzando un valor del 0,5-1% en personas de entre 65-69 años (Nussbaum y Ellis, 2003; de Lau et al., 2004). El incremento es más notable después de los 75 años, con una prevalencia del 1-3% a los 80 años de edad (Nussbaum y Ellis, 2003; de Lau et al., 2004). Estas cifras resaltan la importancia de abordar, no sólo los aspectos médicos de la EP, sino también los factores sociales que contribuyen a su propagación.

En los estudios sobre incidencia y mortalidad de la EP, se observa que los hombres son más propensos a desarrollar esta enfermedad, especialmente entre 60-79 años, donde la incidencia es casi el doble en comparación con las mujeres (Hirsch et al., 2016). Se sugiere que esta disparidad podría deberse a diferencias en la expresión génica entre los sexos (Loke et al., 2015). En las mujeres, se presume una mayor actividad de los estrógenos, lo que resulta en niveles más elevados de dopamina en el estriado. Este aumento de dopamina genera un efecto

1. Introducción

neuroprotector en las etapas preclínicas, retrasando el inicio del proceso neurodegenerativo (Haaxma et al., 2007).

1.1.1. Signos clínicos, síntomas y diagnóstico

La sintomatología de esta enfermedad varía entre la etapa presintomática y la sintomática. Los síntomas de la etapa presintomática, es decir, aquellos que se manifiestan en las primeras fases, son la hiposmia, alteraciones en el sueño, especialmente trastorno del comportamiento del sueño con movimientos oculares rápidos (REM) e insomnio, estreñimiento y disfunción vagal entre otros (Angot y Brundin, 2009; Jellinger, 2011). Estas alteraciones están vinculadas con la degeneración de sistemas de neurotransmisores, como el serotoninérgico, adrenérgico y colinérgico, con la consiguiente pérdida celular en diversas áreas cerebrales (Schapira, 2009), como el locus coeruleus, el núcleo reticular gigantocelular y los núcleos del rafe caudales (Braak et al., 2003b).

La etapa sintomática se manifiesta en fases más avanzadas de la enfermedad (Braak et al., 2004), y se caracteriza principalmente por la presencia de bradicinesia, temblor en reposo y rigidez (Ou et al., 2021). Estos síntomas están relacionados con la principal característica fisiopatológica de la EP, es decir, con la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra* (SN), lo que conlleva una desregulación de la actividad de los ganglios basales (Dauer y Przedborski, 2003).

La ausencia de síntomas motores en la primera fase de la enfermedad puede atribuirse a procesos compensatorios derivados de la “reserva neuronal” o a mecanismos compensatorios activos, como el brote axonal colateral de las neuronas dopaminérgicas supervivientes (Arkadir et al., 2014). Asimismo, las alteraciones cognitivas se manifiestan principalmente en las etapas más avanzadas (Angot y Brundin, 2009).

Por lo tanto, con la EP se vinculan tanto síntomas motores como no motores:

- **Síntomas no motores:** aparecen, con frecuencia, años antes de que se manifiesten los síntomas motores, aunque su intensidad tiende a aumentar durante el desarrollo de la enfermedad. Incluyen disfunción del sistema nervioso autónomo (hipertensión ortostática y estreñimiento), pérdida del sentido del olfato, trastornos psiquiátricos y cognitivos, así como alteraciones relacionadas con el sueño como insomnio, somnolencia diurna y trastorno del comportamiento del sueño REM (Poewe, 2008; Postuma et al., 2015a). También se han documentado otros síntomas como sudoración, disfunción esfinteriana y eréctil e hipotensión

(Jankovic, 2008). Esta agrupación de síntomas, particularmente aquellos vinculados al deterioro cognitivo y la demencia, está asociada con una disminución en la calidad de vida de los pacientes, generando discapacidad progresiva, e incluso acortando su esperanza de vida (Poewe, 2008; Irwin et al., 2013). No obstante, existe una carencia de datos provenientes de ensayos clínicos controlados acerca de su tratamiento (Seppi et al., 2019). Es importante destacar que, en las etapas tempranas de la enfermedad, prevalece la afectación de áreas no nigrales (Braak et al., 2004, 2006).

- **Síntomas motores:** se caracterizan principalmente por la presencia de temblores en reposo, bradicinesia, rigidez e inestabilidad postural (Jankovic, 2008). No obstante, existen variaciones significativas en la sintomatología entre distintos pacientes, y las diversas opciones terapéuticas pueden complicar su abordaje (Schrag y Quinn, 2000). Al igual que sucede con los síntomas no motores, la función motora y la discapacidad experimentan un deterioro progresivo con el tiempo (Alves et al., 2005), impactando negativamente en la calidad de vida de estos pacientes (Martínez-Martín et al., 2014; He et al., 2016).

La naturaleza y la intensidad de los síntomas varían considerablemente según el tiempo transcurrido desde el inicio, la velocidad del deterioro funcional y el tratamiento farmacológico recibido por el paciente (Deumens et al., 2002).

Como consecuencia de los síntomas clínicos previamente mencionados, la EP se presenta como una entidad clínico-patológica compleja. La EP puede clasificarse como idiopática o genética (Tysnes y Storstein, 2017). La **EP idiopática** abarca aproximadamente el 90% de los casos totales y se cree que es causada por el envejecimiento, así como por factores ambientales y predisposición genética. A pesar de que el envejecimiento es el principal factor de riesgo en la EP, diversos agentes ambientales, como la exposición a sustancias tóxicas (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), rotenona, paraquat) o el estilo de vida, se han vinculado con esta enfermedad (Ascherio y Scharzschild, 2016; Ball et al., 2019).

La **EP de origen genético** constituye aproximadamente el 10% de los casos totales, y se caracteriza por un inicio temprano de la sintomatología (< 50 años) y un componente hereditario marcado. Se han identificado 23 loci y 19 genes causativos vinculados a la EP, como *parkin* y *ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1)*, que alteran la homeostasis proteica, *quinasa 1 inducida por fosfatasa* y *tensina homóloga PTEN (PINK-1)* y *quinasa 2 relacionada con leucina y rica en cisteína (LRRK2)* que interfieren con la fosforilación, o *proteína desglucosa DJ-1*, que induce

1. Introducción

estrés oxidativo (van Der Brug et al., 2015; Del Rey et al., 2018). Además, la EP se ha relacionado con alteraciones epigenéticas (metilación del ADN, modificación de histonas y microARNs) (Kim et al., 2007; Coupland et al., 2014; Park et al., 2016). Aunque su prevalencia es baja, las formas hereditarias de esta patología han contribuido significativamente a la comprensión de los mecanismos involucrados en ella, ya que los genes afectados en estas formas también se ven afectados en la EP idiopática (Nalls et al., 2014).

En relación con el diagnóstico de la EP, no existe una prueba concluyente (Miller y O'Callaghan, 2015). Si bien, el examen físico, la identificación clínica de los síntomas motores y la respuesta positiva a tratamientos dopaminérgicos pueden contribuir a establecer este diagnóstico (Samii et al., 2004), es importante señalar que estos síntomas también pueden manifestarse en otros trastornos (Miller y O'Callaghan, 2015). En general, las irregularidades iniciales de la marcha (congelación), los hallazgos en el tracto piramidal, el temblor, la respuesta a la levodopa y la inestabilidad postural posibilitan la diferenciación de la EP de otros trastornos parkinsonianos (Jankovic, 2008), pero debido a esta complejidad diagnóstica, la confirmación definitiva de la EP se logra a través del análisis histopatológico obtenido tras la autopsia.

1.1.2. Patogénesis de la enfermedad de Parkinson

La EP se caracteriza por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) presente en los cerebros de los pacientes afectados por esta enfermedad (Cookson, 2005; Davie, 2008). Este fenómeno se acompaña de la formación de Cuerpos de Lewy (CL) en la SN, en el tronco encefálico, y en las regiones rostrales del cerebro (Braak y Braak, 2000).

El desarrollo de esta patología ha sido relacionado con una gran variedad de mecanismos patogénicos, como la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, las alteraciones en los sistemas autofágico y endo-lisosómico, la acumulación de proteínas anómalas o mal plegadas como la α -sinucleína (α -sin), el desequilibrio de la homeostasis del calcio (Ca^{2+}), y la disfunción del sistema ubiquitina-proteasoma (Helley et al., 2017; Zaichick et al., 2017; Franco-Iborra et al., 2018).

Más concretamente, en el proceso neurodegenerativo de la EP, se ha establecido una conexión entre la agregación de α -sin, la disfunción mitocondrial y la degradación de los sistemas endo-lisosómico y proteasoma (Pozo Devoto y Falzone, 2017; Grassi et al., 2018; Vicario et al., 2018). Sin embargo, el factor causal original sigue siendo desconocido. Por esta razón, es crucial comprender las conexiones y proyecciones del sistema dopaminérgico estriatal, así como la diversidad en las características celulares y moleculares del complejo caudado-putamen (CPC) y la

SN, con el objetivo de comprender la patogénesis y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. En este contexto, lograr una comprensión global de todos los mecanismos patológicos relacionados con la EP es fundamental para desentrañar el factor causal de esta enfermedad (Obeso et al., 2010) (Fig. 1).

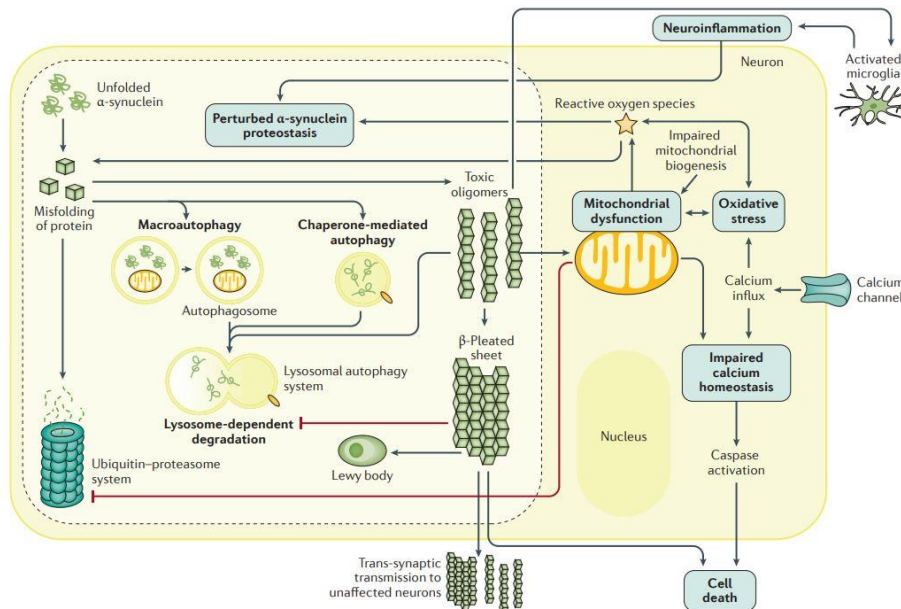


Figura 1. Mecanismos moleculares involucrados en la enfermedad de Parkinson (Poewe et al., 2017). Diagrama esquemático que representa las interacciones entre las principales vías moleculares implicadas en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson.

Degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal

Uno de los principales rasgos patológicos de la EP es la degeneración selectiva de la vía dopaminérgica nigroestriatal (Fig. 2) (Greenamyre et al., 2003). En consecuencia, se observa una pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas en la región mesencefálica, particularmente en la SN, cuyos axones proyectan al estriado como parte de la vía nigroestriatal (Lees et al., 2009; Hegarty et al., 2013). Esta degeneración neuronal resulta en una disminución de los niveles de dopamina en el estriado, dando lugar a las características motoras distintivas que constituyen la base del diagnóstico clínico (Jankovic, 2008).

No obstante, como se ha mencionado anteriormente, la neurodegeneración asociada a la EP no se restringe exclusivamente a la vía nigroestriatal. Se han descrito cambios patológicos en diversas regiones, tanto del sistema nervioso central (SNC) como del periférico, desencadenando una degeneración multisistémica que afecta a una variedad de sistemas de neurotransmisores,

1. Introducción

entre los que se encuentran el sistema noradrenérgico, serotoninérgico y colinérgico, además del dopaminérgico (Braak et al., 2003a; Schapira, 2009). Este deterioro en los sistemas neuronales cruciales tiene consecuencias significativas en aspectos que van más allá del ámbito motor, como la cognición y la depresión (Deumens et al., 2002). De manera complementaria, las disfunciones en los sistemas dopaminérgicos extranigrales (mesolímbico, mesocortical y talámico) podrían igualmente contribuir a la complejidad sintomatológica de la EP (Lim et al., 2009).

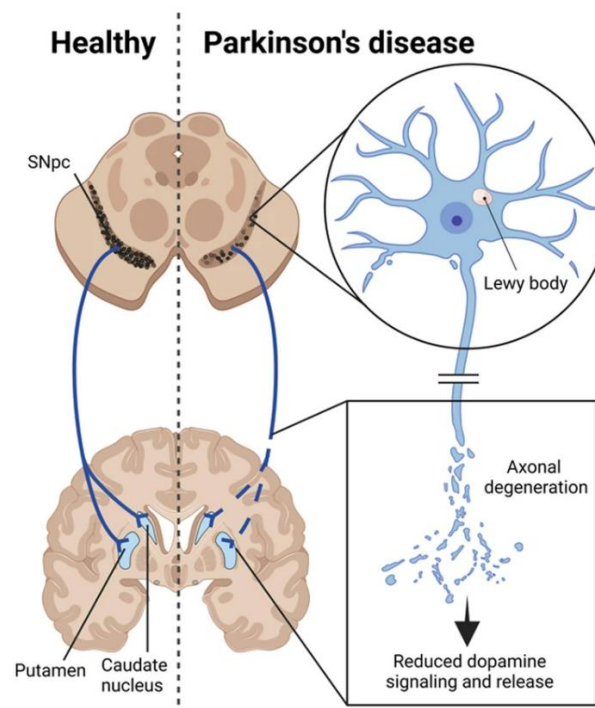


Figura 2. Características distintivas de la enfermedad de Parkinson (EP) (Adaptado de Donovan et al., 2023). Los síntomas motores predominantes de la EP surgen de la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y la denervación de sus axones en los núcleos caudado y putamen, también conocidos como el estriado.

Formación de cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy

Otro de los marcadores patológicos distintivos de la EP es la presencia de CL y neuritas de Lewy (NL) (Riederer et al., 2019). Inicialmente fueron descritos por Friedrich Heinrich Lewy en 1912, y su implicación en la patología fue detallada posteriormente por Tretiakoff en 1919 (Spillantini et al., 1997; Spillantini y Goedert, 2018). Los CL y NL consisten en inclusiones eosinofílicas proteicas intraneuronales predominantemente compuestas por α -sin y ubiquitina en el cuerpo celular y las neuritas, respectivamente, mostrando unas dimensiones que varían entre 8-30 μm de diámetro (Spillantini et al., 1997; Surmeier et al., 2017; Spillantini y Goedert, 2018).

Estas inclusiones pueden estar presentes en diversos lugares, como en los núcleos del tronco encefálico, la amígdala, los ganglios basales, las cortezas límbico-paralímbicas y neocorteza, así como en la médula. En el tronco encefálico, los CL predominan en la SN, los núcleos de los nervios vago y glosofaríngeo, los núcleos reticulares y el locus coeruleus. Por otra parte, los CL corticales se encuentran en las regiones límbicas y neocorticales, principalmente en las capas II, III, V y VI. Los depósitos límbicos suelen detectarse en la amígdala y las cortezas transentorrinales y cinguladas, mientras que la patología neocortical afecta principalmente a las cortezas temporales, frontales y parietales (McKeith et al., 2005). Esta diversidad de localizaciones para los CL podría ser la causa de la manifestación de múltiples síntomas no motores en la EP (Wakabayashi et al., 2013).

Hasta la fecha, no se ha logrado comprender completamente el proceso de formación de los CL, y se asume que dicho desarrollo puede requerir varios meses o incluso años, especialmente considerando que la EP tiene mayor probabilidad de manifestarse en personas mayores (Fares et al., 2021).

Alfa-sinucleína, su fosforilación y la formación de agregados

La proteína α -sinucleína (α -sin), codificada por el gen *SNCA*, se distribuye por diversas regiones cerebrales como la neocorteza, el hipocampo, la amígdala, el tálamo y el cerebelo (Choong y Mochizuki, 2022). Es una molécula de pequeño tamaño, con una longitud de 140 aminoácidos y que presenta tres dominios distintivos: un dominio N-terminal altamente conservado, capaz de formar estructuras de α -hélice anfipáticas que facilitan la interacción con lípidos (Pan et al., 2019); un dominio hidrófobo conocido como componente no amiloide (NAC), y un dominio C-terminal (Caughey y Lansbury, 2003). Adicionalmente, esta proteína exhibe una estructura terciaria predominantemente compuesta por α -hélices y tiende a formar tetrámeros (Caughey y Lansbury, 2003).

En conjunto con las proteínas β - y γ -sinucleína, la α -sin forma la familia de las sinucleínas, y es propensa a diversas modificaciones postraduccionales que alteran su estructura y afinidades de unión. La fosforilación de la α -sin es, probablemente, la modificación más estudiada, lo que conduce a la formación de oligómeros y fibrillas que pueden provocar neurotoxicidad (Fujiwara et al., 2002; Burré et al., 2018).

En condiciones fisiológicas, la α -sin mantiene un equilibrio entre su forma soluble, que corresponde a un estado monomérico desplegado y ubicado en el citosol, y su forma insoluble,

1. Introducción

que adopta un estado α -helicoidal que se une preferentemente a las membranas lipídicas. Especialmente, muestra afinidad por las balsas lipídicas ricas en ácidos grasos insaturados (Fortin et al., 2004). Aunque las funciones fisiológicas de la proteína α -sin no están completamente claras, se cree que participa en el funcionamiento del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), la transducción de señales, la regulación del estrés oxidativo, la función mitocondrial, la función sináptica y el reciclaje de vesículas (Bisaglia et al., 2009). Además, la elevada concentración de α -sin en los terminales presinápticos sugiere una implicación crucial en el mantenimiento de la función presináptica, la liberación de dopamina y la capacidad de unirse a receptores de proteínas de fijación soluble del factor sensible a la N-etilmaleimida (SNARE), esencial para la fusión de vesículas con la membrana (Savolainen et al., 2015). Asimismo, se ha asociado con la liberación de neurotransmisores desde el terminal presináptico hacia la hendidura sináptica (Thayanidhi et al., 2010). Su capacidad para interactuar con lípidos y asociarse con vesículas sinápticas podría influir también en el tráfico intracelular de vesículas (Savolainen et al., 2015). Además, la α -sin tiene la capacidad de unirse a la tirosina hidroxilasa (TH), la enzima responsable de convertir la tirosina en levodopa, el precursor de la dopamina, y regular la actividad de esta enzima (Burré et al., 2018).

La alteración en la estructura terciaria de la proteína α -sin, al pasar de una conformación rica en α -hélice a otra dominada por láminas- β , desencadena el proceso de formación de agregados insolubles (Caughey y Lansbury, 2003). Estas estructuras están asociadas con la agregación y formación de fibrillas de α -sin, que constituyen el componente principal de los CL y las NL (Burré et al., 2018) (**Fig. 3**). Estos agregados se acumulan, ejerciendo un efecto citotóxico en las neuronas, lo que conduce a su muerte y, en consecuencia, al inicio de los síntomas parkinsonianos (Burré et al., 2018). Este proceso marca el inicio de enfermedades conocidas como α -sinucleopatías entre las que destacan la EP, la demencia de CL, o la atrofia multisistémica (Savolainen et al., 2015).

Por otro lado, las mutaciones en el gen *SNCA* se asocian con formas familiares de la EP, destacando así el papel crucial de la α -sin en el desarrollo de esta patología (Henrich et al., 2018). Todas las mutaciones conocidas, incluyendo A30P, E46K, H50Q, G15D y A53T, se encuentran en la región anfipática de la proteína, lo que indica la relevancia de su interacción con lípidos en la patogenia de la enfermedad (Pan et al., 2019). Además, se ha demostrado que las mutaciones en el gen *SNCA* pueden alterar la fosforilación de la α -sin (Guan et al., 2020).

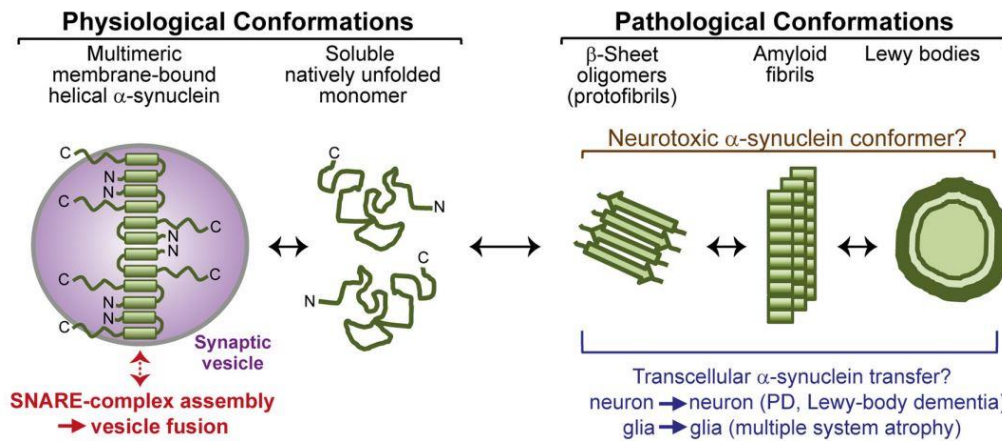


Figura 3. Esquema de las conformaciones de α -sin asociadas con su función fisiológica y actividades patológicas (Burré et al., 2015). La α -sin soluble, de forma nativa, es no estructurada y monomérica. Después de unirse a membranas, como las vesículas sinápticas, experimenta un cambio conformacional y se pliega en una α -hélice anfipática, lo que se asocia con la multimerización y facilita su función de chaperona del complejo SNARE. En condiciones patológicas, la α -sin soluble se organiza en oligómeros con estructura de lámina β (protofibrillas), las cuales evolucionan a fibrillas amiloides, que se depositan en los cuerpos de Lewy. Las protofibrillas y las fibrillas pueden propagarse de neurona a neurona en la EP y la demencia de cuerpos de Lewy.

La fosforilación en la posición S129 destaca como la principal modificación postraduccional de la proteína α -sin, desempeñando un papel crítico en la regulación de su estructura, agregación y neurotoxicidad (Reimer et al., 2018). En el contexto de la EP, esta fosforilación surge como la modificación más predominante y se manifiesta en etapas tempranas (Sonustun et al., 2022). A pesar de la falta de consenso sobre las consecuencias precisas de esta modificación, diversos estudios señalan que la fosforilación en S129 impulsa la agregación de α -sin, respaldando así la idea de que esta modificación tiene un papel crucial en los eventos patológicos asociados con la EP (Gabrielyan et al., 2021; Awa et al., 2022). De hecho, mientras que en el cerebro de pacientes con EP, aproximadamente el 90% de la proteína α -sin se encuentra fosforilada en S129, en cerebros de individuos sanos, sólo el 4% o menos de esta proteína presenta una fosforilación en dicho residuo (Fujiwara et al., 2002; Anderson et al., 2006). La acumulación patogénica de α -sin insoluble fosforilada en la posición S129 se manifiesta principalmente en las etapas avanzadas de esta enfermedad neurodegenerativa (Beach et al., 2009; Walker et al., 2013). Por lo tanto, es un hecho constatado que la α -sin fosforilada (p - α -sin) está relacionada con la progresión patológica de la EP (Zhou et al., 2011).

El mecanismo patogénico de la α -sin implica que la forma fosforilada en S129 activa la caspasa-3, desencadenando apoptosis celular, acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y mayor permeabilización a vesículas lipídicas que la α -sin (Ma et al., 2016). Además, se han identificado depósitos de p - α -sin en las células de Schwann, lo que sugiere su participación en la

1. Introducción

degeneración de la mielina y los axones en el sistema nervioso periférico (Sun et al., 2021a). Teniendo en cuenta que la fosforilación de la α -sin endógena comienza en la región presináptica y se propaga hacia los axones y cuerpos celulares, un objetivo terapéutico potencial sería la degradación o la captura de p- α -sin en las regiones presinápticas, antes de que ocurra la propagación (Awa et al., 2022).

Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo

Las mitocondrias son orgánulos celulares especializados, que desempeñan un papel crucial en la generación de energía para la célula (Franco-Iborra et al., 2016), produciendo trifosfato de adenosina (ATP). Además de su función energética, estas estructuras participan activamente en diversos procesos celulares, incluyendo la regulación de las ROS, la apoptosis y el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} (Dias et al., 2013). En el marco de la EP, la disfunción mitocondrial emerge como un factor central en la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas, tanto de las formas familiares como esporádicas de la enfermedad (Zhu y Chu, 2010; Ryan et al., 2015). Concretamente, se ha observado una reducción generalizada en la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTEM) en diversos tejidos cerebrales, incluyendo la SN (Schapira et al., 1989), el estriado (Mizuno et al., 1989) y la corteza cerebral (Keeney et al., 2006; Parker et al., 2008) de pacientes con EP idiopática. Asimismo, se han observado defectos mitocondriales en las células que sobreexpresan el gen de la α -sin (Parihar et al., 2009; Reeve et al., 2015) en los cerebros de pacientes con EP. Este daño, atribuible a radicales libres, como ROS y peroxinitrito, respalda la noción de que el estrés oxidativo actúa como mecanismo subyacente común que conduce no sólo a la disfunción, sino también, en última instancia, a la muerte celular (Zhu y Chu, 2010; Brieger et al., 2012) (**Fig. 1**). De esta forma, contribuye a la manifestación de síntomas vinculados al proceso neurodegenerativo de la EP (Schapira et al., 2014).

Por otro lado, el hallazgo de genes vinculados a formas familiares de la EP, tales como α -*sinucleína*, *parkina*, *DJ-1*, *PINK-1* y *LRRK2*, respalda la conexión entre la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y el consecuente deterioro de las neuronas dopaminérgicas (**Fig. 1**). Se ha observado que las mutaciones presentes en estos genes impactan tanto en la integridad, como en la función mitocondrial, generando incrementos notables en los niveles de estrés oxidativo (Zuo y Motherwell, 2013).

A pesar de que el complejo I mitocondrial es el objetivo principal y más estudiado en relación a la toxicidad producida por los acúmulos de α -sin, otros complejos de la CTEM también pueden estar afectados. Se ha documentado que la α -sin podría causar disfunción mitocondrial mediante la interacción con el citocromo c oxidasa (Complejo IV) (Danyu et al., 2019). Además, se ha descrito la interacción, tanto de la forma monomérica como oligomérica de la α -sin, con la ATP sintasa mitocondrial (Complejo V) (Ludtmann et al., 2018). Este amplio espectro de interacciones subraya la complejidad de los efectos de la α -sin sobre la maquinaria mitocondrial, y sugiere que múltiples componentes de la CTEM pueden contribuir a la disfunción mitocondrial asociada a la EP.

En conclusión, el daño oxidativo causado por la deficiencia inducida por la α -sin en los complejos de la CTEM, podría ser una característica central en la patogénesis de la EP. Este fenómeno daría lugar al aumento de los niveles de ROS intracelulares y a defectos bioenergéticos que se observan con frecuencia en las formas esporádicas y familiares de la EP (Sohrabi et al., 2023).

Neuroinflamación

Otra característica de la EP es la conexión entre la neuroinflamación y el proceso patológico, evidenciando niveles elevados de citoquinas proinflamatorias en sangre, líquido cefalorraquídeo y en el tejido cerebral de pacientes con EP (Nagatsu et al., 2000). La microglía y los astrocitos desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis del microentorno cerebral (Joe et al., 2018), relacionándolos directamente con el transcurso de esta patología. Los estudios *post mortem* revelan alteraciones como astrocitosis, microgliosis e incluso infiltración linfocítica en la SN de estos pacientes (Przedborski, 2007; Hirsch y Hunot, 2009).

La activación de la microglía ha surgido como un aspecto central en la regulación de la neuroinflamación en la EP (Block et al., 2007). Estas células, consideradas fagocitos residentes del cerebro, desempeñan funciones esenciales en la fisiología normal del SNC, incluyendo la supervisión de las sinapsis, la poda sináptica durante el desarrollo y la formación de nuevas neuronas en el cerebro adulto (Wake y Fields 2011). Sin embargo, la activación excesiva y prolongada de la microglía, junto con la inflamación resultante, ejerce una acción citotóxica, causando daño celular y tisular significativo, lo que promueve la progresión de la EP (Joers et al., 2017). Concretamente, se ha observado una proliferación temprana de microglía en diversos modelos animales (Gerhard et al., 2006), además de un aumento en la expresión de moléculas proinflamatorias antes de la pérdida de neuronas en la SN, lo que sugiere la participación de la

1. Introducción

microglía en la iniciación de la pérdida de tejido en la EP (Rodríguez-Pallares et al., 2007; Su et al., 2009).

La degeneración dopaminérgica en esta patología está vinculada con la sobreproducción de citoquinas citotóxicas (Brodacki et al., 2008) liberadas por la microglía activada, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la interleucina (IL)-1 β y la IL-6 (Qin et al., 2016; Williams-Gray et al., 2016; Liu et al., 2022). Estas citoquinas se asocian con neuronas dañadas, generando ROS y desencadenando neurotoxicidad (Ceulemans et al., 2010; Dumont y Beal, 2011). En este sentido, la interacción de la microglía con diversas proteínas, como la α -sin agregada o mal plegada liberada por las neuronas (Kim et al., 2013), constituye un aspecto crucial en la regulación de la respuesta inflamatoria. La acción de la α -sin oligomérica sobre el receptor tipo Toll 2 (TLR2) desencadena la activación de la vía del factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Dutta et al., 2021). En esta vía, este factor nuclear, que normalmente se encuentra unido al inhibidor de kappa B (I κ B) en el citoplasma, experimenta una separación de I κ B y una translocación al núcleo. Esta acción impulsa la transcripción de genes diana, que codifican para la IL-6, ciclooxigenasa-2 (COX2) y TNF- α (Kouli et al., 2019; Dolatshahi et al., 2021).

Los astrocitos por su lado, desempeñan un efecto protector sobre las neuronas a través de su actividad antioxidante (Takahashi, 2021), aunque también pueden adoptar un papel perjudicial (Wang y Ye, 2021). La astrogliosis reactiva se considera uno de los marcadores más fiables y sensibles de tejido enfermo de pacientes con EP que protege a las células del SNC a través de varios mecanismos, incluida la liberación de factores protectores (Sofroniew y Vinters, 2010). En el tejido cerebral humano, los astrocitos protoplasmáticos son los que concentran la mayoría de los productos génicos recesivos relacionados con la EP (PINK-1, parkin y DJ-1) (Ledesma et al., 2002; Gandhi et al., 2006) y generalmente aumentan su producción en asociación con la astrogliosis en estados patológicos (Mullett et al., 2009).

La disminución en la regulación de los factores neuroprotectores astrocíticos, como factores de crecimiento y glutatión contribuyen a una mayor vulnerabilidad frente a la EP (Mena y García de Yébenes, 2008; Sofroniew y Vinters, 2010). Otra evidencia de la participación temprana de los astrocitos en la enfermedad es que muchas de las proteínas, incluidas las que se concentran en los astrocitos, se encuentran en los núcleos (no en la periferia) de los CL (Chan et al., 2007; Durrenberger et al., 2009).

Los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) son productos liberados desde neuronas dañadas, como fragmentos y organelas mitocondriales, y actúan como estímulos de ligandos que inducen daño en los astrocitos (Iizumi et al., 2016). En este contexto, la α -sin, un marcador

específico de la EP, ha sido identificada como uno de los DAMPs conocidos (Cardinale et al., 2021). En relación con la detección y respuesta a estos DAMPs, el receptor tipo Toll 4 (TLR4), expresado ampliamente en diversas células del sistema nervioso de mamíferos, incluyendo neuronas, astrocitos y microglía, actúa como un receptor de superficie celular para estos patrones (Iizumi et al., 2016; Kam et al., 2020). Paralelamente, se ha observado un aumento en el nivel de ARNm del gen *hemo oxigenasa 1 (HO-1)*, un indicador de la activación del sistema proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Keap1) / factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf-2). Estos hallazgos sugieren la participación del sistema Keap1/Nrf-2 en la expresión de la actividad antioxidante inducida por TLR4 en los astrocitos (Iizumi et al., 2016; Takahashi, 2021).

1.1.3. Etiología de la enfermedad de Parkinson

A pesar de que aún no se comprende la causa exacta de la EP, es probable que esta condición sea el resultado de diversos elementos, entre los que se incluyen la predisposición genética, el proceso fisiológico del envejecimiento, y la exposición a factores ambientales (**Fig. 4**).

Factores genéticos

Los factores genéticos desempeñan una influencia sustancial en la diversidad fenotípica de la EP, siendo responsables de las formas familiares de la enfermedad y con estimaciones actuales de heredabilidad próximas al 60% (Lill et al., 2015). Las mutaciones que afectan al gen de la α -sin, *SNCA*, están asociadas con familias que presentan una EP autosómica dominante (Polymeropoulos et al., 1997) y han consolidado la evidencia que sugiere que niveles elevados de α -sin contribuyen a la patogénesis de la EP (Singleton et al., 2003).

Además, se han identificado otros genes relacionados con formas familiares de la EP. Las mutaciones en el gen *parkin* desencadenan la EP autosómica recesiva de inicio temprano (Kitada et al., 1998), y al estar vinculada con la degradación preferencial de mitocondrias disfuncionales, resulta en la acumulación de estos orgánulos. Asimismo, este gen regula de manera indirecta los niveles del coactivador del receptor gamma 1 α activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 α) (Shin et al., 2011). Es importante resaltar que los niveles bajos de PGC-1 α también se han observado en la EP esporádica (Zheng et al., 2010), lo que sugiere que estos hallazgos tienen relevancia más allá de las formas genéticas de la EP.

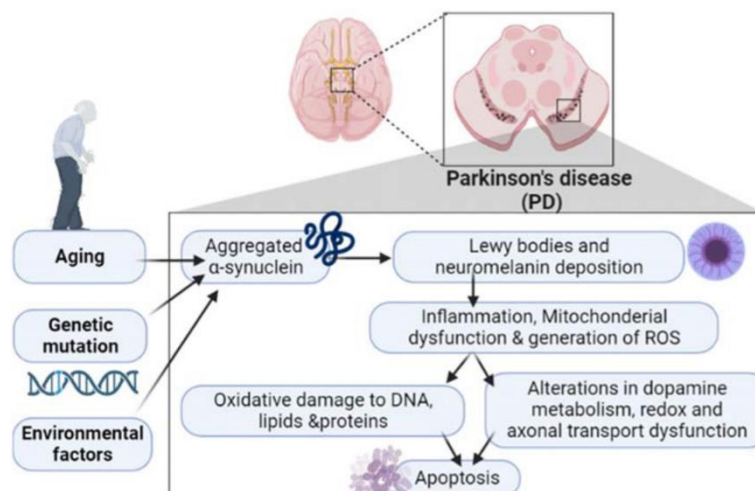


Figura 4. Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson (Al-Kuraishy et al., 2023). El envejecimiento, las mutaciones genéticas y los factores ambientales promueven la formación de agregados de α -sin, con la subsiguiente formación de CL que conduce a la inflamación, disfunción mitocondrial y generación de ROS. Estas alteraciones provocan estrés oxidativo y lesiones en el ADN, provocando alteración del metabolismo de la dopamina y disfunción axonal con inducción de apoptosis de las neuronas dopaminérgicas.

La mutación en el gen *PARK7* también contribuye al desarrollo de la EP autosómica de inicio temprano (Bonifati et al., 2003). La proteína deglicasa (DJ-1), codificada por este gen, tiene efectos antioxidantes a través de diversos mecanismos, entre los que se encuentra la regulación de Nrf-2, un factor de transcripción que controla diversas defensas antioxidantes y la estimulación de la síntesis de glutatión (Raniga et al., 2017). Se ha sugerido la posibilidad de que las alteraciones en los genes *PARK7*, *LRRK2* y *PINK1*, todos presentes en las membranas mitocondriales, están asociadas con la producción de ROS debido a un mantenimiento defectuoso del potencial de membrana mitocondrial (Knott et al., 2008; Wang et al., 2011).

Como se ha mencionado con anterioridad, los pacientes portadores de estas mutaciones genéticas constituyen un porcentaje que oscila entre el 5% y el 15% de todos los casos de EP, siendo mayor el porcentaje de los casos clasificados como EP idiopática o esporádica, donde las causas subyacentes son en su mayoría desconocidas.

Envejecimiento

La relación entre el envejecimiento y EP está sólidamente fundamentada, considerándose el envejecimiento como un factor de riesgo principal para el desarrollo de la EP (Bennett et al., 1996). El hecho de que los procesos implicados en la etiología de la EP también guarden relación con el proceso de envejecimiento (Rodríguez et al., 2015), refuerza la idea de la existencia de vías

biológicas compartidas entre ambos fenómenos. En este contexto, los cambios asociados con la edad podrían desencadenar la neurodegeneración dopaminérgica característica de la EP (Collier et al., 2017).

El envejecimiento involucra la desregulación de diversas vías biológicas, tales como la autofagia, el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la disfunción mitocondrial, muchas de las cuales desempeñan funciones relevantes en condiciones neurodegenerativas (Vanni et al., 2020). La incidencia de la EP alcanza su punto álgido entre los 70 y 79 años, tanto en hombres como en mujeres, registrándose una disminución en los mayores de 80 años, posiblemente debido a la competencia entre mortalidad e incidencia de EP (Chu et al., 2002). Entre los 50 y 90 años, se estima una pérdida de peso cerebral del 2-3% por década, acompañada de una reducción en el volumen de la SN (Chu et al., 2002). La neurodegeneración en la EP se caracteriza por una pérdida más pronunciada de neuronas en la SN ventral en comparación con la SN dorsal, con una preservación relativa del área tegmental ventral (VTA) adyacente (Pang et al., 2019).

Las neuronas dopaminérgicas han demostrado ser especialmente propensas a la degeneración en la EP (Kanaan et al., 2007), creando un estado preparkinsoniano que aumenta la vulnerabilidad a la degeneración neuronal (Pang et al., 2019). Además, se ha identificado un incremento en la α -sin intracelular en las neuronas de la SN relacionado con el envejecimiento, fenómeno que se vincula con una disminución de la enzima TH nigral asociada a la edad. Estos hallazgos respaldan la idea de que el envejecimiento representa un estado subumbral preparkinsoniano (Chu y Kordower, 2007).

A pesar de que el envejecimiento puede ser un factor único en la EP esporádica, dada la correlación positiva entre la prevalencia e incidencia de la enfermedad con la edad (Tanner, 2003), no se puede considerar que el envejecimiento sea el factor determinante en la neurodegeneración de la vía dopaminérgica nigroestriatal.

Factores ambientales

Diversos estudios, tanto epidemiológicos como llevados a cabo en animales, han vinculado algunos pesticidas con el desarrollo de la EP. Por ejemplo, la exposición al paraquat se ha asociado con un aumento del 150% en el riesgo de desarrollar EP (Tanner et al., 2011). De manera similar, se ha demostrado que la rotenona incrementa 2,5 veces la probabilidad de desarrollar EP (Tanner et al., 2011). Además de estos pesticidas, se ha asociado la presencia de otros compuestos tóxicos

1. Introducción

con la aparición de la EP, como el MPTP, un contaminante presente en la heroína sintética (Langston et al., 1983; Langston, 2017).

Asimismo, Betarbet et al. (2000) describieron que la exposición prolongada a pesticidas puede reproducir las características neuroquímicas, anatómicas, neuropatológicas y conductuales de la EP. En consecuencia, la exposición a estas sustancias podría elevar el riesgo de desarrollar EP (Ascherio y Schwarzschild, 2016; Bellou et al., 2016). A pesar de estas evidencias, hasta el momento no se ha identificado un agente específico como causa principal de la EP, pero existen pruebas sustanciales que sugieren la participación de los factores ambientales en esta patología (Ascherio y Schwarzschild, 2016).

1.1.4. Tratamiento de la enfermedad de Parkinson

A pesar de los avances que se han dado en los conocimientos relacionados con la fisiopatología del Parkinson, en la actualidad no existen terapias que hayan logrado incidir en la progresión de la enfermedad (Ou et al., 2021). No obstante, se han desarrollado diversas estrategias para abordar los síntomas clínicos de la EP (Fahn, 2008).

El tiempo que transcurre desde el inicio de la degeneración de la SN hasta el inicio de la sintomatología de la EP no se conoce con exactitud, pero estudios clínicos sugieren que este lapso de tiempo podría abarcar entre 6-8 años, y en pacientes con formas genéticas de la EP este periodo podría incluso incrementarse (Schapira y Obeso, 2006). Los síntomas motores, distintivos de la enfermedad, se manifiestan cuando la degeneración y pérdida de las neuronas dopaminérgicas alcanza al menos el 30%, aunque algunas estimaciones elevan esta cifra hasta el 60% (Kordower et al., 2013; von Linstow et al., 2020). Por lo tanto, el extenso periodo transcurrido entre el inicio de la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigrales y la aparición de los síntomas, subraya la necesidad de iniciar el tratamiento sintomático de la EP de manera temprana. De hecho, tras el diagnóstico inicial, la neurodegeneración progresa rápidamente, resultando en la pérdida de la mayoría de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en un plazo de 4 a 5 años (Kordower et al., 2013).

Desde la década de 1960, la terapia de reemplazo de dopamina, centrada en la administración de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-Dopa), ha sido la estrategia terapéutica principal frente a la EP (Salat y Tolosa, 2013; LeWitt y Fahn, 2016). La L-Dopa es un precursor biosintético de dopamina, permeable a la barrera hematoencefálica, que contrarresta la disminución de este neurotransmisor y la función del mismo, al convertirse en dopamina a través de la dopa

descarboxilasa (**Fig. 5**). Aunque la L-Dopa mitiga los síntomas motores, su eficacia disminuye con el tiempo y provoca complicaciones, como fluctuaciones motoras y discinesias (Espay et al., 2018). Además, este fármaco no altera el curso neurodegenerativo ni protege a las neuronas dopaminérgicas que sobreviven (Wijeyekoon y Barker, 2009).

Por otro lado, en ciertos casos se requieren métodos invasivos para administrar terapias dopaminérgicas más continuas, como las bombas de apomorfina y DuiDopa®, así como intervenciones neuroquirúrgicas, como la estimulación cerebral, en caso de complicaciones, intolerancia o efectos secundarios a la medicación (Wijeyekoon y Barker, 2009).

Frente a este escenario, se investigan alternativas más sofisticadas, como agentes antiapoptóticos, y neuroprotectores, antioxidantes y terapias celulares, con la esperanza de poner freno a la neurodegeneración asociada a la EP (Herrán et al., 2013).

Tratamiento farmacológico

La L-Dopa se mantiene como la terapia más efectiva contra la EP (Lin et al., 2015), consolidándose como la referencia principal para el abordaje de esta enfermedad durante más de cinco décadas. Como precursora de la dopamina (**Fig. 5**), la L-Dopa se transforma en dopamina y atraviesa la barrera hematoencefálica mediante un transportador de aminoácidos (Kageyama et al., 2000). Dado que la dopamina es el neurotransmisor deficitario en la EP y es esencial para el funcionamiento de las vías motoras (Lin et al., 2015), la terapia con L-Dopa se emplea extensamente para elevar las concentraciones de dopamina y tratar los síntomas vinculados a la enfermedad.

La L-Dopa alivia la bradicinesia, el aumento del tono muscular y el temblor, sin embargo, no aborda los síntomas no motores asociados (Mercuri y Bernardi, 2005). En combinación con la L-Dopa, se emplean agonistas de la dopamina, inhibidores de catecol-O-metiltransferasa (COMT) y la enzima monoaminoxidasa B (MAO-B) como terapias adicionales (Schapira, 2009; Tarazi et al., 2014). A medida que la enfermedad avanza, la pérdida gradual de neuronas dopaminérgicas y la corta vida media de la L-Dopa crean un margen terapéutico reducido, resultando en fluctuaciones motoras como los fenómenos de encendido y apagado (Obeso et al., 2010; Postuma et al., 2015b), que consisten en la reaparición de síntomas motores y no motores durante el intervalo sin L-Dopa. Además, surgen discinesias y síntomas no motores, como alteraciones conductuales, lo que disminuye significativamente la calidad de vida de los pacientes (Obeso et al., 2010; Postuma et al., 2015b; Ouma et al., 2017).



Figura 5. Transformación de la L-Dopa en dopamina. Para convertir la L-DOPA en dopamina es necesaria la acción de la DOPA decarboxilasa.

Tratamiento quirúrgico

La EP puede abordarse de manera efectiva mediante intervenciones quirúrgicas, que incluyen tanto lesiones quirúrgicas como la aplicación de estimulación cerebral profunda (Deep Brain Stimulation, DBS). Estos procedimientos han demostrado mejoras significativas en la eficacia de la medicación, reduciendo el "tiempo de encendido" y mitigando la discinesia en comparación con las estrategias médicas convencionales (Vitek et al., 2003; Weaver et al., 2009). La cirugía se recomienda principalmente en etapas de moderadas a avanzadas de la enfermedad, especialmente cuando los síntomas muestran sensibilidad a la L-Dopa y hay presencia de fluctuaciones motoras y/o discinesia (Lang et al., 2006).

La estimulación cerebral profunda emerge como la modalidad de tratamiento más destacada y ampliamente aceptada. Sus ventajas incluyen una reducida morbilidad-mortalidad, reversibilidad, la capacidad de ajustar parámetros de manera personalizada para cada paciente y la opción de retirada en casos de complicaciones como trastornos del control de impulsos o psicosis (Starr et al., 1998; Benabid et al., 2003; Nilsson et al., 2005). La neuroestimulación del núcleo subtalámico (STN) se ha asociado con una disminución en la necesidad de L-Dopa en etapas avanzadas de la EP (Deuschl et al., 2006). En contraste, la estimulación del globo pálido interno (GPi) ha demostrado ser eficaz en la reducción de la discinesia (Krause et al., 2001; Zhang et al., 2021) y los síntomas psiquiátricos (Bang Henriksen et al., 2016).

A pesar de estos beneficios, se han identificado síntomas que muestran resistencia a la estimulación, incluyendo trastornos de la marcha con inestabilidad postural, congelación insensible a la medicación, trastornos del habla, así como disfunción psiquiátrica y cognitiva. Estos síntomas no experimentan mejoría, e incluso pueden empeorar después de la DBS (Martinez-Ramirez y Okun, 2013).

Además de los retos clínicos inherentes, la intervención quirúrgica en sí conlleva complicaciones que incluyen la propensión a infecciones, la vulnerabilidad del sistema de electrodos, la complejidad en el ajuste de parámetros, la obligación de sustituir baterías tras un periodo determinado, y un alto coste económico (Doshi et al., 2002; Oh y Chase, 2002).

1.2. Base anatómica de la enfermedad de Parkinson: ganglios basales

Los ganglios basales conforman una red altamente organizada de núcleos subcorticales esenciales para una amplia gama de funciones, entre las que destacan el control del movimiento, el aprendizaje, la cognición y la motivación (Pennartz et al., 2009). Estas estructuras, interconectadas con la corteza cerebral y el tálamo, constituyen circuitos córtico-basales diseñados para integrar información multimodal y ajustar con precisión la respuesta conductual. Su participación activa se extiende a funciones vinculadas con el control motor, el comportamiento, las funciones ejecutivas, el aprendizaje motor y las emociones (Lanciego et al., 2012). Cualquier alteración en esta compleja red puede desencadenar diversas patologías comportamentales, como la esquizofrenia, la adicción a drogas o la EP (Tremblay et al., 2015).

Los componentes de los ganglios basales incluyen el complejo estriado, formado por los núcleos caudado y putamen, el segmento externo (GPe) e interno (GPi) del globo pálido (en ratas se conoce como núcleo entopeduncular), la SNpc, la *substantia nigra pars reticulata* (SNpr) y el STN (**Fig. 6**).

Estas formaciones, constituidas por los ganglios basales y sus núcleos asociados, es decir, el caudado, putamen, el GPi, el GPe, la SNpc, la SNpr, el STN y el núcleo accumbens (Acb) se clasifican en núcleos de entrada, de salida e intrínsecos (Lanciego et al., 2012).

- **Núcleos de entrada**, tales como el estriado y el Acb, captan señales procedentes de diversas áreas cerebrales, especialmente la corteza, el tálamo y la SN, para luego transmitir las al sistema de los ganglios basales.
- **Núcleos de salida**, como el GPi y la SNpr, remiten la información procesada en los ganglios basales hacia otras regiones cerebrales, principalmente a través del tálamo. Estos núcleos desempeñan un papel crucial en la planificación del movimiento.
- **Núcleos intrínsecos**, como el STN, el GPe y la SNpc, participan en la transmisión de información entre los núcleos de entrada y salida, contribuyendo así a la integración y procesamiento de la información en el sistema de los ganglios basales.

1. Introducción

Estos núcleos interconectados llevan a cabo el procesamiento e integración de señales provenientes de áreas motoras, límbicas, sensoriales y asociativas de la corteza cerebral, para enviar la información procesada de nuevo a la misma región cortical. Así, en los ganglios basales se han descrito las siguientes vías de información (**Fig. 6**):

- **Vía hiperdirecta:** Establece una conexión entre la corteza y los núcleos de salida a través del STN, actuando como un centro dinámico para la ejecución de movimientos voluntarios de las extremidades (Gerfen, 2000).
- **Vía directa:** Establece una conexión directa entre el estriado y los núcleos de salida de los ganglios basales, inhibiéndolos.
- **Vía indirecta:** Conecta el estriado y los núcleos de salida a través del GPe y el STN, eliminando la inhibición en el trayecto hacia el SNr/GPi.

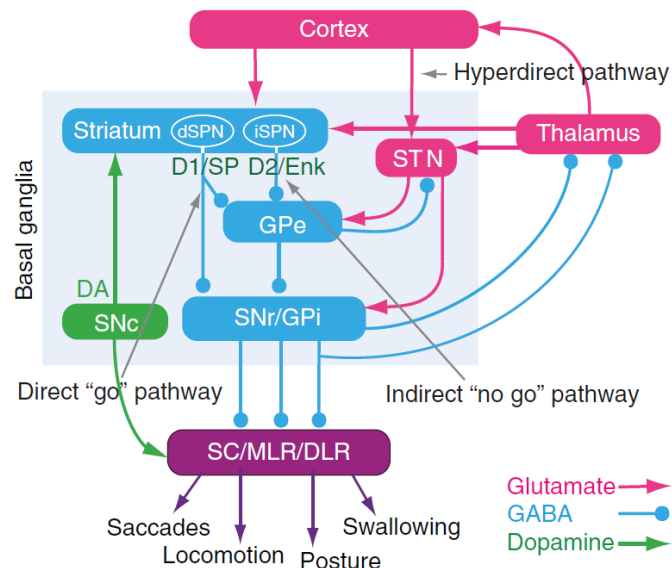


Figura 6. La organización de los ganglios basales (Grillner et al., 2020). El estriado está compuesto por neuronas que utilizan como neurotransmisor el ácido gamma-aminobutírico (GABAérgicas), al igual que el GPe, el GPI y la SNpr. La SNpr y el GPI representan el nivel de salida de los ganglios basales y proyectan a través de diferentes subpoblaciones de neuronas hacia el colículo superior (SC), las regiones locomotoras mesencefálicas (MLR) y diencefálicas (DLR), y otros centros motores del tronco encefálico, así como de vuelta al tálamo con copias de la información enviada al tronco encefálico. Las dSPN que se dirigen a SNpr/GPi expresan el receptor D1, mientras que las iSPN expresan el receptor D2. El circuito indirecto está representado por el GPe, el STN y el nivel de salida (SNpr/GPi), siendo el efecto neto un aumento de la actividad en estos núcleos. También se indica la entrada de dopamina desde la SNpc (verde) al estriado y los centros del tronco encefálico. Las neuronas glutamatérgicas excitatorias se muestran en color rosa y las estructuras GABAérgicas en color azul.

Para que los ganglios basales funcionen de manera adecuada, la liberación de dopamina por parte de las neuronas nigroestriatales en los núcleos de entrada es crucial. La dopamina ejerce su influencia a través de dos tipos de receptores: D1 y D2. Las neuronas de proyección directa, conocidas como dSPNs, expresan receptores D1, los cuales aumentan su excitabilidad en respuesta a dopamina, facilitando así la transmisión a lo largo de la vía directa. Esta acción resulta en la inhibición de la salida del GPi, reduciendo la inhibición del tálamo y facilitando los movimientos. En contraste, las neuronas de proyección de la vía indirecta, iSPNs, expresan receptores D2, disminuyendo su excitabilidad cuando son activados por la dopamina, lo que resulta en la inhibición de la transmisión en la vía indirecta, y, por consiguiente, en la inhibición de los movimientos (Gerfen y Surmeier, 2011; Märtin et al., 2019; Stanley et al., 2020). Ambas vías reciben inervación de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Meredith y Kang, 2006).

En el contexto de la EP, se observa una degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc, lo que desencadena cambios funcionales que afectan a toda la red de ganglios basales (Blandini et al., 2000).

1.2.1. Circuito motor de los ganglios basales en condiciones fisiológicas

El complejo motor de los ganglios basales, especialmente el estriado, establece vínculos cruciales con la corteza cerebral. A través del tálamo, la información procesada en los ganglios basales retorna a la corteza cerebral (Alexander y Crutcher, 1990). Las conexiones intrínsecas de los ganglios basales, en su mayoría, son inhibitorias y GABAérgicas; sin embargo, destaca la proyección excitatoria glutamatérgica que se origina en el STN, marcando una excepción en este entramado neural (Smith et al., 1998).

Este circuito puede dividirse en tres componentes claramente diferenciados:

- **Proyecciones aferentes al estriado:** Las aferencias provienen principalmente de proyecciones glutamatérgicas corticales y proyecciones dopaminérgicas de la SNpc.
- **Proyecciones eferentes desde el estriado:** Las eferencias del estriado se clasifican en dos vías. La vía directa se inicia en las neuronas GABAérgicas estriatales que expresan dinorfina (sustancia P) y ARNm del receptor D1. Estas neuronas proyectan al GPi y la SNpr. En cambio, la vía indirecta se origina en las neuronas GABAérgicas estriatales que expresan encefalina y ARNm del receptor D2. Estas neuronas dirigen sus proyecciones al GPe, y posteriormente, alcanzan el STN y, a partir de allí, llega al GPi y a la SNpr.

1. Introducción

- **Proyecciones eferentes desde los ganglios basales:** los núcleos de salida, el GPi y la SNpr, se dirigen predominantemente hacia el tálamo, y en menor proporción, hacia el núcleo pedúnculo-pontino y el colículo superior (Young y Penney, 1984).

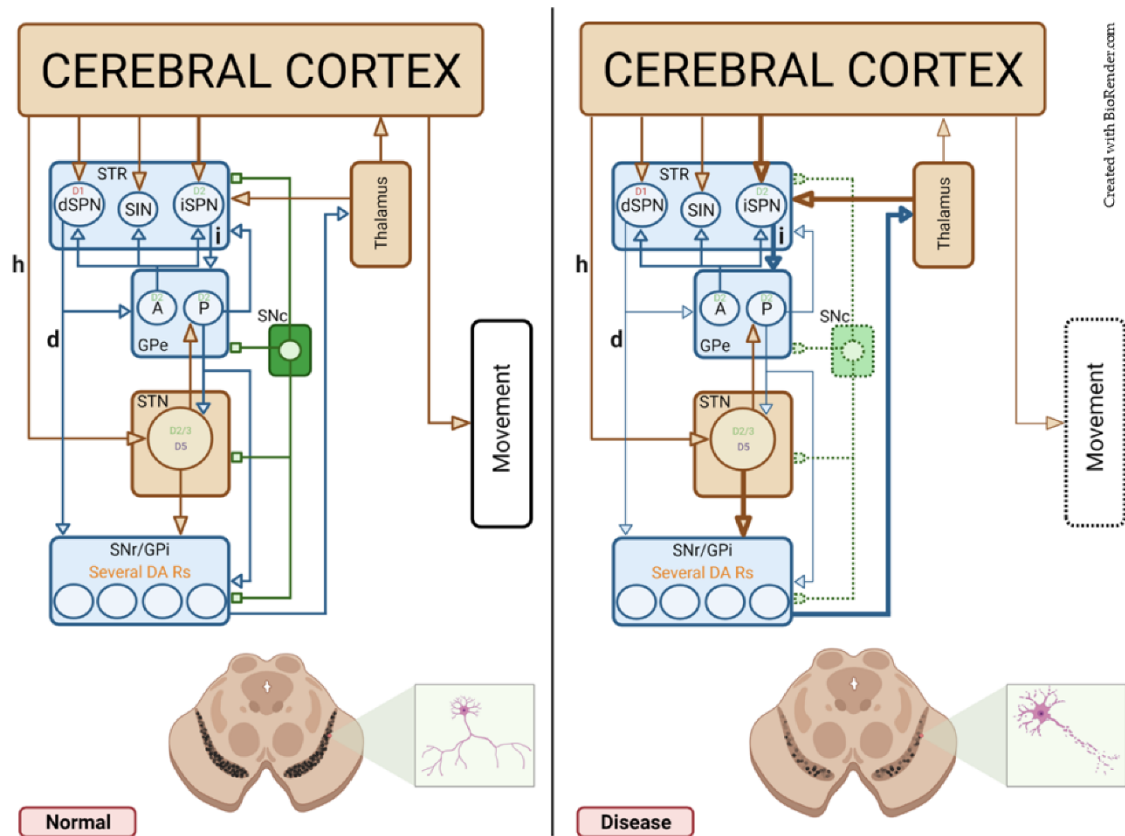


Figura 7. Representación gráfica del circuito motor de los ganglios basales en condiciones normales y en la EP (Dos Santos Heringer et al., 2022). En el cerebro sano, las entradas corticales activan tanto a las neuronas GABAérgicas (azul) como a las glutamatérgicas (marrón) en el estriado (STR) y el núcleo subtalámico (STN), respectivamente. La información de las eferencias corticales a la SNr/GPI puede transmitirse a través de 3 vías diferentes: directa (d), indirecta (i) e hiperdirecta (h). Posteriormente, la SNr/GPI regula las respuestas de las áreas de control motor aguas abajo. Las proyecciones dopaminérgicas (verde) desde la SNc regulan la actividad celular a través de receptores de dopamina distintos (DA Rs). En la EP, tras la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, hay un desequilibrio debido a la hiperactividad de la vía indirecta y la hipoactividad de la vía directa, lo que conduce a la desinhibición tanto del STN como del GPi/SNr (rojo) y resulta en una inhibición mejorada de las regiones motoras aguas abajo.

1.2.2. Circuito motor de los ganglios basales en la enfermedad de Parkinson

La EP se caracteriza principalmente por los síntomas motores resultantes de la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, que inervan la parte somatomotora de los ganglios basales, concretamente el núcleo putamen, una región clave en el control del movimiento (Redgrave et al., 2010; Hernandez et al., 2019). En condiciones patológicas se produce

una disminución de la entrada dopaminérgica desde la SNpc al estriado. Como consecuencia, las dSPNs carecen del respaldo de la activación dopaminérgica en los receptores D1, lo que resulta en una reducción de su excitabilidad y, por ende, en una disminución de la señal en la vía directa. Esto se traduce en una disminución de la inhibición sobre la SNpr y GPi, dificultando así su activación por parte de la corteza cerebral y el tálamo para iniciar movimientos. La reducción de la actividad en la vía directa conlleva a una disminución de la desinhibición del tálamo, generando alteraciones en funciones motoras y cognitivas (Zinger et al., 2011).

En contraste, las iSPNs experimentan una menor inhibición a través de los receptores D2, lo que facilita su activación desde la corteza cerebral, resultando en un aumento de la señal en la vía indirecta. Este incremento de señal genera una excitación adicional en la SNpr/GPi (**Fig. 7**) (Parker et al., 2018). Este proceso desencadena un incremento en la inhibición del tálamo, disminuyendo así la entrada glutamatérgica en la corteza motora. Como resultado, se observa una disminución del movimiento y un aumento del tono muscular, rigidez y bradicinesia en pacientes con EP (Zinger et al., 2011).

1.3. Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson

El estudio de la EP ha impulsado la necesidad de desarrollar una amplia gama de modelos experimentales utilizando animales y células cultivadas *in vitro*, con el propósito de emular diversos aspectos de esta patología. Estos modelos buscan replicar los cambios observados en la enfermedad humana (Blandini et al., 2008), y para este fin, se han empleado principalmente tres grupos de animales: roedores, primates no humanos y especies no mamíferas. Además, los modelos basados en células han surgido como alternativas viables para tratar de explicar ciertos aspectos de la EP. Cada uno de estos grupos presenta ventajas y limitaciones particulares que determinan la idoneidad del modelo para experimentos específicos (Chia et al., 2020).

A continuación, se describen los distintos modelos animales que han sido empleados durante las últimas décadas para el estudio de la EP en roedores. Estos animales son el modelo animal más utilizado para la EP, por un lado, debido a la facilidad de manejo y mantenimiento, y, por otro lado, a que la anatomía y los mecanismos moleculares y celulares de la EP son similares en roedores y en humanos.

1.3.1. Modelos neurotóxicos

Los modelos que emplean neurotoxinas provocan una rápida degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, imitando así la EP esporádica. Estos modelos se generan al administrar sustancias neurotóxicas como la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) o el MPTP, desencadenando un estrés oxidativo que conlleva a la muerte celular de las neuronas dopaminérgicas. No obstante, la desventaja de estos modelos radica en la ausencia de formación de CL, la característica patológica principal de la EP. A pesar de las limitaciones, estos modelos animales han contribuido de manera significativa a la comprensión de los procesos de la enfermedad y a la identificación de posibles objetivos terapéuticos en la EP (Zeng et al., 2018).

6-Hidroxidopamina (6-OHDA)

El primer modelo animal de la EP se generó mediante la administración unilateral de 6-OHDA en el CPC, en la SNpc y en el área dorso-lateral del núcleo interpeduncular (Ungerstedt, 1968), desencadenando así la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc (Dauer y Przedborski, 2003). Este modelo ha obtenido una extensa aceptación gracias a su fenotipo conductual consistente y a la degeneración predecible de las neuronas dopaminérgicas (Sauer y Oertel, 1994). El mecanismo de acción de este modelo consiste en que, una vez que la 6-OHDA ingresa dentro de la neurona, se acumula en el citosol, se oxida y produce ROS y quinonas. Estos, a través de mecanismos de estrés oxidativo, inactivan macromoléculas biológicas, reducen los niveles de enzimas antioxidantes en el estriado y aumentan los niveles de hierro en la SN (Dauer y Przedborski, 2003; Duty y Jenner, 2011; Tieu, 2011). La acumulación de hierro interactúa con los complejos I y IV de las mitocondrias, inhibiendo la cadena respiratoria y generando un mayor estrés oxidativo. Por lo tanto, esta sustancia neurotóxica provoca disfunción mitocondrial. Estos mecanismos son considerados como eventos patológicos de la EP en humanos, otorgando así, aplicabilidad al modelo.

La inyección intracerebral de 6-OHDA es esencial debido a la incapacidad de esta sustancia de atravesar la barrera hematoencefálica (Sauer y Oertel, 1994), por lo que es la única vía de administración que ha sido empleada en este modelo animal. Por el contrario, la inyección de 6-OHDA puede ejecutarse en diversas áreas cerebrales, generando patrones específicos de degeneración neuronal (Perese et al., 1989). Por ende, la elección del lugar de administración de 6-OHDA resulta crucial para definir la magnitud y la progresión temporal de la lesión:

- **Inyección intraestriatal:** Al dirigirse al cuerpo estriado, la 6-OHDA afecta primero a los terminales axonales, seguido de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Perese et al., 1989). Esta técnica induce una degeneración retrógrada de la vía nigroestriatal y tiende a generar una lesión parcial (aproximadamente una pérdida del 60-80% de dopamina en el estriado). En consecuencia, se configura como un modelo idóneo para estudiar las características fisiopatológicas en las fases iniciales del desarrollo de la EP, así como para analizar los efectos y cambios neuropatológicos derivados de nuevas estrategias terapéuticas.
- **Inyección en la SNpc:** la inyección de 6-OHDA en la SNpc desencadena una destrucción masiva de las neuronas dopaminérgicas, dando lugar a una degeneración anterógrada del sistema dopaminérgico nigroestriatal. Por consiguiente, este método presenta síntomas comparativamente más severos que en el caso de la inyección intraestriatal (Haleagrahara et al., 2013).
- **Inyección en el haz nigroestriatal:** la inyección de 6-OHDA en el haz nigroestriatal desencadena un agotamiento casi total de la dopamina en el CPC, denervación de los receptores de dopamina postsinápticos en el CPC (Perese et al., 1989) y una degeneración casi completa de las neuronas dopaminérgicas (Truong et al., 2006). La lesión en este haz desencadena similitudes con la neurodegeneración observada en pacientes con EP idiopática (Perese et al., 1989), representando un modelo avanzado o grave de la misma (Truong et al., 2006).

No obstante, como ya se ha mencionado previamente, una limitación importante de este modelo es su incapacidad para formar CL (Schober, 2004).

1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)

El MPTP destaca por ser uno de los modelos basados en neurotoxinas más empleados para replicar la EP en animales. Dada su naturaleza lipofílica, esta molécula puede atravesar la barrera hematoencefálica tras su administración sistémica. El MPTP es considerado una protoxina, ya que su transformación en 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) es crucial para desencadenar efectos tóxicos (Emborg, 2004; Tieu, 2011). Así, una vez administrado, el MPTP experimenta una oxidación catalizada por MAO-B, presente en los astrocitos de la SN y el estriado, que la transforman en la neurotoxina dopaminérgica MPP⁺ (Martí et al., 2017). El MPP⁺ actúa como un metabolito tóxico, que se absorbe por las neuronas dopaminérgicas debido a su similitud estructural con la dopamina, utilizando el transportador de dopamina (DAT) (Martí et al., 2017). El mecanismo de

1. Introducción

muerte celular comienza con la inhibición del complejo I en la respiración mitocondrial, generando una rápida disminución de los niveles de trifosfato de adenosina (ATP) en el estriado y la SN, lo que conduce a apoptosis y necrosis de las neuronas dopaminérgicas (Sayre et al., 1989).

La utilización del modelo animal basado en la administración de MPTP se recomienda para investigar la disfunción mitocondrial en la EP, gracias a su impacto en las mitocondrias. Para replicar la EP en modelos animales, es necesario administrar la toxina de manera crónica durante semanas, lo que culmina en la muerte celular una vez completada la administración (Petroske, et al., 2001). Sin embargo, al igual que el modelo de 6-OHDA, el modelo con MPTP carece de la característica neuropatológica más distintiva de la EP, que es la formación de CL (Schober, 2004).

1.3.2. Modelos genéticos

La base fundamental para investigar las mutaciones genéticas de una enfermedad reside en la premisa de que las similitudes clínicas entre las formas hereditarias y esporádicas de la afección comparten un mecanismo común. Este enfoque tiene como objetivo la identificación de las vías moleculares y bioquímicas implicadas en la patogénesis de la enfermedad (Blesa et al., 2012).

Se ha descubierto que variantes poco comunes de la EP están vinculadas a mutaciones genéticas en *α -sinucleína*, *parkina*, *LRRK2*, *PINK-1* o *PARK7*, pudiendo representar posibles objetivos terapéuticos. Para estudiar el mecanismo molecular de estos genes en la patología de la EP, se generan modelos genéticos mediante la sobreexpresión de *α -sin* y *LRRK2*, o la eliminación/supresión de genes como *parkina*, *PARK7* y *PINK1* (Gasser, 2009). Así, gracias a los distintos modelos de ratones transgénicos, se han logrado avances significativos en la comprensión de las sinucleinopatías.

Aunque los modelos genéticos ofrecen una vía convincente para investigar la relación entre mutaciones específicas y las formas familiares de la EP, es crucial señalar que la mayoría de estos modelos no logran replicar íntegramente todas las características de la enfermedad. Concretamente, no se han conseguido reproducir los cambios neurodegenerativos progresivos característicos de la EP en humanos. En la mayoría de los casos, estos modelos genéticos no provocan una pérdida sustancial de neuronas dopaminérgicas, que constituye la característica patológica principal de la EP (Sanchez et al., 2014).

1.3.3. Modelos basados en vectores virales

Como alternativa a los modelos animales transgénicos, se ha desarrollado el modelo animal basado en el uso de vectores virales. Para ello, se han estudiado dos sistemas de vectores: el vector viral adenoasociado (AAV) y el vector lentiviral (LV). Estos vectores tienen la capacidad de transducir eficientemente neuronas en el cerebro adulto, manteniendo la expresión de los genes insertados a lo largo del tiempo. Una ventaja adicional radica en su versatilidad para la entrega génica en diversas especies de animales, abarcando desde ratones y ratas, hasta cerdos y monos (Ulusoy et al., 2010).

La aplicación de vectores virales se investigó inicialmente en ratas mediante la administración unilateral de vectores AAV o LV, que codificaban para α -sin humana, tanto de tipo salvaje como mutante, en la SN (Kirik et al., 2002; Lo Bianco et al., 2002). En estos estudios, se logró la expresión eficiente de α -sin en las neuronas dopaminérgicas nigrales, acompañada de patología celular y axonal, así como de una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas (Ulusoy et al., 2010).

Modelos adenovirales

Los vectores AAV resultan especialmente útiles para la entrega dirigida de genes en el cerebro de roedores. Tienen un alto tropismo por las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, y dado que pueden producirse en concentraciones elevadas, la transducción se puede lograr con volúmenes de inyección pequeños. En estudios con ratas, se ha observado una eficiencia de transducción superior al 80% en neuronas nigrales TH+ tras una única inyección de 2-3 μ l de vector (Kirik et al., 2002; Yamada et al., 2004).

Es importante destacar que los diversos serotipos de AAV exhiben diferencias significativas en la eficiencia de transducción y el tropismo tisular (Zincarelli et al., 2008; Srivastava, 2016). Entre los serotipos más utilizados para transducir células del SNC destacan:

- **AAV1:** se han encontrado anticuerpos de este primer serotipo tanto en humanos como en primates no humanos (PNH) (Gao et al., 2002). A diferencia de otros serotipos, el AAV1 no presenta modificaciones postraduccionales y fue el primer vector viral aprobado para su uso en terapia génica (Huang et al., 2016). Este vector logra una transducción efectiva de neuronas, células gliales y endoteliales en el cerebro murino (Wang et al., 2003).

