

# Avances en la investigación preclínica del dominio C-Terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica en enfermedades neurodegenerativas

Parra Irving, Martínez Isabel, Luna Félix, Alatríste Victorino, Limón Daniel, Mendieta Liliana

<sup>1</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

**Correspondencia:** Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 4 Sur Num. 104; Col. Centro C.P. 72000; Puebla de Zaragoza, Puebla, México

**E mail:** liliana.martinezmen@correo.buap.mx

Recibido 17-septiembre-2019

Aceptado 20-diciembre-2019

Publicado 8-mayo-2020

## Resumen

La toxina tetánica es un polipéptido de 1315 aminoácidos que pesa 150 kDa, de la cual, se extrae una fracción no tóxica de 50 kDa que tiene la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica y viaja de forma retro axonal y realiza saltos sinápticos. Estudios *in vivo* e *in vitro* indican que el dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica (H<sub>C</sub>-TeTx) tiene propiedades neuromoduladoras, neuroprotectoras y antiapoptóticas por lo que existen grandes expectativas sobre su posible empleo en la terapéutica.

**Palabras clave:** H<sub>C</sub>-TeTx, metanfetamina, neurodegeneración, neuroprotección, enfermedad de Parkinson.

2020, Parra I., et al.. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Creative Commons Attribution License CC BY 4.0 International NC, que permite el uso, la distribución y la reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se acredite el autor original y la fuente.

# Advances in preclinical research of the C-Terminal domain of the heavy chain of the tetanic toxin in neurodegenerative diseases

## Abstract

*Tetanus toxin* is a polypeptide of 1315 aminoacids of 150 kDa, from which a non-toxic fraction of 50 kDa is extracted that has the ability to cross the blood brain barrier through mechanisms that full-length toxin, have developed to throughout its evolution. We refer to axonal retrograde trip and synaptic jumps. Studies indicate that the C-terminal domain of the *tetanus toxin* heavy chain, *in vivo* and *in vitro*, has neuromodulatory, neuroprotective and antiapoptotic properties when confronted with neurotoxic agents such as MPTP, 6-hydroxypamine or methamphetamine. Therefore, there are high expectations about the therapy with H<sub>C</sub>-TeTx, and its multiple variants, regarding the neuroprotection they provide. With all before said, we propose that H<sub>C</sub> has the potential to be a drug with multiple applications. Even with this, questions remain to be resolved and more studies are required to show in detail the aforementioned effects.

**Keywords:** H<sub>C</sub>-TeTx, methamphetamine, neurodegeneration, neuroprotection, parkinson's disease.

## Introducción

A lo largo de su evolución, las bacterias han sido capaces de adaptarse a situaciones adversas. Esta adaptación trajo consigo el desarrollo de un espectro amplio de componentes como los flagelos, las adhesinas, la formación de cápsulas, la esporulación o la síntesis de toxinas. También fueron capaces de crear un vínculo vital con organismos superiores; en el cuerpo humano habitan una gran cantidad de bacterias que se localizan en la piel, en las mucosas de las cavidades nasal y bucal, en la vagina y el tracto gastrointestinal. Los tejidos internos son normalmente estériles, sin embargo, es frecuente que algunos microorganismos puedan ingresar al huésped y favorecer la aparición de

diferentes enfermedades<sup>1</sup>. Se consideraba que el sistema nervioso central (SNC) era incapaz de tener reacciones inmunológicas y por ello se decía que era un sistema inmunológicamente privilegiado, característica atribuida, principalmente, por la barrera hematoencefálica (BHE), la cual es una interface dinámica, interactiva y adaptable que existe entre el sistema inmune periférico y el sistema nervioso central<sup>2</sup>. No obstante, millones de años de lucha entre patógenos y huéspedes facilitaron el surgimiento de mecanismos complejos para que los patógenos infectaran a sus huéspedes. Los estudios han demostrado que para ingresar al SNC, los patógenos utilizan los sistemas

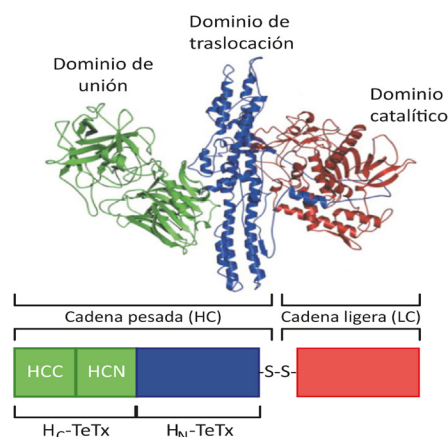
de transporte transcelular o paracelular del endotelio, la maquinaria de transporte retroaxonal de las neuronas periféricas o bien, células inmunes fagocíticas capaces de atravesar la BHE<sup>2,3</sup>. Para esta revisión, hemos enfocado nuestros esfuerzos en el segundo mecanismo referido, debido a que, en el viaje retroaxonal, se ha encontrado un mecanismo no invasivo, potencial y prometedor en la activación de cascadas de sobrevivencia y proliferación celular.

### El dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica

Las bacterias del género *Clostridium* son bacterias Gram positivas, anaerobias estrictas y productoras de esporas. Las especies *tetani* y *botulinum* son productoras de proteínas neurotóxicas zinc-dependientes que comparten características entre sí como la estructura molecular y el mecanismo de acción. Son causantes de padecimientos distintos e inversos, esto es: la toxina tetánica (TeTx o TeNT, del inglés: *tetanus toxin* o *tetanus neurotoxin*, respectivamente) induce tétanos, enfermedad caracterizada por una contractura muscular y espasmos recurrentes; mientras que la toxina botulínica (BoTx, del inglés: *botulinum toxin*) causa el botulismo, afección que se caracteriza por una parálisis flácida generalizada de los músculos esqueléticos y un fallo parasimpático. Ambas toxinas causan la muerte por colapso respiratorio y asfixia<sup>4,5</sup>.

La TeTx es un polipéptido de 1315 aminoácidos compuesta por dos subunidades: en el extremo amino terminal, se encuentra la cadena ligera (LC, del inglés: *Light Chain*) y en el extremo carboxilo terminal, la cadena pesada (HC, del inglés: *Heavy Chain*). Ambas se encuentran unidas mediante un puente disulfuro. La LC es la responsable de causar toxicidad y la HC es la fracción no tóxica del péptido.

El dominio HC al ser tratado con papaína, que produce un corte entre la Ser864 y la Lys865, libera dos dominios: el que se encuentra en el extremo amino terminal, se denomina fragmento N-terminal de la toxina tetánica ( $H_N$ -TeTx) y, el que es derivado del extremo carbono terminal, es denominado fragmento C-terminal de la toxina tetánica ( $H_C$ -TeTx). El  $H_N$  es responsable del transporte de la cadena ligera a través de la membrana de la vesícula sináptica hacia el citoplasma, de la internalización de la toxina en la neurona y del viaje retrógrado. El fragmento  $H_C$  es responsable de la unión de la toxina con las neuronas periféricas<sup>5-9</sup>. A su vez,  $H_C$  presenta dos subdominios unidos por una  $\alpha$ -hélice, el del lado N-terminal (HCN) y el de la porción C-terminal (HCC) (figura 1)



**Figura 1.** Estructura tridimensional de la toxina tetánica. Se compone de dos cadenas: la cadena ligera constituida por el dominio catalítico (Rojo), una zinc-metaloproteasa con actividad endopeptidasa unida por un puente disulfuro con el dominio de translocación (azul) y el dominio de unión a poligangliósidos (verde) que forman la cadena pesada de 100 kDa. Figura tomada y modificada de Ovsepian, et al, 2016. Para más información acerca de la estructura tridimensional de la toxina tetánica puede visitarse la siguiente página web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/full.html?&mmdbid=151924&bu=1&showanno=1>.

