

Tesis de Licenciatura

Análisis de la expresión de factores neurotróficos en un modelo animal del síndrome de Parkinson

Depino, Amaicha Mara

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Depino, Amaicha Mara. (). Análisis de la expresión de factores neurotróficos en un modelo animal del síndrome de Parkinson. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000652_Depino

Cita tipo Chicago:

Depino, Amaicha Mara. "Análisis de la expresión de factores neurotróficos en un modelo animal del síndrome de Parkinson". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. . http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000652_Depino

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

Tesis de Licenciatura

***Análisis de la expresión de factores
neurotróficos en un modelo animal del
síndrome de Parkinson***

Amaicha Mara Depino

Director: Dr. Fernando Pitossi
Instituto de Investigaciones Bioquímicas (FCEyN - UBA)

Marzo de 1999

A mi abuela Julieta Depino.

*A todos los que buscan que los sueños sean más
posibles que esta realidad...*

Índice

	Página
Resumen	4
Abreviaturas	5
Introducción	6
I. El síndrome de Parkinson.	6
a. El factor etiológico.	7
b. La vulnerabilidad selectiva.	9
c. El tratamiento de la enfermedad: ¿por qué una terapia génica?	10
II. Los modelos animales.	13
III. Los factores neurotróficos.	15
a. El factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro (BDNF).	18
b. Las citoquinas en el sistema nervioso central.	18
b.1. Interleuquina-1beta (IL-1 β).	19
b.2. Interleuquina-6 (IL-6).	20
b.3. Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α).	21
b.4. Interleuquina-2 (IL-2).	22
c. Factor de crecimiento transformante-beta 1 (TGF- β 1).	24
IV. Reacción en cadena de la polimerasa competitiva, semi-cuantitativa.	26
Hipótesis de trabajo	29
Objetivos	29
Materiales y métodos	30
Resultados	36
Controles de la RT-PCR semi-cuantitativa.	36
Comparación de los métodos de detección.	39
Cuantificación del ARNm para BDNF en estriado y corteza.	41
Cuantificación del ARNm para TGF- β 1 en estriado.	44
Cuantificación del ARNm para IL-2 en estriado.	45
No se detecta TNF α en estriado a ningún tiempo.	46
Discusión	48
PCR competitiva.	48
Factores neurotróficos en el modelo de la enfermedad de Parkinson.	50
Agradecimientos	55
Bibliografía	56

Resumen

La inyección de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en el estriado de la rata lleva a una progresiva degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra pars compacta. Este modelo ha sido validado para el estudio del síndrome de Parkinson. Por otro lado, existen fuertes evidencias del rol de las citoquinas y las neurotrofinas cerebrales tanto en neurodegeneración como en regeneración. Utilizando este modelo animal, se determinaron los niveles de ARNm de interleuquina-2 (IL-2), Factor de Crecimiento Transformante-beta 1 (TGF- β 1), Factor de Crecimiento Nervioso Derivado del Cerebro (BDNF) y Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α) en el estriado, y de BDNF en la corteza, mediante PCR reversa semi-cuantitativa de alta sensibilidad. Los datos experimentales obtenidos durante la puesta a punto de esta técnica llevaron a la discusión del modelo matemático que actualmente describe la reacción de PCR. Fue así posible cuantificar adecuadamente ARNm con una sensibilidad de aproximadamente 15 moléculas por cada 100 células analizadas. Para el estudio de la expresión de los factores neurotróficos (FNT) se inyectaron unilateralmente ratas adultas con 6-OHDA que fueron sacrificadas a distintos tiempos. Los cerebros fueron rápidamente removidos y se determinaron los niveles tisulares de ARNm de los FNT comparándolos con aquellos de animales a los cuales se les inoculó solución salina. Se detectaron cambios específicos en los niveles tisulares de diversos FNT en el estriado lesionado con la neurotoxina: especialmente se induce TGF- β 1 al primer día, IL-2 a los 12 días y BDNF a los 12 y 30 días. Con la sensibilidad de este método, el ARNm de TNF α no fue detectado en el estriado a ninguno de los tiempos analizados. En la corteza sólo se evidenciaron cambios en la expresión de BDNF en el hemisferio contralateral de los animales inyectados con 6-OHDA a 1 y 30 días post-lesión. Si bien se detectaron inducciones específicas en los tejidos lesionados, también se evidenciaron cambios distintivos en los hemisferios contralaterales y en los animales controles, indicando una compleja red reguladora de los FNT en respuesta a diferentes intervenciones invasivas al SNC.