1. Introducción

- **AAV2:** es el serotipo más estudiado entre todos los AAVs (Lisowski et al., 2015). Fue identificado por primera vez en 1965 como un contaminante de preparaciones de adenovirus de simio (Srivastava, 2016). La cápside de rAAV2 presenta múltiples modificaciones postraduccionales, incluida la ubiquitinación, fosforilación y glicosilación en diferentes sitios (Mary et al., 2019). Este serotipo ha mostrado tropismos para varios tejidos y tipos celulares, tanto en PNH, murinos, caninos y aviares, como humanos, incluyendo la retina (Wassmer et al., 2017) y las células no mitóticas del SNC (Griffey et al., 2006).
- **AAV4:** es uno de los serotipos con mayores diferencias a nivel antigénico (Padron et al., 2005), y tiene su origen en PNH (Blacklow et al., 1968). La única modificación postraduccionales observada en rAAV4 es la ubiquitinación de las proteínas de su cápside (Mary et al., 2019). El AAV4 puede transducir tanto células humanas/PNH, como células de origen murino y canino (Lisowski et al., 2015). Su tropismo específico conduce a una transducción eficaz de tipos celulares específicos en el SNC de mamíferos, especialmente de células endimarias (Davidson et al., 2000) y de células del epitelio pigmentario de la retina (Weber et al., 2003).
- **AAV5:** aislado de lesiones genitales masculinas en 1983, es el único serotipo de AAV obtenido directamente de tejido humano (Bantel-Schaal y zur Hausen, 1984). Destaca por ser el serotipo más divergente genéticamente de todos los AAV (Stutika et al., 2015). Posee características únicas, como diferencias en el tamaño y la función de sus repeticiones terminales invertidas (Qiu y Pintel, 2004). Las proteínas del cápside de rAAV5 experimentan diversas modificaciones postraduccionales, como ubiquitinación, fosforilación y glicosilación (Mary et al., 2019). Presenta la ventaja de transducir células que no pueden ser transducidas con AAV2 (Grimm y Kay, 2003), incluidas las células fotorreceptoras de la retina murina (Rabinowitz et al., 2002; Yang et al., 2002), células de Purkinje, estrelladas, en cesta y de Golgi (Burger et al., 2004).
- **AAV7:** fue aislado en 2002 a partir de tejidos de PNH (Gao et al., 2002, 2004). Aunque los mecanismos de unión y entrada a las células aún son desconocidos (Srivastava, 2016), las proteínas del cápside de rAAV7 experimentan diversas modificaciones postraduccionales, destacando la glicosilación, además de la fosforilación y acetilación (Mary et al., 2019). La seroprevalencia de anticuerpos contra AAV7 en humanos es relativamente baja, confiriéndole una ventaja para su aplicación clínica (Calcedo et al., 2009). Este serotipo presenta un marcado tropismo por las neuronas (Taymans et al., 2007) y las células fotorreceptoras en la retina (Allocca et al., 2007).

- **AAV9:** identificado por primera vez en 2004, el AAV9 se considera un nuevo serotipo por su perfil serológico único (Gao et al., 2005). La cápside de rAAV9 presenta abundantes modificaciones postraduccionales, incluyendo ubiquitinaciones, fosforilaciones, glicosilación y acetilación (Mary et al., 2019). El AAV9 demuestra una eficiencia superior en la transducción celular en la mayoría de los tejidos en comparación con otros AAVs (Gao et al., 2004; Mori et al., 2004). En estudios con modelos murinos, el AAV9 exhibe una rápida distribución, niveles elevados de proteínas y una mejor distribución genómica tras su administración sistémica, superando a otros AAVs (Zincarelli et al., 2008). Además, en el SNC, muestra la capacidad única de atravesar la barrera hematoencefálica (Bevan et al., 2011).

Otros factores, como los promotores seleccionados y los intervalos de tiempo de supervivencia, pueden explicar las variaciones observadas en los porcentajes de muerte celular inducidos por la sobreexpresión de α -sin. Un ejemplo es la introducción de elementos adicionales, como el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis del visón (WPRE), que ha posibilitado una mayor degeneración nigroestriatal al emplear el serotipo AAV9 en ratones, en comparación con los AAV que carecen de WPRE (Sun et al., 2021b).

De esta manera, numerosas investigaciones confirman que la sobreexpresión dirigida de α -sin humana en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, mediante el uso de vectores AAV, reproduce muchas de las características distintivas de la enfermedad humana, ofreciendo así un modelo novedoso de EP progresiva, válido tanto para roedores como para primates (Ulusoy et al., 2010).

Concretamente, los resultados obtenidos en modelos AAV- α -sin revelan que la sobreexpresión de α -sin humana tiene la capacidad de inducir la formación de inclusiones citoplasmáticas y axonales positivas para α -sin, acompañadas de cambios patológicos neurodegenerativos progresivos en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. Estos cambios degenerativos se manifiestan de manera más notoria en las neuronas dopaminérgicas de la SN (Kirik et al., 2002). La sobreexpresión de α -sin en estas neuronas dopaminérgicas tiene un efecto dual: en una fase inicial, cuando la α -sin tiene una distribución citoplasmática difusa, suprime la síntesis y el almacenamiento de dopamina, lo que se refleja en una reducción de la actividad enzimática de la TH y los niveles de dopamina en el estriado. Posteriormente, se observa la aparición de inclusiones citoplasmáticas, neuritas distróficas y muerte celular. Estos datos destacan la interacción entre la α -sin y la dopamina, influyendo en el mantenimiento de la neurotransmisión de dopamina, en la regulación de la homeostasis de dopamina a nivel sináptico, así como en la formación de derivados tóxicos de α -sin y la consiguiente muerte celular. En el

1. Introducción

modelo AAV- α -sin, estos tres mecanismos, combinados con la respuesta inflamatoria inducida por α -sin, pueden interactuar para inducir los cambios patológicos progresivos que se desarrollan en las neuronas dopaminérgicas transducidas (Ulusoy et al., 2010).

Modelos lentivirales

Las inyecciones intranigrales directas de LVs que expresan variantes de α -sin, ya sea de tipo salvaje o mutado, ofrecen varias ventajas: en primer lugar, posibilitan la creación de modelos en especies de mamíferos distintas a los ratones, lo que abre la perspectiva de establecer un modelo genético en PNH para este trastorno neurodegenerativo. Además, permiten la orientación precisa hacia regiones cerebrales específicas, sin el riesgo de provocar efectos adversos en otras estructuras del SNC. A su vez, estos modelos proporcionan una expresión génica más elevada en comparación con los transgénicos y, por último, la facilidad de manipulación del vector permite la creación de diversos modelos (Lo Bianco et al., 2002).

Además, los LVs muestran un fuerte tropismo por las células neuronales (Blömer et al., 1997). En el estriado de roedores se ha observado que el 90% de las células transducidas son neuronas (Bensadoun et al., 2000; Déglon et al., 2000), y en primates, entre el 80-88% (Kordower et al., 1999). Además, entre el 40% y el 50% de las neuronas dopaminérgicas identificadas por inmunohistoquímica para la TH son transducidas en la SN de roedores inyectados con LVs (Bensadoun et al., 2000; Déglon et al., 2000).

No obstante, la expresión del transgén en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo lograda con LVs es significativamente menor que la observada en los modelos AAV, no superando el 50%, como se ha mencionado previamente. Asimismo, la magnitud de la pérdida de neuronas dopaminérgicas, inducida por la sobreexpresión mediada por LV de α -sin, ya sea de tipo salvaje o mutada, también es menos pronunciada (Lo Bianco et al., 2002; Lauwers et al., 2003, 2007), en comparación con los resultados observados en ratas tratadas con AAVs.

1.4. Entorno enriquecido (EE)

El concepto de entorno enriquecido (EE) aborda el papel de los estímulos externos en el desarrollo cerebral. Donald Hebb, al comparar ratas que vivían como mascotas con ratas de laboratorio, encontró una mejora significativa en las habilidades cognitivas de los animales criados

como mascotas (Brown y Milner, 2003). A raíz de estos descubrimientos, Rosenzweig definió el EE como "la combinación de estimulación inanimada y social", caracterizada por su naturaleza multifactorial y multimodal (Rosenzweig y Bennett, 1996). Esta perspectiva del EE desencadena cambios a nivel celular, molecular y conductual como respuesta a estímulos sensoriales, motores y cognitivos (van Praag et al., 1999). Desde entonces, se ha estudiado el efecto del enriquecimiento en el desarrollo cerebral debido a sus efectos cognitivos y de aprendizaje duraderos. A pesar de que los mecanismos exactos del EE aún no se comprenden completamente, se contempla como una estrategia terapéutica potencial para la recuperación de daños cerebrales (Kim et al., 2016).

El EE consiste en aumentar la estimulación somatosensorial, motora y social en el entorno de los animales de laboratorio, lo que resulta en una mejora de sus funciones biológicas (Newberry, 1995). Esto implica el uso de jaulas más amplias que las convencionales, permitiendo la convivencia de un mayor número de animales para fomentar así la interacción social (van Praag et al., 1999; Guilarte et al., 2003; Fischer et al., 2007). La estimulación somatosensorial se logra mediante la incorporación de objetos pequeños de diferentes colores, tamaños, texturas y formas. Además, las jaulas están equipadas con ruedas, túneles y cuerdas de ejercicio para promover la actividad física (Pang y Hannan, 2013) (**Fig. 8**). Se introduce variabilidad en la disposición de los objetos, así como en la ubicación de la comida y la bebida, cambiándolos periódicamente para mantener un ambiente enriquecido y dinámico (Nithianantharajah y Hannan, 2006). Todos estos estímulos generan un aumento en la actividad de los animales, desencadenando modificaciones que abarcan desde el nivel cognitivo hasta el molecular (Guilarte et al., 2003).

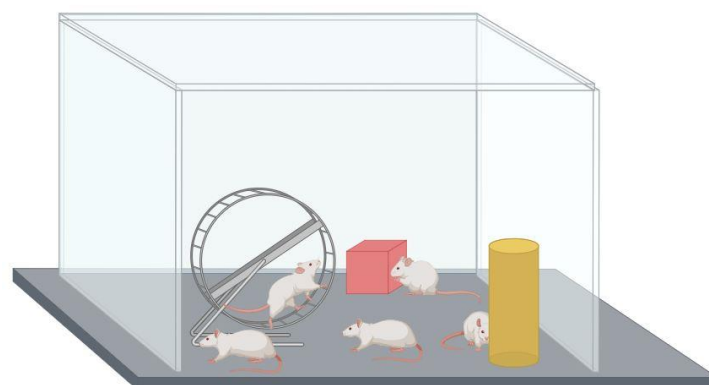


Figura 8. Representación esquemática de las condiciones de EE en la cría de roedores. Jaula equipada con juguetes para promover la exploración y comportamientos estimulantes, con una rueda para correr que fomenta el ejercicio físico, y se caracteriza por albergar un mayor número de animales por jaula, favoreciendo la socialización. Estos elementos son componentes esenciales del EE.

1. Introducción

Además, los efectos beneficiosos derivados de la cría en EE se han observado tanto en condiciones normales como en situaciones patológicas. Estos cambios pueden clasificarse en dos categorías. Por un lado, los cambios a corto plazo, también denominados efectos moleculares, presentan predominantemente propiedades neuroprotectoras. Estos cambios se caracterizan por modificaciones selectivas en la expresión génica, mostrando especificidad celular y espaciotemporal en diversas clases de ontología génica, la acción de factores de crecimiento y la transmisión neural (Fischer et al., 2007; Benn et al., 2010). De hecho, el EE promueve respuestas neuroprotectoras, principalmente al incrementar los niveles de factores neurotróficos en diferentes áreas del cerebro (Young et al., 1999).

Por otro lado, los cambios a largo plazo, conocidos como efectos celulares, producen alteraciones en la expresión génica en neuronas y células gliales (Chen y Russo-Neustadt, 2005). Específicamente, estos cambios abarcan la plasticidad sináptica (Buschler y Manahan-Vaughan, 2012; Jung y Herms, 2014) el aumento de la sinaptogénesis (Kondo et al., 2012) y la neurogénesis en adultos (Salmaso et al., 2012; Tanti et al., 2013), además de influir en el metabolismo (Leger et al., 2012), el sistema inmunológico (McQuaid et al., 2013) y el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (Mitra y Sapolsky, 2012). Por lo tanto, todas estas modificaciones inducen cambios estructurales sinápticos que resultan en una mejora sustancial del aprendizaje y la memoria (Kempermann et al., 1997; Rampon et al., 2000).

1.4.1. El entorno enriquecido y los factores neurotróficos

Uno de los efectos beneficiosos más estudiados del EE es el cambio que produce en la expresión de los factores neurotróficos. Se trata de péptidos difusibles, secretados por neuronas, que desempeñan un papel esencial como factores de crecimiento en el desarrollo, mantenimiento, reparación y supervivencia de poblaciones neuronales específicas. Durante el desarrollo, estos factores impulsan la supervivencia neuronal, fomentan el crecimiento axonal y desempeñan una función crucial en el establecimiento de la red sináptica (Wu y Liu, 2016). A pesar de que se ha resaltado su influencia en la plasticidad sináptica y en la guía de los conos de crecimiento axonal (Lu et al., 2005; Lafuente et al., 2014), también se han identificado funciones en células no neuronales, como en las células endoteliales, células musculares lisas, células inmunitarias y células epiteliales (Lafuente et al., 2014).

Los factores neurotróficos son sintetizados en forma de proteínas precursoras, que se escinden en aminoácidos dibásicos para producir una forma madura que es liberada al medio

extracelular (Lee et al., 2001). A partir de ese momento, la actividad de los factores neurotróficos se lleva a cabo mediante la interacción con los receptores de tirosina quinasa (Trk), mostrando una unión específica y de alta afinidad a diferentes receptores Trk (Bafico y Aaronson, 2003). Este receptor experimenta una rápida autofosforilación, creando así los sitios de acoplamiento para la asociación de moléculas señalizadoras aguas abajo. Posteriormente, estas proteínas señalizadoras se unen al receptor autofosforilado activado, lo que conduce a su activación (Krieglstein, 2008).

La cría en EE genera diversos cambios, incluyendo alteraciones en la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Lu et al., 2005; Karpova, 2014). El BDNF es un miembro de la familia del gen del factor de crecimiento nervioso, y actúa en diversas vías neuronales, especialmente en el sistema nigroestriatal (Mogi et al., 1999). Desempeña un papel esencial en procesos sinaptogénicos y la plasticidad sináptica, así como en la supervivencia y diferenciación neuronal (Lu et al., 2005; Karpova, 2014). A nivel molecular, el BDNF se sintetiza en forma de su precursor, proBDNF, y se transforma en BDNF a través de la acción de la metaloproteínasa de matriz-9 (MMP-9) (Mizoguchi et al., 2011), un activador del plasminógeno tisular (tPA) y p11 (Ding et al., 2011; Sartori et al., 2011).

La señalización del BDNF se activa mediante su unión a TrkB. Tanto el BDNF como el TrkB son expresados por neuronas que producen dopamina (Okazawa et al., 1992). La activación del receptor TrkB modula la diferenciación neuronal, la supervivencia neuronal y la plasticidad sináptica a través de múltiples vías de señalización, como las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) implicadas en la diferenciación celular (Ohira y Hayashi, 2009). Además, la señalización BDNF-TrkB modula la plasticidad sináptica neuronal a través de ERK (Hu et al., 2013). La expresión de BDNF y TrkB experimentan un aumento en el cerebro de animales criados en EE en comparación con aquellos mantenidos en condiciones empobrecidas (aislamiento, sin estimulación física o experiencias de aprendizaje) (Stratta et al., 2016). Este hallazgo sugiere que el EE sería una estrategia prometedora para mejorar la activación de la vía de señalización BDNF/TrkB/ERK, destacando así su potencial terapéutico (Bondi et al., 2014; Gajhede et al., 2015).

Asimismo, se han descrito cambios en la expresión del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) tras la exposición a EE (Alarcón et al., 2023). El GDNF emerge como un protector esencial de las neuronas catecolaminérgicas, protegiéndolas contra el daño tóxico y fomentando el crecimiento de las fibras neuronales (Pascual et al., 2008). La señalización de GDNF se desarrolla a través de un complejo de receptores, compuesto inicialmente por el nucleceptor anclado por glicosil-fosfatidilinositol GFR α 1. Posteriormente, se reclutan otros receptores, entre los que destaca el protooncogén del receptor tirosina quinasa reorganizado durante la

1. Introducción

transfección (RET) (Treanor et al., 1996). La unión de GDNF/GFR α 1 a RET desencadena la homodimerización de RET y su autofosforilación subsiguiente en residuos de tirosina dentro de su dominio intracelular (Kawamoto et al., 2004; Mulligan, 2014). Las fosfotirosinas actúan como puntos de unión para proteínas adaptadoras, activando diversas cascadas de señalización intracelular (Aron y Klein, 2011; Ibáñez, 2013; Mulligan, 2014). En este contexto, la unión de la proteína 1 transformante con dominio de homología 2 (SH2) a Ret, promueve la activación subsiguiente de la cascada de señalización de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa (PI3K) y el factor nuclear NF- κ B, estimulando la actividad mitocondrial y la supervivencia celular (Kramer, 2015a, 2015b; Meka et al., 2015).

En consecuencia, la crianza en EE se presenta como una estrategia neuroprotectora beneficiosa frente a diversas patologías cerebrales.

1.4.2. El entorno enriquecido en la enfermedad de Parkinson

Como ha sido descrito previamente, entre los factores de riesgo de la EP se encuentran el estilo de vida (Elbaz y Moisan, 2008) y el ejercicio físico (Chen et al., 2005). Teniendo en cuenta que los beneficios derivados del EE están estrechamente vinculados a un estilo de vida activo en los seres humanos, no se puede descartar la hipótesis de que los procesos patológicos subyacentes de la EP podrían estar influenciados por el EE (Jadavji et al., 2006).

El EE desencadena mejoras significativas en los síntomas motores (Shu et al., 2014; Shih et al., 2016), así como en los síntomas no motores y la función cognitiva de pacientes con EP (van der Kolk y King, 2013; Stuckenschneider et al., 2019). Además, tanto la actividad física regular como el ejercicio han demostrado reducir la probabilidad de padecer EP (Yang et al., 2015; Bellou et al., 2016; Shih et al., 2016) al favorecer la liberación de factores neuroprotectores (van der Kolk y King, 2013; Palasz et al., 2019b).

Aunque el mecanismo preciso mediante el cual el EE induce neuroprotección y neurorestauración en la EP sigue siendo desconocido, hay una evidencia sustancial que sugiere que la síntesis y liberación de factores neurotróficos desempeña un papel crucial en este proceso (Nithianantharajah y Hannan, 2006), ya que el EE produce cambios en la expresión de estos factores y sus receptores en diversas áreas cerebrales (Spires et al., 2004).

En animales sanos, el EE impulsa la expresión de factores de crecimiento en la vía nigroestriatal (Cohen et al., 2003; Li y Tang, 2005). En condiciones estándar (CE), los modelos

animales de EP han demostrado una reducción en los niveles de proteínas presinápticas y una mayor positividad de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), desencadenando deterioros en la función sináptica, la señalización dependiente de la actividad, la homeostasis del Ca^{2+} y la activación de los astrocitos (Greer y Greenberg, 2008; Wassouf et al., 2018). Sin embargo, el EE ha demostrado atenuar estas alteraciones, reduciendo la positividad a GFAP y restaurando los niveles de la proteína de respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR1) y el receptor nuclear asociado 1 (NURR1) (Wassouf et al., 2018). Este fenómeno se acompaña de un incremento en la expresión de BDNF en el estriado y del ARNm de GDNF en la SN (Bezard et al., 2003; Turner y Lewis, 2003; Faherty et al., 2005). Estas adaptaciones que surgen tras la cría en EE representan un intento de compensar las alteraciones sinápticas inducidas por la EP (Wassouf et al., 2018).

1.4.3. Papel de los factores neurotróficos en la enfermedad de Parkinson

Cualquier perturbación en la síntesis local, transporte o señalización de los factores neurotróficos (como unión, internalización, síntesis de receptores, entre otros) debido a daño local, envejecimiento, mutación o polimorfismo, podría tener consecuencias adversas en la supervivencia neuronal, conduciendo a la muerte neuronal. De hecho, la modificación de los factores neurotróficos para una población neuronal selectiva podría correlacionarse con procesos de neurodegeneración (Bhardwaj y Deshmukh, 2018). Concretamente, esta disfunción podría desencadenar apoptosis neuronal, resultando en la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la EP (Weissmiller y Wu, 2012).

Los factores neurotróficos y de crecimiento regulan el desarrollo cerebral y desempeñan un papel crucial en la regeneración neuronal (Colucci-D'Amato et al., 2020). Estos factores han demostrado tener capacidad para proteger tanto las neuronas dopaminérgicas como las células gliales contra la excitotoxicidad inducida. Este efecto protector se logra mediante la activación de vías de señalización específicas, las cuales desempeñan un papel crucial en la supervivencia celular y el crecimiento axonal (Ramaswamy y Kordower, 2009; Yasuda y Mochizuki, 2010). En consecuencia, al fomentar el crecimiento y la funcionalidad neuronal de la dopamina, y al intervenir en los procesos neurotóxicos, los factores neurotróficos podrían desempeñar un papel terapéutico relevante en el contexto de la EP.

La asociación de niveles disminuidos de BDNF con patologías que presentan déficits cognitivos, sugiere que este factor podría servir como biomarcador de la función cognitiva (Komulainen et al., 2008; Zhang et al., 2012). En el caso de la EP, se han observado alteraciones

1. Introducción

en la liberación de BDNF en el cerebro, la sangre y el suero (Scalzo et al., 2010; Leverenz et al., 2011; Costa et al., 2015), junto con reducciones en los niveles de ARNm y la expresión de proteínas de BDNF en la SNpc y los núcleos caudado y putamen de estos pacientes (Howells et al., 2000). Los análisis *post mortem* de pacientes con EP muestran niveles disminuidos de BDNF en regiones dopaminérgicas del cerebro afectado, lo cual se correlaciona con el pronóstico de la enfermedad (Mogi et al., 1999; Parain et al., 1999).

En modelos animales, se ha observado que el BDNF contribuye a estabilizar la concentración intracelular de Ca^{2+} , a aumentar los niveles de dopamina, a reducir el estrés oxidativo, a promover la función mitocondrial y a suprimir la neuroinflamación (Palasz et al., 2019b). Además, la administración endógena de BDNF protege a las neuronas de la SN de la toxicidad inducida por 6-OHDA y MPTP, tanto en modelos de rata como de primates (Ramaswamy y Kordower, 2009). Por lo tanto, el BDNF previene la degeneración y aumenta la actividad funcional de las neuronas dopaminérgicas, por lo que emerge como un candidato prometedor en el desarrollo de estrategias neuroprotectoras para la EP (Bhardwaj y Deshmukh, 2018).

La importancia de los niveles de BDNF destaca por su relación con la esperanza de vida de los pacientes y la gravedad de la patología (Scalzo et al., 2010). Tanto es así que se ha descrito una relación entre el polimorfismo Val66Met de BDNF y alteraciones congénitas en pacientes con EP (Foltynie et al., 2005; Guerini et al., 2009), lo cual se relaciona con un rendimiento cognitivo inferior en estos pacientes (Wang et al., 2016). Aunque el mecanismo subyacente de esta correlación no se comprende completamente, se postula que la participación del BDNF en la plasticidad sináptica y la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas podría ser fundamental (He et al., 2013). Además, la interacción del BDNF con el sistema dopaminérgico mesolímbico promueve la liberación de dopamina (Narita et al., 2003).

El ejercicio físico también se plantea como un medio para incrementar los niveles de BDNF, facilitando la conversión de proBDNF a BDNF a través del aumento en la expresión de los genes *tPA* y *p11* (Ding et al., 2011; Sartori et al., 2011). Concretamente, el entrenamiento físico restaura los niveles de BDNF en el estriado de animales en el modelo de 6-OHDA (Kim et al., 2014), además de mejorar la resistencia del cerebro frente a insultos y deterioro neuronal (Björklund y Lindvall, 2000; Zhao et al., 2014). Estos hallazgos sugieren la posibilidad de considerar el ejercicio físico como un enfoque terapéutico viable para la EP.

En cuanto al papel del GDNF en el sistema nigroestriatal, cabe destacar su papel como inductor de la supervivencia y crecimiento de las neuronas dopaminérgicas en modelos animales de la EP (Evans y Barker, 2008). De hecho, en el sistema dopaminérgico del mesencéfalo, RET se

expresa exclusivamente en las neuronas dopaminérgicas (Sariola y Saarma, 2003), por lo que la vía de señalización mediada por este Trk resulta importante para la supervivencia a largo plazo de una fracción de neuronas dopaminérgicas nigrales (Kramer et al., 2007). Asimismo, Aron et al. (2010) describieron su papel esencial en el mantenimiento de las fibras de dopamina en el estriado.

Los modelos *in vitro* de la EP han revelado que el GDNF no sólo induce la activación de la enzima que sintetiza dopamina, la TH (Theofilopoulos et al., 2001), sino que también promueve la supervivencia y diferenciación de neuronas dopaminérgicas (Widmer et al., 2000), las protege de toxinas dopaminérgicas como el MPP+ y la 6-OHDA (Ma et al., 2000; Herrán et al., 2014) y disminuye la apoptosis en estas neuronas (Sawada et al., 2000). Por último, los modelos animales de la EP han revelado efectos neuroprotectores y funcionales de GDNF (Ramaswamy et al., 2009), aumentando la supervivencia y diferenciación de las neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo (Rosenblad et al., 2000). La administración exógena de GDNF protege a los animales contra la neurotoxicidad inducida por MPTP en modelos animales de ratones C57Bl/6, monos y marmosetes (Barker et al., 2020).

Por este motivo, se cree que los efectos beneficiosos del EE podrían estar mediados por un aumento en la expresión de los factores neurotróficos BDNF y GDNF en diversos modelos animales de EP (Ickes et al., 2000; Campêlo et al., 2017).

A pesar de que la transición a la aplicación en humanos no resulta tan directa como en los enfoques farmacológicos, el EE en humanos se vincula estrechamente con un estilo de vida activo, ejerciendo así un impacto directo en la salud cognitiva del cerebro (Arenaza-Urquijo et al., 2015). En pacientes humanos con EP, adoptar un estilo de vida activo se traduce en mejoras notables en los aspectos motores (Shih et al., 2016), no motores y cognitivos (Stuckenschneider et al., 2019). La práctica regular de ejercicio, combinada con actividad física, aumenta la liberación de factores neuroprotectores, disminuyendo de este modo el riesgo de desarrollar EP (Bellou et al., 2016; Shih et al., 2016). Actividades como pintar, leer, escribir y realizar ejercicio físico aeróbico promueven la generación de reservas cognitivas en el cerebro humano (Serra et al., 2018). La estimulación cognitiva genera una reserva cognitiva más robusta, aumentando conexiones sinápticas y compensando los mecanismos fisiopatológicos asociados con la demencia antes de su manifestación clínica (Stern et al., 2020), resultando en un retraso aproximado de cinco años en el inicio del deterioro cognitivo (Wilson et al., 2021). Ensayos clínicos actuales proponen el GDNF como una terapia potencial para pacientes con EP (Barker et al., 2020).

1. Introducción

En conclusión, estos hallazgos respaldan la idea de que el EE podría ejercer efectos neuroprotectores y neurorestauradores en las neuronas dopaminérgicas, preservando la función motora en situaciones de depleción de dopamina.

2. HIPÓTESIS

El abordaje de la enfermedad de Parkinson (EP) ha sido objeto de múltiples investigaciones que han empleado diversos modelos animales. Hasta la fecha, ninguno de estos modelos ha alcanzado la precisión requerida para una comprensión integral de la patogénesis de esta patología. En consecuencia, los factores que desencadenan su inicio, así como su evolución, continúan siendo desconocidos.

En un esfuerzo por abordar esta situación, se observa un creciente y significativo uso de vectores adenovirales para la generación de modelos animales de la EP. Este enfoque plantea la necesidad de una evaluación para comprender su utilidad y contribución al estudio de la EP.

Por otro lado, las terapias actualmente disponibles para la EP muestran limitaciones en cuanto a su eficacia a largo plazo y su capacidad para regenerar el tejido dañado y/o ralentizar la progresión de esta enfermedad. Por este motivo, resulta primordial dirigir los esfuerzos actuales hacia la búsqueda de nuevas estrategias neuroprotectoras capaces de paralizar el proceso neurodegenerativo. En este contexto, se ha propuesto el estudio de factores neurotróficos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF). Estas proteínas desempeñan funciones críticas, relacionadas con la génesis, maduración, supervivencia y protección neuronal. Sin embargo, el tratamiento con estos factores neurotróficos ha fracasado como consecuencia de su dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica y su rápida degradación. Como alternativa para superar esta limitación, se propone aumentar la producción endógena de estos factores, mediante la cría en un entorno enriquecido (EE).

Investigar el posible efecto beneficioso del EE en el proceso neurodegenerativo de un modelo animal que sobreexpresa α -sinucleína (α -sin), podría ofrecer un enfoque terapéutico seguro y sin efectos secundarios, con relevancia translacional para otras enfermedades neurodegenerativas.

La activación de genes y la síntesis de proteínas, mediada por el EE, tienen el potencial de influir en la preservación de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal. Este efecto, a su vez, podría tener un efecto significativo en el comportamiento y la cognición, aspectos fundamentales en el manejo de los síntomas de la EP. Además, identificar los cambios principales inducidos por la exposición a EE en animales que sobreexpresan α -sin proporcionaría información sobre los mecanismos celulares y moleculares subyacentes, sentando así las bases para el desarrollo de fármacos más específicos.

2. Hipótesis

Por lo tanto, la **hipótesis** de este trabajo es que la cría en EE disminuye la degeneración de la vía nigroestriatal y, por lo tanto, los síntomas motores en el modelo experimental de EP basado en la sobreexpresión de α -sin mediante la inyección bilateral de 1 μ l del vector viral rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE en la SN de ratas. La mejora de los déficits funcionales y morfológicos presentes en este modelo animal se relacionan con el aumento de los factores neurotróficos y la consiguiente activación de las vías de señalización neuroprotectoras que se activan tras la cría en EE, por lo que el entorno enriquecido consituirá una estrategia prometedora para minimizar y/o ralentizar la progresión de esta enfermedad.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

El objetivo principal de este trabajo de tesis es estudiar las alteraciones motoras y morfológicas presentes en un modelo de rata de la enfermedad de Parkinson (EP) inducido por la sobreexpresión de α -sinucleína (α -sin), generado mediante la administración de un vector adenoviral en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc). Asimismo, se estudiarán los efectos de la cría en un entorno enriquecido (EE) como estrategia neuroprotectora frente a las alteraciones producidas por la sobreexpresión de α -sin, analizando, además, las vías moleculares implicadas en esta posible mejora.

3.2. Objetivos específicos

- I. Validar el modelo animal basado en la inyección bilateral de 1 μ l del vector viral rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE en la SN de ratas para evaluar el efecto de la degeneración nigroestriatal progresiva inducida en este modelo preclínico.
 - Validar la sobreexpresión de α -sin en la vía nigroestriatal y estudiar su capacidad de difusión.
 - Analizar la degeneración de las principales estructuras de la vía nigroestriatal (SNpc y estriado), así como de las proyecciones de la SNpr tras la sobreexpresión de α -sin.
 - Estudiar la activación de la población glial asociada al modelo experimental.
 - Caracterizar los cambios comportamentales motores.

- II. Analizar el efecto de la cría en un entorno enriquecido en los aspectos comportamentales y morfológicos previamente estudiados y validados en el objetivo I, y determinar los cambios moleculares inducidos por el EE.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Animales

Se emplearon 144 ratas macho de la cepa Sprague Dawley con una edad de 8 semanas y un peso de aproximadamente 250 g. Posteriormente, los animales se pesaron cada 7 días hasta finalizar el procedimiento, se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (las luces se encendían a las 08:00 am), con una temperatura y humedad constantes ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ de humedad relativa), y acceso libre a comida y agua.

Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas sobre "La Protección de los Animales Utilizados para Fines Científicos" (210/63/UE) y la Ley Española (RD 53/2013) para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Además, fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (Ref.: M20/2020/241).

4.2. Condiciones de cría

Los animales fueron criados en condiciones estándar de laboratorio o en condiciones de entorno enriquecido.

- **Condiciones estándar (CE):** las ratas se criaron en condiciones estándar de estabulación, es decir, en jaulas de tamaño 500 x 280 x 140 mm con 4 animales por jaula.
- **Entorno enriquecido (EE):** las ratas se criaron en jaulas de un tamaño mayor que las estándar (720 x 550 x 300 mm) con 8 animales por jaula, dotadas de objetos de diferentes tamaños y colores (túneles, refugios, juguetes y plataformas) que se cambiaban cada 2 días y acceso libre a una rueda de ejercicio.

Las condiciones de cría de cada grupo experimental se detallan en apartado 4.4 (**Fig. 9**).

4.3. Procedimiento quirúrgico

Con el fin de inducir la sobreexpresión de α -sinucleína (α -sin), los animales fueron sometidos a una inyección estereotáctica bilateral de un adenovirus (AAV) en la SNpc.

Para ello, los animales fueron anestesiados con isoflurano (4% para la inducción y 1,5-2% para el mantenimiento), suministrado por Ecuphar, y colocados en el marco estereotáctico (David Kopf® Instruments, Turunga, California, EEUU, modelo 957). Posteriormente, se realizó una incisión en el cuero cabelludo y se expuso el cráneo. Las coordenadas estereotácticas utilizadas

4. Material y métodos

fueron AP= -5,3 mm, μ = -2,0 mm, DV= -7,2 (en relación con bregma). Los animales fueron inyectados con 1 μ l de vector viral (rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE o rAAV9-CMVie/SynP-WPRE) con título viral de $1,07 \times 10^{13}$ gcp/ml. Las inyecciones se llevaron a cabo utilizando un capilar de vidrio para reducir el daño tisular, a una velocidad de inyección de 0,125 μ l por minuto. Después de completar la infusión, la aguja de la jeringa se mantuvo durante 5 minutos adicionales para permitir así la difusión del vector viral en las coordenadas de inyección. Una vez transcurrido este tiempo, la aguja fue retirada lentamente. Para facilitar la recuperación de los animales, se les administró meloxicam (2 mg/kg) y solución salina (0,9%, 10 ml/kg) (Sigma-Aldrich). Los AAVs se diluyeron en solución salina al 0,9% el día del procedimiento quirúrgico para alcanzar la concentración adecuada.

4.4. Grupos experimentales

En primer lugar, para estudiar el efecto de la sobreexpresión de la α -sin, los animales fueron divididos en los siguientes grupos experimentales en función de la administración del vector viral:

- **Control CE:** animales que no recibieron inyección estereotáctica y fueron criados en condiciones estándar (n=36).
- **Sham CE:** animales inyectados bilateralmente con el vector viral vacío rAAV9-CMVie/SynP-WPRE a las 8 semanas de edad y criados en condiciones estándar (n=36).
- **α -syn CE:** animales que recibieron bilateralmente el constructo viral rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE a las 8 semanas de edad y criados en condiciones estándar (n=36).

A su vez, para determinar el grado de neurodegeneración inducido por la sobreexpresión de α -sin, estos grupos se subdividieron en tres bloques en función del tiempo transcurrido desde la inyección estereotáctica hasta el sacrificio, manteniendo a los animales durante 1 mes (n=12), 2 meses (n=12) y 4 meses (n=12) después de la administración del virus (**Fig. 9**).

Una vez estudiados los efectos de la sobreexpresión de α -sin en animales criados en CE, se escogió la edad de dos meses postinyección para aplicar una estrategia neuroprotectora. Para ello, se formaron tres grupos experimentales adicionales en los que los animales fueron criados en un entorno enriquecido (EE) durante 2 meses después del procedimiento quirúrgico. De esta forma, se estudió el efecto del EE sobre la degeneración inducida por la sobreexpresión de α -sin (**Fig. 9**):

- **Control EE:** animales que no recibieron inyección estereotáctica y criados en condiciones de entorno enriquecido a partir de las 8 semanas de edad (n=12).

- **Sham EE:** animales que, a la edad de 8 semanas, recibieron una inyección bilateral con el vector viral vacío rAAV9-CMVie/SynP-WPRE, y alojados en jaulas de entorno enriquecido a partir de las 8 semanas de edad (n=12).
- **α -syn EE:** animales que, a la edad de 8 semanas, recibieron una inyección bilateral con el vector viral rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE, y alojados en jaulas de entorno enriquecido a partir de las 8 semanas de edad (n=12).

Los grupos experimentales criados en EE se utilizaron para comparar los resultados con los animales de 16 semanas (2 meses postinyección) que se criaron en CE, es decir, en este caso sólo se estudió una única edad (**Fig. 9**).

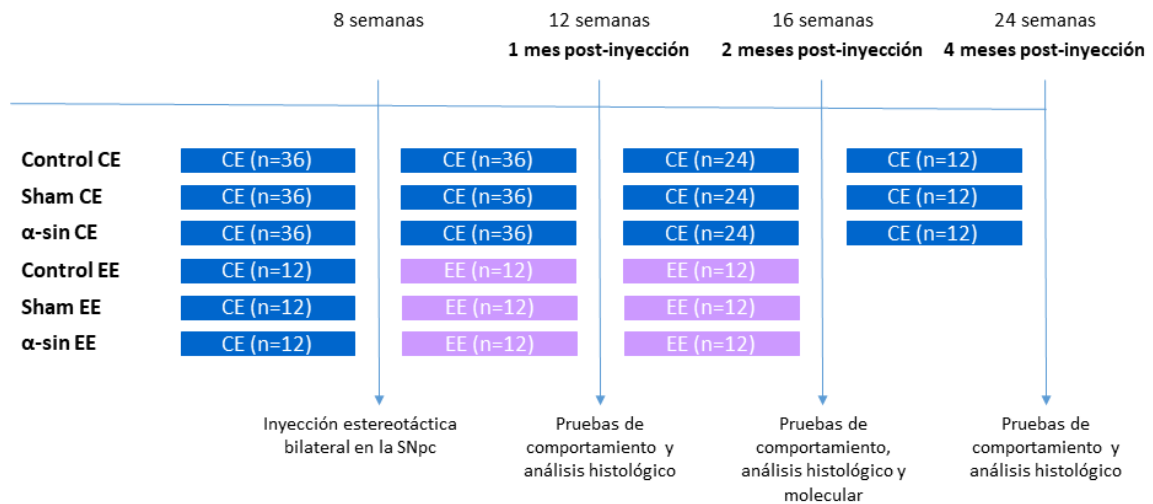


Figura 9. Cronograma del diseño experimental. Representación esquemática de todos los grupos experimentales estudiados, así como de las pruebas realizadas en cada punto temporal analizado. La inyección bilateral del adenovirus se llevó a cabo en animales de 8 semanas de edad. Posteriormente, el test de comportamiento y el análisis histológico se realizaron 1 mes, 2 meses y 4 meses postinyección. El estudio molecular se llevó a cabo en animales criados en condiciones estándar (CE) y entorno enriquecido (EE), 2 meses después de la inyección del virus.

4.5. Pruebas comportamentales

Para realizar las pruebas de comportamiento, se emplearon entre 10 y 12 animales por cada grupo experimental. Las evaluaciones conductuales se realizaron a distintos tiempos desde la inyección estereotáctica, concretamente 1 mes, 2 meses y 4 meses después de la administración del virus (**Fig. 9**). Esta distribución temporal nos permitió estudiar los cambios motores ocurridos, debidos tanto a la sobreexpresión de α -syn, como a la posible lesión inducida por el procedimiento quirúrgico, y sus variaciones a lo largo del tiempo.

4. Material y métodos

Por otro lado, se pudo analizar el efecto de la cría en EE tras la sobreexpresión de α -sin. Los animales que formaban parte de los grupos de EE permanecieron en el mismo entorno durante las pruebas de comportamiento.

4.5.1. Prueba de Campo Abierto (OF)

La actividad locomotora espontánea se midió en una arena de campo abierto (**Fig. 10**). La detección de la actividad fue completamente automatizada utilizando un software diseñado a medida llamado Actitrack (Panlab, España). Este dispositivo constaba de una arena cuadrada (44 x 44 x 35 cm) construida con Plexiglás y equipada con marcos paralelos provistos de haces infrarrojos para una detección precisa de los movimientos de los animales. El software permitía la división del suelo de la arena en dos cuadrados, para distinguir las áreas central y periférica.

Para realizar el test, cada rata se colocó en el centro de la arena y su actividad fue registrada durante un periodo de 10 minutos. Se cuantificó la actividad global, la locomoción, la distancia recorrida, la velocidad media y los movimientos rápidos y lentos. Para el análisis del nivel de ansiedad de los animales, el suelo se dividió en dos cuadrados que permitieron la definición de áreas centrales y periféricas. Esta división permitió cuantificar la distancia relativa en la zona central utilizando la siguiente fórmula: $100 \times [\text{distancia total recorrida en el centro} / \text{distancia total recorrida en la periferia}]$. Después de cada prueba, se limpió la cámara utilizando alcohol de 96%. Cada animal fue sometido a pruebas en tres ocasiones, 1, 2 y 4 meses después de la lesión.

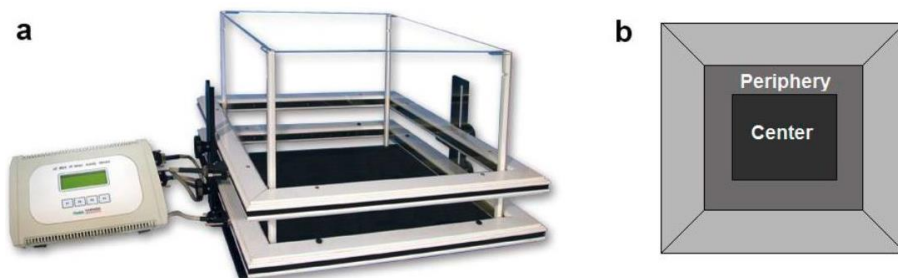


Figura 10. Prueba de Campo Abierto para medir la actividad locomotora. (a) Aparato Actitrack. **(b)** Representación esquemática de la vista superior de las regiones central y periférica.

4.5.2. Representación de mapas de calor

Durante la realización del test de campo abierto con los animales sacrificados 2 meses después del procedimiento quirúrgico, se realizaron grabaciones para la realización de mapas de calor. Los videos fueron grabados con una cámara modelo Yolansin, con una resolución 4 K y 60 fotogramas por segundo, durante 10 minutos. La cámara se montó en un trípode para facilitar su posicionamiento sobre la arena de la prueba de Campo Abierto. Los archivos de video, en formato MP4, fueron analizados fotograma a fotograma utilizando el módulo de Seguimiento de Ubicación de la plataforma de código abierto ezTrack, implementado en Jupiter Notebook (Python) para el software Windows 10 (Pennington et al., 2019). A través de este módulo de seguimiento de ubicación, se calculó la cantidad de tiempo que el animal pasaba recorriendo la jaula, así como la distancia recorrida. Posteriormente, el software utilizó tanto el tiempo como los datos de distancia para generar mapas de calor en el área de la arena. De esta manera, se pudo observar la trayectoria de cada animal en un único gráfico durante los 10 minutos de la prueba.

Los mapas de calor muestran el seguimiento del animal en un gráfico bidimensional con una escala de colores (de azul a rojo). El color azul oscuro representa la falta de movimientos, mientras que la transición de azul claro a rojo, pasando por verde, amarillo y naranja, representa el aumento progresivo de tiempo y distancias en la arena de la Prueba de Campo Abierto.

4.6. Ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Del un total de 144 ratas, se emplearon 72 animales para realizar el análisis inmunohistoquímico, es decir, 6 animales por cada condición experimental.

4.6.1. Procesamiento del material para estudios histológicos

Una vez finalizadas las pruebas de comportamiento, las ratas fueron anestesiadas intraperitonealmente mediante la administración de pentobarbital (50 mg/kg). A continuación, fueron perfundidas transcardiacamente mediante una solución de lavado compuesto por suero fisiológico (cloruro sódico al 0,9%) con el fin de limpiar los hematíes del sistema vascular. Después del lavado, se empleó la una solución de fijación compuesta por paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M (pH 7,4). Tanto el lavado como la fijación se llevaron a cabo con una bomba de perfusión, a una presión constante de 12 mmHg.

4. Material y métodos

Posteriormente, se procedió a la extracción de los cerebros de los animales, que se mantuvieron sumergidos en la misma solución de fijación durante 24h a una temperatura de 4°C. Al día siguiente, los cerebros se introdujeron en una solución de sacarosa al 30% y se mantuvieron a 4°C hasta su total hundimiento. Una vez criopreservados, los cerebros se utilizaron para la obtención de cortes gruesos.

Para la obtención de las secciones coronales cerebrales se realizaron cortes seriados con un grosor de 40 μm , utilizando un microtomo de congelación (Leica, Wetzlar, Alemania). Estas secciones fueron preservadas a -20°C en una solución de crioprotección (30% de etilenglicol y 26% de glicerol en PBS 0,1 M).

4.6.2. Inmunofluorescencia

La sobreexpresión de α -sin, su capacidad de difusión en el cerebro, la agregación a través de la fosforilación, y la coexpresión de la misma con las neuronas dopaminérgicas y/o las células gliales, se estudiaron mediante ensayos de inmunofluorescencia.

Para ello, los pasos que se siguieron fueron los siguientes: primero, se realizaron dos lavados de los cortes coronales con PBS 0,1 M durante 5 minutos cada uno. Después, las secciones fueron sometidas a un proceso de bloqueo utilizando PBS 0,1 M que contenía un 5% de albúmina sérica bovina (BSA) a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla 1**) diluidos en PBS 0,1 M y 0,5% de BSA.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados adicionales de 5 minutos cada uno utilizando PBS 0,1 M. Posteriormente, se procedió a la incubación de las secciones con los anticuerpos secundarios, durante 1 hora. Tras esta incubación, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno. Finalmente, las secciones se montaron utilizando medio de montaje Vectashield (Vector Labs, Peterborough, Reino Unido).

Tabla 1. Concentraciones y referencias de los anticuerpos empleados en los ensayos de inmunofluorescencia.

Anticuerpos primarios		
Rabbit anti-TH	1:1000	Ref: AB152, Abcam, Reino Unido
Mouse anti-TH	1:1000	Ref: AB5280, Abcam, Reino Unido
Mouse anti- α -sin	1:20000	Ref: AB27766, Abcam, Reino Unido
Rabbit anti-p- α -sin	1:1000	Ref: AB51253, Abcam, Reino Unido
Rabbit anti-Iba-1	1:1000	Ref: AB178846, Abcam, Reino Unido
Rabbit anti-GFAP	1:1000	Ref: G-3893, Sigma-Aldrich, Alemania
Anticuerpos secundarios		
Anti-rabbit Alexa Fluor 488	1:400	Ref: A11008, Invitrogen, Massachusetts, EEUU
Anti-mouse Alexa Fluor 488	1:400	Ref: A11001, Invitrogen, Massachusetts, EEUU
Anti-rabbit Alexa Fluor 594	1:400	Ref: A11012, Invitrogen, Massachusetts, EEUU
Anti-mouse Alexa Fluor 594	1:400	Ref: A11005, Invitrogen, Massachusetts, EEUU

4.6.3. Inmunohistoquímica

El efecto de la sobreexpresión de α -sin y de la intervención quirúrgica en las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal fue estudiado mediante inmunohistoquímica frente al antígeno tirosina hidroxilasa (TH). Estos ensayos se llevaron a cabo en animales criados en condiciones estándar 1, 2 y 4 meses después de la inyección, así como en los animales criados en entorno enriquecido, para determinar el efecto neuroprotector del mismo. Por otro lado, se realizó la inmunohistoquímica frente a Nrf-2, un factor de transcripción implicado en la reducción del estrés oxidativo y del deterioro de la función mitocondrial. Por último, se realizó la inmunodetección de marcadores gliales (GFAP e IBA-1) para llevar a cabo un estudio cualitativo de la respuesta glial en los distintos grupos experimentales estudiados.

El protocolo utilizado consistió en la realización de dos lavados de las secciones con PBS 0,1 M durante 5 minutos cada uno, seguidos de una incubación de 20 minutos en una solución de H₂O₂ al 3%, para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena. Tras tres lavados adicionales, se realizó el bloqueo utilizando suero de caballo normal al 5% (NHS) en PBS 0,1 M con Tritón X-100 al 0,5% (PBS-TX) durante 1 hora. Posteriormente, las secciones se incubaron en la misma solución de bloqueo junto con los anticuerpos primarios correspondientes, a una temperatura de 4°C durante toda la noche (Tabla 2).

4. Material y métodos

Al día siguiente, tras realizar otro ciclo de lavados, las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios (**Tabla 2**) a temperatura ambiente en una solución de PBS-TX durante 1 hora. Posteriormente, después de tres lavados de 5 minutos con PBS 0,1 M, las secciones se incubaron con el Complejo Avidina-Biotina (kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories). El revelado se realizó utilizando la especificidad de la reacción de peroxidasa en presencia del cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Ref: D5637, Sigma-Aldrich, España) y H₂O₂ como sustrato de peroxidasa.

Por último, las secciones se montaron y se dejaron secar al aire durante 48 horas, para posteriormente, incluirlas en xilol durante 2 horas y proceder a cubrirlas utilizando medio de montaje de resina sintética DPX (Ref: 06522, Sigma-Aldrich, España).

Tabla 2. Concentraciones y referencias de los anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunohistoquímica.

Anticuerpos primarios		
Rabbit anti-TH	1:1000	Ref: AB152, Abcam, Reino Unido
Rabbit anti-Nrf-2	1:2000	Ref: AB62352, Abcam, Reino Unido
Rabbit anti-Iba-1	1:1000	Ref: AB178846, Abcam, Reino Unido
Rabbit anti-GFAP	1:1000	Ref: G-3893, Sigma-Aldrich, Alemania
Anticuerpos secundarios		
Horse anti-rabbit igG	1:200	Ref: PK-6200, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, EEUU

4.7. Procedimientos de cuantificación para los ensayos inmunohistoquímicos

4.7.1. Estereología

La estereología es un método de cuantificación no sesgada que ha sido empleado para estimar el número de células inmunorreactivas para TH y Nrf-2 en la SNpc (**Fig. 11**). Para determinar los límites de área dentro de la región de la SNpc, se utilizó el atlas estereotáctico de Paxinos y Watson.

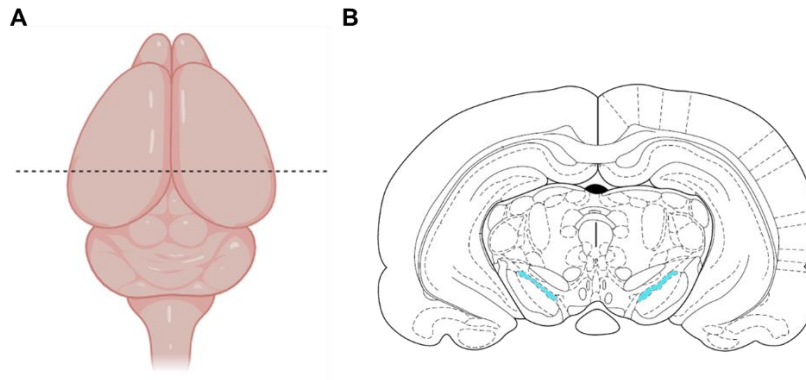


Figura 11. Selección de las áreas para la cuantificación estereológica. (A) Cerebro de rata representando el plano de la región de interés. **(B)** Sección coronal de la SNpc sombreada en azul.

Se empleó el sistema de análisis de imágenes Mercator (Explora-Nova, La Rochelle, Francia) junto con una cámara digital conectada a un microscopio Olympus BX51, que dispone de un escenario motorizado de tres ejes (**Fig. 12**). El método del fraccionador óptico consiste en estimar el número total de células a partir del número de células muestreadas dentro de un conjunto de espacios de conteo virtual equidistantes en las direcciones X, Y y Z, sin ningún sesgo. Para calcular el número total de células, se empleó la siguiente fórmula: $N = \Sigma Q \times (1/ssf) \times (1/asf) \times (1/hsf)$, donde Q representa el número real de células contadas en una muestra, y N es la estimación total de células. En este estudio, el factor de muestreo de secciones (ssf) fue de 1/12.

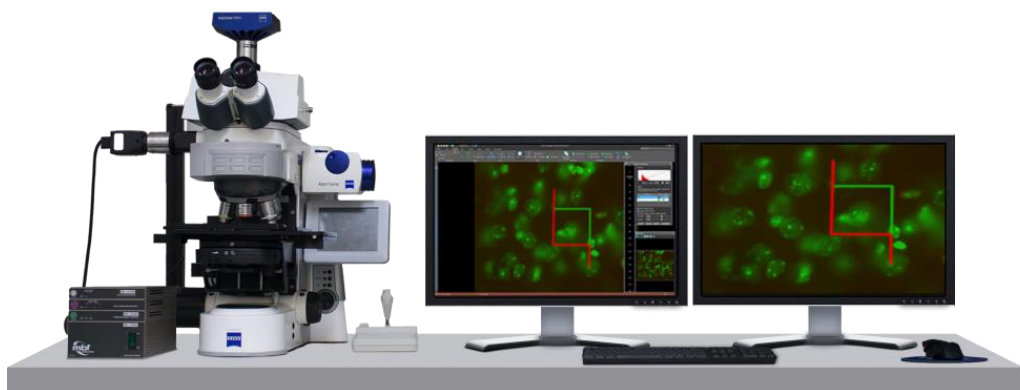


Figura 12. Ejemplo de sistema estereológico para cuantificación estereológica no sesgada.

Las regiones de interés se delimitaron con un objetivo de 4x. Dependiendo de la zona analizada (SNpc o SNpr) se emplearon diferentes tamaños de cuadrícula y marco de conteo (**Tabla 3**), incorporando una zona de protección del 5%. La cuantificación de células inmunopositivas se realizó con un objetivo de 40x, y se aplicaron las pautas del conteo estereológico, es decir, en

4. Material y métodos

total, se examinaron alrededor de 7-8 secciones por cada animal. Las estimaciones de volumen se calcularon mediante el método de Cavalieri.

Para estimar la longitud de las fibras estriatales, también se aplicó el método del Fraccionador, pero en este caso, se sustituyeron los disectores ópticos por "spaceballs" (diseectores esféricos). Los detalles de los criterios de muestreo se encuentran resumidos en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Valores de asf utilizados para la estimación del número y la longitud utilizando el Método del Fraccionador. asf, fracción de muestreo de área; TH, tiroxina hidroxilasa; Nrf-2, Factor 2 relacionado con el factor nuclear E2; SNpc, *substantia nigra pars compacta*; SNpr, *substantia nigra pars reticulata*.; r, radio del Spaceball.

Marcador	Región	Dimensiones del marco de conteo (μm)	Espaciado (μm)
TH	SNpc	50 x 50	70 x 70
TH	SNpr	r = 30	450 x 450
Nrf-2	SNpc	50 x 50	70 x 70

En la fase inicial del análisis, empleada para establecer los parámetros de conteo, determinamos que la contribución del error estándar de la media (SEM) a la varianza total observada fue inferior al 20%. Esto se evaluó mediante la relación CE2/CV2, en la que CE2 representa la variabilidad de las estimaciones estereológicas y CV2 refleja la variabilidad biológica. Por lo general, cuando esta relación es inferior a 0,5, se considera que las estimaciones estereológicas son suficientemente precisas, lo que indica que el enfoque de muestreo fue adecuado.

4.7.2. Densitometría óptica

Para determinar el alcance de la denervación dopaminérgica inducida por la sobreexpresión de α -sin, se realizó un análisis de densidad óptica (DO) en el estriado. Con este fin, se digitalizaron secciones coronales del estriado de todos los grupos experimentales utilizando un escáner EPSON V700 a una resolución de 6400 puntos por pulgada (ppp). En cada sección, se delimitó la región del estriado dorsal y se comparó la DO promedio del hemisferio con la corteza, que se utilizó como referencia de fondo. Las imágenes se analizaron utilizando el software FIJI (Schindelin et al., 2012).

4.7.3. Cuantificación de la superficie ocupada por las degeneraciones axonales (“axonal swellings”)

Se realizó una semi-cuantificación de la inmunohistoquímica TH+ para medir el área ocupada por los agregados proteicos que son indicadores de la degeneración axonal en el estriado de los animales del grupo α -sin. Esta cuantificación se llevó a cabo en los distintos puntos temporales analizados de los animales criados en CE y en EE.

Para ello, se adquirieron tres imágenes del estriado de cada animal utilizando un microscopio óptico (Motic; Serie BA410E, Microscopio Biológico) conectado a una cámara digital (Motican 1080BMH) con un objetivo de 20x. Posteriormente, se procedió a medir el área positiva ocupada por los agregados axonales, respecto al área total (mm²) en cada una de las imágenes obtenidas. La herramienta de análisis utilizada fue el software Image J (NIH).

4.8. Western blot

Con el fin de relacionar los cambios observados a nivel comportamental y morfológico con cambios a nivel molecular, se llevó a cabo la técnica del Western blot (WB). Este análisis se realizó con muestras correspondientes a las áreas de SN y estriado de los animales sacrificados 2 meses después de la inyección del virus, criados tanto en CE como en EE. Se emplearon 6 animales por cada grupo experimental estudiado.

4.8.1. Procesamiento del material para el Western blot

Después de anestesiarse a las ratas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital (100 mg/kg), los animales fueron decapitados, para posteriormente realizar una craniectomía. Tras extraer los cerebros, se llevó a cabo la disección de los mismos y obtener así, las secciones del estriado y de la SN.

El tejido resultante se transfirió a tubos eppendorf para su homogenización. Se emplearon aproximadamente 60 μ l de buffer de lisis frío por cada 1 mg de tejido. Cada ml de este buffer de lisis contenía 15 μ l de inhibidor de proteasas (Ref: P3840, Sigma-Aldrich, España). Después de la homogeneización, las muestras se conservaron en hielo durante 30 minutos, antes de ser sometidas a una centrifugación de 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una microcentrífuga. Se extrajo el líquido sobrenadante que contenía las proteínas de las áreas de interés, y se colocó

4. Material y métodos

en un nuevo tubo conservado en hielo, mientras que el precipitado se desechó. Las muestras se almacenaron a -80°C para su posterior utilización.

4.8.2. Ensayo de Bradford para cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas en cada lisado de tejido, se realizó la prueba de Bradford. Se pipetearon soluciones de H₂O y muestras, y se colocaron en tubos de ensayo siguiendo las indicaciones de la **Tabla 4**. Posteriormente, se añadió el reactivo de tinción (Ensayo de proteínas Bio-Rad, Ref: 5000006, Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) a cada uno de ellos. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. El contenido de cada tubo se distribuyó en 3 pocillos de una microplaca (250 µl en cada uno), y se procedió a medir la absorbancia, tanto de los estándares, como de las muestras desconocidas, utilizando un fluorímetro (Ref: Sinergy HT, Biotek Instruments, Inc, Reino Unido). Este procedimiento se llevó a cabo antes de que transcurriera una hora desde el inicio del proceso.

Tabla 4. Ensayo de Bradford. Concentración de proteínas estándar y desconocidas utilizadas para determinar la cantidad de proteína en los lisados de tejido.

	H ₂ O	Reactivo tinción	BSA (1 µg/µl)
Blanco	800 µl	200 µl	--
5	795 µl	200 µl	5 µl
10	790 µl	200 µl	10 µl
15	785 µl	200 µl	15 µl
20	780 µl	200 µl	20 µl
25	775 µl	200 µl	25 µl
30	770 µl	200 µl	30 µl
35	765 µl	200 µl	35 µl
40	760 µl	200 µl	40 µl
45	755 µl	200 µl	45 µl
50	750 µl	200 µl	50 µl
Muestra	800 µl	200 µl	1 µl de muestra

4.8.3. Electroforesis

Para la preparación de las muestras a cargar, se calculó la cantidad necesaria de cada una de ellas teniendo en cuenta la concentración de proteína obtenida en el ensayo de Bradford. Cada muestra se mezcló con 5 μ l de Buffer de Muestra 4x y se ajustó el volumen final a 20 μ l con H₂O. Posteriormente, las muestras se hirvieron durante 10 minutos, seguido de una breve centrifugación de 30 segundos. Tras colocar el gel en la cubeta de electroforesis, se cargó la misma cantidad de proteínas en todas las calles de los geles de poliacrilamida empleados (Geles preformados Criterion™ TGX™ del 12%, Bio-Rad, España). Junto con las muestras, se cargó un marcador de peso molecular (Escala de proteínas Fisher BioReagents™ EZ-Run™ prestain, Fisher Scientific, España). La electroforesis se realizó a 200 V (**Fig. 13**).

4.8.4. Transferencia de proteínas desde el gel a la membrana

La transferencia semi-húmeda se llevó a cabo utilizando el sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Se realizó durante 7 minutos a una intensidad constante de 2,5 A, con un voltaje máximo de 25 V. Para ello se utilizaron membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF) (Paquetes de Transferencia Trans-Blot® Turbo™ Midi PVDF, Ref: 1704157, Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) (**Fig. 13**).

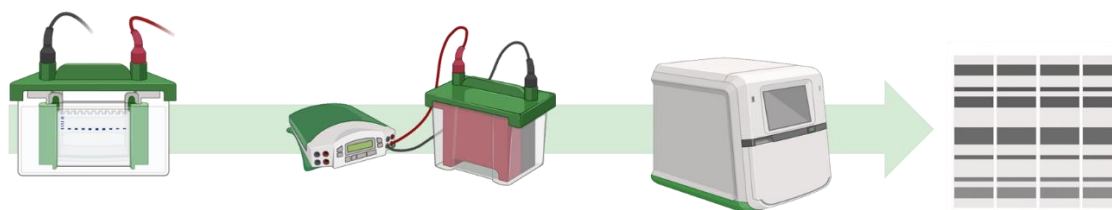


Figura 13. Materiales empleados en procedimiento de Western blot.

4.8.5. Immunoblotting

Las membranas se bloquearon durante 2,5 horas a temperatura ambiente, empleando un tampón de bloqueo (tampón de solución salina tris-bicarbonato de sodio (TTBS) + 5% de leche en polvo). Posteriormente, se procedió a incubarlas durante toda la noche a 4°C con las diluciones apropiadas de anticuerpo primario (**Tabla 5**) en un medio de TTBS + 5% de BSA. Al día siguiente,

4. Material y métodos

las membranas se lavaron 3 veces con TTBS, cada lavado con una duración de 5 minutos, y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado en un tampón de bloqueo que contenía un 1% de BSA (**Tabla 5**) a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno. Para detectar la señal, se empleó la quimioluminiscencia mejorada (Ref: 34076, SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Fisher Scientific, España).

La información detallada sobre las soluciones y tampones se puede encontrar en el **Apéndice 1**.

Tabla 5. Concentraciones y referencias de los anticuerpos empleados en los ensayos de western blot.

Anticuerpos primarios		
Rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (Thr 202/204)	1:1000	Ref: 9101, Cell Signaling Technology Inc, EEUU
Rabbit anti-p44/42 MAPK (Erk 1/2)	1:1000	Ref: 9102, Cell Signaling Technology Inc, EEUU
Rabbit anti-phospho-TrkB (Tyr 706)	1:250	Ref: sc-135645, Santa Cruz Biotechnology Inc, España
Rabbit anti-TrkB (794)	1:1000	Ref: sc-12, Santa Cruz Biotechnology Inc, España
Rabbit anti-BDNF	1:2000	Ref: NBP1-46750, Novus Biologicals, EEUU
Rabbit anti-NF-KB	1:1000	Ref: SAB4502615, Sigma-Aldrich, España
Rabbit anti-GDNF	1:1000	Ref: ab176564, Abcam, España
Rabbit anti-actina	1:2000	Ref: A2066, Sigma-Aldrich, España
Rabbit anti- β -tubulina	1:1000	Ref: ab15568, Abcam, España
Anticuerpos secundarios		
Anti-rabbit IgG HRP conjugate	1:15000	Ref: A-6154, Sigma-Aldrich, España

4.8.6. Adquisición y análisis de datos

Las imágenes se adquirieron mediante el sistema de imágenes ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA), y para la cuantificación de la densidad óptica, se empleó el software Image Studio Digits 3.1 (LI-COR Biotechnology, Cambridge, Reino Unido).

Después de obtener la imagen del WB, se trazó un rectángulo estrecho y la intensidad de la señal dentro de este rectángulo se empleó como representación del contenido total de proteínas de esa muestra. La intensidad promedio en las regiones superior e inferior se utilizó para la detección del fondo. La señal de la proteína de interés se normalizó respecto a una proteína de control única, como la actina o la β -tubulina, que se encuentra en niveles constantes en todas las

muestras. Para garantizar la precisión en los resultados cuantitativos, tanto la proteína de interés de cada individuo en cada grupo, como sus respectivos controles de carga, fueron detectados en el mismo WB.

4.9. Análisis estadístico y preparación de figuras

En primer lugar, se realizó el test de Kolmogorv-Smirnov para examinar la distribución normal de los datos obtenidos y el test de Levene para la homogeneidad de las varianzas. Las diferencias significativas entre los grupos experimentales de los animales criados en condiciones estándar en cada punto temporal estudiado, se evaluaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía con las correcciones posthoc de Tukey para las varianzas homogéneas, o Tamhane T2 para varianzas heterogéneas (SPSS Statistics 29.0, IBM, España).

El análisis para evaluar la progresión temporal, tanto a nivel conductual, como morfológico, se llevó a cabo utilizando R Studio (versión 01.07.2022). En el caso de los datos obtenidos en el test conductual, se ajustaron modelos lineales de efectos mixtos para tener en cuenta la correlación intraanimal mediante los paquetes lme4 y lmerTest. Los efectos fijos incluyeron el tiempo transcurrido desde la cirugía y el grupo, con una interceptación aleatoria para los animales. Para examinar las diferencias en la progresión de los parámetros del OF entre grupos, se introdujo un término de interacción entre el tiempo y el grupo. Por otro lado, se aplicaron análisis de regresión lineal multivariante para evaluar los cambios inmunohistoquímicos en la reactividad a la TH a lo largo de los meses posteriores a la cirugía. Este análisis difirió del anterior dado que se consideraron muestras independientes de animales en cada punto temporal. Al igual que en el análisis conductual, los predictores independientes incluyeron el tiempo, el grupo y el término de interacción entre el tiempo y el grupo.

Para determinar el efecto de la cría en EE sobre los síntomas motores y los cambios morfológicos y moleculares inducidos por la sobreexpresión de α -sin, se realizó un ANOVA de 3 vías, definiendo como factores el entorno, la sobreexpresión de α -sin y la realización del procedimiento quirúrgico (SPSS Statistics 29.0, IBM, España). Mediante este análisis se analizaron los efectos significativos de cada factor de forma independiente, así como la significancia de la interacción entre los distintos factores. En el caso de los datos obtenidos con la semicuantificación de los agregados axonales en el estriado de los animales del grupo α -sin, se realizó un t-test (SPSS Statistics 29.0, IBM, España).

4. Material y métodos

El coeficiente de correlación de Pearson se llevó a cabo para analizar la relación estadística entre dos variables continuas: por un lado, entre la actividad locomotora y el peso, en el caso de los animales criados en CE en los 3 puntos temporales analizados, por otro lado, entre las variables de DO y la cuantificación de las degeneraciones axonales en el estriado de animales criados en CE y EE, 2 meses después de la inyección del virus.

Por último, el hecho de que los animales utilizados para cuantificaciones morfológicas y para el análisis de WB fueran diferentes, limita la posibilidad de realizar análisis estadísticos que correlacionen los hallazgos histológicos con alteraciones moleculares. Esto se debe a que los análisis de correlación requieren que ambas variables continuas se midan en el mismo individuo (o animal). Como una aproximación cuantitativa para explorar la asociación entre ambas, se realizó un análisis de correlación de medias grupales de la siguiente manera. En primer lugar, se calculó la media grupal para cada una de las variables histológicas cuantificadas, así como la media grupal de diferentes moléculas evaluadas mediante WB. De esta forma, se obtuvieron 6 valores por cada variable (un valor por cada grupo experimental). En segundo lugar, se realizó un análisis de correlación de Pearson, de forma que se pudo cuantificar el grado de asociación entre la media grupal de una variable histológica (por ejemplo, densidad óptica de TH+ en estriado) con una variable molecular (por ejemplo, BDNF).

Se consideraron como estadísticamente significativas aquellas diferencias que presentaron valores p inferiores a 0,05. Los resultados se presentan en forma de media acompañada de su error estándar (SEM) (media \pm SEM). Los valores medios y las desviaciones estándar del análisis estereológico se encuentran detallados en el **Apéndice 2**.

Las imágenes de las secciones de inmunohistoquímica fueron capturadas utilizando un microscopio Olympus BX41. Las imágenes de inmunofluorescencia se obtuvieron mediante un microscopio confocal (Zeiss LSM800). En este último caso, para la obtención de imágenes de superficies más extensas, se utilizó la capacidad tridimensional del microscopio confocal. Se escaneó el haz sobre un volumen para recopilar una pila de imágenes y desplazar el escenario a campos de visión consecutivos. Estas pilas de imágenes se ensamblaron para obtener una imagen de mayor extensión. En ambos casos, las imágenes se procesaron mediante el software GIMP 2.10.24. Por último, para la creación de los gráficos, se empleó el software Prism 8 de GraphPad (La Jolla, CA, EE. UU.).

5. RESULTADOS

BLOQUE I: Validación del modelo experimental de la enfermedad de Parkinson

5.1. Efecto de la sobreexpresión de la α -sinucleína sobre la actividad motora

El estudio del efecto de la sobreexpresión de α -sin sobre la actividad motora se analizó mediante el test de campo abierto (OF, por sus siglas en inglés).

En primer lugar, en este apartado analizamos si la sobreexpresión de α -sin tiene un efecto diferente sobre las variables motoras analizadas respecto a los grupos control y sham en cada uno de los puntos temporales estudiados, realizando un ANOVA de una vía (**Fig. 14**).

