



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Xochimilco

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Departamento de Sistemas Biológicos**

**Maestría en Ciencias Farmacéuticas**

**Proyecto de investigación:** Pramipexol atenúa la alodinia y la hiperalgesia en animales con la enfermedad de Parkinson posiblemente a través de la modulación de NFκB en células gliales

**Línea de investigación:** Diseño, obtención y evaluación de fármacos y biomoléculas

**IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**PRESENTA**

**ALUMNA**

Q.F.B. María Cristina Rodríguez Ramos  
Matrícula: 2211801626

**TUTORA**

Dra. Beatriz Godínez Chaparro

**ASESOR INTERNO**

M. en C. Felipe Mendoza Pérez

**ASESOR EXTERNO**

Dr. Miguel Condes Lara

marzo, 2024



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Xochimilco**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Departamento de Sistemas Biológicos**

**Maestría en Ciencias Farmacéuticas**

**Proyecto de investigación:** Pramipexol atenúa la alodinia y la hiperalgesia en animales con la enfermedad de Parkinson posiblemente a través de la modulación de NFkB en células gliales

**Línea de investigación:** Diseño, obtención y evaluación de fármacos y biomoléculas

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**JURADO DEL EXAMEN DE GRADO**

**PRESIDENTA**



Dra. María Guadalupe Martínez Lorenzana

**VOCAL**



Dra. Estefanía González Morales

**SECRETARIA**



Dra. Beatriz Godínez Chaparro

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco por brindarme las bases académicas; por el apoyo económico otorgado como parte de su programa de Movilidad Nacional UAM, apoyo con el cual logré realizar una estancia de movilidad de investigación en el Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Juriquilla. También, por facilitar el uso de sus instalaciones, así mismo a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Sistemas Biológicos, Laboratorio N-004 en el cuál realicé el presente proyecto de Maestría, bajo la dirección de la Dra. Beatriz Godínez Chaparro.

Agradezco al Instituto de Neurobiología UNAM, Campus Juriquilla Querétaro, por facilitarme el uso de sus instalaciones, así mismo al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Departamento de Neurobiología, Laboratorio B-16 de Dolor y Epilepsia en el cuál realicé gran parte del presente proyecto de Maestría, bajo la dirección del Dr. Miguel Condés Lara.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de Maestría, CVU 1117087, con el desarrollo del proyecto “Pramipexol atenúa la alodinia y la hiperalgesia en animales con la enfermedad de Parkinson posiblemente a través de la modulación de NFkB-p65 en células gliales”.

A la Dra. Beatriz Godínez Chaparro, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y laboratorio. Por los consejos, el pensamiento crítico, su absoluto apoyo, la confianza y el extenso tiempo dedicado. Por ser trascendental en mi camino de la investigación y abrirme las puertas en esta gran área del conocimiento.

Al Dr. Miguel Condés Lara, por permitirme ser parte de su laboratorio, facilitarme las herramientas para lograr este gran proyecto, por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio B-16 de Dolor y Epilepsia del Instituto de Neurobiología, UNAM; Campus Juriquilla.

Al M. en C. Felipe Mendoza Pérez, por su total apoyo y entera confianza, por sus oportunos consejos, por ser líder en mi camino de la investigación.

A la Dra. Ma. Guadalupe Martínez Lorenzana, por ser líderesa en mi camino, por los consejos y sabias palabras compartidas, por el tiempo dedicado y su total apoyo en todos los aspectos, siendo un ejemplo a seguir. Por su apoyo técnico en la selección de anticuerpos y montaje de la Técnica de Inmunofluorescencia realizadas en este trabajo. Así cómo en la enseñanza de Seccionado de tejido nervioso mediante Microtomo de Congelación; Técnica de Tinción de violeta de cresilo. Así como su capacitación en la Microscopia de luz óptica, epifluorescencia y confocal. Además de la ayuda otorgada en el análisis de los resultados morfológicos de este trabajo. Durante mi estancia en el Instituto de Neurobiología, UNAM; Campus Juriquilla donde la Doctora Martínez Lorenzana se encuentra adscrita al laboratorio B-16 de Dolor y Epilepsia.

A la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos por su apoyo técnico en el uso del microscopio confocal, en la Unidad de Microscopia del Instituto de Neurobiología, UNAM. Campus Juriquilla, Querétaro.

A la Dra. Estefanía, por estar presente en cada oportuno momento, por ser líderesa y ejemplo a seguir; por los momentos compartidos.

A mi amiga y compañera Jazmín por estar en todo momento.

A mi familia.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	2
<b>Enfermedad de Parkinson</b> .....	2
<b>Fisiopatología</b> .....	2
<b>Dopamina</b> .....	3
<b>Vías dopaminérgicas</b> .....	4
<b>Síntomas de la EP</b> .....	6
<b>Síntomas motores</b> .....	6
<b>Síntomas no motores</b> .....	7
<b>Dolor</b> .....	8
<b>Dolor en la EP</b> .....	8
<b>Microglía y NFkB-p65</b> .....	8
<b>Astrocitos y NFkB-p65</b> .....	10
<b>Efecto antiinflamatorio y antinociceptivo de PPX</b> .....	11
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	12
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	12
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	13
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	13
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	13
<b>Animales</b> .....	13
<b>Fármacos</b> .....	14
<b>Lesión Unilateral con 6-OHDA</b> .....	14
<b>Conductas motoras</b> .....	14
<b>Conducta de giro</b> .....	14
<b>Cilindro</b> .....	15
<b>Evaluación de la alodinia por el método de up-down</b> .....	15
<b>Evaluación de la hiperalgesia mecánica</b> .....	16
<b>Inmunohistoquímica</b> .....	16
<b>Obtención de cerebros</b> .....	16
<b>Procedimiento inmunohistoquímico</b> .....	16
<b>Conteo neuronal</b> .....	17
<b>Inmunofluorescencia</b> .....	18

Diseño experimental .....	20
Análisis estadístico para alodinia, hiperalgesia, prueba de cilindro, prueba de giro, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia .....	20
8. RESULTADOS .....	22
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	44
10. CONCLUSIONES .....	49
11. REFERENCIAS .....	49

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**6-OHDA:** 6-hidroxidopamina

**AB:** Ambas patas

**AC:** Adenilato ciclasa

**AMPc:** Adenosina monofosfato cíclico

**ANOVA:** Análisis de varianza

**AP:** Ante Posterior

**BFS:** Buffer Fosfato Salino

**BFS-T:** Buffer Fosfato Salino Tritón

**CL:** Contralateral

**DOPAC:** 3,4- dihidroxifenilacetato

**DV:** Dorso Ventral

**EP:** Enfermedad de Parkinson

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**GB:** Ganglios basales

**GFAP:** Proteína ácida fibrilar glial

**GRD:** Ganglio de la Raíz Dorsal

**HVA:** Ácido homovanílico

**IASP:** Asociación Internacional para el Estudio del Dolor, por sus siglas en inglés

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma

**IL:** Ipsilateral

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 beta

**IL-6:** Interleucina 6

**iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible

**MDA:** Malondialdehído

**MEP:** Máximo Efecto Posible

**MPTP:** 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina

**NFkB:** Factor nuclear kappa B

**NFkB-p65:** Factor nuclear kappa B p65

**ON:** Óxido nítrico

**PFA:** Paraformaldehído

**PMN:** Polimorfonucleares

**PPX:** Pramipexol

**SEM:** Error estándar de la media

**SNA:** Sistema Nervioso Autónomo

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**SNP:** Sistema Nervioso Periférico

**SNpc:** Sustancia Nigra pars compacta

**SNS:** Sistema Nervioso Somatosensorial

**SS:** Solución Salina

**TH:** Tirosina Hidroxilasa

**TDA:** Transportadores de Dopamina

**TPA:** 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

**TVMA2:** Transportador vesicular de las monoaminas 2

**UAM-X:** Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco

**UPEAL:** Unidad de Producción y Experimentación Animal-Bioterio



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diseño de estudio.....	21
<b>Figura 2.</b> Resultados de la prueba de conducta de giro.....	22
<b>Figura 3.</b> Resultados de la prueba de cilindro.....	23
<b>Figura 4.</b> Efecto de PPX sobre la alodinia táctil.....	24
<b>Figura 5.</b> Efecto de PPX sobre la hiperalgesia mecánica.....	25
<b>Figura 6.</b> Porcentaje del MEP de PPX sobre la alodinia táctil y la hiperalgesia mecánica.....	26
<b>Figura 7.</b> Análisis de densitometría óptica TH de SNpc del grupo sham y 6-OHDA.....	27
<b>Figura 8.</b> Número de neuronas TH+ en SNpc. Análisis de la inmunoreactividad a TH por conteo neuronal en la SNpc del grupo sham y 6-OHDA.....	28
<b>Figura 9.</b> Inmunotinción representativa de TH del estriado grupo sham (A) y 6-OHDA (C), y de la SNpc grupo sham (B) y 6-OHDA.....	28
<b>Figura 10.</b> Cuantificación celular IL y CL de GFAP, NFkB-p65 e Iba1, capa 1.....	30
<b>Figura 11.</b> Cuantificación celular IL y CL de GFAP, NFkB-p65 e Iba1, capa 2.....	31
<b>Figura 12.</b> Cuantificación celular IL y CL de GFAP, NFkB-p65 e Iba1, capa 3.....	32
<b>Figura 13.</b> Cuantificación celular IL y CL de GFAP, NFkB-p65 e Iba1, capa 4.....	33
<b>Figura 14.</b> Cuantificación celular IL y CL de GFAP, NFkB-p65 e Iba1, capa 5.....	34
<b>Figura 15.</b> Cuantificación celular IL y CL de GFAP, NFkB-p65 e Iba1, capa 6.....	35
<b>Figura 16.</b> Fotomicrografías de epifluorescencia para NeuN, Iba1, GFAP y NFkB-p65.....	40

**Figura 17** Fotomicrografías en microscopía confocal, representativas de secciones de el asta dorsal de la médula espinal teñido para Iba1, GFAP y NFkB-p65.....41

**Figura 18** Amplificación de las capas III y IV del segmento L4 del cuerno de asta dorsal de la médula espinal lumbar.....42

**Figura 19** Imagen confocal de cultivos representativos de 2 células de 6-OHDA fusionada para Iba1, NFkB-p65 y GFAP.....43

**ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1.** Estadística de las figuras 10, 11, 12, 13, 14 y 15.....36-38

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más importante después del Alzheimer y afecta alrededor del 3% de la población mayor de 65 años (Bedarf et al., 2019). La EP es un trastorno del movimiento causado por la degeneración nigroestriatal de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) y genera deficiencia del neurotransmisor dopamina en las terminales nerviosas del cuerpo estriado (Imamura et al., 2003; Nagatsu & Sawada, 2005). Los pacientes con la EP se caracterizan por presentar síntomas motores: rigidez, bradicinesia, temblor e inestabilidad postural; y síntomas no motores: deterioro cognitivo, presión arterial baja, depresión, ansiedad, apatía, delirios y dolor (Engels et al., 2018). Particularmente, el dolor afecta negativamente la calidad de vida del paciente (Antonini et al., 2018).

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) define al dolor como: “Una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con, o similar a la asociada con, daño tisular real o potencial” (Raja et al., 2020). Desde la fisiopatología, los pacientes con la EP pueden presentar tres tipos de dolor: nociceptivo, nociplástico y neuropático, los cuales pueden desarrollarse de manera aguda o crónica (Nègre-Pagès et al., 2008; Truini et al., 2013). El dolor neuropático, puede generar fenómenos como la alodinia y la hiperalgesia (Nagatsu & Sawada, 2005). La hiperalgesia es el aumento del dolor por un estímulo que normalmente provoca dolor, mientras que, la alodinia es el dolor debido a un estímulo que normalmente no provoca dolor (IASP, 2021). El dolor neuropático no se resuelve incluso después de que el daño tisular evidente haya sanado, lo que indica que el dolor se debe a una función alterada del sistema nervioso. Creciente evidencia indica que las células gliales, desempeñan funciones importantes en el desarrollo y el mantenimiento del dolor neuropático (Sakaue et al., 2001). En este sentido, se ha sugerido una relación entre la expresión de la microglía y las conductas de dolor que persisten a largo plazo, sugiriendo que la disminución en los niveles de dopamina está relacionada con el aumento en la expresión de citocinas, liberadas por la microglía activada y la inhibición de la transcripción dependiente del

factor nuclear kappa B-p65 (NFkB-p65) que se asocia normalmente con mecanismos antiinflamatorios en la microglía (Logan et al., 2013; Pais & Chatterjee, 2005; Wirenfeldt et al., 2005). El objetivo del presente trabajo es determinar si el pramipexol (PPX) modula la actividad de las células gliales (astrocitos y microglía) vía NFkB-p65 y disminuye la alodinia y la hiperalgesia inducidas por la inyección unilateral con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), en un modelo animal de la EP.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **Enfermedad de Parkinson**

La EP es un trastorno del movimiento causado por la degeneración nigroestriatal de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc que genera deficiencia del neurotransmisor dopamina en las terminales nerviosas del cuerpo estriado (Nagatsu & Sawada, 2005). La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más importante después del Alzheimer, a nivel mundial afecta a alrededor del 3% de la población mayor de 65 años (Bedarf et al., 2019); sin embargo, se estima que entre el 5 y 10% del total de pacientes son menores de 40 años (Ramazani et al., 2019). Los pacientes con la EP se caracterizan por presentar síntomas motores: rigidez, bradicinesia, temblor e inestabilidad postural, así como síntomas no motores: deterioro cognitivo, presión arterial baja, depresión, ansiedad, apatía, alucinaciones, delirios, alteraciones del sueño (Engels et al., 2018) y dolor, afectando negativamente la calidad de vida del paciente (Antonini et al., 2018).

### **Fisiopatología**

La EP se caracteriza por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas (Faivre et al., 2019), el transportador de dopamina y sus metabolitos, el ácido homovanílico (HVA) y el 3,4- dihidroxifenilacetato (DOPAC) tanto en el cuerpo estriado como en la SNpc (Beal, 2001). La interacción combinada de componentes de señalización puede preceder a los síntomas que dan como resultado las características motoras y de comportamiento únicas de la enfermedad (LeWitt, 2015). Dentro de estos

componentes está la generación de los cuerpos de Lewy (cuyo componente principal es la alfa-sinucleína) y la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas, generando un mal funcionamiento en la señalización de varios sistemas de neurotransmisores, entre ellos los neurotransmisores de monoaminas (Beitz, 2014).

## **Dopamina**

El procesamiento del dolor en sí mismo está relacionado con el sistema dopaminérgico que ha sido el foco de mucha investigación durante los últimos 30 años, principalmente porque en dicho sistema la neurotransmisión dopaminérgica se ve afectada por alteraciones directas o indirectas como la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, lo que contribuye a la patogénesis de la EP (Jaber et al., 1996). La dopamina es la principal catecolamina en el sistema nervioso central (SNC) y es el neurotransmisor predominante en el cerebro de los mamíferos controlando una gran variedad de funciones que incluyen: la actividad locomotora, la emoción, el afecto y la secreción neuroendocrina. Los receptores de la dopamina participan en numerosos trastornos como la EP, siendo la neurotransmisión dopaminérgica la que modula la percepción del dolor a través de sus acciones en regiones supraespinales (Haddad et al., 2018), aliviando así el dolor. Muchos sitios del SNC implicados en el procesamiento del dolor tienen una alta densidad de receptores dopaminérgicos cuya activación puede producir efectos analgésicos en humanos y animales experimentales. En consecuencia, el sistema dopaminérgico representa una diana terapéutica para tratar los diferentes tipos de dolor (Tiemann et al., 2014).

Mediante la técnica de inmunofluorescencia han sido mapeadas las vías dopaminérgicas en el cerebro de roedores y se ha descrito la ruta nigroestriatal que va desde los cuerpos celulares de las neuronas en la sustancia negra a sus terminales nerviosas en el cuerpo estriado. También se ha observado que los niveles de dopamina estriatal caen cuando la sustancia negra es lesionada.

De esta manera, hay evidencia experimental del agotamiento de la dopamina en la zona estriatal después de una lesión en los cuerpos celulares en la SNpc, una

característica patológica conocida de la EP. La dopamina se sintetiza en el citosol de neuronas dopaminérgicas y se transporta en vesículas sinápticas a través del transportador vesicular de las monoaminas 2 (TVMA2). Desde las vesículas sinápticas, la dopamina se libera cuando un impulso nervioso que viaja por el axón llega a la terminal nerviosa. Una vez en la hendidura sináptica, la dopamina puede actuar sobre los receptores de la dopamina postsinápticos y presinápticos. El exceso de esta monoamina puede reingresar a la neurona dopaminérgica con ayuda de los transportadores de dopamina (TDA) y una vez en el interior puede ser acumulada nuevamente en las vesículas presinápticas o ser metabolizada (Fahn, 2008). Los receptores dopaminérgicos se clasifican en cinco tipos: D1, D2, D3, D4 y D5 (Gingrich & Caron, 1993; O'Dowd, 1993). Todos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Seeman et al., 2009) y se encargan de la modulación de todas las funciones fisiológicas de la dopamina. Estos receptores se dividen dependiendo su especificidad y mecanismos de señalización: 1) La familia de receptores D<sub>1</sub>-like está compuesta por los subtipos D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>, asociados con el aumento de la adenosina monofosfato cíclico (AMPC), a través de la activación de proteínas Gs estimulando la activación del adenilato ciclasa (AC) en la membrana (Tesfaw et al., 2016), 2). La familia de receptores D<sub>2</sub>-like está constituida por los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>. Estos receptores están acoplados a una proteína Gi, los cuales inhiben a la AC (Missale et al., 1998). Además pueden activar a los canales de K<sup>+</sup> e inhibir la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales dependientes de voltaje (Szénási et al., 2008). La familia de receptores D<sub>2</sub> pueden localizarse en terminales presinápticas y postsinápticas (Sunahara et al., 1990).

### **Vías dopaminérgicas**

El sistema dopaminérgico está involucrado en el procesamiento central del dolor, lo cual sugiere que los receptores D<sub>2</sub> median la función inhibitoria de la dopamina, mientras que los receptores D<sub>1</sub> no están involucrados (Faramarzi et al., 2016). Por otra parte, se sugiere que el sistema dopaminérgico dentro de los ganglios basales (GB), especialmente la vía nigroestriatal, está involucrado en el procesamiento del dolor y como consecuencia, la degeneración de esta vía podría conducir a un

deterioro del sistema nervioso somatosensorial (SNS) (Zengin-Toktas et al., 2013). Las inervaciones dopaminérgicas son las más prominentes en el cerebro y se han identificado cuatro vías dopaminérgicas principales:

Vía nigroestriatal: Aquí las proyecciones dopaminérgicas se originan en la SNpc y se proyectan hasta donde se distribuyen ampliamente los GB (Ko & Strafella, 2012). En esta vía los cuerpos celulares de la dopamina envían proyecciones ascendentes al núcleo estriado desempeñando un papel importante en el movimiento, especialmente en el control de la función motora y en el aprendizaje de nuevas habilidades de movimiento (Tesfaw et al., 2016).