Abreviaturas

- **6-OHDA:** 6-hidroxidopamina (3,4,6-trihidroxifenilamina).
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **ADNc:** Ácido desoxirribonucleico simple cadena complementario a un ARNm, sintetizado a partir de éste mediante transcripción reversa *in vitro*.
- **ARN:** Ácido ribonucleico.
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.
- **BDNF:** Factor de crecimiento derivado del cerebro (Brain-Derived Growth Factor).
- **f.c.:** Fragmento de competición de la PCR competitiva.
- **CDF/LIF:** Factor inhibitorio de leucemia (Leukemia Inhibitory Factor).
- **cDNA:** ADNc que se busca amplificar por PCR ("target").
- **CNTF:** Factor neurotrófico ciliar (Ciliary Neurotrophic Factor).
- **DA:** dopamina (3,4-dihidroxifenilamina).
- **EGF:** Factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor).
- **FGF(a y b):** Factor de crecimiento de fibroblastos (ácido y básico) (Fibroblast Growth Factor).
- **FNT:** Factores neurotróficos.
- **GDNF:** Factor de crecimiento derivado de la glía (Glial-Derived Growth Factor).
- **LB:** cuerpos de Lewy (cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, formados por neurofilamentos).
- **MPTP:** 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina.
- **NGF:** Factor de crecimiento nervioso (Nerve Growth Factor).
- **NT:** Neurotrofina.
- **NTN:** Neurturina (Neurturin)
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- **PD:** Enfermedad de Parkinson.
- **PSP:** Persefina (Persephin).
- **RO[•]:** radicales libres reactivos de oxígeno.
- **SNC:** Sistema nervioso central.
- **TGF-β:** Factor de crecimiento transformante-beta (Transforming Growth Factor Beta).
- **TH:** tirosinhidroxilasa (enzima responsable de la conversión de Tirosina en L-DOPA).
- **TNF:** Factor de Necrosis Tumoral (Tumor Necrosis Factor).

NOTA: Se utilizó la sigla inglesa en los casos en que la misma es comúnmente usada y la utilización de una en español llevaría a confusiones.