El grupo α -sin mostró una actividad general menor en comparación con los grupos control y sham a 1 mes (control = $2120,20 \pm 136,74$, sham = $2402,73 \pm 149,92$, α -sin = $1905,04 \pm 126,06$), 2 meses (control= $2120,20 \pm 136,74$, sham= $2098,40 \pm 143,32$, α -sin = $1570,05 \pm 130,60$), y 4 meses (control= $1654,70 \pm 96,82$, sham = $1445,80 \pm 69,21$, α -sin = $1372,16 \pm 98,56$) tras la inyección del virus. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas entre los grupos α -sin y sham, 1 y 2 meses después de la inyección ($p= 0,029$ y $p= 0,018$ respectivamente), y entre los grupos α -sin y control a 2 meses ($p= 0,020$) (**Fig. 14A**).

En cuanto a la locomoción, la tendencia observada fue similar. El grupo α -sin mostró una actividad locomotora reducida en todos los puntos temporales analizados (1 mes, control= $1895,30 \pm 123,26$, sham= $2167,40 \pm 133,05$, α -sin= $1718,21 \pm 111,50$; 2 meses, control= $1900,40 \pm 121,34$, sham= $1828,13 \pm 125,24$, α -sin = $1381,94 \pm 112,91$; 4 meses, control= $1469 \pm 89,91$, sham= $1273 \pm 61,51$, α -sin = $1213 \pm 76,34$). Las diferencias fueron estadísticamente significativas respecto al grupo sham a 1 mes ($p= 0,007$) y respecto a los grupos control ($p= 0,009$) y sham ($p= 0,016$), 2 meses después de la inyección del virus (**Fig. 14B**).

Los resultados de la distancia recorrida (cm) indicaron que el grupo α -sin recorrió una menor distancia en comparación con el resto de grupos experimentales en los tres puntos temporales analizados (1 mes, control= $5551 \pm 382,20$, sham= $5809 \pm 526,10$, α -sin= $4237 \pm 385,90$; 2 meses, control= $5553 \pm 374,66$, sham= $5042 \pm 481,90$, α -sin= $3263 \pm 397,40$; 4 meses, control= $4515 \pm 270,70$, sham= $3853 \pm 234,60$, α -sin= $3505 \pm 371,70$). Al igual que en las variables previamente descritas, el grupo α -sin mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo sham, 1 mes después de la inyección del virus ($p= 0,0305$), y con los grupos control y sham ($p= 0,0034$ y $p= 0,0112$ respectivamente) a los 2 meses posteriores (**Fig. 14C**).

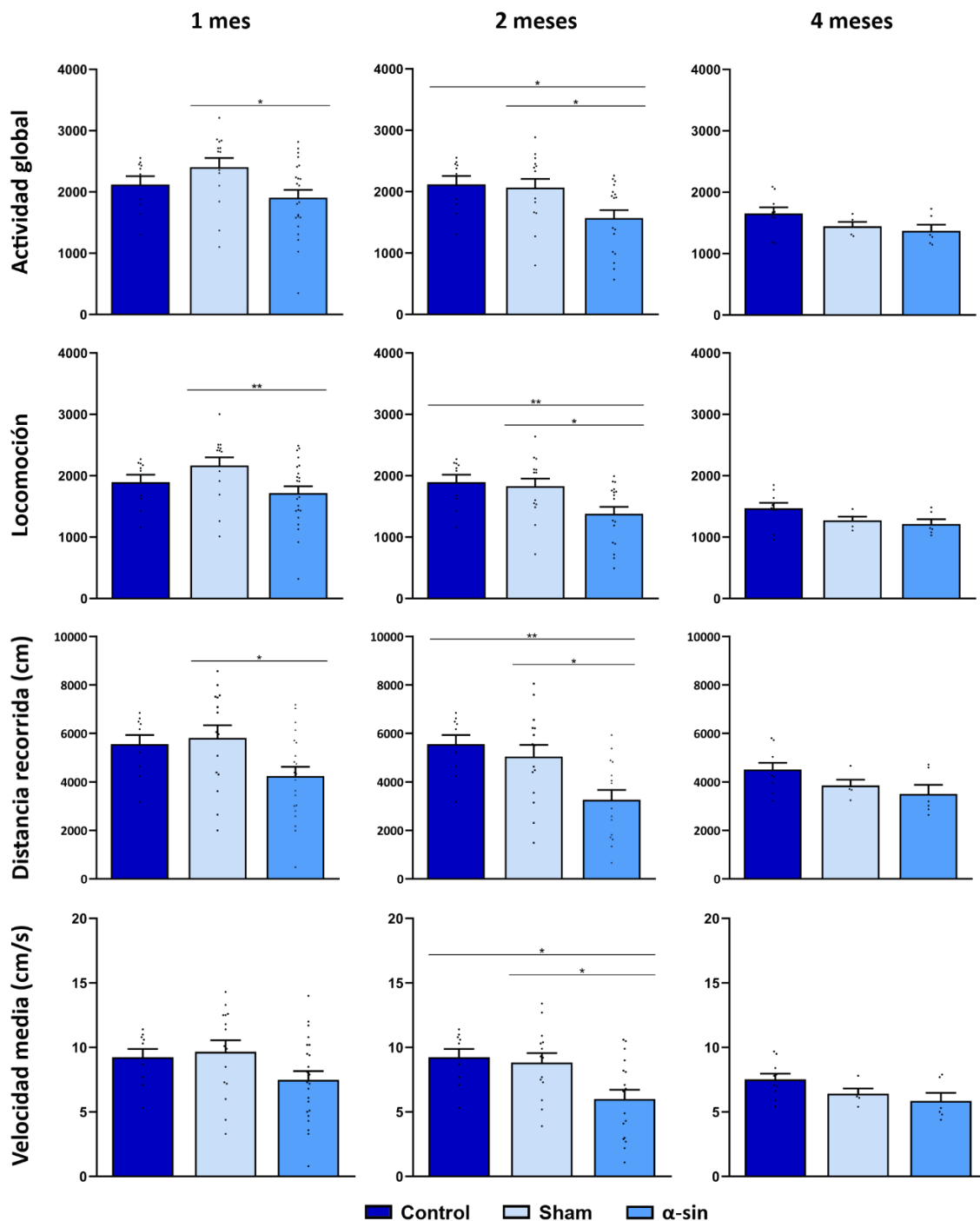


Figura 14. Actividad global espontánea (A), locomoción (B), distancia recorrida (C) y velocidad media (D) obtenidas con el test de Campo Abierto. La detección de la actividad fue completamente automatizada mediante el software Actitrack (Panlab, España). Los datos se representan como media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. El análisis de la actividad general a los 4 meses y la locomoción a 1 y 2 meses se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Los datos restantes fueron sometidos a un análisis mediante un ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey como Post Hoc.

Finalmente, al examinar la velocidad media (cm/s), el grupo α -sin mostró la menor velocidad promedio, alcanzando su punto más bajo 4 meses después de la inyección (1 mes, control= $9,24 \pm 0,63$, sham= $9,67 \pm 0,87$, α -sin= $7,49 \pm 0,67$; 2 meses, control= $9,26 \pm 0,63$, sham= $8,82 \pm 0,73$, α -sin= $6,00 \pm 0,70$; 4 meses, control= $7,53 \pm 0,44$, sham= $6,42 \pm 0,39$, α -sin= $5,85 \pm 0,62$). En este caso, se observaron diferencias significativas al comparar el grupo α -sin con el control ($p= 0,012$) y sham ($p= 0,016$), 2 meses después de la administración del virus (**Fig. 14D**).

Por otro lado, realizamos un análisis temporal basado en modelos lineales mixtos de las variables previamente descritas, para poder determinar si el grupo α -sin presentaba diferencias respecto a los otros grupos experimentales a lo largo del tiempo (**Fig. 15**).

Los resultados obtenidos mostraron que el tiempo ejerce un efecto significativo sobre la actividad global ($p= 2,28e^{-8}$), es decir, el tiempo afecta a todos los grupos sin considerar sus diferencias experimentales por separado. De hecho, al comparar los resultados obtenidos a 2 y 4 meses respecto a aquellos obtenidos a 1 mes, el grupo α -sin experimentó una reducción del 17,58% en la actividad global, 2 meses después de la inyección del virus, y del 27,97%, pasados 4 meses. Por otro lado, en el grupo sham, se evidenció una reducción del 14% en la actividad global después de 2 meses, y una disminución del 39,8%, 4 meses después de la administración del virus vacío. Por último, en el grupo control, no se registraron cambios al comparar los resultados obtenidos entre los primeros dos puntos temporales y, sin embargo, se identificó una disminución del 21,95% pasados 4 meses en comparación con los animales del primer mes. Por otro lado, cabe destacar que la evolución temporal del grupo α -sin mostró una significancia estadística en comparación con el grupo control ($p= 0,01974$), pero no en comparación con el grupo sham (**Fig. 15A**).

En lo que respecta a la actividad locomotora, el tiempo también mostró un efecto significativo sobre la misma ($p= 1,82e^{-8}$), mostrando en el grupo α -sin una reducción del 19,57% y del 29,4%, 2 y 4 meses después de la sobreexpresión de α -sin respectivamente, al compararlos con los resultados obtenidos 1 mes después. El grupo control no presentó variaciones entre los dos primeros puntos temporales analizados, pero, experimentó una disminución del 22,48% en la actividad locomotora después de 4 meses. Por el contrario, el grupo sham exhibió una reducción del 15,65% y del 41,26% a los 2 y 4 meses después de la inyección del virus vacío (**Fig. 15B**). En este caso, la evolución temporal del grupo α -sin también resultó estadísticamente significativa en comparación con el grupo control ($p= 0,01917$) (**Fig. 15B**).

El análisis estadístico también demostró que el tiempo tiene un impacto significativo en la distancia recorrida ($p= 4,54e^{-6}$), indicando que la distancia varía a lo largo del tiempo, sin

5. Resultados

considerar los distintos grupos experimentales por separado. Concretamente, se observó una reducción cercana al 20%, 2 y 4 meses después de la administración del virus, en el grupo α -sin al compararlo con los resultados obtenidos en el primer punto temporal analizado. En el grupo control se mostró una reducción del 18,66% al comparar los datos obtenidos después de 4 meses con los del primer mes. No se observaron cambios entre los dos primeros puntos temporales analizados en este grupo. En relación con el grupo sham, se registró una disminución del 13,2%, 2 meses después de la cirugía, y del 33,67% después de 4 meses (**Fig. 15C**). Por otro lado, al igual que en las variables previamente descritas, la evolución temporal del grupo α -sin fue estadísticamente significativa en comparación con el grupo control ($p=0,03645$).

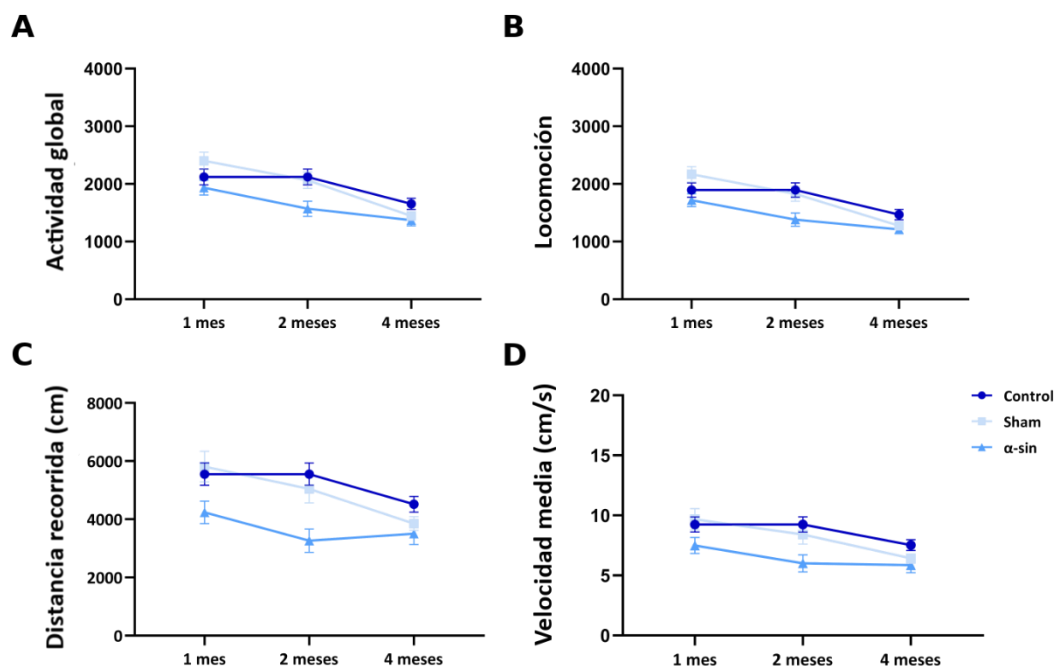


Figura 15. Análisis temporal del test de Campo Abierto. Las gráficas muestran la actividad global (A), la locomoción (B), la distancia recorrida (C) y la velocidad media (D) de los distintos grupos experimentales a 1 mes, 2 meses y 4 meses tras la inyección bilateral del virus adenoasociado. La detección de la actividad fue totalmente automatizada mediante el software Actitrack (Panlab, España). El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante Modelos Lineales Mixtos para analizar las variaciones de los animales a lo largo del tiempo.

Por último, en relación con la velocidad media, el tiempo también tuvo un efecto significativo ($p=8,6e^{-6}$), evidenciando que, la velocidad media de todos los grupos varía a lo largo del tiempo, sin tener en cuenta sus diferencias experimentales. De manera específica, se detectó una disminución del 19,83%, 2 meses después de la inyección, y del 21,9% a los 4 meses, al compararlos con los resultados obtenidos el primer mes. En los demás grupos experimentales, se evidenció la misma tendencia, con una disminución del 18,5% después de 4 meses en el grupo

control. Además, en el grupo sham se observó una reducción del 8,73% y del 33,63% tras 2 y 4 meses, respectivamente (**Fig. 15D**). Asimismo, la evolución temporal del grupo α -sin fue estadísticamente significativa en comparación con el grupo control ($p=0,04377$) (**Fig. 15D**).

Posteriormente, se realizó un análisis de correlación para estudiar la posible relación entre la actividad global de los animales y su peso (**Fig. 16**). Los animales de los grupos control y α -sin no presentaron una correlación significativa entre el peso y la actividad (control: $r= -0,3192$, $p= 0,1701$; α -sin: $r= -0,2732$, $p= 0,1304$). En cambio, en el grupo sham, se observó un coeficiente de correlación de Pearson de $-0,6465$, con una significancia estadística de $p= 0,0003$ (**Fig. 16**). Estos resultados indicaron una relación inversa significativa entre las dos variables, un mayor peso se asoció con una actividad general más baja, y viceversa.

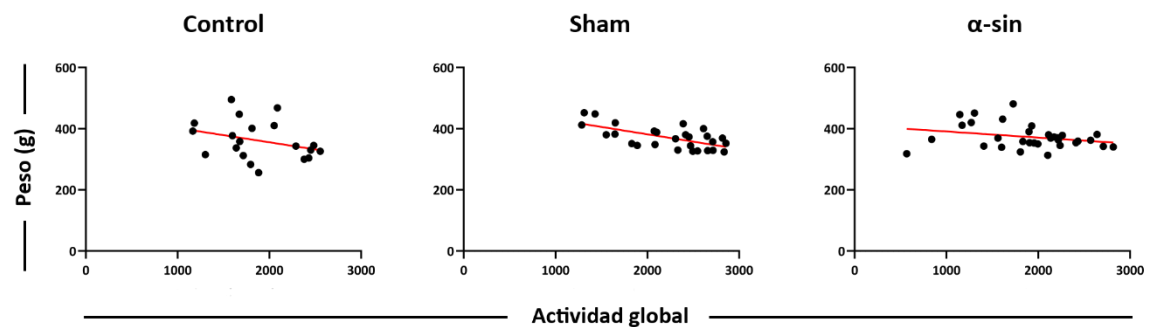


Figura 16. Análisis de correlación para evaluar la relación entre la actividad global y el peso en los diferentes grupos experimentales. Se ha medido la dependencia lineal entre las variables peso y actividad global de los diferentes grupos experimentales siguiendo el coeficiente de correlación de Pearson.

5.2. Análisis de la sobreexpresión de α -sinucleína en la vía nigroestriatal

5.2.1. Colocalización de α -sin y tirosina hidroxilasa (TH)

Tras la identificación de variaciones comportamentales entre los distintos grupos experimentales, el siguiente paso fue investigar si dichas alteraciones podían estar vinculadas a cambios en la expresión de α -sin. Para ello, el primer paso fue determinar si la inyección bilateral del virus, acometida en la SN y que contenía un promotor neuronal, daba lugar a la sobreexpresión de α -sin en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* (SN). Con este fin, empleamos la doble inmunofluorescencia para analizar la correlación espacial entre la expresión de α -sin y TH en la vía nigroestriatal, tanto en la SN como en el estriado.

5. Resultados

Las imágenes muestran colocalización de las neuronas TH-positivas y la α -sin, tanto en la SN (**Fig. 17**) como en el estriado (**Fig. 18**) de los animales del grupo α -sin, lo que indica la presencia de esta proteína dentro de las neuronas dopaminérgicas a lo largo del eje nigroestriatal. Por el contrario, no se observó ninguna colocalización entre las neuronas TH+ y la α -sin en la SN del grupo control y del grupo sham (**Fig. 19 y 20** respectivamente). Esta ausencia de marcaje se extendió hasta el estriado en ambos grupos experimentales (**Fig. 21 y 22**). Por lo tanto, la sobreexpresión de α -sin asociada a la inyección bilateral del adenovirus se detectó de manera exclusiva en el grupo α -sin (**Fig. 17 y 18**).

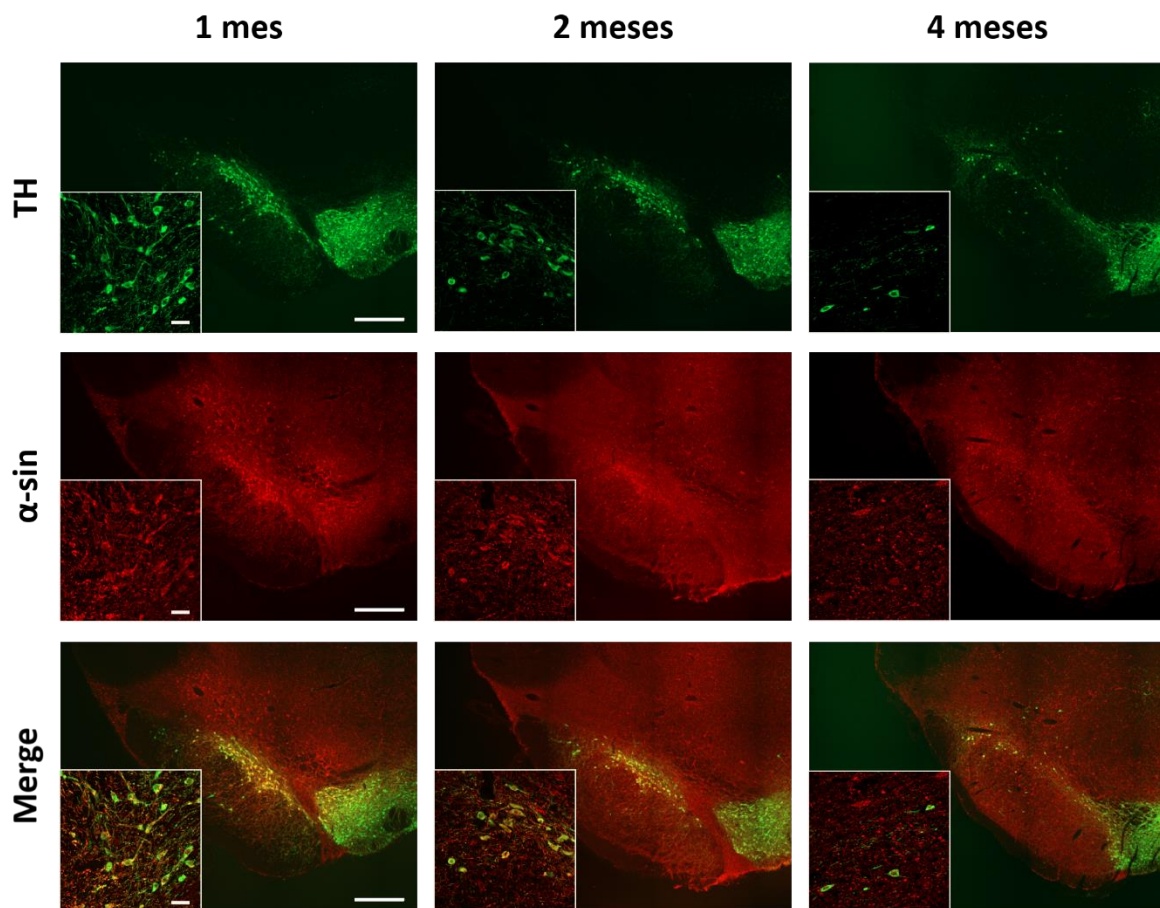


Figura 17. Imágenes representativas de la SN en animales del grupo α -sin. Se muestra marcaje positivo para tirosina hidroxilasa (TH, en verde), α -sinucleína (α -sin, en rojo) y su coexpresión (en amarillo). Barra de escala: 500 μ m (objetivo 4x) y 50 μ m (objetivo 20x).

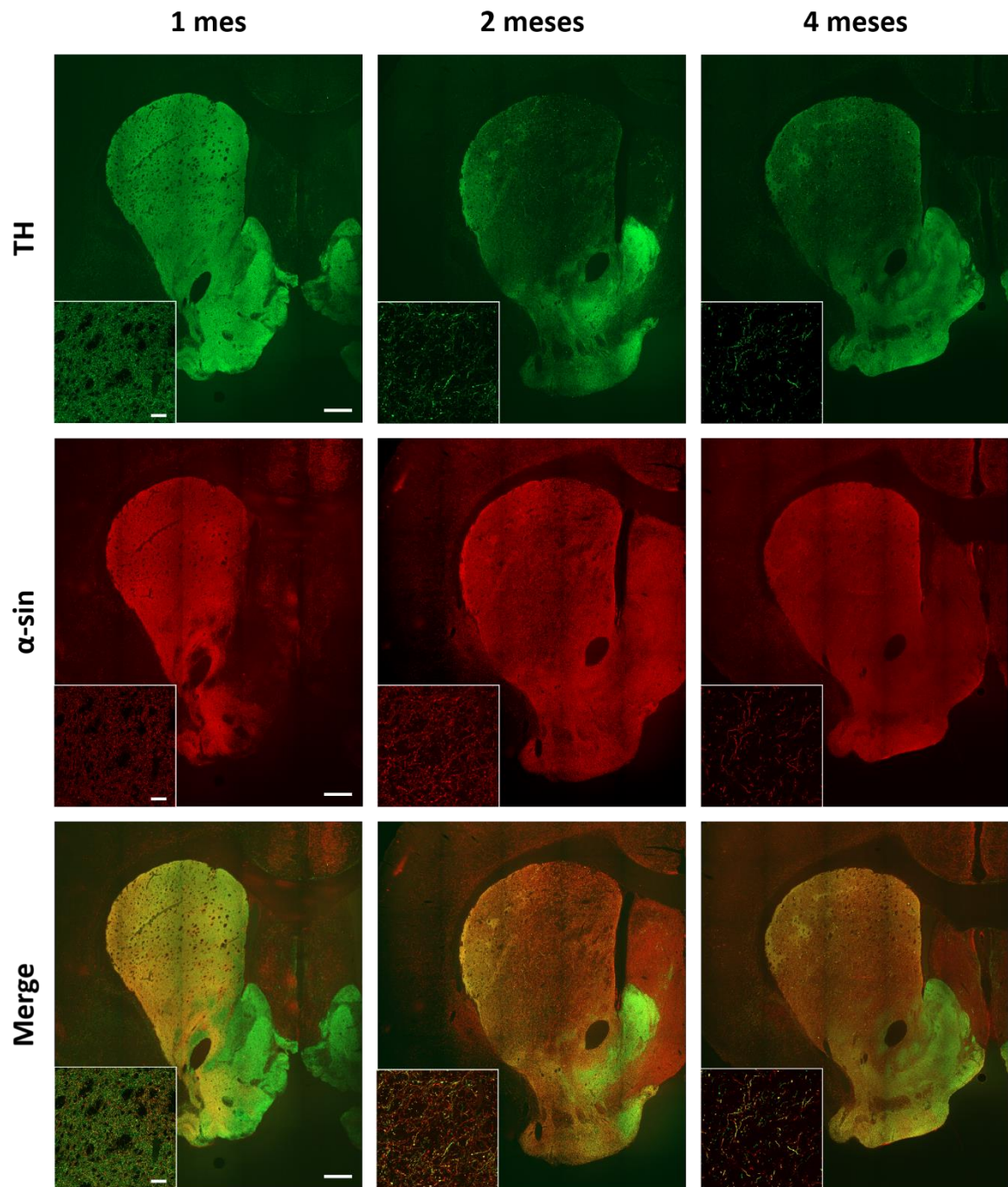


Figura 18. Imágenes representativas del estriado en animales del grupo α -sin. Se muestra marcaje positivo para tirosina hidroxilasa (TH, en verde), α -sinucleína (α -sin, en rojo) y su coexpresión (en amarillo). Barra de escala: 500 μ m (objetivo 4x) y 50 μ m (objetivo 20x).

5. Resultados

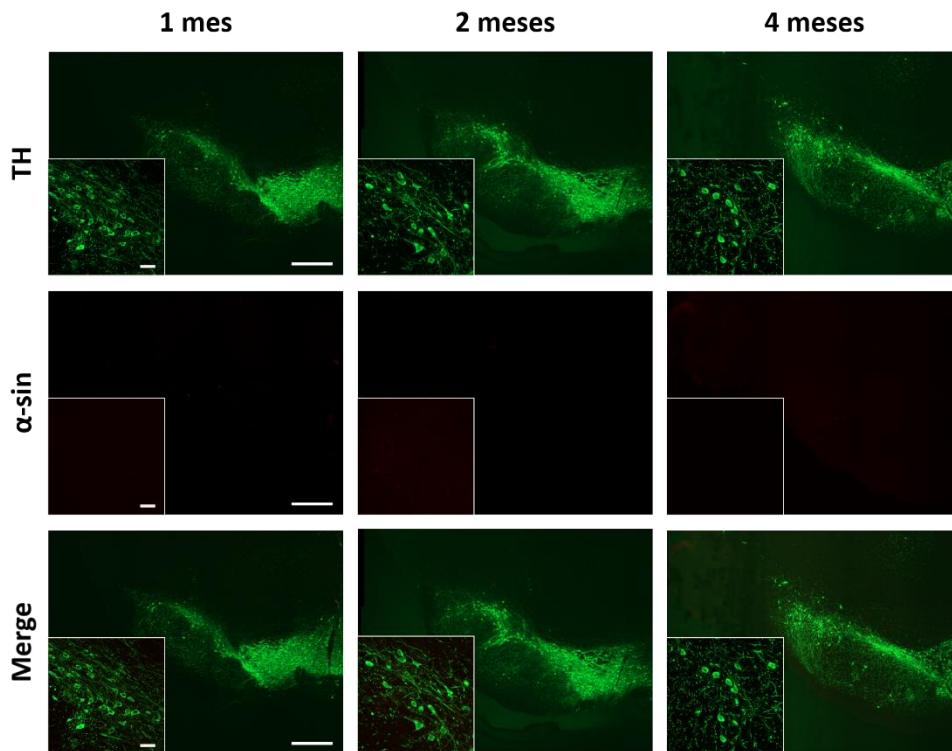


Figura 19. Imágenes representativas de la SN en los animales control. Se muestra marcaje positivo para tirosina hidroxilasa (TH, en verde), ausencia de marcaje para α -sinucleína (α -sin, en rojo) y ausencia de coexpresión (en amarillo). Barra de escala: 500 μ m (objetivo 4x) y 50 μ m (objetivo 20x).

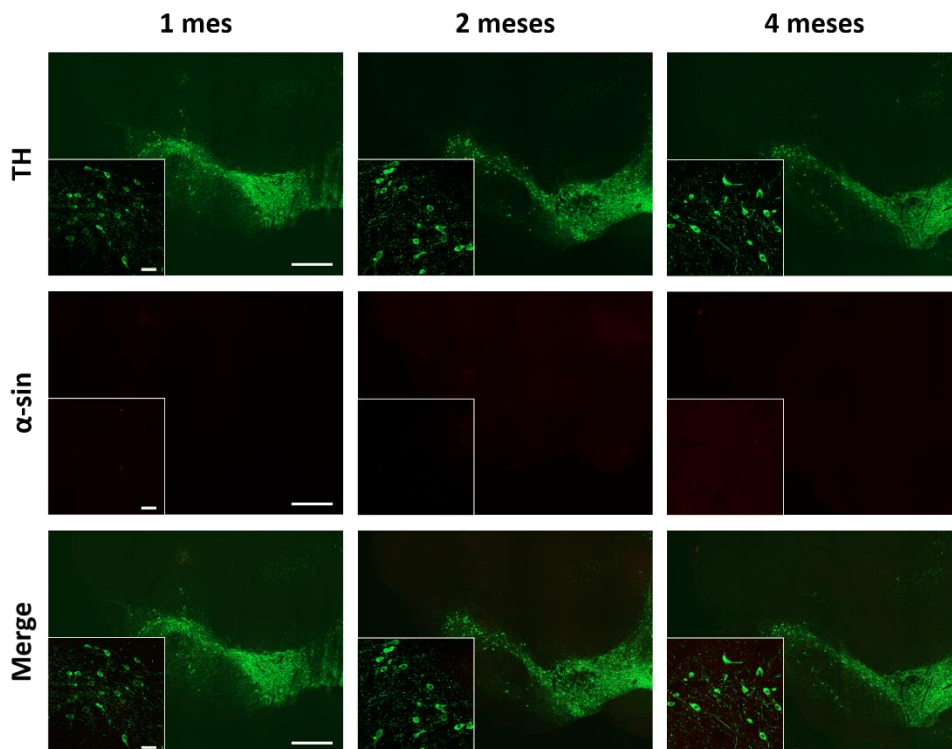


Figura 20. Imágenes representativas de la SN en los animales del grupo sham. Se muestra marcaje positivo para tirosina hidroxilasa (TH, en verde), ausencia de marcaje para α -sinucleína (α -sin, en rojo) y ausencia de coexpresión (en amarillo). Barra de escala: 500 μ m (objetivo 4x) y 50 μ m (objetivo 20x).

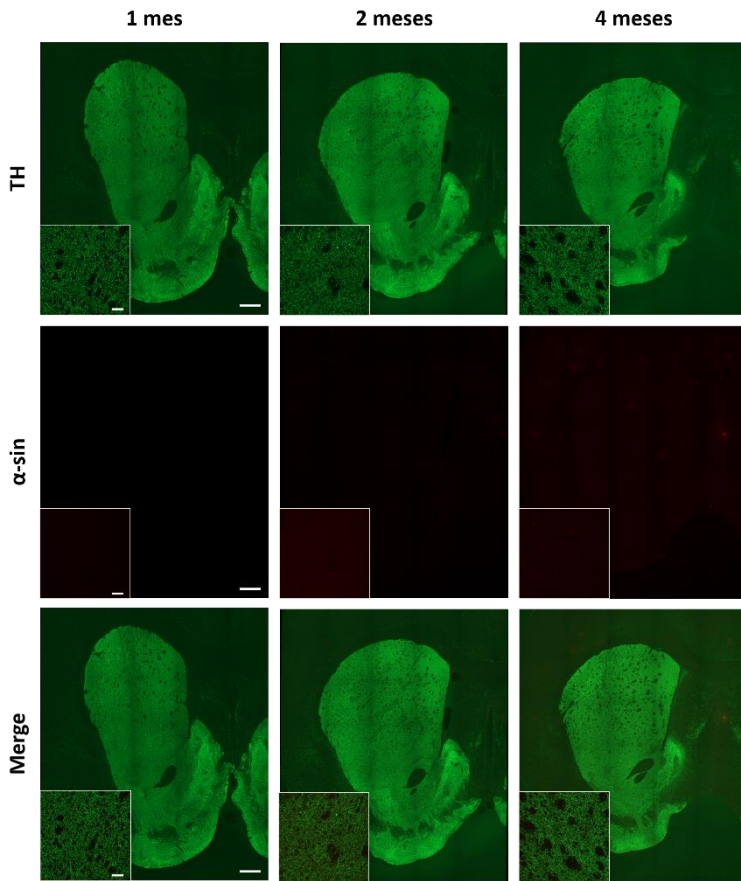


Figura 21. Imágenes representativas del estriado en los animales control. Se muestra marcaje positivo para tirosina hidroxilasa (TH, en verde), ausencia de marcaje para α -sinucleína (α -sin, en rojo) y ausencia de coexpresión (en amarillo). Barra de escala: 500 μ m (objetivo 4x) y 50 μ m (objetivo 20x).

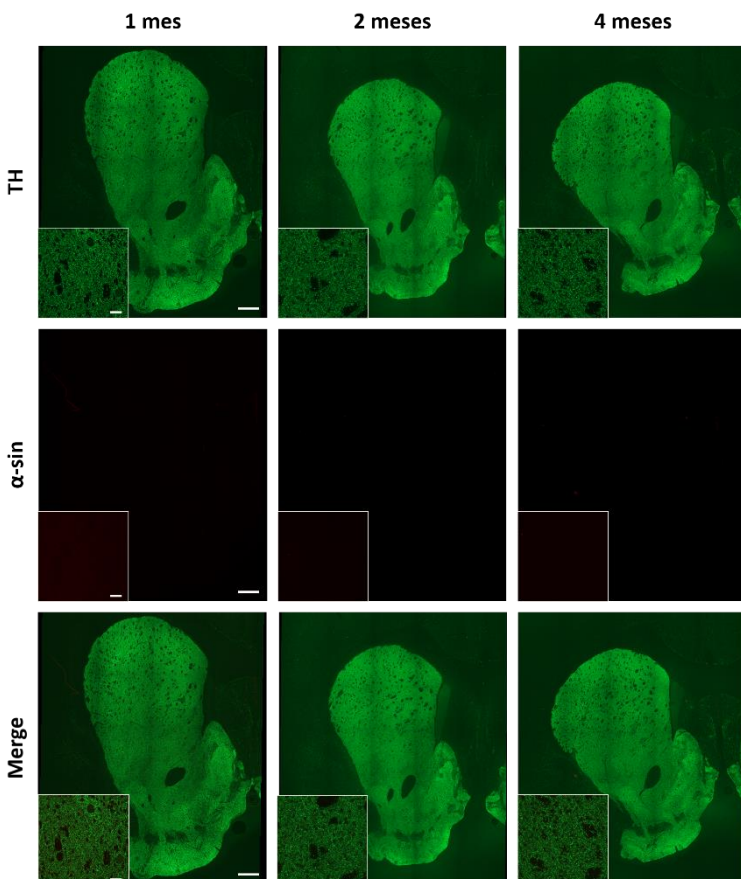


Figura 22. Imágenes representativas del estriado en los animales del grupo sham. Se muestra marcaje positivo para tirosina hidroxilasa (TH, en verde), ausencia de marcaje para α -sinucleína (α -sin, en rojo) y su coexpresión (en amarillo). Barra de escala: 500 μ m (objetivo 4x) y 50 μ m (objetivo 20x).

5. Resultados

5.2.2. Colocalización de α -sin y marcadores gliales

Tras verificar la capacidad de penetración del virus en las neuronas dopaminérgicas, el objetivo fue certificar que el promotor utilizado en nuestro modelo animal era específico de neuronas. Para ello, y con el fin de analizar si la expresión de α -sin se extendía a otros tipos celulares, llevamos a cabo una doble inmunofluorescencia empleando marcadores gliales frente a astrocitos (GFAP) y microglía (Iba-1).

Los resultados obtenidos tanto en la SN como en el estriado, revelaron la ausencia de colocalización entre la α -sin y GFAP e Iba-1 (**Fig. 23**). Este resultado recalca la especificidad neuronal del virus empleado en nuestro modelo animal.

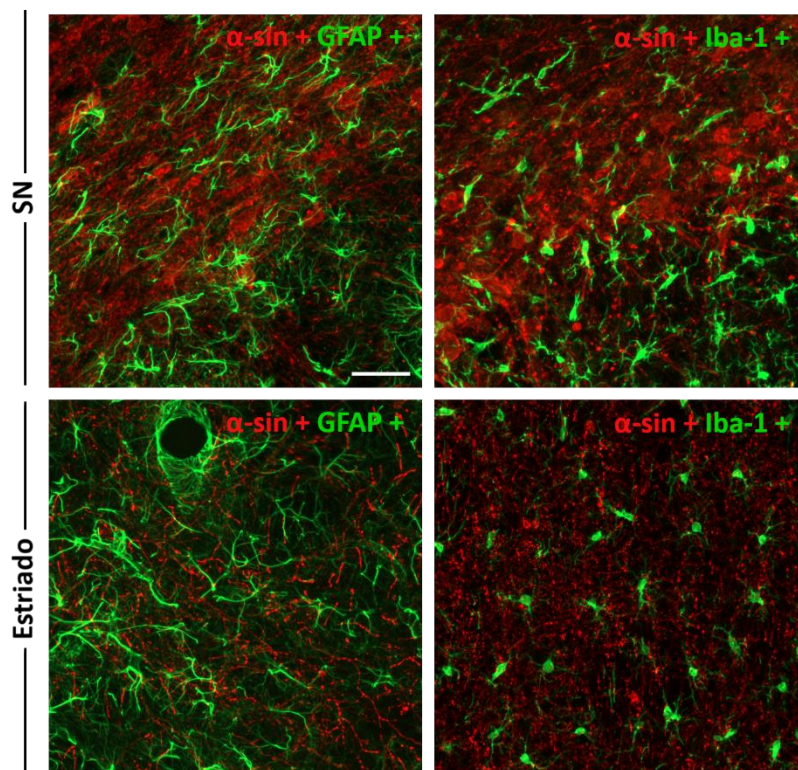


Figura 23. Imágenes representativas de la SN y el estriado de animales que sobreexpresan α -sin. Se muestra marcaje positivo para GFAP e Iba-1 respectivamente en verde, α -sin, en rojo y su coexpresión (en amarillo). Barra de escala: 50 μ m.

5.2.3. Análisis de la difusión de la α -sin

Después de verificar la coexistencia de α -sin con TH en las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, se examinó el patrón espacial de distribución de esta proteína (**Fig. 24**). Mediante el uso de secciones cerebrales coronales seriadas, se llevó a cabo el estudio de la difusión de α -sin desde el lugar de inyección hacia diversas regiones cerebrales: el colículo superior y la sustancia

gris periacueductal en el mesencéfalo, el núcleo geniculado medial del tálamo, la corteza retrosplenial y la corteza prefrontal.

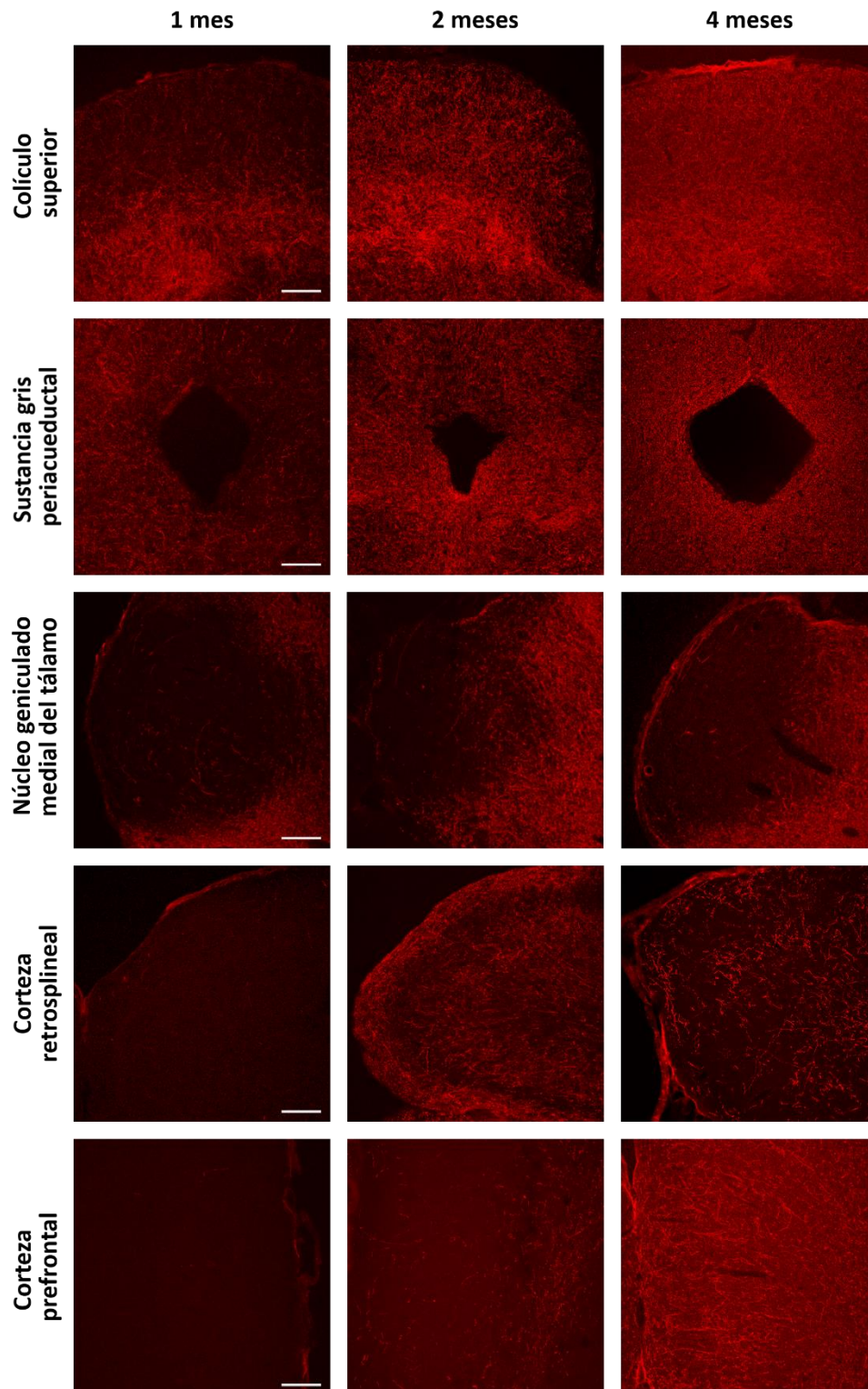


Figura 24. Análisis de la difusión de la α -sin. Imágenes representativas de α -sin (rojo) en el colículo superior, acueducto mesencefálico, núcleo geniculado medial del tálamo, corteza retrosplenial y corteza prefrontal. Barra de escala: 200 μ m.

Las imágenes muestran una marcada y significativa sobreexpresión de la proteína α -sin en las áreas cerebrales analizadas. Tras el primer mes desde la intervención quirúrgica, se observó una variación en la expresión de α -sin en función de la distancia desde el lugar de inyección. De hecho, se registró una disminución en la intensidad de la expresión de α -sin a medida que aumentaba la distancia respecto a la SN (**Fig. 24**). Sin embargo, cabe destacar que la sobreexpresión de esta proteína se acentuó después de los 2 meses, con un ligero incremento observado a los 4 meses (**Fig. 24**). Por lo tanto, en función del tiempo transcurrido desde la inyección del virus, aumenta la difusión de la proteína sobreexpresada, alcanzando áreas cerebrales más alejadas, llegando incluso a la corteza prefrontal.

5.2.4. Análisis de la expresión de la α -sin fosforilada

Las modificaciones postraduccionales de la α -sin han sido descritas como elementos determinantes en la EP. Entre estas modificaciones, destaca la fosforilación en el residuo de serina 129, la cual se vincula con alteraciones en las características de la α -sin, incluyendo su propensión a la agregación (Gorbatyuk et al., 2008), toxicidad (Kragh et al., 2009) e interacciones con otras proteínas (Lou et al., 2010).

Por este motivo, tras analizar la difusión de la proteína α -sin, estudiamos la capacidad de este modelo para generar α -sin fosforilada (p- α -sin). En concordancia con los resultados previos relacionados con la α -sin, se observó un marcaje positivo exclusivamente en animales del grupo α -sin. Sin embargo, a diferencia de la α -sin, la p- α -sin se localizó de manera específica en el sitio de inyección, es decir, en la SN (**Fig. 25**).

El análisis de la expresión de α -sin fosforilada en los distintos puntos temporales, mostró un menor marcaje para p- α -sin pasado 1 mes de la inyección del virus, seguida por un incremento del mismo a partir de los 2 meses, y manteniéndose más o menos constante hasta los 4 meses (**Fig. 25**). Estos hallazgos sugieren una variabilidad temporal en la expresión de p- α -sin, proporcionando una perspectiva sobre la evolución de este marcador en este modelo experimental.

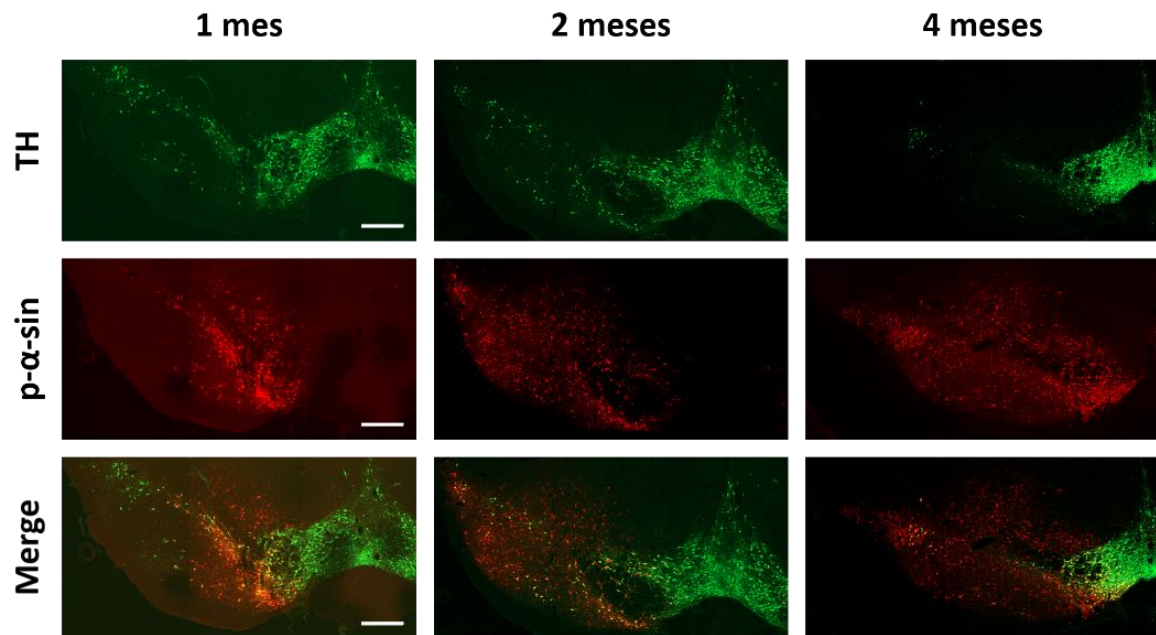


Figura 25. Imágenes representativas de la SN en animales que sobreexpresan p- α -sin. Se muestra marcaje positivo para tirosina hidroxilasa (TH, en verde), α -sinucleína fosforilada (p- α -sin, en rojo) y su coexpresión (en amarillo). Barra de escala: 500 μ m.

5.3. Análisis de la degeneración dopaminérgica de la vía nigroestriatal

Los efectos de la inyección de α -sin y del virus vacío en la SN fueron evaluados midiendo la inmunorreactividad de células TH-positivas en la vía nigroestriatal. Concretamente, se cuantificó, mediante estereología, la densidad de neuronas y fibras TH-positivas en la SNpc y SNpr respectivamente, y se midió la densidad óptica de las fibras dopaminérgicas del estriado.

5.3.1. Cuantificación estereológica de neuronas dopaminérgicas en la SNpc

La cuantificación estereológica de las células TH+ de la SNpc se realizó en los 3 puntos temporales objeto de estudio. Por un lado, se analizaron los resultados mediante un ANOVA de una vía para determinar si la densidad neuronal mostraba diferencias entre los distintos grupos experimentales. Este análisis mostró que, un 1 mes después de la administración del virus, la densidad de neuronas dopaminérgicas (cel/mm³) en el grupo α -sin (5240,85 \pm 354,52) fue menor en comparación con los grupos control (6942,10 \pm 334,87) y sham (6922,90 \pm 658,04). Asimismo, pasados 2 meses, se evidenció una disminución significativa en la densidad del grupo α -sin (4570,44 \pm 325,21) respecto a los grupos control (6373,17 \pm 249,84) y sham (5715,60 \pm 293,04) (p = 0,003 y p = 0,049 respectivamente). Esta misma tendencia se mantuvo a los 4 meses

5. Resultados

postcirugía, al comparar el grupo α -sin ($3730,41 \pm 292,91$) con los grupos control ($5420,10 \pm 576,54$; $p= 0,031$) y sham ($5758,54 \pm 443,72$; $p= 0,008$) (**Fig. 26A**). Estos resultados cuantitativos se pueden observar en las imágenes histológicas representativas de cada grupo experimental (**Fig. 26B**).

Por otro lado, con el fin de examinar si la progresión temporal incide sobre la degeneración de las neuronas de la SNpc, y si esa degeneración difiere entre los distintos grupos experimentales, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal multivariante. Este análisis demostró que el tiempo tiene un efecto significativo sobre la densidad de células TH+ en la SNpc ($p= 0,015835$) (**Fig. 26C**). Concretamente, en el grupo α -sin, se detectó una reducción del 12,79% en la densidad neuronal comparando los dos primeros puntos temporales, y se registró una disminución del 28,82%, 4 meses después de la cirugía. Por otro lado, en el grupo control, se observaron reducciones del 8,19% y del 16,82% a los 2 y 4 meses, respectivamente, al compararlos con los resultados obtenidos en el primer punto temporal estudiado. En cuanto al grupo sham, las disminuciones observadas alcanzaron aproximadamente un 17% tanto a los 2 como a los 4 meses, al compararlos con los resultados del primer mes (**Fig. 26C**). A lo largo del periodo temporal considerado, no se observaron diferencias significativas en la progresión de la densidad de células TH+ entre el grupo α -sin y los grupos control y sham. No obstante, se observó una tendencia hacia una mayor pérdida de reactividad de las células TH-positivas en el grupo α -sin, a pesar de que el tiempo afecta a todos los grupos experimentales.

Posteriormente, analizamos si los cambios previamente descritos en la densidad de las neuronas TH+ de la SNpc podían estar relacionadas con variaciones en el volumen de este núcleo. Para ello, calculamos el volumen de la SNpc mediante el método de Cavalieri en cada uno de los grupos experimentales y en cada punto temporal estudiado. Un mes después de realizar la inyección del virus, los valores de volumen (mm^3) se mantuvieron constantes en los tres grupos experimentales (control= $4,78 \pm 0,12$, sham= $4,81 \pm 0,10$, α -sin= $4,92 \pm 0,08$). Esta misma tendencia se observó 2 meses después de la cirugía, sin variaciones entre los tres grupos experimentales (control= $4,91 \pm 0,27$, sham= $4,81 \pm 0,12$, α -sin= $4,88 \pm 0,27$). Finalmente, 4 meses después de la inyección bilateral del AAV, tampoco se encontraron diferencias significativas, a pesar de que se observó un ligero descenso del volumen ocupado por la SNpc en el grupo α -sin ($4,20 \pm 0,13$) al compararlo con el control ($4,83 \pm 0,25$) y el sham ($4,41 \pm 0,08$). En definitiva, los cambios descritos en la densidad de neuronas dopaminérgicas no están relacionados con cambios en el volumen del área cuantificada (**Fig. 27**).

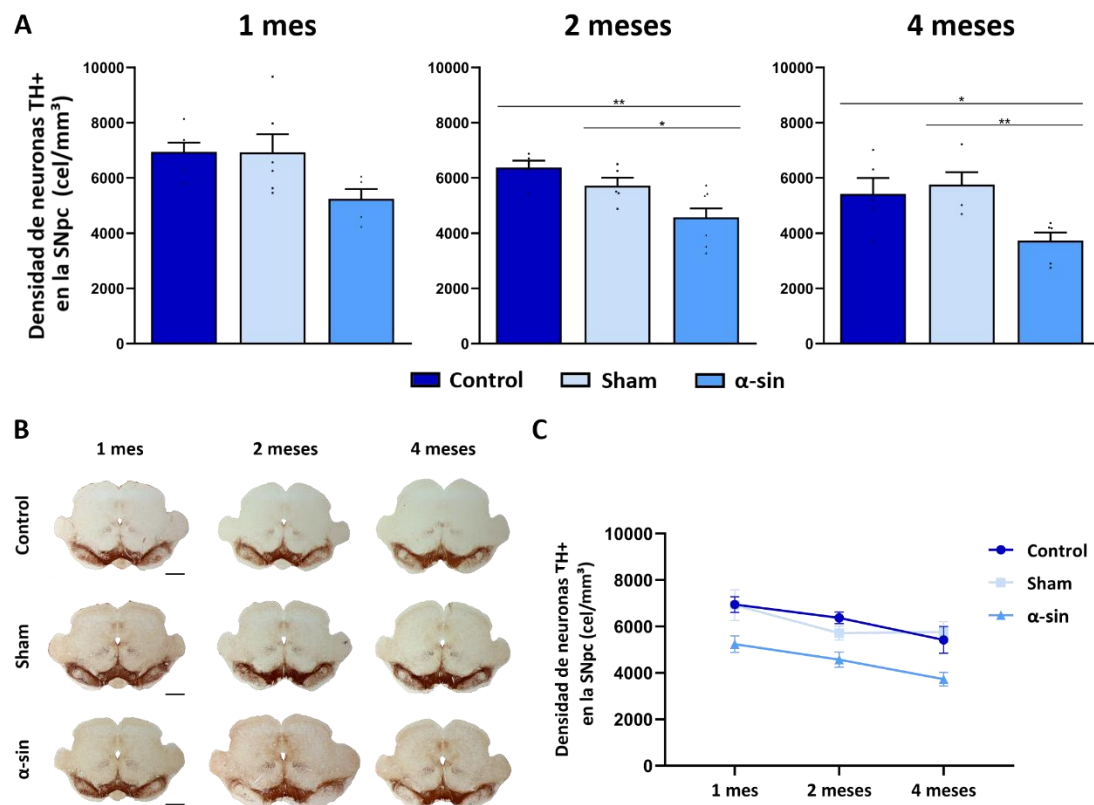


Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de α -sin en la degeneración neuronal de la SNpc. **A)** Cuantificación estereológica de la densidad de células TH+ en la SNpc en los diferentes grupos experimentales 1, 2 y 4 meses después de la inyección del adenovirus. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. Los datos de los 4 meses posteriores a la cirugía se evaluaron utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, adecuada para datos no paramétricos. El resto de los datos fueron sometidos a un análisis mediante un ANOVA de una vía, seguido por la prueba Post Hoc de Tukey. **B)** Inmunohistoquímica para TH en el tronco encefálico de muestras representativas de los grupos control, sham y α -sin, 1, 2 y 4 meses después de la administración del virus. Barra de escala: 1000 μ m. **C)** Análisis temporal mediante regresión lineal multivariante para evaluar la pérdida progresiva de células TH+ en la SNpc. Los datos se presentan como media \pm SEM.

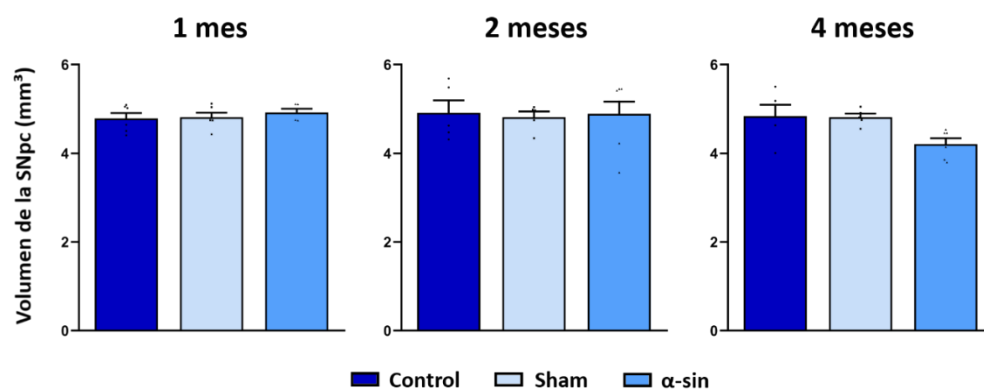


Figura 27. Análisis del volumen de la SNpc. El análisis del volumen ocupado por la SNpc se realizó en los diferentes grupos experimentales 1, 2 y 4 meses después de la cirugía. Los datos se presentan como media \pm SEM. Los datos fueron sometidos a un análisis mediante un ANOVA de una vía, seguido por la prueba de Tukey como Post Hoc.

5.3.2. Análisis de las fibras dopaminérgicas en el estriado

Para profundizar en el estudio sobre el nivel de degeneración obtenido tras la sobreexpresión de α -sin en la vía nigroestriatal, se cuantificó la densidad óptica de las fibras dopaminérgicas en el estriado. Tras realizar un ANOVA de una vía en cada punto temporal, el análisis reveló que, 1 mes después de la inyección del adenovirus, la densidad de fibras era similar en los tres grupos experimentales (control= $80,75 \pm 2,62$, sham= $81,85 \pm 2,72$, y α -sin= $80,94 \pm 3,16$). No obstante, después de 2 meses, se observó una disminución significativa en la densidad de las fibras TH+ en el grupo α -sin ($60,92 \pm 6,78$) en comparación con los grupos control ($83,9403 \pm 2,21266$) y sham ($84,00 \pm 3,48$) ($p= 0,027$ y $p= 0,020$ respectivamente). Esta reducción persistió después de 4 meses en el grupo α -sin ($53,49 \pm 4,51$) (control= $73,78 \pm 3,70$, sham= $78,62 \pm 0,34$) (**Fig. 28A**). La disminución en la densidad óptica de las fibras dopaminérgicas es evidente en las imágenes histológicas representativas de cada grupo experimental, destacando una degeneración pronunciada en el grupo α -sin, 2 y 4 meses después de la cirugía (**Fig. 28B**).

Además de analizar las diferencias entre los grupos experimentales, realizamos una regresión multivariante para así poder determinar el efecto del tiempo sobre las fibras del estriado (**Fig. 28C**). Los resultados mostraron que el tiempo tiene un efecto significativo sobre la densidad óptica del estriado ($p= 2e^{-16}$). Este resultado se acompaña de una reducción de fibras del 24,73% en el grupo α -sin entre los dos primeros puntos temporales analizados. Esta disminución se acentuó ligeramente después de 4 meses, representando una pérdida del 33,90% en comparación con el primer mes. En el grupo control prácticamente no se produjeron variaciones en la densidad óptica a lo largo de los puntos temporales analizados, únicamente se cuantificó una ligera disminución del 8,62% entre el primer y último punto temporal. Por otro lado, en el grupo sham la reducción en la densidad óptica entre los animales de 4 meses y 1 mes no superó el 4%. Tanto es así que el análisis estadístico mostró una progresión estadísticamente diferente entre el grupo α -sin en comparación con el grupo sham ($p= 0,046$). Es decir, el tiempo afecta de manera desigual a estos dos grupos experimentales. En el caso del grupo control, a pesar de que no se encontraron diferencias significativas en la progresión, la tendencia observada es la misma que en el grupo sham (**Fig. 28C**). Por lo tanto, tanto el tiempo como la sobreexpresión de α -sin revelaron cambios significativos en la densidad de las fibras TH-positivas del estriado, a lo largo de los 3 puntos temporales analizados.

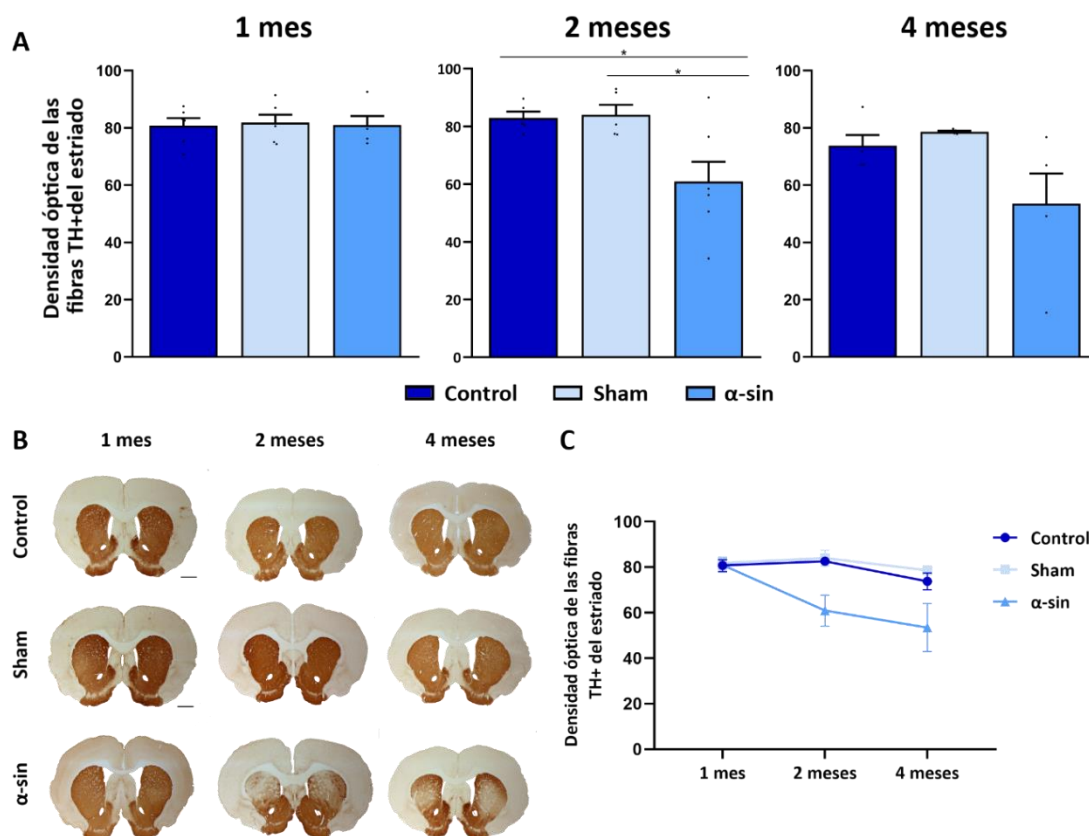


Figura 28. Efecto de la sobreexpresión de α -sin en la degeneración de fibras dopaminérgicas en el estriado. **A)** Cuantificación de la densidad óptica de fibras TH+ en el estriado de los diferentes grupos experimentales 1, 2 y 4 meses después de la inyección del adenovirus. Los datos se presentan como media \pm SEM. Estos datos fueron sometidos a un análisis mediante un ANOVA de una vía, seguido por la prueba de Tukey como Post Hoc. * $p < 0,05$. **B)** Inmunohistoquímica de TH en el estriado de muestras representativas de los grupos control, sham y α -sin, 1, 2 y 4 meses después de la cirugía. Barra de escala: 1000 μ m. **C)** Análisis temporal mediante regresión lineal multivariante para evaluar la pérdida progresiva de fibras TH+ en el estriado. Los datos se presentan como media \pm SEM.

Por otro lado, la presencia de agregados proteicos en los axones (“axonal swelling” en inglés) es uno de los indicadores más recurrentes de la degeneración. Por este motivo se llevó a cabo un análisis de la superficie ocupada por estos agregados en el estriado de los animales del grupo α -sin, con el fin de evaluar el estado degenerativo de cada individuo. Como se aprecia en las imágenes (**Fig. 29A**), la degeneración se intensificó a partir de los 2 meses posteriores a la inyección bilateral del virus, manteniéndose relativamente inalterada hasta los 4 meses. Estos hallazgos se encuentran respaldados por los resultados cuantitativos (**Fig. 29B**), donde se observaron diferencias significativas al comparar el grupo α -sin de 1 mes ($0,17 \pm 0,03$) con los grupos de 2 ($0,60 \pm 0,10$) y 4 meses ($0,55 \pm 0,03$) ($p = 0,017$ y $p < 0,001$ respectivamente).

5. Resultados

En este contexto, se llevó a cabo un análisis de correlación con el objetivo de contrastar la presencia de degeneración axonal con la densidad óptica del estriado (**Fig. 29C**), obteniendo un coeficiente de correlación de Pearson de $-0,690$ con una significancia de $p=0,002$. Esto indica una relación inversa significativa entre ambas variables, es decir, una mayor densidad óptica se relaciona con una menor degeneración axonal y viceversa.

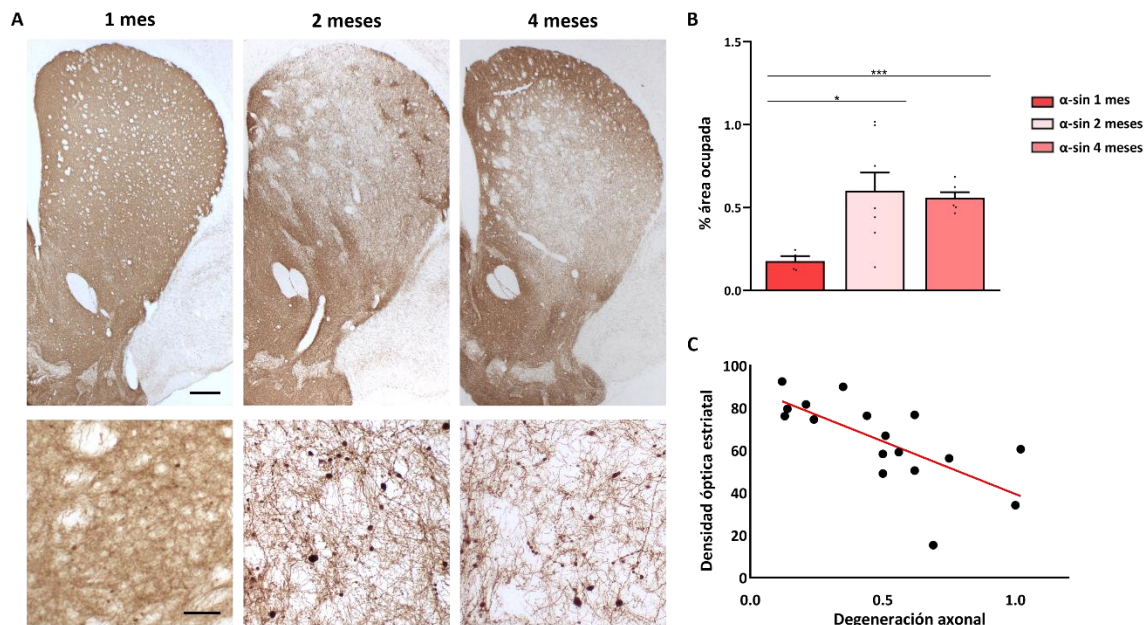


Figura 29. Análisis de la degeneración axonal en el estriado y su relación con la densidad óptica. A) Imágenes representativas del estriado que muestran tanto el patrón de degeneración en este núcleo, como la presencia de agregados proteicos axonales. Barra de escala: 200 μm (objetivo 2x) y 50 μm (objetivo 20x). **B)** Cuantificación del área de superficie ocupada por los agregados axonales en el estriado. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $p<0,05$ y *** $p<0,001$. Todos los datos han sido sometidos a análisis mediante un ANOVA de una vía, seguido por la prueba Post Hoc T2-Tamhane. **C)** Análisis de correlación basado en el coeficiente de Pearson para evaluar la relación entre las variables densidad óptica y degeneración axonal en el estriado.

5.3.3. Cuantificación estereológica de fibras dopaminérgicas en la SNpr

La *substantia nigra pars reticulata* (SNpr) es otro componente esencial de la vía nigroestriatal. Desempeña un papel central al regular la inhibición selectiva de movimientos, mantener el equilibrio en la actividad estriatal y preservar la tonicidad muscular. En el contexto de la enfermedad de Parkinson (EP), la disfunción de la SNpr contribuye a trastornos del movimiento, destacando su importancia en la coordinación precisa de movimientos voluntarios. Es por ello por lo que posteriormente, analizamos la degeneración inducida por la sobreexpresión de α -sin en la SNpr. Tras la cuantificación estereológica de las fibras, los resultados fueron analizados mediante un ANOVA de una vía en cada uno de los puntos temporales.

En la fase inicial, 1 mes después de la inyección del virus, se observó que la densidad ($\mu\text{m}/\text{mm}^3$) de las fibras dopaminérgicas se mantenía prácticamente inalterada en los tres grupos experimentales (control= $34,0 \times 10^5 \pm 1,96 \times 10^5$, sham= $30,9 \times 10^5 \pm 3,08 \times 10^5$, α -sin= $32,2 \times 10^5 \pm 3,72 \times 10^5$) (**Fig. 30A**). A partir del segundo mes, se observó una reducción significativa en la densidad de las fibras dopaminérgicas en el grupo α -sin ($18,8 \times 10^5 \pm 2,86 \times 10^5$) en comparación con los grupos control ($35,1 \times 10^5 \pm 5,156 \times 10^5$) y sham ($23,1 \times 10^5 \pm 4,96 \times 10^5$) ($p= 0,006$ y $p= 0,035$ respectivamente) (**Fig. 30A**). La tendencia observada a los 4 meses postinyección fue similar a la observada a los 2 meses, donde el grupo α -sin ($24,1 \times 10^5 \pm 4,78 \times 10^5$) mostró diferencias significativas respecto al grupo sham ($37,4 \times 10^5 \pm 2,95 \times 10^5$; $p= 0,030$), y una disminución importante respecto al grupo control ($33,7 \times 10^5 \pm 1,53 \times 10^5$) (**Fig. 30A**).