Vía mesolímbica: En esta vía las proyecciones dopaminérgicas se originan en el área tegmental ventral (ATV) del mesencéfalo, que son proyectadas hacia el sistema límbico y mesocortical para su posterior diseminación en la amígdala, la corteza piriforme, los núcleos septales laterales y el núcleo accumbens. Estas neuronas están íntimamente involucradas en varias funciones primordiales del SNC, las cuales incluyen el movimiento voluntario, la alimentación, el afecto, la recompensa, el sueño, la atención, la memoria y el aprendizaje (Beaulieu et al., 2011).

Vía mesocortical: En esta vía las fibras dopaminérgicas también surgen en el ATV y se proyectan hacia la corteza frontal. La dopamina en esta región regula el comportamiento cognitivo y emocional. Los niveles de la dopamina en el cerebro, especialmente en la corteza prefrontal, ayudan a mejorar la memoria y la atención (Björklund & Dunnett, 2007; Tesfaw et al., 2016).

Vía tuberoinfundibular: Se origina en el núcleo arcuato del hipotálamo. En esta vía, la dopamina inhibe la liberación de prolactina (Björklund & Dunnett, 2007; Tesfaw et al., 2016).

En la periferia, la dopamina participa en diferentes funciones fisiológicas como la regulación del olfato, la regulación hormonal, la función cardiovascular y la regulación simpática, entre otras (Missale et al., 1998; Sibley et al., 1993).

## **Síntomas de la EP**

A nivel clínico la EP presenta, principalmente, síntomas motores, no motores y cognitivos, relacionados con fallas del sistema nervioso autónomo (SNA) y cambios de comportamiento. Estos síntomas característicos de la enfermedad son evidentes hasta que se ha perdido aproximadamente el 60 o 70% de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc (Beitz, 2014; Csoti et al., 2016; Ramazani et al., 2019).

### **Síntomas motores**

*Rigidez:* Se observa rigidez en casi todos los pacientes, puede comenzar unilateralmente, pero generalmente se presenta en ambos lados. Cuando se examina el rango de movimiento de la articulación, el paciente a menudo muestra una rigidez de "rueda dentada" que es similar al patrón de trinquete de un engranaje (Beitz, 2014).

*Bradicinesia:* Lentitud del movimiento que a menudo se describe como cansancio o debilidad por parte de los pacientes. Se manifiesta por la disminución de la destreza manual de los dedos, al arrastrar los pies, dificultad para levantarse de una silla y para abrir paquetes o contenedores (Beitz, 2014).

*Temblores (reposo):* El temblor de "rodamiento" en reposo es más notable cuando la parte del cuerpo no participa en un movimiento intencionado. Generalmente inicia unilateralmente y progresa a temblor de reposo bilateral (Beitz, 2014).

*Inestabilidad postural:* En el curso de la enfermedad, los pacientes probablemente mostrarán inestabilidad postural con un mayor riesgo de caída (Beitz, 2014).

Además de los síntomas motores "clásicos" descritos anteriormente, se observan otras manifestaciones motoras. Estos incluyen: expresión facial enmascarada (hipomimia), disminución de la velocidad del parpadeo del ojo, visión borrosa, alteraciones de la mirada hacia arriba, distonía, postura encorvada, dificultad para girar en la cama, marcha arrastrada, "congelación" (incapacidad para moverse) y problemas del habla, tales como hipofonía (voz cada vez más suave) o palilalia (repetición de palabras o frases) (Beitz, 2014).



## **Síntomas no motores**

Los síntomas no motores desempeñan un papel fundamental en la calidad de vida de los pacientes con la EP, siendo los más frecuentes:

*Depresión:* Con una prevalencia del 20 - 30%, no diagnosticándose en la mayoría de los pacientes (Beitz, 2014).

*Ansiedad:* Se presenta en el 25 - 52% de los pacientes con la EP (Beitz, 2014).

*Deterioro cognitivo (demencia):* El riesgo de desarrollar demencia es seis veces mayor siendo más común en pacientes con la EP con una fuerte asociación familiar. Sin embargo, hasta el 60% de los pacientes desarrollan demencia 12 años posteriores al diagnóstico (Beitz, 2014).

*Alteración del sueño:* Afecta a casi el 98% de los pacientes. Con mayor frecuencia, al despertar temprano por la mañana y la vigilia frecuente durante la noche, el temblor de reposo puede actuar para despertar al paciente durante el sueño ligero. Los trastornos del sueño disminuyen considerablemente la calidad de vida de los pacientes afectados (Beitz, 2014).

*Disfunción olfatoria:* La disfunción olfatoria (hiposmia) se detecta en más del 90% de los pacientes. La mayoría de los pacientes afectados generalmente no son conscientes del déficit (Beitz, 2014).

*Dolor:* Su presencia es común, con una prevalencia de entre el 40 y 85% (Beiske et al., 2009; Geroin et al., 2016; Nègre-Pagès et al., 2008), este rango tan amplio se debe a los diferentes tipos de dolor que pueden presentar (Buhmann et al., 2020). También se incluyen: cambios cognitivos, cambios conductuales, falla del SNA, trastornos sensoriales, presión arterial baja, delirios (Engels et al., 2018), trastorno del comportamiento del movimiento ocular rápido y estreñimiento (Chaudhuri & Odin, 2010).

Se ha observado que los síntomas no motores pueden preceder a la aparición de síntomas motores. Datos retrospectivos sugieren que al menos cuatro síntomas (problemas olfativos, trastorno del comportamiento del movimiento ocular rápido, estreñimiento y depresión) pueden ser anteriores a los síntomas motores (Chaudhuri & Odin, 2010).

## **Dolor**

El dolor es un síntoma no motor frecuente en la EP que se relaciona con la pérdida de monoaminas y la neuroinflamación (Kam et al., 2020). La IASP define al dolor como "Una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada, o similar a la asociada con, daño tisular real o potencial", experiencia personal que está influenciada en diversos grados por factores biológicos, psicológicos y sociales (Raja et al., 2020).

## **Dolor en la EP**

Desde una perspectiva fisiopatológica, los pacientes con la EP pueden presentar tres tipos de dolor, nociceptivo, nociplástico y neuropático, presentándose de manera aguda o crónica (Mylius et al., 2021).

El dolor nociceptivo relacionado a la EP, puede ser de tipo visceral y/o músculo esquelético (originado por posturas anormales, rigidez y acinesia causada por fluctuaciones motoras, lo que lleva a distonías dolorosas); el dolor nociplástico deriva de fluctuaciones hiper/hipodopaminérgicas (Mylius et al., 2021); y el dolor neuropático se caracteriza por generar respuestas de dolor espontáneas o evocadas como la alodinia y la hiperalgesia. La prevalencia del dolor en la EP se estima entre un 40% al 85% (Beiske et al., 2009; Broen et al., 2012; Geroin et al., 2016; Nègre-Pagès et al., 2008).

## **Microglía y NFkB-p65**

En el cerebro, las neuronas se comunican con las células gliales para mantener la estructura y la función del parénquima. Entre estos tipos de células podemos encontrar a la microglía que representa del 5–10% del total de células del SNC y los astrocitos, el tipo de célula más abundante en el cerebro (Frost & Schafer, 2016; Sofroniew & Vinters, 2010).

La microglía son los macrófagos residentes en el cerebro y las células inmunitarias primarias del SNC. Tomando en cuenta todas las regiones del cerebro, la densidad de microglía en un cerebro humano no enfermo es de alrededor del 10%, lo que las convierte en una población celular significativa (Mittelbronn et al., 2001). La

microglía desempeña un papel importante en las respuestas inmunes innatas y adaptativas en el SNC. En condiciones normales, la microglía tiene una estructura ramificada (Lee, 2013), cuando la microglía es activada por inmunógenos, como bacterias o agregados de proteína  $\beta$ -amiloide, retraen sus procesos y se transforman en estructuras ameboides. También liberan factores proinflamatorios como óxido nítrico (ON), especies reactivas de oxígeno (ERO), prostaglandina  $E_2$  y citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), interleucina 1 beta ( $IL-1\beta$ ) e interleucina 6 ( $IL-6$ ). Cuando los inmunógenos se eliminan, la microglía vuelve a su morfología convencional (homeostasis) (Kettenmann et al., 2011; Lee, 2013). Sin embargo, la expresión microglial crónica conduce a la muerte neuronal que subyace a la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas mediadas por neuroinflamación como la EP.

Si bien la glía es esencial para regular la homeostasis en el cerebro, su disfunción contribuye a la neurodegeneración en muchas enfermedades cerebrales, incluida la EP. En modelos animales de la EP se ha demostrado que la  $\alpha$ -sinucleína liberada de las células cerebrales activa la microglía para producir citocinas proinflamatorias como la  $IL-1\beta$ , que ejerce efectos nocivos sobre las neuronas (Kıçık et al., 2020). Si bien, la expresión inicial de la microglía conduce a una inflamación descontrolada que exacerba la muerte neuronal (Fernandes et al., 2014), NF $\kappa$ B es un factor de transcripción ampliamente conocido por estar asociado a la producción de citocinas pro-inflamatorias en trastornos neuroinflamatorios (Logan et al., 2013; Pais & Chatterjee, 2005; Wirenfeldt et al., 2005) y la producción de estas citocinas está regulada principalmente por NF $\kappa$ B (Arslan et al., 2020).

### **Astrocitos y NF $\kappa$ B-p65**

Los astrocitos son células que recubren a las neuronas y participan en la neuroinflamación activando la astrogliosis. La astrogliosis se asocia con el desarrollo y la persistencia del dolor neuropático, se han propuesto varios mecanismos a través de los cuales la astrogliosis contribuye en el dolor neuropático (Carlton et al., 2009; Nesic et al., 2005). En condiciones normales, NF $\kappa$ B inactivo se

localiza en el citoplasma interactuando con la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  (Hayden & Ghosh, 2008). Por su parte, la expresión de los astrocitos depende de la interacción entre estas células y neuronas, con la liberación de estos en ambos tipos de células (Tian et al., 2017). Se presume que los astrocitos son un fenotipo reactivo en traumatismos agudos del SNC; supervivencia neuronal en diferentes modelos de enfermedad; inflamación y trastornos neurodegenerativos (Brambilla et al., 2005; Burda & Sofroniew, 2014; Hains et al., 2002; Raasch et al., 2011). Los astrocitos reactivos activan la protección celular mediante la liberación de citocinas proinflamatorias a través de la señalización de NF $\kappa$ B (Hains et al., 2002). Una consecuencia de la expresión de citocinas proinflamatorias es la activación de la cascada de señalización NF $\kappa$ B en los astrocitos reactivos (Kaltschmidt et al., 2005). Algunos estudios, han demostrado que la actividad astrocítica de NF $\kappa$ B impulsa el grado de hiperalgesia y alodinia en diferentes modelos crónicos de dolor (Hartung et al., 2015; Xu et al., 2014) donde el nivel de NF $\kappa$ B-p65 en astrocitos se ve aumentado significativamente en un modelo de artrosis de rodilla, por lo que se especula que NF $\kappa$ B-p65 en astrocitos, facilita la generación de dolor crónico (Li Yunze et al., 2020).

El papel de NF $\kappa$ B como regulador crítico de la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ ), se debe a que estas son liberadas en respuesta a la activación de NF $\kappa$ B (Sakaue et al., 2001). Se ha demostrado que las citocinas proinflamatorias están involucradas en la inducción, la persistencia y la gravedad del dolor neuropático después de una lesión del sistema nervioso periférico (SNP) o SNC. NF $\kappa$ B juega un papel fundamental en la regulación de la expresión de citocinas proinflamatorias y en el desarrollo y el mantenimiento del dolor neuropático (Sakaue et al., 2001). En este sentido, se ha observado que la inyección endoneural de un análogo puede bloquear a NF $\kappa$ B-p65 en el sitio de la lesión nerviosa reduciendo tanto la activación de NF $\kappa$ B-p65 como la expresión de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en el ganglio de la raíz dorsal (GRD) lesionado aliviando la hiperalgesia hasta dos semanas posteriores a su administración (Sakaue et al., 2001), y esto correlaciona con la reducción de mediadores inflamatorios: IL-1 $\alpha$ , IL-6 e iNOS, que se producen

a través de la vía NFkB-p65 y que han sido implicados en la patogenia del dolor neuropático (Sakaue et al., 2001). Lo anterior sugiere que NFkB-p65 participa en el desarrollo del dolor neuropático. Por lo tanto, resulta interesante explorar moléculas que modulen la actividad glial vía NFkB-p65 y la vía dopaminérgica y con ello mitigar y/o aliviar el dolor generado por la EP. En este contexto, en el laboratorio estamos interesados en caracterizar el efecto antinociceptivo y modulador de los fármacos dopaminérgicos, particularmente en este trabajo de tesis se exploró el PPX.

### **Efecto antiinflamatorio y antinociceptivo de PPX**

El PPX es un agonista dopaminérgico D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> empleado en el tratamiento de la EP para contrarrestar síntomas motores. Sin embargo, estudios recientes realizados por Sadeghi y colaboradores (2017) demostraron por primera vez propiedades antiinflamatorias del PPX. El pretratamiento intraperitoneal con PPX es capaz de reducir la inflamación inducida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), carragenina y formalina (Sadeghi et al., 2017). A través de un análisis histológico, en este estudio se confirma que el PPX fue capaz de reducir el edema y la migración de las células polimorfonucleares (PMN) al sitio de la lesión. Por su parte, la falta de un efecto significativo del PPX sobre el aumento de los niveles séricos de malondialdehído (MDA) debido a la inyección de carragenina descartó la importancia de las propiedades antioxidantes del PPX en la respuesta antiinflamatoria (Sadeghi et al., 2017).

Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el pre- y post-tratamiento con PPX (3 mg/kg/i.p.) previene y revierte, respectivamente, la alodinia y la hiperalgesia mecánica secundaria inducidas por formalina en la pata ipsilateral (IL) y contralateral (CL). Asimismo, en animales con la EP, la administración aguda y sub-aguda (10 días) con PPX (3 mg/kg/s.c.) revirtió la alodinia y la hiperalgesia inducida por 6-OHDA (Romero-Sánchez et al., 2020). En conjunto, la evidencia previa nos sugiere que el PPX posee propiedades antialodínicas y antihiperalgésicas, indicando que puede ser un fármaco atractivo para el manejo del dolor neuropático en pacientes con la EP, por lo que resulta importante conocer los

mecanismos responsables que subyacen el efecto antialodínico y antihiperalgésico inducido por este compuesto. Hallazgos recientes han demostrado un incremento en la expresión de la astrogliosis y la microgliosis inducida por 6-OHDA con PPX (Patricio et al., 2019), sugiriendo que dicho fármaco participa en la modulación de los astrocitos y la microglía en animales con la EP. Además, recientemente nuestro grupo de trabajo ha demostrado a través de acoplamiento molecular, que el PPX puede unirse a NFkB-p65 por lo que resulta interesante estudiar si este mecanismo participa en la modulación de células gliales vía inhibición de NFkB-p65.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El dolor neuropático está presente en diversas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, que afecta cada vez más personas. Por lo que resulta importante buscar tratamientos que coadyuven en el alivio de este tipo de dolor. El PPX es un fármaco que pudiera tener efecto antialodínico y antihiperalgésico a través de la vía NFkB-p65 e inhibir la expresión de microglía y astrocitos.

### **4. HIPÓTESIS**

El PPX al unirse a NFkB-p65 es capaz de inhibir la expresión de la microglía y astrocitos y a su vez aliviar la alodinia y la hiperalgnesia inducidas por la lesión unilateral de la SNpc con 6-OHDA.

### **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si PPX es capaz de modular la activación de NFkB-p65 en células gliales, disminuyendo la alodinia y la hiperalgnesia inducidas por la lesión unilateral de la SNpc con 6-OHDA.

## **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Inducir la EP mediante la lesión unilateral de la SNpc con 6-OHDA.
2. Determinar el daño de la vía nigroestriatal posterior a la administración unilateral con 6-OHDA en la SNpc por medio de la conducta de giro inducida por apomorfina y la conducta de cilindro.
3. Evaluar el efecto antialodínico y el efecto antihiperalgésico inducido por la administración subaguda (10 días) de PPX (1 y 3 mg/kg/i.p.) en ratas con la EP.
4. Determinar la expresión de NFkB-p65, Iba1 y GFAP en la porción L4-L6 de la médula espinal, por inmunofluorescencia en ratas con la EP, tratadas con la administración subaguda (10 días) de PPX (3 mg/kg/i.p.).

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales**

Para fines del presente estudio se utilizaron ratas Wistar macho de peso entre 280-300 g, se mantuvieron en el cubículo número 5, primer piso de la unidad de producción y experimentación Animal-Bioterio (UPEAL. UAM Xochimilco, Ciudad de México) en un ambiente controlado (Ciclo de luz-oscuridad 12:12, 22°C) con acceso libre a agua y alimento. Todas las pruebas se realizaron según el Consejo Mexicano para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999 para el trato con animales), las normas europeas y la IASP, aprobadas por el comité de Ética institucional de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X), No. de protocolo 148.

### **Fármacos**

Ácido ascórbico, 6-OHDA, apomorfina, paraformaldehído (PFA) y PPX fueron comprados en Sigma Merk. El ácido ascórbico y PPX fueron disueltos en solución salina (SS) al 0.9%. La 6-OHDA y apomorfina fueron disueltos en ácido ascórbico al 0.02% y SS al 0.9%.

### **Lesión Unilateral con 6-OHDA**

Para generar la lesión, se utilizó el modelo unilateral con 6-OHDA (Romero-Sánchez et al., 2020). Previamente se anestesió a la rata con una mezcla de Ketamina (45 mg/kg/i.p.) y Xilacina (12 mg/kg/i.p.). Una vez anestesiada la rata se rasuró en la parte superior de la cabeza y se aseguró en un marco estereotáxico. Después se llevó a cabo la lesión unilateral haciendo un orificio en el cráneo sobre la SNpc izquierda. Posteriormente, se administró 6-OHDA en las coordenadas (en mm respecto a bregma y la superficie de la dura madre): Anterior-posterior (AP) - 4.52 mm, lateral (L) + 1.8 mm y ventral (V) – 8.0 mm (Paxinos & Watson, 2013). La velocidad de inyección fue de 0.2 µl/min a una concentración de 16 µg/µl.

### **Conductas motoras**

#### **Conducta de giro**

Esta prueba se realizó 15 días post cirugía. Previo a la prueba, por vía subcutánea se administró a las ratas 1 mg/kg de apomorfina y se colocó en un cilindro de 30 cm de altura y un diámetro de 25 cm, se registró la rotación que dieron sobre su propio eje y fue medida a través de un conteo del número de rotaciones completas en un lapso de 30 min. Únicamente se consideraron los giros cuando la rata logró completar los 360°C sobre su propio eje. Las ratas que completaron al menos 300 giros en 60 min fueron resguardadas para experimentos posteriores; sin embargo, aquellos animales que no alcanzaron un total de 300 giros sobre su propio eje durante los 60 min fueron eutanizados con CO<sub>2</sub>.

#### **Cilindro**

La prueba del cilindro es utilizada para evaluar el uso de las extremidades delanteras del animal. Se realizó un recuento de los contactos de las extremidades anteriores de manera simultánea e independiente, con la finalidad de observar la pérdida de las funciones motoras con respecto al tiempo después de la



administración unilateral de 6-OHDA en la SNpc izquierda (Mendieta et al., 2016; Schallert, 2006).