El primer dominio le permite unirse a carbohidratos, y se conoce como región lectínica, mientras que el segundo dominio adopta una estructura  $\beta$ -*trefoil* que posee alta afinidad y alta capacidad por los poliosialilgangliosidos como los GD1b, GT1b y GQ1b<sup>10-13</sup> o uniones de alta afinidad y baja capacidad como los GM<sup>14-16</sup> que, en efecto, muestran un acceso limitado a las neuronas cuando su síntesis es inhibida<sup>15-17</sup>. La unión con las membranas se realiza de manera específica sobre zonas no mielinizadas de las membranas del sistema nervioso simpático y central<sup>13,18</sup> y está mediada por balsas lipídicas<sup>15,16</sup>.

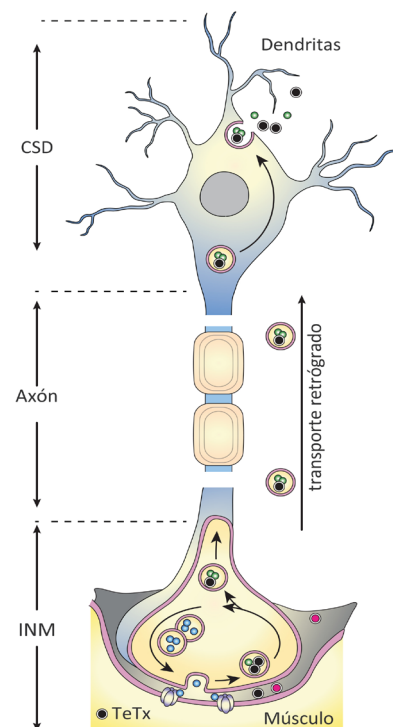
Después del reconocimiento de la superficie neuronal (figura 2), fragmento lleva a cabo un transporte retrógrado (con una velocidad estimada próxima a los 7.5 mm/h) mediante endocitosis por una vía dependiente de clatrina<sup>19,20</sup>. La endocitosis requiere la actividad de la dinamina y varios adaptadores que incluyen AP2 y AP180, independientemente de la EPSINA-1<sup>20</sup>.

Algunos hallazgos sugieren que requiere dos GTPasas pequeñas, la Rab5 y la Rab7, que interaccionan de manera secuencial en el viaje y translocación de las vesículas que llevan al H<sub>c</sub>-TeTx. Así, el fragmento H<sub>c</sub> transita primero con Rab-5 y posteriormente, se mueve a un compartimento con Rab-7<sup>20,21</sup>. El H<sub>c</sub>-TeTx también podría viajar acompañado de los receptores tirosina quinasa B (TrkB) y su receptor común p75<sup>NTR</sup> cuando se activan por sus ligandos endógenos: el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés: *Nerve Growth Factor*) y/o el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés: *Brain-Derived Neurotrophic Factor*). Esto sugiere que el H<sub>c</sub>-TeTx utiliza la misma maquinaria que las neurotrofinas cuando se endocita y transporta<sup>12-14</sup>. Aún con lo descrito, son necesarias más pruebas experimentales para describir el viaje retrógrado de la TeTx y del H<sub>c</sub>.

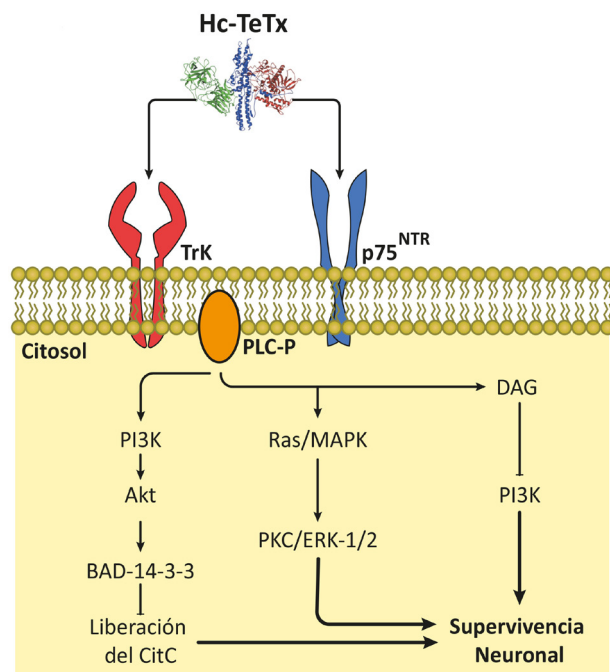
### Bases moleculares del fragmento H<sub>c</sub>-TeTx en SNC

Se ha mostrado que el fragmento tiene un alto potencial trófico debido que actúa sobre receptores de membrana con actividad tirosina cinasa como el Trk A, la vía de señalización PLC $\gamma$ -1/PKC y la fosforilación de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2, del inglés: Extracellular signal-Regulated Kinases 44 y 42; kDa) en sinaptosomas de encéfalo de rata<sup>22-24</sup>.

**Figura 2.** Esquema del transporte retroaxonal del fragmento H<sub>c</sub>-TeTx. El fragmento H<sub>c</sub>-TeTx se une a los polisialilgangliosidos y a las proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI) para poder ser internalizado por endocitosis y viajar de forma retrógrada al soma neuronal procediendo a salir al espacio sináptico y repetir el proceso de internalización a la siguiente neurona, este proceso se denomina "salto sináptico". INM: inyección neuromuscular; CSD: compartimiento somatodendrítico. Modificado de Ovsepian, et al.<sup>41</sup> 2016.



Resulta importante destacar que el H<sub>c</sub> tiene una potencia similar a la TeTx para inducir la activación de los receptores Trk, tanto en sinaptosomas como en cultivo primario de neuronas corticales de cerebro de rata, específicamente, la fosforilación en Tyr490 y Tyr674/Tyr675<sup>16,25</sup>. Estos resultados dieron las primeras evidencias de que, *in vitro*, el fragmento H<sub>c</sub>-TeTx actúa de manera similar a las neurotrofinas porque activa la misma cascada de transducción de señales, específicamente: la vía p21Ras/proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés: *Mitogen-Activated Protein Kinase*) que involucra a ERK1/2 (con fosforilación en Thr202 y Tyr204) y la vía PI-3K/Akt, que inhibe a las proteínas glicógeno sintasa cinasa-3β (GSK3β, del inglés: *Glycogen Synthase Kinase 3 beta*), BAD, vías implicadas en la inducción de la apoptosis<sup>26,27</sup> (figura 3).



**Figura 3.** Vía de señalización del fragmento H<sub>c</sub>-TeTx. Al interactuar con los receptores tirosina cinasa (Trk) de tipo A y/o B y el receptor de neurotrofinas p75. Las vías mostradas son: fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K/Akt), fosfolipasa-c (PLC/PKC), y la proteína cinasa ½ activada por mitógenos (MAPK). Todas estas rutas conducen a la supervivencia neuronal.