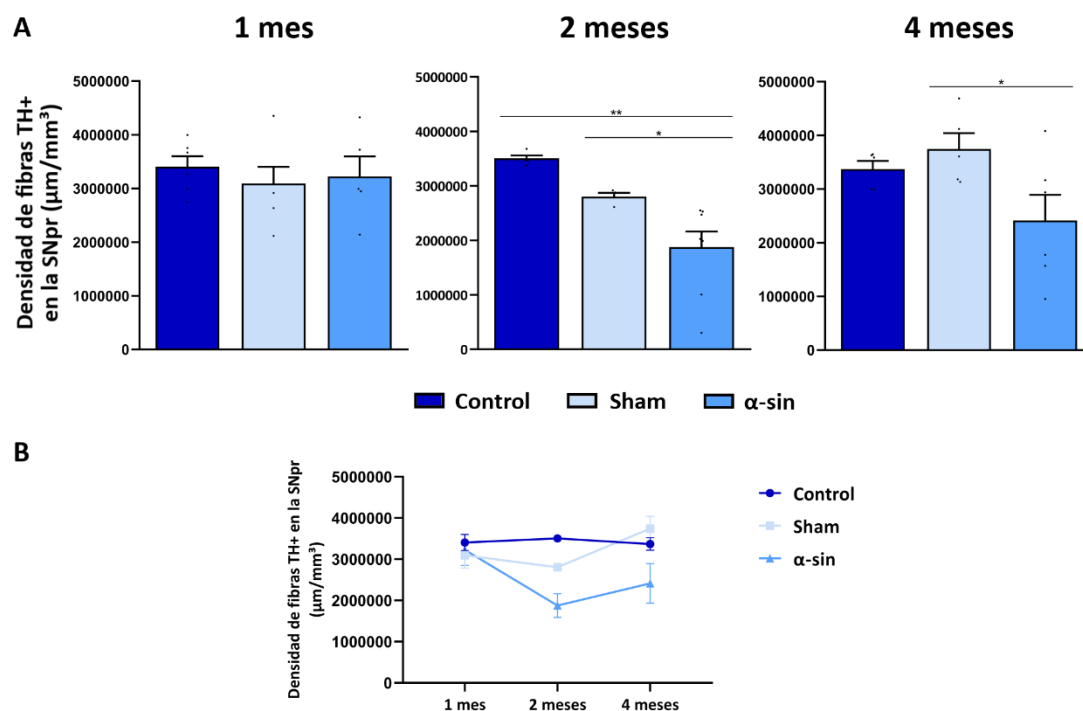


Figura 30. Evaluación de la degeneración dopaminérgica inducida por la sobreexpresión de α -sin en la SNpr. A) Cuantificación estereológica de las fibras TH+ en la SNpr en los diferentes grupos experimentales 1, 2 y 4 meses después de la inyección del virus. Los datos se presentan como media \pm SEM. Los análisis a los 2 y 4 meses después de la cirugía se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Los datos restantes fueron sometidos a un análisis mediante un ANOVA de una vía seguido por la prueba Post Hoc Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. **B)** Análisis temporal mediante regresión lineal multivariante para evaluar la pérdida progresiva de fibras TH+ en la SNpr.

Por otro lado, el efecto del tiempo en la densidad de fibras de la SNpr también se analizó mediante regresión lineal multivariante. Los resultados mostraron un efecto significativo del tiempo ($p= 3,37e^{-12}$). Asimismo, la densidad de fibras TH+ en la SNpr no mostró una progresión

estadísticamente diferente en el grupo α -sin frente a los otros dos grupos experimentales. A pesar de ello, se observó una tendencia hacia una mayor disminución en el grupo α -sin en comparación con el grupo sham ($p=0,076$). Esta tendencia se tradujo en una reducción del 41,80% y 25,18% en la densidad de fibras TH+ en la SNpr del grupo α -sin, a los 2 y 4 meses tras la inyección del virus, respectivamente, en comparación con el punto temporal de 1 mes (**Fig. 30B**). En el grupo control no hubo cambios entre los 3 puntos temporales estudiados, y en el grupo sham, se observó una disminución a los 2 meses postinyección del 25% que se revirtió pasados 4 meses. Por lo tanto, el grupo α -sin muestra una densidad menor en los tiempos analizados y es el grupo experimental más afectado por la variable del tiempo.

5.4. Evaluación cualitativa de la activación glial tras la sobreexpresión de α -sin

Después de concluir el análisis dopaminérgico en la vía nigroestriatal, llevamos a cabo una evaluación cualitativa para determinar si las alteraciones previamente descritas estaban vinculadas a cambios en el patrón inflamatorio. Para ello, realizamos inmunohistoquímicas utilizando los marcadores GFAP e Iba-1, con el fin de detectar posibles cambios en la activación de astrocitos y microglía, respectivamente, en los distintos grupos experimentales y en los tres tiempos analizados.

En la región de la SN, se evidenció un aumento en la expresión de GFAP durante el primer mes en los grupos sham y α -sin, en comparación con el grupo control (**Fig. 31**). Tras transcurrir 2 meses desde la inyección del virus, se produjo una disminución en la positividad de este marcador en el grupo sham, aproximándose a los niveles observados en el grupo control. No obstante, la presencia de astrocitos reactivos en el grupo α -sin se mantuvo similar a los niveles del primer mes. Después de 4 meses, no se identificaron variaciones entre los grupos control y sham, mientras que el grupo α -sin continuó manifestando una activación astrocitaria equiparable a la descrita en los meses anteriores (**Fig. 31**).

En la región estriatal, se evidenciaron variaciones menos pronunciadas en la población astrocitaria. Así, 1 mes después de la intervención, se constató un ligero aumento en la presencia de astrocitos reactivos en el grupo α -sin en comparación con los grupos control y sham. Esta tendencia se mantuvo constante tanto a los 2, como a los 4 meses posteriores a la cirugía. En términos de evolución temporal, no se identificaron cambios significativos (**Fig. 32**).

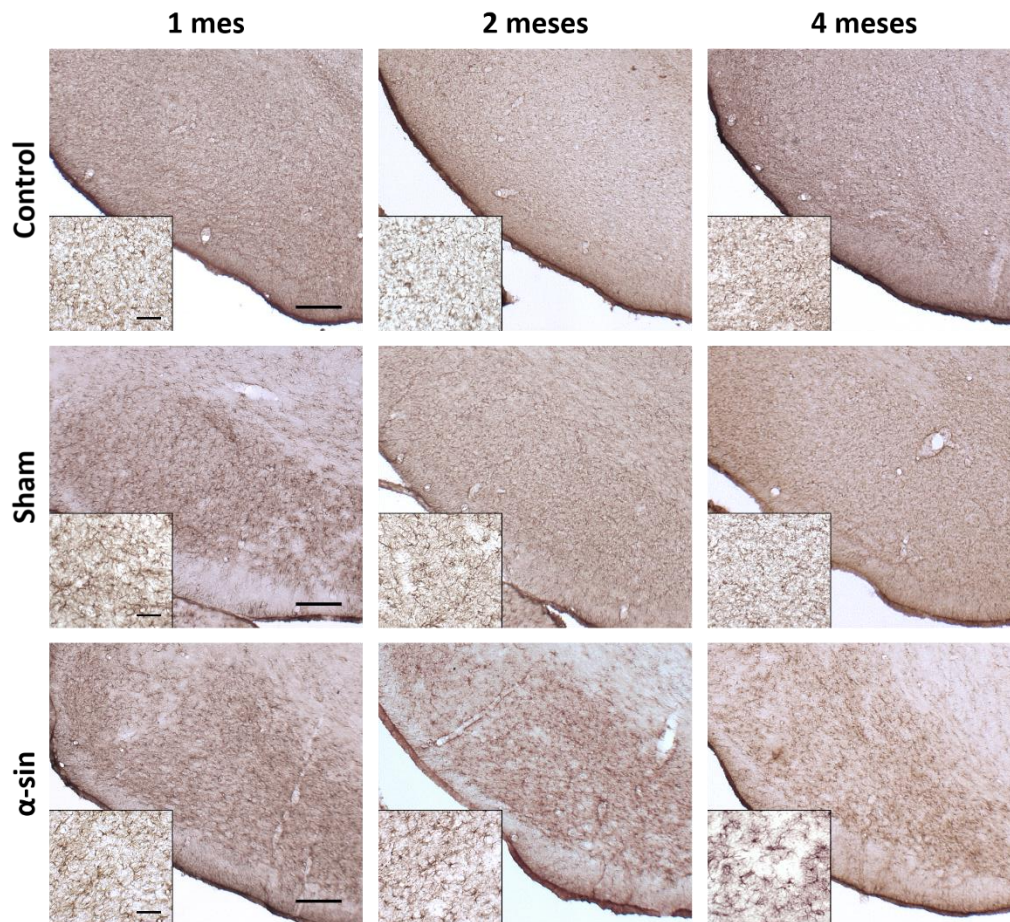


Figura 31. Expresión de astrocitos reactivos en la SN. Imágenes representativas de la SN que muestran la inmunohistoquímica frente a GFAP empleada para detectar la presencia de astrocitos reactivos en los grupos control, sham y α -sin. Barra de escala: 200 μ m (objetivo 4x) y 50 μ m (objetivo 20x).

En relación con la población de microglía, las imágenes de Iba-1 en la SN mostraron una notable proliferación de la microglía en los grupos sometidos a intervención (sham y α -sin) en comparación con el grupo control, 1 mes después de la inyección (**Fig. 33**). Asimismo, la morfología de las células Iba+ difiere entre los grupos intervenidos y el grupo control. Mientras que los primeros muestran una microglía hiperramificada y con el cuerpo celular hinchado, en el grupo control, las células muestran un aspecto más parecido a la microglía en reposo (**Fig. 33**). En cambio, a los 2 meses se observó una disminución en la positividad de Iba-1 en el grupo sham, mostrando un marcaje y una apariencia similar a las células del grupo control (**Fig. 33**). Por el contrario, en el grupo α -sin la positividad frente a Iba-1 continuó siendo muy elevada tanto a 2 como a 4 meses tras la inyección. Además de la proliferación celular, en este caso también se observó una morfología correspondiente a la microglía activada, ya que las células presentaban una ramificación significativamente mayor, acompañada de cuerpos celulares hinchados (**Fig. 33**).

5. Resultados

Por último, 4 meses después de la inyección del vector viral, no se observaron diferencias entre los grupos sham y control (**Fig. 33**).

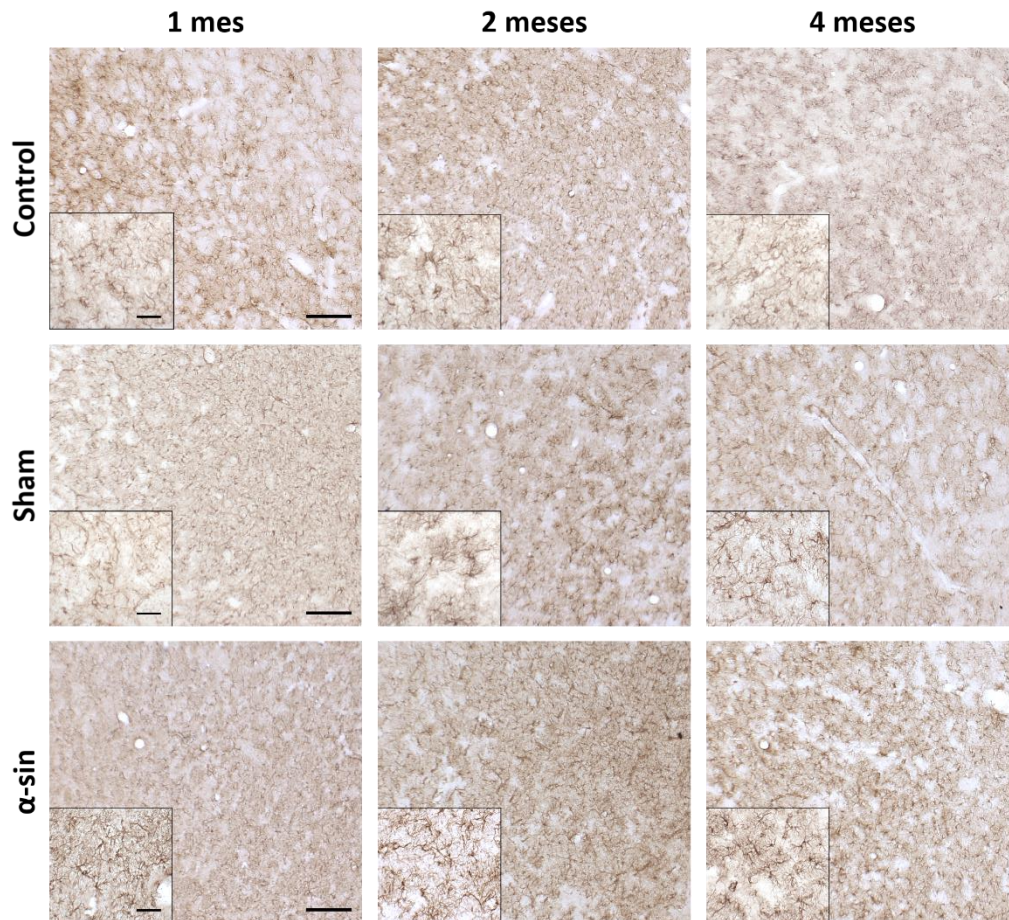


Figura 32. Expresión de astrocitos reactivos en el estriado. Imágenes representativas del estriado que muestran la inmunohistoquímica frente a GFAP empleada para detectar la presencia de astrocitos reactivos en los grupos control, sham y α -sin, a lo largo de la escala temporal. Barra de escala: 200 μ m (objetivo 4x) y 50 μ m (objetivo 20x).

En el estriado, se observó una tendencia análoga a la previamente descrita en la SN, 1 mes después de la intervención quirúrgica, se manifestó un aumento en la expresión de microglía en los grupos sham y α -sin, en comparación con el grupo control (**Fig. 34**). Después de 2 meses, la población microglial en el grupo sham experimentó una disminución, mientras que, en el grupo α -sin, se mantuvo a niveles similares a los observados durante el primer mes (**Fig. 34**). Cuatro meses postinyección, no se encontraron diferencias entre los grupos control y sham, mientras que el grupo α -sin presentó una mayor proliferación (**Fig. 34**). Por otro lado, la morfología de las células Iba+ en los animales control indica que la microglía está en reposo, mientras que en el grupo α -sin, las células presentan un número significativamente mayor de ramificaciones en todos los puntos temporales analizados. A su vez, las imágenes muestran que en el grupo sham, 1 mes

después de la inyección, la microglía está activada, pero en los siguientes puntos temporales recupera la morfología de la microglía en reposo (**Fig. 34**).

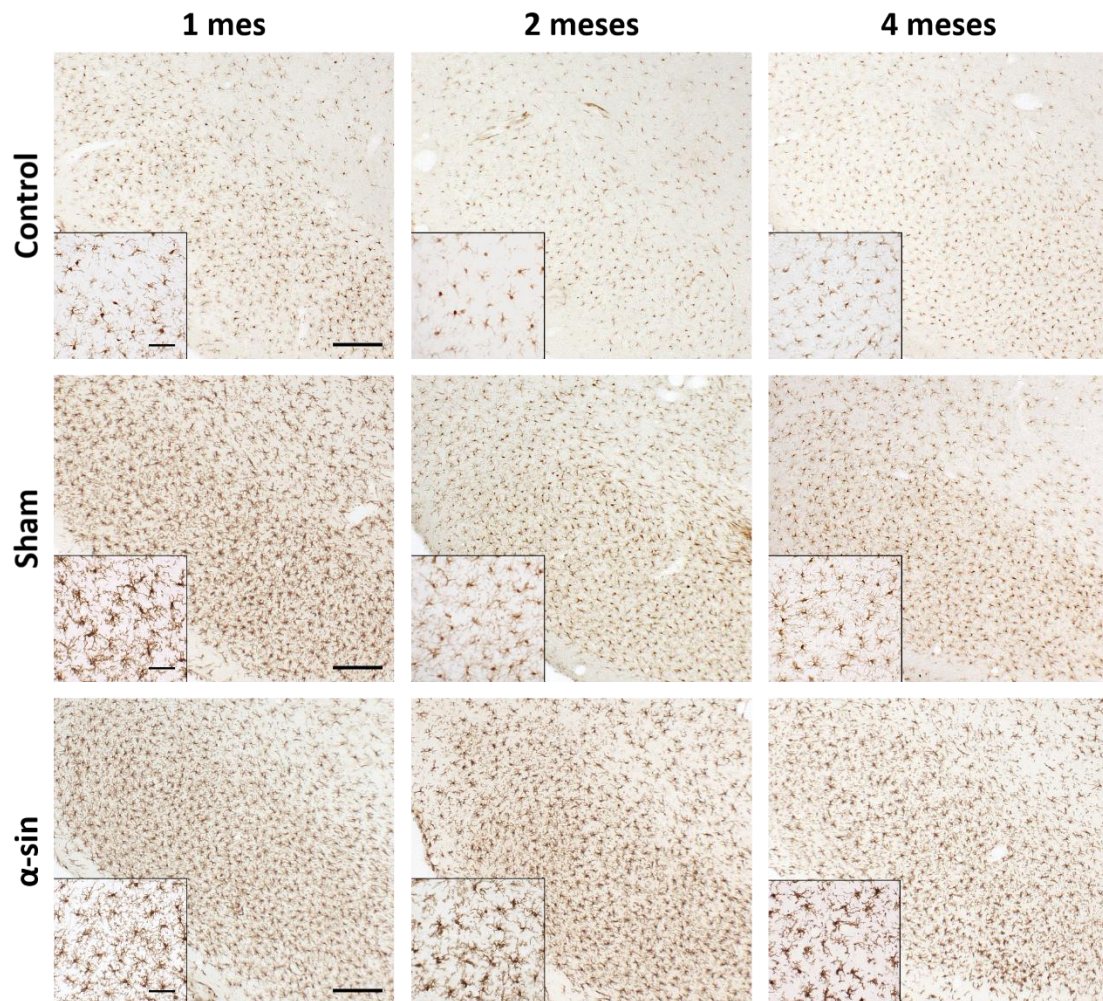


Figura 33. Cambios en la población microglial en la SN. Imágenes representativas de la SN que muestran los resultados de la inmunohistoquímica frente a Iba-1 empleada para identificar los cambios en la población microglial en los grupos control, sham y α -sin, en los tres puntos temporales analizados. Barra de escala: 200 μ m (objetivo 4x) y 50 μ m (objetivo 20x).

En resumen, los resultados del primer bloque muestran, por un lado, que el AAV infecta de forma específica las neuronas dopaminérgicas de la SN dando lugar a la sobreexpresión de la α -sin. Además, se confirma la capacidad de este modelo de generar la fosforilación de esta proteína en el residuo S129, siendo uno de los cambios postransduccionales más comunes de los agregados de α -sin. Por otro lado, el análisis de la degeneración de la vía nigroestriatal evidencia una pérdida de neuronas y fibras TH+ en la SNpc y en el estriado respectivamente, acompañados de una activación glial y de una afectación motora en el test de campo abierto.

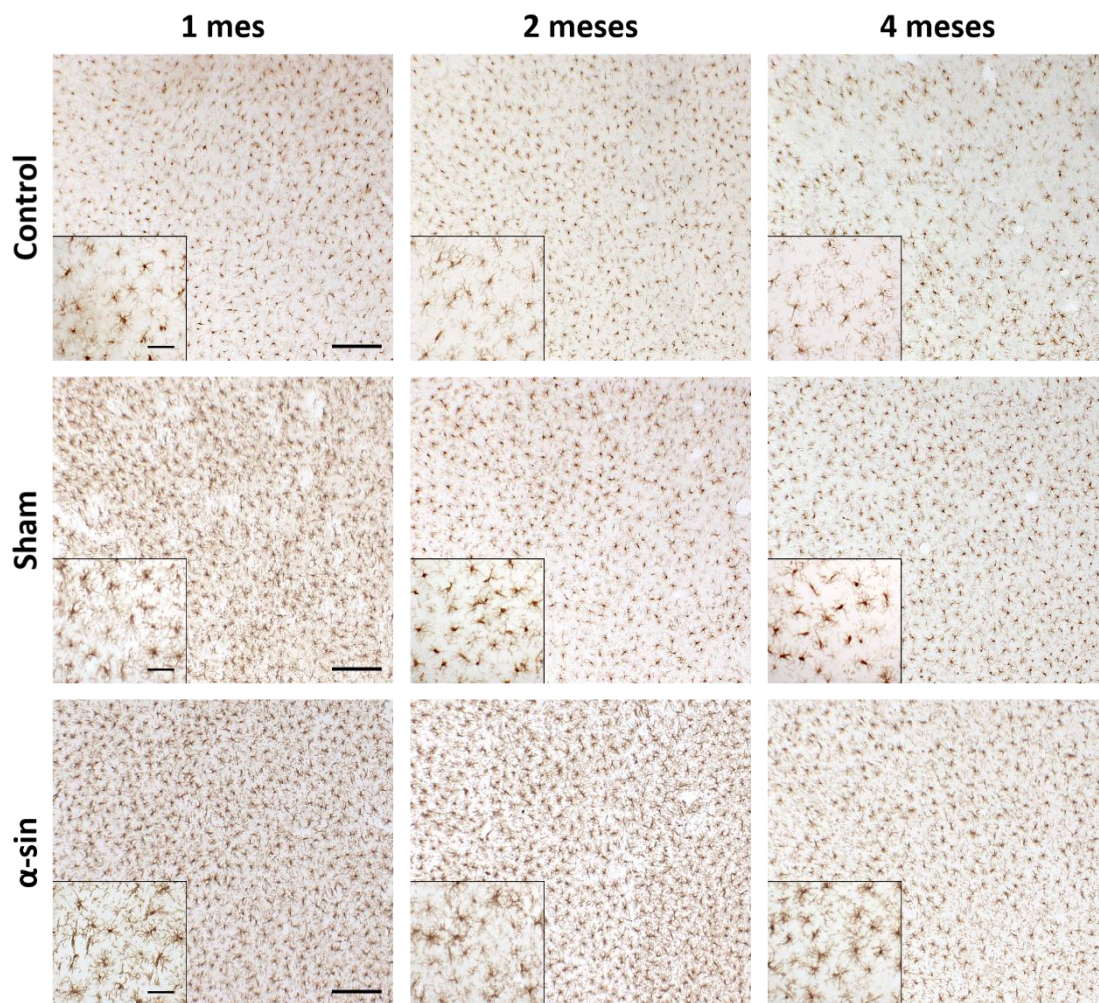


Figura 34. Cambios en la población microglial en el estriado. Imágenes representativas del estriado que muestran los resultados de la inmunohistoquímica frente a Iba-1 empleada para identificar la población microglial en los grupos control, sham y α -sin, en todos los puntos temporales analizados. Barra de escala: 200 μ m (objetivo 4x) y 50 μ m (objetivo 20x).

BLOQUE II: Efecto del entorno enriquecido sobre la degeneración de la vía nigroestriatal inducido por la sobreexpresión de α -sin

Después de validar este modelo experimental de la enfermedad de Parkinson basado en la sobreexpresión de α -sin, inducida mediante la inyección bilateral de rAAV9, el siguiente paso fue estudiar el potencial efecto neurorescatador que la cría en un entorno enriquecido (EE) podía tener en este modelo animal.

En el segundo bloque de resultados se analiza el efecto neuroprotector del EE en animales sacrificados 2 meses después de la sobreexpresión de α -sin. Concretamente, se comparan los animales criados en condiciones estándar (CE) (los resultados de estos grupos experimentales se muestran en el Bloque I de resultados y en el Apéndice 1) con sus homólogos de la misma edad criados en EE. La decisión de seleccionar animales de esta edad se basó en los resultados obtenidos en el primer bloque, y es que se trata del punto temporal donde, además de observar alteraciones motoras, se describió una degeneración dopaminérgica marcada, aunque no correspondía con la mayor muerte neuronal registrada. De esta manera, se estudió la capacidad del entorno enriquecido para proteger a las neuronas en proceso de degeneración y ralentizar así, la progresión de la sintomatología descrita.

5.5. Efecto del entorno enriquecido sobre la actividad motora

Con el propósito de analizar las alteraciones motoras producidas por la sobreexpresión de α -sin en los distintos grupos experimentales, así como para investigar el impacto neurorescatador del EE, se realizó la Prueba de Campo Abierto (OF).

Tras analizar los resultados obtenidos mediante ANOVA de tres factores, se observó que el tipo de cría tuvo un efecto significativo en la actividad global ($p= 0,007$). Los animales criados en EE experimentaron una disminución del 21,77% en la actividad global en comparación con los criados en CE. En cambio, la intervención quirúrgica no mostró un efecto significativo ($p= 0,349$). En cuanto a la sobreexpresión de α -sin, se observó una tendencia hacia la reducción del 13,9% de la actividad global entre el grupo α -sin y los grupos control y sham ($p= 0,076$). Esta tendencia se observó en ambas condiciones de cría, pero fue mayor en animales criados en CE, ya que en EE, los valores de actividad global revelaron que el grupo α -sin exhibía una actividad inferior ($1334,25 \pm 309,44$) en comparación con el grupo control ($1558,91 \pm 456,53$) pero no con el grupo sham ($1339,25 \pm 613,32$) (**Fig. 35A**). Por otro lado, el entorno de cría no mostró interacciones

5. Resultados

significativas ni con la sobreexpresión de α -sin ($p= 0,082$), ni con la cirugía ($p= 0,574$). Esto indica que el entorno produjo un efecto similar en todos los grupos experimentales, independientemente de si en ellos se sobreexpresó α -sin o si fueron sometidos a intervención quirúrgica (**Fig. 35A**).

El análisis de la locomoción mostró una tendencia similar, con un impacto significativo del entorno de cría ($p= 0,018$). Los animales criados en CE mostraron un índice locomotor un 20% superior en comparación con los criados en EE. Asimismo, se evidenció una tendencia a la disminución del 14% en la locomoción de los animales con sobreexpresión de α -sin, al ser comparados con los de los grupos control y sham ($p= 0,073$). En condiciones de EE, los grupos control ($1438,58 \pm 123,28$) y sham ($1233,42 \pm 166,06$) exhibieron una locomoción ligeramente superior al grupo α -sin ($1221,73 \pm 84,08$), tendencia que se mantuvo en los grupos criados en CE (**Fig. 35B**). El factor de la cirugía tampoco tuvo un impacto significativo en la locomoción de los animales ($p= 0,302$) (**Fig. 35B**). En cuanto a las interacciones entre factores, no se encontraron interacciones significativas entre el entorno y la cirugía ($p= 0,6$), ni entre el entorno y la sobreexpresión de α -sin ($p= 0,089$).

En relación con la distancia recorrida (cm), el entorno también resultó tener un efecto significativo ($p < 0,001$). De manera consistente con los parámetros previamente analizados, se observó que los animales criados en CE recorrían una distancia un 40% superior en comparación con los criados en EE. En este caso, la intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -sin no tuvieron un efecto significativo en la distancia recorrida ($p= 0,206$ y $p= 0,067$, respectivamente) (**Fig. 35C**). A pesar de ello, como se ha descrito en el Bloque I, en CE, el grupo α -sin mostró una distancia recorrida inferior en comparación con los grupos control y sham. Por el contrario, en los animales criados en EE, la distancia recorrida por los grupos sham ($2486,01 \pm 342,50$) y α -sin ($2517,04 \pm 199,29$) no mostró diferencias con la distancia recorrida por el grupo control ($3018,17 \pm 270,17$) (**Fig. 35C**). Por último, el entorno de cría no presentó interacciones significativas con la cirugía ($p= 0,977$). Sin embargo, a pesar de que la interacción con la sobreexpresión de α -sin no alcanzó un efecto estadísticamente significativo ($p= 0,057$), se observó una tendencia a la reducción de la distancia recorrida en 1060,29 cm en los animales con sobreexpresión de α -sin criados en EE, en comparación con los criados en CE (**Fig. 35C**).

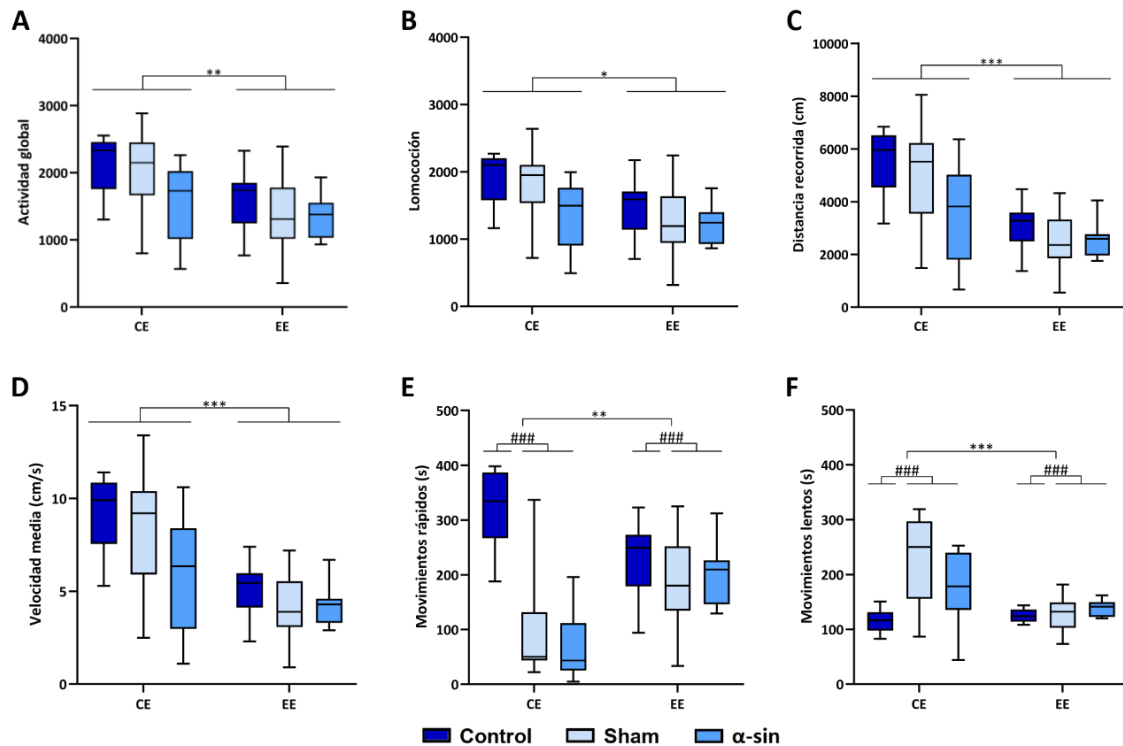


Figura 35. Análisis del efecto de la cría en entorno enriquecido en las variables motoras analizadas en los distintos grupos experimentales mediante el test de Campo Abierto. La detección de la actividad fue completamente automatizada mediante un software diseñado a medida, Actitrack (Panlab, España). El análisis de **A**) la actividad global, **B**) la locomoción, **C**) la distancia recorrida (cm), **D**) la velocidad media (cm/s), **E**) los movimientos rápidos (s) y **F**) los movimientos lentos (s) se realizó mediante un ANOVA de tres factores para evaluar las diferencias en la media de los seis grupos experimentales, considerando como variables independientes el entorno de cría, la intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -sin. Este análisis permitió evaluar tanto los efectos individuales de cada factor, como sus interacciones. Los datos se representan en Boxplots: mediana + rango intercuartílico. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ para las diferencias entre entornos, ### $p < 0,001$ para las diferencias entre los grupos operados (sham y α -sin) y control. CE: condiciones estándar, EE: entorno enriquecido.

Los resultados de la velocidad media (cm/s) también mostraron un efecto significativo del entorno de cría ($p < 0,001$), de forma que los animales criados en CE presentaron una velocidad media un 39,5% superior en comparación con los de EE, independientemente de si habían sido sometidos a cirugía o presentaban sobreexpresión de α -sin. En CE, el grupo α -sin exhibió una velocidad media inferior respecto a los grupos control y sham. Por otro lado, los animales control criados en EE ($5,01 \pm 0,44$) mostraron una velocidad media superior a los grupos sham ($4,14 \pm 0,57$) y α -sin ($4,2 \pm 0,32$) (**Fig. 35D**). La intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -sin no produjeron efectos significativos en la velocidad media de los animales ($p = 0,213$ y $p = 0,068$, respectivamente) (**Fig. 35D**). En cuanto a las interacciones halladas entre los factores analizados, la velocidad media no presentó interacción con la cirugía ($p = 0,976$). No obstante, a pesar de que la interacción con la sobreexpresión de α -sin tampoco alcanzó significancia ($p = 0,056$), se

5. Resultados

evidenció una tendencia a la reducción en la velocidad media de 1,763 cm/s en los animales del grupo α -sin criados en EE, en comparación con los criados en CE (**Fig. 35D**).

Al analizar los movimientos rápidos (s), se observó que ni el tipo de entorno, ni la sobreexpresión de α -sin produjeron efectos significativos en estos movimientos ($p= 0,680$ y $p= 0,462$, respectivamente) (**Fig. 35E**). Sin embargo, la cirugía mostró un efecto significativo sobre la capacidad de realizar movimientos rápidos ($p= 0,000$). La lesión produjo un impacto negativo en esta variable, indicando que los grupos experimentales sometidos a intervención, es decir, sham y α -sin, presentaban una disminución del 33,2% en los movimientos rápidos en comparación con los no intervenidos quirúrgicamente, es decir, el grupo control. En CE, el grupo control ($320,90 \pm 22,89$) mostró una velocidad mayor en los movimientos rápidos en comparación con los grupos sham ($124,12 \pm 33,85$) y α -sin ($68,0 \pm 13,56$) (**Fig. 35E**). Esta misma tendencia se mantuvo en condiciones de EE, donde los animales del grupo control ($224,03 \pm 20,52$) se movieron ligeramente más rápido que los del grupo sham ($187,38 \pm 26,81$) y α -sin ($196,94 \pm 16,36$) (**Fig. 35E**). Además, la cirugía presentó una interacción significativa con el tipo de entorno ($p= 0,002$), lo que indicó que el tipo de cría afectó de forma diferente a los movimientos rápidos de los animales sometidos a cirugía. Concretamente, la cría en EE fue capaz de revertir parcialmente algunos de los efectos producidos por la lesión, observándose una mejora en 90,49 s en comparación con la cría en CE en los animales operados (**Fig. 35E**).

Finalmente, en lo que respecta a los movimientos lentos (s), al igual que en el caso anterior, ni la sobreexpresión de α -sin, ni las condiciones de cría presentaron efectos significativos ($p= 0,325$ y $p= 0,185$, respectivamente). Sin embargo, la cirugía sí mostró un efecto significativo ($p < 0,001$). Los grupos lesionados (sham y α -sin) mostraron un incremento del 33,2% en los movimientos lentos sobre el grupo control en ambas condiciones de cría. Así, en CE, el grupo control ($115,56 \pm 6,67$) realizó menos movimientos lentos en comparación con los grupos sham ($225,30 \pm 20,80$) y α -sin ($189,25 \pm 16,44$) (**Fig. 35F**). En EE, el grupo α -sin ($138,43 \pm 4,17$) se movió ligeramente más lento que los grupos control ($125,16 \pm 3,33$) y sham ($128,13 \pm 9,03$) (**Fig. 35F**). Además, se observó una interacción significativa entre la cirugía y el entorno ($p < 0,001$), lo que indicó que, al igual que ocurría con los movimientos rápidos, el tipo de cría tuvo una influencia distinta sobre los movimientos lentos de los grupos sometidos a cirugía. En este sentido, el EE produjo una disminución de 73,058 s en los movimientos lentos de los animales lesionados y criados en este entorno (**Fig. 35F**).

En conjunto, los resultados de la prueba de Campo Abierto, indican que los animales criados bajo condiciones estándar (CE) mostraron un comportamiento exploratorio más alto que aquellos criados en enriquecimiento ambiental (EE). Este resultado también se observó en los mapas de calor (Fig. 36) donde se representa la prevalencia de un animal en un punto específico de la arena. Además, en ambas condiciones de cría, el grupo control tuvo una actividad exploratoria más elevada que el resto de los grupos (Fig. 36).

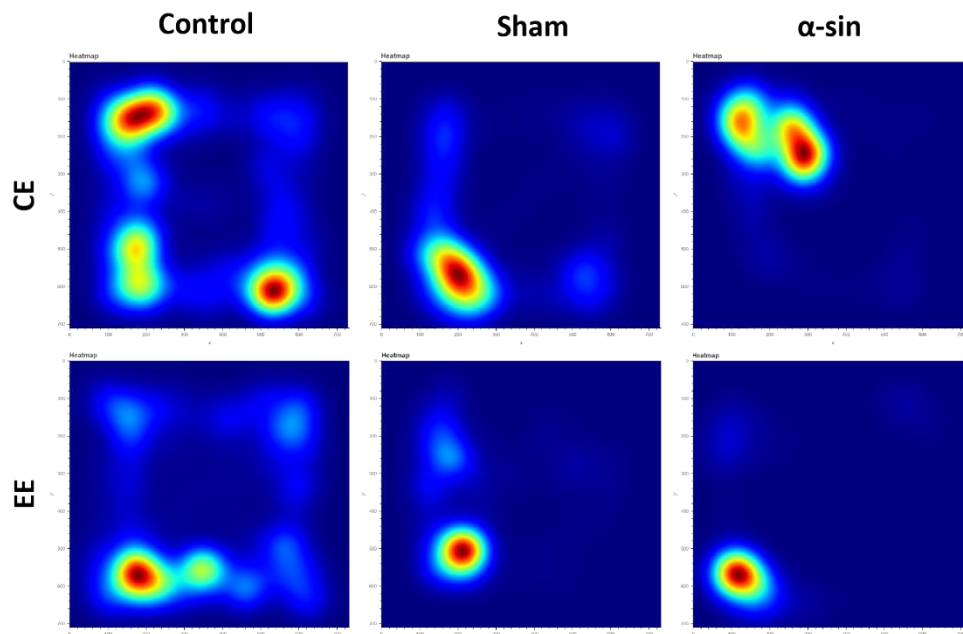


Figura 36. Análisis representativo de mapas de calor del comportamiento exploratorio en el test de Campo Abierto durante 10 minutos. Las gráficas muestran que los animales criados bajo condiciones estándar (CE) exhiben un comportamiento exploratorio superior en comparación con aquellos criados en enriquecimiento ambiental (EE). El color azul oscuro implica falta de movimiento. La transición de colores, pasando por azul claro, verde, amarillo, naranja y rojo, refleja un aumento en la actividad de estos animales en el área (los colores más cálidos indican mayor permanencia en un área específica).

Además de las variables motoras ya descritas, la prueba de Campo Abierto también se empleó para evaluar el nivel de ansiedad de los animales. La medición de este parámetro se basa en la distancia relativa (cm) recorrida en el centro de la arena, donde una mayor distancia se asocia con un menor nivel de estrés y viceversa. Este análisis reveló un efecto significativo del tipo de estabulación ($p= 0,007$), indicando que los animales criados en CE transcurrían un 40% más de tiempo en el centro de la arena y, por lo tanto, presentaban niveles de estrés más bajos, que los criados en EE. Concretamente, en condiciones CE, los grupos α -sin ($29,33 \pm 4,46$) y sham ($32,60 \pm 4,63$) exhibieron un mayor porcentaje de distancia recorrida en el centro, en comparación con el grupo control ($22,82 \pm 3,00$). Sin embargo, en condiciones de EE, esta tendencia se invirtió, ya que

5. Resultados

el grupo α -sin ($12,37 \pm 2,89$) permaneció un menor porcentaje de tiempo en el centro, seguido por el grupo sham ($14,52 \pm 2,77\%$) y el grupo control ($18,96 \pm 2,97\%$) (**Fig. 37**).

Aunque no se observó una interacción significativa entre el tipo de entorno y la cirugía ($p=0,059$), los resultados indicaron que los animales operados y criados en CE pasaron casi un 17,5% más de tiempo en el centro de la arena, en comparación con los de EE. Esta diferencia fue menos pronunciada en los animales sin operar, donde los controles criados en CE estuvieron sólo un 3,29% más de tiempo en el centro que sus homólogos criados en EE (**Fig. 37**).

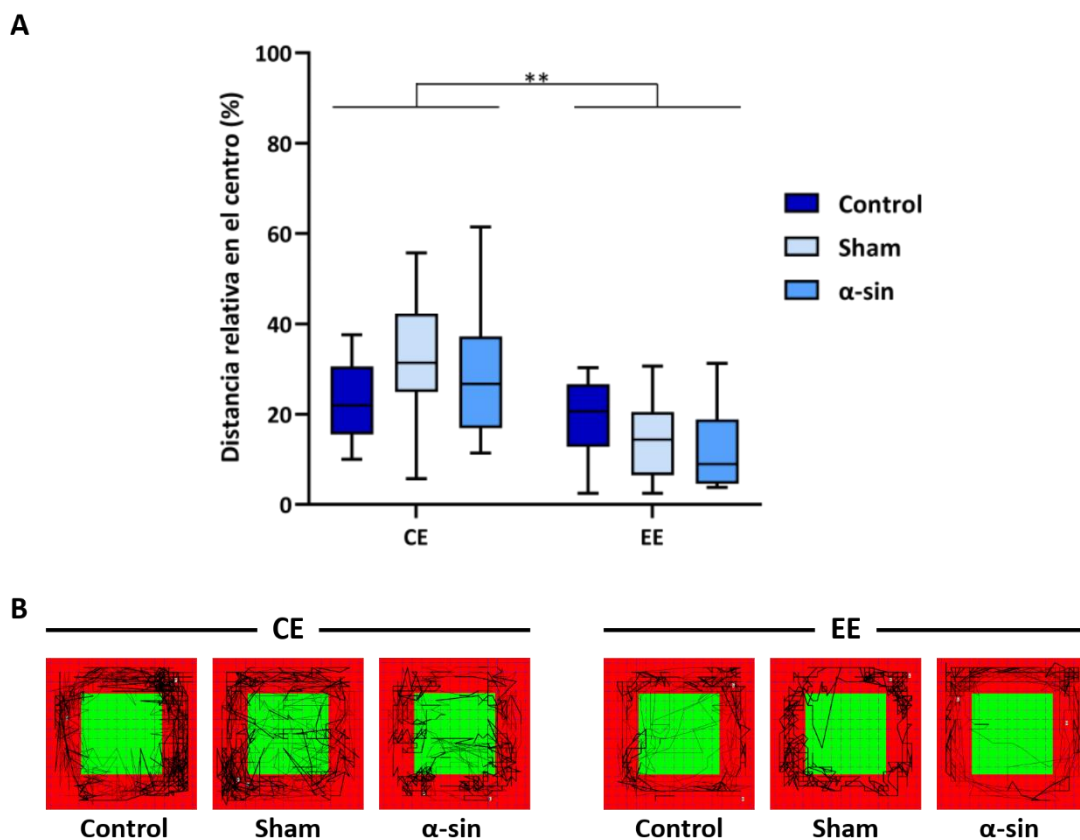


Figura 37. Estudio de la ansiedad en función de las condiciones de cría. A) El análisis del porcentaje de la distancia recorrida en el centro de la arena vs en la periferia fue calculado como el porcentaje de la distancia recorrida en el centro versus en la periferia. Este análisis se realizó mediante un ANOVA de tres factores para evaluar las diferencias en la media de los seis grupos experimentales, considerando como variables independientes el entorno de cría, la intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -sin. Este análisis permitió evaluar tanto los efectos individuales de cada factor, como sus interacciones. Los datos se representan en Boxplots: mediana + rango intercuartílico. ****** $p < 0,01$ para las diferencias entre entornos. **B)** Imágenes representativas de los registros de la actividad locomotora en Actitrack en los distintos grupos experimentales criados en CE y EE respectivamente. CE: condiciones estándar, EE: entorno enriquecido.

5.6. Análisis de la sobreexpresión de α -sinucleína en la vía nigroestriatal tras la cría en EE

5.6.1. Análisis de la sobreexpresión de α -sin y su colocalización con tirosina hidroxilasa en la SNpc

Tras analizar la actividad motora de los animales, el siguiente paso fue comparar la sobreexpresión de α -sin en los animales criados en CE y en EE.

Por un lado, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia frente a α -sin (marcada en rojo) en secciones coronales seriadas del cerebro, para estudiar su capacidad de difusión (**Fig. 38**). Las imágenes muestran que la sobreexpresión de α -sin se extiende desde la zona de inyección (SNpc) hacia el estriado (**Fig. 38A-C**), así como a regiones del tronco del encéfalo como el colículo superior, el cuerpo geniculado medial del tálamo o la corteza cerebral, en animales criados en CE y EE (**Fig. 38D-F**). En CE, la expresión de α -sin es similar tanto en la zona de inyección del virus, como en las zonas de proyección directas de la SN (**Fig. 38B-C**). En cambio, en condiciones de EE, la positividad de α -sin es menor en el tronco del encéfalo (**Fig. 38B-D**), en el tálamo (**Fig. 38E**) o en la corteza cerebral (**Fig. 38F**) respecto al grupo criado en CE.

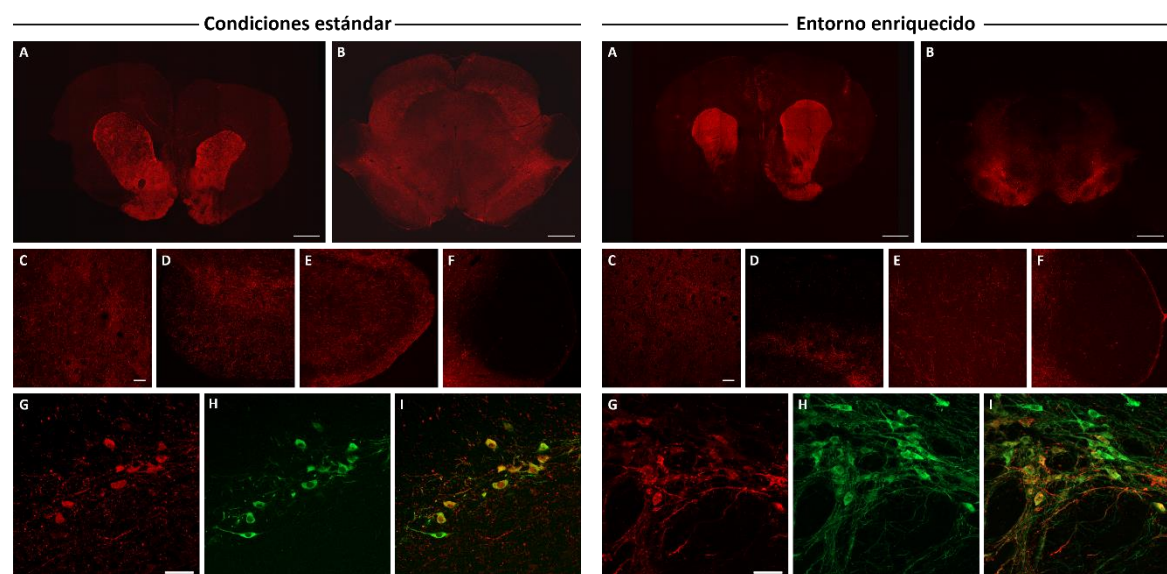


Figura 38. Imágenes representativas de α -sin (rojo) en diversas áreas cerebrales. **A)** estriado, **B)** tronco encefálico, **C)** estriado, **D)** colículo superior, **E)** corteza cerebral, **F)** núcleo geniculado medial. Las imágenes **G, H, I** corresponden a células dopaminérgicas de la SNpc positivas para α -sin (rojo), TH (verde) y su coexpresión (amarillo). Barra de escala: 1000 μ m (A, B), 100 μ m (C, D, E, F), 50 μ m (G, H, I).

5. Resultados

Por otro lado, para determinar la coexpresión de la α -sin en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, se llevó a cabo un doble marcaje frente a α -sin y TH (**Fig. 38G-I**). A pesar de que esta coexpresión se manifestó en ambas condiciones de estabulación, se observó una ligera diferencia en la colocalización, siendo menor en los animales criados en EE.

5.6.2. Análisis de la expresión de la α -sin fosforilada en la SNpc

Además de determinar la sobreexpresión de α -sin, se estudiaron los posibles cambios en la expresión de α -sin fosforilada (p- α -sin) en ambas condiciones de cría. Las imágenes de la doble inmunofluorescencia frente a p- α -sin y TH mostraron que, al igual que en CE, la p- α -sin permanecía en el sitio de inyección (SN) (**Fig. 39**) y no se difundía a otras áreas cerebrales (resultados no mostrados) en los animales criados en condiciones de EE.

En cuanto al patrón de expresión, se detectó una mayor expresión de p- α -sin en los animales criados en condiciones CE (**Fig. 39A, D, G**). Asimismo, las figuras muestran colocalización de p- α -sin con las células TH+ en ambas condiciones de cría (**Fig. 39C, F, I**).

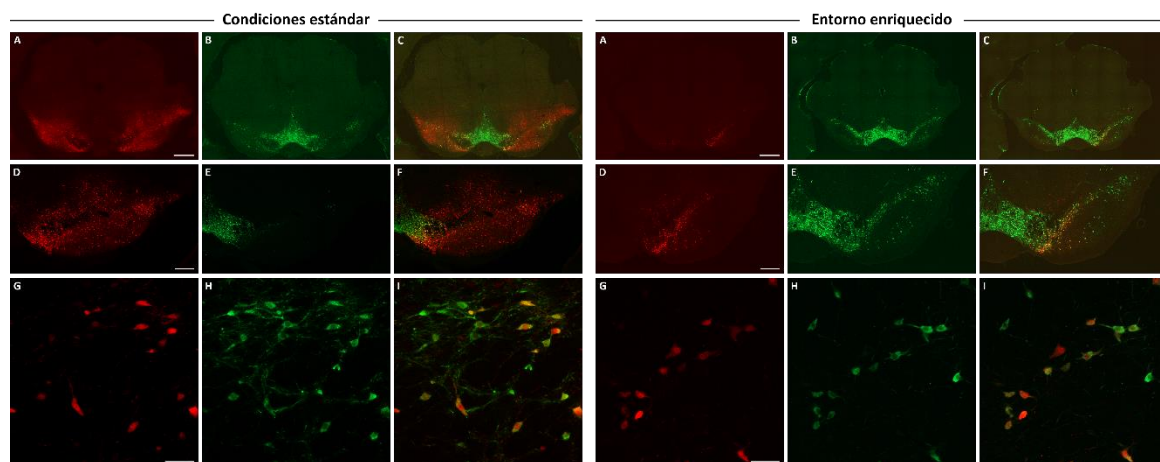


Figura 39. Imágenes representativas de la coexpresión de p- α -sin en la *substantia nigra* de animales criados en condiciones estándar y entorno enriquecido. Se muestra marcaje positivo para α -sin (rojo), tirosina hidroxilasa (verde) y su coexpresión (amarillo) en neuronas dopaminérgicas del tronco del encéfalo (**A, B, C**), SN (**D, E, F**) y SNpc (**G, H, I**) de animales que sobreexpresan α -sin. Barra de escala: 1000 μ m (**A, B, C**), 500 μ m (**D, E, F**), 50 μ m (**G, H, I**).

5.7. Efecto del entorno enriquecido sobre la degeneración dopaminérgica de la vía nigroestriatal

Para analizar los cambios en la degeneración de la vía nigroestriatal tras la sobreexpresión de α -sin en animales criados en EE, se evaluó la inmunorreactividad de la TH, tanto en la SN como en el estriado. Por un lado, se cuantificó, mediante estereología, la densidad de neuronas y fibras TH-positivas en la SNpc y la SNpr respectivamente. Por otro lado, se cuantificó la densidad óptica de las fibras dopaminérgicas en el estriado, analizando la presencia de degeneración axonal en los diferentes grupos experimentales, criados en CE y en EE.

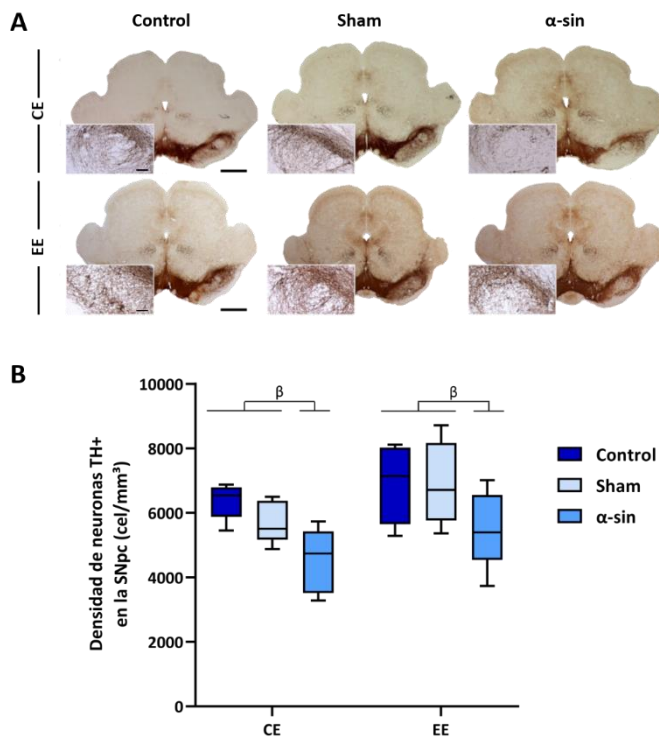
5.7.1. Cuantificación estereológica de neuronas dopaminérgicas en la SNpc

Con el propósito de investigar si el EE era capaz de mitigar los efectos degenerativos derivados de la sobreexpresión de α -sin en la SNpc, se llevó a cabo la inmunohistoquímica frente a TH en los distintos grupos experimentales. Las diferencias observadas en las imágenes histológicas representativas de cada grupo experimental (**Fig. 40A**) se cuantificaron mediante estereología para después ser analizadas mediante un ANOVA de tres factores (**Fig. 40B**).

El análisis de los resultados estereológicos, reveló un impacto significativo de la sobreexpresión de α -sin en la densidad celular (cel/mm³) de la SNpc ($p=0,004$). En particular, los animales con sobreexpresión de α -sin experimentaron una reducción de 1289,67 cel/mm³, en comparación con los grupos control y sham (**Fig. 40B**). En los animales criados en EE se observó una disminución en el grupo α -sin ($5460,28 \pm 481,33$), en comparación con los grupos sham ($6894,48 \pm 543,75$) y control ($6905,84 \pm 476,27$). Asimismo, la disminución de la densidad de los animales α -sin, respecto a los grupos sham y control, fue muy similar en los animales criados en CE. Por otro lado, no se encontró un efecto significativo de la cirugía sobre la densidad de células TH+ en este núcleo ($p=0,452$), ya que los animales operados mostraron valores similares a los no operados, con una disminución de 334,466 cel/mm³ en los operados (**Fig. 40B**). Por último, aunque el factor del entorno no alcanzó significancia estadística ($p=0,097$), se observó una tendencia hacia una mayor conservación celular ($711,256 \text{ cel/mm}^3$) en los animales criados en EE, en comparación con los criados en CE (**Fig. 40B**).

En cuanto a la relación entre los factores analizados, no se halló una interacción significativa entre los mismos ($p=0,731$ para la interacción entre entorno y sobreexpresión de α -sin; $p=0,467$ para la interacción entre entorno y cirugía), de forma que los efectos producidos por las variables fueron independientes entre sí.

5. Resultados



A continuación, para responder a la pregunta de si las variaciones de la densidad neuronal de la SNpc estaban relacionadas con cambios en el volumen de este núcleo en los distintos grupos experimentales, se analizó el volumen de la SNpc, calculado mediante el principio de Cavalieri (**Fig. 41**). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un ANOVA de tres vías, y los resultados mostraron que ni la cirugía ($p= 0,673$), ni la sobreexpresión de α -sin ($p= 0,755$), ni el tipo de entorno ($p= 0,858$) produjeron un efecto significativo sobre el volumen de la SNpc. De hecho, el valor del volumen se mantuvo relativamente constante en ambos entornos de cría (CE: control= $4,91 \pm 0,27$, sham= $4,81 \pm 0,12$, α -sin= $4,88 \pm 0,27$; EE: control= $4,87 \pm 0,38$, sham= $4,71 \pm 0,27$, α -sin= $4,82 \pm 0,30$) (**Fig. 41**). En consecuencia, las fluctuaciones detalladas previamente en la densidad neuronal de la SNpc no resultaron estar vinculadas con cambios en el volumen de este núcleo.

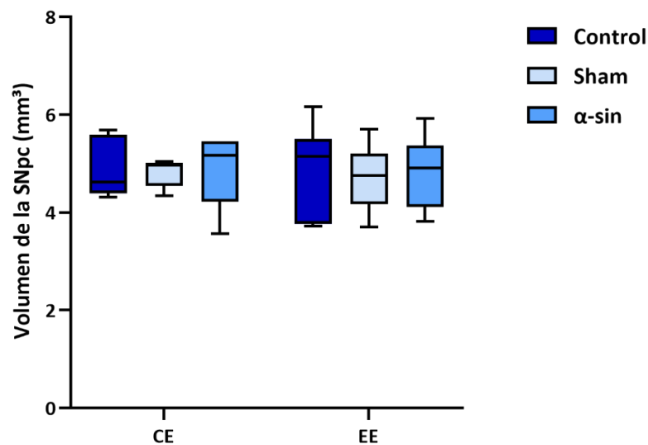


Figura 41. Cuantificación del volumen de la SNpc mediante el principio de Cavalieri en ambos entornos de cría. El análisis del volumen de la SNpc se realizó en los diferentes grupos experimentales criados en CE y EE. El análisis se realizó mediante un ANOVA de tres factores, considerando el entorno de cría, la intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -sin como variables independientes. Los resultados se presentan en Boxplots, que muestran la mediana y el rango intercuartílico. CE: condiciones estándar, EE: entorno enriquecido.

5.7.2. Análisis de fibras dopaminérgicas en el estriado

Después de analizar la degeneración neuronal de la SNpc, se estudió el efecto de la cría en EE sobre las fibras dopaminérgicas del estriado tras la sobreexpresión de α -sin. Para ello, se cuantificó la densidad óptica de las fibras TH+ en el estriado. En la **Fig. 42A** se pueden observar las imágenes representativas de esta inmunohistoquímica en los distintos grupos experimentales analizados, donde se observa una menor degeneración en el grupo α -sin criado en EE.

Los resultados obtenidos tras el análisis ANOVA de tres factores apoyaron lo observado en las imágenes previamente mencionadas. Las gráficas mostraron un efecto significativo de la sobreexpresión de α -sin ($p= 0,010$), siendo la DO de estos animales un 15,8% menor, en comparación con los animales de los grupos control y sham (**Fig. 42B**). Concretamente, en EE, el grupo control mostró la mayor DO ($103,59 \pm 7,35$), seguido del grupo sham ($91,44 \pm 2,93$) y siendo menor en el grupo α -sin ($85,93 \pm 3,63$). La tendencia de los animales criados en CE fue similar. Además, el entorno también mostró efectos significativos ($p= 0,000$), indicando que todos los grupos experimentales criados en EE exhibieron una densidad óptica un 24% mayor que aquellos criados en CE (**Fig. 42B**). La cirugía, por su parte, no mostró efectos significativos sobre DO de las fibras dopaminérgicas estriatales ($p= 0,310$), ya que, tanto los animales operados como los no operados, mostraron valores similares, con una ligera disminución del 6,44% en los operados (**Fig. 42B**).

Asimismo, no se evidenció una interacción significativa entre los distintos factores ($p= 0,099$ para la interacción entre entorno y α -sin; $p= 0,228$ para la interacción entre entorno y cirugía), indicando que los efectos del entorno de cría, la intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -

5. Resultados

sin en la densidad de fibras TH+ en el estriado fueron independientes entre sí. Cada factor ejerció su influencia de manera individual, sin ser modulado por la presencia o ausencia de los demás factores.

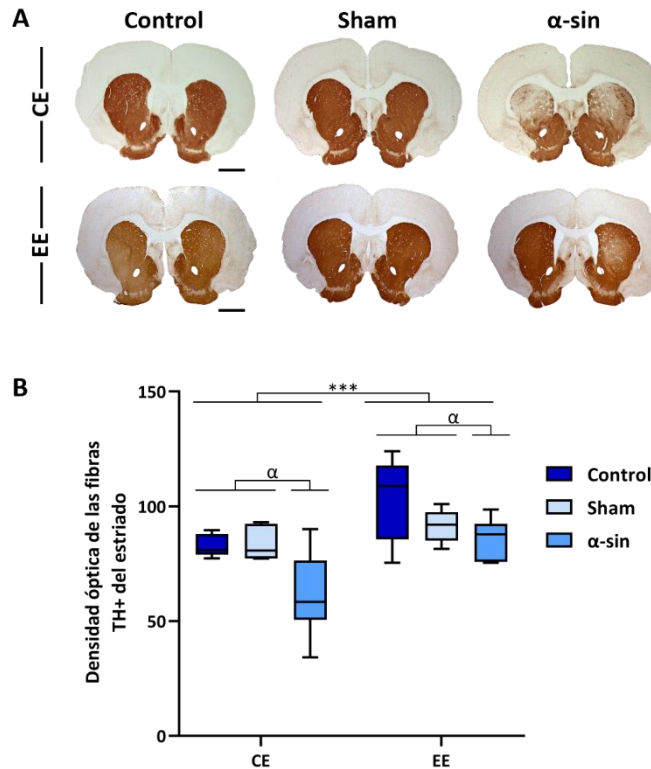


Figura 42. Análisis de la degeneración dopaminérgica estriatal en condiciones estándar (CE) y entorno enriquecido (EE). A) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de TH en el estriado de los grupos control, sham y α -sin, criados en CE o EE. Barra de escala 1000 μ m. B) Cuantificación de la densidad óptica de las fibras TH+ en el estriado a través de un ANOVA de tres factores para evaluar las variaciones en la densidad de fibras TH+ en los seis grupos experimentales. Las variables independientes incluyeron el entorno de cría, la intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -sin. Los datos se presentan en Boxplots, destacando la mediana y el rango intercuartílico. *** $p < 0,001$ indica las diferencias significativas obtenidas por la cría en distintos entornos; $\alpha p < 0,05$ denota las diferencias significativas obtenidas por la sobreexpresión de α -sin.

Además de la cuantificación descrita, en consonancia con los resultados del primer bloque, se realizó un análisis para estudiar si la cría en EE modificaba la presencia de los agregados proteicos (indicadores de la degeneración axonal) en los axones estriatales. Para ello, se comparó la superficie ocupada por los agregados axonales en el estriado de individuos del grupo α -sin, 2 meses después de la intervención quirúrgica, de los animales criados en CE y EE. La cuantificación se llevó a cabo exclusivamente en el modelo animal con sobreexpresión de α -sin, ya que en ausencia de neurodegeneración, no se detectó la presencia de estos agregados proteicos axonales (Fig. 43).

Al analizar las imágenes obtenidas, se observó una marcada acentuación de la degeneración en el núcleo estriado de los animales criados en CE, al compararlos con sus homólogos criados en EE. Esta observación se reflejó en una mayor proporción de degeneraciones axonales en los animales criados en CE (Fig. 43A).

El análisis cuantitativo respaldó la observación cualitativa, revelando que la superficie ocupada por las degeneraciones axonales en el estriado de los animales del grupo α -sin criados

en CE ($0,60 \pm 0,10$) fue significativamente mayor que la de los criados en EE ($0,22 \pm 0,01$), ($p=0,011$) (**Fig. 43B**).

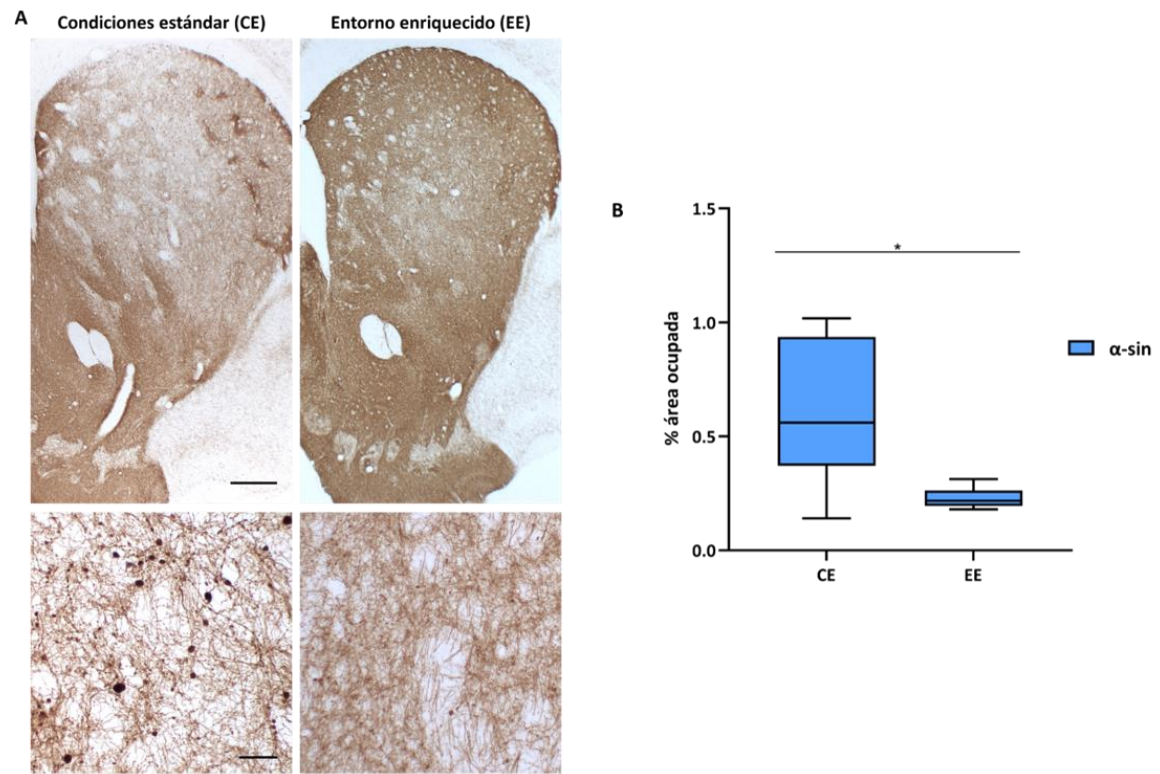


Figura 43. Análisis de la degeneración axonal en el estriado de animales del grupo α -sin criados en condiciones estándar y entorno enriquecido. **A)** Imágenes representativas del estriado que muestran el patrón de degeneración en este núcleo y la presencia de agregados proteicos axonales. Barra de escala: 200 μ m (objetivo 2x) y 50 μ m (objetivo 20x). **B)** Cuantificación del área de superficie ocupada por los agregados axonales en el estriado. Los datos se presentan en Boxplots, destacando la mediana y el rango intercuartílico. Se analizaron mediante T-test sin asumir varianzas iguales. * $p<0,05$. CE: condiciones estándar, EE: entorno enriquecido.

Una vez determinado que los animales criados en EE presentaban una menor degeneración axonal, acompañada de una menor DO de las fibras TH+ en el estriado, se llevó a cabo un análisis de correlación entre las dos variables previamente descritas.

El análisis de correlación de Pearson (**Fig. 44**) reveló una correlación negativa ($r= -0,845$), y estadísticamente significativa ($p< 0,0001$) entre la superficie ocupada por las degeneraciones axonales y la densidad óptica de TH en esta misma región. Por lo tanto, este resultado puso de manifiesto que una menor densidad óptica se asociaba con una mayor presencia de degeneración axonal (**Fig. 44**). Cabe mencionar que, para realizar este análisis, se tuvieron en cuenta los todos los animales que recibieron la inyección bilateral de AAV para sobreexpresar α -sin ($n=12$).

5. Resultados

Posteriormente, se realizó un análisis de correlación por grupos (CE, $n=6$ y EE, $n=6$) con el objetivo de estudiar los efectos del entorno de manera independiente. Este estudio reveló que gran parte de la correlación entre la densidad óptica y las degeneraciones axonales en el estriado estaba influenciada por el grupo criado en CE. En estos animales, el coeficiente de correlación de Pearson fue de $-0,742$ y su significancia rozó el límite de ser significativa ($p=0,056$). Es crucial considerar que el p -valor en los análisis de correlación está fuertemente influenciado por el tamaño muestral. En este contexto, al observar que el coeficiente de correlación fue de $-0,742$ para el grupo criado en CE, a pesar de no alcanzar significancia estadística, se interpreta como un resultado positivo (Fig. 44). También se observó una correlación negativa en el grupo criado en EE, aunque el coeficiente de correlación fue considerablemente menor ($r=-0,291$) y no alcanzó significancia ($p=0,576$) (Fig. 44).

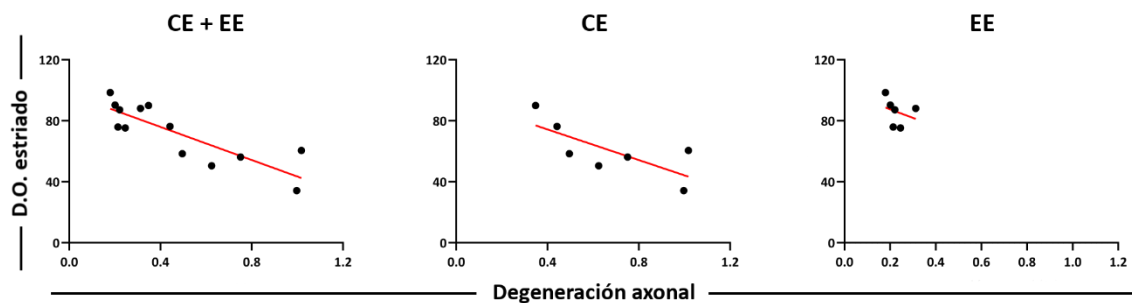


Figura 44. Análisis de correlación para evaluar la relación entre la densidad óptica estriatal y el porcentaje de superficie ocupada por la degeneración axonal. Se ha medido la dependencia lineal entre las variables densidad óptica estriatal y el porcentaje de la superficie ocupada por la degeneración axonal en el grupo experimental α -sin criado en CE y EE, siguiendo el coeficiente de correlación de Pearson. CE: condiciones estándar, EE: entorno enriquecido; D.O.: densidad óptica.

5.7.3. Cuantificación estereológica de fibras dopaminérgicas en la SNpr

Como ha sido descrito previamente, la SNpr participa en la modulación y regulación de la actividad de las vías motoras. Motivados por esta premisa, decidimos estudiar si la cría en EE podía contrarrestar los efectos derivados de la sobreexpresión de α -sin.