El cilindro es transparente, con una altura de 30 cm y un diámetro de 25 cm. Dentro de éste, se grabó a cada rata durante 5 min para su posterior análisis. Los contactos que se llevaron a cabo entre las extremidades de cada rata y las paredes del cilindro se registraron como IL, CL, y/o contacto con ambas patas (AB). Este ensayo se realizó 14 días después de la cirugía.

### **Evaluación de la alodinia por el método de up-down**

Las lesiones pueden generar un síndrome que comprende, además del dolor espontáneo, respuestas exageradas al tacto ligero (alodinia táctil). La alodinia táctil, probablemente es la respuesta más común provocada por el estímulo (Singh et al., 2017). Para este ensayo, se aplicó un estímulo mecánico por el método up-down con filamentos de von Frey (Touch test sensory evaluador), cuya fuerza comprende desde los 0.4 g hasta los 15 g. El ensayo comenzó con un filamento de 0.4 g; cuando se obtuvo una respuesta positiva de retiro de la pata se marcó con la letra "X" en una hoja de registro y se cambió de filamento disminuyendo el gramaje. Cuando se obtuvo una respuesta negativa al estímulo mecánico, se marcó con la letra "O" y se volvió a aplicar el estímulo con el filamento inmediatamente superior. Para que una respuesta sea considerada positiva, el animal debió retirar abruptamente la extremidad, cualquier otro comportamiento se tomó como una respuesta negativa. La prueba se realizó hasta registrar 3 respuestas iguales o hasta exceder el valor del filamento de 15 g (Chaplan et al., 1994). Las mediciones basales se realizaron antes de la lesión con 6-OHDA. Este ensayo se realizó 24 horas después de la primera administración de PPX y después durante 10 días del día 20 al día 30.

### **Evaluación de la hiperalgesia mecánica**

La hiperalgesia mecánica se evaluó mediante el método de retiro de la pata. Las ratas se colocaron en cámaras de observación de plexiglás con fondo de malla de

alambre, permitiendo el acceso a las patas y se dejaron durante 15 minutos para que se aclimataran al medio antes de iniciar la prueba (Chaplan et al., 1994).

Las mediciones basales se realizaron antes de la lesión con 6-OHDA y 20 días después de la lesión. Fueron empleados los filamentos de von Frey, utilizando fuerzas de flexión de 250 mN (26 g), una fuerza de 250 mN o más se considera un estímulo nocivo y se produce hiperalgesia cuando hay una mayor respuesta a este estímulo (Fu et al., 2001). La prueba se aplicó 10 veces, en la superficie plantar de las ratas. Se evitó tocar las almohadillas de la pata, debido a que es una región con menos sensibilidad.

## **Inmunohistoquímica**

### **Obtención de cerebros**

Treinta días después de la lesión unilateral de la SNpc en ratas macho Wistar, se anestesiaron con pentobarbital sódico (200 mg/kg vía i.p.) y se perfundieron por vía intracardiaca, con 250 mL de SS al 0.9% y posteriormente, con 300 mL de PFA al 4% en una solución amortiguadora de fosfatos: buffer fosfato salino (BFS) 0.1 M, a un pH de 7.3. Al final de este procedimiento se extrajeron los cerebros de los animales y se colocaron en sacarosa al 30% en buffer de fosfatos de sodio 1X y se almacenaron a 4 °C.

### **Procedimiento inmunohistoquímico**

El procedimiento inmunohistoquímico fue modificado de Mendieta et al. 2016. Se realizaron cortes coronales (60 µm) de los cerebros de ratas de los grupos 6-OHDA y sham, en la región que comprende la SNpc (Bregma -4.00 mm a -6.60 mm) y el estriado (Bregma 2.40 mm a -3.80 mm) (Paxinos & Watson, 2009) por medio de un criostato (Leica CM1100), a -22 °C. Se guardaron en placas de 24 pozos con BFS, identificados adecuadamente por zona y grupo experimental.

Se seleccionaron 5-6 cortes de cada zona (SNpc y estriado) por cerebro, los cuales se colocaron en placas de 24 pozos con BFS, después se realizaron 3 lavados a temperatura ambiente con BFS-Tritón (BFS-T) 0.4% durante 10 minutos. Después,

se incubaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en PBS-T durante 10 minutos para eliminar la peroxidasa endógena y se realizaron 3 lavados con BFS-T durante 10 minutos cada uno. Luego, se bloqueó con suero de cabra al 5% durante 10 minutos y ahí mismo, se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario Anti-TH rabbit (diluido 1:500 en solución de bloqueo, Santa Cruz, sc-25269) durante 24 horas a 4°C con agitación constante, pasado este tiempo; se realizaron 3 lavados con BFS-T durante 10 minutos cada uno, se incubaron los tejidos con el anticuerpo secundario biotinilado goat anti-mouse (Vector, dilución 1:500) por 90 minutos en agitación constante y se realizaron 3 lavados a temperatura ambiente con BFS-T durante 10 minutos. Posteriormente, se incubaron los tejidos con estreptavidina acoplada a HRP (Invitrogen, dilución 1:5000) durante 90 minutos en agitación constante y se realizaron 3 lavados con BFS-T durante 10 minutos cada uno. A continuación, se reveló con 1 mL de diaminobenzidina (Sigma, 50 mg/100 mL) y 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% por cada pozo, durante 30 minutos. Se retiró la solución y se añadió BFS para detener la reacción colorimétrica, se colocaron los tejidos en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar durante 24 horas. Finalmente, se deshidrataron con soluciones de etanol 80, 90 y 100%, xilol:etanol 50:50 y xilol 100%, inmediatamente después se añadieron 200 µL del medio de montaje Entellan (Merck, Cat. 1.07960), se cubrieron con cubreobjetos de 24 x 60 mm y se dejaron secar por 24 horas.

### **Conteo neuronal**

La cuantificación se realizó por dos métodos; densidad óptica y conteo manual. Para la densidad óptica, se observaron las muestras en un estereoscopio (Leica EZ4) y se tomaron fotografías y cuantificación en objetivos 0.8-1.25X para obtener imágenes del tejido completo y 2.0X para cuantificar cada lado.

Para la cuantificación por densidad óptica se seleccionaron imágenes de 5-7 cortes por cada cerebro, en estas imágenes se identificó la SNpc con ayuda del Atlas de Paxinos & Watson (2009). Posteriormente, se analizaron con el programa Image Studio lite Versión 5.2 con ayuda de la herramienta “draw ellipse” a diferentes

tamaños según la anterioridad identificada. Se recopilaron los datos de “Signal”, “Area” y “Background” de cada uno de los lados de los cortes.

Para el método de conteo manual, se tomaron fotografías con un microscopio Motic BA310E acoplado a una cámara digital Motic 285A, con el objetivo 10X. Se seleccionaron imágenes de 5-7 cortes por cada cerebro de rata. Se identificó la SNpc con ayuda del Atlas de Paxinos & Watson (2009) y con la herramienta de dibujo libre se marcó y contó cada una de las neuronas por cuadrantes, las cuales fueron registradas y sumadas para tener el número de neuronas por lado (IL o CL) de cada rebanada.

### **Inmunofluorescencia**

Bajo anestesia con isoflurano, los animales fueron perfundidos con PFA al 4% preparado en BF (Buffer Fosfato), perfundidos a través de la aorta ascendente. La sección de la médula espinal L4-L6 se extrajo y se postfijó en PFA al 4% durante 30 min. Dos días después, la médula espinal se transfirió a sacarosa al 30% preparada en BFS para su crioprotección a 4°C. Los tejidos se seccionaron (40 µm de espesor), se recolectaron en 5 series cada 200 µm y se procesaron para realizar la inmunofluorescencia. Las secciones del tejido se incubaron en BFS con Tritón X-100 al 0.5% durante 20 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, las secciones se incubaron en BFS 0.1 M con un coctel de anticuerpos: i) monoclonal primario de conejo contra NFκB p65 (1:500, Cat# 3033, Cell Signaling Technology), ii) monoclonal de ratón contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, 1:400, Cat# 3670 Cell Signaling Technology) iii) policlonal de pollo contra NeuN (1:500; Cat# Ab134014, Abcam) iiiii) policlonal de cabra contra Iba1 (1:5000, Cat# Ab107159, Abcam) durante 24 h a 4°C. Después de la incubación, las secciones se lavaron durante 5 min con BFS 0.1 M y se incubaron en un segundo cóctel de anticuerpos secundarios: i) burro anti-conejo Alexa Fluor 647 (1:300, Cat# A31573, ThermoFisher Scientific), ii) burro anti-cabra Alexa Fluor 555 (1:300, Cat# A21432, ThermoFisher Scientific), iii) burro anti-ratón Alexa Fluor 350 (1:300, Cat# A10035, ThermoFisher Scientific) y iiiii) burro anti-pollo FITC (1:125) durante 24 h a

4°C protegido de la luz. Después de la incubación, las secciones se lavaron durante 5 minutos con BFS 0.1 M. Para su conservación y observación en el microscopio de epifluorescencia el tejido se deshidrató utilizando un tren de deshidratación. Para cuantificar la expresión de NeuN, NFkB-p65, GFAP e Iba1 en la sección de la médula espinal L4-L6, contamos el número de células fluorescentes con la herramienta de dibujo libre Paint, se marcó y contó cada una de células por cuadrantes, las cuales fueron registradas y sumadas para obtener el número total. Como control de pegado inespecífico (control negativo) de los anticuerpos secundarios utilizados en nuestro estudio, también se realizó inmunotinción de la misma forma, pero sin anticuerpos primarios, para un control negativo.

Las imágenes se obtuvieron y capturaron utilizando un microscopio confocal LSM 780 DUO con platina motorizada (Carl Zeiss) y software versión 4.2 (Carl Zeiss) con 25 X/0.8, 40 X/1.3 y objetivo de inmersión en aceite, utilizando el láser de argón de 488 nm para excitar. Alexa Fluor 488, y láser de diodo de 561 nm para Alexa Fluor 555 y emisión de láser HeNe a 476 nm. Los intervalos de sección estenopeica y z se mantuvieron constantes para todas las imágenes. Todos los casos de 25-35 secciones ópticas z de 0,5-1 µm de espesor se obtuvieron del tejido de 40 µm de espesor para cada pila de imágenes. Se adquirieron secciones ópticas a un tamaño digital de 1024 x 1024 píxeles y se promediaron 4 veces para reducir el ruido, y se generaron imágenes de epifluorescencia con un microscopio de fluorescencia motorizado invertido Olympus IX81 (Olympus Latin America, Inc, Florida, FL, EE. UU.). Utilizando una lámpara de Xenón (módulo Cell-R DSU, Olympus) conectada al microscopio con una fibra óptica. También se obtuvieron imágenes digitales de mayor potencia (100X) asistidas por computadora de neuronas marcadas utilizando una cámara CCD digital ORCA®-R2 (Hamamatsu Photonics K.K. Japón), con el software de imágenes xCellence-RT, v1.2 (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Alemania). En todos los casos, se importó una imagen de proyección bidimensional en formato de archivo de imagen de etiqueta y se utilizó para componer las figuras de paneles múltiples. Además, se realizó una proyección ortogonal mediante secciones ópticas.

## **Diseño experimental**

Para establecer si la inyección con 6-OHDA en ratas indujo la EP, se hicieron las siguientes pruebas 1) la prueba de comportamiento de giro se evaluó como índice de desequilibrio dopaminérgico 15 días después de la cirugía estereotáxica, 2) la prueba del cilindro se evaluó como un indicador de asimetría motora 14 días después de la inyección de 6-OHDA en SNpc (Figura 1). Para evaluar si la administración intraperitoneal subaguda (10 días) post-tratamiento con PPX podía revertir la alodinia y la hiperalgesia, se administró a las ratas PPX (1 y 3 mg/kg/i.p./día) o vehículo (SS al 0.9%).

La alodinia táctil y la hiperalgesia mecánica se evaluaron de forma subaguda (0-10 días). Finalmente, al trigésimo día, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (200 mg/kg/i.p.) y perfundidas con PFA al 4% (Figura 1). La médula espinal L4-L6 y el cerebro se transfirió a sacarosa al 30%. Se obtuvieron secciones de la médula espinal L4-L6 (40  $\mu$ m de espesor) mediante un microtomo Leica SM 2000 y secciones de la SNpc y el estriado, se almacenaron en BFS (pH 7,4) para evaluaciones inmunofluorescentes GFAP, Iba1 y NFkB-p65 o inmunohistoquímicas para tirosina hidroxilasa (TH).

## **Análisis estadístico para alodinia, hiperalgesia, prueba de cilindro, prueba de giro, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia**

Todos los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Se utilizó Prism (versión 8.0.1 GraphPad Software, San Diego, CA) para la producción de gráficos y análisis estadísticos. Para el umbral de retirada de la pata del 50% (alodinia) o el número de respuestas de retirada de la pata trasera (hiperalgesia), los datos se analizaron estadísticamente utilizando un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. Los datos se consideraron significativamente diferentes cuando  $P < 0.05$ . Los datos de inmunohistoquímica se expresan como la media  $\pm$  S.E.M. para 3-6 animales; las diferencias se consideraron significativas con una  $P < 0.05$  en comparación con el grupo sham (ANOVA una vía seguido de

prueba de Tukey). Se uso el programa estadístico Sigma Plot 12.0. Los datos de inmunofluorescencia, prueba de cilindro y prueba de giro se analizaron con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Tukey.

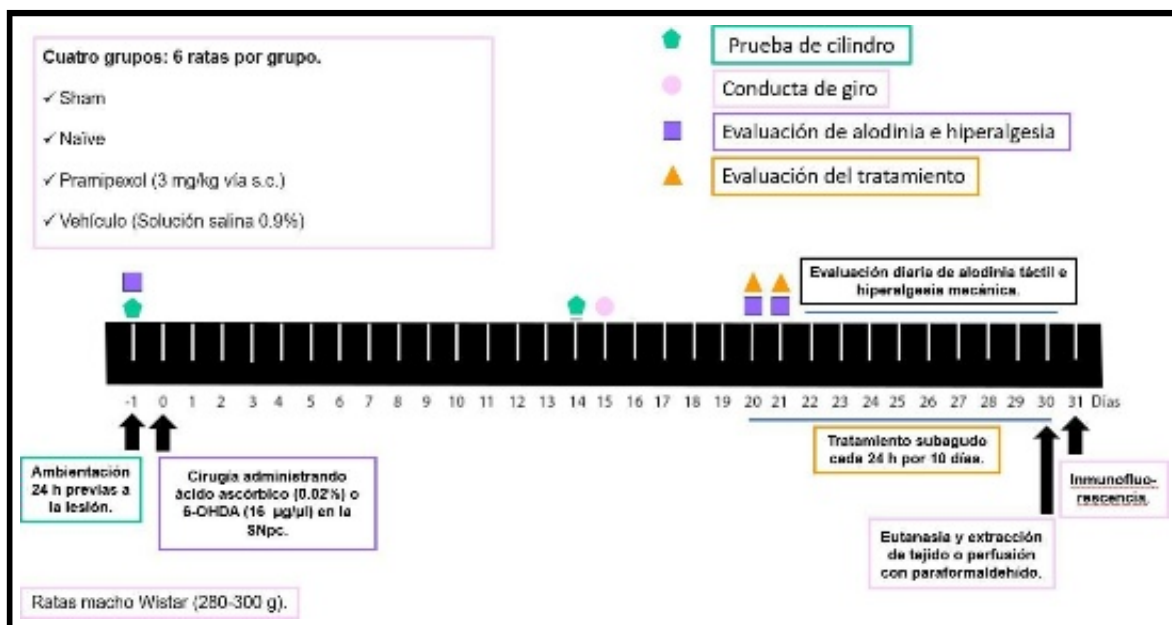


Figura 1. Esquema de trabajo del curso temporal de la administración de PPX o vehículo, así como de la evaluación de las conductas motoras y las conductas nociceptivas.

## 8. RESULTADOS

### Validación de la lesión unilateral de la SNpc en el modelo de la EP inducida con 6-OHDA

Los animales lesionados unilateralmente con 6-OHDA presentaron rotación asimétrica hacia el lado CL ( $492.15 \pm 7.62$  giros en 1 hora) respecto a los animales no lesionados los cuales no presentaron giros (Figura 2). Por otra parte, los animales lesionados con 6-OHDA presentaron un menor uso del miembro anterior CL a la lesión de 21.32% (Figura 3B), al igual que el uso de ambas patas 18.63% (Figura 3C), en comparación con el grupo sham. Utilizando mayoritariamente el miembro anterior IL a la lesión 60.05% (Figura 3A).

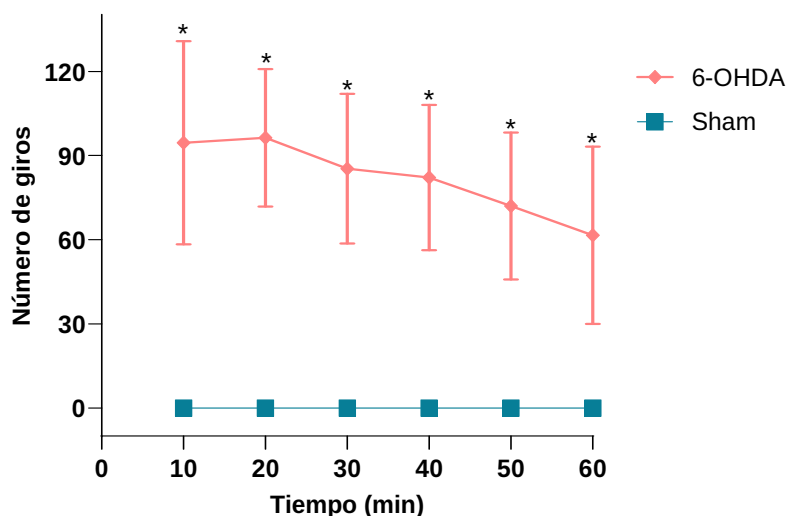


Figura 2. Resultados de la prueba de conducta de giros posterior a la administración de apomorfina 1 mg/kg/s.c. en ratas, 15 días después de la lesión unilateral con 6-OHDA ( $16 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).  $F(1,35) = 282.3$ ,  $*P \leq 0.0001$  comparado con el grupo sham, seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni.



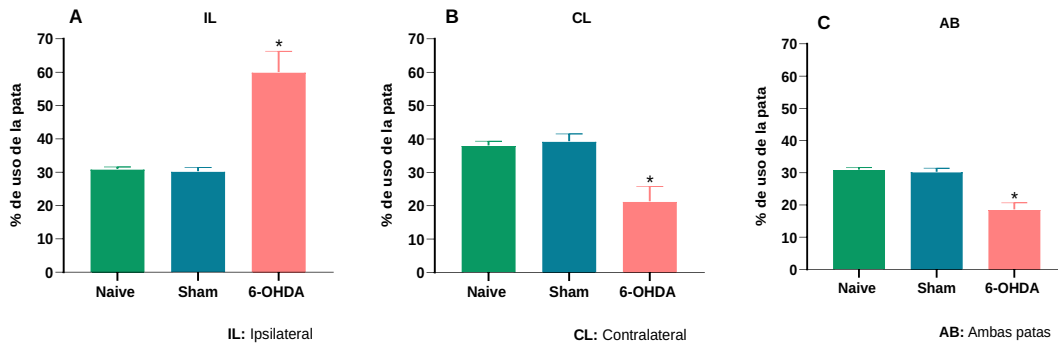


Figura 3. Resultados de la prueba de cilindro en el grupo de 6-OHDA, IL 60.05% (A), CL 21.32% (B) y AB 18.63% (C), 14 días posteriores a la lesión unilateral con 6-OHDA (16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). ANOVA de 1 vía;  $F(5,105) = 368.1$ ,  $*P \leq 0.0001$  comparado con el grupo sham, seguido de Tukey; posterior a la lesión.