La caracterización de la interacción proteína-proteína y proteína-membrana a nivel molecular ha dado luces para ampliar la concepción del mecanismo neuroprotector del fragmento. Se sabe que el H<sub>c</sub> puede ejercer diferentes efectos dependiendo de la ruta de señalización que module, según la proteína, o bien, la membrana con la que interactúe. Estudios realizados por el grupo de Aguilera y colaboradores, sugieren que la administración del fragmento H<sub>c</sub>-TeTx, posee actividad en el sistema nervioso, a través de la modulación de las vías de señalización de los receptores Trk<sup>22,23</sup>. Asimismo, estos estudios han dado las pautas para continuar estudiando los mecanismos moleculares y, con base en ellos, la comunidad científica se motivó a investigar los receptores endógenos del fragmento y su captación por endocitosis (tema de gran importancia desde el punto de vista de la neurobiología que no se abordará en la presente revisión). Otro asunto que se ha planteado resolver es conocer la capacidad antigénica y, con ello, sustituir la vacunación por medio del toxoide (TeTx atenuado).

Finalmente, se ha propuesto al fragmento H<sub>c</sub>-TeTx como vehículo de diferentes fármacos, debido a que tiene la capacidad de evadir la BHE, análogo a un “caballo de Troya”. Estas tres propuestas en cuestión hacen del fragmento un xenobiótico atractivo que podría brindar oportunidades terapéuticas en el futuro.

El fragmento TeTx-H<sub>c</sub> ha sido probado en diversas condiciones, *in vivo* e *in vitro*, para determinar

sus probables propiedades neuroprotectoras, antiapoptóticas y antiautofágicas. Especialmente, se ha estudiado en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas. Estos desórdenes son frecuentemente asociados con la atrofia progresiva, esporádica o hereditaria de estructuras del SNC o periférico por lo cual se han utilizado diversas estrategias a fin de reducir la sintomatología de estas enfermedades, proteger del daño neuronal o impedir su desarrollo.

En la presente sección tratamos de dar una breve reseña acerca de trabajos puntuales que ejemplifican los mecanismos que dieron pauta a distintos regímenes terapéuticos y, más adelante, se describirán los resultados obtenidos en el estudio del H<sub>C</sub> frente a modelos experimentales de neurodegeneración mediada por agentes farmacológicos como el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y la metanfetamina (METH), estudios en los que nuestro grupo de trabajo ha sido pionero.

#### Avances en el estudio preclínico del fragmento H<sub>C</sub>-TeTx

Bizzini, et al.<sup>28</sup> propusieron al fragmento, por primera vez, como un acarreador de moléculas de gran peso molecular con propiedades tróficas, pero incapaces de atravesar la BHE. Entre estos agentes se encuentran la superóxido dismutasa (SOD-1, del inglés: *superoxide dismutase*); los factores neuronales derivados de la glía (GDNF, del inglés: *Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor*) y del cerebro; la proteína anti-apoptótica leucemia/linfoma 2 de células B (Bcl-X, del inglés: *B-cell leukemia/lymphoma extra large protein*) y el factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1, del inglés: *Insulin-like Growth Factor 1*)<sup>28-36</sup>.

Dos enfermedades relacionadas con la atrofia muscular son la esclerosis lateral amiotrófica

(ELA) y la atrofia muscular espinal (AMS). Ambas enfermedades están asociadas a la mutación de un gen: las proteínas SOD y de supervivencia de motoneuronas (SMN1, del inglés: *survival motor neuron 1*), respectivamente. Para el primer caso, la administración del constructo SOD<sup>G93A</sup>-H<sub>C</sub><sup>37</sup>, o la administración de un plásmido con la información del H<sub>C</sub>-TeTx<sup>38</sup>, en tanto que para el segundo mostraron disminuir la atrofia muscular. Este efecto, en la ELA, fue asociado con la inhibición las caspasas-1 y -3 en la médula espinal y con la activación de la proteína Akt. Por su parte, en la AMS, en la médula espinal se redujo la autofagia y la regulación de proteínas apoptóticas como BAX y caspasa-3, y en el músculo esquelético se produjo una disminución en la expresión del marcador para autofagia Lc-3 a un rango basal. Resultados semejantes fueron encontrados en un estudio realizado por el grupo de Armagan en el que, a los sujetos experimentales se les causó una lesión en la médula espinal, que provocó la desmielinización axonal muerte neuronal y degeneración del tracto retrógrado; el tratamiento con el H<sub>C</sub>-TeTx redujo los efectos neurotóxicos sobre neuronas corticales en la sustancia gris mediante la regulación de proteínas proapoptóticas, antiapoptóticas y autofágicas: bax, bad, bak, caspasa-3 y Ask1; Bcl-2 y Bcl-xl; LC3IIB, mTOR, y Atg5, respectivamente<sup>39</sup>.

Por otro lado, estudios *in vitro* mostraron que Bcl-2 inhibe la muerte celular en tejidos sin factores de crecimiento, tejidos hipoglucémicos, tejidos hipoxémicos o tejidos con alta cantidad de radicales libres, el grupo de Nakashima fusionó esta proteína con el fragmento H<sub>C</sub> para averiguar si el H<sub>C</sub> podría fungir como un transportador, desde la periferia hasta el SNC, de proteínas con peso molecular pequeño y, de ser así, si la fusión realizada conservaría las propiedades neuroprotectoras del H<sub>C</sub>, de supervivencia neuronal del Bcl-2 y antiapoptóticas de ambos.

Además, fusionaron a la proteína Bcl-2 con 204 residuos aminoácidos del fragmento H<sub>C</sub> (referido como HCC) para comprobar si esta fracción mantenía las propiedades tróficas de la toxina, o bien, del fragmento H<sub>C</sub>.

La adición de Bcl2-HCC previno parcialmente la muerte de las células de una manera dependiente de la concentración (40 nM o 400 nM). El H<sub>C</sub> también mostró ligeras propiedades citoprotectoras, pero esta actividad pareció alcanzar el punto más alto a una concentración más baja (40 nM). Asimismo, la cantidad de liberación de citocromo C en las células tratadas con la fusión del Bcl-2 y la fracción del H<sub>C</sub> fue menor que la observada para células tratadas con H<sub>C</sub> o sin tratamiento, lo que sugiere que la proteína de fusión reduce la apoptosis<sup>5</sup>.

Aún con los datos mostrados aquí y los que se detallan más adelante, algunos investigadores han afirmado que el viaje retrógrado del fragmento H<sub>C</sub> no es tan efectivo como el de la toxina completa. Por esta razón, se ha propuesto probar una toxina mutante de longitud completa pero enzimáticamente inactiva (TeTIM, del inglés: *TeTx Inactive Mutant*). En un estudio realizado por Saak se usaron proteínas fusionadas compuestas por los fragmentos de la TeTx (H<sub>C</sub> y HCC) y al mutante inactivo unida a un núcleo de estreptavidina (CS, del inglés: *core streptavidin*) con el fin de comparar la unión a neuronas, endocitosis, transporte retroaxonal y transferencia transináptica en neuronas cultivadas de la médula espinal de ratas. Los resultados indican que el CS-TeTIM demostró ser más eficiente viajando que los fragmentos H<sub>C</sub> y HCC. Es posible que la toxina completa tenga más de una fracción de unión a las neuronas, por lo cual, el mutante de la toxina estaría aprovechando todos esos recursos que le faltan a cualquiera de los fragmentos, o bien, que los fragmentos sean digeridos durante el transporte y, por ello, se

encontró menor reactividad a estos. Según este mismo autor, el neurotropismo inferior y el tráfico axonal de los fragmentos de la TeTx, podrían atribuirse a la desnaturalización parcial, a los métodos de producción, o la separación de TeTx por escisión proteolítica.