Tras realizar un análisis cuantitativo de la densidad de fibras TH+ en la SNpr ($\mu\text{m}/\text{mm}^3$), se llevó a cabo el análisis estadístico mediante un ANOVA de tres vías. La media marginal estimada de fibras TH+ fue significativamente menor en los animales con sobreexpresión de α -sin, en comparación con los grupos control y sham ($p=0,024$). Concretamente, se observó una disminución del 20,25% en la densidad de fibras dopaminérgicas de los animales inyectados con

α -sin, en comparación con los que carecían de la misma (**Fig. 45**). Así, los animales criados en EE mostraron una tendencia similar a la descrita en CE (resultados primer bloque), donde el grupo α -sin ($27,7 \times 10^5 \pm 2,18 \times 10^5$) presentó una reducción de fibras TH+ en comparación con los grupos control ($36,4 \times 10^5 \pm 2,49 \times 10^5$) y sham ($36,7 \times 10^5 \pm 2,24 \times 10^5$) (**Fig. 45**). Por otro lado, se identificó una tendencia en los animales criados en EE a presentar una densidad de fibras un 16,15% mayor en comparación con los criados en CE, sin embargo, este efecto no alcanzó significancia estadística ($p= 0,074$) (**Fig. 45**). En cuanto al efecto de la cirugía, los resultados mostraron una disminución del 18% en la densidad de fibras dopaminérgicas en los animales inyectados con el vector viral AAV9, con o sin sobreexpresión de α -sin. Aunque la cirugía no demostró un efecto significativo en la densidad de fibras TH+ en la SNpr, este valor se situaba en el umbral de significancia estadística ($p= 0,059$) (**Fig. 45**).

Por último, se identificó una interacción estadísticamente significativa entre el entorno y la cirugía ($p= 0,047$). El aumento de la densidad de fibras en los animales intervenidos quirúrgicamente, criados en EE, resultó significativamente mayor (35% mayor) que en los criados en CE (**Fig. 45**).

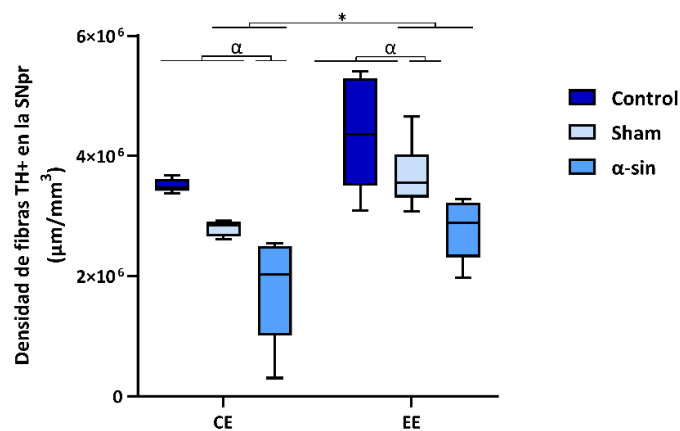


Figura 45. Cuantificación de la degeneración dopaminérgica inducida por la sobreexpresión de α -sin en la SNpr de animales criados en CE y EE. Cuantificación estereológica de las fibras TH+ en la SNpr de los diferentes grupos experimentales criados en CE y EE. Los datos se presentan en Boxplots, que muestran la mediana y el rango intercuartílico. Se llevó a cabo un ANOVA de tres factores, considerando el entorno de cría, la intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -sin como variables independientes. * $p < 0,05$ indica las diferencias significativas obtenidas por la cría en distintos entornos, mientras que $^{\alpha}p < 0,05$ denota las diferencias significativas obtenidas por la sobreexpresión de α -sin. CE: condiciones estándar, EE: entorno enriquecido.

5.8. Impacto del EE sobre el estrés oxidativo inducido por la sobreexpresión de α -sin

El factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf-2) es una proteína clave en la protección contra el estrés oxidativo. Ante este tipo de situaciones, el Nrf-2 se libera y se transloca desde el citoplasma al núcleo celular, donde se une a la región promotora de genes conocidos como elementos de respuesta a antioxidantes (ARE, por sus siglas en inglés). Esta unión activa la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes y proteínas desintoxicantes, consolidando así la función del Nrf-2 como un regulador del estrés oxidativo y del mantenimiento de la homeostasis celular.

Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de α -sin produce un aumento de ROS y, por lo tanto, está relacionada con un aumento del estrés oxidativo, el objetivo de este apartado fue estudiar los cambios en la expresión Nrf-2 en los tres grupos experimentales criados en CE y EE, mediante técnicas de inmunohistoquímica (**Fig. 46A**).

Los resultados obtenidos tras la cuantificación estereológica (cel/mm³) revelaron que, en los animales criados en CE, el grupo α -sin (7779,25 \pm 531,21) exhibió una expresión de Nrf-2 superior en comparación con los grupos control (4730,41 \pm 419,70) y sham (5245,97 \pm 189,55), siendo la expresión más elevada en el grupo sham. En los animales criados en EE, el aumento en la expresión de Nrf-2 se observó en los grupos lesionados, es decir, en el sham (7230,15 \pm 324,85) y el α -sin (7223,46 \pm 550,43), siendo superiores en comparación con el grupo control (3452,60 \pm 429,02) (**Fig. 46B**).

El análisis estadístico, basado en un ANOVA de tres vías, mostró que el entorno de cría tuvo un impacto significativo ($p= 0,05$) en la densidad de células Nrf-2+, donde se observó una reducción del 14,65% en la densidad de los animales criados en EE, en comparación con los criados en CE (**Fig. 46B**). Además, la sobreexpresión de α -sin también mostró un efecto significativo ($p= 0,007$). En este caso, los animales del grupo α -sin presentaron un aumento de 1263,296 cel/mm³ (19,65%) en la expresión de Nrf-2, en comparación con los que carecían de la misma (**Fig. 46B**). La cirugía también tuvo un efecto significativo en esta variable ($p < 0,001$), y es que los animales operados mostraron un aumento en la expresión de 2146,552 cel/mm³ (31,24%) en comparación con los controles (**Fig. 46B**).

Además, se evidenció una interacción significativa entre el entorno y la sobreexpresión de α -sin ($p= 0,007$), indicando que el efecto del entorno estaba relacionado con la sobreexpresión de esta proteína. Concretamente, la cría en EE redujo la expresión de Nrf-2 en los animales con

sobreexpresión de α -sin en un 29,07% (2186,791 cel/mm³), en comparación con esos mismos animales criados en CE (Fig. 46B). Esta misma tendencia se manifestó tras la interacción significativa entre el entorno y la cirugía ($p= 0,001$), donde se observó que, los animales intervenidos quirúrgicamente y criados en EE, mostraban una mayor densidad de células Nrf-2+ en la SNpc que aquellos criados en CE, con un aumento aproximado del 10% (714,199 cel/mm³) (Fig. 46B).

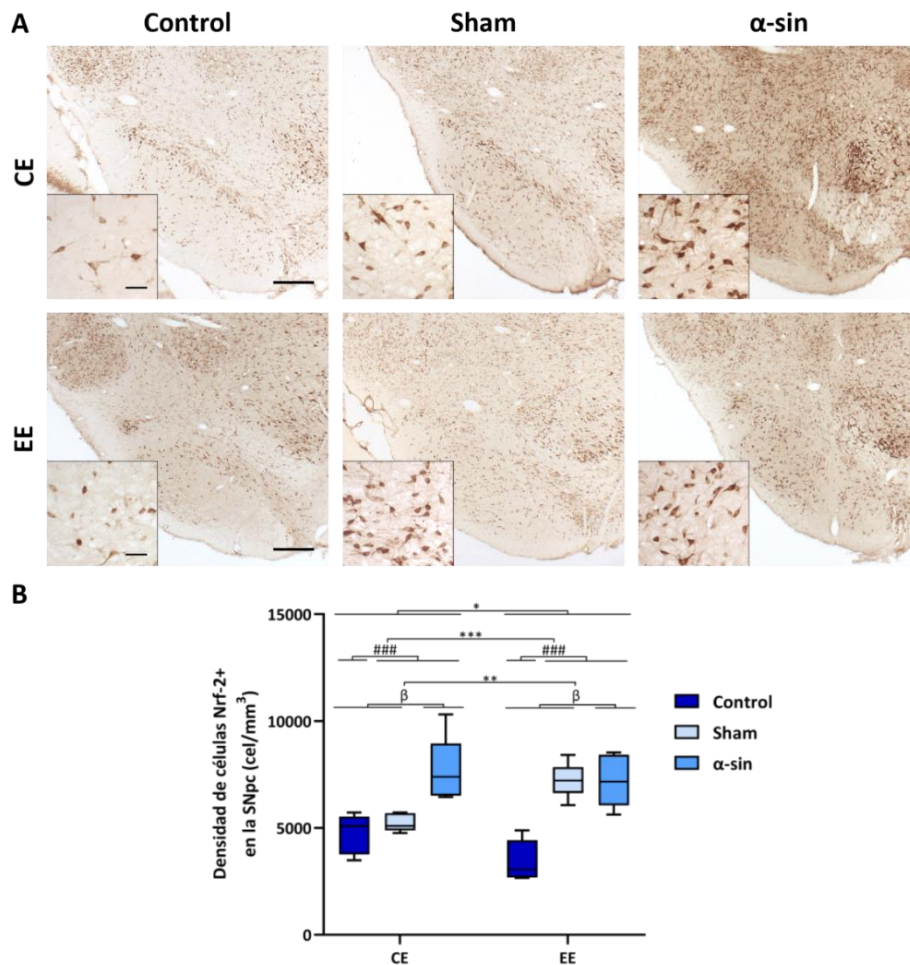


Figura 46. Estudio de la expresión de Nrf-2 en la SNpc. A) Imágenes representativas de la expresión de Nrf-2 en la SNpc de los distintos grupos experimentales criados en condiciones CE y EE. Barras de escala: 200 μ m (objetivo 2x) y 50 μ m (objetivo 20x). **B)** Cuantificación estereológica de las células Nrf-2+ de la SNpc en los diferentes grupos experimentales. Se realizó un ANOVA de tres factores, considerando el entorno de cría, la intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -sin como variables independientes. Los resultados se presentan en Boxplots, que muestran la mediana y el rango intercuartílico. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ refleja las diferencias significativas derivadas de la cría en distintos entornos y las interacciones entre la sobreexpresión de α -sin y la intervención quirúrgica con el entorno. $\beta p < 0,01$ denota las diferencias significativas asociadas a la sobreexpresión de α -sin y ### $p < 0,001$ muestra las diferencias significativas obtenidas como consecuencia de los efectos producidos por la intervención quirúrgica. CE: condiciones estándar, EE: entorno enriquecido.

5.9. Evaluación cualitativa de la activación glial tras la sobreexpresión de α -sin y la cría en EE

Una vez estudiado el efecto del entorno enriquecido sobre la degeneración dopaminérgica, procedimos a analizar si el entorno de cría ocasionaba alguna modificación en el patrón inflamatorio de la vía nigroestriatal.

En cuanto a la activación astrocitaria, en el área de la SN se detectó una disminución en la expresión de astrocitos GFAP+ en todos los grupos experimentales operados (sham y α -sin) criados en EE, en comparación con los criados en CE (Fig. 47). Cabe mencionar que esta disminución fue particularmente notable en el grupo α -sin, donde la expresión de GFAP mostró una significativa reducción en la *substantia nigra* tras la cría en EE (Fig. 47).

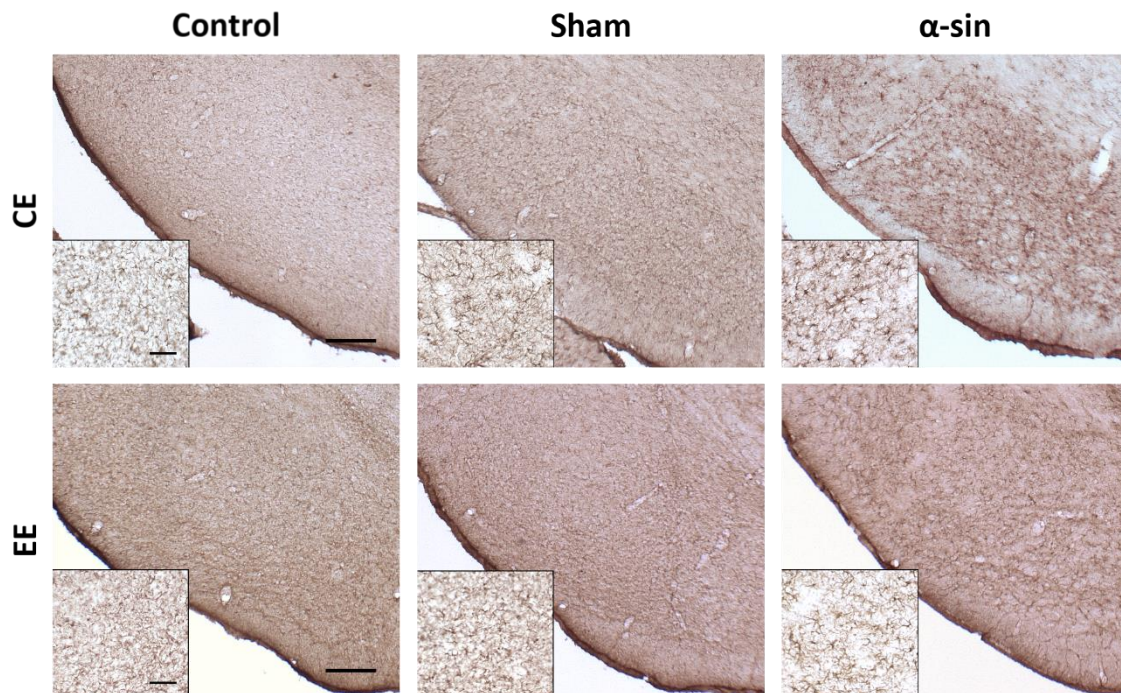


Figura 47. Diferencias en la reactividad astrocitaria en la SN de los distintos grupos experimentales según el entorno de cría. Imágenes representativas de la SN que muestran la inmunohistoquímica frente a GFAP empleada para identificar la presencia de astrocitos reactivos en los grupos control, sham y α -sin de animales criados en condiciones estándar (CE) y entorno enriquecido (EE). Barra de escala: 200 μ m (objetivo 4x) y 50 μ m (objetivo 20x).

En el estriado, se apreció una tendencia similar a la descrita anteriormente en la SN. La sobreexpresión de α -sin provocó un aumento en la expresión de GFAP, 2 meses después de la cirugía en los animales criados en CE. Sin embargo, se observó que el EE logró mitigar esta

activación de los astrocitos, especialmente notable en el grupo con sobreexpresión de α -sin (**Fig. 48**).

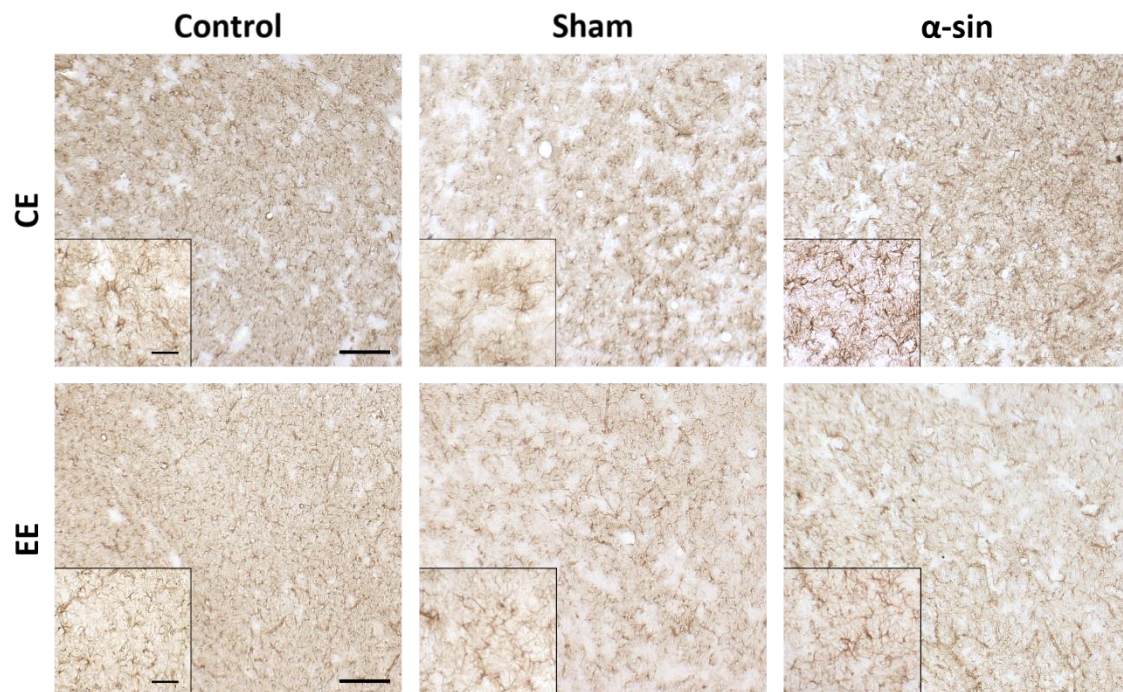


Figura 48. Cambios en la reactividad de astrocitos en el estriado de los distintos grupos experimentales según el entorno de cría. Imágenes representativas del estriado que muestran la inmunohistoquímica frente a GFAP empleada para detectar la presencia de astrocitos reactivos en los grupos control, sham y α -sin de animales criados en condiciones estándar (CE) y entorno enriquecido (EE). Barra de escala: 200 μ m (objetivo 4x) y 50 μ m (objetivo 20x).

Por otro lado, también se analizó el patrón de expresión de la microglía. La inmunohistoquímica frente a Iba-1 reveló un ligero aumento en la expresión de este marcador en el grupo α -sin criado en EE, en comparación con los grupos control y sham criados en las mismas condiciones ambientales (**Fig. 49**). Por otro lado, en el grupo sham no se detectaron diferencias en comparación con el grupo control criado en EE (**Fig. 49**).

Al comparar ambas condiciones de cría, se observó una disminución en la expresión de Iba-1 en los grupos lesionados criados en EE, siendo esta reducción especialmente pronunciada en el grupo con sobreexpresión de α -sin (**Fig. 49**). Además de mostrar cambios en la proliferación celular, los animales intervenidos (sham y α -sin) criados en EE, mostraron unas características morfológicas diferentes a los criados en condiciones estándar, y es que la microglía presentó muchas menos ramificaciones y no se observaron cuerpos celulares hinchados (**Fig. 49**). Por lo tanto, la activación microglial fue significativamente menor en los animales criados en EE.

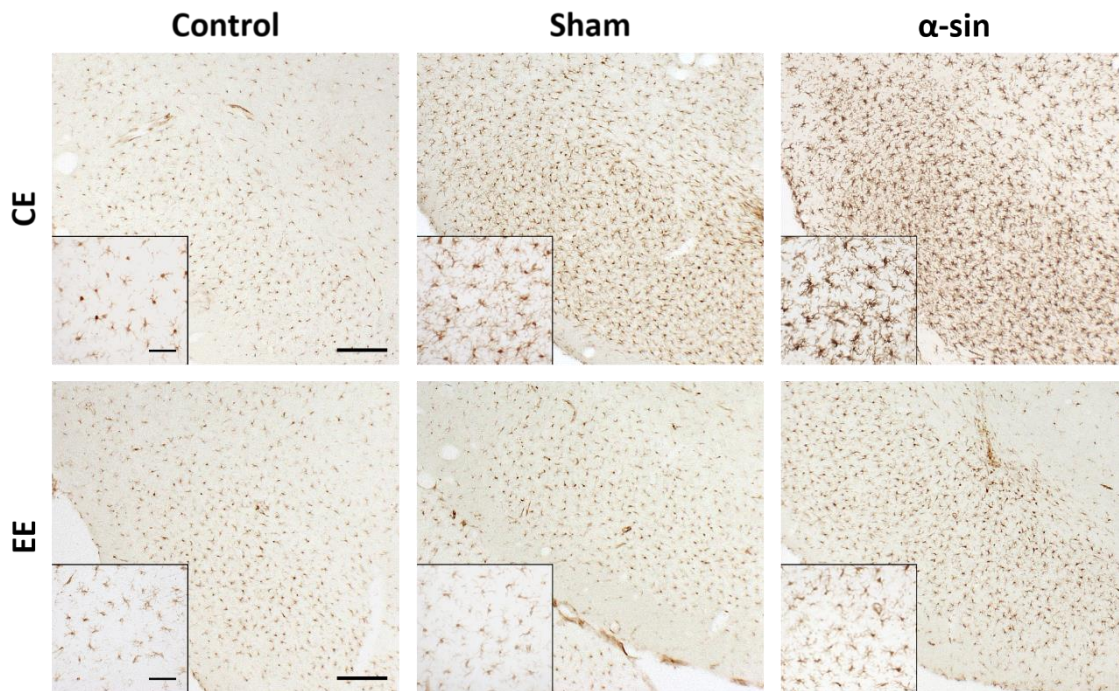


Figura 49. Diferencias en la expresión de Iba-1 en la SN de los distintos grupos experimentales según el entorno de cría. Imágenes representativas de la SN que muestran la inmunohistoquímica frente a Iba-1, utilizada para identificar la población microglial en los grupos control, sham y α -sin de animales criados en condiciones estándar (CE) y entorno enriquecido (EE). Barra de escala: 200 μ m (objetivo 4x) y 50 μ m (objetivo 20x).

En el análisis del estriado, se apreció una mayor homogeneidad en la positividad frente a Iba-1 entre los tres grupos experimentales criados en EE, siendo ligeramente mayor en el grupo α -sin (**Fig. 50**). Sin embargo, al contrastar ambos entornos, se evidenció una disminución significativa en la expresión de Iba-1 del grupo α -sin criado en EE, en comparación con el grupo criado en CE (**Fig. 50**). En los demás grupos experimentales, no se observaron variaciones de relevancia en cuanto a la proliferación microglial (**Fig. 50**). Cabe destacar la notable disminución de las ramificaciones que se observaron en los animales criados en EE, así como la reducción de la presencia de somas neuronales hinchados en los grupos intervenidos y criados en EE, siendo mayor en el grupo α -sin (**Fig. 50**). Por consiguiente, al igual que en la SN, el EE también disminuyó la activación glial en el estriado.

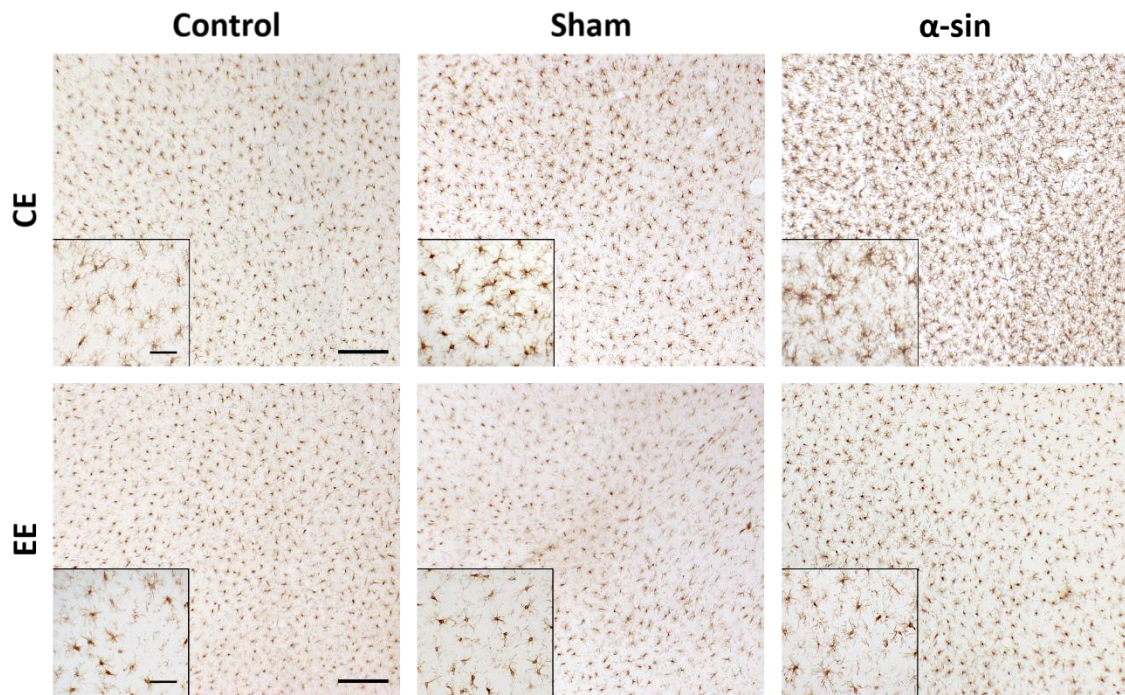


Figura 50. Cambios en la expresión de Iba-1 en el estriado de los distintos grupos experimentales según el entorno de cría. Imágenes representativas del estriado que muestran la inmunohistoquímica frente a Iba-1, empleada para identificar la población microglial en los grupos control, sham y α -sin de animales criados en condiciones estándar (CE) y entorno enriquecido (EE). Barra de escala: 200 μ m (objetivo 4x) y 50 μ m (objetivo 20x).

5.10. Evaluación de la expresión de proteínas clave en la vía de regulación del EE

Analizados los efectos de la sobreexpresión de α -sin y la cría en un entorno enriquecido sobre la degeneración de la vía nigroestriatal y la activación glial, el siguiente paso fue determinar la expresión molecular de proteínas que pudieran estar implicadas en los cambios previamente descritos. El estudio se llevó a cabo tanto en la SN como en el estriado.

La cría en EE aumenta la expresión de factores neurotróficos, como el BDNF. De hecho, la interacción del BDNF con su receptor TrkB, desempeña un papel crucial en los cambios inducidos por el entorno. En este contexto, además de estudiar los cambios en la expresión de BDNF, se llevó a cabo el análisis de la unión de este factor con su receptor, cuantificando la ratio p-TrkB/TrkB, el cual sería indicador de la unión del ligando (BDNF) y su receptor (TrkB). Por último, se estudió la vía de señalización celular de ERK, que es una de las principales rutas de los factores de crecimiento, y está implicada en la regulación de procesos neurales clave, contribuyendo a la supervivencia neuronal, la diferenciación y la plasticidad sináptica, entre otros.

5. Resultados

Por otro lado, también se analizó la expresión de proteínas relacionadas con las células gliales, como son el factor neurotrófico derivado del cerebro (GDNF) y el factor nuclear kappa B (Nf- κ B) que desempeñan un papel crucial en la supervivencia neuronal y en la regulación de la respuesta inmunológica y la inflamación, respectivamente. En el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, la activación excesiva de Nf- κ B ha sido asociada con el proceso inflamatorio crónico en el sistema nervioso central, desencadenando respuestas inflamatorias y daño neuronal. De esta manera, se estudió la implicación de esta molécula en el modelo experimental de EP basado en la sobreexpresión de α -sin, así como su interacción con el entorno enriquecido.

5.10.1. Análisis de la expresión de BDNF

Tras la cuantificación de los resultados obtenidos mediante WB, se analizaron mediante un ANOVA de tres factores. Los resultados obtenidos en la SN mostraron un efecto significativo del EE sobre la expresión de BDNF ($p= 0,006$). En este sentido, los animales criados en EE mostraron una expresión un 10,73% (DO= 0,022) superior en comparación con aquellos criados en CE (**Fig. 51A**). Además, la intervención quirúrgica también mostró efectos significativos en la expresión de este factor ($p= 0,09$), manifestándose un descenso del 10,3% (DO= 0,021) en los animales sometidos a cirugía en relación con los controles (**Fig. 51A**). Todos los animales operados mostraron una disminución en la expresión de BDNF, independientemente del entorno de cría. Sin embargo, aunque la interacción entre el entorno y la intervención quirúrgica no alcanzó significancia estadística ($p= 0,232$), se observó que los animales criados en EE, mostraban un descenso menos pronunciado en la expresión de BDNF que los criados en CE, registrándose una diferencia de 0,032 (16,08%). Por consiguiente, se percibió una tendencia hacia la mejora de la expresión de BDNF en los animales operados y criados en EE (**Fig. 51A**).

Por otro lado, la sobreexpresión de α -sin no mostró efectos significativos en la producción de BDNF ($p= 0,336$). El análisis de la expresión de BDNF en la SN mostró que, en CE, el grupo control ($0,20 \pm 0,007$) presentó una expresión más elevada de esta proteína en comparación con los grupos sham ($0,17 \pm 0,005$) y α -sin ($0,16 \pm 0,008$) (**Fig. 51A**). En cambio, en condiciones de EE, la expresión de BDNF se mantuvo relativamente constante en los tres grupos experimentales (control= $0,21 \pm 0,006$, sham= $0,20 \pm 0,008$, α -sin= $0,19 \pm 0,003$) (**Fig. 51A**).

Asimismo, no se evidenció una interacción significativa entre el entorno y la sobreexpresión de α -sin ($p= 0,843$) y la cirugía ($p= 0,232$). Esta ausencia sugiere que las diferencias previamente señaladas en relación con el entorno de cría de los animales y su impacto en la expresión de BDNF

fueron consistentes en todos los individuos, sin importar el grupo experimental al que pertenezcan (**Fig. 51A**).

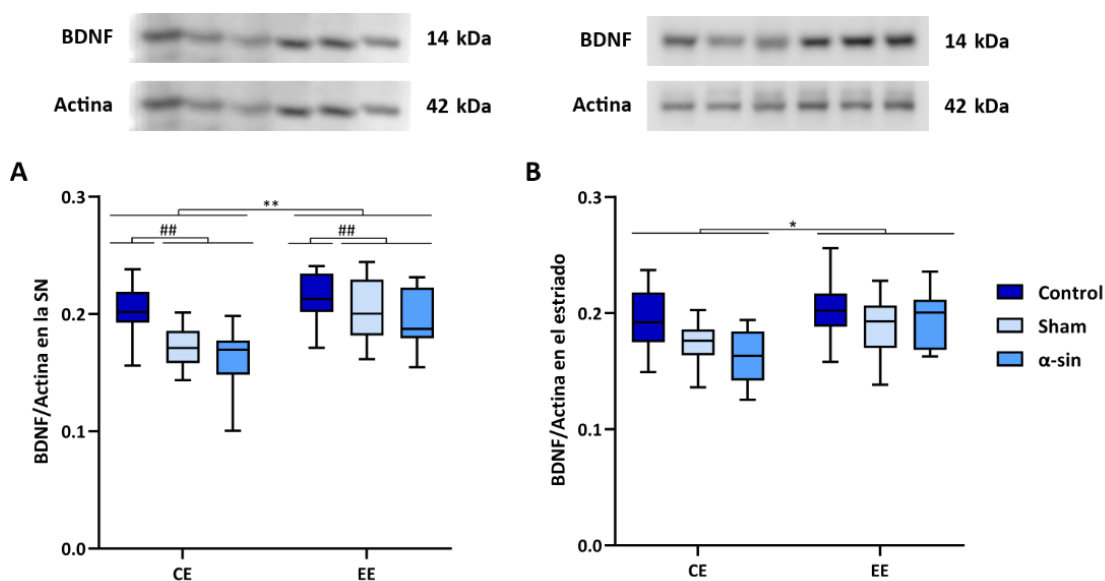


Figura 51. Estudio y cuantificación de los niveles de expresión de la proteína BDNF en la vía nigroestriatal de los diferentes grupos experimentales criados en CE y EE. Se analizaron los datos de la densidad óptica de BDNF normalizados con actina en la SN (**A**) y en el estriado (**B**) mediante un ANOVA de tres factores. Se consideró el entorno de cría, la intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -sin como variables independientes. Los resultados se representan mediante Boxplots, que muestran la mediana y el rango intercuartílico de las densidades ópticas obtenidas para el anticuerpo primario contra BDNF normalizado frente a la actina. ** $p < 0,01$ refleja las diferencias significativas derivadas del entorno de cría. ## $p < 0,01$ señala las diferencias significativas asociadas a los efectos de la intervención quirúrgica. CE: condiciones estándar, EE: entorno enriquecido.

En el estriado de los animales criados en CE, el grupo control ($0,19 \pm 0,009$) mostró una DO superior a la de los grupos sham ($0,17 \pm 0,006$) y α -sin ($0,16 \pm 0,008$). Por otro lado, en condiciones de EE, el grupo control mantuvo la densidad óptica más alta ($0,20 \pm 0,008$). Sin embargo, en este entorno se observó una reversión parcial del daño causado por la sobreexpresión de α -sin, ya que los valores de expresión de los grupos sham ($0,19 \pm 0,008$) y α -sin ($0,19 \pm 0,009$) prácticamente se igualaron (**Fig. 51B**).

Al analizar los datos mediante un ANOVA de tres factores, en el estriado también se observó un impacto significativo del entorno de cría sobre la expresión de BDNF ($p = 0,026$). En particular, los animales criados en EE exhibieron una expresión de BDNF un 11% ($DO = 0,022$) más elevada que los criados en CE. En contraste, ni la intervención quirúrgica, ni la sobreexpresión de α -sin manifestaron efectos significativos en la expresión de BDNF ($p = 0,116$ y $p = 0,974$, respectivamente) (**Fig. 51B**).

La interacción entre el entorno y la cirugía ($p= 0,799$) no reveló diferencias significativas. El análisis de la interacción entre el entorno y la sobreexpresión de α -sin reflejó una tendencia hacia un aumento en la expresión del 15,3% ($DO= 0,031$) en los animales criados en EE al compararlos con los criados en CE, aunque esta diferencia no alcanzó significancia estadística ($p= 0,242$) (**Fig. 51B**).

5.10.2. Análisis de la expresión de p-TrkB/TrkB

Con el objetivo de obtener una comprensión más detallada de los efectos de la modulación del BDNF por el EE, se investigó si la sobreexpresión de BDNF, inducida por el EE, iba acompañada de una sobreexpresión de su receptor TrkB y de su fosforilación en la vía nigroestriatal (**Fig. 52**). Todos los resultados se normalizaron frente a la actina y se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA de 3 factores.

En relación a los niveles de fosforilación del TrkB (p-TrkB) en la SN, se observó que la sobreexpresión de α -sin tuvo un impacto significativo en la forma activada de este receptor ($p= 0,048$). Los animales con sobreexpresión de α -sin mostraron una reducción del 11,52% ($DO= 0,031$) en la densidad óptica de este receptor. Las variables entorno de cría y cirugía no mostraron efectos significativos en este parámetro ($p= 0,126$ y $p= 0,239$ respectivamente) (**Fig. 52A**).

Posteriormente, se evaluó la expresión del receptor en su estado normal, y ni el entorno de cría ($p= 0,146$), ni la intervención quirúrgica ($p= 0,931$) ni la sobreexpresión de α -sin ($p= 0,155$), produjeron un efecto significativo sobre la expresión de TrkB (**Fig. 52B**).

Finalmente, se calculó la proporción de TrkB fosforilado (p-TrkB) respecto al TrkB total en la SN y se observó que el entorno tuvo un efecto significativo en este cociente ($p= 0,007$). Los animales criados en EE mostraron una densidad óptica un 18,45% superior ($DO= 0,257$) que los criados CE (**Fig. 52C**). Además, la sobreexpresión de α -sin también influyó significativamente en esta ratio ($p= 0,008$). La inyección de α -sin mediante vectores virales disminuyó significativamente los niveles de p-TrkB/TrkB ($0,93 \pm 0,08$) respecto a la inyección de vectores virales vacíos ($1,2241 \pm 0,07$), mientras que el EE aumentó dichos niveles sin observarse una interacción significativa entre el EE y la sobreexpresión de α -sin ($p= 0,670$). Es decir, el EE no afectó de forma diferente a los animales con AAV α -sin (**Fig. 52C**). Por otro lado, la intervención quirúrgica no influyó en la expresión de p-TrkB/TrkB ($p= 0,252$). A pesar de ello, en CE, el grupo control mostró una densidad óptica ligeramente superior ($1,33 \pm 0,13$), que los grupos sham ($1,22 \pm 0,07$) y α -sin ($0,93 \pm 0,08$). Esta misma tendencia se observó en EE, donde el grupo control ($1,54 \pm 0,06$) presentó una

densidad óptica superior que los grupos sham ($1,23 \pm 0,09$) y α -sin ($1,28 \pm 0,04$), siendo, en ambos casos, el valor del grupo α -sin el menor, especialmente en los animales criados en CE (**Fig. 52C**). Además, tampoco se observaron interacciones significativas entre el entorno y la intervención quirúrgica ($p= 0,930$) y la sobreexpresión de α -sin ($p= 0,670$), por lo que las alteraciones previamente descritas en cuanto al entorno de cría fueron independientes a la cirugía y de la α -sin (**Fig. 52C**).

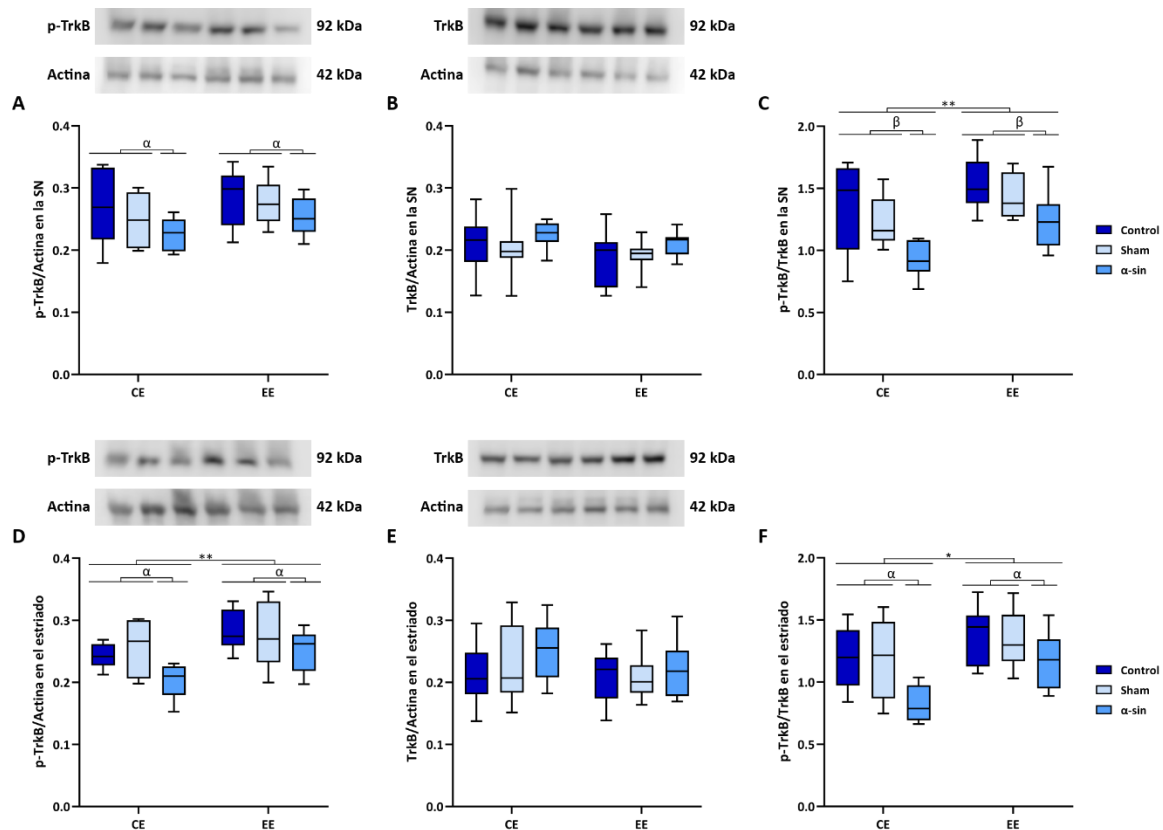


Figura 52. Cuantificación de los niveles de expresión de TrkB y TrkB fosforilado en la vía nigroestriatal. Se analizaron los niveles de densidad óptica de p-TrkB (A, D), TrkB (B, E) y p-TrkB/TrkB (C, F) en la SN y en el estriado mediante un ANOVA de tres factores, considerando el entorno de cría, la intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -sin como variables independientes. Los resultados se representan mediante Boxplots, que muestran la mediana y el rango intercuartílico. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ reflejan las diferencias significativas derivadas del entorno de cría. $\alpha p < 0,05$ y $\beta p < 0,01$ señalan las diferencias significativas asociadas a los efectos de la sobreexpresión de α -sin. CE: condiciones estándar, EE: entorno enriquecido.

En el estriado, el entorno tuvo un efecto significativo en la expresión p-TrkB ($p= 0,007$). Los animales criados en EE exhibieron un aumento significativo del 16,47% ($DO= 0,044$) en la expresión del receptor activado en comparación con los criados en CE. Paralelamente, los animales con sobreexpresión de α -sin manifestaron una reducción significativa del 14,7% ($DO=$

0,039) en la expresión de p-TrkB en comparación con los grupos control y sham ($p=0,018$). Cabe destacar que la intervención quirúrgica no mostró efectos significativos en este parámetro ($p=0,828$) (**Fig. 52D**).

El análisis del receptor TrkB reveló que ni el entorno ($p=0,429$), ni la intervención quirúrgica ($p=0,734$), ni la sobreexpresión de α -sin ($p=0,381$) produjeron un impacto significativo en la expresión de este receptor (**Fig. 52E**).

En cuanto a la ratio p-TrkB/TrkB en el estriado, el grupo control ($1,19 \pm 0,10$) y sham ($1,18 \pm 0,14$) exhibieron una ratio de p-TrkB/TrkB similar, siendo superior al grupo α -sin ($0,82 \pm 0,06$). En EE se observó una tendencia similar, donde el grupo α -sin ($1,17 \pm 0,09$) mostró una expresión inferior en comparación a los grupos sham ($1,34 \pm 0,09$) y control ($1,38 \pm 0,09$) (**Fig. 52F**). Así, el análisis estadístico mostró que la cría en EE tuvo un efecto significativo del 21% ($DO=0,269$; $p=0,014$). Además, la sobreexpresión de α -sin también tuvo un impacto significativo ($p=0,014$). Los animales con sobreexpresión de α -sin experimentaron una reducción significativa del 20,9% ($DO=0,267$) en la ratio de p-TrkB/TrkB, en comparación con los grupos control y sham. La cirugía por su lado, no ejerció ningún efecto en la expresión de p-TrkB/TrkB ($p=0,811$) (**Fig. 52F**). De manera análoga a lo observado en la SN, la administración de α -sin mediante vectores virales condujo a una disminución significativa de los niveles de p-TrkB/TrkB ($0,99 \pm 0,07$) en comparación con la inyección de vectores virales vacíos ($1,26 \pm 0,08$). Además, no se observaron interacciones significativas entre el entorno y la intervención quirúrgica ($p=0,857$), ni entre el entorno y la sobreexpresión de α -sin ($p=0,338$) (**Fig. 52F**).

5.10.3. Análisis de la activación de la vía de señalización de ERK

Para evaluar si la cría en EE aumentaba la actividad de esta vía de señalización, se determinó la proporción relativa de ERK fosforilada (p-ERK) con respecto al ERK total, normalizando, en ambos casos, con actina.

El análisis de la SN reveló un efecto significativo del EE en la fosforilación de ERK ($p=0,005$). En particular, los animales criados en CE exhibieron una disminución del 18,7% ($DO=0,220$) en la densidad óptica de la ratio p-ERK/ERK, en comparación con los criados en EE (**Fig. 53A**). En CE, la densidad óptica de la expresión de p-ERK/ERK se mantuvo relativamente constante en los tres grupos experimentales, siendo ligeramente inferior en los animales operados (control= $0,99 \pm 0,10$, sham= $0,80 \pm 0,09$, α -sin= $0,92 \pm 0,08$). En condiciones de EE, se observó la misma tendencia

que la descrita previamente, con una expresión ligeramente más elevada en el grupo control ($1,29 \pm 0,12$) en comparación con los grupos sham ($1,26 \pm 0,13$) y α -sin ($1,05 \pm 0,10$) (**Fig. 53A**). Sin embargo, a pesar de estas pequeñas diferencias, la intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -sin no mostraron un efecto significativo en la relación p-ERK/ERK ($p= 0,307$ y $p= 0,689$, respectivamente) (**Fig. 53A**). Tampoco se observaron interacciones significativas entre el entorno y la cirugía ($p= 0,463$), ni entre el entorno y la sobreexpresión de α -sin ($p= 0,138$), por lo que el EE incrementó los niveles de la vía de señalización p-ERK/ERK independientemente de si se trataba de animales control, sham o α -sin.

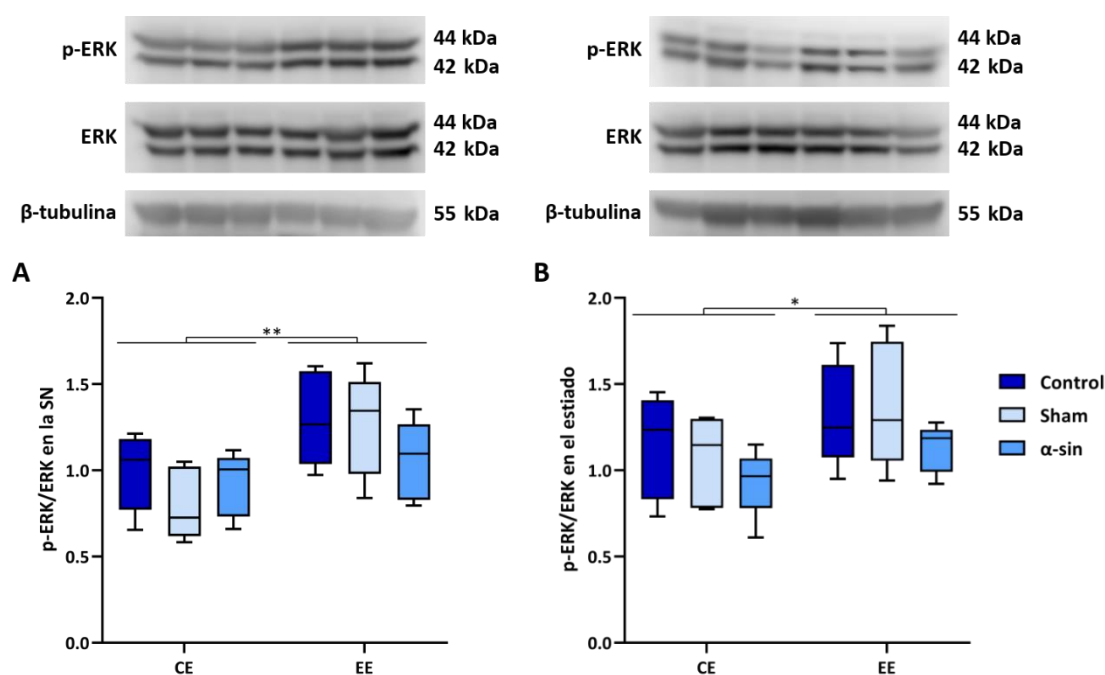


Figura 53. Cuantificación de los niveles de expresión de ERK y ERK fosforilado en la vía nigroestriatal. Se evaluaron los niveles de densidad óptica de p-ERK/ERK, normalizados respecto a la β -tubulina en la SN (**A**) y el estriado (**B**). Los resultados se analizaron mediante un ANOVA de tres factores, considerando el entorno de cría, la intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -sin como variables independientes. Los resultados se representan mediante Boxplots, que muestran la mediana y el rango intercuartílico. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ indican las diferencias significativas asociadas al entorno de cría. CE: condiciones estándar, EE: entorno enriquecido.

El análisis de los resultados del estriado, también mostró un efecto significativo del EE sobre la ratio p-ERK/ERK ($p= 0,034$). Los animales criados en EE exhibieron un aumento del 15,42% (DO= 0,189) en comparación con los criados en CE (**Fig. 53B**). Aunque la sobreexpresión de α -sin no alcanzó significancia estadística ($p= 0,129$), se observó una reducción de aproximadamente el 15% (DO= 0,19) en el grupo α -sin, en comparación con los grupos sham y control (**Fig. 53B**). Por su lado, la cirugía no mostró un efecto significativo ($p= 0,916$) (**Fig. 53B**). Así, en CE, el grupo control ($1,14$

5. Resultados

$\pm 0,13$) presentó niveles de p-ERK/ERK superiores a los grupos sham ($1,06 \pm 0,11$) y α -sin ($0,93 \pm 0,08$). En EE, la expresión de p-ERK/ERK entre el grupo control ($1,32 \pm 0,13$) y el sham ($1,37 \pm 0,16$) se mantuvo relativamente constante, mientras que disminuyó ligeramente en el grupo α -sin ($1,12 \pm 0,06$) (**Fig. 53B**).

La interacción entre el entorno y la cirugía ($p= 0,581$), y entre el entorno y la sobreexpresión de α -sin ($p= 0,617$), no mostró efectos significativos, indicando que el aumento de expresión, como consecuencia de la cría en EE, se produjo en todos los grupos experimentales, independientemente del resto de factores analizados (**Fig. 53B**).

5.10.4. Análisis de la expresión de GDNF

El factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) es un factor de crecimiento que desempeña un papel crucial en la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas, protegiéndolas de la muerte. Por este motivo, se estudió si la expresión de este factor neurotrófico estaba modificada por las condiciones de cría en los diferentes grupos experimentales (**Fig. 54**).

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en la SN no reveló diferencias significativas asociadas con las condiciones de cría ($p= 0,082$), la cirugía ($p= 0,092$) o la sobreexpresión de α -sin ($p= 0,062$) (**Fig. 54A**). Sin embargo, se observó la tendencia de que los animales criados en EE mostraban una expresión de GDNF un 7,2% superior que los criados en CE. Por otro lado, también se observó una tendencia similar relacionada con la sobreexpresión de α -sin, donde los animales con dicha sobreexpresión exhibieron una expresión de GDNF un 7,5% inferior en comparación con los grupos sham y control. Concretamente, en CE el grupo control ($0,24 \pm 0,011$) mostró la expresión más elevada, seguido por el grupo sham ($0,22 \pm 0,009$) y, en último lugar, el grupo α -sin ($0,20 \pm 0,011$). Esta misma tendencia se observó en EE, donde el grupo α -sin ($0,22 \pm 0,008$) mostró los niveles más bajos de GDNF, seguido por el grupo sham ($0,23 \pm 0,006$), y finalmente, el grupo control ($0,25 \pm 0,009$) (**Fig. 54A**).

Por otro lado, la interacción entre el entorno y la cirugía, así como el entorno y la sobreexpresión de α -sin, no resultaron significativas ($p= 0,934$ y $p= 0,527$, respectivamente). No obstante, se observó una tendencia que sugiere que los animales con sobreexpresión de α -sin criados en EE mostraban un aumento del 9,4% en la expresión de GDNF, al compararlos con los criados en CE (**Fig. 54A**).

En el estriado, los resultados fueron similares a lo descrito previamente para la SN. No se detectaron diferencias significativas en la expresión de GDNF relacionadas con el entorno de cría ($p= 0,404$), la intervención quirúrgica ($p= 0,260$) o la sobreexpresión de α -sin ($p= 0,245$). Sin embargo, los animales criados en EE mostraron una tendencia al aumento en la expresión de GDNF del 8,5%. Además, los animales del grupo α -sin expresaron un 11,5% menos de GDNF en comparación con los grupos control y sham (**Fig. 54B**). De hecho, en los animales criados en CE, el grupo control ($0,19 \pm 0,021$) mostró la mayor expresión de GDNF, seguida de los grupos sham ($0,17 \pm 0,019$) y α -sin ($0,15 \pm 0,016$). Por otro lado, en los animales criados en EE, el grupo α -sin ($0,16 \pm 0,019$) mostró una expresión inferior de GDNF respecto a los grupos sham ($0,18 \pm 0,019$) y control ($0,21 \pm 0,0109$) (**Fig. 54B**).

En este contexto, no se observó una interacción significativa entre el entorno y la intervención quirúrgica, ni entre el entorno y la sobreexpresión de α -sin ($p= 0,832$ y $p= 0,967$ respectivamente). Esto sugiere que la tendencia relacionada con el aumento en la expresión de GDNF, como resultado de la cría en EE, afecta de igual manera a todos los grupos experimentales, independientemente de si han sido sometidos a cirugía o han sobreexpresado α -sin (**Fig. 54B**).

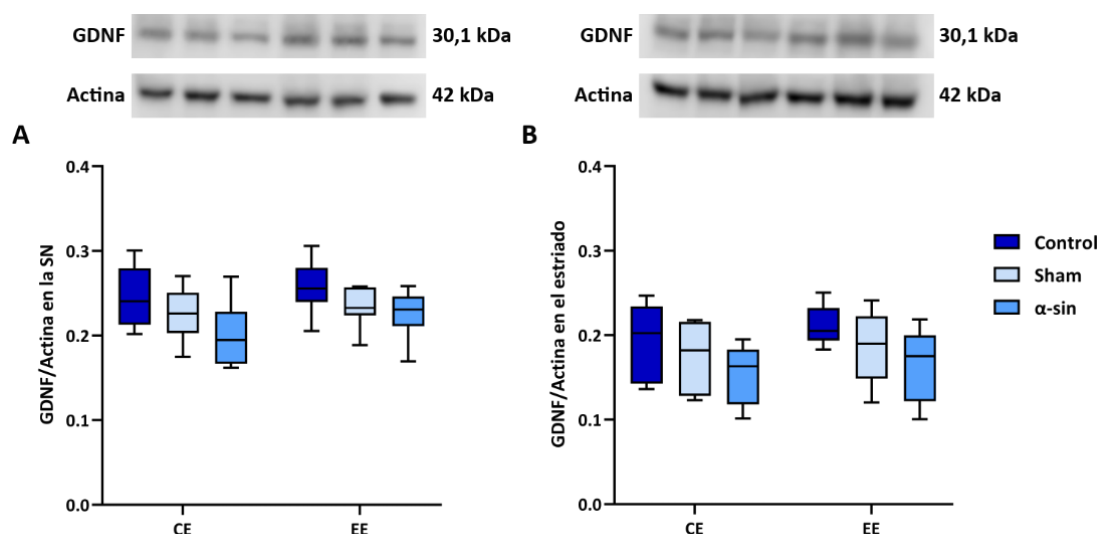


Figura 54. Cuantificación de los niveles de expresión de la proteína GDNF en la vía nigroestriatal de los diferentes grupos experimentales criados en CE y EE. Se analizaron los datos de densidad óptica de GDNF normalizados con actina en la SN (A) y el estriado (B) mediante un ANOVA de tres factores. Las variables independientes consideradas fueron el entorno de cría, la intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -sin. Los resultados se representan mediante Boxplots, que muestran la mediana y el rango intercuartílico de las densidades ópticas obtenidas para el anticuerpo primario contra GDNF normalizado frente a la actina. CE: condiciones estándar, EE: entorno enriquecido.

5.10.5. Análisis de la expresión de Nf-κB

El análisis detallado de la expresión de Nf-κB en la vía nigroestriatal reveló que, en la SN, el entorno de cría no tuvo un efecto significativo ($p=0,704$). Tanto es así, que los valores de densidad óptica de los animales criados en CE y EE fueron muy similares. En CE, los grupos control ($0,14 \pm 0,009$) y sham ($0,16 \pm 0,010$) exhibieron una expresión de Nf-κB similar e inferior en comparación con el grupo α -sin ($0,18 \pm 0,014$). En condiciones de EE, el grupo control ($0,14 \pm 0,005$) continuó mostrando una menor expresión de Nf-κB, seguido por el grupo sham ($0,17 \pm 0,012$), y el grupo α -sin ($0,17 \pm 0,013$) (**Fig. 55A**). Asimismo, ni la intervención quirúrgica ($p=0,084$) ni la sobreexpresión de α -sin ($p=0,264$) tuvieron un efecto significativo sobre la expresión de Nf-κB (**Fig. 55A**). A pesar de la ausencia de efectos significativos, se observó una tendencia en la que los animales sometidos a intervención quirúrgica mostraron una expresión de Nf-κB un 11,5% ($DO=0,02$) superior en comparación con los controles. Una tendencia similar se observó en los animales con sobreexpresión de α -sin, con un aumento del 8,2% ($DO=0,014$) en comparación con los grupos control y sham (**Fig. 55A**).

No se observaron interacciones significativas entre el entorno y la cirugía ($p=0,698$), ni entre el entorno y la sobreexpresión de α -sin ($p=0,264$). Sin embargo, se evidenció una tendencia hacia una expresión de Nf-κB superior en un 10% ($DO=0,018$) en los animales con sobreexpresión de α -sin criados en CE en comparación con los criados en EE (**Fig. 55A**).

En el contexto del núcleo estriado, el análisis reveló que el entorno ($p=0,646$), la cirugía ($p=0,239$) y la sobreexpresión de α -sin ($p=0,132$) tampoco produjeron diferencias significativas en la expresión de Nf-κB. No obstante, se observó una tendencia hacia un ligero aumento, aproximadamente del 8% ($DO=0,016$), en la expresión de Nf-κB en animales con sobreexpresión de α -sin (**Fig. 55B**). Al explorar la expresión de Nf-κB en los grupos experimentales criados en los distintos entornos, se observó que, en CE, el grupo control mostró la menor expresión de Nf-κB ($0,16 \pm 0,006$), seguido por el grupo sham ($0,20 \pm 0,019$), mientras que el grupo α -sin mostró la expresión más elevada ($0,22 \pm 0,022$). Por otro lado, en EE se replicó la misma tendencia observada en CE, donde el grupo α -sin ($0,21 \pm 0,018$) presentó una expresión superior que los grupos control ($0,18 \pm 0,006$) y sham ($0,21 \pm 0,018$) (**Fig. 55B**).

En el núcleo estriado, tampoco se encontraron interacciones significativas entre el entorno de cría y la intervención quirúrgica ($p=0,890$), ni entre el entorno de cría y la sobreexpresión de α -sin ($p=0,466$) (**Fig. 55B**).

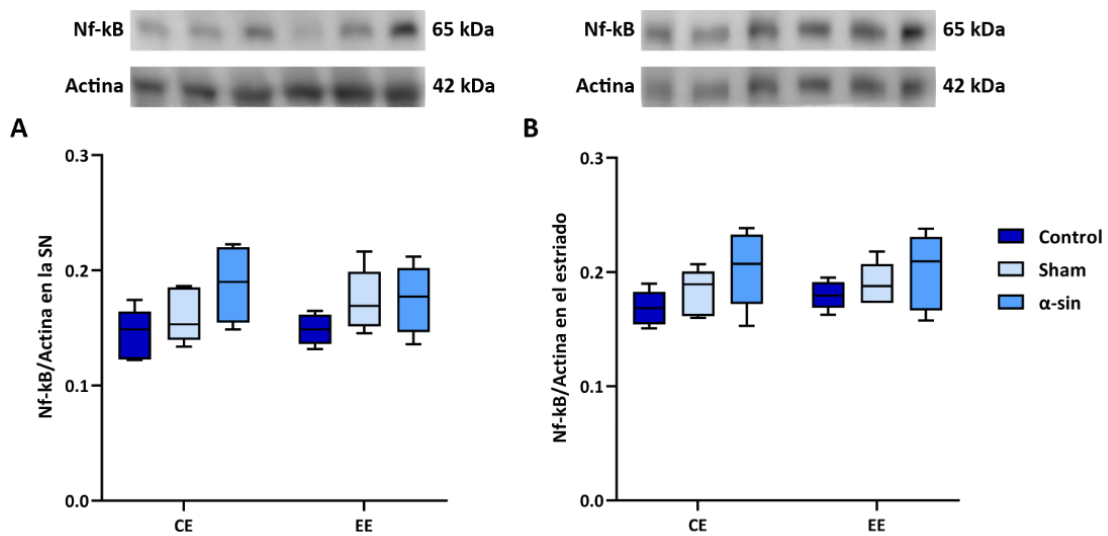


Figura 55. Cuantificación de los niveles de expresión de Nf-κB en la vía nigroestriatal. Se evaluó la densidad óptica de la expresión de Nf-κB normalizado frente a la actina, en la SN (A) y el estriado (B). Los resultados se analizaron mediante un ANOVA de tres factores, considerando el entorno de cría, la intervención quirúrgica y la sobreexpresión de α -sin como variables independientes. Los resultados se representan mediante Boxplots, que muestran la mediana y el rango intercuartílico. CE: condiciones estándar, EE: entorno enriquecido.

5.11. Análisis de correlación de las variables histológicas y moleculares

Con el fin de abordar de manera integral los datos histológicos y moleculares, optamos por llevar a cabo una correlación de medias grupales, seguido de un análisis de correlación de Pearson (**Fig. 51**). Esta metodología implica analizar la relación entre las medias de diferentes grupos, permitiendo identificar posibles asociaciones o patrones conjuntos en los datos obtenidos.

Los resultados histológicos revelaron que la sobreexpresión de α -sin tuvo un efecto negativo en las neuronas TH+, disminuyendo tanto el número celular, como las fibras TH+ en la SN, así como reduciendo la densidad óptica de las fibras dopaminérgicas en estriado.

El análisis de correlación entre las medias grupales reveló una correlación positiva entre la densidad celular de la SNpc (**Fig. 51A**) y las fibras TH+ en SNpr (**Fig. 51B**) con los niveles de p-TrkB/TrkB ($r= 0,98$, $p= 0,0004$ y $r= 0,93$, $p= 0,006$, respectivamente). Además, se observó una relación positiva entre la densidad de fibras TH+ de la SNpr y los niveles de BDNF ($r= 0,88$, $p= 0,022$; **Fig. 51C**). Asimismo, la expresión de GDNF se correlacionó positivamente con la densidad de células dopaminérgicas (**Fig. 51D**) y de fibras TH+ (**Fig. 51E**) en la SN ($r= 0,87$, $p= 0,025$ y $r= 0,83$,

5. Resultados

$p=0,041$, respectivamente). Por otro lado, se encontró una correlación negativa entre la densidad de células Nrf-2+ y la expresión de GDNF en la SN ($r=-0,88$, $p=0,019$; **Fig. 51F**).

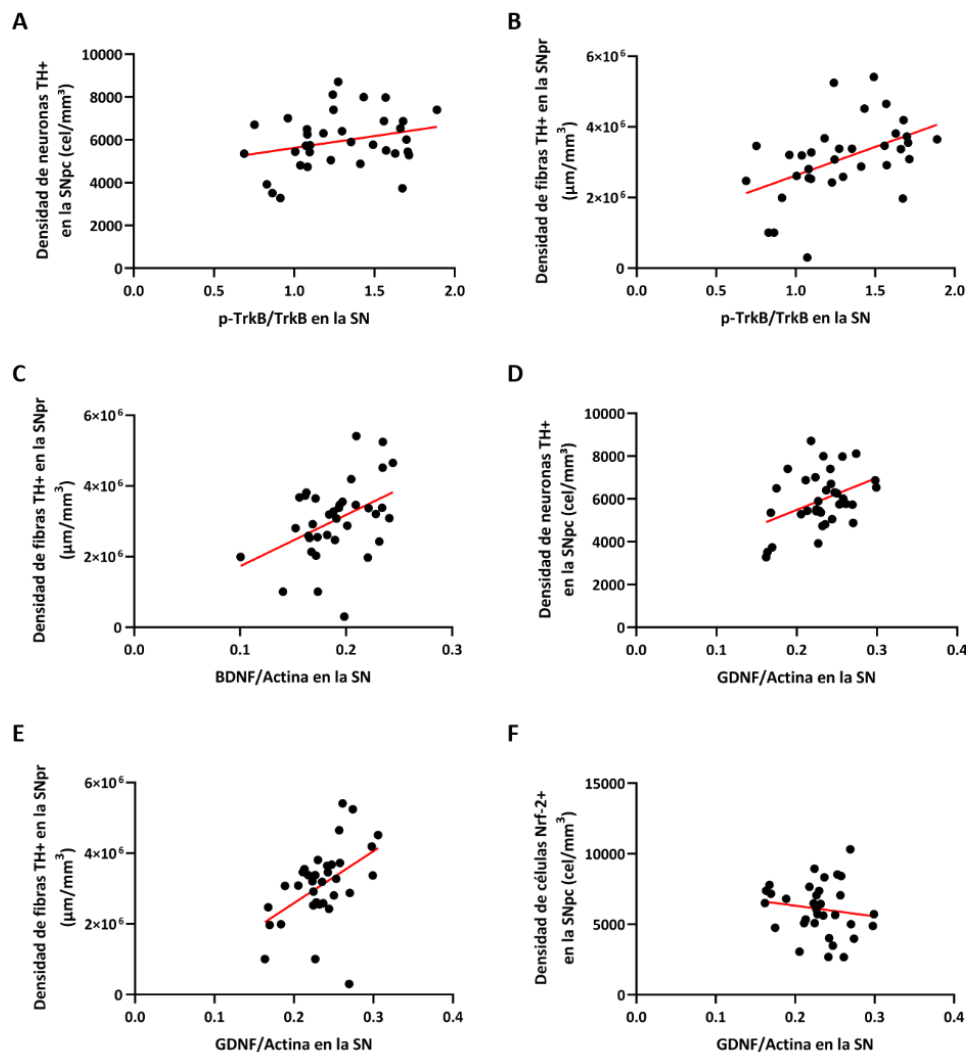


Figura 51. Análisis de correlación de Pearson. Las gráficas muestran las correlaciones halladas en la SN. **A)** Correlación entre la densidad de neuronas TH+ de la SNpc respecto a los niveles de p-TrkB/TrkB. **B)** Correlación entre la densidad de fibras TH+ de la SNpr respecto a los niveles de p-TrkB/TrkB. **C)** Correlación entre la densidad de fibras TH+ de la SNpr respecto a los niveles de BDNF. **D)** Correlación entre la densidad de neuronas TH+ de la SNpc respecto a los niveles de GDNF. **E)** Correlación entre la densidad de fibras TH+ de la SNpr respecto a los niveles de GDNF. **F)** Correlación entre la densidad de células Nrf-2+ de la SNpc y los niveles de expresión de GDNF.

En el estriado se identificaron correlaciones entre la densidad óptica de las fibras TH+ y los factores neurotróficos. Concretamente, se encontró una correlación positiva con los niveles de p-TrkB/TRkB ($r=0,97$, $p=0,001$; **Fig. 52A**), BDNF ($r=0,83$, $p=0,041$; **Fig. 52B**), p-ERK/ERK ($r=0,87$, $p=0,024$; **Fig. 52C**), además de una relación positiva con los niveles de GDNF ($r=0,86$, $p=0,027$; **Fig. 52D**).

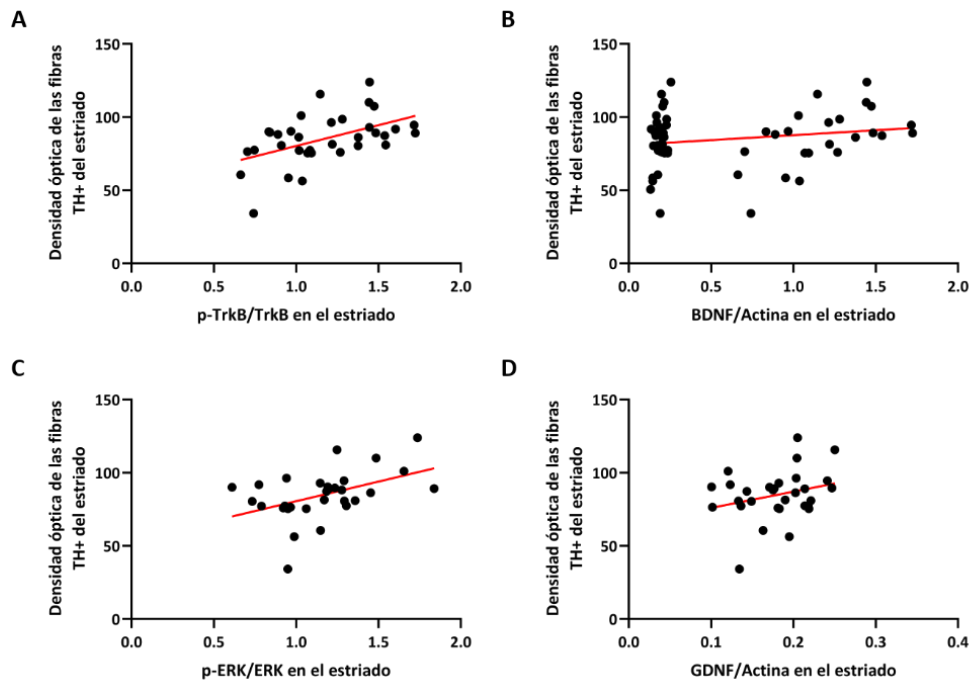


Figura 52. Análisis de correlación de Pearson. Las gráficas muestran las correlaciones de los resultados correspondientes al estriado. En las gráficas se muestra la correlación de la densidad óptica de las fibras del estriado respecto a los niveles de p-TrkB/TrkB (A), BDNF (B), p-ERK/ERK (C) y GDNF (D).

Por lo tanto, en líneas generales, los marcadores moleculares analizados mostraron una correlación significativa con las alteraciones morfológicas causadas por la sobreexpresión de α -sin, sugiriendo que estas vías moleculares podrían estar implicadas en la atenuación de los efectos tóxicos de esta proteína.

6. DISCUSIÓN

A lo largo de las últimas décadas se han desarrollado diversos modelos animales con el objetivo de comprender la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson (EP). Tanto los modelos animales basados en la administración de neurotóxicos, como los modelos animales transgénicos han sido capaces de provocar la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, y, en consecuencia, las alteraciones motoras características de esta enfermedad. A pesar de tratarse de modelos experimentales que han permitido avanzar en la comprensión de la patología, cabe destacar que ninguno de estos modelos ha conseguido replicar la formación de los cuerpos de Lewy (CL). Es por ello por lo que en los últimos años se ha propuesto el uso de virus adenoasociados capaces de sobreexpresar α -sinucleína (α -sin), proteína clave en la formación de los CL, para reproducir la patología de la EP.

Por esta razón, en este trabajo, por un lado, se ha caracterizado y validado un modelo de rata de EP basado en la inyección bilateral de un virus adenoasociado (rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE) que induce la sobreexpresión de α -sin en la SN de ratas de 8 semanas de edad, evaluando así su capacidad para replicar el fenotipo de la enfermedad. Por otro lado, teniendo en cuenta la creciente evidencia del beneficio del entorno enriquecido como estrategia neuroprotectora y no invasiva, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, se ha explorado el impacto del EE en este modelo experimental. Cabe destacar que, hasta el momento, no se ha publicado ningún trabajo realizado en un modelo animal de EP basado en la sobreexpresión de α -sin que haya estudiado el efecto del EE. Por todo ello, en este estudio se ha evaluado la eficacia del EE para atenuar los síntomas motores y las alteraciones patológicas asociadas con la EP.