### **Efecto antialodínico y antihiperalgésico inducido por el tratamiento intraperitoneal subagudo (10 días) de PPX en ratas lesionadas con 6-OHDA**

Los animales lesionados unilateralmente con 6-OHDA disminuyeron el 50% de la respuesta del umbral de retirada de la pata. Además, la administración unilateralmente con 6-OHDA indujo hiperalgnesia mecánica en ambas patas.

La administración intraperitoneal subaguda (10 días) de PPX (1 y 3 mg/kg), pero no el vehículo, incrementó el umbral de retiro de la pata IL (ANOVA de 2 vías;  $F(4.297) = 1740$ ,  $P < 0.0001$ , seguido por la prueba post-hoc de Bonferroni) y CL (ANOVA de 2 vías;  $F(4.297) = 4050$ ,  $P < 0.0001$ , seguido por la prueba post-hoc de Bonferroni) de manera dosis dependiente, lo que se interpretó como un efecto antialodínico. Además, el tratamiento subagudo con PPX a la dosis de 1 y 3 mg/kg/día/i.p. indujo un efecto antialodínico a partir de cuarto y octavo día de la administración, respectivamente, y revirtió la alodinia a partir de séptimo día en la pata ipsilateral (Figura 4A) y contralateral (Figura 4B).

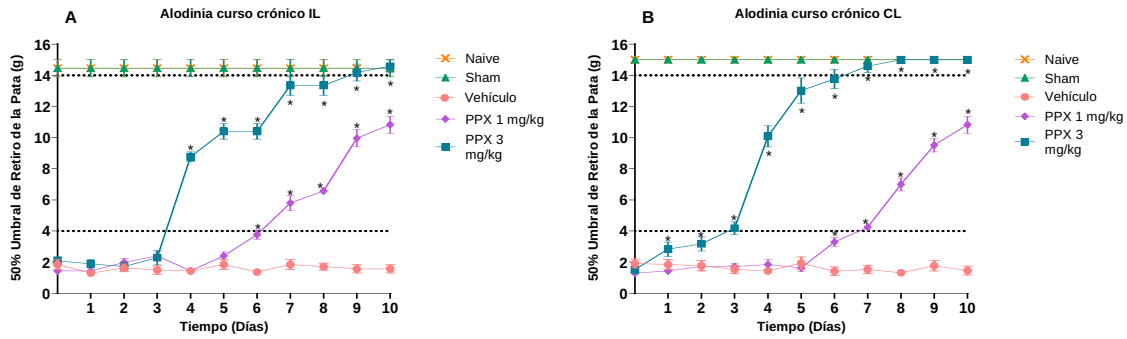


Figura 4. Efecto de PPX (1 y 3 mg/kg/i.p.) sobre la alodinia táctil inducida por la administración de 6-OHDA (16  $\mu$ g/ $\mu$ l) evaluado en la pata IL obteniendo un aumento a partir del día 4 (A) y pata CL obteniendo un aumento a partir del día 4 (B) comparado con los grupos naïve, sham y vehículo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  S.E.M. para 6 animales. IL (ANOVA de 2 vías;  $F(4,297) = 1740$ ,  $*P < 0.0001$  comparado con el grupo vehículo, seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni) y CL (ANOVA de 2 vías;  $F(4,297) = 4050$ ,  $*P < 0.0001$  comparado con el grupo vehículo, seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni) con respecto al grupo sham, lo que es indicativo de inducción de alodinia táctil.

Por otro lado, la administración intraperitoneal subaguda (10 días) de PPX (1 y 3 mg/kg), pero no el vehículo, disminuyó el número de respuestas de retirada de la pata trasera IL (ANOVA de 2 vías;  $F(4,297) = 719.5$ ,  $P < 0,0001$ , seguido de la prueba post- hoc de Bonferroni) y CL (ANOVA de 2 vías;  $F(4,297) = 617.4$ ,  $P < 0,0001$ , seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni) de manera dosis dependiente, lo que se interpretó como un efecto antihiperalgésico. Las dosis de 1 y 3 mg/kg/día vía i.p. revirtieron la hiperalgnesia inducida por la lesión unilateral con 6-OHDA en la SNpc a partir de los cinco días de la administración, manteniendo el efecto antihiperalgésico durante 10 días en la pata ipsilateral (Figura 5A) y contralateral (Figura 5B).

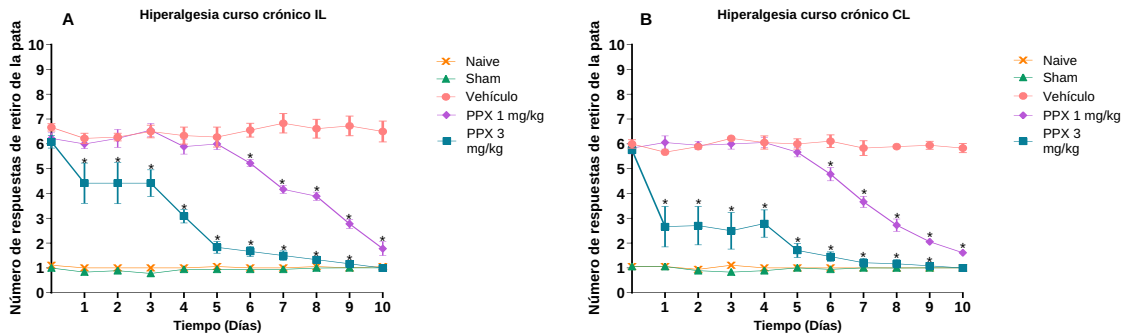


Figura 5. Efecto de PPX (1 y 3 mg/kg/i.p.) sobre la hiperalgesia mecánica inducida por la administración de 6-OHDA (16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) evaluado en la para IL obteniendo una disminución a partir del día 5 (A) y CL obteniendo una disminución a partir del día 5 (B) comparado con los grupos naïve, sham y vehículo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  S.E.M. para 6 animales. IL (

ANOVA de dos vías;  $F(4.297) = 719.5$ ,  $*P < 0.0001$  comparado con el grupo vehículo, seguido por la prueba post-hoc de Bonferroni) y CL (ANOVA de 2 vías;  $F(4.297) = 617.4$ ,  $*P < 0,0001$  comparado con el grupo vehículo, seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni). Las ratas presentaron un aumento bilateral en la respuesta de retiro de la pata tras la aplicación del filamento de von Frey (250 mN), lo que es indicativo de inducción de hiperalgesia mecánica.

Se obtuvo un 20.21 del %MEP en la disminución del número de respuestas de retirada de la pata trasera IL (Figura 6A) y un 16.59 del %MEP en la disminución del número de respuestas de retirada de la pata trasera CL (Figura 6B) tras la administración intraperitoneal subaguda (10 días) de PPX 1 mg/kg; se obtuvo un 53.48 del %MEP en la disminución del número de respuestas de retirada de la pata trasera IL (Figura 6A) y un 62.53 del %MEP en la disminución del número de respuestas de retirada de la pata trasera CL (Figura 6B) después de la administración intraperitoneal subaguda (10 días) de PPX 3 mg/kg. Asimismo, se demostró un 25.47 del MEP en la disminución del número de respuestas de retirada de la pata trasera IL (Figura 6C) y un 25.78 del %MEP en la disminución del número de respuestas de retirada de la pata trasera CL (Figura 6D) tras la administración

intraperitoneal subaguda (10 días) de PPX 1 mg/kg. Finalmente, se obtuvo un 67.37 del %MEP en la disminución del número de respuestas de retirada de la pata trasera IL (Figura 6C) y un 77.90 del %MEP en la disminución del número de respuestas de retirada de la pata trasera CL (Figura 6D) tras la administración intraperitoneal subaguda (10 días) de PPX 3 mg/kg.

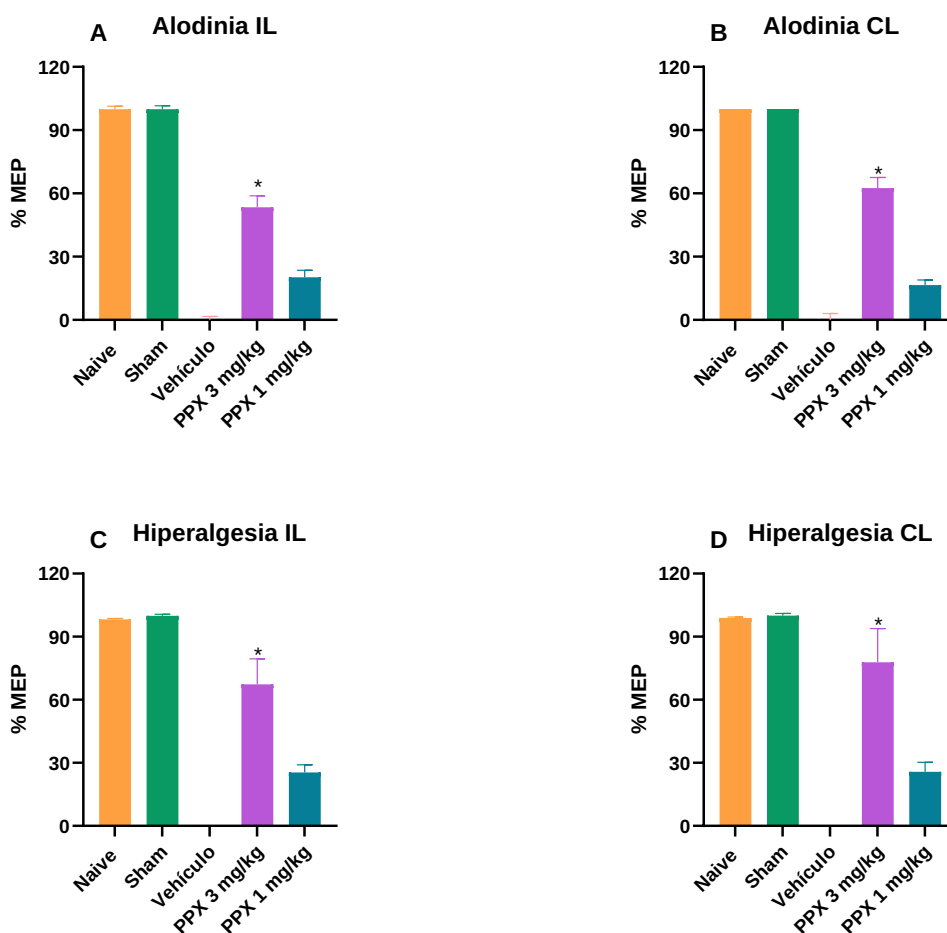


Figura 6. Porcentaje del máximo efecto posible (MEP) de PPX (1 y 3 mg/kg/i.p.) sobre la alodinia táctil en la pata IL obteniendo una reducción significativa con la dosis de 3 mg/kg (A) y CL obteniendo una reducción significativa con la dosis de 3 mg/kg (B) y la hiperalgnesia mecánica en la pata IL obteniendo una reducción significativa con la dosis de 3 mg/kg (C) y CL obteniendo una reducción significativa con la dosis de 3 mg/kg (D) inducidas por la administración de 6-OHDA (16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) comparado con los grupos naïve, sham y vehículo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  S.E.M. para 6 animales. Alodinia e hiperalgnesia IL (ANOVA de 1 vía; \* $P < 0.0001$  comparado con el grupo vehículo, seguido de Tukey) y CL (ANOVA de 1 vía; \* $P < 0,0001$  comparado con el grupo vehículo, seguido de Tukey).

## Inmunohistoquímica

En cuanto a la cuantificación por densidad óptica (figura 7), para el grupo sham se obtuvieron valores de 18.42 (IL) y 19.12 (CL), sin encontrar diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0.822$ ) entre los lados, en cambio, para el grupo 6-OHDA se obtuvieron valores de 0.35 para IL y de 1.56 para el lado CL, encontrando diferencia estadísticamente significativa ( $*P = 0.002$ ) entre ambos lados.

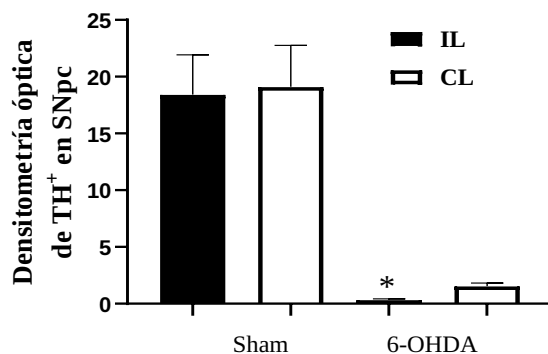


Figura 7. Análisis de densitometría óptica TH de SNpc del grupo sham y 6-OHDA. Los datos se expresan como la media  $\pm$  S.E.M. para 3 animales;  $*P < 0,001$  en comparación con el grupo simulado (ANOVA de 1 o 2 vías seguido de la prueba de Tukey).

Para la cuantificación por conteo neuronal (Figura 8), se encontraron valores de 487.33 (IL) y 499.67 (CL) para el grupo sham, sin encontrar diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0.9897$ ) entre los lados; en cambio, para el grupo 6-OHDA se obtuvieron valores de 178 para el lado IL y de 356.57 para el lado CL, encontrando diferencia estadísticamente significativa ( $*P = 0.0105$ ) entre ambos lados.

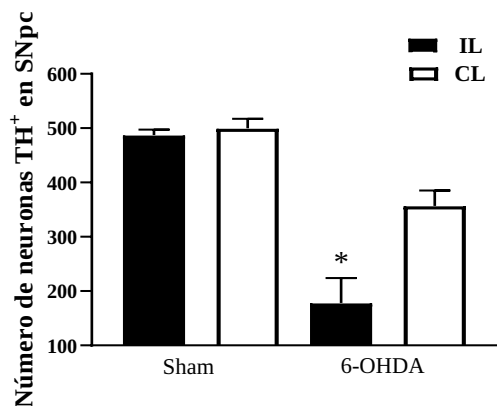


Figura 8. Número de neuronas TH<sup>+</sup> en SNpc. Análisis de la inmunoreactividad a TH por conteo neuronal en la SNpc del grupo sham y 6-OHDA. Los datos se expresan como la media  $\pm$  S.E.M. para 3 animales; \*P < 0,001 en comparación con el grupo simulado (ANOVA de 1 o 2 vías seguido de la prueba de Tukey).

En general, las ratas que recibieron inyección unilateral de 6-OHDA, mostraron una pérdida significativa de células positivas a TH en la SNpc del lado donde se realizó la lesión, a diferencia de aquellas ratas que habían recibido inyección del vehículo (Figura 9), con un promedio de pérdida del ~80% de neuronas (Figura 8).

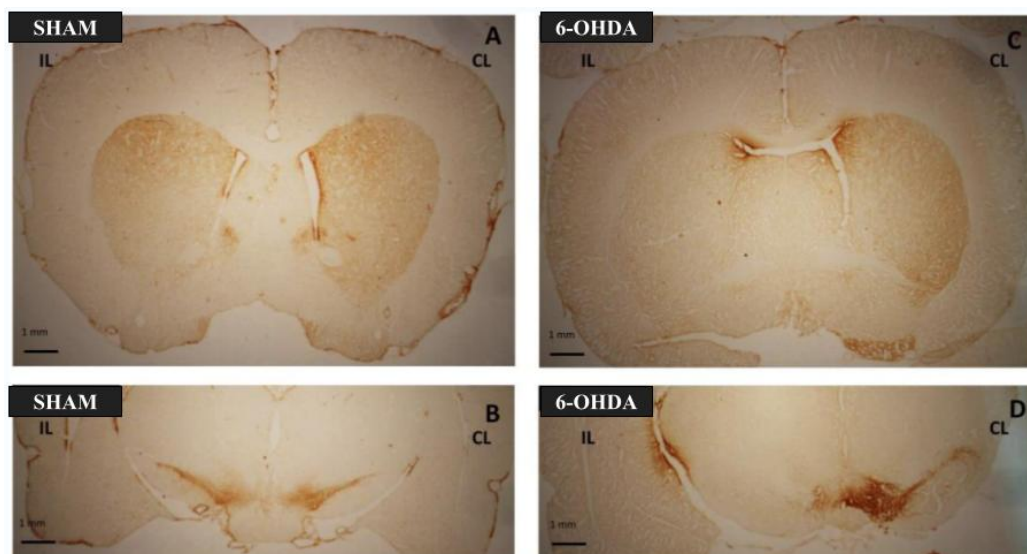


Figura 9. Inmunotinción representativa de TH del estriado grupo sham (A) y 6-OHDA (C), y de la SNpc grupo sham (B) y 6-OHDA (D) de las ratas lesionadas y no lesionadas con inyección de 6-OHDA (16  $\mu$ g/ $\mu$ l) en la SNpc. Barra de escala = 1mm.

## **PPX revirtió la expresión de astrocitos y microglía inducida por 6-OHDA**

GFAP e Iba1 se analizaron por inmunofluorescencia, donde la tinción de GFAP reflejó astrogliosis (Eng et al., 2000), mientras que la tinción de Iba1 reflejó microgliosis (Ito et al., 1998). Treinta días posteriores a la lesión unilateral con 6-OHDA se presentó un aumento en la inmunotinción de GFAP en el asta dorsal de la médula espinal L4-L6 (Figura 16). Además, la lesión con 6-OHDA indujo un aumento en el número de células positivas a GFAP en cada capa de el asta dorsal (Figura 10, 11, 12, 13, 14, 15, su estadística se muestra en la tabla 1). Interesantemente, el número de células de la inmunotinción de GFAP fue revertido por PPX 3 mg/kg en el asta dorsal espinal IL y CL en todas las capas (Figura 10, 11, 12, 13, 14, 15, su estadística se muestra en la tabla 1).