Este estudio resulta interesante sobremanera, ya que demuestra las ventajas de usar el TeTxIM sobre las fracciones respecto al tráfico retroaxonal que con ello, puede perfilarse como un eficiente transportador de fármacos que no atraviesan la BHE. Queda, no obstante, un largo camino por recorrer para demostrar que el TeTIM tiene las altas capacidades quiméricas, antiapoptóticas y antiautofágicas que muestra el H<sub>C</sub>-TeTx<sup>40,41</sup>.

#### El fragmento H<sub>C</sub>-TeTx en los modelos para la enfermedad de Parkinson

Por el número de personas afectadas, la enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente. En la EP hay un desorden progresivo del movimiento, es de orden idiopático y está asociado al envejecimiento. Se estima que la EP se presenta entre el 0.3 y 2% de la población mayor de 60 años<sup>42</sup>. Esta patología se caracteriza por inducir afectaciones motoras como temblor, inestabilidad postural y bradicinesia y no motoras como falta de sueño y depresión, entre otras.

La neuropatología es resultado de la deficiencia de dopamina (DA) debida a la muerte progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc), las cuales envían sus proyecciones hacia el NE, caudado y putamen involucrados en el control de habilidades motoras<sup>43,44</sup>.

Existen fármacos como la L-DOPA y los agonistas dopaminérgicos que son capaces de disminuir



los síntomas motores de la EP pero, no existe una terapéutica que logre la restauración del sistema dopaminérgico y que aumente la producción de DA en el NE para mejorar las conductas motoras<sup>45</sup>. Para el estudio de la EP dos de los neurotóxicos más utilizados son el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina y la 6-hidroxidopamina. El MPTP es metabolizado por la enzima monoaminoxidasa B (MAO-B), que genera el metabolito activo el 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>); mientras que la 6-OHDA, posee una gran similitud estructural con la DA. Así, ambos se unen al transportador de dopamina (DAT, del inglés: *Dopamine Transporter*) para introducirse a las neuronas dopaminérgicas.

El mecanismo de toxicidad de dichos neurotóxicos está relacionado con la inhibición de los complejos mitocondriales y el colapso del potencial membranar, la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS), disminución del sistema antioxidante y disminución de la proteína ferritina, así como con la activación glial, la lipoperoxidación y la nitración proteica, entre otros<sup>46-57</sup>.

Uno de los primeros hallazgos que permitió sugerir a la H<sub>c</sub>-TeTx como a neuroprotector fue realizado por Chaïb-Oukadour, et al.<sup>58</sup> en 2009, mostrando que el H<sub>c</sub> indujo la fosforilación de BAD, que está relacionado a una regulación por Bcl-XL y que regula la translocación de BAX en la mitocondria; inhibe la liberación del citocromo-c, inhibe de la activación de caspasa-3 y regula la translocación del factor de transcripción NFκB hacia el núcleo. En suma, que el fragmento H<sub>c</sub>-TeTx, en una concentración de 10 nM, es suficiente para disminuir la muerte por apoptosis en los cultivos celulares de neuronas granulocorticales de rata.

Mendieta L., et al.<sup>59</sup>, estudiaron los efectos bioquímicos, neuroquímicos y conductuales

producidos por la administración intracraneal del fragmento H<sub>c</sub>-TeTx y la subsecuente infusión de MPP<sup>+</sup> en el NE de ratas Wistar. Se administró, intraestriatalmente, 1 µL de H<sub>c</sub>-TeTx a una concentración 2 µM mediante cirugía estereotáxica y a continuación, se administraron MPP<sup>+</sup> [10 µg/1 µL]. Los hallazgos fueron alentadores, puesto que se mostró que una sola aplicación de H<sub>c</sub>-TeTx redujo el número de giros contralaterales y mejoró las habilidades motoras finas de los sujetos lesionados. Por otro lado, experimentos recientes en ratas Spraw-Dawley lesionadas en el estriado con MPP<sup>+</sup> y tratadas periféricamente con H<sub>c</sub> refuerzan la propuesta sobre sus propiedades neuroprotectoras<sup>60</sup>.

En segunda instancia, se estudió al modelo de degeneración dopaminérgica inducido con 6-OHDA. Por tres días consecutivos, a ratas Wistar se les administraron diferentes dosis del H<sub>c</sub>-TeTx (0.1, 1, 5, 10, 20 µg/kg; i.m. Una dosis por grupo) y después, se les administró, unilateralmente, el tóxico 6-OHDA [16 µg/2 µL] en el NE dorsolateral mediante cirugía estereotáxica<sup>61</sup>. Posteriormente, se evaluó el efecto en la respuesta conductual, celular y neuroquímica de los sujetos tratados. Los resultados a nivel conductual indicaron que el fragmento protegió al sistema del deterioro motor, manifestado como la disminución de la asimetría motora y no presentaron la conducta de giro inducida por metanfetamina. Los resultados neuroquímicos parecieron correlacionarse con los datos conductuales; se encontró un elevado número de células Tirosina Hidroxilasa-positivas (TH+) y una alta concentración de DA, así como una menor proporción de células argirofílicas o inmunoteñidas con la caspasa-3. También, en el grupo lesionado y tratado con H<sub>c</sub> disminuyó la astrogliosis determinada por medio de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP, del inglés: *Glial Fibrillary Acidic Protein*).



Con el propósito de comprender las acciones antioxidantes y antiinflamatorias del fragmento H<sub>c</sub>-TeTx y en sinergia con otros fármacos como el pramipexol (PPX) que es un agonista D2/D3, a ratas Wistar se les administró 6-OHDA en el NE dorsolateral, y se administró H<sub>c</sub>-TeTx (20 µg/kg i.m. cada 24 h) durante 3 días; PPX (1 mg/kg p.o., cada 12 h) durante 30 días. Tanto H<sub>c</sub>-TeTx como PPX mejoraron los déficits motores, evaluado en el modelo del cilindro, y neuroquímicos, determinados por la cantidad de células TH+ inducidos por la lesión 6-OHDA; sin embargo, la combinación de los dos fármacos no fue superior a la administración individual. Además, se reiteró que el H<sub>c</sub> es capaz de disminuir la astrogliosis y, como datos experimentales novedosos, el fragmento disminuyó la activación microglial, las ROS y la lipoperoxidación, aunque no tuvo ningún efecto en la modulación de la enzima SOD. Con estos resultados, se justifica una evaluación adicional de diferentes concentraciones de H<sub>c</sub>-TeTx y PPX como una posible intervención en la EP<sup>62</sup>.

En otro trabajo, se propuso administrar el fragmento H<sub>c</sub>-TeTx (20 µg/kg i.m. por tres días) en el noveno día posterior a la lesión con 6-OHDA a ratas Wistar. Tal como se esperaba, se encontró que los animales lesionados presentaron una asimetría motora que progresó conforme transcurría el experimento. Asimismo, la asimetría motora de los SE tratados con H<sub>c</sub>-TeTx no fue progresiva, sino que se mantuvo en el mismo rango durante todo el experimento. Esto fue confirmado al realizar el análisis bioquímico de la TH en donde se determinó una mayor inmunoreactividad en el NE y un mayor número de neuronas TH+ en la SNpc respecto al grupo lesionado. En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento, con tres aplicaciones, del fragmento H<sub>c</sub> posterior a la lesión dopaminérgica establecida, pudo reducir el proceso degenerativo y, si bien no hay un efecto

restaurador, es posible mantener la funcionalidad de las neuronas remanentes a la toxicidad de la 6-OHDA<sup>63</sup>.