6.1. Validación del modelo experimental de la EP basado en la sobreexpresión de α -sin mediado por el rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE

El modelo animal de la enfermedad de Parkinson (EP) empleado en este estudio se basó en la sobreexpresión de α -sin mediada por un virus adenoasociado que contenía un promotor específico para neuronas. La inyección del virus se realizó de forma bilateral en la SNpc de ratas macho a la edad de 2 meses, y se estudiaron los posibles efectos de la sobreexpresión de α -sin en la degeneración de la vía nigroestriatal y en la actividad motora.

6.1.1. La inyección de rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE produce una sobreexpresión de α -sin en las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal

En primer lugar, para comprobar si la inyección intracraneal del AAV había dado lugar a la infección de neuronas dopaminérgicas y a la sobreexpresión de α -sin, llevamos a cabo un doble marcaje de TH/ α -sin en la SNpc. En los animales del grupo α -sin, se observó una notable coexpresión de ambos marcadores en este núcleo en todos los puntos temporales analizados. Aun así, el número de células que coexpresaban ambos marcadores fue disminuyendo con el paso del tiempo, hecho que podría estar relacionado con una reducción en la población de células dopaminérgicas causada por la sobreexpresión de α -sin.

La coexistencia de α -sin y TH en la SN indica que el adenovirus empleado (rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE) es válido para infectar neuronas dopaminérgicas. Estudios previos también han descrito una coexpresión de la α -sin en neuronas TH-positivas mediante el uso de diversos vectores virales como rAAV2/5, AAV6 y AAV1/2 en ratas (Koprach et al., 2010; Decressac et al., 2012; Gombash et al., 2013). Asimismo, al igual que en nuestro estudio, la presencia de colocalización ha sido descrita tanto 3 semanas (Koprach et al., 2010) como 3 meses después de la inyección viral (Decressac et al., 2012). Además, esta colocalización también se ha observado en ratones, en un modelo experimental que analizó los efectos del vector viral AAV1/2, 10 semanas después de su inyección (Ip et al., 2017). Por lo tanto, estos hallazgos confirman que los AAV son una herramienta adecuada para inducir la sobreexpresión de α -sin en las neuronas dopaminérgicas.

Por otro lado, teniendo en cuenta que los axones de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc proyectan al cuerpo estriado, analizamos la coexpresión de α -sin y TH en este núcleo. Las imágenes de la doble inmunohistoquímica mostraron una colocalización de α -sin en las fibras TH-positivas del estriado. Resultados similares han sido descritos en otros modelos basados en la sobreexpresión de α -sin con AAV, sugiriendo el transporte anterógrado de esta proteína desde el soma de las neuronas dopaminérgicas ubicadas en la SNpc hasta las terminales sinápticas en el estriado (Decressac et al., 2012; Gombash et al., 2013).

A pesar de que el vector rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE inyectado contiene un promotor específico para neuronas, y haber confirmado la correcta infección de estas células, evaluamos la especificidad neuronal del promotor empleado, estudiando la posible coexistencia de α -sin con las otras poblaciones celulares del SNpc, como son las células gliales. Además de las neuronas dopaminérgicas, que constituyen la población celular predominante de la SNpc (Root et al, 2016), tanto los astrocitos como la microglía tienen una presencia abundante en este núcleo y en el SNC

en general (Verkhatsky et al., 2019; Kam et al., 2020). Con este propósito, se llevaron a cabo ensayos de doble inmunofluorescencia de α -sin frente a marcadores de astrocitos (GFAP) y microglia (Iba-1) tanto en la SN como en el estriado. Las imágenes no mostraron colocalización entre los marcadores gliales y α -sin, reforzando así la validez y la especificidad del promotor utilizado, que se dirige exclusivamente a las neuronas.

6.1.2. Difusión de la α -sin

Una vez determinada la especificidad de la infección y la sobreexpresión de α -sin, se caracterizó la capacidad de difusión de la proteína sobreexpresada. La inmunohistoquímica frente a α -sin, realizada en cortes seriados, mostró que la presencia de la proteína alcanzaba desde regiones mesencéfalicas como el colículo superior y la sustancia gris periacueductal, hasta regiones corticales como la corteza retrosplenial y prefrontal. De hecho, se observó un aumento progresivo de la positividad frente a α -sin a medida que transcurría el tiempo, es decir, desde el primer mes postinyección hasta el cuarto mes postinyección.

Por lo tanto, este modelo animal de enfermedad de Parkinson posee la capacidad de replicar la hipótesis propuesta por Braak et al. (2004), que postula que la progresión de la patología relacionada con α -sin sigue un patrón específico en todo el SNC. Este proceso se inicia en el bulbo olfatorio, el núcleo olfatorio anterior y el núcleo motor dorsal del nervio vago. Desde estas áreas iniciales, la progresión patológica sigue una trayectoria específica, afectando al locus coeruleus, el núcleo reticular gigantocelular y los núcleos rafe caudales. Este avance continúa, alcanzando el subnúcleo central de la amígdala, los núcleos colinérgicos del prosencéfalo basal y la SNpc. Más adelante, se produce una afectación del córtex cerebral, que inicia con el mesocórtex temporal anteromedial. En este punto comienza la fase sintomática de la patología. Posteriormente, se observa la implicación de las áreas corticales de asociación, seguidas por las áreas funcionales primarias, produciendo una afectación generalizada que abarca todo el cerebro (Braak et al., 2003a, 2004). Esta progresión gradual explica nuestros resultados, en lo que, durante los primeros meses, las áreas corticales no mostraron una sobreexpresión significativa de α -sin. Otros autores también han documentado la propagación de α -sin hacia áreas distantes desde el lugar de inyección. En particular, un modelo basado en la inyección estereotáctica bilateral de 3 μ l de AAV- α -sin en la SN de ratas macho reveló la difusión de esta proteína al hipocampo, 10 semanas después de la inyección (Crowley et al., 2018). Además, se ha descrito que inyecciones vagas de AAV desencadenan la sobreexpresión de proteínas y la difusión a larga distancia de α -sin, no sólo

en el cerebro de la rata, sino también en el cerebro del ratón (Helwig et al., 2016). Por último, en estudios *in vitro* se ha visto que las neuronas cultivadas pueden liberar α -sin y absorberla del entorno extracelular (Volpicelli-Daley et al., 2011; Reyes et al., 2015).

Sin embargo, los mecanismos responsables de la propagación de la α -sin aún no se comprenden completamente. En lo que se refiere a la vía nigroestriatal, estudios previos han sugerido que el transporte anterógrado, desde los somas neuronales situados en la SN hasta las terminaciones axonales, es responsable de la expresión generalizada del vector viral en el estriado (Bjorklund et al., 2000). A pesar de que en un inicio se postuló que esta transmisión de α -sin entre diferentes regiones se llevaría a cabo a través de vías anatómicamente interconectadas (Braak et al., 2003a), recientemente se ha postulado que la α -sin se propaga de manera similar a los priones, lo que facilita su difusión en todo el cerebro mediante mecanismos de transmisión célula-célula (Gómez-Benito et al., 2020). Otro estudio reciente también ha descrito que los exosomas obtenidos de pacientes con EP e inyectados en el estriado de ratones son capaces de dispersarse por todo el cerebro (Guo et al., 2020).

En definitiva, la difusión de la α -sin en este modelo experimental sigue un patrón que se asemeja a la progresión descrita en los pacientes de EP. Aunque no se trata de un objetivo de este trabajo de tesis doctoral, la propagación de la esta proteína a otras áreas cerebrales más alejadas de la vía nigroestriatal podría influir en la funcionalidad de todas ellas, resultando de interés evaluar esta posible afectación.

6.1.3. La sobreexpresión de α -sin mediante el vector rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn induce la fosforilación del residuo S129 en la *substantia nigra*

Además de la capacidad de sobreexpresar y de difundir α -sin a otras áreas cerebrales, la validación del modelo animal también conlleva corroborar la capacidad del mismo para generar cuerpos y neuritas de Lewy. Se ha descrito que los cambios en la estructura de α -sin desencadenan la formación de agregados insolubles, constituyendo el componente principal de los CL y NL (Burré et al., 2018). Además, se cree que la fosforilación del residuo Ser129 de la α -sin, principal modificación postraduccional de la proteína, desempeña un papel crítico en la regulación de su estructura y en la formación de agregados, acelerando la conversión patogénica del monómero de α -sin a la forma fibrilar (Maries et al., 2003; Reimer et al., 2018; Gabrielyan et al., 2021; Awa et al., 2022). Cabe destacar que los cerebros de individuos sanos presentan una proporción muy baja

de p- α -sin (Muntane et al., 2012), mientras que, en el cerebro de pacientes con EP, más del 90% de la α -sin insoluble se encuentra fosforilada (Okochi et al., 2000).

Por consiguiente, optamos por estudiar la expresión de p- α -sin, y los resultados revelaron que nuestro modelo experimental sí fue capaz de inducir la fosforilación en el residuo S129 de la α -sin. No obstante, sólo se observó marcaje positivo en la SN, es decir, en el área de inyección. Este resultado podría estar relacionado con lo descrito por Helwig et al. (2016), quienes, tras la inyección del vector AAV2/6 en el nervio vago de ratones hembra, detectaron tanto α -sin monomérica como oligomérica en neuronas de regiones cerebrales más rostrales y no así, las fibrillas. Por lo tanto, sólo las formas más solubles de α -sin desempeñarían un papel significativo en la difusión de esta proteína, a larga distancia en todo el cerebro (Helwig et al., 2016).

Además, se observó que la positividad del marcaje aumentaba a partir de los 2 meses posteriores a la lesión, manteniéndose estable 4 meses después de la lesión. De forma similar a lo detectado en nuestro modelo animal, Yamada et al. (2004) observaron p- α -sin en la SN de ratas lesionadas con 3 μ l del vector viral AAV2/5 en este núcleo, 13 semanas después de la inyección (Yamada et al., 2004). Por otro lado, el modelo animal neurotóxico de EP, basado en la inyección intraperitoneal de 30 mg/kg de MTPT a ratones durante 5 días consecutivos mostró expresión de p- α -sin, 8 días después de haber recibido la última dosis (Hu et al., 2020). Estos resultados, además de resaltar la relevancia de la fosforilación de α -sin en S129 y su implicación en los trastornos neurodegenerativos, ponen de manifiesto la importancia de considerar el factor temporal en la interpretación de la expresión de p- α -sin, así como el modelo animal de EP empleado.

6.1.4. La sobreexpresión de α -sin provoca una degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriatal

Las alteraciones producidas en la estructura de la α -sin tras su sobreexpresión conllevan la formación de agregados insolubles, que se acumulan y ejercen un efecto citotóxico en las neuronas (Burré et al., 2018). En consecuencia, se produce la muerte de las neuronas dopaminérgicas, dando lugar al inicio de los síntomas parkinsonianos (Savolainen et al., 2015; Burré et al., 2018).

En nuestro modelo animal, la sobreexpresión de α -sin indujo una reducción superior al 20% de la densidad de neuronas TH+ en la SNpc entre 1 y 2 meses después de la inyección del virus, y una disminución del 35,22% a los 4 meses postinyección respecto al grupo sham. Además, se observó una disminución progresiva en el número de células TH+ en la SNpc del grupo α -sin a lo

6. Discusión

largo del tiempo, mostrando una densidad un 28,82% menor en el cuarto mes, en comparación con el primer mes postlesión. Estos resultados ponen de manifiesto una degeneración progresiva de la población de neuronas dopaminérgicas de la SNpc tras inducir la sobreexpresión de α -sin. Trabajos previos llevados a cabo en modelos animales de EP, basados en la inyección de virus adenoasociados, detallaron resultados similares a los descritos en este trabajo (Koprach et al., 2011; Decressac et al., 2012; Gombash et al., 2013; Ip et al., 2017; Gubinelli et al., 2022; Negrini et al., 2022). Estos trabajos, además de poner de manifiesto una muerte neuronal inducida por la sobreexpresión de α -sin, describieron una disminución de neuronas TH+ similar a la observada en este estudio. Gombash et al. (2013) determinaron una muerte neuronal del 35% y 60%, 1 y 2 meses después de la inyección de 2 μ l a $1,0 \times 10^{13}$ gp/ml de rAAV2/5- α -sin, es decir, inyectaron el virus a la misma concentración, pero el doble de volumen en comparación a nuestro modelo experimental, provocando en consecuencia, una disminución de neuronas dos veces mayor que en nuestro caso. Asimismo, Decressac et al. (2012) encontraron una muerte neuronal del 40%, 3 semanas después de la inyección de 3 μ l de virus a $3,7 \times 10^{12}$ gp/ml, por lo que en este caso también se refleja la relación del volumen de AAV inyectado con la muerte neuronal inducida. En la misma línea, Negrini et al. (2022) describieron una pérdida del 37% de neuronas en la SNpc, 3 meses después de la inyección unilateral de 2 μ l del vector viral AAV2/9 que sobreexpresaba α -sin humana a 6×10^{12} gp/ml, siendo un resultado similar al obtenido en nuestro modelo animal. Otro estudio reciente también ha mostrado una pérdida aproximada del 30% de las células dopaminérgicas de la SNpc tras 4 meses desde la administración unilateral de 4 μ l de AAV-h-aSYN a $2,5 \times 10^{12}$ gp/ml (Gubinelli et al., 2022), y del 28%, 6 semanas después de la inyección unilateral de 2 μ l del vector viral AAV1/2 A53T α -syn (Koprach et al., 2011). En modelos animales de ratón, la inyección unilateral de 1,5 μ l de AAV1/2-A53T α -sin a una concentración de $5,16 \times 10^{12}$ gp/ml en la SN, registró una pérdida del 33% de las neuronas dopaminérgicas de la SN, 10 semanas después de la inyección (Ip et al., 2017). Por último, Sucunza et al. (2021) emplearon el mismo serotipo AAV9 que en nuestro trabajo para sobreexpresar en este caso, α -sin mutada A53T en la SNpc de *Macaca fascicularis*. Tras la inyección bilateral de 5 μ l del AAV, describieron una pérdida del 39% de las neuronas dopaminérgicas, 3 meses después de la inyección (Sucunza et al., 2021).

Por otro lado, al igual que se detectó la presencia de α -sin en los terminales axónicos del estriado, se produjo una degeneración de dichas fibras. En este caso, al comparar los resultados del grupo α -sin con el grupo sham, no se encontraron cambios significativos 1 mes después de la inyección, mientras que el deterioro se hizo evidente a partir del segundo mes, donde se observó una disminución de las fibras TH+ del 27,48% respecto al grupo sham, superando un umbral de degeneración del 30% a los 4 meses después de la cirugía. La ausencia de cambios notables en

este núcleo durante el primer mes después de la operación estaría relacionado con el hecho de que el proceso degenerativo comienza en la SN, necesitando un mayor periodo de tiempo para que el virus se difunda progresivamente a lo largo de la vía nigroestriatal y llegar así, al cuerpo estriado. De hecho, en modelos animales de la EP basados en la inyección de 6-OHDA en la SN, se vio que inicialmente, el deterioro se presenta en las neuronas dopaminérgicas, afectando posteriormente a las fibras estriatales (Haleagrahara et al., 2013). Además, esta progresión se alinea con la teoría propuesta por Braak, que describe una degeneración inicial de las neuronas dopaminérgicas en la SN durante la fase III de la progresión de la EP, mientras que, durante este mismo periodo, el estriado muestra resistencia al desarrollo de alteraciones patológicas (Braak et al., 2004). Por lo tanto, la degeneración se manifiesta primero en la SN y luego se extiende a otras regiones, como es el caso del estriado.

En cuanto a la disminución de fibras TH+, varios estudios han descrito un deterioro similar al cuantificado en este modelo experimental. Por un lado, en animales experimentales de EP en ratas, la inyección de 2 µl se acompañó de una disminución del 25% entre las 3 y 6 semanas posteriores (Koprich et al., 2010). Asimismo, Gombash et al. (2013) hallaron una pérdida del 42% de las fibras a los 2 meses posteriores a la inyección de 2 µl de AAV, por lo que administraron el doble del volumen, acompañado de una reducción aproximadamente del doble al encontrado en nuestro caso. En cambio, Phan et al. (2017) no encontraron diferencias significativas hasta 4 semanas después de la inyección unilateral de 2 µl de α -sin-rAAV2/6 en la SN de ratas hembra, y se determinó una pérdida del 32,8% en las fibras estriatales 3 meses después de la cirugía. De manera similar, la administración unilateral de 1,5 µl de AAV1/2 que expresaba la variante A53T- α -sin humana mutada en la SN de ratones también indujo una reducción del 20% de las fibras dopaminérgicas en el estriado después de un intervalo de 10 semanas tras la inyección (Ip et al., 2017). Estos últimos resultados vuelven a ser similares a los obtenidos en nuestro trabajo, por lo que podemos concluir que la sobreexpresión de α -sin provocó una degeneración de la vía nigroestriatal que concuerda con la dosis del virus administrada.

En cuanto a la progresión temporal, también hubo evidencia de un deterioro progresivo de las fibras TH+ en los grupos con sobreexpresión de α -sin en relación a los puntos temporales analizados. Se observó una pérdida del 24% de las fibras dopaminérgicas estriatales a los 2 meses, seguida de una disminución pronunciada del 33,9%, 4 meses después de la cirugía, al compararlos con el grupo de 1 mes. En línea con nuestros resultados, Decressac et al. (2012) describieron que la reducción en la densidad de fibras TH+ en el cuerpo estriado estaba relacionada con el tiempo transcurrido desde la inyección nigral. En este trabajo obtuvieron una disminución del 30% de las

6. Discusión

fibras TH+ aproximadamente 3 semanas después de la inyección, y del 60%, 2 meses después de la inyección de 3 μ l de rAAV2/6 WT α -sin.

Todos estos hallazgos destacan, por un lado, la influencia temporal en la densidad de neuronas TH+ de la SNpc y de las fibras TH+ del estriado, y por otro, la importancia de la dosis administrada, ya que las diferencias observadas en la degeneración de la vía nigroestriatal entre los distintos estudios parecen estar relacionadas con la cantidad de virus administrada.

Por otro lado, los resultados mostraron una degeneración más acusada en el periodo comprendido entre los dos primeros puntos temporales analizados (1 y 2 meses postinyección) que entre los dos últimos (2 y 4 meses postinyección). Además, esta diferencia fue más pronunciada en el caso de las fibras estriatales. Este fenómeno podría ser atribuido a un mecanismo compensatorio, en el cual las neuronas sanas aumentan su arborización en un intento por contrarrestar los efectos de la degeneración en la vía nigroestriatal. Este resultado ha sido descrito en varios trabajos a lo largo de las últimas décadas en modelos animales de EP basados en la administración de 6-OHDA (Blanchard et al., 1996; Finkelstein et al., 2000) o MPTP (Porritt et al., 2005). Todos ellos describieron un crecimiento de fibras dopaminérgicas semanas o meses después de la lesión causada por la administración de los neurotóxicos mencionados. En la misma línea, en un estudio reciente, basado en la inyección unilateral de 5 μ l 6-OHDA en la SNpc de ratones, se mostró una pérdida del 50% de las neuronas dopaminérgicas que, tras 90 días desde la administración de la neurotóxico, se acompañó de una compensación de la arborización de los axones de estas neuronas dopaminérgicas (Tanguay et al., 2021).

A pesar de ello, es un hecho constatado que la sobreexpresión de α -sin en la SNpc afecta a las fibras dopaminérgicas que proyectan al estriado. Se ha observado la presencia de degeneraciones patológicas en los terminales estriatales, con una apariencia morfológica similar a los esferoides axonales descritos en pacientes con EP, identificados como un indicador de interrupción del tráfico axonal (Tagliaferro y Burke, 2016) y constituyendo un evento patológico relevante en el desarrollo de esta enfermedad (Sekigawa et al., 2012; Hunn et al., 2015; Tagliaferro et al., 2015). Estas degeneraciones axonales están caracterizadas por la presencia de agregados proteicos que confieren a los axones una apariencia semejante a una "cadena de cuentas". A medida que la enfermedad avanza, los axones experimentan distrofia e hinchazón, para luego segmentarse y fragmentarse en esferoides (Zhou et al., 1998). Estas estructuras, además de α -sin, también contienen otras proteínas como neurofilamentos y ubiquitina, compartiendo similitudes con las neuritas de Lewy (NL) observadas en los pacientes con EP (Kordower et al., 2013). Por lo tanto, además de analizar la densidad óptica de las fibras TH+, se estudió la presencia de agregados

axonales asociados al proceso degenerativo. En nuestro estudio, se detectaron acumulaciones proteicas, conocidas como degeneraciones axonales (axonal swellings), exclusivamente en el estriado de los animales con sobreexpresión de α -sin, volviéndose más prominentes a los 2 meses de la inyección. Estos esferoides experimentaron un aumento de más del 200% a los 2 y 4 meses después de la intervención quirúrgica. Cabe destacar que se encontró una correlación negativa entre la cantidad de degeneraciones axonales y la densidad óptica del tejido estriado, es decir, a medida que aumenta la superficie ocupada por estas acumulaciones, la densidad óptica del tejido estriado disminuye. Por lo tanto, estos hallazgos subrayan la estrecha relación entre la presencia de estas estructuras anómalas de proteínas y el deterioro de la integridad del tejido estriado. Estas alteraciones axonales también han sido descritas previamente en modelos experimentales de EP basados en la sobreexpresión de α -sin mediante AAVs. Van der Perren et al. (2015) observaron neuritas hinchadas en el estriado de ratas inyectadas con 3 μ l del vector viral rAAV2/7 en la SN de ratas. Asimismo, Phan et al. (2017) describieron una disminución en la cantidad de fibras α -sin positivas acompañada de un aumento en el número y tamaño de estas degeneraciones a lo largo del tiempo, por lo que estos trabajos previos están en línea con nuestros resultados.

Además de la SNpc y el estriado, también se analizaron los cambios inducidos por la sobreexpresión de α -sin en la *substantia nigra pars reticulata* (SNpr). La SNpr está compuesta principalmente por neuronas GABAérgicas que proyectan al tálamo, al colículo superior y a la formación reticular, desempeñando así un papel crucial en la ejecución de los movimientos (Takakusaki et al., 2004; Hikosaka, 2007; Faynveitz et al., 2019). Por otro lado, las neuronas dopaminérgicas extienden sus dendritas hasta la SNpr, formando arborizaciones terminales. La presencia de receptores dopaminérgicos en las neuronas GABAérgicas de la SNpr, permite que la dopamina liberada por las neuronas de la SNpc module la actividad de las neuronas GABAérgicas (Faynveitz et al., 2019). Por lo tanto, en el contexto de la EP, la disminución de dopamina producida tras la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, afectaría tanto de forma directa alterando la frecuencia y el patrón de excitación de las neuronas GABAérgicas (Obeso et al., 2000), como de forma indirecta, a través de las variaciones que se producen en las aferencias recibidas procedentes del estriado.

En nuestro estudio, la cuantificación estereológica de las fibras dopaminérgicas de la SNpr mostró una disminución significativa del 45%, 2 meses después de la cirugía. Consistente con nuestros hallazgos, Decressac et al. (2012) también describieron una disminución significativa en la densidad de las fibras dopaminérgicas de la SNpr, 3 semanas después de la inyección nigral de 3 μ l de rAAV2/6 WT α -sin en la SN de ratas, volviéndose más pronunciada entre los 2 y 4 meses después de la cirugía. Resultados similares se han descrito en modelos transgénicos para el gen

LRRK2, donde se encontró una reducción en la densidad de las fibras TH+ (Li et al., 2009; Ramonet et al., 2011). Otros estudios corroboraron este patrón en un modelo de ratones transgénicos *hLRRK2(R1441G)* a la edad de 2-4 meses, sugiriendo que la reducción en la densidad de las fibras dopaminérgicas podría servir como un marcador temprano en la progresión de la enfermedad en modelos transgénicos de EP (Tagliaferro et al., 2015).

Por lo tanto, la sobreexpresión de α -sin produce una degeneración anterógrada de la vía nigroestriatal, provocando una disminución de la densidad de neuronas TH+ en la SNpc, y acompañado de una reducción de la densidad de fibras dopaminérgicas, tanto en el estriado como en la SNpr. Asimismo, la disminución de la sobreexpresión de α -sin en los distintos puntos temporales estudiados y descrita en el apartado anterior, coincide con la pérdida progresiva frente a la positividad de TH a lo largo de la vía nigroestriatal. Por último, cabe destacar que, en términos generales, esta degeneración muestra un comportamiento progresivo en el tiempo, resultando en una afectación mayor a los 4 meses postinyección respecto a los otros dos puntos temporales analizados. Esta progresión pone de manifiesto la existencia de una ventana temporal a tener en cuenta para los estudios de tratamientos neurorescatadores.

6.1.5. Aumento de la reactividad glial en la vía nigroestriatal como consecuencia de la sobreexpresión de α -sin

Además de la degeneración neuronal descrita, numerosos estudios han destacado alteraciones relacionadas con la EP en células gliales. Estudios llevados a cabo en pacientes con EP han descrito, mediante técnicas de imagen nuclear, una activación de la microglía en todo el cerebro (Ouchi et al., 2009). Estos resultados también han sido respaldados por análisis histológicos en tejido *post mortem*, los cuales han revelado activación microglial, no sólo en la SN, sino también en regiones como el putamen, el hipocampo y la corteza (Imamura et al., 2003). Además, se ha demostrado que la activación microglial puede inducir la respuesta de astrocitos reactivos neurotóxicos (Liddel et al., 2017), comprometiendo la supervivencia de los oligodendrocitos (Kiray et al., 2016). Por lo tanto, se sospecha que la patología glial desempeña un papel fundamental en la iniciación y propagación de procesos neuroinflamatorios en todo el cerebro, contribuyendo así al deterioro neuronal característico de la EP.

En el caso del modelo experimental objeto de nuestro estudio, los resultados revelaron un aumento en la expresión de ambos marcadores gliales en la SN de los animales operados (sham y

α -sin), 1 mes después de la cirugía. Además, la proliferación microglial se caracterizó por un aumento significativo de las ramificaciones, acompañado de somas celulares hinchados en estos grupos experimentales. En cambio, en el grupo control, las células mostraron características morfológicas correspondientes a la microglía en reposo. Esta diferencia entre grupos experimentales operados y no operados estaría relacionada con la lesión causada al realizar la inyección intracraneal del AAV. De hecho, en modelos animales de traumatismo craneoencefálico, así como de estrés postraumático se ha descrito un fenotipo microglial hiperramificado y con una mayor longitud de los procesos, 1 mes después de producir la lesión (Smith et al., 2019; Grovola et al., 2023). Asimismo, la proliferación de los astrocitos podría estar relacionada con su participación en la reparación del tejido nervioso lesionado (Jeong et al., 2013).

En línea con los trabajos previamente mencionados, los niveles inflamatorios del grupo sham disminuyeron a los 2 meses postinyección, mostrando un marcaje frente a GFAP e Iba-1 similar a los del grupo control. Esta reducción en la activación glial y en el fenotipo de las células Iba-1+ en el grupo sham, sugiere la recuperación del tejido dañado. Como ya se ha mencionado previamente, los astrocitos juegan un papel fundamental en la respuesta frente a las lesiones cerebrales. Además, se ha propuesto que señales de "encendido/apagado" indican a la microglía si debe mantenerse en un estado ramificado o iniciar la transición hacia una morfología activa (Ziebell et al., 2015). A su vez, para que esta activación microglial y, por ende, su desactivación pueda ocurrir, el SNC debe funcionar correctamente (Schafer y Stevens, 2010), hecho que se cumpliría en el grupo sham, una vez revertidos los efectos de la intervención.

La sobreexpresión de α -sin en cambio, indujo una proliferación glial en la vía nigroestriatal que se mantuvo constante hasta los 4 meses postinyección, y fue más notoria en la SN. Además, las células Iba+ mostraron una hiperramificación acompañada de cuerpos celulares agrandados, es decir, presentaron características de microglía activada. Estudios previos en pacientes con EP ya habían documentado un aumento de la microglía nigral en individuos con esta patología (Gerhard et al., 2006; Smajić et al., 2022), respaldando así la evidencia de que la microglía participa en la respuesta inflamatoria asociada a la EP (Moehle y West, 2015). En modelos animales de la EP también se ha identificado este aumento de la población glial. Farrand et al. (2017) emplearon un modelo de rata basado en la inyección bilateral intraestriatal de 2 μ l de 6-OHDA, en el que 21 días después de la inyección, detectaron una proliferación de astrocitos y microglía. En otro modelo de ratón, basado en la inyección intraperitoneal de lipopolisacáridos (LPS), se observó que la morfología de la microglía después de la inyección se inclinó hacia una apariencia de microglía activada, con cuerpos celulares aumentados y procesos altamente ramificados en la corteza cerebral de estos animales (Kwon et al., 2018). Por otro lado, estudios basados en modelos

animales que sobreexpresan α -sin, han determinado que los agregados de α -sin pueden activar a las células gliales y que la patología neuronal inducida por esta proteína, tiene un papel determinante en la modulación del fenotipo de la microglía activada (Sánchez-Guajardo et al., 2010; Barkholt et al., 2012). Asimismo, en ratones transgénicos se ha descrito un aumento de la microglía activada en la vía nigroestriatal (Su et al., 2008; Watson et al., 2012), así como un aumento de la expresión de GFAP (Iovino et al., 2020). Todos estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo, y se podrían relacionar con lo descrito por Liddel et al. (2017), que demostraron que la microglía activada induce la activación de astrocitos neurotóxicos.

Por lo tanto, en conjunto, nuestros resultados respaldan el papel fundamental de la patología glial en la EP, destacando la necesidad de realizar más estudios que permitan comprender mejor su contribución a la enfermedad.

6.1.6. Deterioro de la actividad motora causada por la sobreexpresión de α -sin

La señalización correcta de los ganglios basales y el tálamo es de vital importancia para el correcto funcionamiento de las vías motoras directa e indirecta. La degeneración dopaminérgica provocada por la sobreexpresión de α -sin conlleva a una disminución de los niveles de dopamina en el estriado que, por consiguiente, podría alterar la actividad motora de estos animales. Con el fin de determinar esta posible afectación motora, se realizó el test de campo abierto. Los resultados mostraron que los animales con sobreexpresión de α -sin experimentaron un empeoramiento significativo en la actividad general, la locomoción y la velocidad media en comparación con los grupos control y sham en los diferentes puntos temporales analizados. Estas alteraciones conductuales se hicieron evidentes a partir de 1 mes después de la cirugía y persistieron en los demás puntos temporales analizados, alcanzando su punto máximo a los 2 meses después de la intervención. Estudios anteriores han descrito resultados similares al inyectar bilateralmente 2 μ l de AAV2 en la SNpc de ratas Wistar, donde observaron una reducción significativa en la distancia recorrida y un aumento en el tiempo de reposo en el grupo α -sin en comparación con el grupo sham (Campos et al., 2013). Oliveras-Salvá et al. (2013) también describieron que la inyección de 2 μ l del vector viral AAV2/7 en la SN de ratones desencadena una reducción significativa en la distancia recorrida después de un periodo de 15 semanas tras la cirugía. Además, en modelos transgénicos A30P, basados en la sobreexpresión de α -sin, se ha observado una disminución significativa en la actividad locomotora a los 8 meses de edad (Ekmark-Lewen et al., 2018). Estos hallazgos corroboran nuestros resultados y refuerzan la

asociación entre la sobreexpresión de α -sin y los déficits motores observados en el modelo experimental de la EP.

Además, el hecho de que las diferencias significativas en el comportamiento comiencen 2 meses después de la cirugía, podría estar asociado con una reducción en la liberación de dopamina en los terminales sinápticos inducida por la degeneración neuronal causada sobreexpresión de α -sin, así como por alteraciones en los terminales postsinápticos del cuerpo estriado, resultantes de niveles reducidos de dopamina (Gombash et al., 2013). En nuestro caso, considerando que los animales son inyectados en la SN, la manifestación de alteraciones conductuales 2 meses después de la cirugía coinciden en el tiempo con la disminución de fibras TH+ acusada en el estriado. Por lo tanto, ese sería el periodo postinyección necesario para que la degeneración axonal provoque una alteración en los niveles de dopamina, dando lugar a los trastornos motores previamente descritos.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, este modelo animal replicaría la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson, produciendo una degeneración anterógrada de la vía nigroestriatal acompañado de la formación de degeneraciones axonales. La muerte de las neuronas infectadas por el vector viral comienza en los somas de estas neuronas, situadas en la SNpc, que son las responsables de la liberación de dopamina a través de sus proyecciones axonales y dendríticas en el cuerpo estriado y la SNpr, respectivamente. En consecuencia, se produce la reducción de los niveles de dopamina, causando así el inicio de los síntomas motores característicos de la enfermedad. Además, reproduce con éxito la progresión temporal observada en los pacientes con EP, generando una patología que se desarrolla de manera gradual. Debido a estas características, este modelo podría ser valioso para el estudio de tratamientos neuroprotectores, ya que la progresión temporal permite determinar el momento adecuado para comenzar la aplicación de estos tratamientos.

6.2. El entorno enriquecido como estrategia neuroprotectora en el modelo animal de EP inducido por el vector rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE

A pesar de que los efectos beneficiosos del entorno enriquecido (EE) hayan sido reportados en distintas patologías neurodegenerativas, hasta el momento, no se han publicado trabajos que estudien el efecto neuroprotector del EE en un modelo animal de EP basado en la sobreexpresión de α -sin inducido por un vector viral. Es por ello, que, tras validar el modelo animal, se estableció el periodo óptimo para investigar el efecto neurorescatador inducido por el EE en este modelo animal. Basándonos en los resultados obtenidos, se escogió el punto temporal correspondiente a los 2 meses postinyección debido a la presencia de una degeneración significativa pero potencialmente reversible, ya que la muerte neuronal resultó superior a los 4 meses y, por consiguiente, a los 2 meses habría neuronas en proceso de degeneración. Así, los animales fueron criados en EE durante 2 meses después de la intervención quirúrgica.

6.2.1. La cría en EE reduce la sobreexpresión de α -sin y su fosforilación en las neuronas de la vía nigroestriatal, sin alterar la capacidad de difusión

El primer análisis realizado para determinar si el entorno de cría provocó cambios en la sobreexpresión de α -sin, fue una doble inmunofluorescencia frente a α -sin y TH en la SNpc, es decir, en el lugar de inyección. Se observó colocalización en los animales criados en ambas condiciones, a pesar de que fue ligeramente menor en animales criados en EE. Esta variación podría estar relacionada con el efecto neuroprotector ejercido por el EE, y es que se ha descrito que el EE influye en el metabolismo de la dopamina, así como en las enzimas relacionadas con su síntesis y degradación, sus receptores y su almacenamiento en vesículas (Jüngling et al., 2018). De esta forma, una posible mejora en la positividad frente a la TH, implicaría de una manera relativa, una menor colocalización de α -sin/TH. En esta línea, un estudio llevado a cabo en ratones con niveles reducidos de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) debido al tratamiento con MPTP y criados en EE durante 3 meses, mostró mejoras en los niveles de expresión de ARNm de TH y un aumento en el número de neuronas inmunorreactivas a TH (Yuan et al., 2009). También se ha descrito que la exposición de ratones tratados con MPTP y criados en EE durante 2 meses resultó en un incremento de células TH+ en la SNpc, proporcionando protección contra la neurotoxicidad inducida por MPTP (Bezard et al., 2003; Goldberg et al., 2011).

Al igual que ocurría en CE, la inyección bilateral con el adenovirus en los animales criados en EE indujo la sobreexpresión de α -sin, no sólo en el lugar de inyección (SNpc), sino también en el estriado, en núcleos mesencefálicos como el colículo superior, el complejo geniculado medial del tálamo y la corteza cerebral. Cabe destacar, que en este caso también se observó una expresión de α -sin reducida respecto a las condiciones estándar en todas las áreas cerebrales analizadas. Estos hallazgos están en línea con trabajos previos realizados tanto con pacientes humanos, como con modelos animales. Iofrida et al. (2017) reportaron una menor presencia de α -sin en los glóbulos rojos de humanos que realizaban un entrenamiento físico 3 veces por semana, respecto a aquellos que llevaban una vida sedentaria. Por otro lado, un estudio realizado con ratones transgénicos A53T α -sin de la línea M83 demostró que, tras 2 meses de ejercicio regular en la cinta de correr, se produjo una reducción significativa en la expresión de α -sin en las neuronas TH+ de la SNpc (Dutta et al., 2022).

Uno de los posibles mecanismos por el cual los animales criados en EE muestran una menor expresión de α -sin podría estar relacionado con los sistemas de degradación de proteínas. La α -sin puede ser degradada por el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y la vía autofágica-lisosomal (ALP), habiéndose demostrado una disfunción de ambos mecanismos durante el desarrollo de la EP (Webb et al., 2003; Lees et al., 2009; More et al., 2013). En consecuencia, además de disminuir la degradación de esta proteína, mediante el uso de modelos animales genéticos se ha demostrado que se produce un aumento de las variantes tóxicas de la proteína, que darían lugar a la formación de agregados (Balestrino y Schapira, 2020; Senkevich y Gan-Or, 2020). En modelos animales de EP basados en la inyección de neurotóxicos y vectores adenovirales también se han descrito alteraciones de la vía autofágica-lisosómica (Chu et al., 2007; Decressac et al., 2013). En cambio, un estudio reciente ha mostrado que la cría en EE aumenta la función del mecanismo de la vía autofágica-lisosomal en un modelo animal de EP, dando lugar a una mejora sináptica mediada por la autofagia (Xu et al., 2023). Zhang et al. (2022) también han sugerido que el EE potencia la autofagia inhibiendo la actividad de la rapamicina en mamíferos, a través de su participación en las vías de señalización MAPK/ERK 1/2, lo que, en última instancia, puede inducir un aumento en el flujo autofágico, al mejorar la disfunción lisosomal.

Además de la difusión de la α -sin, se analizó la capacidad de fosforilación de esta proteína. Observamos que, de manera similar a lo observado en CE, la p- α -sin permanecía en el sitio de inyección en los animales criados en EE. Sin embargo, el nivel de expresión de p- α -sin fue inferior en los animales criados en EE al compararlos con los criados en CE. Este resultado también se ha descrito en otros modelos animales. Un estudio reciente ha demostrado que en ratones de la línea transgénica hA53T α -sin G2-3, criados durante 2 meses en EE, la densidad de p- α -sin en la SN

tendía a disminuir respecto los animales criados en CE (Kim et al., 2021). Dutta et al. (2022) también han descrito que la realización de ejercicio físico durante 2 meses, se acompañó de una reducción en la expresión de esta proteína en la SN de ratones transgénicos A53T α -sin de la línea M83. Esta disminución podría estar relacionada con el papel de la α -sin en la regulación del complejo receptor de proteína de fijación soluble sensible al factor N-etilmaleimida (SNARE) y el tamaño de las vesículas sinápticas (Darios et al., 2010; Scott y Roy, 2012). Se ha descrito que la p- α -sin puede unirse a las proteínas SNARE e interrumpir sus funciones (Garcia-Reitböck et al., 2010), mientras que la cría en EE aumenta la expresión de proteínas SNARE, al mismo tiempo que reduce la expresión de p- α -sin (Kim et al., 2021), lo que sugiere un posible mecanismo neuroprotector en la patología de la EP.

6.2.2. El entorno enriquecido aumenta la supervivencia de las neuronas en proceso de degeneración en la vía nigroestriatal tras la sobreexpresión de α -sin

Los cambios observados en la sobreexpresión de α -sin entre animales criados en condiciones estándar y entorno enriquecido, podrían a su vez, reflejarse en diferencias en la degeneración observada en la vía nigroestriatal. Para determinar si el EE era capaz de revertir la degeneración dopaminérgica observada en el grupo α -sin, se cuantificó la densidad de neuronas TH+ en la SNpc y las fibras TH+ tanto en el estriado como en la SNpr.

En primer lugar, se analizaron los cambios en la SNpc, donde los resultados estereológicos revelaron una reducción significativa del 20% en la densidad de neuronas dopaminérgicas entre los animales del grupo α -sin y sham criados en EE. Al comparar los animales criados en EE y CE, a pesar de no alcanzar una significancia estadística, se observó una clara tendencia hacia una mayor preservación celular en los animales criados en EE. Tanto es así que los animales criados en EE mostraron una densidad de células TH+ un 11,5% mayor que los criados en CE. Más concretamente, en el grupo α -sin, se evidenció un incremento del 16,3% en la densidad neuronal de los animales criados en EE respecto a los criados en CE. Esta tendencia ya había sido documentada en otros modelos animales. Un estudio reciente, llevado a cabo con ratones transgénicos C57BL/6; Prnp-SNCA*A53T y criados en EE durante 8 semanas, mostró una mayor conservación de las células TH+ en la SN (Cho et al., 2022). Por otro lado, un modelo de rata basado en la inyección unilateral de 7,5 μ g de 6-OHDA en el estriado reveló un aumento estadísticamente significativo en el número de neuronas TH+ en la SN respecto al control, después de 1 semana de cría en EE (Requejo et al., 2018).

En el caso de las fibras TH+ del estriado, se observó una disminución significativa del 15,8% en los animales con sobreexpresión de α -sin, mientras que la cría en EE exhibió un incremento significativo del 24,09% en la densidad óptica, en comparación con los animales criados en CE. Este aumento fue especialmente destacado en el grupo de animales con sobreexpresión de α -sin, donde se registró un incremento en la densidad óptica de fibras dopaminérgicas estriatales de aproximadamente un 30% al comparar los criados en EE respecto a los criados en CE. Estos resultados concuerdan con trabajos previos. Anastasía et al. (2009) describieron un efecto neuroprotector del EE sobre las fibras dopaminérgicas tras la administración de 4 μ l de 6-OHDA en el haz medial del cerebro, y criadas en EE durante 3 semanas, antes y después de la lesión. En la misma línea, otro estudio más reciente ha puesto de manifiesto un aumento de la densidad óptica en el estriado de los animales lesionados con 6-OHDA tras haberlos sometido a ejercicio físico (5 días/semana) durante 4 semanas respecto al grupo sedentario (Shi et al., 2017). Estos hallazgos sugieren que el EE mejora la preservación de las estructuras dopaminérgicas. Concretamente, en nuestro estudio, la densidad óptica del grupo α -sin criado en EE, mostró valores equiparables a los del grupo control criado en CE, sugiriendo que la cría en EE logró atenuar los efectos de la sobreexpresión de α -sin. Y es que el EE no solo aumenta los niveles de actividad física, sino también de la estimulación sensorial (Nithianantharajah y Hannan, 2006), lo que podría haber posibilitado esta recuperación. De hecho, una investigación basada en la inyección bilateral de 3 μ l de AAV2/6- α -sin en la SN de ratas, estabuladas en jaulas con ruedas de ejercicio durante 40 semanas indicó que, la carrera voluntaria no logró rescatar la degeneración parcial de las terminales nerviosas dopaminérgicas en el estriado (Crowley et al., 2018), lo que subraya que la interacción entre los diversos componentes del EE promueve un mayor efecto neuroprotector que el ejercicio físico aislado.

Además de comprobar que el EE inducía una recuperación de las fibras TH+ en el estriado, se analizó la presencia de agregados axonales en este núcleo. Los resultados mostraron una disminución significativa, tanto desde una perspectiva cualitativa como cuantitativa, en la incidencia de degeneración axonal en los sujetos del grupo α -sin criados en EE, en comparación con los criados en CE. Concretamente, la superficie ocupada por las degeneraciones axonales en los individuos criados en EE fue un 62% menor que en los criados en CE. La disminución en la presencia de agregados axonales mostró una correlación negativa respecto a la densidad de fibras TH+ en el estriado de ambos grupos experimentales, siendo más pronunciada en el grupo criado en EE, lo cual sugiere, junto con los cambios observados en la densidad de neuronas TH+ en la SNpc, la participación de mecanismos protectores vinculados a la cría en EE.

6. Discusión

Dada la importancia funcional de la SNpr, y basándonos en el efecto negativo causado por la sobreexpresión de α -sin en los animales criados en CE, se estudió el efecto de la cría en EE sobre este núcleo. El análisis estadístico de la cuantificación de las fibras dopaminérgicas en la SNpr, reveló una disminución del 20,25% de las fibras en los animales inyectados con α -sin en comparación con los que carecían de ella, considerando conjuntamente los criados en CE y EE. Este patrón ya había sido observado en CE, donde la sobreexpresión de α -sin impactó significativamente en la densidad de estas fibras dopaminérgicas. En este contexto, se observó que este entorno de cría pudo revertir la degeneración dopaminérgica en la SNpr en los animales operados. En CE, los animales sometidos a cirugía mostraron una disminución relativa del 40% en las fibras TH+, en contraste con el grupo control. Sin embargo, en EE, esta disminución se limitó al 11%. Estos resultados sugieren que el EE puede prevenir la pérdida de fibras TH+ en la SNpr en aproximadamente un 75%. En particular, se observó que en los animales sometidos a intervención quirúrgica, el EE propició un aumento del 37,5% en la densidad de fibras en comparación con los operados criados en CE. Por lo tanto, se ha demostrado que la SNpr manifiesta una notable plasticidad ante el EE, mostrando la capacidad de restaurar la reactividad de las fibras TH+. Bechard et al. (2017) también encontraron un aumento en la densidad óptica de las fibras TH+ de la SNpr tras la cría en EE durante 3 semanas, en comparación con el grupo de animales criados en CE. Estos resultados resaltan el impacto notable de la cría en EE en la SNpr, incluso en ausencia de intervención quirúrgica.

Es importante destacar que el impacto atenuado del EE en la densidad de neuronas TH+ de la SNpc, sería posiblemente atribuible a que, al tratarse de la zona de inyección del AAV, la degeneración de las neuronas comienza por los somas y, en consecuencia, los mecanismos neuroprotectores asociados con el EE podrían tener una eficacia reducida en la SNpc en comparación con otras regiones afectadas más tardíamente. Estos hallazgos concuerdan con investigaciones previas que describieron que no hubo diferencias en el porcentaje de células TH+ en la SN de ratas lesionadas unilateralmente con 2 μ l de 6-OHDA, criadas en un EE postnatal o en CE (Jungling et al., 2017).

Las causas exactas por las cuales el EE protege las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal frente a la toxicidad inducida por la sobreexpresión de α -sin aún no se conocen por completo. Por un lado, hay evidencias que sugieren que los niveles alterados de los receptores de dopamina 1 (D1) y 2 (D2) están asociados con los síntomas de la EP (Rassu et al., 2017), y se ha observado que el EE es capaz de reestablecer los niveles normales de estos receptores (Cho et al., 2022). Por otro lado, los efectos beneficiosos del EE podrían estar relacionados con un aumento en la expresión del BDNF, como se ha observado en diversos modelos animales de la EP inducidos

por 6-OHDA y MPTP (Ickes et al., 2000; Campêlo et al., 2017). Estudios previos también han descrito un aumento en la expresión de BDNF en el hipocampo de ratas envejecidas, relacionado con un incremento significativo en el crecimiento de las neuritas en animales criados en EE (Neidl et al., 2016; Hutson et al., 2019). Asimismo, la función protectora del EE frente a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, podría estar relacionada con su capacidad para mitigar y modular la neuroinflamación, así como para modificar la expresión de moléculas pro- y antiinflamatorias (Cotman et al., 2007; Singh et al., 2020). Por último, el papel del entorno enriquecido sobre la modulación del estrés oxidativo, otra característica fisiopatológica de la EP, podría a su vez, contribuir a una mejora de los cambios morfológicos observados. Recientemente, se han estudiado los cambios en los niveles de enzimas de desintoxicación, tales como el citocromo P450 familia 1 subfamilia A miembro 2 (CYP1A2), la paraoxonasa 1 (PON1), y la alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1), en un modelo de ratón transgénico B6.Cg-Tg [Prnp-SNCA*A53T] criado en EE durante 2 meses, mostrando que el EE fue capaz de reestablecer los niveles enzimáticos y por lo tanto, de reducir el estrés oxidativo (Wi et al., 2018).

A continuación, teniendo en cuenta que, hasta el momento, no se han estudiados los efectos del EE en un modelo animal basado en la sobreexpresión de α -sin mediante la inyección de un virus adenoasociado, analizaremos la implicación de algunos de estos mecanismos en nuestro modelo experimental.

6.2.3. El entorno enriquecido revierte la disminución de los niveles de BDNF-TrkB-ERK causado por la sobreexpresión de α -sin

Entre los posibles mecanismos moleculares que subyacen al efecto neuroprotector del EE, destaca su papel modulador en la expresión de factores neurotróficos, que inducen cambios estructurales significativos en el cerebro (Mohammed et al., 2002; Wassouf et al., 2018).

Se ha descrito que la cría en EE aumenta entre otros, la expresión de BDNF, cuyo efecto neuroprotector está mediado por la activación de la vía TrkB/MAPK/ERK1/2/IP3K/Akt (Numakawa et al., 2010). La vía de señalización BDNF-TrkB regula múltiples procesos neuronales críticos, como el crecimiento dendrítico, la maduración y estabilización de las espinas dendríticas (Gorski et al., 2003; Kwon et al., 2011; Orefice et al., 2013), así como la plasticidad sináptica (Chen et al., 2017a; Leal et al., 2017). Además, esta vía activada por el BDNF, aumenta la supervivencia neuronal actuando sobre la apoptosis, la neurotoxicidad provocada por el glutamato y el óxido nítrico, o el

daño celular inducido por el estrés oxidativo (Petersén et al., 2001; Numakawa et al., 2010; Wu et al., 2019).

En el contexto de la EP, se ha demostrado que las neurotrofinas previenen la muerte celular y promueven la proliferación y maduración neuronal, potenciando el crecimiento y la funcionalidad de las neuronas afectadas (Awad et al., 2015; Sampaio et al., 2017). Además, se ha descrito que la disfunción de la transducción de señales mediada por ERK, que pertenece a la familia de quinasas activadas por mitógenos (MAPK), contribuye significativamente a la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas, como la EP (Rai et al., 2019). Estas cascadas de MAPK son fundamentales para regular procesos biológicos, como la proliferación celular, la diferenciación y las respuestas al estrés (Keshet y Seger, 2010; Plotnikov et al., 2011; Sabio y Davis, 2014). Nuestros resultados mostraron que, en concordancia con los cambios morfológicos descritos, la sobreexpresión de α -sin y la cría en EE produjeron alteraciones en la expresión de las proteínas relacionadas con funciones neuroprotectoras en las regiones clave de la vía nigroestriatal.

En cuanto al efecto de la sobreexpresión de α -sin, se encontró una reducción en la expresión de BDNF de un 14% en la SN, y de un 10% en el estriado de estos animales. Esta disminución en la expresión de la neurotrofina, se acompañó de una disminución significativa de la ratio de p-TrkB/TrkB tanto en la SN como en el estriado (18% y 20,97%, respectivamente), lo que sugiere una menor activación de la vía BDNF-TrkB en los animales con sobreexpresión de α -sin en comparación con los grupos control y sham. Asimismo, la fosforilación de ERK aguas abajo mostró la misma tendencia, es decir, los animales con sobreexpresión de α -sin mostraron una reducción en la ratio p-ERK/ERK, tanto en la SN como en el estriado (11,5% y 15,6% respectivamente), respecto al grupo sham. Por lo tanto, estos resultados están en línea con lo descrito en trabajos previos, tanto en estudios clínicos de la EP como en modelos experimentales de esta enfermedad. Concretamente, en pacientes de EP se ha documentado un descenso en los niveles de BDNF, tanto en sangre como en el cerebro (Howells et al., 2000; Scalzo et al., 2010; Sampaio et al., 2017), y se ha visto que se altera el transporte del BDNF en las neuronas (Chu et al., 2012), además de inhibir la síntesis de dopamina (Kang et al., 2017). Asimismo, en modelos animales transgénicos y basados en la inyección de 6-OHDA se ha descrito la reducción de la expresión de BDNF, tanto en la SN como en el estriado (Real et al., 2013; Fang et al., 2017).

Para que los cambios en la expresión de BDNF estén relacionados con un aumento en la activación de la vía de señalización mencionada previamente, es necesario analizar la expresión del receptor TrkB y su fosforilación. Tuon et al. (2014) encontraron una reducción de la expresión

de TrkB en el estriado y en el hipocampo de ratones lesionados unilateralmente con 6-OHDA en el estriado, en comparación con el grupo sham. Posteriormente, Sconce et al. (2015b) describieron una disminución significativa en los niveles de p-TrkB en la SN, que a su vez estaba asociada a una reducción no significativa en la expresión de la proteína BDNF respecto al grupo sham, en un modelo de ratón de MPTP. Modelos experimentales basados en la sobreexpresión de α -sin también observaron una reducción en la fosforilación de TrkB (Kang et al., 2017). Además, estos autores, constataron que el receptor TrkB colocalizaba con la proteína α -sin en los CL de pacientes con EP, exhibiendo una positividad para p-TrkB considerablemente más tenue que los niveles totales de TrkB (Kang et al., 2017).

Además de la fosforilación del receptor, la activación de moléculas de la vía de señalización también pone de manifiesto la funcionalidad de la vía. Concretamente, un trabajo reciente estableció una conexión entre la disfunción motora relacionada con la EP, y la activación disminuida de la vía de señalización ERK/MAPK, así como un desequilibrio en los niveles de dopamina en el estriado (Mariani et al., 2019). En la misma línea, Bilge et al. (2020) mostraron una disminución en la expresión de p-ERK en el estriado de ratas, 10 días después de la administración de rotenona en la SNpc y en el VTA (Bilge et al., 2020). Por lo tanto, todos estos hallazgos respaldan y amplían nuestras observaciones sobre la influencia negativa de la α -sin en la activación de la vía BDNF-TrkB-ERK1/2 en la EP.

Por otro lado, los resultados también mostraron un efecto significativo del entorno enriquecido sobre la expresión de estas moléculas. Tanto en la SN como en el estriado, los animales mostraron un aumento de la expresión del BDNF (10,73% y 11%, respectivamente), de la activación de su receptor (p-TrkB/TrkB; 18,45% y 16,47%, respectivamente) y de la activación de la vía de señalización aguas abajo (p-ERK/ERK; 18,7% y 15,42%, respectivamente) en comparación con los animales criados en CE. Resultados similares han sido descritos en trabajos previos llevados a cabo en otros modelos animales, donde se ha descrito un aumento de la expresión de TrkB, BDNF y la ratio p-ERK/ERK (Faherty et al., 2005; Bengoetxea et al., 2018; Wang et al., 2022; Xu et al., 2022). Por lo tanto, quedaría demostrado que la estimulación ambiental ejerce una influencia significativa en la regulación de la expresión de neurotrofinas, activando así, las vías neuroprotectoras.

Cabe destacar que este incremento entre los entornos de cría fue más notorio en el grupo con sobreexpresión de α -sin. Mientras que en los animales criados en EE se encontró una tendencia al aumento de la expresión del BDNF del 11,88% y del 15% en la SN y en el estriado, respectivamente, la mejora fue significativa en el caso de la ratio p-TrkB/TrkB (18,5% en la SN y

6. Discusión

21% en el estriado), y se acompañó de un aumento en la relación p-ERK/ERK en ambos núcleos (12,81 en la SN y 11,5% en el estriado) en comparación con los animales del grupo α -sin criados en CE. Por ende, el EE demostró ser capaz de contrarrestar los efectos de la sobreexpresión de α -sin sobre los niveles de estas proteínas.

Trabajos previos han descrito resultados similares en cuanto al efecto neuroprotector del EE y del ejercicio físico, y, sobre todo, han sido llevados a cabo en modelos animales basados en la administración de neurotóxicos. En un modelo de ratón progresivo de EP, inducido por el tratamiento repetido con bajas dosis de reserpina, la exposición a EE durante 3 meses condujo a un aumento en los niveles de BDNF en el estriado (Fernandes et al., 2012). Asimismo, el ejercicio físico por sí solo también indujo un incremento significativo en los niveles del BDNF en la SN de ratones inyectados con MPTP (Lau et al., 2011; Zhao et al., 2014). Por otro lado, en animales inyectados con 6-OHDA, se observó que la práctica de ejercicio durante 60 días antes de la inyección, resultó en un aumento significativo en los niveles de TrkB en el estriado e hipocampo de estos animales (Tuon et al., 2014). En un estudio adicional, la práctica de ejercicio durante 4 semanas antes la administración intraperitoneal de lipopolisacárido (1 mg/kg), previno la pérdida de neuronas dopaminérgicas y restauró los niveles de moléculas de señalización BDNF-TrkB en la SN (Wu et al., 2011). Estos resultados también han sido corroborados en estudios con seres humanos, donde se ha observado un aumento en la actividad de TrkB en los linfocitos de pacientes con enfermedad de Parkinson que participaron en un programa intensivo y aeróbico durante 4 semanas (Fontanesi et al., 2016). Todo ello concuerda con un estudio reciente en el que, mediante un metanálisis basado en datos de modelos animales de EP, se ha demostrado que el ejercicio incrementó los niveles de TrkB (da Costa Daniele et al., 2020). Esta observación se alinea con trabajos previos que han demostrado que una intervención de ejercicio aeróbico durante 2 y 4 semanas resultó efectiva para aumentar la expresión de p-ERK1/2 en ratones lesionados con 6-OHDA en el estriado (Choe et al., 2012; Wang et al., 2022). Este incremento en la expresión de p-ERK, inducido por el ejercicio físico, desencadena un aumento en la expresión de los receptores D2 en el estriado, protegiendo selectivamente las espinas dendríticas con estos receptores (Real et al., 2013; Chen et al., 2015, 2017b).

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, los resultados muestran que la cría en EE aumenta la expresión del BDNF, activando la cascada de señalización neuroprotectora a través de su unión, y consiguiente fosforilación de su receptor TrkB. Además, estos cambios moleculares muestran correlación con los cambios morfológicos descritos en este modelo experimental de la EP. Por un lado, el análisis de correlación de medias grupales reveló una correlación positiva entre la densidad celular de la SNpc y la expresión p-TrkB/TrkB. Investigaciones previas han respaldado

esta idea al demostrar que el aumento de la expresión de TrkB en el cerebro de ratones transgénicos B6;129X1-Snca^{tm1Rosl}, conduce a un incremento en el número de neuronas dopaminérgicas TH+ (Kang et al., 2022). Asimismo, también hemos encontrado una correlación positiva entre la expresión de BDNF y la densidad de fibras TH+, tanto en la SN como en el estriado, es decir, el aumento en la expresión de BDNF contrarresta la degeneración de las fibras dopaminérgicas. Además, los niveles de expresión de p-ERK/ERK también muestran una correlación positiva con las fibras dopaminérgicas estriatales. Todos estos resultados corroboran lo descrito en estudios previos, donde la inhibición del gen que codifica el BDNF resultó en la pérdida de neuronas dopaminérgicas en ratones, confirmando así la función protectora del BDNF contra lesiones y procesos degenerativos (Baquet et al., 2005; Gerecke et al., 2010). Además, este factor neurotrófico aumentó la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en la SN de ratas lesionadas con 6-OHDA (Nam et al., 2015) y el crecimiento de axones dopaminérgicos, cuando el gen *Bdnf* fue transducido 6 semanas después de la lesión axonal, a ratones inyectados con 6-OHDA (Kim et al., 2012). En pacientes con EP se ha visto que la concentración disminuida de BDNF en suero y cerebro se acompaña de un aumento en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, lo que conduce a trastornos del movimiento y déficit cognitivo (Wang et al., 2016; Lin et al., 2017; Huang et al., 2018).

En la misma línea, se ha descrito que la activación de la señalización p-TrkB/p-Akt conduce a la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP (CREB), lo que a su vez, provoca un aumento en la producción de BDNF. Este incremento en los niveles de BDNF en el cerebro refuerza la vía neurotrófica del TrkB, contribuyendo así a la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas y al aumento de los niveles de TH (Kang et al., 2022). Por último, Cao et al. (2017) determinaron que el incremento de la fosforilación de ERK1/2 estaría implicado en la supervivencia de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y de las fibras en el estriado de ratones tratados con MPTP.

En este contexto, la modulación en los niveles de BDNF y p-TrkB/TrkB inducido por el EE podría contribuir a la normalización de los niveles de activación del receptor TrkB. En la ratio p-TrkB/TrkB, los valores de expresión en el grupo α -sin criado en EE se asemejan a los del grupo sham criado en CE. Esta similitud sugiere que el EE no sólo induce un aumento significativo de BDNF y p-ERK/ERK, sino que también contrarresta los efectos adversos de la sobreexpresión de α -sin en los niveles de p-TrkB/TrkB.

En resumen, nuestros hallazgos revelan que la exposición a EE aumenta los niveles de factores neurotróficos y la activación de las vías de señalización clave en la función neuroprotectora como

son el BDNF y la relación p-Trkb/TrkB y p-ERK/ERK, ofreciendo perspectivas valiosas sobre su potencial impacto positivo en enfermedades neurodegenerativas como la EP.

6.2.4. Papel del EE sobre las células gliales: disminución de la neuroinflamación y aumento de la expresión del GDNF

Mientras que la sobreexpresión de α -sin provocó un aumento de la reactividad glial, el análisis cualitativo de las inmunohistoquimias frente a GFAP e Iba-1 reveló una reducción de estos marcadores en los animales criados en EE, siendo esta reducción mayor en el grupo α -sin. Además, también se observaron diferencias morfológicas, sobre todo en la población microglial, donde los animales sometidos a intervención quirúrgica y criados en EE mostraron células Iba-1+ con menos ramificaciones y con somas no hinchados. Estos hallazgos sugieren un papel potencial modulador del EE sobre la respuesta glial, que promueve un estado microglial no activado asociado con la reducción de marcadores neuroinflamatorios (Ali et al., 2019) y, que, por lo tanto, ofrecería una vía para mitigar la inflamación causada con la sobreexpresión de α -sin en modelos de EP.

A pesar de que no se han encontrado estudios que hayan analizado los cambios en la reactividad glial en modelos de EP criados en EE, diversos estudios han determinado que el efecto neuroprotector de la actividad física, uno de los principales componentes del EE, está relacionado con la prevención y la modulación de los procesos inflamatorios (Cotman et al., 2007). En modelos animales basados en la administración intraperitoneal de MPTP, se ha descrito una disminución de la expresión de GFAP en la SN de ratas, tras 2 (Sconce et al., 2015a) y 10 semanas de actividad física (Palasz et al., 2019a), alcanzando niveles similares al grupo control. En la misma línea, Dutre et al. (2012) mostraron que tras la inyección unilateral de 3 μ l de 6-OHDA en el haz medial del cerebro anterior de ratas, se observó una reducción de GFAP en el estriado de estos animales después de 32 días de ejercicio físico. En cuanto a la expresión de Iba-1, también se ha descrito una disminución de la misma en roedores tratados con MPTP (Palasz et al., 2019a) y 6-OHDA (Real et al., 2019) tras la exposición a ejercicio físico. Asimismo, un estudio reciente basado en un modelo de ratón tratado con MPTP demostró que el ejercicio en cinta de correr, realizado durante 1 hora al día/5 días a la semana durante 6 semanas, suprimía la activación de la microglía en la SN desencadenada por MPTP, al mismo tiempo que inducía un cambio en la morfología de estas células (Wang et al., 2021), siendo estos hallazgos similares a los descritos en nuestro estudio. Cabe destacar que, en modelos animales de otras patologías neurodegenerativas como el

Alzhéimer, se ha observado un efecto similar del EE. Un modelo de ratón mostró que, tras la cría en EE durante 8 semanas, la morfología microglial presentó un estado menos activo que los criados en CE (Xu et al., 2016).

Los mecanismos por los cuales el EE puede mitigar la neuroinflamación inducida por la sobreexpresión de α -sin pueden estar relacionados con cambios en la expresión de moléculas proinflamatorias o antiinflamatorias por parte de los astrocitos y la microglía. Por un lado, la disminución de la activación glial observada en nuestro modelo animal tras la cría en EE, se asoció con una reducción en la expresión del factor Nuclear-Kappa B (NF- κ B) en los animales del grupo α -sin. Concretamente, los animales de este grupo experimental mostraron una reducción del 10% en la expresión de este factor en la SN, en comparación con sus homólogos criados en CE. Este hallazgo se suma a la evidencia que destaca la desregulación de NF- κ B en la EP, donde la implicación de este factor de transcripción trasciende al ámbito de la neuroinflamación (Singh et al., 2020). La α -sin liberada por las neuronas dopaminérgicas dañadas es reconocida por las células gliales, lo que desencadena la translocación de NF- κ B en estas células, y resulta en un aumento de los procesos neuroinflamatorios (Fellner et al., 2013; Rannikko et al., 2015). Además, se establece una relación de retroalimentación entre los agregados de α -sin y la activación de NF- κ B en las neuronas, puesto que el aumento en la expresión de α -sin conduce a un aumento en la expresión de NF- κ B en la SN, y viceversa (Fellner et al., 2013; Rannikko et al., 2015). Estos resultados se alinean con los descritos en nuestro modelo, ya que los animales con sobreexpresión de α -sin han mostrado un incremento en la expresión de NF- κ B en la SN. En modelos animales, se ha observado la activación de NF- κ B en la SN de ratones tratados con inyecciones intraperitoneales de MPTP (Ghosh et al., 2007), así como una expresión notablemente elevada de NF- κ B, tanto en la corteza, como en el estriado de ratas tratadas con una única inyección intranigral unilateral de 5 μ g/ 5 μ l de lipopolisacárido, en comparación con el grupo control (Patel y Singh, 2022). Asimismo, estudios *post mortem* han revelado inmunopositividad para NF- κ B en los CL de pacientes con demencia, lo que sugiere que el NF- κ B podría estar relacionado con la pérdida neuronal asociada con la sobreexpresión de α -sin (Togo et al., 2001). Estudios posteriores corroboraron estos hallazgos, al mostrar un incremento de NF- κ B en las células gliales de la SN de pacientes con EP (Ghosh et al., 2007; Garcia-Esparcia et al., 2014).

En cambio, como se ha mencionado previamente, los animales con sobreexpresión de α -sin y criados en EE mostraron una disminución de la inflamación, acompañada de una reducción en los niveles de Nf- κ B. Estudios previos han relacionado la práctica de ejercicio físico con una disminución en los niveles de Nf- κ B, en consonancia con efectos neuroprotectores y reducción de la neuroinflamación, previniendo la muerte celular de las neuronas dopaminérgicas (Tuon et al.,

2015; Jang et al., 2017). Más concretamente, Wang et al. (2021) demostraron que la exposición de ratones inyectados con MPTP (25 mg/kg) a la realización de ejercicio mediante cintas de correr), proporcionaba neuroprotección al suprimir la vía de señalización del TLR4/NF- κ B/NLRP3 (Wang et al., 2021). La vía del receptor tipo Toll 4 (TLR4), del factor nuclear κ B (NF- κ B) y del receptor de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NLRP3) está involucrada en la inflamación e induce la secreción de citoquinas inflamatorias, incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina-1 beta (IL-1 β) y la IL-18, que son mediadas por NF- κ B (Xiang et al., 2015; Wang et al., 2016; Cao et al., 2018; Yao et al., 2018). En este sentido, otro estudio basado en el mismo modelo animal de MPTP mostró una disminución en la expresión de Nf- κ B en el músculo gastrocnemio de los animales sometidos a la realización de ejercicio físico en una cinta de correr durante 4 semanas (Erekat y Al-Jarrah, 2022). Es relevante destacar que, en este estudio, al igual que en nuestros resultados, la expresión de NF- κ B del grupo control fue muy inferior a la de los animales lesionados con MPTP.

En la enfermedad de Parkinson, además de los cambios producidos en la vía de señalización del Nf- κ B, la interacción de la α -sin liberada por las neuronas dopaminérgicas con los astrocitos conlleva una disminución de los niveles del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), y la expresión de sus receptores tirosina quinasa (RET), eliminando así una vía vital de supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en la edad adulta (Chu y Kordower, 2021). En nuestro modelo experimental, se determinó una reducción del 9% y del 11% en la expresión de GDNF en la SN y en el estriado de los animales del grupo α -sin, respecto al grupo sham criados en CE, por lo que estos hallazgos estarían en línea con lo descrito previamente. Cabe mencionar que la reducción en los animales criados en EE resultó menor, y, además, al comparar los animales con sobreexpresión de α -sin criados en ambas condiciones de cría, se observó que los animales de este grupo experimental criados en EE mostraron un aumento del 10% en la expresión de GDNF en la SN, en comparación con los criados en CE.

Este aumento en la síntesis de factores tróficos después de la cría en EE podría favorecer la función neuroprotectora. El aumento de factores neurotróficos, entre los que se encuentran el BDNF y el GDNF, está asociado con los efectos beneficiosos del EE, los cuales, a su vez, pueden ser potenciados por la actividad física (Bezard et al., 2003; Bengoetxea et al., 2008; Anastasia et al., 2009). El GDNF, es un factor neurotrófico que ha sido relacionado con la protección de las neuronas dopaminérgicas frente al daño tóxico y con la inducción del crecimiento de fibras (Pascual et al., 2008), consolidándose como un componente crucial en la fisiopatología de enfermedades como la EP. Estudios previos han demostrado que el aumento en la expresión de GDNF ejerce un efecto neuroprotector y neurorestaurador en modelos animales de EP (Shingo

et al., 2002; Lindvall y Wahlberg, 2008), estimulando la regeneración de las neuronas del sistema nigroestriatal (Love et al., 2005). Concretamente, un modelo experimental de EP basado en la administración de 6-OHDA en el estriado, demostró que tras utilizar un vector viral para sobreexpresar GDNF, 3 semanas después de producir la lesión, resultó en un aumento del número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, protegiéndolas contra la degeneración en este modelo animal de EP (Tereshchenko et al., 2014). Estos efectos podrían estar mediados por el receptor de GDNF, el receptor de tirosina quinasa de membrana (RET), el cual activa la quinasa de señal regulada por señales extracelulares (ERK), que a su vez regula actividades relacionadas con la supervivencia neuronal (Sariola y Saarma, 2003). Esta correlación también ha sido descrita en nuestro modelo animal, donde la expresión de GDNF se correlacionó positivamente con la densidad de células dopaminérgicas en la SNpc, y negativamente con la expresión de NF- κ B, es decir, un aumento de la expresión de GDNF se acompañó de una mayor densidad de neuronas TH+ en la SNpc y de una disminución de NF- κ B.