## Número de células de GFAP, NFkB-p65 e Iba1 de la capa 1 de el asta dorsal de la médula espinal lumbar L4-L6

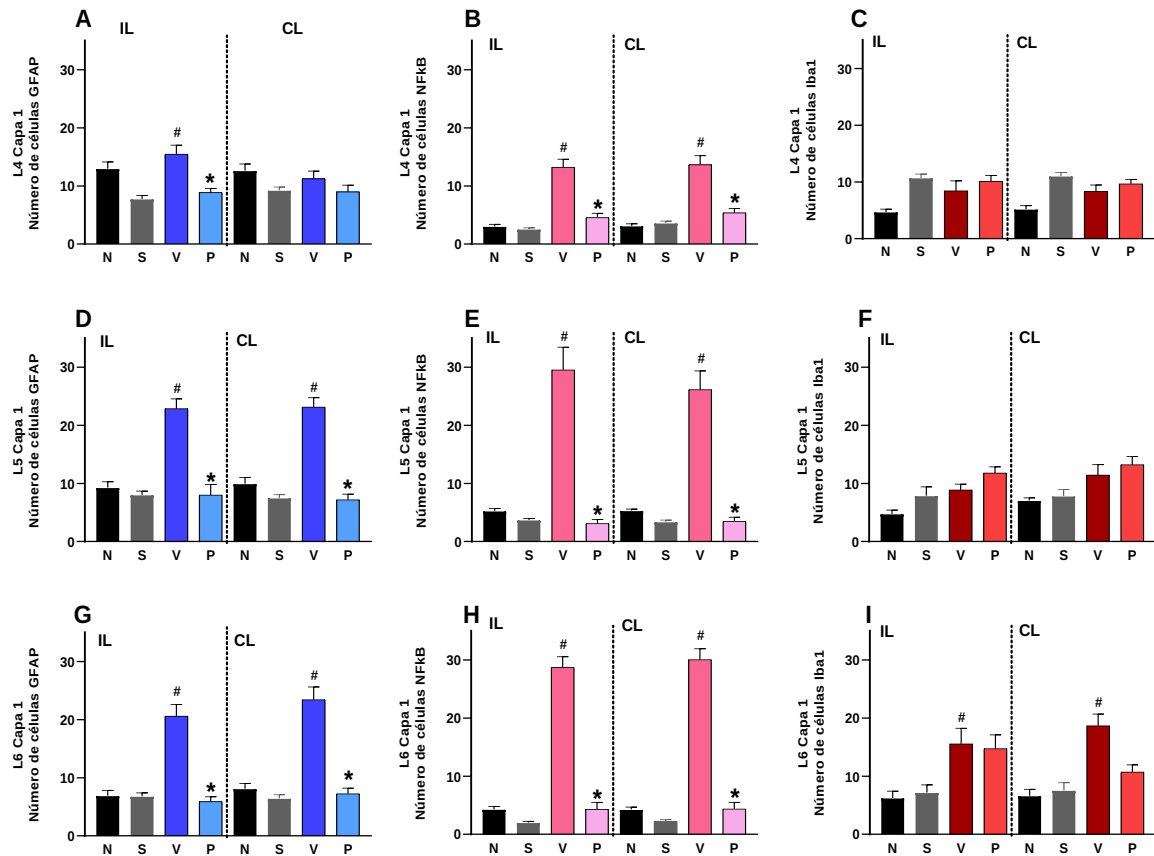


Figura 10. Número de células de inmunotinción de GFAP (A, D, G), NFkB-p65 (B, E, H) e Iba1 (C, F, I) en la capa 1 L4, L5 y L6 de el asta dorsal médula espinal lumbar IL y CL. Grupos experimentales N: naïve, S: sham, V: Vehículo, P: Pramipexol. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3), ANOVA 1 vía. Tukey \*P  $\leq$  0.01 en comparación con el grupo 6-OHDA y #P  $\leq$  0.01 en comparación con el grupo sham.



## Número de células de GFAP, NFkB-p65 e Iba1 de la capa 2 de el asta dorsal de la médula espinal lumbar L4-L6

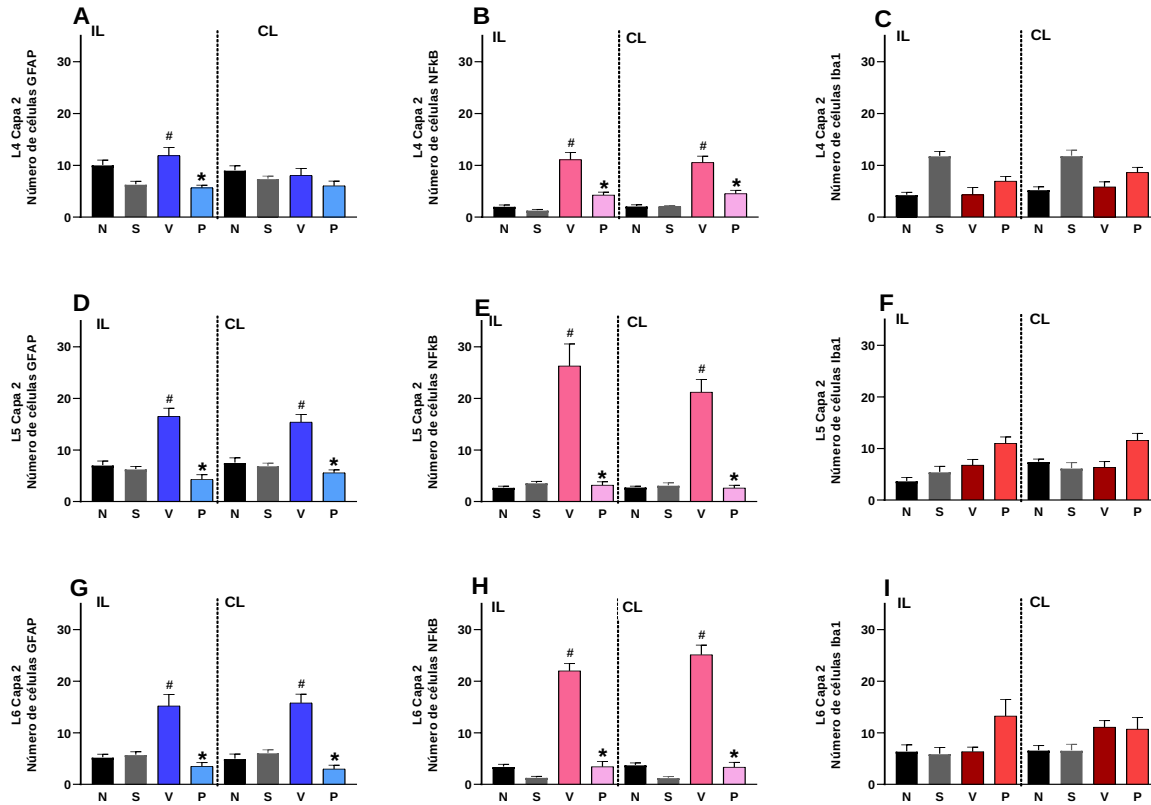


Figura 11. Número de células de inmunotinción de GFAP (A, D, G), NFkB-p65 (B, E, H) e Iba1 (C, F, I) en la capa 2 L4, L5 y L6 de el asta dorsal médula espinal lumbar IL y CL. Grupos experimentales N: naïve, S: sham, V: Vehículo, P: Pramipexol. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3), ANOVA 1 vía. Tukey \*P  $\leq$  0.01 en comparación con el grupo 6-OHDA y #P  $\leq$  0.01 en comparación con el grupo sham.

## Número de células de GFAP, NFkB-p65 e Iba1 de la capa 3 de el asta dorsal de la médula espinal lumbar L4-L6

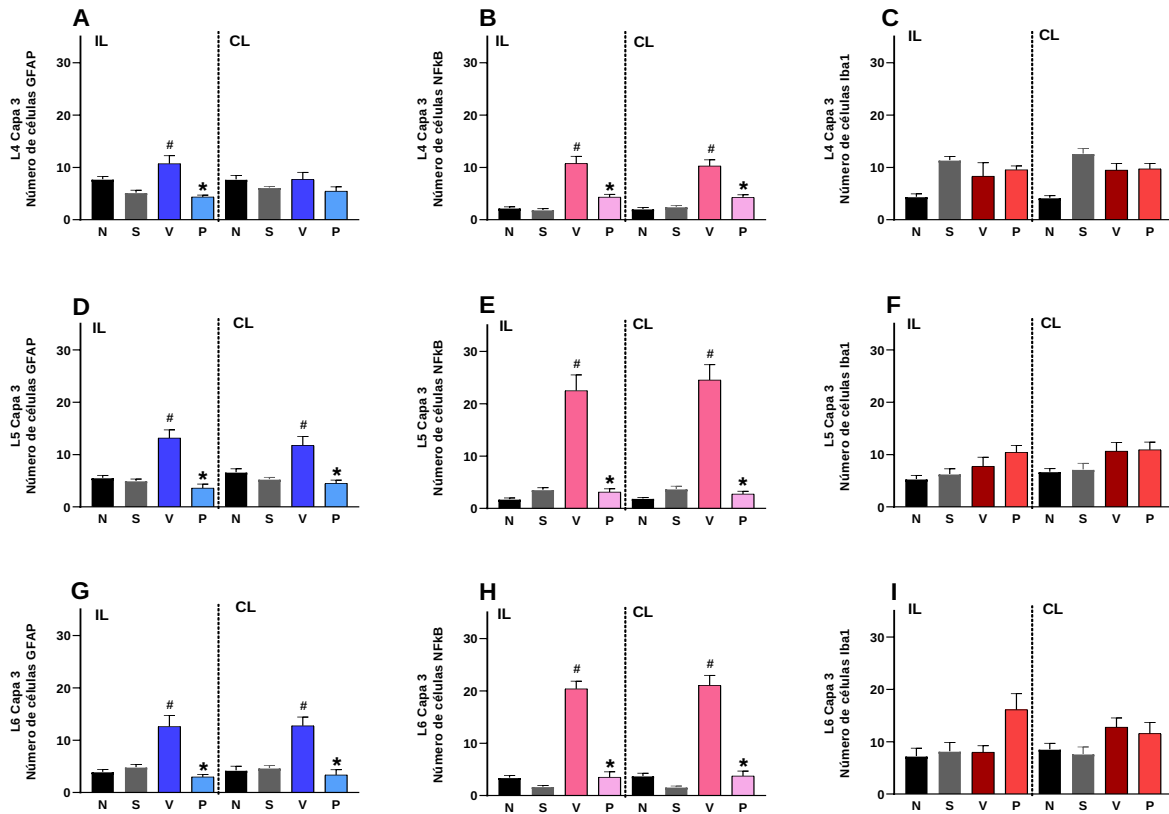


Figura 12. Número de células de inmunotinción de GFAP (A, D, G), NFkB-p65 (B, E, H) e Iba1 (C, F, I) en la capa 3 L4, L5 y L6 de el asta dorsal médula espinal lumbar IL y CL. Grupos experimentales N: naïve, S: sham, V: Vehículo, P: Pramipexol. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3), ANOVA 1 vía. Tukey \*P  $\leq$  0.01 en comparación con el grupo 6-OHDA y #P  $\leq$  0.01 en comparación con el grupo sham.

## Número de células de GFAP, NFkB-p65 e Iba1 de la capa 4 de el asta dorsal de la médula espinal lumbar L4-L6

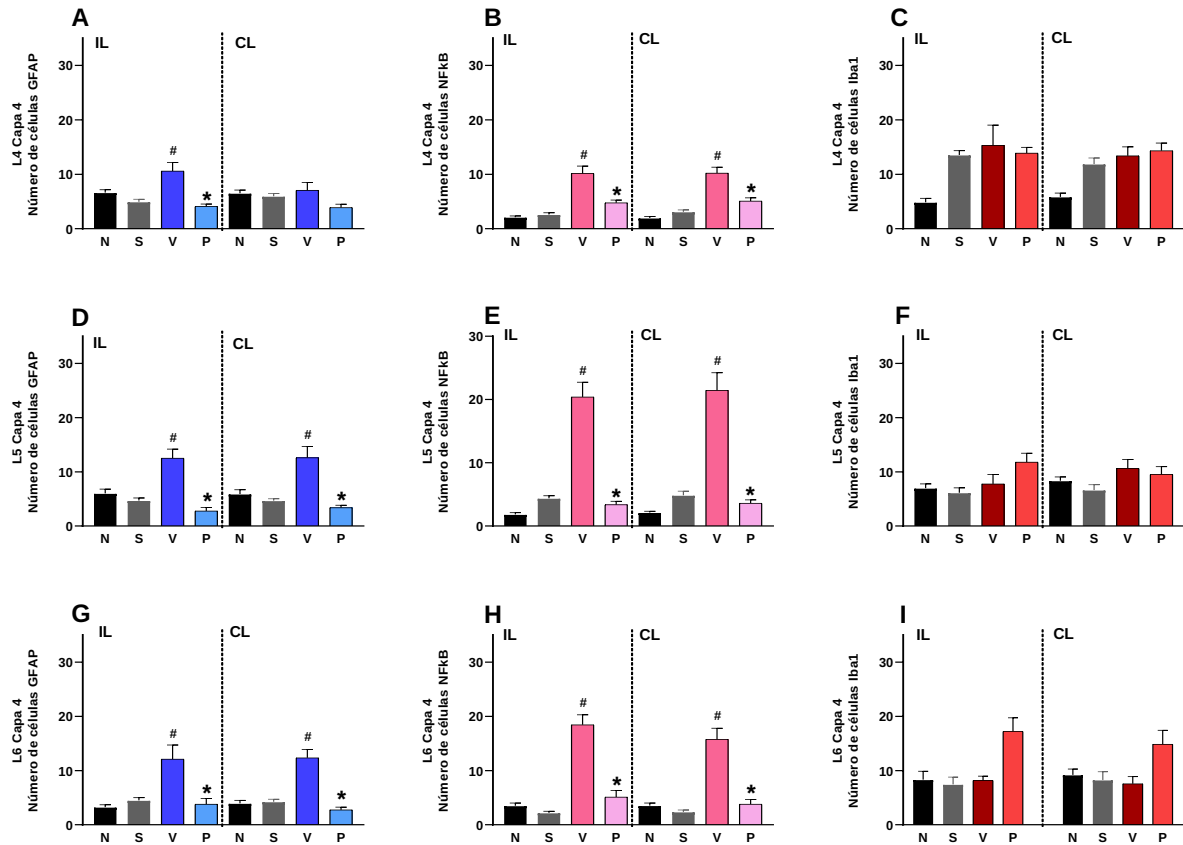


Figura 13. Número de células de inmunotinción de GFAP (A, D, G), NFkB-p65 (B, E, H) e Iba1 (C, F, I) en la capa 4 L4, L5 y L6 de el asta dorsal médula espinal lumbar IL y CL. Grupos experimentales N: naïve, S: sham, V: Vehículo, P: Pramipexol. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3), ANOVA 1 vía. Tukey \*P  $\leq$  0.01 en comparación con el grupo 6-OHDA y #P  $\leq$  0.01 en comparación con el grupo sham.

## Número de células de GFAP, NFkB-p65 e Iba1 de la capa 5 de el asta dorsal de la médula espinal lumbar L4-L6

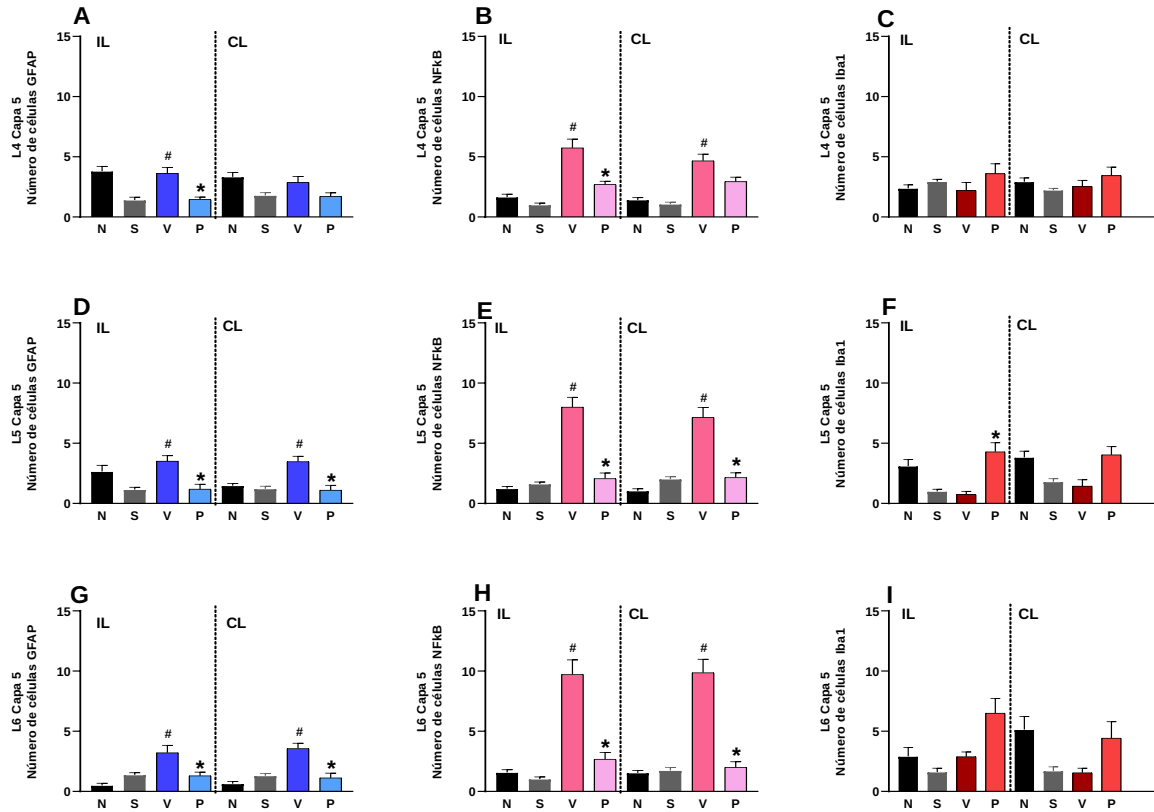


Figura 14. Número de células de inmunotinción de GFAP (A, D, G), NFkB-p65 (B, E, H) e Iba1 (C, F, I) en la capa 5 L4, L5 y L6 de el asta dorsal médula espinal lumbar IL y CL. Grupos experimentales N: naïve, S: sham, V: Vehículo, P: Pramipexol. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3), ANOVA 1 vía. Tukey \*P  $\leq$  0.01 en comparación con el grupo 6-OHDA y #P  $\leq$  0.01 en comparación con el grupo sham.

## Número de células de GFAP, NFkB-p65 e Iba1 de la capa 6 de el asta dorsal de la médula espinal lumbar L4-L6

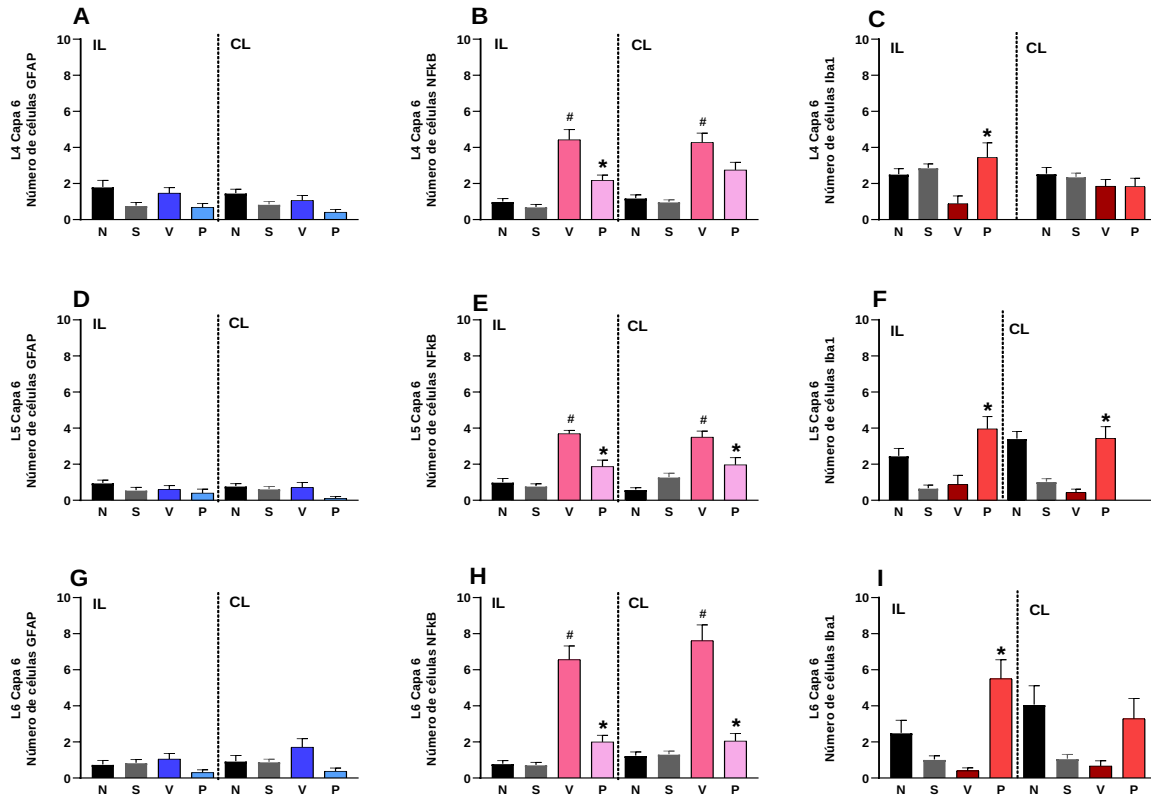


Figura 15. Número de células de inmunotinción de GFAP (A, D, G), NFkB-p65 (B, E, H) e Iba1 (C, F, I) en la capa 6 L4, L5 y L6 de el asta dorsal médula espinal lumbar IL y CL. Grupos experimentales N: naïve, S: sham, V: Vehículo, P: Pramipexol. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3), ANOVA 1 vía. Tukey \*P  $\leq$  0.01 en comparación con el grupo 6-OHDA y #P  $\leq$  0.01 en comparación con el grupo sham.