Siguiendo el esquema de lesión tardía y asumiendo que la eficacia de la terapéutica con L-DOPA es limitada, debido a que, luego de algunos años de tratamiento, los pacientes presentan tolerancia al fármaco que posteriormente, causa problemas motores como las discinesias, la pregunta a resolver fue si era posible prevenir los efectos adversos inducidos por L-DOPA. Para explorar esta cuestión, se realizó un estudio para evaluar el efecto del post- y pretratamiento con el H<sub>c</sub>-TeTx en un modelo de discinesias en ratas inducidas con un tratamiento crónico de L-DOPA<sup>64</sup>.

Se emplearon tres grupos experimentales independientes; discinesias con un tratamiento crónico de L-DOPA en las siguientes dosis; baja, 6 mg/kg; media, 10 mg/kg y alta, 25 mg/kg. Los resultados indicaron que la administración del H<sub>c</sub>-TeTx con 6 o 10 mg/kg de L-DOPA no reduce la severidad de las discinesias, mientras que el grupo tratado con H<sub>c</sub>-TeTx y 25 mg/kg de L-DOPA mostró una atenuación temporal de movimientos discinéticos. Sin embargo, no se observó ningún efecto restaurador de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc ni una disminución de la expresión del factor de transcripción FosB/ΔFosB en el NE dorsal, el cual es un importante marcador discinetogénico. Es muy probable que el fragmento H<sub>c</sub>-TeTx no tenga un efecto trófico o restaurador una vez iniciado el proceso degenerativo. Por ello, se decidió administrar el fragmento tres días previos a la lesión en el MFB. Los resultados indican que hay una ligera recuperación motora evaluada en el modelo del cilindro y conducta rotatoria. Además, se comprobó que la administración de H<sub>c</sub>-TeTx disminuye los MIAs, al inicio del tratamiento con L-DOPA y, aunque no se observó un efecto

neuroprotector de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, sí se encontró una disminución de la expresión de FosB/ $\Delta$ FosB en el NE dorsal de ratas discinéticas. Este último evento resulta novedoso, aunque no está claro cómo el fragmento H<sub>c</sub>-TeTx podría participar en la regulación de este factor de transcripción. Por ello, resulta necesario realizar una investigación más detallada sobre la señalización que puede inducir el fragmento H<sub>c</sub>-TeTx, porque la activación de los Trk asociados al H<sub>c</sub> participa como activador del promotor para la expresión del gen *fosb* y la vía ERK1/2 está implicada en el desarrollo de discinesias. Los experimentos con un modelo de discinesias en rata, representan un reto muy grande para el fragmento H<sub>c</sub>, ya que, la pérdida neuronal en la SNpc es casi total, además de que las modificaciones en los ganglios basales que se generan durante el tratamiento crónico con L-DOPA, hacen que la funcionalidad de estos animales sea diferente. Sin embargo, en estos experimentos se descubrió que si bien el H<sub>c</sub>-TeTx no inhibe completamente el desarrollo de discinesias, sí podría hacerlo al inicio del tratamiento con L-DOPA. Resultará, pues, de alto interés poder entender de qué modo, el fragmento H<sub>c</sub>-TeTx, regula la expresión de diferentes genes durante la degeneración dopaminérgica<sup>45,63,64</sup>.

Dado que la depresión es un síntoma no motor de la EP, se realizó un estudio para determinar si el H<sub>c</sub>-TeTx posee propiedades antidepresivas y si el BDNF o el factor de necrosis tumoral alfa también se ven afectados. Grupos independientes de ratas Wistar-Kyoto, fueron tratadas con 20, 40 y 60  $\mu$ g/kg, i.m. y se evaluó su desempeño en las tareas de campo abierto y nado forzado. Los resultados indican efectos antidepresivos de larga duración de una sola dosis (60  $\mu$ g/kg) de H<sub>c</sub>-TeTx, así como el aumento de BDNF en la corteza frontal y el hipocampo y la disminución del TNF-alfa en las mismas áreas.

Estos resultados sugieren la posible utilidad de H<sub>c</sub>-TeTx en la comorbilidad de la depresión de la EP<sup>65</sup>.

Todos estos hallazgos son alentadores para futuros enfoques clínicos en el tratamiento de la EP. Los avances en las tecnologías de imagen y la identificación de marcadores genéticos para esta enfermedad deberían conducir a un diagnóstico más temprano y brindar la oportunidad de una intervención terapéutica con H<sub>c</sub>-TeTx en una etapa en la que un número significativo de neuronas dopaminérgicas permanecen sanas.

### El fragmento H<sub>c</sub>-TeTx y la toxicidad inducida por metanfetamina

La metanfetamina (METH) es un estimulante tipo anfetamínico, cuyo uso prolongado puede causar un deterioro conductual severo y déficit cognitivo<sup>66,67</sup>. Según estudios epidemiológicos, individuos que consumen METH crónicamente, presentan alteraciones del sistema nigroestriatal y tienen de dos a tres veces más riesgo de padecer la EP<sup>67-70</sup>. La METH es un agente capaz de inducir alteraciones de tipo neurodegenerativas.

En roedores, el tratamiento de METH produce la degeneración de las terminales dopaminérgicas del NE. Recién, se describió que dosis repetidas de METH (3x5 mg/kg o 3x10 mg/kg) causan una neurodegeneración de las terminales estriatales al igual que los cuerpos neuronales de la SNpc. La toxicidad de la METH involucra la disfunción mitocondrial, la activación glial<sup>70-72</sup>, la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y nitrosativo, así como la activación de vías apoptóticas y necróticas<sup>73-75</sup>. Por lo anterior, resulta de suma importancia, en primer lugar, prevenir el consumo de la METH y, en ese sentido, auxiliar tanto a los nuevos consumidores como a los de antaño para que tengan un mejor estilo de vida.

Por lo dicho, perfilamos al fragmento H<sub>C</sub>-TeTx como un agente para disminuir la acción neurotóxica causada por la administración de dosis repetidas de METH en un modelo en ratón C57BL/6J<sup>76</sup>. Estos recibieron tres inyecciones de METH (4 mg/kg, i.p; tres horas de intervalo entre inyecciones) y, 1, 48 y 72 h posteriores a la de METH se administró el fragmento H<sub>C</sub>-TeTx (40 µg/kg).

Los hallazgos indican que el fragmento H<sub>C</sub>-TeTx disminuye significativamente la degeneración de las terminales dopaminérgicas causadas por la METH en los días 1, 3 y 7 subsecuentes a la administración de la droga, mostrados con marcadores dopaminérgicos como la TH y el DAT en el NE, datos que fueron contrastados con el uso de la técnica (Ag/Cu) y, a su vez, acompañados de una menor inmunoreactividad para la sintasa neuronal del óxido nítrico.