Por último, algunos estudios han sugerido que el GDNF es capaz de modular la reactividad microglial. Se ha observado que ratones transgénicos heterocigotos (Gdnf+/-) de 12 meses de edad mostraron una reducción de las neuronas dopaminérgicas de la SN, acompañada de un incremento en la expresión de enzimas proinflamatorias, como la ciclooxigenasa 2 (Littrell et al., 2013). Además, otro estudio realizado en este mismo modelo animal demostró una pérdida de la inmunorreactividad dopaminérgica en el estriado, seguida de un aumento de la microglía activa en la SN (Boger et al., 2007). Un estudio adicional llevado a cabo en cultivos organotípicos de corteza-estriado-mesencéfalo mostró que la administración exógena de GDNF reducía la activación microglial y protegía a las neuronas dopaminérgicas de la muerte desencadenada por el agente proinflamatorio lipopolisacárido (Xing et al., 2010).

En conjunto, estos resultados sugieren que el GDNF podría actuar sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en modelos experimentales de EP, promoviendo la acción antiinflamatoria y modulando la degeneración de las neuronas, que a su vez, no desencadenarían señales relacionadas con la respuesta proinflamatoria y la proliferación de las células gliales (Cobianchi et al., 2017).

6.2.5. El entorno enriquecido modula el estrés oxidativo causado por la expresión de α -sin

Al igual que la neuroinflamación, el estrés oxidativo es un aspecto fundamental en la fisiopatología de la EP, y está regulado, entre otros, por el factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf-2) (Petrillo et al., 2020). El Nrf-2 activa mecanismos endógenos que contrarrestan el aumento de estrés oxidativo que ocurre en el cerebro de los pacientes de Parkinson (Nguyen et al., 2005). Desempeña un papel esencial al regular y coordinar la expresión de genes relacionados con enzimas detoxificantes y proteínas antioxidantes. De esta forma, el Nrf-2 proporciona protección a las células frente a los daños causados por las especies reactivas de oxígeno, evitando la apoptosis y fomentando la supervivencia celular (Kaspar et al., 2009).

Como ya se ha descrito previamente, la sobreexpresión de α -sin ha sido relacionado con niveles aumentados de ROS en la EP (Sohrabi et al., 2023). Por lo tanto, analizamos en nuestro modelo experimental los cambios en la expresión de Nrf-2 en la SN de los animales. Así, los resultados mostraron que la sobreexpresión de α -sin provocaba un incremento significativo del 20% en la densidad de células Nrf-2+ en la SN, en comparación con los grupos sham y control. Este aumento en la expresión podría ser una respuesta celular estratégica para contrarrestar el aumento de estrés oxidativo inducido por la sobreexpresión de α -sin. Ramsey et al. (2007) observaron una acumulación de Nrf-2 en las neuronas dopaminérgicas supervivientes de la SN de pacientes con EP, resultados que sugieren la activación de la vía del Nrf-2 en neuronas durante el proceso neurodegenerativo. Un estudio reciente, llevado a cabo en pacientes con EP, reveló un aumento en la expresión de Nrf-2 en el ARNm total extraído de leucocitos, en comparación con individuos sanos (Petrillo et al., 2020). Además, la utilización de células madre pluripotentes inducidas de pacientes con EP, mostró una sobreexpresión de Nrf-2 en neuronas diferenciadas a partir de estas células (Imaizumi et al., 2012). Es importante señalar, que en la SN, este factor de transcripción puede ser expresado por neuronas dopaminérgicas (Ramsey et al., 2007), y por células gliales, como los astrocitos (Guo et al., 2021). Tanto es así que en un modelo animal transgénico de EP (Thy1-hSYN^{A53T}), se observó que un aumento de la expresión de Nrf-2 en astrocitos y una reducción de la muerte neuronal causada por la sobreexpresión de α -sin mutante A53T (Gan et al., 2012). Un estudio realizado en cultivos celulares de neuronas dopaminérgicas de rata también demostró que el Nrf-2 disminuyó la toxicidad de proteínas asociadas a la EP, incrementando la degradación de la α -sin y dando lugar a una mayor supervivencia de estas neuronas (Skibinski et al., 2017).

Por otro lado, los resultados también revelaron que los animales lesionados exhibieron una expresión de Nrf-2 un 31% superior en comparación con aquellos sin operar. La cirugía es considerada como un evento estresante para el organismo (Finnerty et al., 2013), y por consiguiente, puede desencadenar respuestas antioxidantes y desintoxicantes mediadas por un aumento en la activación de Nrf-2. De hecho, en un estudio llevado a cabo en un modelo experimental de traumatismo craneoencefálico se observó un aumento significativo en los niveles de proteína Nrf-2, 24 horas después de la lesión (Yan et al., 2008).

El entorno de cría también mostró un efecto significativo sobre la densidad de células Nrf-2+, siendo un 15% menor en los animales criados en EE. Este resultado sugiere que el entorno enriquecido es capaz de modular la respuesta antioxidante y desintoxicante mediada por el Nrf-2. En relación con esto, se ha descrito que la cría en EE favorece un menor estrés oxidativo. Más concretamente, un estudio llevado a cabo con un modelo transgénico de EP basado en la sobreexpresión de α -sin, describió un aumento significativo del estrés oxidativo, manifestado por un aumento en diversas enzimas detoxificantes, como alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1), en el bulbo olfatorio y en el tronco del encéfalo de los animales criados en condiciones estándar, pero disminuyó tras la cría en EE durante 2 meses (Wi et al., 2018). Estos hallazgos sugieren que la exposición a EE fue capaz de reducir el estrés oxidativo, lo que resultó en la normalización de las enzimas relacionadas con la desintoxicación (Wi et al., 2018; Seo et al., 2020). En este contexto, la respuesta adaptativa de Nrf-2 podría ser suficiente para mantener la homeostasis celular, sin la necesidad de una sobreexpresión prolongada, y permitiendo una eficiente conservación de los recursos celulares (Marinho et al., 2014; Vargas-Mendoza et al., 2019). Además, nuestros resultados revelaron una interacción significativa entre el entorno y la sobreexpresión de α -sin, y es que los animales del grupo α -sin criados en EE exhibieron una reducción de casi el 30% en la expresión de Nrf-2, en comparación con los criados en CE. Este resultado sugiere que el entorno tiene la capacidad de modular la respuesta inducida por la sobreexpresión de α -sin, resultando, en este caso, en la reducción de la toxicidad de esta proteína (Wassouf et al., 2018).

En relación con lo descrito, cabe destacar que en nuestro modelo experimental, la positividad de Nrf-2 en la SNpc mostró una correlación inversa con la expresión de GDNF. Estudios previos han señalado que el GDNF posee la capacidad de reducir la liberación de mediadores inflamatorios y ROS, generados como resultado de la activación glial (Rocha et al., 2012; Lima Giacobbo et al., 2019). En consecuencia, se produce un aumento de la actividad de enzimas implicadas en la detoxificación enzimática de ROS, como la supeóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Chao y Lee, 1999). Esta observación sugiere una posible disminución en los niveles de Nrf-2 ya que se trata de una molécula que se activa en presencia de ROS (Hayes y Dinkova-Kostova,

2014). Por lo tanto, el aumento en la expresión de GDNF en los animales criados en EE, induciría una mayor activación de enzimas que reducen los niveles de ROS, y, por consiguiente, una menor expresión de Nrf-2.

6.2.6. Cambios en la sintomatología motora debido a la cría en EE

Con todo lo descrito hasta el momento, el entorno enriquecido muestra la capacidad de mejorar parcialmente, los efectos morfológicos y moleculares de la sobreexpresión de α -sin, que, a su vez, deberían reflejarse en la sintomatología motora. Para evaluar la actividad motora se utilizó la prueba de campo abierto (OF), donde los animales criados en EE exhibieron un descenso significativo del 20% en la actividad global y la locomoción, así como una reducción aproximada del 40% en la distancia recorrida y la velocidad media al compararlos con los criados en CE. A pesar de tratarse de unos resultados contradictorios, varios estudios previos han descrito una menor actividad espontánea e impulsividad en animales criados en EE (Mora et al., 2007; Zentall, 2021), lo que podría explicar las diferencias observadas en la actividad de los animales criados en CE y EE. Otro estudio indicó que la cría en EE durante 5 semanas, iniciada a los 28 días de edad, resultó en animales que no alcanzaron los niveles de actividad locomotora, distancia recorrida y velocidad media observados en el grupo criado en CE (Brenes et al., 2009). Estos resultados coinciden con hallazgos posteriores, que describieron que la cría en EE durante 6 semanas provocó un descenso en la actividad locomotora en comparación con las ratas criadas en CE (Matsuda et al., 2018). Una posible explicación de estos resultados podría estar relacionada con el incremento de la estimulación producida por el EE, que desencadena una rápida habituación de estos animales a un entorno novedoso, dando lugar a una disminución en la actividad motora observada en las pruebas de comportamiento (Garrido et al., 2013).

Por otro lado, la intervención quirúrgica tuvo un impacto significativo en los movimientos rápidos y lentos, evidenciando una disminución aproximada del 30% en los movimientos rápidos, y un aumento del 33,2% en los movimientos lentos en los animales operados en comparación con el grupo control. Estudios previos han demostrado que la actividad exploratoria de ratas hembra, criadas durante 6 semanas en CE y EE experimentó una disminución después de la inyección unilateral de 2 μ l de 6-OHDA en el haz nigroestriatal, en comparación con los niveles de actividad registrados antes de la lesión (Jadavji et al., 2006). Además, en este mismo estudio se registró el movimiento de los animales criados en EE dentro de la jaula, observándose una significativa reducción en su dispersión después de la lesión en comparación con los valores obtenidos antes

de la misma (Jadavji et al., 2006). En relación con esto, en nuestro estudio, observamos que la afectación de la cirugía en los movimientos de los animales fue dependiente del entorno. De manera notable, la cría en EE fue capaz de revertir más del 35% de estos efectos. En particular, los animales operados criados en EE exhibieron un aumento significativo en los movimientos rápidos y una disminución en los movimientos lentos al compararlos con los criados en CE. Esta capacidad de recuperación asociada al EE ha sido respaldada por hallazgos similares en otros estudios. Un trabajo reciente, realizado en ratones transgénicos que sobreexpresaban la proteína α -sin humana A53T, reveló mejoras en la función motora, evaluada mediante la prueba de rotarod, tanto en animales sanos como en aquellos afectados por la enfermedad, tras 2 meses en EE (Seo et al., 2020).

Asimismo, se exploró la posible relación de las alteraciones comportamentales previamente mencionadas con los niveles de ansiedad de los animales, y es que un mayor comportamiento locomotor en el centro de la arena se asocia con niveles más bajos de comportamiento ansioso (Prut y Belzung, 2003). Este análisis reveló un impacto significativo de las condiciones de cría en los niveles de ansiedad de los animales. Concretamente, los animales criados en EE recorrieron una menor distancia en el centro de la arena que aquellos criados en CE, es decir, mostraron niveles más elevados de ansiedad. Estos hallazgos coinciden con resultados previamente reportados por otros autores. Brenes et al. (2009) revelaron una reducción significativa de la distancia recorrida en la zona central por parte de los animales enriquecidos durante 5 semanas, en comparación con los criados en CE. Otros investigadores observaron que los ratones C57BL/6J estabulados en jaulas equipadas con ruedas de ejercicio, experimentaron un aumento en los niveles de ansiedad después de 3 semanas de ejercicio voluntario (Fuss et al., 2010). A pesar de que se detectó un incremento significativo en los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) hipocampal, el ejercicio no mostró efectos antidepresivos en este caso (Fuss et al., 2010).

Por lo tanto, el aumento de la estimulación motora proporcionada por el EE, la rápida adaptación a un entorno novedoso y el aumento de los niveles de ansiedad mostrados por estos animales, podrían ser causantes del comportamiento exploratorio reducido, dando lugar a una menor distancia recorrida. A pesar de ello, cabe destacar la mejora observada en la realización de movimientos rápidos en los animales enriquecidos, lo que sugiere una mejora en la actividad motora. En definitiva, la elección del test de comportamiento resulta de gran importancia para evaluar de forma correcta las posibles mejoras en la sintomatología motora en los modelos animales de EP y criados en EE.

6. Discusión

En resumen, el estudio actual ha permitido validar el modelo experimental basado en administración bilateral de 1 μ l de rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE. La sobreexpresión de α -sin provocó alteraciones motoras y una degeneración dopaminérgica, manifestadas por la pérdida de neuronas en la SNpc, de fibras en el estriado y en la SNpr, así como un aumento de las degeneraciones axonales en el estriado y de la reactividad glial en la vía nigroestriatal. Además, la aplicación del EE como una estrategia neuroprotectora no invasiva ha atenuado la degeneración dopaminérgica provocada por la sobreexpresión de la α -sin en la vía nigroestriatal. Esta mejora estaría relacionada con diversos mecanismos moleculares que modula el EE. Entre ellas se ha demostrado un aumento significativo en la activación de la vía de señalización BDNF/TrkB/ERK, relacionada con funciones neuroprotectoras. El EE también actuó sobre las células gliales, por un lado, induciendo un ligero aumento en la expresión de GDNF, y, por otro lado, mitigando la neuroinflamación, y es que disminuyó la reactividad glial y los niveles de expresión del factor de transcripción NF- κ B. Por último, se ha comprobado que el EE modula la expresión de Nrf-2, una molécula relacionada con el estrés oxidativo, que, a su vez, es un factor determinante en la progresión de la enfermedad de Parkinson.

Por lo tanto, este estudio arroja nuevas perspectivas sobre los efectos beneficiosos de la cría en EE en modelos animales basados en la sobreexpresión de α -sin, destacando el potencial del EE como estrategia para mejorar las alteraciones motoras, la degeneración neuronal y las alteraciones neuroquímicas relevantes en la EP.

7. CONCLUSIONES

1. La inyección bilateral de 1 μ l de rAAV9-CMVie/SynP-wtsyn-WPRE en la SNpc dio lugar a una sobreexpresión de α -sin en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y en sus proyecciones al estriado, además de difundirse progresivamente hasta alcanzar la corteza cerebral. Por otro lado, se determinó la presencia de α -sin fosforilada en el residuo S129 en la SNpc en todos los puntos temporales analizados.
2. La sobreexpresión de α -sin provocó una degeneración progresiva en la vía nigroestriatal, que resultó significativa a partir del segundo mes después de la inyección del AAV. Esta degeneración se manifestó mediante la disminución de la densidad de neuronas dopaminérgicas de la SNpc, de las fibras TH+ en el estriado que, a su vez, mostraron una correlación inversa con los agregados axonales, y la disminución de fibras dopaminérgicas de la SNpr.
3. La reactividad glial provocada por la sobreexpresión de α -sin se observó tanto en astrocitos como, sobre todo, en la población microglial, y se mantuvo en los distintos puntos temporales analizados.
4. Las alteraciones morfológicas causadas por la sobreexpresión de α -sin tanto en la SN como en el estriado, se acompañaron de una afectación motora significativa a partir de los 2 meses después de la inyección del AAV.
5. La exposición al entorno enriquecido (EE) durante 2 meses después de la inyección, redujo la expresión de α -sin y p- α -sin, sin inducir cambios en la difusión de la proteína.
6. La disminución observada en la sobreexpresión de α -sin se acompañó de una menor degeneración nigroestriatal, es decir, el entorno enriquecido indujo un aumento de la densidad neuronal de la SNpc, y, sobre todo, de la densidad de fibras del estriado y de la SNpr.
7. El entorno enriquecido aumentó la expresión de BDNF, así como la activación de la vía BDNF/TrkB/ERK tanto en la SN como en el estriado. Estos resultados mostraron, además, una correlación significativa con la recuperación de la densidad de neuronas en la SNpc, y con las fibras dopaminérgicas de la SNpr y del estriado.
8. Se determinó una disminución de la reactividad glial provocada por la sobreexpresión de α -sin tras la cría en EE, mostrando una marcada disminución de la positividad de los marcadores gliales en la vía nigroestriatal. A pesar de que el enriquecimiento no indujo cambios

7. Conclusiones

significativos en la expresión de GDNF y Nf- κ B, se determinó una correlación inversa y significativa en la expresión de ambas proteínas.

9. El entorno enriquecido promovió la disminución del número de células Nrf-2+, previamente aumentada en los animales de grupo α -sin, indicando que el EE modula la expresión de este factor relacionado con el estrés oxidativo.

10. La mejora en la degeneración descrita a través de los parámetros morfológicos y moleculares inducidos por el EE, se tradujo en una mejora de los movimientos rápidos realizados en los animales con sobreexpresión de α -sin. Sin embargo, el EE no logró revertir el resto de las variables motoras analizadas debido a un incremento en los niveles de ansiedad de estos animales.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn KJ, Paik SR, Chung KC, Kim J (2006). Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of alpha-synuclein. *J Neurochem.* 97(1):265-79.
- Alarcón TA, Presti-Silva SM, Simões APT, Ribeiro FM, Pires RGW (2023). Molecular mechanisms underlying the neuroprotection of environmental enrichment in Parkinson's disease. *Neural Regen Res.* 18(7):1450-6.
- Alcalay RN, Kehoe C, Shorr E, Battista R, Hall A, Simuni T, Marder K, Wills AM, Naito A, Beck JC, Schwarzschild MA, Nance M (2020). Genetic testing for Parkinson disease: current practice, knowledge, and attitudes among US and Canadian movement disorders specialists. *Genet Med.* 22(3):574-80.
- Alexander GE, Crutcher MD (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13(7):266-71.
- Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Alexiou A, Papadakis M, Alsayegh AA, Almohmadi NH, Saad HM, Batiha GE (2023). Pros and cons for statins use and risk of Parkinson's disease: An updated perspective. *Pharmacol Res Perspect.* 11(2):e01063.
- Allocca M, Mussolino C, Garcia-Hoyos M, Sanges D, Iodice C, Petrillo M, Vandenberghe LH, Wilson JM, Marigo V, Surace EM, Auricchio A (2007). Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virol.* 81(20):11372-80.
- Alves G, Wentzel-Larsen T, Aarsland D, Larsen JP (2005). Progression of motor impairment and disability in Parkinson disease: a population-based study. *Neurology.* 65(9):1436-41.
- Anastasia A, Torre L, de Erausquin GA, Mascó DH (2009). Enriched environment protects the nigrostriatal dopaminergic system and induces astroglial reaction in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 109(3):755-65.
- Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, de Laat R, Banducci K, Caccavello RJ, Barbour R, Huang J, Kling K, Lee M, Diep L, Keim PS, Shen X, Chataway T, Schlossmacher MG, Seubert P, Schenk D, Sinha S, Gai WP, Chilcote TJ (2006). Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem.* 281(40):29739-52.
- Angot E, Brundin P (2009). Dissecting the potential molecular mechanisms underlying alpha-synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 15(3):S143-7.
- Arenaza-Urquijo EM, Wirth M, Chételat G (2015). Cognitive reserve and lifestyle: moving towards preclinical Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 7:134.
- Arkadir D, Bergman H, Fahn S (2014). Redundant dopaminergic activity may enable compensatory axonal sprouting in Parkinson disease. *Neurology.* 82(12):1093-8.
- Aron L, Klein P, Pham TT, Kramer ER, Wurst W, Klein R (2010). Pro-survival role for Parkinson's associated gene DJ-1 revealed in trophically impaired dopaminergic neurons. *PLoS Biol.* 8(4):e1000349.
- Aron L, Klein R (2011). Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* 34(2):88-100.
- Ascherio A, Schwarzschild MA (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol.* 15(12):1257-72.
- Awa S, Suzuki G, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Saito M, Hasegawa M (2022). Phosphorylation of endogenous α -synuclein induced by extracellular seeds initiates at the pre-synaptic region and spreads to the cell body. *Sci Rep.* 12(1):1163.
- Awad BI, Carmody MA, Steinmetz MP (2015). Potential role of growth factors in the management of spinal cord injury. *World Neurosurg.* 83(1):120-31.
- Bafico A, Aaronson SA (2003). Classification of growth factors and their receptors. *Holland-Frei Cancer Medicine.* Hamilton (ON): BC Decker. 6:2003.

8. Bibliografía

- Ball N, Teo WP, Chandra S, Chapman J (2019). Parkinson's Disease and the Environment. *Front Neurol.* 10:218.
- Balestrino R, Schapira AHV (2020). Parkinson disease. *Eur J Neurol.* 27(1):27-42.
- Bang Henriksen M, Johnsen EL, Sunde N, Vase A, Gjelstrup MC, Østergaard K (2016). Surviving 10 years with deep brain stimulation for Parkinson's disease--a follow-up of 79 patients. *Eur J Neurol.* 23(1):53-61.
- Bantel-Schaal U, zur Hausen H (1984). Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology.* 134(1):52-63.
- Baquet ZC, Bickford PC, Jones KR (2005). Brain-derived neurotrophic factor is required for the establishment of the proper number of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. *J Neurosci.* 25(26):6251-9.
- Barker RA, Björklund A, Gash DM, Whone A, Van Laar A, Kordower JH, Bankiewicz K, Kiebertz K, Saarma M, Booms S, Huttunen HJ, Kells AP, Fiandaca MS, Stoessl AJ, Eidelberg D, Federoff H, Voutilainen MH, Dexter DT, Eberling J, Brundin P, Isaacs L, Mursaleen L, Bresolin E, Carroll C, Coles A, Fiske B, Matthews H, Lungu C, Wyse RK, Stott S, Lang AE (2020). GDNF and Parkinson's Disease: Where Next? A Summary from a Recent Workshop. *J Parkinsons Dis.* 10(3):875-91.
- Beach TG, Adler CH, Lue L, Sue LI, Bachalakuri J, Henry-Watson J, Sasse J, Boyer S, Shirohi S, Brooks R, Eschbacher J, White CL 3rd, Akiyama H, Caviness J, Shill HA, Connor DJ, Sabbagh MN, Walker DG; Arizona Parkinson's Disease Consortium (2009). Unified staging system for Lewy body disorders: correlation with nigrostriatal degeneration, cognitive impairment and motor dysfunction. *Acta Neuropathol.* 117(6):613-34.
- Bechard AR, Bliznyuk N, Lewis MH (2017). The development of repetitive motor behaviors in deer mice: Effects of environmental enrichment, repeated testing, and differential mediation by indirect basal ganglia pathway activation. *Dev Psychobiol.* 59(3):390-9.
- Bellou V, Belbasis L, Tzoulaki I, Evangelou E, Ioannidis JP (2016). Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses. *Parkinsonism Relat Disord.* 23:1-9.
- Benabid AL, Le Bas JF, Pollak P (2003). Apport thérapeutique et physiopathologique de la stimulation des structures cérébrales profondes dans la maladie de Parkinson [Therapeutic and physiopathological contribution of electric stimulation of deep brain structures in Parkinson's disease]. *Bull Acad Natl Med.* 187(2):305-19; discussion 319-22.
- Bengoetxea H, Argandoña EG, Lafuente JV (2008). Effects of visual experience on vascular endothelial growth factor expression during the postnatal development of the rat visual cortex. *Cereb Cortex.* 18(7):1630-9.
- Bengoetxea H, Rico-Barrío I, Ortuzar N, Murueta-Goyena A, Lafuente JV (2018). Environmental Enrichment Reverses Tyrosine Kinase Inhibitor-Mediated Impairment Through BDNF-TrkB Pathway. *Mol Neurobiol.* 55(1):43-59.
- Benn CL, Luthi-Carter R, Kuhn A, Sadri-Vakili G, Blankson KL, Dalai SC, Goldstein DR, Spires TL, Pritchard J, Olson JM, van Dellen A, Hannan AJ, Cha JH (2010). Environmental enrichment reduces neuronal intranuclear inclusion load but has no effect on messenger RNA expression in a mouse model of Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 69(8):817-27.
- Bennett DA, Beckett LA, Murray AM, Shannon KM, Goetz CG, Pilgrim DM, Evans DA (1996). Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. *N Engl J Med.* 334(2):71-6.
- Bensadoun JC, Déglon N, Tseng JL, Ridet JL, Zurn AD, Aebischer P (2000). Lentiviral vectors as a gene delivery system in the mouse midbrain: cellular and behavioral improvements in a 6-OHDA model of Parkinson's disease using GDNF. *Exp Neurol.* 164(1):15-24.

- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 3(12):1301-6.
- Bevan AK, Duque S, Foust KD, Morales PR, Braun L, Schmelzer L, Chan CM, McCrate M, Chicoine LG, Coley BD, Porensky PN, Kolb SJ, Mendell JR, Burghes AH, Kaspar BK (2011). Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Mol Ther.* 19(11):1971-80.
- Bezard E, Dovero S, Belin D, Duconger S, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Piazza PV, Gross CE, Jaber M (2003). Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *J Neurosci.* 23(35):10999-1007.
- Bhardwaj R, Deshmukh R (2018). Neurotrophic factors and Parkinson's disease. *Clin Investig.* 7(4):53-62.
- Bilge SS, Günaydin C, Önger ME, Bozkurt A, Avci B (2020). Neuroprotective action of agmatine in rotenone-induced model of Parkinson's disease: Role of BDNF/cREB and ERK pathway. *Behav Brain Res.* 392:112692.
- Bisaglia M, Mammi S, Bubacco L (2009). Structural insights on physiological functions and pathological effects of α -synuclein. *FASEB J.* 23(2):329-40.
- Bjorklund A, Kirik D, Rosenblad C, Georgievska B, Lundberg C, Mandel RJ (2000). Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res.* 886(1-2):82-98.
- Björklund A, Lindvall O (2000). Parkinson disease gene therapy moves toward the clinic. *Nat Med.* 6(11):1207-8.
- Blacklow NR, Hoggan MD, Rowe WP (1968). Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *J Natl Cancer Inst.* 40(2):319-27.
- Blanchard V, Anglade P, Dziewczapolski G, Savasta M, Agid Y, Raisman-Vozari R (1996). Dopaminergic sprouting in the rat striatum after partial lesion of the substantia nigra. *Brain Res.* 709(2):319-25.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E (2000). Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 62(1):63-88.
- Blandini F, Armentero MT, Martignoni E (2008). The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord.* 14(2):S124-9.
- Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S (2012). Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012:845618.
- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 8(1):57-69.
- Blömer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH (1997). Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol.* 71(9):6641-9.
- Bondi CO, Klitsch KC, Leary JB, Kline AE (2014). Environmental enrichment as a viable neurorehabilitation strategy for experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 31(10):873-88.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science.* 299(5604):256-9.
- Braak H, Braak E (2000). Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol.* 247(2):II3-10.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003a). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 24(2):197-211.

8. Bibliografía

- Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K (2003b). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm (Vienna)*. 110(5):517-36.
- Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*. 318(1):121-34.
- Braak H, Bohl JR, Müller CM, Rüb U, de Vos RA, Del Tredici K (2006). Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord*. 21(12):2042-51.
- Brenes JC, Padilla M, Fornaguera J (2009). A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behav Brain Res*. 197(1):125-37.
- Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 142:w13659.
- Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, Kozłowska E, Drela N, Chalimoniuk M, Stepień A (2008). Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci Lett*. 441(2):158-62.
- Brown RE, Milner PM (2003). The legacy of Donald O. Hebb: more than the Hebb synapse. *Nat Rev Neurosci*. 4(12):1013-9.
- Burger C, Gorbatyuk OS, Velardo MJ, Peden CS, Williams P, Zolotukhin S, Reier PJ, Mandel RJ, Muzyczka N (2004). Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther*. 10(2):302-17.
- Burré J, Sharma M, Südhof TC (2015). Definition of a molecular pathway mediating α -synuclein neurotoxicity. *J Neurosci*. 35(13):5221-32.
- Burré J, Sharma M, Südhof TC (2018). Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 8(3):a024091.
- Buschler A, Manahan-Vaughan D (2012). Brief environmental enrichment elicits metaplasticity of hippocampal synaptic potentiation in vivo. *Front Behav Neurosci*. 6:85.
- Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, Lin J, Wilson JM (2009). Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis*. 199(3):381-90.
- Campêlo CLC, Santos JR, Silva AF, Dierschnabel AL, Pontes A, Cavalcante JS, Ribeiro AM, Silva RH (2017). Exposure to an enriched environment facilitates motor recovery and prevents short-term memory impairment and reduction of striatal BDNF in a progressive pharmacological model of parkinsonism in mice. *Behav Brain Res*. 328:138-48.
- Campos FL, Carvalho MM, Cristovão AC, Je G, Baltazar G, Salgado AJ, Kim YS, Sousa N (2013). Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. *Front Behav Neurosci*. 7:175.
- Cao Q, Qin L, Huang F, Wang X, Yang L, Shi H, Wu H, Zhang B, Chen Z, Wu X (2017). Amentoflavone protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease model mice through PI3K/Akt and ERK signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*. 319:80-90.
- Cardinale A, Calabrese V, de Iure A, Picconi B (2021). Alpha-Synuclein as a Prominent Actor in the Inflammatory Synaptopathy of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 22(12):6517.
- Caughey B, Lansbury PT (2003). Protofibrils, pores, fibrils and neurodegeneration: Separating the Responsible Protein Aggregates from The Innocent Bystanders. *Annu Rev Neurosci*. 26:267-98.
- Cerri S, Mus L, Blandini F (2019). Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *J Parkinsons Dis*. 9(3):501-15.

- Ceulemans AG, Zgavc T, Kooijman R, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, Michotte Y (2010). The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. *J Neuroinflammation*. 7:74.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P (2007). The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*. 53(2):344-54.
- Chen H, Zhang SM, Schwarzschild MA, Hernán MA, Ascherio A (2005). Physical activity and the risk of Parkinson disease. *Neurology*. 64(4):664-9.
- Chen MJ, Russo-Neustadt AA (2005). Exercise activates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Brain Res Mol Brain Res*. 135(1-2):181-93.
- Chen W, Wei X, Liu XL, Yan KL (2015) Effect of exercise on cortex -striatum glutamatergic neurotransmission in PD model rats. *J Beijing Sport Univ*. 38:61–6.
- Chen T, Wu Y, Wang Y, Zhu J, Chu H, Kong L, Yin L, Ma H (2017a). Brain-Derived Neurotrophic Factor Increases Synaptic Protein Levels via the MAPK/Erk Signaling Pathway and Nrf2/Trx Axis Following the Transplantation of Neural Stem Cells in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Neurochem Res*. 42(11):3073-83.
- Chen W, Qiao D, Liu X, Shi K (2017b). Treadmill Exercise Improves Motor Dysfunction and Hyperactivity of the Corticostriatal Glutamatergic Pathway in Rats with 6-OHDA-Induced Parkinson's Disease. *Neural Plast*. 2017:2583910.
- Chia SJ, Tan EK, Chao YX (2020). Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 21(7):2464.
- Cho E, Kim K, Kim H, Cho SR (2022). Reelin protects against pathological α -synuclein accumulation and dopaminergic neurodegeneration after environmental enrichment in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 175:105898. 19.
- Choe MA, Koo BS, An GJ, Jeon S (2012). Effects of Treadmill Exercise on the Recovery of Dopaminergic Neuron Loss and Muscle Atrophy in the 6-OHDA Lesioned Parkinson's Disease Rat Model. *Korean J Physiol Pharmacol*. 16(5):305-12.
- Choong CJ, Mochizuki H (2022). Neuropathology of α -synuclein in Parkinson's disease. *Neuropathology*. 42(2):93-103.
- Chu Y, Kompoliti K, Cochran EJ, Mufson EJ, Kordower JH (2002). Age-related decreases in Nurr1 immunoreactivity in the human substantia nigra. *J Comp Neurol*. 450(3):203-14.
- Chu Y, Kordower JH (2007). Age-associated increases of alpha-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? *Neurobiol Dis*. 25(1):134-49.
- Chu CT, Zhu J, Dagda R (2007). Beclin 1-independent pathway of damage-induced mitophagy and autophagic stress: implications for neurodegeneration and cell death. *Autophagy*. 3(6):663-6.
- Chu Y, Morfini GA, Langhamer LB, He Y, Brady ST, Kordower JH (2012). Alterations in axonal transport motor proteins in sporadic and experimental Parkinson's disease. *Brain*. 135(7):2058-73.
- Chu Y, Kordower JH (2021). GDNF signaling in subjects with minimal motor deficits and Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 153:105298.
- Cobianchi S, Arbat-Plana A, Lopez-Alvarez VM, Navarro X (2017). Neuroprotective Effects of Exercise Treatments After Injury: The Dual Role of Neurotrophic Factors. *Curr Neuropharmacol*. 15(4):495-518.
- Cohen AD, Tillerson JL, Smith AD, Schallert T, Zigmond MJ (2003). Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine-treated rats: possible role of GDNF. *J Neurochem*. 85(2):299-305.

8. Bibliografía

- Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH (2017). Aging and Parkinson's disease: Different sides of the same coin? *Mov Disord.* 32(7):983-90.
- Colucci-D'Amato L, Speranza L, Volpicelli F (2020) Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. *Int J Mol Sci.* 21(20):7777.
- Cookson MR (2005). The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem.* 74:29-52.
- Costa A, Peppe A, Carlesimo GA, Zabberoni S, Scalici F, Caltagirone C, Angelucci F (2015). Brain-derived neurotrophic factor serum levels correlate with cognitive performance in Parkinson's disease patients with mild cognitive impairment. *Front Behav Neurosci.* 9:253.
- da Costa Daniele TM, de Bruin PFC, de Matos RS, de Bruin GS, Maia Chaves C Junior, de Bruin VMS (2020). Exercise effects on brain and behavior in healthy mice, Alzheimer's disease and Parkinson's disease model-A systematic review and meta-analysis. *Behav Brain Res.* 383:112488.
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie L-A (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 30:464–72.
- Coupland KG, Mellick GD, Silburn PA, Mather K, Armstrong NJ, Sachdev PS, Brodaty H, Huang Y, Halliday GM, Hallupp M, Kim WS, Dobson-Stone C, Kwok JB (2014). DNA methylation of the MAPT gene in Parkinson's disease cohorts and modulation by vitamin E in vitro. *Mov Disord.* 29(13):1606-14.
- Crowley EK, Nolan YM, Sullivan AM (2018). Neuroprotective effects of voluntary running on cognitive dysfunction in an α -synuclein rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 65:60-8.
- Danyu L, Yanran L, Xiuna J, Ying C, Sudan P, Tianen Z, Zhifen Z, Dezhi Z, Kaixun H, Yingyu X, Enxiang T (2019). α -Synuclein induced mitochondrial dysfunction via cytochrome c oxidase subunit 2 in SH-SY5Y cells. *Exp Cell Res.* 378(1):57-65.
- Darios F, Ruipérez V, López I, Villanueva J, Gutierrez LM, Davletov B (2010). Alpha-synuclein sequesters arachidonic acid to modulate SNARE-mediated exocytosis. *EMBO Rep.* 11(7):528-33.
- Dauer W, Przedborski S (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 39(6):889-909.
- Davidson BL, Stein CS, Heth JA, Martins I, Kotin RM, Derksen TA, Zabner J, Ghodsi A, Chiorini JA (2000). Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(7):3428-32.
- Davie CA (2008). A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull.* 86:109-27.
- Decressac M, Mattsson B, Lundblad M, Weikop P, Björklund A (2012). Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of α -synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiol Dis.* 45(3):939-53.
- Decressac M, Mattsson B, Weikop P, Lundblad M, Jakobsson J, Björklund A (2013). TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from α -synuclein toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(19):E1817-26.
- Déglon N, Tseng JL, Bensadoun JC, Zurn AD, Arsenijevic Y, Pereira de Almeida L, Zufferey R, Trono D, Aebischer P (2000). Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease. *Hum Gene Ther.* 11(1):179-90.
- Del Rey NL, Quiroga-Varela A, Garbayo E, Carballo-Carbajal I, Fernández-Santiago R, Monje MHG, Trigo-Damas I, Blanco-Prieto MJ, Blesa J (2018). Advances in Parkinson's Disease: 200 Years Later. *Front Neuroanat.* 12:113.
- Deumens R, Blokland A, Prickaerts J (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol.* 175(2):303-17.
- Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P, Volkmann J, Schäfer H, Bötzel K, Daniels C, Deuschländer A, Dillmann U, Eisner W, Gruber D, Hamel W, Herzog J, Hilker R, Klebe S, Kloss M, Koy J, Krause M,

- Kupsch A, Lorenz D, Lorenz S, Mehdorn HM, Moriglane JR, Oertel W, Pinsker MO, Reichmann H, Reuss A, Schneider GH, Schnitzler A, Steude U, Sturm V, Timmermann L, Tronnier V, Trottenberg T, Wojtecki L, Wolf E, Poewe W, Voges J; German Parkinson Study Group, Neurostimulation Section (2006). A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 355(9):896-908.
- Dias V, Junn E, Mouradian MM (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 3(4):461-91.
- Ding Q, Ying Z, Gómez-Pinilla F (2011). Exercise influences hippocampal plasticity by modulating brain-derived neurotrophic factor processing. *Neuroscience.* 192:773-80.
- Dolatshahi M, Ranjbar Hameghavandi MH, Sabahi M, Rostamkhani S (2021). Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in pathophysiology of Parkinson disease: Diverse patterns and mechanisms contributing to neurodegeneration. *Eur J Neurosci.* 54(1):4101-23.
- Dos Santos Heringer L, Rios Carvalho J, Teixeira Oliveira J, Texeira Silva B, de Souza Aguiar Dos Santos DM, Martinez Martinez Toledo AL, Borges Savoldi LM, Magalhães Portela D, Adriani Marques S, Campello Costa Lopes P, Blanco Martinez AM, Rocha Mendonça H (2022). Altered excitatory and inhibitory neocortical circuitry leads to increased convulsive severity after pentylentetrazol injection in an animal model of schizencephaly, but not of microgyria. *Epilepsia Open.* 7(3):462-73.
- Doshi PK, Chhaya N, Bhatt MH (2002). Depression leading to attempted suicide after bilateral subthalamic nucleus stimulation for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 17(5):1084-5.
- Dovonou A, Bolduc C, Soto Linan V, Gora C, Peralta Iii MR, Lévesque M (2023). Animal models of Parkinson's disease: bridging the gap between disease hallmarks and research questions. *Transl Neurodegener.* 12(1):36.
- Dumont M, Beal MF (2011). Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med.* 51(5):1014-26.
- Durrenberger PF, Filiou MD, Moran LB, Michael GJ, Novoselov S, Cheetham ME, Clark P, Pearce RK, Graeber MB (2009). DnaJB6 is present in the core of Lewy bodies and is highly up-regulated in parkinsonian astrocytes. *J Neurosci Res.* 87(1):238-45.
- Dutta D, Jana M, Majumder M, Mondal S, Roy A, Pahan K (2021). Selective targeting of the TLR2/MyD88/NF- κ B pathway reduces α -synuclein spreading in vitro and in vivo. *Nat Commun.* 12(1):5382.
- Dutta D, Paidi RK, Raha S, Roy A, Chandra S, Pahan K (2022). Treadmill exercise reduces α -synuclein spreading via PPAR α . *Cell Rep.* 40(2):111058.
- Duty S, Jenner P (2011). Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol.* 164(4):1357-91.
- Ekmark-Lewén S, Lindström V, Gumucio A, Ihse E, Behere A, Kahle PJ, Nordström E, Eriksson M, Erlandsson A, Bergström J, Ingelsson M (2018). Early fine motor impairment and behavioral dysfunction in (Thy-1)-h[A30P] alpha-synuclein mice. *Brain Behav.* 8(3):e00915.
- Elbaz A, Moisan F (2008). Update in the epidemiology of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 21(4):454-60.
- Emborg ME (2004). Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *J Neurosci Methods.* 139(2):121-43.
- Erekat NS, Al-Jarrah MD (2022). Endurance exercise training suppresses myostatin upregulation and nuclear factor-kappa B activation in a mouse model of Parkinson's disease. *Vet World.* 15(2):383-9.
- Espay AJ, Morgante F, Merola A, Fasano A, Marsili L, Fox SH, Bezard E, Picconi B, Calabresi P, Lang AE (2018). Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease: Current and evolving concepts. *Ann Neurol.* 84(6):797-811.

8. Bibliografía

- Evans JR, Barker RA (2008). Neurotrophic factors as a therapeutic target for Parkinson's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 12(4):437-47.
- Faherty CJ, Raviie Shepherd K, Herasimtschuk A, Smeyne RJ (2005). Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. *Brain Res Mol Brain Res*. 134(1):170-9.
- Fahn S (2008). The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 23(3):S497-508.
- Fang F, Yang W, Florio JB, Rockenstein E, Spencer B, Orain XM, Dong SX, Li H, Chen X, Sung K, Rissman RA, Masliah E, Ding J, Wu C (2017). Synuclein impairs trafficking and signaling of BDNF in a mouse model of Parkinson's disease. *Sci Rep*. 7(1):3868.
- Faynveitz A, Lavian H, Jacob A, Korngreen A (2019). Proliferation of Inhibitory Input to the Substantia Nigra in Experimental Parkinsonism. *Front Cell Neurosci*. 13:417.
- Fares MB, Jagannath S, Lashuel HA (2021). Reverse engineering Lewy bodies: how far have we come and how far can we go? *Nat Rev Neurosci*. 22(2):111-31.
- Farrand AQ, Helke KL, Gregory RA, Gooz M, Hinson VK, Boger HA (2017). Vagus nerve stimulation improves locomotion and neuronal populations in a model of Parkinson's disease. *Brain Stimul*. 10(6):1045-54.
- Fellner L, Irschick R, Schanda K, Reindl M, Klimaschewski L, Poewe W, Wenning GK, Stefanova N (2013). Toll-like receptor 4 is required for α -synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia*. 61(3):349-60.
- Fernandes VS, Santos JR, Leão AH, Medeiros AM, Melo TG, Izídio GS, Cabral A, Ribeiro RA, Abílio VC, Ribeiro AM, Silva RH (2012). Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 231(1):154-63.
- Finkelstein DI, Stanic D, Parish CL, Tomas D, Dickson K, Horne MK (2000). Axonal sprouting following lesions of the rat substantia nigra. *Neuroscience*. 97(1):99-112.
- Finnerty CC, Mabvuure NT, Ali A, Kozar RA, Herndon DN (2013). The surgically induced stress response. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 37(5):21S-9S.
- Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH (2007). Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*. 447(7141):178-82.
- Foltynie T, Lewis SG, Goldberg TE, Blackwell AD, Kolachana BS, Weinberger DR, Robbins TW, Barker RA (2005). The BDNF Val66Met polymorphism has a gender specific influence on planning ability in Parkinson's disease. *J Neurol*. 252(7):833-8.
- Fontanesi C, Kvint S, Frazzitta G, Bera R, Ferrazzoli D, Di Rocco A, Rebholz H, Friedman E, Pezzoli G, Quartarone A, Wang HY, Ghilardi MF (2016). Intensive Rehabilitation Enhances Lymphocyte BDNF-TrkB Signaling in Patients With Parkinson's Disease. *Neurorehabil Neural Repair*. 30(5):411-8.
- Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, Kubo S, Anthony MD, Edwards RH (2004). Lipid Rafts Mediate the Synaptic Localization of a -Synuclein. *J Neurosci*. 24(30):6715-23.
- Franco-Iborra S, Vila M, Perier C (2016). The Parkinson Disease Mitochondrial Hypothesis: Where Are We at? *Neuroscientist*. 22(3):266-77.
- Franco-Iborra S, Cuadros T, Parent A, Romero-Gimenez J, Vila M, Perier C (2018). Defective mitochondrial protein import contributes to complex I-induced mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell Death Dis*. 9(11):1122.
- Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T (2002). α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol*. 4(2):160-4.

- Fuss J, Ben Abdallah NM, Vogt MA, Touma C, Pacifici PG, Palme R, Witzemann V, Hellweg R, Gass P (2010). Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*. 20(3):364-76.
- Gabrielyan L, Liang H, Minalyan A, Hatami A, John V, Wang L (2021). Behavioral Deficits and Brain α -Synuclein and Phosphorylated Serine-129 α -Synuclein in Male and Female Mice Overexpressing Human α -Synuclein. *J Alzheimers Dis*. 79(2):875-93.
- Gajhede Gram M, Gade L, Wogensen E, Mogensen J, Malá H (2015). Equal effects of typical environmental and specific social enrichment on posttraumatic cognitive functioning after fimbria-fornix transection in rats. *Brain Res*. 1629:182-95.
- Gan L, Vargas MR, Johnson DA, Johnson JA (2012). Astrocyte-specific overexpression of Nrf2 delays motor pathology and synuclein aggregation throughout the CNS in the alpha-synuclein mutant (A53T) mouse model. *J Neurosci*. 32(49):17775-87.
- Gandhi S, Muqit MM, Stanyer L, Healy DG, Abou-Sleiman PM, Hargreaves I, Heales S, Ganguly M, Parsons L, Lees AJ, Latchman DS, Holton JL, Wood NW, Revesz T (2006). PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain*. 129(7):1720-31.
- Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(18):11854-9.
- Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol*. 78(12):6381-8.
- Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM (2005). New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther*. 5(3):285-97.
- Garcia-Esparcia P, Llorens F, Carmona M, Ferrer I (2014). Complex deregulation and expression of cytokines and mediators of the immune response in Parkinson's disease brain is region dependent. *Brain Pathol*. 24(6):584-98.
- Garcia-Reitböck P, Anichtchik O, Bellucci A, Iovino M, Ballini C, Fineberg E, Ghetti B, Della Corte L, Spano P, Tofaris GK, Goedert M, Spillantini MG (2010). SNARE protein redistribution and synaptic failure in a transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Brain*. 133(7):2032-44.
- Garrido P, De Blas M, Ronzoni G, Cordero I, Antón M, Giné E, Santos A, Del Arco A, Segovia G, Mora F (2013). Differential effects of environmental enrichment and isolation housing on the hormonal and neurochemical responses to stress in the prefrontal cortex of the adult rat: relationship to working and emotional memories. *J Neural Transm (Vienna)*. 120(5):829-43.
- Gasser T (2009). Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert Rev Mol Med*. 11:e22.
- GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators (2018). Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 17(11):939-53.
- Gerecke KM, Jiao Y, Pani A, Pagala V, Smeyne RJ (2010). Exercise protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Brain Res*. 1341:72-83.
- Gerfen CR (2000). Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci*. 23(10):S64-70.
- Gerfen CR, Surmeier DJ (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci*. 34:441-66.
- Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ (2006). In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 21(2):404-12.

8. Bibliografía

- Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM, Ghosh S, Mosley RL, Gendelman HE, Pahan K (2007). Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(47):18754-9.
- Goldberg NR, Haack AK, Meshul CK (2011). Enriched environment promotes similar neuronal and behavioral recovery in a young and aged mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 172:443-52.
- Gombash SE, Manfredsson FP, Kemp CJ, Kuhn NC, Fleming SM, Egan AE, Grant LM, Ciucci MR, MacKeigan JP, Sortwell CE (2013). Morphological and behavioral impact of AAV2/5-mediated overexpression of human wildtype alpha-synuclein in the rat nigrostriatal system. *PLoS One*. 8(11):e81426.
- Gómez-Benito M, Granada N, García-Sanz P, Michel A, Dumoulin M, Moratalla R (2020). Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein. *Front Pharmacol*. 11:356.
- Gorbatyuk OS, Li S, Sullivan LF, Chen W, Kondrikova G, Manfredsson FP, Mandel RJ, Muzyczka N (2008). The phosphorylation state of Ser-129 in human alpha-synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(2):763-8.
- Gorski JA, Zeiler SR, Tamowski S, Jones KR (2003). Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J Neurosci*. 23(17):6856-65.
- Grassi D, Howard S, Zhou M, Diaz-Perez N, Urban NT, Guerrero-Given D, Kamasawa N, Volpicelli-Daley LA, LoGrasso P, Lasmézas CI (2018). Identification of a highly neurotoxic α -synuclein species inducing mitochondrial damage and mitophagy in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115(11):E2634-43.
- Greenamyre JT, Betarbet R, Sherer TB (2003). The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism Relat Disord*. 9(2):S59-64.
- Greer PL, Greenberg ME (2008). From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron*. 59(6):846-60.
- Griffey MA, Wozniak D, Wong M, Bible E, Johnson K, Rothman SM, Wentz AE, Cooper JD, Sands MS (2006). CNS-directed AAV2-mediated gene therapy ameliorates functional deficits in a murine model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Mol Ther*. 13(3):538-47.
- Grillner S, Robertson B, Kotaleski JH (2020). Basal Ganglia-A Motion Perspective. *Compr Physiol*. 10(4):1241-75.
- Grimm D, Kay MA (2003). From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther*. 3(4):281-304.
- Grovala MR, Jinich A, Paleologos N, Arroyo EJ, Browne KD, Swanson RL, Duda JE, Cullen DK (2023). Persistence of Hyper-Ramified Microglia in Porcine Cortical Gray Matter after Mild Traumatic Brain Injury. *Biomedicines*. 11(7):1960.
- Guan Y, Zhao X, Liu F, Yan S, Wang Y, Du C, Cui X, Li R, Zhang CX (2020). Pathogenic Mutations Differentially Regulate Cell-to-Cell Transmission of α -Synuclein. *Front Cell Neurosci*. 14:159.
- Gubinelli F, Sarauskyte L, Venuti C, Kulacz I, Cazzolla G, Negrini M, Anwer D, Vecchio I, Jakobs F, Manfredsson FP, Davidsson M, Heuer A (2022). Characterisation of functional deficits induced by AAV overexpression of alpha-synuclein in rats. *Curr Res Neurobiol*. 4:100065.
- Guerini FR, Beghi E, Riboldazzi G, Zangaglia R, Pianezzola C, Bono G, Casali C, Di Lorenzo C, Agliardi C, Nappi G, Clerici M, Martignoni E (2009). BDNF Val66Met polymorphism is associated with cognitive impairment in Italian patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 16(11):1240-5.
- Guilarte TR, Toscano CD, McGlothlan JL, Weaver SA (2003). Environmental enrichment reverses cognitive and molecular deficits induced by developmental lead exposure. *Ann Neurol*. 53(1):50-6.
- Guo M, Wang J, Zhao Y, Feng Y, Han S, Dong Q, Cui M, Tieu K (2020). Microglial exosomes facilitate α -synuclein transmission in Parkinson's disease. *Brain*. 143(5):1476-97.

- Guo Q, Wang B, Wang X, Smith WW, Zhu Y, Liu Z (2021). Activation of Nrf2 in Astrocytes Suppressed PD-Like Phenotypes via Antioxidant and Autophagy Pathways in Rat and Drosophila Models. *Cells*. 10(8):1850
- Haaxma CA, Bloem BR, Borm GF, Oyen WJ, Leenders KL, Eshuis S, Booij J, Dluzen DE, Horstink MW (2007). Gender differences in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 78(8):819-24.
- Haleagrahara N, Siew CJ, Ponnusamy K (2013). Effect of quercetin and desferrioxamine on 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced neurotoxicity in striatum of rats. *J Toxicol Sci*. 38(1):25-33.
- He YY, Zhang XY, Yung WH, Zhu JN, Wang JJ (2013). Role of BDNF in central motor structures and motor diseases. *Mol Neurobiol*. 48(3):783-93.
- He L, Lee EY, Sterling NW, Kong L, Lewis MM, Du G, Eslinger PJ, Huang X (2016). The Key Determinants to Quality of Life in Parkinson's Disease Patients: Results from the Parkinson's Disease Biomarker Program (PDBP). *J Parkinsons Dis*. 6(3):523-32.
- Hegarty SV, Sullivan AM, O'Keeffe GW (2013). Midbrain dopaminergic neurons: a review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev Biol*. 379(2):123-38.
- Helley MP, Pinnell J, Sportelli C, Tieu K (2017). Mitochondria: A Common Target for Genetic Mutations and Environmental Toxicants in Parkinson's Disease. *Front Genet*. 8:177.
- Helwig M, Klinkenberg M, Rusconi R, Musgrove RE, Majbour NK, El-Agnaf OM, Ulusoy A, Di Monte DA (2016). Brain propagation of transduced α -synuclein involves non-fibrillar protein species and is enhanced in α -synuclein null mice. *Brain*. 139(3):856-70.
- Henrich MT, Geibl FF, Lee B, Chiu WH, Koprach JB, Brotchie JM, Timmermann L, Decher N, Matschke LA, Oertel WH (2018). A53T- α -synuclein overexpression in murine locus coeruleus induces Parkinson's disease-like pathology in neurons and glia. *Acta Neuropathol Commun*. 6(1):39.
- Hernandez LF, Obeso I, Costa RM, Redgrave P, Obeso JA (2019). Dopaminergic Vulnerability in Parkinson Disease: The Cost of Humans' Habitual Performance. *Trends Neurosci*. 42(6):375-83.
- Herrán E, Ruiz-Ortega JA, Aristieta A, Igartua M, Requejo C, Lafuente JV, Ugedo L, Pedraz JL, Hernández RM (2013). In vivo administration of VEGF- and GDNF-releasing biodegradable polymeric microspheres in a severe lesion model of Parkinson's disease. *Eur J Pharm Biopharm*. 85(3B):1183-90.
- Herrán E, Requejo C, Ruiz-Ortega JA, Aristieta A, Igartua M, Bengoetxea H, Ugedo L, Pedraz JL, Lafuente JV, Hernández RM (2014). Increased antiparkinson efficacy of the combined administration of VEGF- and GDNF-loaded nanospheres in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Int J Nanomedicine*. 9:2677-87.
- Hikosaka O (2007). GABAergic output of the basal ganglia. *Prog Brain Res*. 160:209-26.
- Hirsch EC, Hunot S (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*. 8(4):382-97.
- Hirsch L, Jette N, Frolkis A, Steeves T, Pringsheim T (2016). The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*. 46(4):292-300.
- Howells DW, Porritt MJ, Wong JY, Batchelor PE, Kalnins R, Hughes AJ, Donnan GA (2000). Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol*. 166(1):127-35.
- Hu YS, Long N, Pigino G, Brady ST, Lazarov O (2013). Molecular mechanisms of environmental enrichment: impairments in Akt/GSK3 β , neurotrophin-3 and CREB signaling. *PLoS One*. 8(5):e64460.
- Hu S, Hu M, Liu J, Zhang B, Zhang Z, Zhou FH, Wang L, Dong J (2020). Phosphorylation of Tau and α -Synuclein Induced Neurodegeneration in MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 16:651-63.

8. Bibliografía

- Huang LY, Patel A, Ng R, Miller EB, Halder S, McKenna R, Asokan A, Agbandje-McKenna M (2016). Characterization of the Adeno-Associated Virus 1 and 6 Sialic Acid Binding Site. *J Virol.* 90(11):5219-30.
- Huang Y, Yun W, Zhang M, Luo W, Zhou X (2018). Serum concentration and clinical significance of brain-derived neurotrophic factor in patients with Parkinson's disease or essential tremor. *J Int Med Res.* 46(4):1477-85.
- Hunn BH, Cragg SJ, Bolam JP, Spillantini MG, Wade-Martins R (2015). Impaired intracellular trafficking defines early Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 38(3):178-88.
- Hutson TH, Kathe C, Palmisano I, Bartholdi K, Hervera A, De Virgiliis F, McLachlan E, Zhou L, Kong G, Barraud Q, Danzi MC, Medrano-Fernandez A, Lopez-Atalaya JP, Boutillier AL, Sinha SH, Singh AK, Chaturbedy P, Moon LDF, Kundu TK, Bixby JL, Lemmon VP, Barco A, Courtine G, Di Giovanni S (2019). Cbp-dependent histone acetylation mediates axon regeneration induced by environmental enrichment in rodent spinal cord injury models. *Sci Transl Med.* 11(487):eaaw2064.
- Ibáñez CF (2013). Structure and physiology of the RET receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(2):a009134.
- Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC (2000). Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol.* 164(1):45-52.
- Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, Nihira T, Kobayashi T, Ohyama M, Sato S, Takanashi M, Funayama M, Hirayama A, Soga T, Hishiki T, Suematsu M, Yagi T, Ito D, Kosakai A, Hayashi K, Shouji M, Nakanishi A, Suzuki N, Mizuno Y, Mizushima N, Amagai M, Uchiyama Y, Mochizuki H, Hattori N, Okano H (2012). Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and α -synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol Brain.* 5:35.
- Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y (2003). Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol.* 106:518-26.
- Iofrida C, Daniele S, Pietrobono D, Fusi J, Galetta F, Trincavelli ML, Bonuccelli U, Franzoni F, Martini C (2017). Influence of physical exercise on β -amyloid, α -synuclein and tau accumulation: an in vitro model of oxidative stress in human red blood cells. *Arch Ital Biol.* 155(1-2):33-42.
- Iovino L, Tremblay ME, Civiero L (2020). Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells. *J Pharmacol Sci.* 144(3):151-64.
- Ip CW, Klaus LC, Karikari AA, Visanji NP, Brotchie JM, Lang AE, Volkman J, Koprach JB (2017). AAV1/2-induced overexpression of A53T- α -synuclein in the substantia nigra results in degeneration of the nigrostriatal system with Lewy-like pathology and motor impairment: a new mouse model for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 5(1):11.
- Irwin DJ, Lee VM, Trojanowski JQ (2013). Parkinson's disease dementia: convergence of α -synuclein, tau and amyloid- β pathologies. *Nat Rev Neurosci.* 14(9):626-36.
- Jadavji NM, Kolb B, Metz GA (2006). Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats. *Neuroscience.* 140(4):1127-38.
- Jankovic J (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 79(4):368-76.
- Jellinger KA (2011). Synuclein deposition and non-motor symptoms in Parkinson disease. *J Neurol Sci.* 310(1-2):107-11.
- Jeong HK, Ji KM, Kim J, Jou I, Joe EH (2013). Repair of astrocytes, blood vessels, and myelin in the injured brain: possible roles of blood monocytes. *Mol Brain.* 6:28.

- Joe EH, Choi DJ, An J, Eun JH, Jou I, Park S (2018). Astrocytes, Microglia, and Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol.* 27(2):77-87.
- Joers V, Tansey MG, Mulas G, Carta AR (2017). Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. *Prog Neurobiol.* 155:57-75.
- Jung CK, Herms J (2014). Structural dynamics of dendritic spines are influenced by an environmental enrichment: an in vivo imaging study. *Cereb Cortex.* 24(2):377-84.
- Jungling A, Reglodi D, Karadi ZN, Horvath G, Farkas J, Gaszner B, Tamas A (2017). Effects of Postnatal Enriched Environment in a Model of Parkinson's Disease in Adult Rats. *Int J Mol Sci.* 18(2):406.
- Jüngling A, Reglődi D, Tamás A (2018). Review on the neuroprotective effects of environmental enrichment in models of Parkinson's disease. *Clin Pharmacol Transl Med.* 2(2):101-7.
- Kageyama T, Nakamura M, Matsuo A, Yamasaki Y, Takakura Y, Hashida M, Kanai Y, Naito M, Tsuruo T, Minato N, Shimohama S (2000). The 4F2hc/LAT1 complex transports L-DOPA across the blood-brain barrier. *Brain Res.* 879(1-2):115-21.
- Kam TI, Hinkle JT, Dawson TM, Dawson VL (2020). Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 144:105028.
- Kang SS, Zhang Z, Liu X, Manfredsson FP, Benskey MJ, Cao X, Xu J, Sun YE, Ye K (2017). TrkB neurotrophic activities are blocked by α -synuclein, triggering dopaminergic cell death in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(40):10773-8.
- Kang SS, Wu Z, Liu X, Edgington-Mitchell L, Ye K (2022). Treating Parkinson's Disease via Activation of BDNF/TrkB Signaling Pathways and Inhibition of Delta-Secretase. *Neurotherapeutics.* 19(4):1283-97.
- Kanaan NM, Kordower JH, Collier TJ (2007). Age-related accumulation of Marinesco bodies and lipofuscin in rhesus monkey midbrain dopamine neurons: relevance to selective neuronal vulnerability. *J Comp Neurol.* 502(5):683-700.
- Karpova NN (2014). Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity. *Neuropharmacology.* 76(C):709-18.
- Kasdagli MI, Katsouyanni K, Dimakopoulou K, Samoli E (2019). Air pollution and Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis up to 2018. *Int J Hyg Environ Health.* 222(3):402-9.
- Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 47(9):1304-9.
- Kawamoto Y, Takeda K, Okuno Y, Yamakawa Y, Ito Y, Taguchi R, Kato M, Suzuki H, Takahashi M, Nakashima I (2004). Identification of RET autophosphorylation sites by mass spectrometry. *J Biol Chem.* 279(14):14213-24.
- Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP Jr (2006). Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci.* 26(19):5256-64.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.* 386(6624):493-5.
- Kempster PA, Williams DR, Selikhova M, Holton J, Revesz T, Lees AJ (2007). Patterns of levodopa response in Parkinson's disease: a clinico-pathological study. *Brain.* 130(8):2123-8.
- Keshet Y, Seger R (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol.* 661:3-38.
- Kwon JH, Gaire BP, Park SJ, Shin DY, Choi JW (2018). Identifying lysophosphatidic acid receptor subtype 1 (LPA₁) as a novel factor to modulate microglial activation and their TNF- α production by activating ERK1/2. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 1863(10):1237-45.

8. Bibliografía

- Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G, Abeliovich A (2007). A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science*. 317(5842):1220-4.
- Kim SR, Kareva T, Yarygina O, Kholodilov N, Burke RE (2012). AAV transduction of dopamine neurons with constitutively active Rheb protects from neurodegeneration and mediates axon regrowth. *Mol Ther*. 20(2):275-86.
- Kim C, Ho DH, Suk JE, You S, Michael S, Kang J, Joong Lee S, Masliah E, Hwang D, Lee HJ, Lee SJ (2013). Neuron-released oligomeric α -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun*. 4:1562.
- Kim BK, Shin MS, Kim CJ, Baek SB, Ko YC, Kim YP (2014). Treadmill exercise improves short-term memory by enhancing neurogenesis in amyloid beta-induced Alzheimer disease rats. *J Exerc Rehabil*. 10(1):2-8.
- Kim MS, Yu JH, Kim CH, Choi JY, Seo JH, Lee MY, Yi CH, Choi TH, Ryu YH, Lee JE, Lee BH, Kim H, Cho SR (2016). Environmental enrichment enhances synaptic plasticity by internalization of striatal dopamine transporters. *J Cereb Blood Flow Metab*. 36(12):2122-33.
- Kim K, Wi S, Seo JH, Pyo S, Cho SR (2021). Reduced Interaction of Aggregated α -Synuclein and VAMP2 by Environmental Enrichment Alleviates Hyperactivity and Anxiety in a Model of Parkinson's Disease. *Genes (Basel)*. 12(3):392.
- Kiray H, Lindsay SL, Hosseinzadeh S, Barnett SC (2016). The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. *Exp Neurol*. 283:541-9.
- Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, Muzyczka N, Mandel RJ, Björklund A (2002). Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci*. 22(7):2780-91.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 392(6676):605-8.
- Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzell E (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 9(7):505-18.
- Komulainen P, Pedersen M, Hänninen T, Bruunsgaard H, Lakka TA, Kivipelto M, Hassinen M, Rauramaa TH, Pedersen BK, Rauramaa R (2008). BDNF is a novel marker of cognitive function in ageing women: the DR's EXTRA Study. *Neurobiol Learn Mem*. 90(4):596-603.
- Kondo M, Takei Y, Hirokawa N (2012). Motor protein KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. *Neuron*. 73(4):743-57.
- Koprach JB, Johnston TH, Reyes MG, Sun X, Brotchie JM (2010). Expression of human A53T alpha-synuclein in the rat substantia nigra using a novel AAV1/2 vector produces a rapidly evolving pathology with protein aggregation, dystrophic neurite architecture and nigrostriatal degeneration with potential to model the pathology of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 5:43.
- Koprach JB, Johnston TH, Huot P, Reyes MG, Espinosa M, Brotchie JM (2011). Progressive neurodegeneration or endogenous compensation in an animal model of Parkinson's disease produced by decreasing doses of alpha-synuclein. *PLoS One*. 6(3):e17698.
- Kordower JH, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Palfi S, Roitberg BZ, Emborg M, Hantraye P, Déglon N, Aebischer P (1999). Lentiviral gene transfer to the nonhuman primate brain. *Exp Neurol*. 160(1):1-16.
- Kordower JH, Olanow CW, Dodiya HB, Chu Y, Beach TG, Adler CH, Halliday GM, Bartus RT (2013). Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain*. 136(8):2419-31.
- Kouli A, Horne CB, Williams-Gray CH (2019). Toll-like receptors and their therapeutic potential in Parkinson's disease and α -synucleinopathies. *Brain Behav Immun*. 81:41-51.

- Kragh CL, Lund LB, Febbraro F, Hansen HD, Gai WP, El-Agnaf O, Richter-Landsberg C, Jensen PH (2009). Alpha-synuclein aggregation and Ser-129 phosphorylation-dependent cell death in oligodendroglial cells. *J Biol Chem.* 284(15):10211-22.
- Kramer ER, Aron L, Ramakers GM, Seitz S, Zhuang X, Beyer K, Smidt MP, Klein R (2007). Absence of Ret signaling in mice causes progressive and late degeneration of the nigrostriatal system. *PLoS Biol.* 5(3):e39.
- Kramer ER (2015a). Crosstalk of parkin and Ret in dopaminergic neurons. *Oncotarget.* 6(18):15704-5.
- Kramer ER (2015b). The neuroprotective and regenerative potential of parkin and GDNF/Ret signaling in the midbrain dopaminergic system. *Neural Regen Res.* 10(11):1752-3.
- Krause M, Fogel W, Heck A, Hacke W, Bonsanto M, Trenkwalder C, Tronnier V (2001). Deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease: subthalamic nucleus versus globus pallidus internus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 70(4):464-70.
- Kriegstein K (2008). Neurotrophic Factors. *Encycl Mol Pharmacol.* 843-5.
- Kwon M, Fernández JR, Zegarek GF, Lo SB, Firestein BL (2011). BDNF-promoted increases in proximal dendrites occur via CREB-dependent transcriptional regulation of cypin. *J Neurosci.* 31(26):9735-45.
- Lafuente JV, Requejo C, Bengoetxea H, Ortuzar N, Bulnes S (2014). Angioglioneurinas y enriquecimiento ambiental: una prometedora alianza para la restauración del cerebro. *OmniaScience.* 209-55.
- Lanciego JL, Luquin N, Obeso JA (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2(12):a009621.
- Lang AE, Houeto JL, Krack P, Kubu C, Lyons KE, Moro E, Ondo W, Pahwa R, Poewe W, Tröster AI, Uitti R, Voon V (2006). Deep brain stimulation: preoperative issues. *Mov Disord.* 21(14):S171-96.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 219(4587):979-80.
- Langston JW (2017). The MPTP Story. *J Parkinsons Dis.* 7(s1):S11-9.
- de Lau LM, Giesbergen PC, de Rijk MC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM (2004). Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study. *Neurology.* 63(7):1240-4.
- Lau YS, Patki G, Das-Panja K, Le WD, Ahmad SO (2011). Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. *Eur J Neurosci.* 33(7):1264-74.
- Lauwers E, Debyser Z, Van Dorpe J, De Strooper B, Nuttin B, Baekelandt V (2003). Neuropathology and neurodegeneration in rodent brain induced by lentiviral vector-mediated overexpression of alpha-synuclein. *Brain Pathol.* 13(3):364-72.
- Lauwers E, Bequé D, Van Laere K, Nuyts J, Bormans G, Mortelmans L, Casteels C, Vercammen L, Bockstael O, Nuttin B, Debyser Z, Baekelandt V (2007). Non-invasive imaging of neuropathology in a rat model of alpha-synuclein overexpression. *Neurobiol Aging.* 28(2):248-57.
- Leal G, Bramham CR, Duarte CB (2017). BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. *Vitam Horm.* 104:153-95.
- Ledesma MD, Galvan C, Hellias B, Dotti C, Jensen PH (2002). Astrocytic but not neuronal increased expression and redistribution of parkin during unfolded protein stress. *J Neurochem.* 83(6):1431-40.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* 294(5548):1945-8.

8. Bibliografía

- Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009). Parkinson's disease. *Lancet*. 373(9680):2055-66.
- Leger M, Bouet V, Freret T, Darmaillacq AS, Dacher M, Dauphin F, Boulouard M, Schumann-Bard P (2012). Environmental enrichment improves recent but not remote memory in association with a modified brain metabolic activation profile in adult mice. *Behav Brain Res*. 228(1):22-9.
- Leverenz JB, Watson GS, Shofer J, Zabetian CP, Zhang J, Montine TJ (2011). Cerebrospinal fluid biomarkers and cognitive performance in non-demented patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 17(1):61-4.
- LeWitt PA, Fahn S (2016). Levodopa therapy for Parkinson disease: A look backward and forward. *Neurology*. 86(14):S3-12.
- Li L, Tang BL (2005). Environmental enrichment and neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Res Commun*. 334(2):293-7.
- Li Y, Liu W, Oo TF, Wang L, Tang Y, Jackson-Lewis V, Zhou C, Geghman K, Bogdanov M, Przedborski S, Beal MF, Burke RE, Li C (2009). Mutant LRRK2(R1441G) BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 12(7):826-8.
- Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 541(7638):481-7.
- Lill CM, Hansen J, Olsen JH, Binder H, Ritz B, Bertram L (2015). Impact of Parkinson's disease risk loci on age at onset. *Mov Disord*. 30(6):847-50.
- Lim SY, Fox SH, Lang AE (2009). Overview of the extranigral aspects of Parkinson disease. *Arch Neurol*. 66(2):167-72.
- Lin L, Lian HT, Sun XY, Yu YM, Liu B (2015). An L-dopa electrochemical sensor based on a graphene doped molecularly imprinted chitosan film. *Anal Methods*. 7(4):1387-94.
- Lin JG, Chen CJ, Yang HB, Chen YH, Hung SY (2017). Electroacupuncture Promotes Recovery of Motor Function and Reduces Dopaminergic Neuron Degeneration in Rodent Models of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 18(9):1846.
- Lisowski L, Tay SS, Alexander IE (2015). Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 24:59-67.
- Liu SY, Qiao HW, Song TB, Liu XL, Yao YX, Zhao CS, Barret O, Xu SL, Cai YN, Tamagnan GD, Sossi V, Lu J, Chan P (2022). Brain microglia activation and peripheral adaptive immunity in Parkinson's disease: a multimodal PET study. *J Neuroinflammation*. 19(1):209.
- Iizumi T, Takahashi S, Mashima K, Minami K, Izawa Y, Abe T, Hishiki T, Suematsu M, Kajimura M, Suzuki N (2016). A possible role of microglia-derived nitric oxide by lipopolysaccharide in activation of astroglial pentose-phosphate pathway via the Keap1/Nrf2 system. *J Neuroinflammation*. 13(1):99.
- Lo Bianco C, Ridet JL, Schneider BL, Deglon N, Aebischer P (2002). alpha -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(16):10813-8.
- Loke H, Harley V, Lee J (2015). Biological factors underlying sex differences in neurological disorders. *Int J Biochem Cell Biol*. 65:139-50.
- Lou H, Montoya SE, Alerte TN, Wang J, Wu J, Peng X, Hong CS, Friedrich EE, Mader SA, Pedersen CJ, Marcus BS, McCormack AL, Di Monte DA, Daubner SC, Perez RG (2010). Serine 129 phosphorylation reduces the ability of alpha-synuclein to regulate tyrosine hydroxylase and protein phosphatase 2A in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 285(23):17648-61.
- Love S, Plaha P, Patel NK, Hotton GR, Brooks DJ, Gill SS (2005). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces neuronal sprouting in human brain. *Nat Med*. 11(7):703-4.