INTRODUCCIÓN

I. El síndrome de Parkinson.

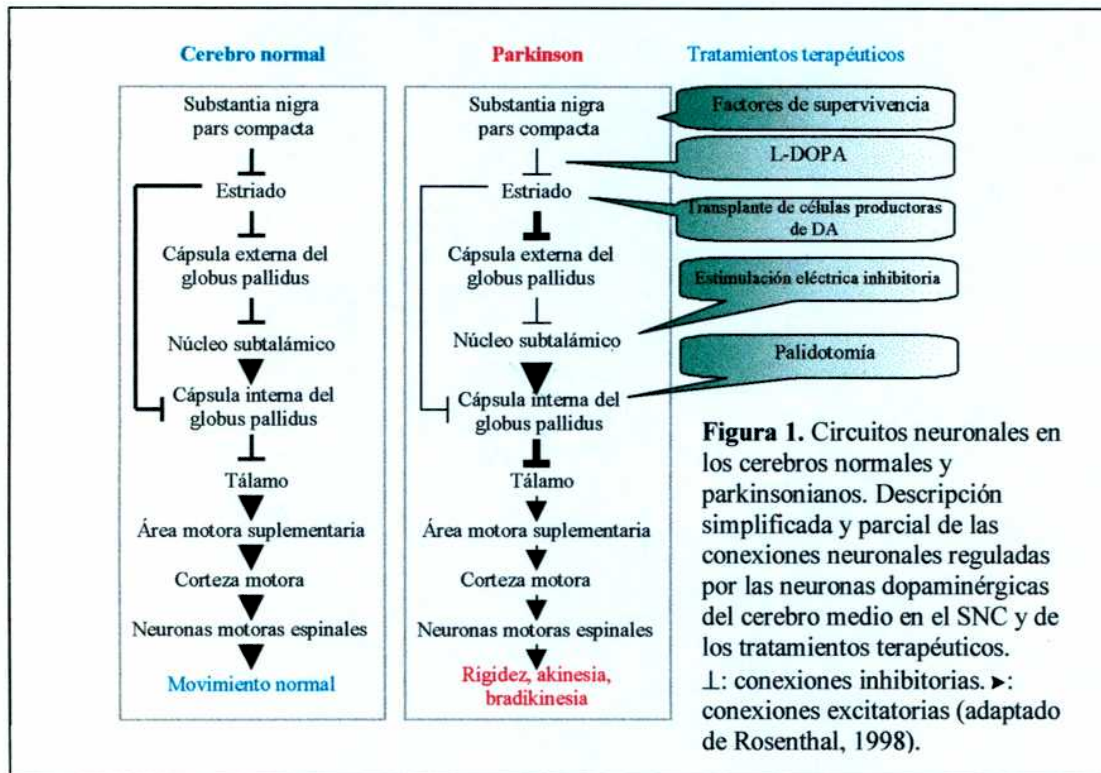
Cuando, en 1817, James Parkinson describió por primera vez la enfermedad que él llamó "parálisis con temblores" (Parkinson, 1817), el número de pacientes no era todavía importante. Pero, con los cambios demográficos globales y el incremento en la expectativa de vida, las aflicciones asociadas a la edad se han vuelto cada vez más prevalentes. Entre 1970 y 1998 la población mundial aumentó un 60%, mientras que el número de personas de más de 80 años se duplicó, y las proyecciones anuncian que este incremento continuará: para el año 2050 habrá 1970 millones de ancianos (United Nations, 1998).

La enfermedad de Parkinson (PD) es el segundo desorden neurodegenerativo más común (luego de la enfermedad de Alzheimer). Está mundialmente distribuida y su prevalencia total que se encuentra entre 0,1-0,2%, aumenta al 1,4% alrededor de los 55 años de edad y al 3,4% a los 75 (Riess et al., 1998).

Los individuos afectados sufren de deficiencias debilitantes en las funciones motoras que se manifiestan en (1) temblores rítmicos en el reposo, (2) imposibilidad de iniciar movimientos de rutina (akinesia) y movimientos voluntarios anormalmente lentos (bradikinesia), (3) rigidez muscular que lleva a movimientos abruptos, (4) inestabilidad postural, y (5) falta de expresión facial. La enfermedad es invariablemente progresiva y 5-10 años luego del inicio los pacientes están postrados y mueren de infecciones o complicaciones secundarias (Rosenthal, 1998).

La enfermedad es causada por la pérdida de dopamina (DA) en los terminales de las proyecciones principales de las neuronas nigrales en el estriado, la corteza y el nucleus accumbens, debido a la degeneración neuronal de la zona compacta de la substantia nigra. Los primeros síntomas clínicos se evidencian cuando la función de estas células ha disminuido en un 75% del normal (Hagan et al., 1997). Las consecuencias de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas son bien conocidas. Estas células son una parte integral de los ganglios basales, un grupo de núcleos del cerebro anterior que cumplen un rol importante en el control motor. En su ausencia, un exceso de estímulos inhibitorios es enviado desde los ganglios basales a través de globus pallidus hacia el tálamo, provocando una disminución en la actividad de la corteza motora y los síntomas negativos de la PD: akinesia, bradykinesia y rigidez (**Figura 1**).

Además, la pérdida de la retroalimentación entre las neuronas nigrales dopaminérgicas y el tálamo da como resultado la liberación de impulsos periódicos espontáneos en el tálamo, que son en parte responsables de los temblores característicos (Rosenthal, 1998). También otros sistemas dopaminérgicos del cerebro se ven afectados en la PD, pero con menor severidad que las proyecciones nigrostriatales.