Además, el fragmento no causó modificaciones sobre la activación de la microglía que se genera en el primer día posterior a la administración de METH. Finalmente, los ratones que recibieron el fragmento H<sub>C</sub>-TeTx mejoraron las tareas de conducta motora y coordinación en el campo abierto y el rotarod respecto a los grupos control. Definitivamente, este estudio permitió encontrar una nueva utilidad farmacológica para el fragmento H<sub>C</sub>-TeTx por su alto potencial neuroprotector a nivel del sistema dopaminérgico y determinar su eficacia a nivel conductual.

Serán futuros estudios los que nos permitirán sugerir la forma más eficaz de uso de este fármaco en la toxicidad de la METH. Todos estos resultados permiten perfilar al fragmento H<sub>C</sub>-TeTx como un agente con acción neuroprotectora en ratas hemiparkinsonianas. Es importante destacar que la administración intramuscular y a bajas concentraciones ofrece muchas ventajas del fragmento H<sub>C</sub>-TeTx, incluso sobre las neurotrofinas o factores de crecimiento que, si bien son efectivos, no logran cruzar la barrera hematoencefálica.

Existen grandes expectativas sobre la terapéutica con H<sub>C</sub>-TeTx, y sus múltiples variantes, respecto a la neuroprotección que proveen, a sus efectos antiapoptóticos, antiautofagocíticos, antioxidantes y antidepresivos, esto último como un hallazgo novedoso. Todo ello perfila al fragmento como fármaco potencial con aplicaciones múltiples, con lo cual se demuestra que aún quedan interrogantes por resolver que hacen necesario realizar más estudios para mostrar a detalle los efectos mencionados.

#### Financiamiento

Ninguno

#### Conflicto de intereses

Los autores reportan que no existe conflicto de intereses con relación a los materiales.

#### Bibliografía

1. Ribet D, Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect.* 2015;17(3):173-83. doi:10.1016/j.micinf.2015.01.004.
2. Banks WA. The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation. *Brain Behav Immun.* 2015; 44:1-8. doi: 10.1016/j.bbi.2014.08.007

3. Kim KS. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6(8):625-34. doi: [10.1038/nrmicro1952](https://doi.org/10.1038/nrmicro1952).
4. Montecucco C, Schiavo G. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol Microbiol*. 1994;13(1):1-8. doi: [10.1111/j.1365-2958.1994.tb00396.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00396.x).
5. Roteins: cytoprotection and retrograde axonal migration. *BMC Biotechnol*. 2018; 18(1):39. doi: [10.1186/s12896-018-0452-z](https://doi.org/10.1186/s12896-018-0452-z).
6. Craven CJ, Dawson DJ. The chain composition of tetanus toxin. *Biochim Biophys Acta*. 1973; 317(2):277-85. doi: [10.1016/0005-2795\(73\)90223-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(73)90223-7).
7. Helting TB, Zwisler O. Structure of tetanus toxin. I. Breakdown of the toxin molecule and discrimination between polypeptide fragments. *J Biol Chem*. 1977; 252(1):187-93.
8. Helting TB, Zwisler O, Wiegandt H. Structure of tetanus toxin. II. Toxin binding to ganglioside. *J Biol Chem*. 1977;252(1):194-8. PubMed PMID: 64469.
9. Montecucco C, Schiavo G. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q Rev Biophys*. 1995;28(4):423-72. PubMed PMID: 8771234.
10. Meckler RL, Baron R, McLachlan EM. Selective uptake of C-fragment of tetanus toxin by sympathetic preganglionic nerve terminals. *Neuroscience*. 1990; 36(3):823-9. doi: [10.1016/0306-4522\(90\)90025-y](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90025-y).
11. Herreros J, Lalli G, Schiavo G. C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor. *Biochem J*. 2000; 347(1):199-204. PubMed PMID: 10727419
12. Rummel A, Bade S, Alves J, Bigalke H, Binz T. Two carbohydrate binding sites in the H(CC)-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. *J Mol Biol*. 2003; 326(3):835-47. doi: [10.1016/s0022-2836\(02\)01403-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01403-1).
13. Rummel A. Double receptor anchorage of botulinum neurotoxins accounts for their exquisite neurospecificity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013; 364:61-90. doi: [10.1007/978-3-642-33570-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-33570-9_4).
14. Lalli G, Schiavo G. Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR. *J Cell Biol*. 2002; 156(2):233-9. doi: [10.1083/jcb.200106142](https://doi.org/10.1083/jcb.200106142).
15. Herreros J, Ng T, Schiavo G. Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell*. 2001;12(10):2947-60. doi: [10.1091/mbc.12.10.2947](https://doi.org/10.1091/mbc.12.10.2947).
16. Herreros J, Schiavo G. Lipid microdomains are involved in neurospecific binding and internalisation of clostridial neurotoxins. *Int J Med Microbiol*. 2002; 291(6-7):447-53. PubMed PMID: 11890543.
17. Yavin E, Nathan A. Tetanus toxin receptors on nerve cells contain a trypsin-sensitive component. *Eur J Biochem*. 1986; 154(2):403-7. doi: [10.1111/j.1432-1033.1986.tb09412.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09412.x).
18. Yavin E, Yavin Z, Habig WH, Hardegree MC, Kohn LD. Tetanus toxin association with developing neuronal cell cultures. Kinetic parameters and evidence for ganglioside-mediated internalization. *J Biol Chem*. 1981; 256(13):7014-22. PubMed PMID: 7240260.
19. Roux S, Colasante C, Saint Clément C, Barbier J, Curie T, Girard E, et al. Internalization of a GFP-tetanus toxin C-terminal fragment fusion protein at mature mouse neuromuscular junctions. *Mol Cell Neurosci*. 2005; 30(4):572-82. PubMed PMID: 16456925.
20. Deinhardt K, Berninghausen O, Willison HJ, Hopkins CR, Schiavo G. Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1. *J Cell Biol*. 2006; 174(3):459-71. doi: [10.1083/jcb.200508170](https://doi.org/10.1083/jcb.200508170).