- Lu B, Pang PT, Woo NH (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 6(8):603-14.
- Ludtmann MHR, Angelova PR, Horrocks MH, Choi ML, Rodrigues M, Baev AY, Berezhnov AV, Yao Z, Little D, Banushi B, Al-Menhali AS, Ranasinghe RT, Whiten DR, Yapom R, Dolt KS, Devine MJ, Gissen P, Kunath T, Jaganjac M, Pavlov EV, Klenerman D, Abramov AY, Gandhi S (2018). α -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease. *Nat Commun.* 9(1):2293.
- Ma D, Wang X, Han J (2000). NIH 3T3 cells or engineered NIH 3T3 cells stably expressing GDNF can protect primary dopaminergic neurons. *Neurol Res.* 22:538-44.
- Ma MR, Hu ZW, Zhao YF, Chen YX, Li YM (2016). Phosphorylation induces distinct alpha-synuclein strain formation. *Sci Rep.* 6:37130.
- Mariani LL, Longueville S, Girault JA, Hervé D, Gervasi N (2019). Differential enhancement of ERK, PKA and Ca²⁺ signaling in direct and indirect striatal neurons of Parkinsonian mice. *Neurobiol Dis.* 130:104506.
- Maries E, Dass B, Collier TJ, Kordower JH, Steece-Collier K (2003). The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nat Rev Neurosci.* 4(9):727-38.
- Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol.* 2:535-62.
- Martí Y, Matthaeus F, Lau T, Schloss P (2017). Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) differentially affects monoamine release and re-uptake in murine embryonic stem cell-derived dopaminergic and serotonergic neurons. *Mol Cell Neurosci.* 83:37-45.
- Märtn A, Calvigioni D, Tzortzi O, Fuzik J, Wärnberg E, Meletis K (2019). A Spatiomolecular Map of the Striatum. *Cell Rep.* 29(13):4320-33.e5.
- Martínez-Martín P, Rodríguez-Blázquez C, Forjaz MJ, Alvarez-Sánchez M, Arakaki T, Bergareche-Yarza A, Chade A, Garretto N, Gershanik O, Kurtis MM, Martínez-Castrillo JC, Mendoza-Rodríguez A, Moore HP, Rodríguez-Violante M, Singer C, Tilley BC, Huang J, Stebbins GT, Goetz CG (2014). Relationship between the MDS-UPDRS domains and the health-related quality of life of Parkinson's disease patients. *Eur J Neurol.* 21(3):519-24.
- Martinez-Ramirez D, Okun MS (2013). Rationale and clinical pearls for primary care doctors referring patients for deep brain stimulation. *Gerontology.* 60(1):38-48.
- Mary B, Maurya S, Arumugam S, Kumar V, Jayandharan GR (2019). Post-translational modifications in capsid proteins of recombinant adeno-associated virus (AAV) 1-rh10 serotypes. *FEBS J.* 286(24):4964-81.
- Matsuda W, Ehara A, Nakadate K, Yoshimoto K, Ueda S (2018). Effects of environmental enrichment on the activity of the amygdala in micrencephalic rats exposed to a novel open field. *Congenit Anom (Kyoto).* 58(1):16-23.
- McKeith IG, Dickson DW, Lowe J, Emre M, O'Brien JT, Feldman H, Cummings J, Duda JE, Lippa C, Perry EK, Aarsland D, Arai H, Ballard CG, Boeve B, Burn DJ, Costa D, Del Ser T, Dubois B, Galasko D, Gauthier S, Goetz CG, Gomez-Tortosa E, Halliday G, Hansen LA, Hardy J, Iwatsubo T, Kalaria RN, Kaufer D, Kenny RA, Korczyn A, Kosaka K, Lee VM, Lees A, Litvan I, Londos E, Lopez OL, Minoshima S, Mizuno Y, Molina JA, Mukaetova-Ladinska EB, Pasquier F, Perry RH, Schulz JB, Trojanowski JQ, Yamada M; Consortium on DLB (2005). Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology.* 65(12):1863-72.
- McQuaid RJ, Audet MC, Jacobson-Pick S, Anisman H (2013). Environmental enrichment influences brain cytokine variations elicited by social defeat in mice. *Psychoneuroendocrinology.* 38(7):987-96.
- Meka DP, Müller-Rischart AK, Nidadavolu P, Mohammadi B, Motori E, Ponna SK, Aboutaleb H, Bassal M, Annamneedi A, Finckh B, Miesbauer M, Rotermund N, Lohr C, Tatzelt J, Winklhofer KF, Kramer ER (2015). Parkin cooperates with GDNF/RET signaling to prevent dopaminergic neuron degeneration. *J Clin Invest.* 125(5):1873-85.

8. Bibliografía

- Mena MA, García de Yébenes J (2008). Glial cells as players in parkinsonism: the "good," the "bad," and the "mysterious" glia. *Neuroscientist*. 14(6):544-60.
- Mercuri NB, Bernardi G (2005). The 'magic' of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends Pharmacol Sci*. 26(7):341-4.
- Meredith GE, Kang UJ (2006). Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. *Mov Disord*. 21(10):1595-606.
- Miller DB, O'Callaghan JP (2015). Biomarkers of Parkinson's disease: present and future. *Metabolism*. 64(3):S40-6.
- Mitra R, Sapolsky RM (2012). Short-term enrichment makes male rats more attractive, more defensive and alters hypothalamic neurons. *PLoS One*. 7(5):e36092.
- Mizoguchi H, Nakade J, Tachibana M, Ibi D, Someya E, Koike H, Kamei H, Nabeshima T, Itohara S, Takuma K, Sawada M, Sato J, Yamada K (2011). Matrix metalloproteinase-9 contributes to kindled seizure development in pentylentetrazole-treated mice by converting pro-BDNF to mature BDNF in the hippocampus. *J Neurosci*. 31(36):12963-71.
- Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, Ozawa T, Kagawa Y (1989). Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 163(3):1450-5.
- Moehle MS, West AB (2015). M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally? *Neuroscience*. 302:59-73.
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T (1999). Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 270(1):45-8.
- Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Diamond MC, Eriksson PS, Bogdanovic N (2002). Environmental enrichment and the brain. *Prog Brain Res*. 138:109-33.
- Mora F, Segovia G, del Arco A (2007). Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev*. 55(1):78-88.
- Mori S, Wang L, Takeuchi T, Kanda T (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology*. 330(2):375-83.
- More SV, Kumar H, Kim IS, Song SY, Choi DK (2013). Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mediators Inflamm*. 2013:952375.
- Mullett SJ, Hamilton RL, Hinkle DA (2009). DJ-1 immunoreactivity in human brain astrocytes is dependent on infarct presence and infarct age. *Neuropathology*. 29(2):125-31.
- Mulligan LM (2014). RET revisited: expanding the oncogenic portfolio. *Nat Rev Cancer*. 14(3):173-86.
- Muntane G, Ferrer I, Martinez-Vicente M (2012). α -synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain. *Neuroscience*. 200:106-19.
- Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A (2000). Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 60:277-90.
- Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, Do CB, Hernandez DG, Saad M, DeStefano AL, Kara E, Bras J, Sharma M, Schulte C, Keller MF, Arepalli S, Letson C, Edsall C, Stefansson H, Liu X, Pliner H, Lee JH, Cheng R; International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC); Parkinson's Study Group (PSG) Parkinson's Research: The Organized GENetics Initiative (PROGENI); 23andMe; GenePD; NeuroGenetics Research Consortium (NGRC); Hussman Institute of Human Genomics (HIHG); Ashkenazi Jewish Dataset Investigator; Cohorts for Health and Aging Research in Genetic Epidemiology (CHARGE); North American Brain Expression Consortium (NABEC); United Kingdom Brain Expression Consortium (UKBEC); Greek Parkinson's Disease Consortium; Alzheimer Genetic Analysis Group; Ikram MA, Ioannidis JP, Hadjigeorgiou GM, Bis JC, Martinez M, Perlmutter JS, Goate

- A, Marder K, Fiske B, Sutherland M, Xiromerisiou G, Myers RH, Clark LN, Stefansson K, Hardy JA, Heutink P, Chen H, Wood NW, Houlden H, Payami H, Brice A, Scott WK, Gasser T, Bertram L, Eriksson N, Foroud T, Singleton AB (2014). Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet.* 46(9):989-93.
- Nam JH, Leem E, Jeon MT, Jeong KH, Park JW, Jung UJ, Kholodilov N, Burke RE, Jin BK, Kim SR (2015). Induction of GDNF and BDNF by hRheb(S16H) transduction of SNpc neurons: neuroprotective mechanisms of hRheb(S16H) in a model of Parkinson's disease. *Mol Neurobiol.* 51(2):487-99.
- Narita M, Aoki K, Takagi M, Yajima Y, Suzuki T (2003). Implication of brain-derived neurotrophic factor in the release of dopamine and dopamine-related behaviors induced by methamphetamine. *Neuroscience.* 119(3):767-75.
- Negrini M, Tomasello G, Davidsson M, Fenyi A, Adant C, Hauser S, Espa E, Gubinelli F, Manfredsson FP, Melki R, Heuer A (2022). Sequential or Simultaneous Injection of Preformed Fibrils and AAV Overexpression of Alpha-Synuclein Are Equipotent in Producing Relevant Pathology and Behavioral Deficits. *J Parkinsons Dis.* 12(4):1133-53.
- Neidl R, Schneider A, Bousiges O, Majchrzak M, Barbelivien A, de Vasconcelos AP, Dorgans K, Doussau F, Loeffler JP, Cassel JC, Boutillier AL (2016). Late-Life Environmental Enrichment Induces Acetylation Events and Nuclear Factor κ B-Dependent Regulations in the Hippocampus of Aged Rats Showing Improved Plasticity and Learning. *J Neurosci.* 36(15):4351-61.
- Newberry RC (1995). Environmental enrichment: increasing the biological relevance of captive environments. *Appl Anim Behav Sci.* 44:229-43.
- Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, Yang CS, Pickett CB (2005). Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem.* 280(37):32485-92.
- Nilsson MH, Törnqvist AL, Rehncrona S (2005). Deep-brain stimulation in the subthalamic nuclei improves balance performance in patients with Parkinson's disease, when tested without anti-parkinsonian medication. *Acta Neurol Scand.* 111(5):301-8.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 7(9):697-709.
- Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H (2010). BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Histopathol.* 25(2):237-58.
- Nussbaum RL, Ellis CE (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 348(14):1356-64.
- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW (2000). Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 23(10): S8-19.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AH, Halliday G (2010). Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med.* 16(6):653-61.
- Oh JD, Chase TN (2002). Glutamate-mediated striatal dysregulation and the pathogenesis of motor response complications in Parkinson's disease. *Amino Acids.* 23(1-3):133-9.
- Ohira K, Hayashi M (2009). A new aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity. *Curr Neuropharmacol.* 7(4):276-85.
- Okazawa H, Murata M, Watanabe M, Kamei M, Kanazawa I (1992). Dopaminergic stimulation up-regulates the in vivo expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the striatum. *FEBS Lett.* 313(2):138-42.
- Okochi M, Walter J, Koyama A, Nakajo S, Baba M, Iwatsubo T, Meijer L, Kahle PJ, Haass C (2000). Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 275(1):390-7.
- Oliveras-Salvá M, Van der Perren A, Casadei N, Stroobants S, Nuber S, D'Hooge R, Van den Haute C, Baekelandt V (2013). rAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse

8. Bibliografía

- substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 8:44.
- Orefice LL, Waterhouse EG, Partridge JG, Lalchandani RR, Vicini S, Xu B (2013). Distinct roles for somatically and dendritically synthesized brain-derived neurotrophic factor in morphogenesis of dendritic spines. *J Neurosci.* 33(28):11618-32.
- Ou Z, Pan J, Tang S, Duan D, Yu D, Nong H, Wang Z (2021). Global Trends in the Incidence, Prevalence, and Years Lived With Disability of Parkinson's Disease in 204 Countries/Territories From 1990 to 2019. *Front Public Health.* 9:776847.
- Ouchi Y, Yagi S, Yokokura M, Sakamoto M (2009). Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 15(3):S200-4.
- Ouma S, Fukae J, Fujioka S, Yamamoto S, Hatano T, Yoritaka A, Okuma Y, Kashihara KI, Hattori N, Tsuboi Y (2017). The Risk Factors for the Wearing-off Phenomenon in Parkinson's Disease in Japan: A Cross-sectional, Multicenter Study. *Intern Med.* 56(15):1961-6.
- Padron E, Bowman V, Kaludov N, Govindasamy L, Levy H, Nick P, McKenna R, Muzyczka N, Chiorini JA, Baker TS, Agbandje-McKenna M (2005). Structure of adeno-associated virus type 4. *J Virol.* 79(8):5047-58.
- Palasz E, Niewiadomski W, Gasiorowska A, Mietelska-Porowska A, Niewiadomska G (2019a). Neuroplasticity and neuroprotective effect of treadmill training in the chronic mouse model of Parkinson's disease. *Neural Plast.* 2019:1-14.
- Palasz E, Niewiadomski W, Gasiorowska A, Wysocka A, Stepniewska A, Niewiadomska G (2019b). Exercise-Induced Neuroprotection and Recovery of Motor Function in Animal Models of Parkinson's Disease. *Front Neurol.* 10:1143.
- Pan PY, Zhu Y, Shen Y, Yue Z (2019). Crosstalk between presynaptic trafficking and autophagy in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 122:64-71.
- Pang TY, Hannan AJ (2013). Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. *Neuropharmacology.* 64:515-28.
- Pang SY, Ho PW, Liu HF, Leung CT, Li L, Chang EES, Ramsden DB, Ho SL (2019). The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 8:23.
- Parain K, Murer MG, Yan Q, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E, Raisman-Vozari R (1999). Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. *Neuroreport.* 10(3):557-61.
- Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P (2009). Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(10):2015-24.
- Park G, Tan J, Garcia G, Kang Y, Salvesen G, Zhang Z (2016). Regulation of Histone Acetylation by Autophagy in Parkinson Disease. *J Biol Chem.* 291(7):3531-40.
- Parker WD Jr, Parks JK, Swerdlow RH (2008). Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Res.* 1189:215-8.
- Parker JG, Marshall JD, Ahanonu B, Wu YW, Kim TH, Grewe BF, Zhang Y, Li JZ, Ding JB, Ehlers MD, Schnitzer MJ (2018). Diametric neural ensemble dynamics in parkinsonian and dyskinetic states. *Nature.* 557(7704):177-12.
- Parkinson J (1817). An essay on the shaking palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 4(2):223-36; discussion 222.
- Pascual A, Hidalgo-Figueroa M, Piruat JI, Pintado CO, Gómez-Díaz R, López-Barneo J (2008). Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. *Nat Neurosci.* 11(7):755-61.

- Patel M, Singh S (2022). Apigenin Attenuates Functional and Structural Alterations via Targeting NF- κ B/Nrf2 Signaling Pathway in LPS-Induced Parkinsonism in Experimental Rats: Apigenin Attenuates LPS-Induced Parkinsonism in Experimental Rats. *Neurotox Res.* 40(4):941-60.
- Pennartz CM, Berke JD, Graybiel AM, Ito R, Lansink CS, van der Meer M, Redish AD, Smith KS, Voorn P (2009). Corticostriatal Interactions during Learning, Memory Processing, and Decision Making. *J Neurosci.* 29(41):12831-8.
- Pennington ZT, Dong Z, Feng Y, Vetere LM, Page-Harley L, Shuman T, Cai DJ (2019). ezTrack: An open-source video analysis pipeline for the investigation of animal behavior. *Sci Rep.* 9(1):19979.
- Perese DA, Ulman J, Viola J, Ewing SE, Bankiewicz KS (1989). A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Res.* 494(2):285-93.
- Petersén A A, Larsen KE, Behr GG, Romero N, Przedborski S, Brundin P, Sulzer D (2001). Brain-derived neurotrophic factor inhibits apoptosis and dopamine-induced free radical production in striatal neurons but does not prevent cell death. *Brain Res Bull.* 56(3-4):331-5.
- Petrillo S, Schirinzì T, Di Lazzaro G, D'Amico J, Colona VL, Bertini E, Pierantozzi M, Mari L, Mercuri NB, Piemonte F, Pisani A (2020). Systemic activation of Nrf2 pathway in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 35(1):180-4.
- Petroske E, Meredith GE, Callen S, Totterdell S, Lau YS (2001). Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. *Neuroscience.* 106(3):589-601.
- Phan JA, Stokholm K, Zareba-Paslawska J, Jakobsen S, Vang K, Gjedde A, Landau AM, Romero-Ramos M (2017). Early synaptic dysfunction induced by α -synuclein in a rat model of Parkinson's disease. *Sci Rep.* 7(1):6363.
- Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R (2011). The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta.* 1813(9):1619-33.
- Poewe W (2008). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 15(1):14-20.
- Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag AE, Lang AE (2017). Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 3:17013.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 276(5321):2045-7.
- Porritt M, Stanic D, Finkelstein D, Batchelor P, Lockhart S, Hughes A, Kalnins R, Howells D (2005). Dopaminergic innervation of the human striatum in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 20(7):810-8.
- Postuma RB, Iranzo A, Hogl B, Arnulf I, Ferini-Strambi L, Manni R, Miyamoto T, Oertel W, Dauvilliers Y, Ju YE, Puligheddu M, Sonka K, Pelletier A, Santamaria J, Frauscher B, Leu-Semenescu S, Zucconi M, Terzaghi M, Miyamoto M, Unger MM, Carlander B, Fantini ML, Montplaisir JY (2015a). Risk factors for neurodegeneration in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: a multicenter study. *Ann Neurol.* 77(5):830-9.
- Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH, Deuschl G (2015b). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 30(12):1591-601.
- Pozo Devoto VM, Falzone TL (2017). Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease: a role for α -synuclein? *Dis Model Mech.* 10(9):1075-87.
- Prut L, Belzung C (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 463(1-3):3-33.
- Przedborski S (2007). Neuroinflammation and Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol.* 83:535-51.

8. Bibliografía

- Qin XY, Zhang SP, Cao C, Loh YP, Cheng Y (2016). Aberrations in Peripheral Inflammatory Cytokine Levels in Parkinson Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 73(11):1316-24.
- Qiu J, Pintel DJ (2004). Alternative polyadenylation of adeno-associated virus type 5 RNA within an internal intron is governed by the distance between the promoter and the intron and is inhibited by U1 small nuclear RNP binding to the intervening donor. *J Biol Chem.* 279(15):14889-98.
- Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol.* 76(2):791-801.
- Rai SN, Dilnashin H, Birla H, Singh SS, Zahra W, Rathore AS, Singh BK, Singh SP (2019). The Role of PI3K/Akt and ERK in Neurodegenerative Disorders. *Neurotox Res.* 35(3):775-95.
- Ramaswamy S, Kordower JH (2009). Are growth factors the answer? *Parkinsonism Relat Disord.* 15(3):S176-80.
- Ramaswamy S, Soderstrom KE, Kordower JH (2009). Trophic factors therapy in Parkinson's disease. *Prog Brain Res.* 175:201-16.
- Ramonet D, Daher JP, Lin BM, Stafa K, Kim J, Banerjee R, Westerlund M, Pletnikova O, Glauser L, Yang L, Liu Y, Swing DA, Beal MF, Troncoso JC, McCaffery JM, Jenkins NA, Copeland NG, Galter D, Thomas B, Lee MK, Dawson TM, Dawson VL, Moore DJ (2011). Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2. *PLoS One.* 6(4):e18568.
- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kiyin M, Tsien JZ (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci.* 3(3):238-44.
- Ramsey CP, Glass CA, Montgomery MB, Lindl KA, Ritson GP, Chia LA, Hamilton RL, Chu CT, Jordan-Sciutto KL (2007). Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 66(1):75-85.
- Raniga PV, Di Trapani G, Tonissen KF (2017). The Multifaceted Roles of DJ-1 as an Antioxidant. *Adv Exp Med Biol.* 1037:67-87.
- Rannikko EH, Weber SS, Kahle PJ (2015). Exogenous α -synuclein induces toll-like receptor 4 dependent inflammatory responses in astrocytes. *BMC Neurosci.* 16:57.
- Rassu M, Del Giudice MG, Sanna S, Taymans JM, Morari M, Brugnoli A, Frassinetti M, Masala A, Esposito S, Galioto M, Valle C, Carri MT, Biosa A, Greggio E, Crosio C, Iaccarino C (2017). Role of LRRK2 in the regulation of dopamine receptor trafficking. *PLoS One.* 12(6):e0179082.
- Real CC, Ferreira AF, Chaves-Kirsten GP, Torrão AS, Pires RS, Britto LR (2013). BDNF receptor blockade hinders the beneficial effects of exercise in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 237:118-29.
- Redgrave P, Rodriguez M, Smith Y, Rodriguez-Oroz MC, Lehericy S, Bergman H, Agid Y, DeLong MR, Obeso JA (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 11(11):760-72.
- Reeve AK, Ludtmann MH, Angelova PR, Simcox EM, Horrocks MH, Klenerman D, Gandhi S, Turnbull DM, Abramov AY (2015). Aggregated α -synuclein and complex I deficiency: exploration of their relationship in differentiated neurons. *Cell Death Dis.* 6(7):e1820.
- Reimer L, Vesterager LB, Betzer C, Zheng J, Nielsen LD, Kofoed RH, Lassen LB, Bølcho U, Paludan SR, Fog K, Jensen PH (2018). Inflammation kinase PKR phosphorylates α -synuclein and causes α -synuclein-dependent cell death. *Neurobiol Dis.* 115:17-28.
- Requejo C, Ruiz-Ortega JA, Cepeda H, Sharma A, Sharma HS, Ozkizilcik A, Tian R, Moessler H, Ugedo L, Lafuente JV (2018). Nanodelivery of Cerebrolysin and Rearing in Enriched Environment Induce

- Neuroprotective Effects in a Preclinical Rat Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol.* 55(1):286-99.
- Reyes JF, Olsson TT, Lamberts JT, Devine MJ, Kunath T, Brundin P (2015). A cell culture model for monitoring α -synuclein cell-to-cell transfer. *Neurobiol Dis.* 77:266-75.
- Riederer P, Berg D, Casadei N, Cheng F, Classen J, Dresel C, Jost W, Krüger R, Müller T, Reichmann H, Rieß O, Storch A, Strobel S, van Eimeren T, Völker HU, Winkler J, Winklhofer KF, Wüllner U, Zunke F, Monoranu CM (2019). α -Synuclein in Parkinson's disease: causal or bystander? *J Neural Transm (Vienna).* 126(7):815-40.
- Rodríguez M, Rodríguez-Sabate C, Morales I, Sanchez A, Sabate M (2015). Parkinson's disease as a result of aging. *Aging Cell.* 14(3):293-308.
- Rodríguez-Pallares J, Parga JA, Muñoz A, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2007). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurochem.* 103(1):145-56.
- Root DH, Wang HL, Liu B, Barker DJ, Mód L, Szocsics P, Silva AC, Maglóczy Z, Morales M (2016). Glutamate neurons are intermixed with midbrain dopamine neurons in nonhuman primates and humans. *Sci Rep.* 6:30615.
- Rosenblad C, Kirik D, Björklund A (2000). Sequential administration of GDNF into the substantia nigra and striatum promotes dopamine neuron survival and axonal sprouting but not striatal reinnervation or functional recovery in the partial 6-OHDA lesion model. *Exp Neurol.* 161(2):503-16.
- Rosenzweig MR, Bennett EL (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res.* 78(1):57-65.
- Ruf WP, Meirelles JL, Danzer KM (2023). Spreading of alpha-synuclein between different cell types. *Behav Brain Res.* 436:114059.
- Ryan BJ, Hoek S, Fon EA, Wade-Martins R (2015). Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci.* 40(4):200-10.
- Sabio G, Davis RJ (2014). TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin Immunol.* 26(3):237-45.
- Salat D, Tolosa E (2013). Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current status and new developments. *J Parkinsons Dis.* 3(3):255-69.
- Salles A, Romano A, Freudenthal R (2014). Synaptic NF-kappa B pathway in neuronal plasticity and memory. *J Physiol Paris.* 108(4-6):256-62.
- Salmaso N, Silbereis J, Komitova M, Mitchell P, Chapman K, Ment LR, Schwartz ML, Vaccarino FM (2012). Environmental enrichment increases the GFAP+ stem cell pool and reverses hypoxia-induced cognitive deficits in juvenile mice. *J Neurosci.* 32(26):8930-9.
- Samii A, Nutt JG, Ransom BR (2004). Parkinson's disease. *Lancet.* 363(9423):1783-93.
- Sampaio TB, Savall AS, Gutierrez MEZ, Pinton S (2017). Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's diseases: implications for pathogenesis and therapy. *Neural Regen Res.* 12(4):549-57.
- Sanchez G, Varaschin RK, Büeler H, Marcogliese PC, Park DS, Trudeau LE (2014). Unaltered striatal dopamine release levels in young Parkin knockout, Pink1 knockout, DJ-1 knockout and LRRK2 R1441G transgenic mice. *PLoS One.* 9(4):e94826.
- Sanchez-Guajardo V, Febbraro F, Kirik D, Romero-Ramos M (2010). Microglia acquire distinct activation profiles depending on the degree of alpha-synuclein neuropathology in a rAAV based model of Parkinson's disease. *PLoS One.* 5(1):e8784.
- Sariola H, Saarma M (2003). Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci.* 116(19):3855-62.

8. Bibliografía

- Sartori CR, Vieira AS, Ferrari EM, Langone F, Tongiorgi E, Parada CA (2011). The antidepressive effect of the physical exercise correlates with increased levels of mature BDNF, and proBDNF proteolytic cleavage-related genes, p11 and tPA. *Neuroscience*. 180:9-18.
- Sauer H, Oertel WH (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*. 59(2):401-15.
- Savolainen MH, Yan X, Myöhänen TT, Huttunen HJ (2015). Prolyl oligopeptidase enhances α -Synuclein dimerization via direct protein-protein interaction. *J Biol Chem*. 290(8):5117-26.
- Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Nakanishi M, Akaike A, Shimohama S (2000). Neuroprotective mechanism of glial cell line-derived neurotrophic factor in mesencephalic neurons. *J Neurochem*. 74(3):1175-84.
- Sayre LM, Wang F, Hoppel CL (1989). Tetraphenylborate potentiates the respiratory inhibition by the dopaminergic neurotoxin MPP+ in both electron transport particles and intact mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 161(2):809-18.
- Scalzo P, Kümmer A, Bretas TL, Cardoso F, Teixeira AL (2010). Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. *J Neurol*. 257(4):540-5.
- Schafer DP, Stevens B (2010). Synapse elimination during development and disease: immune molecules take centre stage. *Biochem Soc Trans*. 38(2):476-81.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*. 1(8649):1269.
- Schapira AH, Obeso J (2006). Timing of treatment initiation in Parkinson's disease: a need for reappraisal? *Ann Neurol*. 59(3):559-62.
- Schapira AH. *Neurobiology and treatment of Parkinson's disease* (2009). *Trends Pharmacol Sci*. 30(1):41-7.
- Schapira AH, Olanow CW, Greenamyre JT, Bezaud E (2014). Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet*. 384(9942):545-55.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 9(7):676-82.
- Schober A (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res*. 318(1):215-24.
- Schrag A, Quinn N (2000). Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain*. 123(11):2297-305.
- Sconce MD, Churchill MJ, Greene RE, Meshul CK (2015a). Intervention with exercise restores motor deficits but not nigrostriatal loss in a progressive MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 299:156-74.
- Sconce MD, Churchill MJ, Moore C, Meshul CK (2015b). Intervention with 7,8-dihydroxyflavone blocks further striatal terminal loss and restores motor deficits in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 290:454-71.
- Scott D, Roy S. (2012) α -Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility and maintains recycling-pool homeostasis. *J Neurosci*. 32(30):10129-35.
- Sekigawa A, Fujita M, Sekiyama K, Takamatsu Y, Hatano T, Rockenstein E, La Spada AR, Masliah E, Hashimoto M (2012). Distinct mechanisms of axonal globule formation in mice expressing human wild type α -synuclein or dementia with Lewy bodies-linked P123H β -synuclein. *Mol Brain*. 5:34.
- Senkevich K, Gan-Or Z (2020). Autophagy lysosomal pathway dysfunction in Parkinson's disease; evidence from human genetics. *Parkinsonism Relat Disord*. 73:60-71.

- Seo JH, Kang SW, Kim K, Wi S, Lee JW, Cho SR (2020). Environmental Enrichment Attenuates Oxidative Stress and Alters Detoxifying Enzymes in an A53T α -Synuclein Transgenic Mouse Model of Parkinson's Disease. *Antioxidants (Basel)*. 9(10):928.
- Seppi K, Ray Chaudhuri K, Coelho M, Fox SH, Katzenschlager R, Perez Lloret S, Weintraub D, Sampaio C; the collaborators of the Parkinson's Disease Update on Non-Motor Symptoms Study Group on behalf of the Movement Disorders Society Evidence-Based Medicine Committee (2019). Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease-an evidence-based medicine review. *Mov Disord*. 34(2):180-98.
- Serra L, Gelfo F, Petrosini L, Di Domenico C, Bozzali M, Caltagirone C (2018). Rethinking the Reserve with a Translational Approach: Novel Ideas on the Construct and the Interventions. *J Alzheimers Dis*. 65(4):1065-78.
- Shi K, Liu X, Qiao D, Hou L (2017). Effects of Treadmill Exercise on Spontaneous Firing Activities of Striatal Neurons in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Motor Control*. 21(1):58-71.
- Shih IF, Liew Z, Krause N, Ritz B (2016). Lifetime occupational and leisure time physical activity and risk of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 28:112-7.
- Shin JH, Ko HS, Kang H, Lee Y, Lee YI, Pletinkova O, Troconso JC, Dawson VL, Dawson TM (2011). PARIS (ZNF746) repression of PGC-1 α contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell*. 144(5):689-702.
- Shu HF, Yang T, Yu SX, Huang HD, Jiang LL, Gu JW, Kuang YQ (2014). Aerobic exercise for Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*. 9(7):e100503.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 302(5646):841.
- Skibinski G, Hwang V, Ando DM, Daub A, Lee AK, Ravisankar A, Modan S, Finucane MM, Shaby BA, Finkbeiner S (2017). Nrf2 mitigates LRRK2- and α -synuclein-induced neurodegeneration by modulating proteostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114(5):1165-70.
- Smajić S, Prada-Medina CA, Landoulsi Z, Ghelfi J, Delcambre S, Dietrich C, Jarazo J, Henck J, Balachandran S, Pachchek S, Morris CM, Antony P, Timmermann B, Sauer S, Pereira SL, Schwamborn JC, May P, Grünewald A, Spielmann M (2022). Single-cell sequencing of human midbrain reveals glial activation and a Parkinson-specific neuronal state. *Brain*. 145(3):964-78.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*. 86(2):353-87.
- Smith KL, Kassem MS, Clarke DJ, Kuligowski MP, Bedoya-Pérez MA, Todd SM, Lagopoulos J, Bennett MR, Arnold JC (2019). Microglial cell hyper-ramification and neuronal dendritic spine loss in the hippocampus and medial prefrontal cortex in a mouse model of PTSD. *Brain Behav Immun*. 80:889-99.
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 119(1):7-35.
- Sohrabi T, Mirzaei-Behbahani B, Zadali R, Pirhaghi M, Morozova-Roche LA, Meratan AA (2023). Common Mechanisms Underlying α -Synuclein-Induced Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *J Mol Biol*. 435(12):167992.
- Sonustun B, Altay MF, Strand C, Ebanks K, Hondhamuni G, Warner TT, Lashuel HA, Bandopadhyay R (2022). Pathological Relevance of Post-Translationally Modified Alpha-Synuclein (pSer87, pSer129, nTyr39) in Idiopathic Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *Cells*. 11(5):906.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 388(6645):839-40.

8. Bibliografía

- Spillantini MG, Goedert M (2018). Neurodegeneration and the ordered assembly of α -synuclein. *Cell Tissue Res.* 373(1):137-48.
- Spires TL, Grote HE, Varshney NK, Cordery PM, van Dellen A, Blakemore C, Hannan AJ (2004). Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. *J Neurosci.* 24(9):2270-6.
- Srivastava A (2016). In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol.* 21:75-80.
- Stern Y, Arenaza-Urquijo EM, Bartrés-Faz D, Belleville S, Cantilon M, Chetelat G, Ewers M, Franzmeier N, Kempermann G, Kremen WS, Okonkwo O, Scarmeas N, Soldan A, Udeh-Momoh C, Valenzuela M, Vemuri P, Vuoksimaa E (2020). The Reserve, Resilience and Protective Factors PIA Empirical Definitions and Conceptual Frameworks Workgroup. Whitepaper: Defining and investigating cognitive reserve, brain reserve, and brain maintenance. *Alzheimers Dement.* 16(9):1305-11.
- Stratta P, Sanità P, Bonanni RL, de Cataldo S, Angelucci A, Rossi R, Origlia N, Domenici L, Carmassi C, Piccinni A, Dell'Osso L, Rossi A (2016). Clinical correlates of plasma brain-derived neurotrophic factor in post-traumatic stress disorder spectrum after a natural disaster. *Psychiatry Res.* 244:165-70.
- Stuckenschneider T, Askew CD, Meneses AL, Baake R, Weber J, Schneider S (2019). The Effect of Different Exercise Modes on Domain-Specific Cognitive Function in Patients Suffering from Parkinson's Disease: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *J Parkinsons Dis.* 9(1):73-95.
- Stutika C, Hüser D, Weger S, Rutz N, Heßler M, Heilbronn R (2015). Definition of herpes simplex virus helper functions for the replication of adeno-associated virus type 5. *J Gen Virol.* 96(4):840-50.
- Stanley G, Gokce O, Malenka RC, Südhof TC, Quake SR (2020). Continuous and Discrete Neuron Types of the Adult Murine Striatum. *Neuron.* 105(4):688-99.e8.
- Starr PA, Vitek JL, Bakay RA (1998). Ablative surgery and deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Neurosurgery.* 43(5):989-1013; discussion 1013-5.
- Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R, Prifti L, Venkatesh K, Federoff HJ (2008). Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 29(11):1690-701.
- Su X, Federoff HJ, Maguire-Zeiss KA (2009). Mutant alpha-synuclein overexpression mediates early proinflammatory activity. *Neurotox Res.* 16(3):238-54.
- Sucunza D, Rico AJ, Roda E, Collantes M, González-Aseguinolaza G, Rodríguez-Pérez AI, Peñuelas I, Vázquez A, Labandeira-García JL, Broccoli V, Lanciego JL (2021). Glucocerebrosidase Gene Therapy Induces Alpha-Synuclein Clearance and Neuroprotection of Midbrain Dopaminergic Neurons in Mice and Macaques. *Int J Mol Sci.* 22(9):4825.
- Sun L, Jiang WW, Wang Y, Yuan YS, Rong Z, Wu J, Fan Y, Lu M, Zhang KZ (2021a). Phosphorylated α -synuclein aggregated in Schwann cells exacerbates peripheral neuroinflammation and nerve dysfunction in Parkinson's disease through TLR2/NF- κ B pathway. *Cell Death Discov.* 7(1):289.
- Sun X, Yu X, Zhang L, Zhao W, Wang M, Zhang Y, Li X, Gao R, Breger LS, Dovero S, Porras G, Fernagut PO, Dehay B, Bezard E, Qin C (2021b). Comparison of the expression and toxicity of AAV2/9 carrying the human A53T α -synuclein gene in presence or absence of WPRE. *Heliyon.* 7(2):e06302.
- Surmeier DJ, Obeso JA, Halliday GM (2017). Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci.* 18(2):101-13.
- Tagliaferro P, Kareva T, Oo TF, Yarygina O, Kholodilov N, Burke RE (2015). An early axonopathy in a hLRRK2(R1441G) transgenic model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis.* 82:359-71.
- Tagliaferro P, Burke RE (2016). Retrograde Axonal Degeneration in Parkinson Disease. *J Parkinsons Dis.* 6(1):1-15.
- Takahashi S (2021). Neuroprotective Function of High Glycolytic Activity in Astrocytes: Common Roles in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 22(12):6568.

- Takakusaki K, Saitoh K, Harada H, Kashiwayanagi M (2004). Role of basal ganglia-brainstem pathways in the control of motor behaviors. *Neurosci Res.* 50(2):137-51.
- Tanguay W, Ducrot C, Giguère N, Bourque MJ, Trudeau LE (2021). Neonatal 6-OHDA lesion of the SNc induces striatal compensatory sprouting from surviving SNc dopaminergic neurons without VTA contribution. *Eur J Neurosci.* 54(7):6618-32.
- Tanner CM (2003). Is the cause of Parkinson's disease environmental or hereditary? Evidence from twin studies. *Adv Neurol.* 91:133-42.
- Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, Meng C, Priestley B, Fernandez HH, Cambi F, Umbach DM, Blair A, Sandler DP, Langston JW (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect.* 119(6):866-72.
- Tanti A, Westphal WP, Girault V, Brizard B, Devers S, Leguisquet AM, Surget A, Belzung C (2013). Region-dependent and stage-specific effects of stress, environmental enrichment, and antidepressant treatment on hippocampal neurogenesis. *Hippocampus.* 23(9):797-811.
- Tarazi FI, Sahli ZT, Wolny M, Mousa SA (2014). Emerging therapies for Parkinson's disease: from bench to bedside. *Pharmacol Ther.* 144(2):123-33.
- Taymans JM, Vandenberghe LH, Haute CV, Thiry I, Deroose CM, Mortelmans L, Wilson JM, Debyser Z, Baekelandt V (2007). Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Hum Gene Ther.* 18(3):195-206.
- Tereshchenko J, Maddalena A, Bähr M, Kügler S (2014). Pharmacologically controlled, discontinuous GDNF gene therapy restores motor function in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 65:35-42.
- Thayanidhi N, Helm JR, Nycz DC, Bentley M, Liang Y, Hay JC (2010). Alpha-synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs. *Mol Biol Cell.* 21(11):1850-63.
- Theofilopoulos S, Goggi J, Riaz SS, Jauniaux E, Stern GM, Bradford HF (2001). Parallel induction of the formation of dopamine and its metabolites with induction of tyrosine hydroxylase expression in foetal rat and human cerebral cortical cells by brain-derived neurotrophic factor and glial-cell derived neurotrophic factor. *Brain Res Dev Brain Res.* 127(2):111-22.
- Tieu K (2011). A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1(1):a009316.
- Togo T, Iseki E, Marui W, Akiyama H, Uéda K, Kosaka K (2001). Glial involvement in the degeneration process of Lewy body-bearing neurons and the degradation process of Lewy bodies in brains of dementia with Lewy bodies. *J Neurol Sci.* 184(1):71-5.
- Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A (1996). Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature.* 382(6586):80-3.
- Tremblay L, Worbe Y, Thobois S, Sgambato-Faure V, Féger J (2015). Selective dysfunction of basal ganglia subterritories: From movement to behavioral disorders. *Mov Disord.* 30(9):1155-70.
- Truong L, Allbutt H, Kassiou M, Henderson JM (2006). Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behav Brain Res.* 169(1):1-9.
- Tuon T, Valvassori SS, Dal Pont GC, Paganini CS, Pozzi BG, Luciano TF, Souza PS, Quevedo J, Souza CT, Pinho RA (2014). Physical training prevents depressive symptoms and a decrease in brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. *Brain Res Bull.* 108:106-12.

8. Bibliografía

- Turner CA, Lewis MH (2003). Environmental enrichment: effects on stereotyped behavior and neurotrophin levels. *Physiol Behav.* 80(2-3):259-66.
- Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease (2017). *J Neural Transm (Vienna).* 124(8):901-5.
- Ulusoy A, Decressac M, Kirik D, Björklund A (2010). Viral vector-mediated overexpression of α -synuclein as a progressive model of Parkinson's disease. *Prog Brain Res.* 184:89-111.
- Ungerstedt U (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 5(1):107-10.
- van der Brug MP, Singleton A, Gasser T, Lewis PA (2015). Parkinson's disease: From human genetics to clinical trials. *Sci Transl Med.* 7(305):205ps20.
- van der Kolk NM, King LA (2013). Effects of exercise on mobility in people with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 28(11):1587-96.
- Van der Perren A, Toelen J, Casteels C, Macchi F, Van Rompuy AS, Sarre S, Casadei N, Nuber S, Himmelreich U, Osorio Garcia MI, Michotte Y, D'Hooge R, Bormans G, Van Laere K, Gijssbers R, Van den Haute C, Debyser Z, Baekelandt V (2015). Longitudinal follow-up and characterization of a robust rat model for Parkinson's disease based on overexpression of alpha-synuclein with adeno-associated viral vectors. *Neurobiol Aging.* 36(3):1543-58.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci.* 2(3):266-70.
- Vanni S, Colini Baldeschi A, Zattoni M, Legname G (2020). Brain aging: A Janus-faced player between health and neurodegeneration. *J Neurosci Res.* 98(2):299-311.
- Vargas-Mendoza N, Morales-González Á, Madrigal-Santillán EO, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, García-Melo LF, Anguiano-Robledo L, Fregoso-Aguilar T, Morales-Gonzalez JA (2019). Antioxidant and Adaptive Response Mediated by Nrf2 during Physical Exercise. *Antioxidants (Basel).* 8(6):196.
- Verkhatsky A, Ho MS, Zorec R, Parpura V (2019). The Concept of Neuroglia. *Adv Exp Med Biol.* 1175:1-13.
- Vicario M, Cieri D, Brini M, Cali T (2018). The Close Encounter Between Alpha-Synuclein and Mitochondria. *Front Neurosci.* 12:388.
- Vitek JL, Bakay RA, Freeman A, Evatt M, Green J, McDonald W, Haber M, Barnhart H, Wahlay N, Triche S, Mewes K, Chockkan V, Zhang JY, DeLong MR (2003). Randomized trial of pallidotomy versus medical therapy for Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 53(5):558-69.
- Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, Meaney DF, Trojanowski JQ, Lee VM (2011). Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron.* 72(1):57-71.
- von Linstow CU, DeLano-Taylor M, Kordower JH, Brundin P (2020). Does Developmental Variability in the Number of Midbrain Dopamine Neurons Affect Individual Risk for Sporadic Parkinson's Disease? *J Parkinsons Dis.* 10(2):405-11.
- Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F, Takahashi H (2013). The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol.* 47(2):495-508.
- Wake H, Fields RD (2011). Physiological function of microglia. *Neuron Glia Biol.* 7(1):1-3.
- Walker DG, Lue LF, Adler CH, Shill HA, Caviness JN, Sabbagh MN, Akiyama H, Serrano GE, Sue LI, Beach TG; Arizona Parkinson Disease Consortium (2013). Changes in properties of serine 129 phosphorylated α -synuclein with progression of Lewy-type histopathology in human brains. *Exp Neurol.* 240:190-204.
- Wang C, Wang CM, Clark KR, Sferra TJ (2003). Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain. *Gene Ther.* 10(17):1528-34.

- Wang HL, Chou AH, Wu AS, Chen SY, Weng YH, Kao YC, Yeh TH, Chu PJ, Lu CS (2011). PARK6 PINK1 mutants are defective in maintaining mitochondrial membrane potential and inhibiting ROS formation of substantia nigra dopaminergic neurons. *Biochim Biophys Acta*. 1812(6):674-84.
- Wang Y, Liu H, Zhang BS, Soares JC, Zhang XY (2016). Low BDNF is associated with cognitive impairments in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 29:66-71.
- Wang P, Ye Y (2021). Astrocytes in Neurodegenerative Diseases: A Perspective from Tauopathy and α -Synucleinopathy. *Life (Basel)*. 11(9):938.
- Wang W, Lv Z, Gao J, Liu M, Wang Y, Tang C, Xiang J (2021). Treadmill exercise alleviates neuronal damage by suppressing NLRP3 inflammasome and microglial activation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res Bull*. 174:349-58.
- Wang X, Wang Y, Chen J, Li J, Liu Y, Chen W (2022). Aerobic exercise improves motor function and striatal MSNs-Erk/MAPK signaling in mice with 6-OHDA-induced Parkinson's disease. *Exp Brain Res*. 240(6):1713-25.
- Wassmer SJ, Carvalho LS, György B, Vandenberghe LH, Maguire CA (2017). Exosome-associated AAV2 vector mediates robust gene delivery into the murine retina upon intravitreal injection. *Sci Rep*. 7:45329.
- Wassouf Z, Hentrich T, Samer S, Rotermund C, Kahle PJ, Ehrlich I, Riess O, Casadei N, Schulze-Hentrich JM (2018). Environmental Enrichment Prevents Transcriptional Disturbances Induced by Alpha-Synuclein Overexpression. *Front Cell Neurosci*. 12:112.
- Watson MB, Richter F, Lee SK, Gabby L, Wu J, Masliah E, Effros RB, Chesselet MF (2012). Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Exp Neurol*. 237(2):318-34.
- Weaver FM, Follett K, Stern M, Hur K, Harris C, Marks WJ Jr, Rothlind J, Sagher O, Reda D, Moy CS, Pahwa R, Burchiel K, Hogarth P, Lai EC, Duda JE, Holloway K, Samii A, Horn S, Bronstein J, Stoner G, Heemskerk J, Huang GD; CSP 468 Study Group (2009). Bilateral deep brain stimulation vs best medical therapy for patients with advanced Parkinson disease: a randomized controlled trial. *JAMA*. 301(1):63-73.
- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC (2003). Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem*. 278(27):25009-13.
- Weber M, Rabinowitz J, Provost N, Conrath H, Folliot S, Briot D, Chérel Y, Chenuaud P, Samulski J, Moullier P, Rolling F (2003). Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther*. 7(6):774-81.
- Weissmiller AM, Wu C (2012). Current advances in using neurotrophic factors to treat neurodegenerative disorders. *Transl Neurodegener*. 1(1):14.
- Wi S, Lee JW, Kim M, Park CH, Cho SR (2018). An Enriched Environment Ameliorates Oxidative Stress and Olfactory Dysfunction in Parkinson's Disease with α -Synucleinopathy. *Cell Transplant*. 27(5):831-9.
- Widmer HR, Schaller B, Meyer M, Seiler RW (2000). Glial cell line-derived neurotrophic factor stimulates the morphological differentiation of cultured ventral mesencephalic calbindin- and calretinin-expressing neurons. *Exp Neurol*. 164(1):71-81.
- Wijeyekoon R, Barker RA (2009). Cell replacement therapy for Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 1792(7):688-702.
- Williams-Gray CH, Wijeyekoon R, Yarnall AJ, Lawson RA, Breen DP, Evans JR, Cummins GA, Duncan GW, Khoo TK, Burn DJ, Barker RA; ICICLE-PD study group (2016). Serum immune markers and disease progression in an incident Parkinson's disease cohort (ICICLE-PD). *Mov Disord*. 31(7):995-1003.
- Wilson RS, Wang T, Yu L, Grodstein F, Bennett DA, Boyle PA (2021). Cognitive Activity and Onset Age of Incident Alzheimer Disease Dementia. *Neurology*. 97(9):e922-9.

8. Bibliografía

- Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence (2011). *Eur J Epidemiol.* 26(1):S1-58.
- Wu SY, Wang TF, Yu L, Jen CJ, Chuang JI, Wu FS, Wu CW, Kuo YM (2011). Running exercise protects the substantia nigra dopaminergic neurons against inflammation-induced degeneration via the activation of BDNF signaling pathway. *Brain Behav Immun.* 25(1):135-46.
- Wu L, Liu YM (2016). Factors associated with Parkinson's disease patients with hyposmia in Chinese han population: a casecontrol study. *Biomed Res.* 27:2
- Wu CH, Chen CC, Hung TH, Chuang YC, Chao M, Shyue SK, Chen SF (2019). Activation of TrkB/Akt signaling by a TrkB receptor agonist improves long-term histological and functional outcomes in experimental intracerebral hemorrhage. *J Biomed Sci.* 26(1):53.
- Xu L, Zhu L, Zhu L, Chen D, Cai K, Liu Z, Chen A (2021). Moderate Exercise Combined with Enriched Environment Enhances Learning and Memory through BDNF/TrkB Signaling Pathway in Rats. *Int J Environ Res Public Health.* 18(16):8283.
- Xu L, Qu C, Liu Y, Liu H (2023). The environmental enrichment ameliorates chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive impairment by activating autophagy signaling pathway and improving synaptic function in hippocampus. *Brain Res Bull.* 204:110798.
- Yamada M, Iwatsubo T, Mizuno Y, Mochizuki H (2004). Overexpression of alpha-synuclein in rat substantia nigra results in loss of dopaminergic neurons, phosphorylation of alpha-synuclein and activation of caspase-9: resemblance to pathogenetic changes in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 91(2):451-61.
- Yan W, Wang HD, Hu ZG, Wang QF, Yin HX (2008). Activation of Nrf2-ARE pathway in brain after traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* 431(2):150-4.
- Yang GS, Schmidt M, Yan Z, Lindbloom JD, Harding TC, Donahue BA, Engelhardt JF, Kotin R, Davidson BL (2002). Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol.* 76(15):7651-60.
- Yang F, Trolle Lagerros Y, Bellocco R, Adami HO, Fang F, Pedersen NL, Wirdefeldt K (2015). Physical activity and risk of Parkinson's disease in the Swedish National March Cohort. *Brain.* 138(2):269-75.
- Yasuda T, Mochizuki H (2010). Use of growth factors for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother.* 10(6):915-24.
- Young AB, Penney JB (1984). Neurochemical anatomy of movement disorders. *Neurol Clin.* 2(3):417-33.
- Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ (1999). Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med.* 5(4):448-53.
- Yuan ZY, Gu P, Liu L, Wang YY, Liu J, Cui DS, Geng Y, Zhang ZX, Zhu AP, Ma L, Wang MW (2009). Neuroprotective effects of enriched environment in MPTP-treated SAMP8 mice. *Neurosci Lett.* 454(1):6-10.
- Zaichick SV, McGrath KM, Caraveo G (2017). The role of Ca²⁺ signaling in Parkinson's disease. *Dis Model Mech.* 10(5):519-35.
- Zeng XS, Geng WS, Jia JJ (2018). Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. *ASN Neuro.* 10:1759091418777438.
- Zentall TR (2021). Effect of Environmental Enrichment on the Brain and on Learning and Cognition by Animals. *Animals (Basel).* 11(4):973.
- Zhang XY, Liang J, Chen DC, Xiu MH, Yang FD, Kosten TA, Kosten TR (2012). Low BDNF is associated with cognitive impairment in chronic patients with schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* 222(2):277-84.

- Zhang J, Li J, Chen F, Liu X, Jiang C, Hu X, Ma L, Xu Z (2021). STN versus GPi deep brain stimulation for dyskinesia improvement in advanced Parkinson's disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Neurol Neurosurg.* 201:106450.
- Zhang QQ, Luo L, Liu MX, Wang CJ, Wu Y, Yu KW (2022). Enriched Environment-Induced Neuroprotection against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Might Be Mediated via Enhancing Autophagy Flux and Mitophagy Flux. *Mediators Inflamm.* 2022:2396487.
- Zhao L, He LX, Huang SN, Gong LJ, Li L, Lv YY, Qian ZM (2014). Protection of dopamine neurons by vibration training and up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in a MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Physiol Res.* 63(5):649-57.
- Zheng B, Liao Z, Locascio JJ, Lesniak KA, Roderick SS, Watt ML, Eklund AC, Zhang-James Y, Kim PD, Hauser MA, Grünblatt E, Moran LB, Mandel SA, Riederer P, Miller RM, Federoff HJ, Wüllner U, Papapetropoulos S, Youdim MB, Cantuti-Castelvetri I, Young AB, Vance JM, Davis RL, Hedreen JC, Adler CH, Beach TG, Graeber MB, Middleton FA, Rochet JC, Scherzer CR; Global PD Gene Expression (GPEX) Consortium (2010). PGC-1 α , a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. *Sci Transl Med.* 2(52):52ra73.
- Zhou L, Miller BL, McDaniel CH, Kelly L, Kim OJ, Miller CA (1998). Frontotemporal dementia: neuropil spheroids and presynaptic terminal degeneration. *Ann Neurol.* 44(1):99-109.
- Zhou J, Broe M, Huang Y, Anderson JP, Gai WP, Milward EA, Porritt M, Howells D, Hughes AJ, Wang X, Halliday GM (2011). Changes in the solubility and phosphorylation of α -synuclein over the course of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 121(6):695-704.
- Zhu J, Chu CT (2010). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Alzheimers Dis.* 20(2):S325-34.
- Ziebell JM, Adelson PD, Lifshitz J (2015). Microglia: dismantling and rebuilding circuits after acute neurological injury. *Metab Brain Dis.* 30(2):393-400.
- Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther.* 16(6):1073-80.
- Zinger A, Barcia C, Herrero MT, Guillemin GJ (2011). The involvement of neuroinflammation and kynurenine pathway in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* 2011:716859.
- Zuo L, Motherwell MS (2013). The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene.* 532(1):18-23.

ANEXOS

Anexo 1: Soluciones

4% Paraformaldehído

- Agregar 800 mL de PBS 0,1M en un vaso de vidrio colocado en una placa de agitación en una campana de ventilación.
- Calentar mientras se agita hasta alcanzar aproximadamente 60 °C.
- Agregar 40 g de polvo de paraformaldehído (Ref: 141451.1211, Panreac, España) a la solución de PBS caliente.
- Agregar 7-8 tabletas de NaOH (Hidróxido de sodio, Ref: 30620, Sigma-Aldrich, España) para elevar el pH.
- Una vez que el paraformaldehído esté disuelto, enfriar la solución.
- Ajustar el volumen de la solución a 1 L con PBS 0,1M.
- Ajustar el pH a 7,4 con ácido clorhídrico al 37% (Ref: 131020.1611, Panreac, España).
- Filtrar la solución.

Cloruro de Sodio al 0,9%

- Agregar 9 g de Cloruro de Sodio (Ref: 31434, Sigma-Aldrich, España) a 1 L de H₂O_d.
- Agitar hasta que la solución se disuelva por completo.

Solución de Sacarosa al 30%

- Colocar 150 g de sacarosa (Ref: 131621.1211, Panreac, España) en 350 ml de PBS 0,1M.
- Mezclar y ajustar el volumen a 500 ml.

PBS 1M (Solución Salina Tamponada con Fosfatos a 1M)

1. Disolver lo siguiente en 1 L de H₂O_d:
 - 3,45 g de fosfato monobásico de sodio (Ref: S9638, Sigma-Aldrich, España).
 - 10,65 g de fosfato dibásico de sodio (Ref: S9763, Sigma-Aldrich, España).
 - 83 g de cloruro de sodio (Ref: 31434, Sigma-Aldrich, España).
2. Mezclar para disolver y ajustar el pH a 7,4.
3. Almacenar la solución a temperatura ambiente.

PBS 0,1M

- Disolver 100 ml de PBS 1M en 900 ml de agua desionizada.
- Ajustar el pH a 7,4 si es necesario.

PBS 0,1M + 0.5% Tritón X-100

- Agregar 500 µl de Tritón X-100 (Ref: T9284, Sigma-Aldrich, España) en 100 ml de PBS 0,1M.

PBS 0.1M + 4% de Azida Sódica

- Agregar 2 g de azida sódica (Ref: S-2002, Sigma-Aldrich, España) a 50 ml de H₂O_d.
- Coger 1 ml de la solución anterior y mezclarlo con 200 ml de PBS 0,1M.

TrisHCl 0,05M

- Disolver 0,605 g de Trizma Base (Ref: T-1503, Sigma-Aldrich, España) en 100 ml de H₂O_d.
- Ajustar el pH a 7,4 con HCl al 37% (Ref: 131020.1611, Panreac, España).

Buffer de Citrato de Sodio

- Solución A: 21,10 g de ácido cítrico (Ref: 3655188, Sigma-Aldrich, España) en 1 L de H₂O_d.
- Solución B: 29,41 g de citrato de sodio (Ref: 6448, Merck, Alemania) en 1 L de H₂O_d.
- Mezclar 9 ml de solución A con 41 ml de solución B en 450 ml de H₂O_d.

DAB (50 mg/ml)

- Mezclar 50 mg de DAB (Ref: D-5637, Sigma-Aldrich, España) por cada ml de H₂O_d.
- Utilizar una campana de laboratorio.

Preparación de portaobjetos recubiertos con gelatina

- Preparar la solución de recubrimiento de gelatina disolviendo 3 g de gelatina (Ref: 4078.500, Merck, Alemania) en 250 ml de H₂O_d calentada (60-80°C).
- Después de que la gelatina se haya disuelto, añadir 0,125 mg de sulfato de potasio y cromo (III) dodecahidrato (Ref: 1035, Merck, Alemania). El sulfato de potasio y cromo dodecahidrato

cargará positivamente los portaobjetos, lo que les permitirá atraer las secciones de tejido cargadas negativamente.

- Revolver hasta que la solución esté completamente disuelta.
- Colocar los portaobjetos histológicos en bastidores de vidrio.
- Sumergir los bastidores que contienen los portaobjetos en la solución de recubrimiento de gelatina durante aproximadamente 10 segundos.
- Retirar los bastidores con los portaobjetos y permitir que escurran. Eliminar el exceso de solución de los bastidores sobre papel de filtro (golpear suavemente los bastidores contra el papel de filtro para un mejor drenaje).
- Colocar los bastidores con los portaobjetos en un horno a 37°C durante 24-48 horas.
- Guardar los portaobjetos secos en las cajas originales y almacenar a temperatura ambiente hasta su uso.

Buffer de Muestra LAEMMLI 4x

- 1,25 ml de Tris 2M pH 6,8.
- 4 ml de glicerol al 100%.
- 2,67 ml de SDS al 30% (Sulfato de dodecilo sódico, Ref: 1.13760.0100, Merck, Alemania).
- 83 µl de BFB al 1% (Bromofenol Azul, Ref: B-5525, Sigma-Aldrich, España).

Agregar 100 µl de 2-mercaptoetanol (Ref: 8.05740.0250, Merck, Alemania) por cada 400 µl de Buffer de Muestra 4x (SB4x).

Buffer de Electroforesis (EB) 10x

- 15,5 g de Trizma Base (Ref: T1503, Sigma-Aldrich, España).
- 72 g de glicina (Ref: G8818, Sigma-Aldrich, España).
- 500 ml de H₂O_d.

Almacenar a 4°C.

Buffer de Electroforesis (EB) 1x

- Diluir el EB 10x (100 ml de EB10x + 900 ml de H₂O_d).
- Agregar 10 ml de SDS al 10%.

Buffer de Solución Salina Tamponada (TBS) 5x

- 6,08 g de Trizma Base (Ref: T1503, Sigma-Aldrich, España).
- 20 g de NaCl (Ref: 31434, Sigma-Aldrich, España).
- Ajustar el volumen a 500 ml con H₂O_d.
- Ajustar el pH a 7,6.

TTBS (Solución Salina Tamponada con Tween)

- 100 ml de TBS 5x.
- 400 ml de H₂O_d.

Agregar 500 µl de H₂O destilada.

Anexo II: Resultados test de Campo Abierto

Actividad global espontánea, locomoción, distancia recorrida, velocidad media, movimientos rápidos, movimientos lentos y distancia recorrida en el centro de la arena obtenidos con el test de Campo Abierto para cada grupo experimental (control, sham y α -sin) 1, 2 y 4 meses posteriores a la inyección bilateral del AAV9 en la SNpc en animales criados en condiciones estándar (CE) y entorno enriquecido (EE).

Actividad global

		1 mes CE	2 meses CE	4 meses CE	2 meses EE
Control	Media	2120,20	2120,20	1654,70	1558,91
	SEM	136,74	136,74	96,82	456,53
Sham	Media	2402,73	2098,40	1445,80	1339,25
	SEM	149,92	143,32	69,21	613,32
α-sin	Media	1905,04	1570,05	1372,16	1334,25
	SEM	126,06	130,60	98,56	309,44

Locomoción

		1 mes CE	2 meses CE	4 meses CE	2 meses EE
Control	Media	1895,30	1900,40	1469	1438,58
	SEM	123,26	121,34	89,91	123,28
Sham	Media	2167,40	1828,13	1273	1233,42
	SEM	133,05	125,24	61,51	166,06
α-sin	Media	1718,21	1381,94	1213	1221,73
	SEM	111,50	112,91	76,34	84,08

Distancia recorrida (cm)

		1 mes CE	2 meses CE	4 meses CE	2 meses EE
Control	Media	5551	5553	4515	3018,17
	SEM	382,20	374,66	270,70	270,17
Sham	Media	5809	5042	3853	2486,01
	SEM	526,10	481,90	234,60	342,50
α-sin	Media	4237	3263	3505	2517,04
	SEM	385,90	397,40	371,70	199,29

Velocidad media (cm/s)

		1 mes CE	2 meses CE	4 meses CE	2 meses EE
Control	Media	9,24	9,26	7,53	5,01
	SEM	0,63	0,63	0,44	0,44
Sham	Media	9,67	8,82	6,42	4,14
	SEM	0,87	0,73	0,39	0,57
α-sin	Media	7,49	6,00	5,85	4,2
	SEM	0,67	0,70	0,62	0,32

Movimientos rápidos (s)

		2 meses CE	2 meses EE
Control	Media	320,90	224,03
	SEM	22,89	20,52
Sham	Media	124,12	187,38
	SEM	33,85	26,81
α-sin	Media	68,0	196,94
	SEM	13,56	16,36

Movimientos lentos (s)

		2 meses CE	2 meses EE
Control	Media	115,56	125,16
	SEM	6,67	3,33
Sham	Media	225,30	128,13
	SEM	20,80	9,03
α-sin	Media	189,25	138,43
	SEM	16,44	4,17

Distancia relativa en el centro de la arena (%)

		2 meses CE	2 meses EE
Control	Media	22,82	18,96
	SEM	3,00	2,97
Sham	Media	32,60	14,52
	SEM	4,63	2,77
α-sin	Media	29,33	12,37
	SEM	4,46	2,89

Anexo III: Resultados de las cuantificaciones de la vía nigroestriatal

Densidad de las neuronas dopaminérgicas (TH+) de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) y análisis del volumen de este núcleo, densidad óptica de las fibras dopaminérgicas (TH+) y de la degeneración axonal del estriado, la densidad de fibras de la *substantia nigra pars reticulata* (SNpr) y la cuantificación estereológica de las células positivas para el Factor 2 relacionado con el factor nuclear E2 (Nrf-2) en la SNpc en los diversos grupos experimentales (control, sham y α -sin) 1, 2 y 4 meses después de la inyección bilateral del AAV9 en la SNpc en animales criados en condiciones estándar (CE) y entorno enriquecido (EE).

Estereología de las neuronas TH+ de la SNpc (cel/mm³)

		1 mes CE	2 meses CE	4 meses CE	2 meses EE
Control	Media	6942,1004	6373,1762	5420,1035	6905,8451
	SEM	334,87119	249,84607	576,5422	476,27561
Sham	Media	6922,9044	5715,6037	5758,5488	6894,4859
	SEM	658,04746	293,04782	443,72023	543,75305
α -sin	Media	5240,8563	4570,4447	3730,4188	5460,2876
	SEM	354,5241	325,21884	292,91463	481,33626

Volumen de la SNpc (mm³)

		1 mes CE	2 meses CE	4 meses CE	2 meses EE
Control	Media	4,78	4,91	4,83	4,87
	SEM	0,12	0,27	0,25	0,38
Sham	Media	4,81	4,81	4,41	4,71
	SEM	0,10	0,12	0,08	0,27
α -sin	Media	4,92	4,88	4,20	4,82
	SEM	0,08	0,27	0,13	0,30

Densidad óptica de las fibras dopaminérgicas del estriado

		1 mes CE	2 meses CE	4 meses CE	2 meses EE
Control	Media	80,75	83,9403	73,78	103,59
	SEM	2,62	2,21266	3,70	7,35
Sham	Media	81,85	84,00	78,62	91,44
	SEM	2,72	3,48	0,34	2,93
α -sin	Media	80,94	60,92	53,49	85,93
	SEM	3,16	6,78	4,51	3,63

Degeneración axonal estriatal (% área ocupada)

		1 mes CE	2 meses CE	4 meses CE	2 meses EE
α -sin	Media	0,17	0,60	0,55	0,22
	SEM	0,03	0,10	0,03	0,01

Estereología de las fibras TH+ de la SNpr

		1 mes CE	2 meses CE	4 meses CE	2 meses EE
Control	Media	34,0 x 10 ⁵	35,1 x 10 ⁵	33,7 x 10 ⁵	36,4 x 10 ⁵
	SEM	1,96 x 10 ⁵	5,156 x 10 ⁵	1,53 x 10 ⁵	2,49 x 10 ⁵
Sham	Media	30,9 x 10 ⁵	23,1 x 10 ⁵	37,4 x 10 ⁵	36,7 x 10 ⁵
	SEM	3,08 x 10 ⁵	4,96 x 10 ⁵	2,95 x 10 ⁵	2,24 x 10 ⁵
α-sin	Media	32,2 x 10 ⁵	18,8 x 10 ⁵	24,1 x 10 ⁵	27,7 x 10 ⁵
	SEM	3,72 x 10 ⁵	2,86 x 10 ⁵	4,78 x 10 ⁵	2,18 x 10 ⁵

Estereología de las células Nrf-2+ en la SNpc

		2 meses CE	2 meses EE
Control	Media	4730,4188	3452,6081
	SEM	419,70184	429,02130
Sham	Media	5245,9704	7230,1593
	SEM	189,55436	324,85077
α-sin	Media	7779,2562	7223,4649
	SEM	531,21646	550,43064

Anexo IV: Resultados de las cuantificaciones de la expresión de proteínas (WB)

Densidad óptica de la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la ratio del receptor tirosina quinasa B fosforilado, respecto a su estado inactivo (p-TrkB/TrkB), la ratio de la quinasa regulada por señales extracelulares fosforilada, respecto a su estado inactivo (p-ERK/ERK), el factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF) y el factor de transcripción nuclear kappa B (Nf- κ B) medidas mediante western blot (WB) en la SN y el estriado de los diversos grupos experimentales (control, sham y α -sin) 2 meses después de la inyección bilateral del AAV9 en la SNpc de animales criados en condiciones estándar (CE) y entorno enriquecido (EE).

Expresión del BDNF

Substantia nigra (SN)		2 meses CE	2 meses EE
Control	Media	0,20	0,21
	SEM	0,007	0,006
Sham	Media	0,17	0,20
	SEM	0,005	0,008
α-sin	Media	0,16	0,19
	SEM	0,008	0,003

Estriado		2 meses CE	2 meses EE
Control	Media	0,19	0,20
	SEM	0,009	0,008
Sham	Media	0,17	0,19
	SEM	0,006	0,008
α-sin	Media	0,16	0,19
	SEM	0,008	0,009

Expresión de la ratio p-TrkB/TrkB

Substantia nigra (SN)		2 meses CE	2 meses EE
Control	Media	1,33	1,54
	SEM	0,13	0,06
Sham	Media	1,22	1,23
	SEM	0,07	0,09
α-sin	Media	0,93	1,28
	SEM	0,08	0,04

Estriado		2 meses CE	2 meses EE
Control	Media	1,19	1,38
	SEM	0,10	0,09
Sham	Media	1,18	1,34
	SEM	0,14	0,09
α-sin	Media	0,82	1,17
	SEM	0,06	0,09

Expresión de la ratio p-ERK/ERK

<i>Substantia nigra (SN)</i>		2 meses CE	2 meses EE
Control	Media	0,99	1,29
	SEM	0,10	0,12
Sham	Media	0,80	1,26
	SEM	0,09	0,13
α -sin	Media	0,92	1,05
	SEM	0,08	0,10

Estriado		2 meses CE	2 meses EE
Control	Media	1,14	1,32
	SEM	0,13	0,13
Sham	Media	1,06	0,16
	SEM	0,11	0,09
α -sin	Media	0,93	1,12
	SEM	0,08	0,06

Expresión del GDNF

<i>Substantia nigra (SN)</i>		2 meses CE	2 meses EE
Control	Media	0,24	0,25
	SEM	0,011	0,009
Sham	Media	0,22	0,23
	SEM	0,009	0,006
α -sin	Media	0,20	0,22
	SEM	0,011	0,008

Estriado		2 meses CE	2 meses EE
Control	Media	0,19	0,21
	SEM	0,021	0,0109
Sham	Media	0,17	0,18
	SEM	0,019	0,09
α -sin	Media	0,15	0,16
	SEM	0,016	0,019

Expresión del Nf- κ B

<i>Substantia nigra (SN)</i>		2 meses CE	2 meses EE
Control	Media	0,14	0,14
	SEM	0,009	0,005
Sham	Media	0,16	0,17
	SEM	0,010	0,012
α -sin	Media	0,18	0,17
	SEM	0,014	0,013

Estriado		2 meses CE	2 meses EE
Control	Media	0,16	0,18
	SEM	0,006	0,006
Sham	Media	0,20	0,21
	SEM	0,019	0,018
α -sin	Media	0,22	0,21
	SEM	0,022	0,018