Además de la pérdida de las neuronas pigmentadas de la substantia nigra, una característica patológica relativamente específica acompaña a la degeneración neuronal: los cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, conocidos como cuerpos de Lewy (LB, descritos por F.H. Lewy en 1912). Los LB son encontrados en varias regiones del cerebro, incluyendo la substantia nigra, el locus coeruleus, el nucleus basalis, el hipotálamo, la corteza, los núcleos motores del nervio craneal y las divisiones centrales y periféricas del sistema nervioso autónomo (Riess et al., 1998).

I.a. El factor etiológico.

La(s) causa(s) de la muerte neuronal en la PD son desconocidas y en general se acepta el origen multifactorial de la enfermedad, causada por la acción de factores ambientales sobre individuos genéticamente predispuestos durante su envejecimiento. Los desencadenantes podrían ser infecciones virales y toxinas ambientales, así como el

estrés oxidativo inducido por metabolitos de la DA, la edad, el sexo, el estado inmunológico, la dieta, etc.

En 1983 se observó que la administración intravenosa de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), que es un producto colateral de la reacción de síntesis de la 1-metil-4-fenil-4-propionoxy-piperidina (MPPP) que se vendía en una región de California (Estados Unidos de Norteamérica) como una nueva "heroína sintética", causaba un severo parkinsonismo en los individuos adictos (Langston et al., 1983). Este trabajo no sólo permitió incluir a esos pacientes en los protocolos terapéuticos de la PD, sino que promovió el desarrollo de modelos animales para el estudio de la PD tanto en primates no humanos como en ratones (ver más adelante). Además, las similitudes químicas del MPTP con herbicidas comunes estimularon la investigación epidemiológica de la enfermedad (Golbe, 1998). Sin embargo, la búsqueda extensiva de toxinas ambientales que fueran relevantes a la patogenia de la PD idiopática no ha conducido a descubrimientos definitivos.

Por otro lado, la contribución genética a la PD ha sido controvertida durante largo tiempo, debido al fracaso en estudios tendientes a demostrar un aumento en la concordancia de la PD en gemelos, comparados con mellizos. Sin embargo, ahora se sabe que estos estudios tenían limitaciones de diseño, y con el uso de técnicas de estudio más sensibles (la tomografía de emisión de positrones para medir la incorporación de ¹⁸fluorodopa en los ganglios basales) se ha llegado a la conclusión de que factores genéticos contribuyen a la disposición para la PD. Así, aunque en la mayoría de los pacientes la PD es esporádica (lo que se desprende de la falta de familiares de primer grado con la enfermedad), el estudio genético de la enfermedad ha llevado a la descripción de varios genes ligados a la enfermedad (**Tabla 1**) (Riess et al., 1998).

Tabla 1. Genes asociados a la PD (adaptado de (Riess et al., 1998)).

Gen	Ubicación cromosómica	Locus del gen de la PD	Mutación	Tinción de LB
α-Synucleína (NACP)	4q21-23	ADPD1 (PARK 1)	Perdida de sentido	Sí
β-Synucleína	5q35		Desconocida	No
γ-Synucleína (Persina)	10q23		Desconocida	No
Desconocido	2p13	ADPD2 (PARK 3)		
Parkina	6	ARPD1 (PARK 2)	Deleciones	Desconocido
MIF (?)	22q13		Desconocida	Desconocido

Abreviaturas: LB, Lewy body; NACP, componente precursor no β-amiloide; MIF, factor inhibitorio de la migración de macrófagos.

Recientemente se ha descrito un gen ligado a la enfermedad en un número de familias independientes, el cual codifica para una proteína presináptica, la α -synucleína (Clayton and George, 1998). En homogenatos de cerebros, 0,5-1% de la proteína citoplasmática es synucleína. Esta proteína fue originalmente encontrada en los terminales nerviosos presinápticos y en porciones de la envoltura nuclear, de ahí su nombre (Maroteaux et al., 1988). Estudios posteriores no han podido confirmar su localización nuclear, y hoy es considerada una proteína presináptica, vinculada a las vesículas sinápticas. Tanto la α - como la β -synucleína parecen estar relacionadas con la plasticidad neuronal, ya que los mayores niveles de proteína y ARNm se encuentran en regiones relacionadas con las modificaciones sinápticas dependientes de la experiencia (Clayton and George, 1998). En estudios histológicos se ha encontrado que la α -synucleína se encuentra en muy altos niveles en los LB, sugiriendo un rol de esta proteína en la PD (Spillantini et al., 1998). Las razones por las cuales estas proteínas se agregan en la patología se desconocen, pero análisis estructurales revelan que ellas presentan dos estructuras estables una de las cuales promueve la agregación, integrando así la categoría de prion (Weinreb et al., 1996).