**Tabla 1.** Estadística de las figuras 10, 11, 12, 13, 14 y 15 correspondientes a la cuantificación de la expresión de GFAP, Iba1 y NFkB-p65.

	GFAP			Iba1			NFkB-p65		
	L4	L5	L6	L4	L5	L6	L4	L5	L6
<b>Capa 1</b>	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.114) = 9.981, P < 0,0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.99) = 3.045, P < 0.03	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.85) = 34.28, P < 0,0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (7.176) = 30.77, P < 0,0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.66) = 33.01, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.64) = 43.32, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.112) = 18.46, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.118) = 15.98, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.92) = 8.827, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.91) = 8.555, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.56) = 6.035, P < 0.0012; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.56) = 9.017, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.153) = 36.84, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.160) = 31.74, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.129) = 54.96, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.130) = 59.80, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.102) = 156.5, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.103) = 173.3, P < 0.0001
<b>Capa 2</b>	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.116) = 7.153, P < 0,0002; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.99) =	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.85) = 24.47, P < 0,0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.91) =	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.66) = 16.87, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.64) =	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.112) = 25.13, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.118) =	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.92) = 11.20, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.91) =	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.56) = 3.013, P < 0.03; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.56) =	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.153) = 31.42, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.160) =	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.129) = 39.20, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.130) =	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.103) = 145.9, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.105) =

	1.993, P < 0.12	16.63, P < 0,0001	25.78, P < 0.0001	13.72, P < 0.0001	6.155, P < 0.0007	2.506, P < 0.06	34.27, P < 0.0001	69.00, P < 0.0001	138.7, P < 0.0001
<b>Capa 3</b>	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.116) = 9.225, P < 0,0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.135) = 2.85, P < 0.04	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.85) = 19.84, P < 0,0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.91) = 10.34, P < 0,0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.66) = 13.43, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.67) = 17.74, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.112) = 20.37, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.118) = 24.31, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.92) = 5.124, P < 0.0024; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.91) = 3.828, P < 0.0124	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.56) = 2.569, P < 0.0634; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.56) = 1.981, P < 0.1272	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.153) = 28.66, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.160) = 33.09, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.132) = 55.42, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.133) = 70.70, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.99) = 109.4, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.99) = 83.32, P < 0.0001
<b>Capa 4</b>	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.116) = 8.779, P < 0,0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.99) = 2.578, P < 0.05	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.85) = 13.41, P < 0,0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.91) = 11.17, P < 0,0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.66) = 8.321, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.64) = 24.55, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.112) = 24.78, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.118) = 13.38, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.92) = 4.667, P < 0.0044; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.91) = 1.811, P < 0.1507	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.56) = 5.014, P < 0.0038; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.56) = 1.936, P < 0.1342	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.153) = 24.18, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.160) = 32.14, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.129) = 66.75, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.130) = 51.53, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.102) = 52.79, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.108) = 31.25, P < 0.0001

<b>Capa 5</b>	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.116) = 11.89, P < 0,0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.99) = 5.871, P < 0.001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.85) = 6.512, P < 0,0005; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.91) = 14.15, P < 0,0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.66) = 10.26, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.64) = 20.16, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.112) = 1.849, P < 0.1425; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.118) = 1.747, P < 0.1613	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.91) = 6.624, P < 0.0004; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.91) = 4.917, P < 0.0033	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.56) = 11.11, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.56) = 6.730, P < 0.0006	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.153) = 24.26, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.160) = 22.93, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.129) = 52.39, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.130) = 42.08, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.102) = 41.56, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.103) = 51.58, P < 0.0001
<b>Capa 6</b>	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.116) = 3.240, P < 0.02; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.99) = 4.303, P < 0.006	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.85) = 1.538, P < 0.21; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.91) = 1.646, P < 0.18	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.66) = 1.308, P < 0.28; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.64) = 2.624, P < 0.05	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.112) = 3.088, P < 0.0301; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.118) = 0.9959, P < 0.3974	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.91) = 8.188, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.91) = 9.308, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.57) = 17.50, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (4.67) = 5.203, P < 0.0010	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.153) = 25.28, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.160) = 21.59, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.129) = 29.69, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.130) = 21.39, P < 0.0001	IL: ANOVA de 1 vía; F (3.102) = 46.62, P < 0.0001; CL: ANOVA de 1 vía, F (3.102) = 45.19, P < 0.0001



Estos resultados (Figura 10, 11, 12, 13, 14, 15, su estadística se muestra en la tabla 1) indicaron que PPX podría restaurar la expresión de la astrogliosis inducida por 6-OHDA en el asta dorsal de la médula espinal lumbar. Por el contrario, posterior a la administración de PPX 3 mg/kg, la inmunotinción de Iba1 no presentó cambios en el número de células, pero si en la morfología en las capas de la médula espinal L4-L6 30 días después de la lesión con 6-OHDA (Figuras 10, 11, 12, 13, 14 y 15, su estadística se muestra en la tabla 1).

Para determinar qué tipo celular incrementó la expresión de NFkB-p65 en el asta dorsal espinal L4-L6 de las ratas lesionadas con 6-OHDA, se realizó una triple tinción mediante el uso de anticuerpos específicos para NFkB-p65, GFAP e Iba1 (Figura 17). La intensidad de la fluorescencia y la cuantificación del número de inmunotinciones de GFAP, Iba1 y NFkB-p65 revelaron que los astrocitos, y la microglía, se activaron en el dorso espinal IL y CL (L4-L6), siguiendo a las ratas lesionadas con 6-OHDA la expresión de NFkB-p65 aumentó principalmente en astrocitos y en la microglía (Figura 17).

Treinta días después de la lesión de los animales con 6-OHDA se observó un aumento en el tamaño de los cuerpos celulares de microglía (Figura 18 y 19). Para determinar si PPX puede modular la activación de NFkB-p65 en células gliales (astrocitos y microglía) en animales lesionados con 6-OHDA, se analizaron células positivas para inmunotinción de NFkB-p65 en L4. Se realizó una triple tinción de NFkB-p65, GFAP e Iba-1 (Figura 18A-P) en el asta dorsal de la médula espinal L6 de las ratas con lesión de 6-OHDA (Figura 18A-P). La expresión de NFkB-p65 aumenta principalmente en astrocitos (Figura 19A4 y A4'), pero no en microglía (Figura 19B4 y B4').

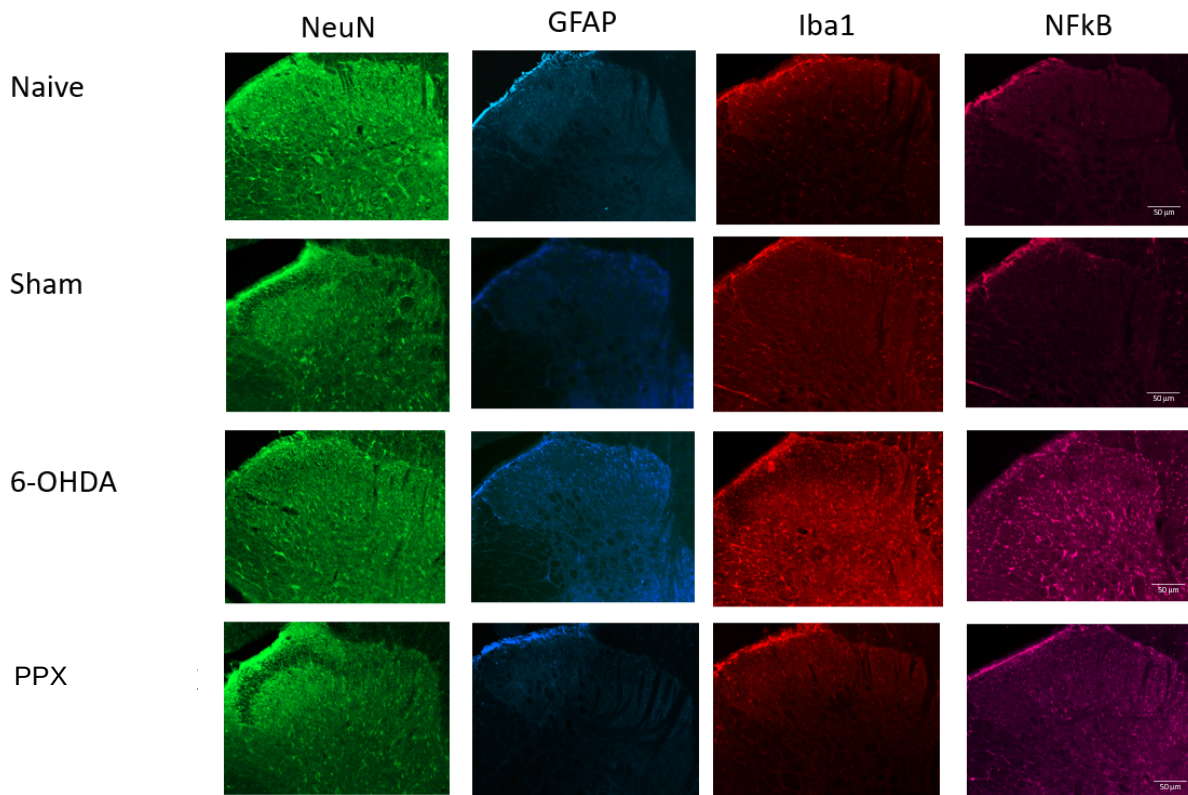


Figura 16. Fotomicrografías de epifluorescencia para NeuN, Iba1, GFAP y NFkB-p65 en el asta dorsal de la médula espinal lumbar. Grupos experimentales naïve, sham, 6-OHDA y PPX.

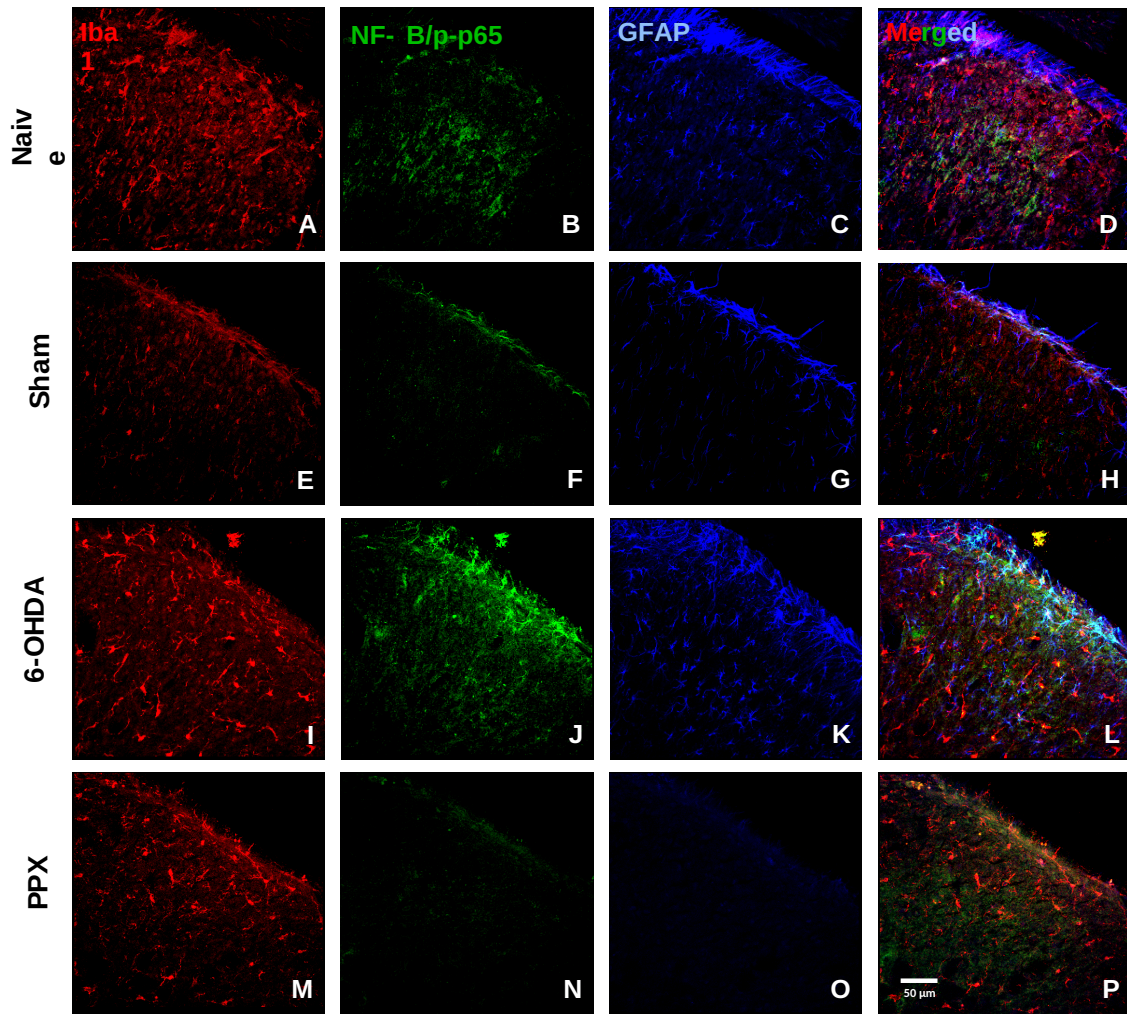


Figura 17. Fotomicrografías en microscopía confocal, representativas de secciones de el asta dorsal de la médula espinal lumbar L4-L6 por inmunofluorescencia, teñido para Iba1 (microglía) (A, E, I, M), GFAP (astrocitos) (C, G, K, O) y NFκB-p65 (B, F, J, N) al día 30 después de la lesión unilateral con 6-OHDA y lesiones subagudas (10 días) postratamiento con PPX (3 mg/kg/i.p./día) Se observan los efectos de 6-OHDA y PPX en la expresión de Iba1, GFAP y NFκB-p65. En el merged de las fotomicrografías, se muestra la colocalización de las células Iba1 y NFκB-p65 (H) y de las células GFAP y NFκB-p65 (H). Barra de escala = 50 μm.

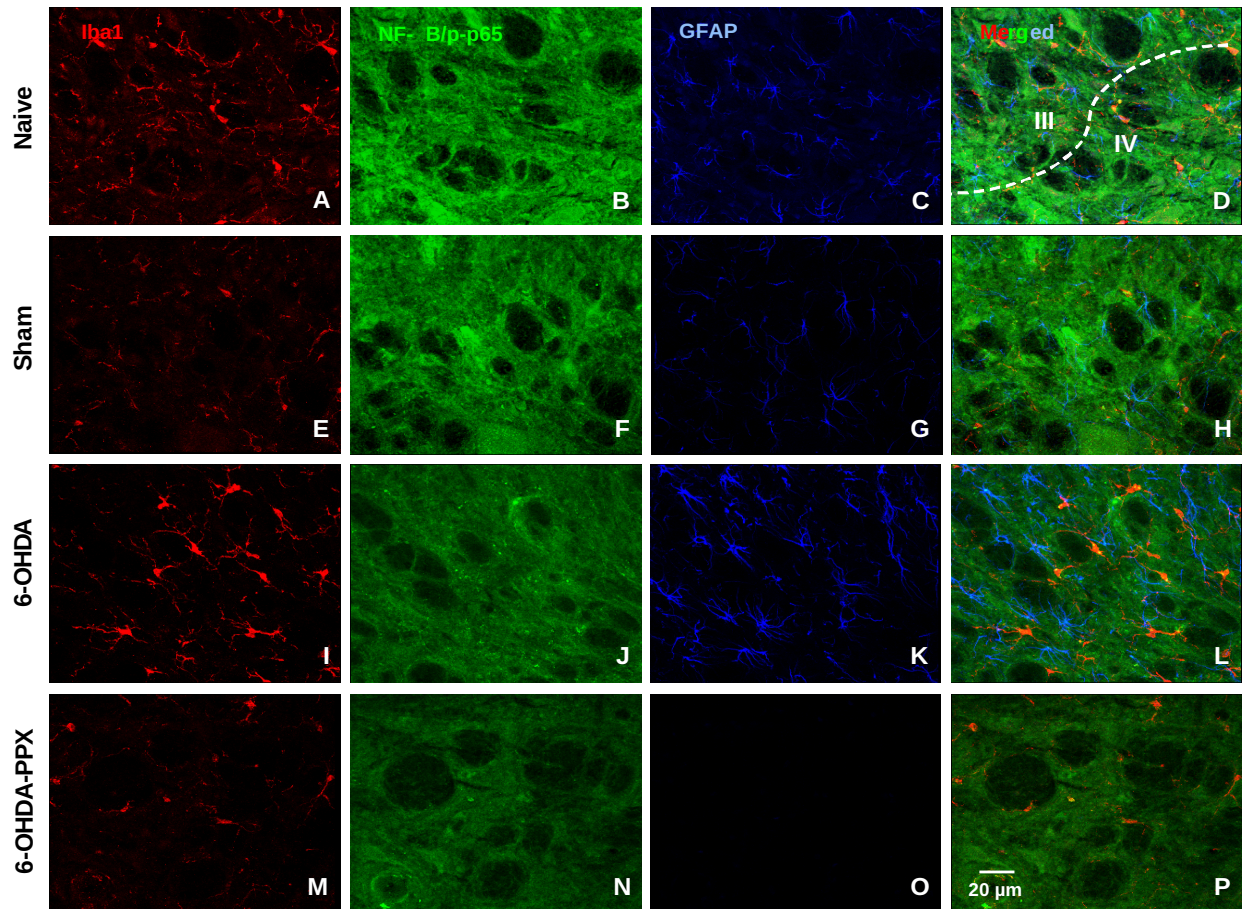


Figura 18. Amplificación de las capas III y IV del segmento L4 del cuerno de asta dorsal de la médula espinal lumbar. Las líneas discontinuas muestran la separación entre las capas en los grupos experimentales naïve, sham, 6-OHDA y 6-OHDA-PPX. Se notaron cambios morfológicos presentes en los cuerpos celulares que contienen Iba1 en los diferentes grupos (A, E, I, M); un aumento en el número de GFAP en el grupo 6-OHDA (K), y una disminución en el número de GFAP en el grupo 6-OHDA-PPX (O). En el merged (D, H, L, P) en el grupo 6-OHDA (L) se muestra la colocalización entre NFκB-p65 y GFAP; y proximidades entre NFκB-p65 e Iba1. Objetivo 25x, tamaño de la pila; X = 212.55 μm, Y = 212.55 μm y Z = 19 μm.