21. Deinhardt K, Salinas S, Verastegui C, Watson R, Worth D, Hanrahan S, et al. Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron*. 2006; 52(2):293-305. doi: 10.1016/j.neuron.2006.08.018.
22. Aguilera J, Yavin E. In vivo translocation and down-regulation of protein kinase C following intraventricular administration of tetanus toxin. *J Neurochem*. 1990; 54(1):339-42. doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb13319.x.
23. Gil C, Chaib-Oukadour I, Pelliccioni P, Aguilera J. Activation of signal transduction pathways involving trkA, PLCgamma-1, PKC isoforms and ERK-1/2 by tetanus toxin. *FEBS Lett*. 2000; 481(2):177-82. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02002-0.
24. Herrando-Grabulosa M, Casas C, Aguilera J. The C-terminal domain of tetanus toxin protects motoneurons against acute excitotoxic damage on spinal cord organotypic cultures. *J Neurochem*. 2013;124(1):36-44. doi: 10.1111/jnc.12062.
25. Gil C, Chaib-Oukadour I, Aguilera J. C-terminal fragment of tetanus toxin heavy chain activates Akt and MEK/ERK signalling pathways in a Trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons. *Biochem J*. 2003; 373(2):613-20. doi: 10.1042/BJ20030333.
26. Chaib-Oukadour I, Gil C, Aguilera J. The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurones from apoptotic death: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Neurochem*. 2004; 90(5):1227-36. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02586.x.
27. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*. 2000;10(3):381-91. doi: 10.1016/S0959-4388(00)00092-1.
28. Bizzini B, Grob P, Glicksman MA, Akert K. Use of the B-IIb tetanus toxin derived fragment as a specific neuropharmacological transport agent. *Brain Res*. 1980;193(1):221-7. doi: 10.1016/0006-8993(80)90959-2.
29. Figueiredo DM, Hallewell RA, Chen LL, Fairweather NF, Dougan G, Savitt JM, et al. Delivery of recombinant tetanus-superoxide dismutase proteins to central nervous system neurons by retrograde axonal transport. *Exp Neurol*. 1997;145, 2(1):546-54. doi: 10.1006/exnr.1997.6490.
30. Calvo AC, Moreno-Igoa M, Mancuso R, Manzano R, Oliván S, Muñoz MJ, et al. Lack of a synergistic effect of a non-viral ALS gene therapy based on BDNF and a TTC fusion molecule. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:10. doi: 10.1186/1750-1172-6-10.
31. Payne AM, Zheng Z, Messi ML, Milligan CE, González E, Delbono O. Motor neurone targeting of IGF-1 prevents specific force decline in ageing mouse muscle. *J Physiol*. 2006; 570(2):283-94. doi: 10.1113/jphysiol.2005.100032.
32. Payne AM, Messi ML, Zheng Z, Delbono O. Motor neuron targeting of IGF-1 attenuates age-related external Ca<sup>2+</sup>-dependent skeletal muscle contraction in senescent mice. *Exp Gerontol*. 2007; 42(4):309-19. doi: 10.1016/j.exger.2006.11.003.
33. Larsen KE, Benn SC, Ay I, Chian RJ, Celia SA, Remington MP, et al. A glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF):tetanus toxin fragment C protein conjugate improves delivery of GDNF to spinal cord motor neurons in mice. *Brain Res*. 2006; 1120(1):1-12. doi: 10.1016/j.brainres.2006.08.079.
34. Ciriza J, Moreno-Igoa M, Calvo AC, Yague G, Palacio J, Miana-Mena FJ, et al. A genetic fusion GDNF-C fragment of tetanus toxin prolongs survival in a symptomatic mouse ALS model. *Restor Neurol Neurosci*. 2008; 26(6):459-65. PubMed PMID: 19096133.

35. Moreno-Igoa M, Calvo AC, Ciriza J, Muñoz MJ, Zaragoza P, Osta R. Non-viral gene delivery of the GDNF, either alone or fused to the C-fragment of tetanus toxin protein, prolongs survival in a mouse ALS model. *Restor Neurol Neurosci*. 2012; 30(1):69-80. doi: [10.3233/RNN-2011-0621](https://doi.org/10.3233/RNN-2011-0621).
36. Fragment in model of global cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Brain Res Bull*. 2014; 101:37-44. doi: [10.1016/j.brainresbull.2013.11.006](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.11.006).
37. Moreno-Igoa M, Calvo AC, Penas C, Manzano R, Oliván S, Muñoz MJ, et al. Fragment C of tetanus toxin, more than a carrier. Novel perspectives in non-viral ALS gene therapy. *J Mol Med (Berl)*. 2010; 88(3):297-308. doi: [10.1007/s00109-009-0556-y](https://doi.org/10.1007/s00109-009-0556-y).
38. Oliván S, Calvo AC, Rando A, Herrando-Grabulosa M, Manzano R, Zaragoza P, et al. Neuroprotective Effect of Non-viral Gene Therapy Treatment Based on Tetanus Toxin C-fragment in a Severe Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *Front Mol Neurosci*. 2016; 9:76. doi: [10.3389/fnmol.2016.00076](https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00076).
39. Sozbilen MC, Ozturk M, Kaftan G, Dagci T, Ozyalcin H, Armagan G. Neuroprotective Effects of C-terminal Domain of Tetanus Toxin on Rat Brain Against Motorneuron Damages After Experimental Spinal Cord Injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2018; 43(6):E327-E33. doi: [10.1097/BRS.0000000000002357](https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000002357).
40. Ovsepián SV, Ovespián SV, Bodeker M, O'Leary VB, Lawrence GW, Oliver Dolly J. Internalization and retrograde axonal trafficking of tetanus toxin in motor neurons and trans-synaptic propagation at central synapses exceed those of its C-terminal-binding fragments. *Brain Struct Funct*. 2015; 220(3):1825-38. doi: [10.1007/s00429-015-1004-0](https://doi.org/10.1007/s00429-015-1004-0).
41. Ovsepián SV, O'Leary VB, Ntziachristos V, Dolly JO. Circumventing Brain Barriers: Nanovehicles for Retroaxonal Therapeutic Delivery. *Trends Mol Med*. 2016; 22(11):983-93. doi: [10.1016/j.molmed.2016.09.004](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.004).
42. Salama A, Ibrahim W, Tousson E, Sakr S, Masoud M, Akela, et al. Epigenetic study of Parkinson's Disease in experimental animal model. *Inter j clini exp neurol*. 2015; 3(1):11-20.
43. Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1357-91. doi: [10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x).
44. Segura-Aguilar J, Kostrzewa RM. Neurotoxin mechanisms and processes relevant to Parkinson's disease: an update. *Neurotox Res*. 2015;27(3):328-54. doi: [10.1007/s12640-015-9519-y](https://doi.org/10.1007/s12640-015-9519-y).
45. Wang T, Cao X, Zhang T, Shi Q, Chen Z, Tang B. Effect of simvastatin on L-DOPA-induced abnormal involuntary movements of hemiparkinsonian rats. *Neurol Sci*. 2015; 36(8):1397-402. doi: [10.1007/s10072-015-2127-z](https://doi.org/10.1007/s10072-015-2127-z).
46. Bradbury AJ, Costall B, Domeney AM, Jenner P, Kelly ME, Marsden CD, et al. 1-methyl-4-phenylpyridine is neurotoxic to the nigrostriatal dopamine pathway. *Nature*. 1986; 319(6048):56-7. doi: [10.1038/319056a0](https://doi.org/10.1038/319056a0).
47. Heikkilä RE, Nicklas WJ, Vyas I, Duvoisin RC. Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci Lett*. 1985; 62(3):389-94. doi: [10.1016/0304-3940\(85\)90580-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90580-4).
48. Singer TP, Ramsay RR. Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. An update. *FEBS Lett*. 1990;274(1-2):1-8. PubMed PMID: 2253761.
49. Storey E, Hyman BT, Jenkins B, Brouillet E, Miller JM, Rosen BR, et al. 1-Methyl-4-phenylpyridinium produces excitotoxic lesions in rat striatum as a result of impairment of oxidative metabolism. *J Neurochem*. 1992; 58(5):1975-8. doi: [10.1111/j.1471-4159.1992.tb10080.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10080.x).
50. Trevor AJ, Singer TP, Ramsay RR, Castagnoli N. Processing of MPTP by monoamine oxidases: implications for molecular toxicology. *J Neural Transm Suppl*. 1987; 23:73-89. doi: [10.1007/978-3-7091-8901-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8901-6_5).



51. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001; 65(2):135-72. PubMed PMID: 11403877.
52. Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol.* 2002; 175(2):303-17. doi: [10.1006/exnr.2002.7891](https://doi.org/10.1006/exnr.2002.7891).
53. Francardo V, Recchia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H, Cenci MA. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2011; 42(3):327-40. doi: [10.1016/j.nbd.2011.01.024](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.024).
54. Francardo V. Modeling Parkinson's disease and treatment complications in rodents: Potentials and pitfalls of the current options. *Behav Brain Res.* 2018; 352:142-50. doi: [10.1016/j.bbr.2017.12.014](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.12.014).
55. Gupta S, Goswami P, Biswas J, Joshi N, Sharma S, Nath C, et al. 6-Hydroxydopamine and lipopolysaccharides induced DNA damage in astrocytes: involvement of nitric oxide and mitochondria. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015; 778:22-36. doi: [10.1016/j.mrgentox.2014.12.007](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.12.007).
56. Hernandez-Baltazar D, Mendoza-Garrido ME, Martinez-Fong D. Activation of GSK-3 $\beta$  and caspase-3 occurs in Nigral dopamine neurons during the development of apoptosis activated by a striatal injection of 6-hydroxydopamine. *PLoS One.* 2013; 8(8):e70951. doi: [10.1371/journal.pone.0070951](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070951).
57. Chaïb-Oukadour I, Gil C, Rodríguez-Alvarez J, Ortega A, Aguilera J. Tetanus toxin H(C) fragment reduces neuronal MPP<sup>+</sup> toxicity. *Mol Cell Neurosci.* 2009; 41(3):297-303. doi: [10.1016/j.mcn.2009.03.006](https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.03.006).
58. Chaïb-Oukadour I, Gil C, Rodríguez-Alvarez J, Ortega A, Aguilera J. Tetanus toxin H(C) fragment reduces neuronal MPP<sup>+</sup> toxicity. *Mol Cell Neurosci.* 2009; 41(3):297-303. doi: [10.1016/j.mcn.2009.03.006](https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.03.006).
59. Mendieta L, Venegas B, Moreno N, Patricio A, Martínez I, Aguilera J, et al. The carboxyl-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin prevents dopaminergic degeneration and improves motor behavior in rats with striatal MPP<sup>+</sup>-lesions. *Neurosci Res.* 2009; 65(1):98-106. doi: [10.1016/j.neures.2009.06.001](https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.06.001).
60. Moreno-Galarza N, Mendieta L, Palafox-Sánchez V, Herrando-Grabulosa M, Gil C, Limón DI, et al. Peripheral Administration of Tetanus Toxin Hc Fragment Prevents MPP<sup>+</sup> Toxicity In Vivo. *Neurotox Res.* 2018;34(1):47-61. doi: [10.1007/s12640-017-9853-3](https://doi.org/10.1007/s12640-017-9853-3).
61. Mendieta L, Bautista E, Sánchez A, Guevara J, Herrando-Grabulosa M, Moran J, et al. The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin given by intramuscular injection causes neuroprotection and improves the motor behavior in rats treated with 6-hydroxydopamine. *Neurosci Res.* 2012; 74(2):156-67. doi: [10.1016/j.neures.2012.08.006](https://doi.org/10.1016/j.neures.2012.08.006).
62. Patricio F, Parra I, Martínez I, Pérez-Severiano F, Montes S, Aguilera J, et al. Effectiveness of Fragment C Domain of Tetanus Toxin and Pramipexole in an Animal Model of Parkinson's Disease. *Neurotox Res.* 2019. doi: [10.1007/s12640-018-9990-3](https://doi.org/10.1007/s12640-018-9990-3).
63. Sánchez-González A, Mendieta L, Palafox V, Candalija A, Luna F, Aguilera J, et al. The restorative effect of intramuscular injection of tetanus toxin C-fragment in hemiparkinsonian rats. *Neurosci Res.* 2014;84:1-9. doi: [10.1016/j.neures.2014.04.008](https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.04.008).
64. Palafox-Sánchez V, Mendieta L, Ramírez-García G, Candalija A, Aguilera J, Limón ID. Effect of the C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin on dyskinesia caused by levodopa in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2016;145:33-44. doi: [10.1016/j.pbb.2016.04.001](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.04.001).

65. Getachew B, Mendieta L, Csoka AB, Aguilera J, Tizabi Y. Antidepressant effects of C-Terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin in a rat model of depression. *Behav Brain Res.* 2019; 370:111968. doi: [10.1016/j.bbr.2019.111968](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111968).
66. Granado N, Ares-Santos S, Moratalla R. Methamphetamine and Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* 2013;2013:308052. doi: [10.1155/2013/308052](https://doi.org/10.1155/2013/308052).
67. Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Leonido-Yee M, Franceschi D, et al. Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. *Am J Psychiatry.* 2001;158(3):377-82. doi: [10.1176/appi.ajp.158.3.377](https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.3.377).
68. Callaghan RC, Cunningham JK, Sykes J, Kish SJ. Increased risk of Parkinson's disease in individuals hospitalized with conditions related to the use of methamphetamine or other amphetamine-type drugs. *Drug Alcohol Depend.* 2012;120(1-3):35-40. doi: [10.1016/j.drugalcdep.2011.06.013](https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2011.06.013).
69. Curtin K, Fleckenstein AE, Robison RJ, Crookston MJ, Smith KR, Hanson GR. Methamphetamine/amphetamine abuse and risk of Parkinson's disease in Utah: a population-based assessment. *Drug Alcohol Depend.* 2015;146:30-8. Epub 2014/11/16. doi: [10.1016/j.drugalcdep.2014.10.027](https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.10.027).
70. Chang L, Alicata D, Ernst T, Volkow N. Structural and metabolic brain changes in the striatum associated with methamphetamine abuse. *Addiction.* 2007; 102(S1):16-32. doi: [10.1111/j.1360-0443.2006.01782.x](https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2006.01782.x).
71. Thomas DM, Kuhn DM. MK-801 and dextromethorphan block microglial activation and protect against methamphetamine-induced neurotoxicity. *Brain Res.* 2005;1050(1-2):190-8. doi: [10.1016/j.brainres.2005.05.049](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.05.049).
72. Thomas DM, Kuhn DM. MK-801 and dextromethorphan block microglial activation and protect against methamphetamine-induced neurotoxicity. *Brain Res.* 2005;1050(1-2):190-8. doi: [10.1016/j.brainres.2005.05.049](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.05.049).
73. Wang J, Xu W, Ali SF, Angulo JA. Connection between the striatal neurokinin-1 receptor and nitric oxide formation during methamphetamine exposure. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1139:164-71. doi: [10.1196/annals.1432.001](https://doi.org/10.1196/annals.1432.001).
74. Granado N, Lastres-Becker I, Ares-Santos S, Oliva I, Martin E, Cuadrado A, et al. Nrf2 deficiency potentiates methamphetamine-induced dopaminergic axonal damage and gliosis in the striatum. *Glia.* 2011; 59(12):1850-63. doi: [10.1002/glia.21229](https://doi.org/10.1002/glia.21229).
75. Downey LA, Loftis JM. Altered energy production, lowered antioxidant potential, and inflammatory processes mediate CNS damage associated with abuse of the psychostimulants MDMA and methamphetamine. *Eur J Pharmacol.* 2014;727:125-9. doi: [10.1016/j.ejphar.2014.01.032](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.01.032).
76. Mendieta L, Granado N, Aguilera J, Tizabi Y, Moratalla R. Fragment C Domain of Tetanus Toxin Mitigates Methamphetamine Neurotoxicity and Its Motor Consequences in Mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016;19(8). doi: [10.1093/ijnp/pyw021](https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw021).

---

### Artículo sin conflicto de interés

---

© Archivos de Neurociencias