I.b. La vulnerabilidad selectiva.

Los pacientes con la enfermedad de Huntington, con la PD y con esclerosis lateral amiotrófica pueden desarrollar demencia, reflejando una patología cortical tardía en la enfermedad. Los pacientes con la enfermedad de Alzheimer frecuentemente desarrollan parkinsonismo. Así, la vulnerabilidad selectiva no es un fenómeno absoluto sino que refleja una interacción entre dos características: (1) cada enfermedad afecta poblaciones de neuronas en diferente medida a lo largo del tiempo; y (2) la considerable plasticidad del sistema nervioso permite que haya compensación funcional hasta el momento en que el daño es tan grande que provoca los síntomas (Hardy and Gwinn-Hardy, 1998). El resultado de la interacción entre estos dos factores es que las patologías muchas veces dan la ilusión de ser un único síntoma clínico en un determinado momento, cuando en realidad tienen un efecto más global que afecta a los sistemas funcionales en diferentes momentos a lo largo de la historia natural de la enfermedad. La mayor parte de la enfermedad –de hecho, el período en el que un tratamiento sería crítico- probablemente tiene lugar mucho antes de que se manifiesten los síntomas.

Aunque la noción de vulnerabilidad selectiva es una sobresimplificación, las neuronas de la substantia nigra poseen diversas características que las hacen altamente susceptibles al daño oxidativo: (1) la síntesis de catecolaminas lleva a una producción fisiológica relativamente alta de radicales libres de oxígeno (RO^{\cdot}); (2) estas neuronas contienen grandes cantidades de hierro (Graeber and Müller, 1998); (3) la neuromelanina, un pigmento que se acumula particularmente en la substantia nigra humana, tiene como precursores a las quinonas que se producen por la oxidación de la dopamina, la norepinefrina o la epinefrina, sirviendo así de depósito de estos productos tóxicos. De hecho, la cantidad de este pigmento en estas neuronas está inversamente relacionada con la PD y la enzima inhibitoria de la migración de macrófagos (MIF), que está involucrada en la síntesis de neuromelanina y por lo tanto en la detoxificación, tiene una ubicación cromosomal (22q11.2) muy cercana a una mutación de la PD (22q13) (Matsunaga et al., 1999). No parece casual, sino causal, que los modelos animales de la PD (tanto la lesión con MPP^{+} como con 6-hidroxidopamina, 6-OHDA) involucren ambos la generación de RO^{\cdot} y el consecuente daño oxidativo.

I.c. El tratamiento de la enfermedad: ¿por qué una terapia génica?

Debido al desconocimiento del factor etiológico, el tratamiento de la enfermedad se ha focalizado en intentar el mejoramiento de los síntomas. En 1960, un grupo de Suecia describió la posibilidad de mejorar los síntomas de la enfermedad de Parkinson mediante la lesión térmica del globus pallidus (Svinnilson et al., 1960). Pero en 1967 la droga L-Dopa revolucionó el tratamiento, permitiendo el mejoramiento farmacológico de los síntomas de la enfermedad (Cotzias et al., 1967), y haciendo que la intervención neuroquirúrgica fuera descartada por muchos médicos. La administración de esta droga junto con inhibidores de la decarboxilasa de aminoácidos periférica (por ej. benserazida), si bien ha permitido observar resultados asombrosos en el corto plazo, pierde lamentablemente efectividad con el tiempo y produce efectos colaterales motores adversos y debilitantes como diskinesias y akinesias (Hagan et al., 1997). Esto, junto con diversos estudios que han revelado los detalles de las conexiones de los núcleos involucrados en el control de las funciones motoras, ha provocado un resurgimiento de las intervenciones neuroquirúrgicas, con éxito variado (resumidas en (Graybel, 1996)).