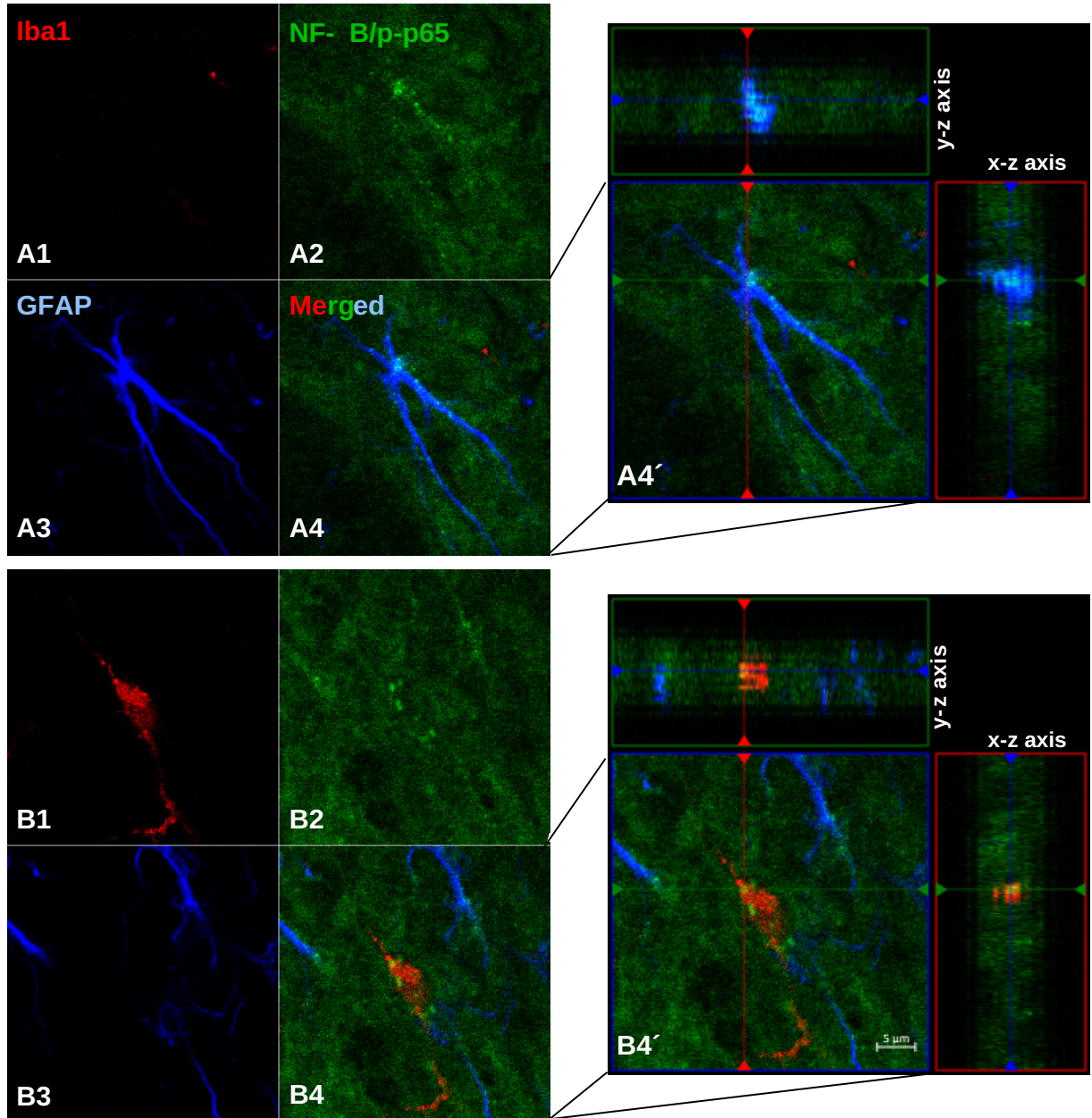


Figura 19. Imágenes representativas de 2 células (A, B) de 6-OHDA fusionada para Iba1 (A1, B1), NFκB-p65 (A2, B2) y GFAP (A3, B3); fusión y proyección ortogonal (A4, B4) en microscopia confocal. Los paneles en A4 muestran una vista ortogonal de todas las secciones ópticas; los planos xz y yz muestran la colocalización entre NFκB-p65 y GFAP. Los paneles en B4 muestran otra vista ortogonal de todas las secciones ópticas; los planos xz y yz no muestran colocalización, pero sí proximidad entre Iba1 y NFκB-p65. Barra de escala: 5  $\mu\text{m}$ .

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo, los resultados validan que la administración unilateral nigroestriatal en la SNpc con 6-OHDA (16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), promovió la degeneración de las neuronas dopaminérgicas generando alodinia táctil e hiperalgesia mecánica (Ungerstedt & Arbuthnott 1970; Gómez-Paz et al., 2018). En el conteo de neuronas positivas a TH por densidad óptica y neuronal nos muestran una disminución de alrededor del 80% de neuronas positivas a TH en las ratas que sufrieron la lesión con la 6-OHDA. A diferencia de otros modelos, el modelo 6-OHDA induce la muerte de neuronas dopaminérgicas en zonas específicas (Hernández-Baltazar, 2017), por ello es de los más utilizados y es adecuado para reproducir la EP (Mendieta et al., 2016, Kin et al., 2019). Además, este modelo resulta de utilidad para evaluar efectos de fármacos antiparkinsonianos como levodopa y PPX.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que la lesión unilateral con 6-OHDA en la SNpc afecta la vía dopaminérgica nigroestriatal, promoviendo el desarrollo de las sensaciones dolorosas como la alodinia y la hiperalgesia (Romero-Sánchez et al., 2020).

La deficiencia motora se evaluó con pruebas motoras como la conducta de giro a los 15 días y prueba de cilindro a los 14 días posteriores a la lesión. Dichas pruebas fueron realizadas para examinar los efectos del daño derivado de la lesión, así como confirmar la manifestación de la EP. Se contaron los giros y se determinó la asimetría de uso de las extremidades anteriores por medio de las pruebas de comportamiento rotacional y cilindro respectivamente. En la conducta de giros se vieron aumentadas significativamente las rotaciones CL inducidas por la administración subcutánea de apomorfina, obteniendo un promedio de  $492.15 \pm 7.62$  giros en 1 hora en el grupo 6-OHDA (Figura 2). Lo anterior, coincide con lo descrito por Ungerstedt y Arbuthnott sobre la pérdida dopaminérgica (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970).

La prueba del cilindro es otra prueba motora en la que a los 14 días posteriores a la lesión se observa un incremento en el uso de la pata IL dentro de los 5 minutos de

análisis en ratas a las que se les generó la lesión con 6-OHDA. En contraste, en ratas sham el uso de la pata CL fue mayor (Figura 3). Nuestros datos concuerdan con lo descrito por Mendieta y colaboradores (Mendieta et al., 2009; Schallert, 2006).

La administración intraperitoneal subaguda de PPX 1 y 3 mg/kg (10 días) como tratamiento, aumentó el 50% de la respuesta del umbral de retirada de la pata (Figuras 4, 6A, 6B) y redujo el número de respuestas de retirada de la pata a la aplicación del filamento de von Frey (26 g) en ambas patas (Figuras 5, 6C, 6D), lo que demuestra que el PPX, a las dos concentraciones evaluadas, revierte la alodinia táctil e hiperalgesia mecánica en un modelo animal de EP.

El tratamiento con PPX ha sido evaluado en diferentes modelos de dolor; por ejemplo, se encontró que el postratamiento sistémico con PPX reduce la hiperalgesia mecánica y la alodinia táctil inducida por formalina (Edwards et al., 2022; Santamaría-Anzures et al., 2023). El postratamiento intraperitoneal con PPX aumentó la latencia de retirada de la pata ante la estimulación térmica (Cao et al., 2016). La administración repetida de PPX (4 días) bloquea la alodinia mecánica y térmica inducida por reserpina en ratones (Martins et al., 2022). En conjunto, estos datos sugieren que el postratamiento sistémico con PPX revierte la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica, inducida por reserpina en ratones, que presentan un dolor inflamatorio de larga duración y en la fibromialgia (Martins et al., 2022). En modelos con 6-OHDA, el PPX también ha sido estudiado, por ejemplo el postratamiento subcutáneo con PPX (10 días) revirtió la alodinia táctil y la hiperalgesia mecánica (Romero-Sánchez et al., 2020).

El modelo de la EP con 6-OHDA, además de demostrar una pérdida de neuronas dopaminérgicas a través de disminuir la expresión de TH y de inducir signos como la alodinia y la hiperalgesia, genera un aumento de células gliales. Estudios previos han demostrado que lesiones al SNC o periférico producen un aumento de células gliales como astrocitos y microglía en la médula espinal (L4-L5) en diferentes modelos de dolor preclínico (Romero-Sandoval & Sweitzer, 2015). En un modelo de dolor neuropático, se produjo la expresión de citocinas inflamatorias y el aumento

de Iba1 inducido por lesión nerviosa en el asta dorsal de la médula espinal L4 (Koshimizu et al., 2020).

La neuroinflamación está asociada con enfermedades neurodegenerativas como la EP; ya que la microglía y los astrocitos son reguladores claves de las respuestas inflamatorias en el sistema nervioso (Kwon & Koh, 2020). Aunque la glía es esencial para la homeostasis en el SNC (Schwartz et al., 2013; Wyss-Coray y Mucke, 2002), también la expresión de la microglía y los astrocitos se clasifica como neurotóxica y su disfunción contribuye a la neurodegeneración de muchas enfermedades incluyendo la EP (Kam et al., 2020). Se ha demostrado que muchos de los genes relacionados con la EP también se expresan en células gliales y en neuronas (Booth et al., 2017; Zhang et al., 2016) y hay evidencia de que las disfunciones microgliales y astrocíticas contribuyen a la patogénesis y progresión de la EP. En un modelo estriatal de la EP, los animales inyectados con 6-OHDA mostraron un aumento en GFAP inmunoreactivo y células Iba1 positivas en comparación con animales control, 14 días después de la lesión (Campos et al., 2021).

Por lo tanto, es necesario abordar la respuesta inflamatoria centrándonos en las contribuciones de la microglía y los astrocitos. En nuestro estudio, se observó un incremento en el número de células positivas para GFAP, lo cual no se observó para la proteína Iba1, en células de el asta dorsal de la médula espinal L4-L6, expresándose con la misma intensidad de la capa 1 a la capa 6 en ratas lesionadas con 6-OHDA (Figuras 10,11, 12, 13, 14, 15, su estadística se muestra en la tabla 1), lo que puede implicar astrogliosis.

En un modelo de dolor neuropático, se demostró microgliosis espinal después de una lesión del nervio periférico y la microgliosis aumentó a los 2 y 3 días alcanzando niveles máximos en 4 a 7 días (Chen et al., 2018; Echeverry et al., 2008). De igual manera, al día 7 postcirugía con 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratas macho, hay un mayor número de células que expresan Iba1 (Patricio et al., 2019), lo que sugiere una proliferación de la microglía en las primeras etapas del dolor y esta no permanece activa de manera subcrónica, lo que nos indica que la relación entre células microgliales activadas puede cambiar en función de la progresión de la



enfermedad neurodegenerativa. En otro estudio, Hong Mei Wang et al. en el 2013 demostró que las lesiones con 6-OHDA generan un aumento en la expresión de astrocitos. En cultivos primarios de astrocitos corticales de ratas Sprague-Dawley se observa un mayor número de células de GFAP a la dosis de 30, 100 y 200  $\mu$ m de 6-OHDA. Los astrocitos tienen un papel importante en el proceso de dolor persistente (Li Yunze et al., 2020). Esta evidencia podría respaldar nuestro resultado, dado que la inmunofluorescencia de células que expresan GFAP e Iba1 se procesaron 30 días después de la lesión con 6-OHDA (Figura 16) y se correlacionó con la presencia de alodinia e hiperalgesia en ratas con EP. Park y sus colaboradores no observaron ningún cambio en los astrocitos y la microglía de las astas dorsales en la médula espinal después del tratamiento con 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP) (Park Jihye et al., 2015). Sin embargo, Mi Eun Kim et al. en 2016 demostraron la expresión glial en el modelo del EP inducido por MPTP y se observó una reducción de astrocitos tras la administración de PPX 1 mg/kg/s.c., la que no se detecta en la microglía. Marcadores relacionados con la neuroinflamación como GFAP, Iba1 y NFkB-p65 se han visto aumentados posterior a la administración de MPTP (Lee et al., 2022). La discrepancia entre estos resultados y nuestros hallazgos (Figura 17) probablemente se deba al modelo de EP estudiado: i) 6-OHDA frente a MPTP, así como ii) tiempo posterior a la lesión nigroestriatal 30 días frente a 14 días. Para una mejor comprensión de los roles de la microglía y los astrocitos en enfermedades neurodegenerativas es esencial desarrollar terapias efectivas. La expresión de NFkB-p65, guarda relación con la respuesta inflamatoria, y se ha visto implicada en diferentes tipos de células como las células gliales en modelos de dolor. La expresión astrocítica podría deberse a la activación de la vía NFkB-p65. Yunze Li et al., 2020 demostraron una regulación positiva de NFkB-p65 en un modelo de rata con osteoartritis.

La microglía es una célula capaz de modificar su morfología en función de los estímulos que recibe de su entorno. En condiciones normales, la microglía tiene una forma muy ramificada con un cuerpo celular pequeño. Mientras que, cuando existe un estímulo patológico, la microglía cambia rápidamente su morfología, acortando sus ramas y agrandando su cuerpo celular (Green et al., 2022; Tam et al., 2014). En

el presente trabajo se muestran imágenes de microglía en ratas naïve y sham, donde su morfología es muy ramificada, y sus membranas son las que mayor fluorescencia presentan (Figura 18). Los animales lesionados por 6-OHDA mostraron un cambio en la morfología, los cuerpos celulares de la microglía aumentaron de tamaño y disminuyeron sus procesos a una forma de microglía hipertrófica (Figura 19), también llamada microglía activa o microglía hiperreactiva (Savage et al., 2019). En esta forma activa, la microglía aumenta su capacidad de fagocitar, así como de producir citocinas proinflamatorias (Woodburn et al., 2021). Esta activación de la microglía puede ocurrir debido a la presencia de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, entre otras, liberadas por neuronas o astrocitos. Esta capacidad de modificar su morfología se ha observado en la EP a nivel supraespinal en los núcleos relacionados con la producción y liberación de dopamina (Au y Ma, 2017; Doorn et al., 2014; Tejera y Heneka, 2019). La novedad de este estudio es que también se observa un cambio morfológico de la microglía a nivel de las capas superficiales y profundas del asta dorsal de la médula espinal, principalmente donde se encuentran las fibras aferentes primarias responsables de la transmisión de información nociceptiva.

Una mejor comprensión de las funciones de la microglía y los astrocitos en la EP puede proporcionar conocimientos sobre la neurodegeneración y nuevos enfoques terapéuticos para la EP. En nuestro estudio, observamos la activación de la vía NFkB-p65 tras la administración de 6-OHDA, la cual se vio disminuida tras la administración de PPX 3 mg/kg/i.p., lo que nos indica que la vía de NFkB-p65 podría ser un posible mecanismo de acción del PPX.

## 10. CONCLUSIONES

1. La administración intraperitoneal de PPX 1 y 3 mg/kg, disminuyó la alodinia y la hiperalgesia en animales con la EP inducida por la lesión con 6-OHDA (16 µg/µl).
2. La alodinia y la hiperalgesia en animales con la EP van acompañadas de la activación de células gliales como astrocitos y microglía en el asta dorsal de la medula espinal L4-L6, 30 días posteriores a la inyección de 6-OHDA.
3. PPX disminuye la alodinia y la hiperalgesia reduciendo la activación de astrocitos y microglía, posiblemente, a través de la modulación de la vía NFκB-p65 en el asta dorsal de la medula espinal L4-L6 en animales con la EP inducida por la lesión con 6-OHDA.

## 11. REFERENCIAS

1. Antonini, A., Tinazzi, M., Abbruzzese, G., Berardelli, A., Chaudhuri, K. R., Defazio, G., Ferreira, J., Martinez-Martin, P., Trenkwalder, C., & Rascol, O. (2018). Pain in Parkinson's disease: Facts and uncertainties. *European Journal of Neurology*, 25(7), 917-e69.
2. Arslan, D. B., Gurvit, H., Genc, O., Kicik, A., Eryurek, K., Cengiz, S., Erdogdu, E., Yildirim, Z., Tufekcioglu, Z., Uluğ, A. M., Bilgic, B., Hanagasi, H., Tuzun, E., Demiralp, T., & Ozturk-Isik, E. (2020). The cerebral blood flow deficits in Parkinson's disease with mild cognitive impairment using arterial spin labeling MRI. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 127(9), 1285–1294.
3. Au, N. P. B., & Ma, C. H. E. (2017). Recent Advances in the Study of Bipolar/Rod-Shaped Microglia and their Roles in Neurodegeneration. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 128.
4. Beal, M. F. (2001). Experimental models of Parkinson's disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(5), 325–334.
5. Beaulieu, J.M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 182–217.

6. Bedarf, J. R., Hildebrand, F., Goeser, F., Bork, P., & Wüllner, U. (2019). [The gut microbiome in Parkinson's disease]. *Der Nervenarzt*, 90(2), 160–166.
7. Beiske, A. G., Loge, J. H., Rønningen, A., & Svensson, E. (2009). Pain in Parkinson's disease: Prevalence and characteristics. *Pain*, 141(1–2), 173–177.
8. Beitz, J. M. (2014). Parkinson's disease: A review. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 6(1), 65–74.
9. Björklund, A., & Dunnett, S. B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: An update. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 194–202.
10. Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W.-H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E. J., & Bethea, J. R. (2005). Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(1), 145–156.
11. Broen, M. P. G., Braaksma, M. M., Patijn, J., & Weber, W. E. J. (2012). Prevalence of pain in Parkinson's disease: A systematic review using the modified QUADAS tool. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 27(4), 480–484.
12. Booth HDE, Hirst WD, Wade-Martins R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci*. 2017 Jun;40(6):358-370.
13. Buhmann, C., Kassubek, J., & Jost, W. H. (2020). Management of Pain in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 10(s1), S37–S48.
14. Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81(2), 229–248.
15. Campos ACP, Berzuíno MB, Barbosa GR, Freire HMRC, Lopes PS, Assis DV, Fonoff ET, Pagano RL. Motor Cortex Stimulation Reversed Hypernociception, Increased Serotonin in Raphe Neurons, and Caused Inhibition of Spinal Astrocytes in a Parkinson's Disease Rat Model. *Cells*. 2021 May 11;10(5):1158.
16. Cao, L.F., Peng, X.Y., Huang, Y., Wang, B., Zhou, F.M., Cheng, R.X., Chen, L.H., Luo, W.F., Liu, T., 2016. Restoring Spinal Noradrenergic Inhibitory Tone Attenuates Pain Hypersensitivity in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neural Plast* 2016.
17. Carlton, S. M., Du, J., Tan, H. Y., Nesic, O., Hargett, G. L., Bopp, A. C., Yamani, A., Lin, Q., Willis, W. D., & Hulsebosch, C. E. (2009). Peripheral and central sensitization in remote spinal cord regions contribute to central neuropathic pain after spinal cord injury. *Pain*, 147(1–3), 265–276.

18. Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., & Yaksh, T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, 53(1), 55–63.
19. Chaudhuri, K. R., & Odin, P. (2010). The challenge of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Progress in Brain Research*, 184, 325–341.
20. Chen, G., Zhang, Y.Q., Qadri, Y.J., Serhan, C.N., Ji, R.R., 2018. Microglia in Pain: Detrimental and Protective Roles in Pathogenesis and Resolution of Pain. *Neuron* 100, 1292–1311.
21. Doorn, K. J., Goudriaan, A., Blits-Huizinga, C., Bol, J. G., Rozemuller, A. J., Hoogland, P. V., Lucassen, P. J., Drukarch, B., van de Berg, W. D., & van Dam, A. M. (2014). Increased amoeboid microglial density in the olfactory bulb of Parkinson's and Alzheimer's patients. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 24(2), 152–165.
22. Echeverry, S., Shi, X.Q., Zhang, J., 2008. Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain. *Pain* 135, 37–47.
23. Edwards, S., Callicoaate, C.N., Barattini, A.E., Cucinello-Ragland, J.A., Melain, A., Edwards, K.N., Gilpin, N.W., Avegno, E.M., Pahng, A.R., 2022. Pramipexole treatment attenuates mechanical hypersensitivity in male rats experiencing chronic inflammatory pain.
24. Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research*, 25(9-10), 1439–1451.
25. Engels, G., Vlaar, A., McCoy, B., Scherder, E., & Douw, L. (2018). Dynamic Functional Connectivity and Symptoms of Parkinson's Disease: A Resting-State fMRI Study. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 388.
26. Fahn, S. (2008). The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 23 Suppl 3, S497-508.
27. Faivre, F., Joshi, A., Bezard, E., & Barrot, M. (2019). The hidden side of Parkinson's disease: Studying pain, anxiety and depression in animal models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 96, 335–352.
28. Faramarzi, G., Zendehtdel, M., & Haghparast, A. (2016). D1- and D2-like dopamine receptors within the nucleus accumbens contribute to stress-induced analgesia in formalin-related pain behaviours in rats. *European Journal of Pain (London, England)*, 20(9), 1423–1432.

29. Fernandes, A., Miller-Fleming, L., & Pais, T. F. (2014). Microglia and inflammation: Conspiracy, controversy or control? *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 71(20), 3969–3985.
30. Frost JL, Schafer DP. Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends Cell Biol.* 2016 Aug;26(8):587-597.
31. Fu KY, Light AR, Maixner W. Long-lasting inflammation and long-term hyperalgesia after subcutaneous formalin injection into the rat hindpaw. *J Pain.* 2001 Feb;2(1):2-11.
32. Geroin, C., Gandolfi, M., Bruno, V., Smania, N., & Tinazzi, M. (2016). Integrated Approach for Pain Management in Parkinson Disease. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 16(4), 28.
33. Gingrich, J. A., & Caron, M. G. (1993). Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 16, 299–321.
34. Gómez-Paz, A., Drucker-Colín, R., Milán-Aldaco, D., Palomero-Rivero, M., Ambriz-Tututi, M., 2018. Intrastriatal Chromospheres' Transplant Reduces Nociception in Hemiparkinsonian Rats. *Neuroscience* 387, 123–134.
35. Green, T. R. F., Murphy, S. M., & Rowe, R. K. (2022). Comparisons of quantitative approaches for assessing microglial morphology reveal inconsistencies, ecological fallacy, and a need for standardization. *Scientific reports*, 12(1), 18196.
36. Haddad, M., Pud, D., Treister, R., Suzan, E., & Eisenberg, E. (2018). The effects of a dopamine agonist (apomorphine) on experimental and spontaneous pain in patients with chronic radicular pain: A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *PloS One*, 13(4), e0195287.
37. Hains, B. C., Everhart, A. W., Fullwood, S. D., & Hulsebosch, C. E. (2002). Changes in serotonin, serotonin transporter expression and serotonin denervation supersensitivity: Involvement in chronic central pain after spinal hemisection in the rat. *Experimental Neurology*, 175(2), 347–362.
38. Hartung, J. E., Eskew, O., Wong, T., Tchivileva, I. E., Oladosu, F. A., O'Buckley, S. C., Nackley, A. G. (2015). Nuclear factor-kappa B regulates pain and COMT expression in a rodent model of inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 50, 196–202.
39. Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 132(3), 344–362.

40. Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M., & Villanueva-Olivo, A. (2017). The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 32(8), 533–539.
41. Hong Mei Wang, Zhang T, Li Q, Huang JK, Chen RF, Sun XJ. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  by lithium chloride suppresses 6-hydroxydopamine-induced inflammatory response in primary cultured astrocytes. *Neurochem Int.* 2013 Nov;63(5):345-53.
42. IASP Subcommittee on Taxonomy. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain* 1979;6:249–52.
43. 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 Neuropathologica*, 106(6), 518–526.
44. Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S., 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain research. Molecular brain research*, 57(1), 1–9.
45. Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C., & Caron, M. G. (1996). Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*, 35(11), 1503–1519.
46. Kaltschmidt, B., Widera, D., & Kaltschmidt, C. (2005). Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1745(3), 287–299.
47. Kam, T.-I., Hinkle, J. T., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2020). Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 144, 105028.
48. Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553.
49. Kıçık, A., Tüzün, E., Erdoğan, E., Bılgıç, B., Tüfekçioğlu, Z., Öztürk-İşik, E., Hanağasi, H., & Gürvit, H. (2020). Neuroinflammation Mediators are Reduced in Sera of Parkinson's Disease Patients with Mild Cognitive Impairment. *Noro Psikiyatri Arsivi*, 57(1), 15–17.

50. Kin, K., Yasuhara, T., Kameda, M., Date, I. (2019) Animal models for Parkinson's disease research: trends in the 2000s. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (21), 5402.
51. Ko, J. H., & Strafella, A. P. (2012). Dopaminergic neurotransmission in the human brain: New lessons from perturbation and imaging. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 18(2), 149–168.
52. Koshimizu H, Ohkawara B, Nakashima H, Ota K, Kanbara S, Inoue T, Tomita H, Sayo A, Kiryu-Seo S, Konishi H, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Imagama S, Kiyama H, Ohno K. Zonisamide ameliorates neuropathic pain partly by suppressing microglial activation in the spinal cord in a mouse model. *Life Sci*. 2020 Dec 15;263:118577.
53. Kwon, H. S., & Koh, S.-H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration*, 9, 42.
54. Lee HJ, Choe K, Park JS, Khan A, Kim MW, Park TJ, Kim MO. O-Cyclic Phytosphingosine-1-Phosphate Protects against Motor Dysfunctions and Glial Cell Mediated Neuroinflammation in the Parkinson's Disease Mouse Models. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Oct 26;11(11):2107.
55. Lee, M. (2013). Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation. *Current Protein & Peptide Science*, 14(1), 21–32.
56. LeWitt, P. A. (2015). Levodopa therapy for Parkinson's disease: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 30(1), 64–72.
57. Li, Y., Yang, Y., Guo, J., Guo, X., Feng, Z., Zhao, X., 2020. Spinal NF- $\kappa$ B upregulation contributes to hyperalgesia in a rat model of advanced osteoarthritis. *Mol Pain* 16.
58. Logan, T. T., Villapol, S., & Symes, A. J. (2013). TGF- $\beta$  superfamily gene expression and induction of the Runx1 transcription factor in adult neurogenic regions after brain injury. *PloS One*, 8(3), e59250.
59. Martins, C., Paes, R., Baldasso, G., Ferrarini, E., Scussel, R., Zaccaron, R., Machado-De-Avila, R., Lock Silveira, P., Dutra, R., 2022. Pramipexole, a dopamine D3/D2 receptor-preferring agonist, attenuates reserpine-induced fibromyalgia-like model in mice. *Neural Regen Res* 17, 450–458.



60. Mendieta, L., Granado, N., Aguilera, J., Tizabi, Y., & Moratalla, R. (2016). Fragment C Domain of Tetanus Toxin Mitigates Methamphetamine Neurotoxicity and Its Motor Consequences in Mice. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19(8), pyw021.
61. Mendieta, L., Venegas, B., Moreno, N., Patricio, A., Martínez, I., Aguilera, J., & Limón, I. D. (2009). The carboxyl-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin prevents dopaminergic degeneration and improves motor behavior in rats with striatal MPP (+)-lesions. *Neuroscience Research*, 65(1), 98–106.
62. Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*, 78(1), 189–225.
63. Mittelbronn M, Dietz K, Schluessener HJ, Meyermann R. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol*. 2001 Mar;101(3):249-55.
64. Mylius, V., Lloret, S.P., Cury, R.G., Teixeira, M.J., Barbosa, V.R., Barbosa, E.R., Moreira, L.I., Listik, C., Fernandes, A.M., de Lacerda Veiga, D., Barbour, J., Hollenstein, N., Oechsner, M., Walch, J., Brugger, F., Hägele-Link, S., Beer, S., Rizos, A., Chaudhuri, K.R., Bouhassira, D., Lefaucheur, J.P., Timmermann, L., Gonzenbach, R., Kägi, G., Möller, J.C., de Andrade, D.C., 2021. The Parkinson disease pain classification system: results from an international mechanism-based classification approach. *Pain* 162, 1201–1210.
65. Nagatsu, T., & Sawada, M. (2005). Inflammatory process in Parkinson's disease: Role for cytokines. *Current Pharmaceutical Design*, 11(8), 999–1016.
66. Nègre-Pagès, L., Regragui, W., Bouhassira, D., Grandjean, H., Rascol, O., & DoPaMiP Study Group. (2008). Chronic pain in Parkinson's disease: The cross-sectional French DoPaMiP survey. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 23(10), 1361–1369.
67. Nestic, O., Lee, J., Johnson, K. M., Ye, Z., Xu, G.-Y., Unabia, G. C., Wood, T. G., McAdoo, D. J., Westlund, K. N., Hulsebosch, C. E., & Regino Perez-Polo, J. (2005). Transcriptional profiling of spinal cord injury-induced central neuropathic pain. *Journal of Neurochemistry*, 95(4), 998–1014.
68. O'Dowd, B. F. (1993). Structures of dopamine receptors. *Journal of Neurochemistry*, 60(3), 804–816.

69. Pais, T. F., & Chatterjee, S. (2005). Brain macrophage activation in murine cerebral malaria precedes accumulation of leukocytes and CD8+ T cell proliferation. *Journal of Neuroimmunology*, 163(1–2), 73–83.
70. Park, J., Lim, C.S., Seo, H., Park, C.A., Zhuo, M., Kaang, B.K., Lee, K., 2015. Pain perception in acute model mice of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Mol Pain* 11.
71. Patricio, F., Parra, I., Martínez, I., Pérez-Severiano, F., Montes, S., Aguilera, J., Limón, I.D., Tizabi, Y., Mendieta, L., 2019. Effectiveness of Fragment C Domain of Tetanus Toxin and Pramipexole in an Animal Model of Parkinson's Disease. *Neurotox Res* 35, 699–710.
72. Paxinos, G., Watson, C., 2009. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier.
73. Paxinos, G., Watson, C., 2013. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 7 th. ed. Elsevier.
74. Raasch, J., Zeller, N., van Loo, G., Merkler, D., Mildner, A., Erny, D., Knobloch, K.-P., Bethea, J. R., Waisman, A., Knust, M., Del Turco, D., Deller, T., Blank, T., Priller, J., Brück, W., Pasparakis, M., & Prinz, M. (2011). IkappaB kinase 2 determines oligodendrocyte loss by non-cell-autonomous activation of NF-kappaB in the central nervous system. *Brain: A Journal of Neurology*, 134(Pt 4), 1184–1198.
75. Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, Keefe FJ, Mogil JS, Ringkamp M, Sluka KA, Song XJ, Stevens B, Sullivan MD, Tutelman PR, Ushida T, Vader K. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 2020 Sep 1;161(9):1976-1982.
76. Ramazani, E., Tayarani-Najaran, Z., & Fereidoni, M. (2019). Celecoxib, indomethacin, and ibuprofen prevent 6-hydroxydopamine-induced PC12 cell death through the inhibition of NFkB and SAPK/JNK pathways. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(5), 477–484.
77. Romero-Sánchez, H. A., Mendieta, L., Austrich-Olivares, A. M., Garza-Mouriño, G., Benitez-Diaz Mirón, M., Coen, A., & Godínez-Chaparro, B. (2020). Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway with 6-OHDA induced allodynia and hyperalgesia reverted by pramipexol in rats. *European Journal of Pharmacology*, 869, 172814.
78. Romero-Sandoval Alfonso, E., & Sweitzer, S. (2015). Nonneuronal central mechanisms of pain: Glia and immune response. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 131, 325–358.

79. Sadeghi, H., Parishani, M., Akbartabar Touri, M., Ghavamzadeh, M., Jafari Barmak, M., Zarezade, V., Delaviz, H., & Sadeghi, H. (2017). Pramipexole reduces inflammation in the experimental animal models of inflammation. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 39(2), 80–86.
80. Sakaue, G., Shimaoka, M., Fukuoka, T., Hiroi, T., Inoue, T., Hashimoto, N., Sakaguchi, T., Sawa, Y., Morishita, R., Kiyono, H., Noguchi, K., & Mashimo, T. (2001). NF-kappa B decoy suppresses cytokine expression and thermal hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *Neuroreport*, 12(10), 2079–2084.
81. Santamaria-Anzures, J., Pérez-Ramos, J., Mendoza-Pérez, F., Godínez-Chaparro, B., 2023. Pramipexole inhibits formalin-induced acute and long-lasting mechanical hypersensitivity via NF-kB pathway in rats. *Drug Dev Res*.
82. Savage, J. C., Carrier, M., & Tremblay, M. È. (2019). Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2034, 13–26.
83. Schallert, T. (2006). Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 3(4), 497–504.
84. Schwartz M, Kipnis J, Rivest S, Prat A. How do immune cells support and shape the brain in health, disease, and aging? *J Neurosci*. 2013 Nov 6;33(45):17587-96.
85. Seeman, P., & Guan, H.C. (2009). Glutamate agonist LY404,039 for treating schizophrenia has affinity for the dopamine D2(High) receptor. *Synapse* (New York, N.Y.), 63(10), 935–939.
86. Sibley, D. R., Monsma, F. J., & Shen, Y. (1993). Molecular neurobiology of dopaminergic receptors. *International Review of Neurobiology*, 35, 391–415.
87. Singh, S., Jamwal, S., & Kumar, P. (2017). Neuroprotective potential of Quercetin in combination with piperine against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Neural Regeneration Research*, 12(7), 1137–1144.
88. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010 Jan;119(1):7-35.
89. Sunahara, R. K., Niznik, H. B., Weiner, D. M., Stormann, T. M., Brann, M. R., Kennedy, J. L., Gelernter, J. E., Rozmahel, R., Yang, Y. L., & Israel, Y. (1990). Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature*, 347(6288), 80–83.

90. Szénási, G., Vegh, M., Szabo, G., Kertesz, S., Kapus, G., Albert, M., Greff, Z., Ling, I., Barkoczy, J., Simig, G., Spedding, M., & Harsing, L. G. (2008). 2,3-benzodiazepine-type AMPA receptor antagonists and their neuroprotective effects. *Neurochemistry International*, 52(1–2), 166–183.
91. Tam, W. Y., & Ma, C. H. (2014). Bipolar/rod-shaped microglia are proliferating microglia with distinct M1/M2 phenotypes. *Scientific reports*, 4, 7279.
92. Tejera, D., & Heneka, M. T. (2019). Microglia in Neurodegenerative Disorders. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2034, 57–67.
93. Tesfaw, G., Ayano, G., Awoke, T., Assefa, D., Birhanu, Z., Miheretie, G., & Abebe, G. (2016). Prevalence and correlates of depression and anxiety among patients with HIV on-follow up at Alert Hospital, Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Psychiatry*, 16(1), 368.
94. Tian, G., Luo, X., Tang, C., Cheng, X., Chung, S. K., Xia, Z., Cheung, C. W., & Guo, Q. (2017). Astrocyte contributes to pain development via MMP2-JNK1/2 signaling in a mouse model of complex regional pain syndrome. *Life Sciences*, 170, 64–71.
95. Tiemann, L., Heitmann, H., Schulz, E., Baumkötter, J., & Ploner, M. (2014). Dopamine precursor depletion influences pain affect rather than pain sensation. *PloS One*, 9(4), e96167.
96. Truini, A., Frontoni, M., & Cruccu, G. (2013). Parkinson's disease related pain: A review of recent findings. *Journal of Neurology*, 260(1), 330–334.
97. Ungerstedt, U., & Arbuthnott, G. W. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Research*, 24(3), 485–493.
98. Wirenfeldt, M., Babcock, A. A., Ladeby, R., Lambertsen, K. L., Dagnaes-Hansen, F., Leslie, R. G. Q., Owens, T., & Finsen, B. (2005). Reactive microgliosis engages distinct responses by microglial subpopulations after minor central nervous system injury. *Journal of Neuroscience Research*, 82(4), 507–514.
99. Woodburn, S. C., Bollinger, J. L., & Wohleb, E. S. (2021). The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress. *Journal of neuroinflammation*, 18(1), 258.
100. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron*. 2002 Aug 1;35(3):419-32.

101. Xu, J., Zhu, M.D., Zhang, X., Tian, H., Zhang, J.H., Wu, X.B., Gao, Y.J. (2014). NF $\kappa$ B-mediated CXCL1 production in spinal cord astrocytes contributes to the maintenance of bone cancer pain in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 38.
102. Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, Caneda C, Plaza CA, Blumenthal PD, Vogel H, Steinberg GK, Edwards MS, Li G, Duncan JA 3rd, Cheshier SH, Shuer LM, Chang EF, Grant GA, Gephart MG, Barres BA. Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron*. 2016 Jan 6;89(1):37-53.
103. Zengin-Toktas, Y., Ferrier, J., Durif, F., Llorca, P.-M., & Authier, N. (2013). Bilateral lesions of the nigrostriatal pathways are associated with chronic mechanical pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience Research*, 76(4), 261–264.
104. Zhou L, Hu Y, Li C, Yan Y, Ao L, Yu B, Fang W, Liu J, Li Y. Levo-corydalmine alleviates vincristine-induced neuropathic pain in mice by inhibiting an NF-kappa B-dependent CXCL1/CXCR2 signaling pathway. *Neuropharmacology*. 2018 Jun; 135:34-47.