Por otro lado, como para muchos la idea de dañar más un circuito para eliminar el problema surgido por la pérdida de ciertas neuronas es contra-intuitivo, otra estrategia terapéutica es la de transplantar nuevas células allí donde algunas se han perdido. Más

de 200 pacientes han recibido transplantes en el mundo (Olanow et al., 1996). Se han confirmado mejoramientos clínicos mediante estudios funcionales, los cuales se han correlacionado con la supervivencia del transplante y con la innervación del estriado huésped en estudios postmortem de los pacientes intervenidos (Kordower et al., 1995). Dos estudios clínicos controlados, promovidos por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América (NIH) están teniendo lugar con tejidos mesencefálicos fetales en un número mayor de pacientes y se planea otro ensayo de varios centros en Europa. Además, estudios recientes en modelos animales han logrado restaurar histológica, fisiológica y funcionalmente la vía nigroestriatal (Zhou et al., 1996). Sin embargo, aunque todos estos resultados son promisorios, los transplantes neuronales siguen siendo un procedimiento controvertido, con varias dificultades éticas y técnicas que llevan a buscar diversas alternativas (por ejemplo, (Rosenthal, 1998), (Studer et al., 1998), (Sanberg et al., 1997)).

Por todo esto, aún es necesario el desarrollo de terapias que permitan el tratamiento y, si es posible, la cura de esta enfermedad. La terapia génica consiste en la transferencia de un gen activo a una célula huésped. Conceptualmente, la técnica involucra la identificación de secuencias de ADN y de tipos celulares apropiados, y el desarrollo de formas adecuadas de transferencia de suficiente ADN a esas células, de forma de alcanzar la producción de ARN o proteína deseadas. Con una transferencia adecuada del gen terapéutico, los tratamientos pueden ir desde la reversión de una enfermedad genética o la disminución del crecimiento tumoral, hasta combatir una infección viral o detener una enfermedad neurodegenerativa (Verma and Somia, 1997).

En las enfermedades no exclusivamente genéticas (como la PD) los genes terapéuticos pueden codificar para moléculas neurotróficas, agentes anti-apoptóticos, citoquinas, neurotransmisores, o receptores. Así, en los modelos animales de la PD se han ensayado diversas terapias génicas. La transferencia de ADN mediante un vector adenoviral codificante para la tirosinhidroxilasa (TH, enzima limitante de la síntesis de dopamina) en rata lesionadas con 6-OHDA demostró mejoras comportamentales a corto plazo (reducción del comportamiento rotatorio inducido por apomorfina hasta 2 semanas después de la transferencia genética (Horellou et al., 1994)). La utilización de un vector bicistrónico expresando la TH junto con la enzima decarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC, responsable de la conversión de L-Dopa en dopamina) en monos tratados con la toxina MPTP, también mostró mejoras comportamentales que perduraron más de 2 meses (During et al., 1998). Sin embargo se necesitarán estudios a

largo plazo para descartar la existencia de síndromes hiperdopaminérgicos o efectos colaterales similares a los observados con L-Dopa en estos tipos de tratamiento.

La neuroprotección se refiere, en términos terapéuticos, a las intervenciones que producen beneficios perdurables mediante la alteración de la etiología o la patogenia y de esa manera detienen el inicio de la enfermedad o el decaimiento clínico (Shoulson, 1998). Los mecanismos de patogénesis pueden involucrar factores de propagación, que pueden ser autosostenibles, por ejemplo estrés oxidativo, actividad de radicales libres, excitotoxicidad, acumulación de agregados intracelulares, inmunogenicidad, disfunción mitocondrial, y apoptosis. Estos conceptos son la base de otro tipo de terapia génica ensayada para la PD: la transferencia de factores neurotróficos. GDNF, un factor neurotrófico de las neuronas dopaminérgicas, ha sido utilizado con éxito en diversos modelos animales de la PD (Choi-Lundberg et al., 1997; Tomac et al., 1995; Gash et al., 1996), e incluso en el modelo utilizado en este seminario (Sauer et al., 1995; Bilang-Bleuel et al., 1997). Otros factores neurotróficos que habían demostrado proteger a las neuronas dopaminérgicas en cultivo (por ejemplo, TGF- β 3), han resultado en cambio ineficaces *in vivo* (Sauer et al., 1995). Sin embargo, resultados preliminares y no publicados de ensayos clínicos de terapia génica con GDNF para la PD no han sido tan contundentes, posiblemente debido al estado avanzado de la enfermedad de los pacientes que ingresan a ese tipo de protocolos.

Así, la búsqueda de nuevos genes terapéuticos para este tipo de terapias es de vital importancia para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento. En respuesta a daño o a infección, la inflamación es una espada de doble filo, con un número de condiciones neuropatológicas importantes que exhiben el lado negativo de la respuesta. Las citoquinas pueden provocar gliosis (aumento en el número de células no neuronales, hipertrofia de los cuerpos celulares de la glía y otros cambios celulares), reacciones de complemento, activación de proteasas y de microglía, además de una amenaza tóxica por sí mismas. Pero, por otro lado, las citoquinas pueden controlar la respuesta inflamatoria y actuar como factores neurotróficos (Patterson, 1995). Descifrar la acción de las citoquinas en un modelo animal en particular representa así una oportunidad de revelar una opción terapéutica, y representan junto con las neurotrofinas los candidatos más firmes para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

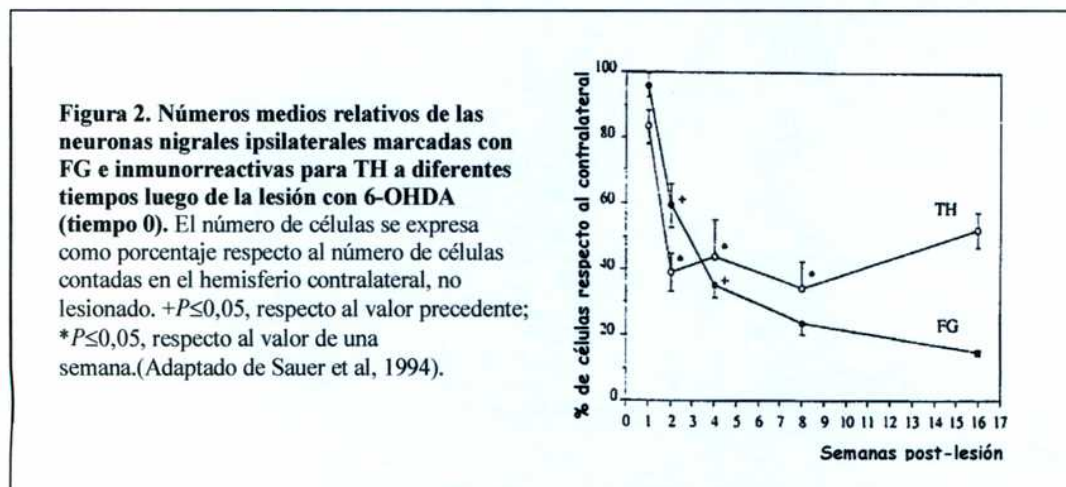
II. Los modelos animales.

Existen varios modelos animales para el estudio de los eventos que involucran la degeneración de la substantia nigra en la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, la mayoría de los modelos lamentablemente no representan un adecuado paradigma de neurodegeneración progresiva, la cual es característica de la enfermedad.

El modelo murino de degeneración de células nigrales actualmente en uso involucra la degeneración de las neuronas dopaminérgicas luego de la inyección de 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina (MPTP). El ion MPP^+ interfiere con el complejo I de la cadena de transporte de electrones, provocando la depleción de energía de la célula y su estrés oxidativo por radicales libres (Nussbaum and Polymeropoulos, 1997). Sin embargo no causa una condición neurodegenerativa progresiva sino un insulto tóxico agudo, diferenciándose así de las características progresivas de la enfermedad.

El modelo de inyección de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en el estriado de la rata utilizado en este seminario, por otro lado, presenta características degenerativas progresivas (Sauer and Oertel, 1994). La 6-OHDA es incorporada a los terminales dopaminérgicos por medio de los transportadores de DA de alta afinidad. Allí, su oxidación resulta en la formación de radicales hidroxílicos, que reaccionan con azúcares y fosfolípidos llevando finalmente a la pérdida de la integridad de la membrana y a la destrucción de los terminales.

En la caracterización de este modelo (Sauer and Oertel, 1994) se inyectó un marcador retrógrado llamado fluorogold (FG) en el estriado, 7 días antes de la lesión y en los dos hemisferios. Este marcador permite seguir la degeneración de las neuronas dopaminérgicas que inervan la zona que rodea al sitio de inyección. Una semana después se inyectó la toxina en uno sólo de los estriados siguiendo luego los fenómenos provocados por la lesión. La 6-OHDA causa una rápida degeneración de los terminales nigroestriales a las 24 horas, provocando una forma de "axotomía química" que aísla a los cuerpos celulares nigrales de sus estructuras blanco estriales. La degeneración continúa a partir de ese momento progresivamente, perdiéndose parte de la inmunorreactividad para TH dentro de la semana y observándose un encogimiento de los cuerpos neuronales dopaminérgicos. La muerte neuronal (estimada por el número de células marcadas con FG) se evidencia a partir de las 2 semanas luego de la lesión, comparando con el hemisferio contralateral, y a partir de ese momento crece asintóticamente (**Figura 2**).



En los animales sacrificados 1 y 2 semanas después de la lesión se observaron pequeñas cicatrices necróticas en el sitio de inyección, en general asociadas a pequeñas hemorragias. A tiempos mayores no se observó ninguna hemorragia.

El número de células marcadas con FG e inmunorreactivas para TH es significativamente menor en el hemisferio lesionado a partir de las 2 semanas, aunque no presenta diferencias a lo largo del tiempo. En el lado no lesionado también se observan diferencias significativas entre el número de células marcadas con FG a una semana y todos los otros tiempos (Tabla 2).

Tabla 2. Caracterización a diferentes tiempos de las neuronas nigrales ipsilaterales y contralaterales a la lesión con 6-OHDA intra-estriado. (Adaptado de Sauer et al, 1994.)

	Número medio de células con FG (rango)		Número de células positivas para TH (rango)		% de células con TH y FG (rango)	
	ipsilateral	contralateral	ipsilateral	contralateral	ipsilateral	contralateral
1 semana post 6-OHDA (n = 8)	98,1 ± 4,9 (78-126)	102,9 ± 4,6 (81-117)	143,6 ± 7,4 * (99-168)	175,5 ± 11,8 (145-241)	69,4 ± 5,4 (45-91)	79,4 ± 1,4 (75-87)
2 semanas post 6-OHDA (n = 8)	54,6 ± 5,4 ** (30-77)	94,4 ± 4,9 (79-117)	71,7 ± 11,5 ** (34-112)	184,7 ± 7,8 (159-227)	51,5 ± 6,5 ** (28-74)	75,3 ± 1,5 (70-84)
4 semanas post 6-OHDA (n = 8)	29,1 ± 2,5 ** (21-41)	85,2 ± 4,6 (61-102)	77,9 ± 18,8 ** (22-141)	188,6 ± 11,0 (140-251)	62,5 ± 2,4 ** (53-76)	88,9 ± 1,3 (83-94)
8 semanas post 6-OHDA (n = 8)	17,6 ± 2,5 ** (7-27)	75,1 ± 3,6 (61-89)	66,4 ± 17,2 ** (10-143)	193,2 ± 6,5 (172-227)	68,6 ± 6,5 ** (34-89)	88,1 ± 2,3 (80-98)
16 semanas post 6-OHDA (n = 8)	9,6 ± 1,0 ** (9-13)	65,4 ± 2,1 (60-72)	75,8 ± 8,4 ** (51-100)	146,8 ± 14,3 (121-199)	75,8 ± 1,2 ** (72-80)	89,9 ± 1,6 (85-95)

Cuando se comparan con el hemisferio contralateral no lesionado: la pérdida de neuronas nigrales marcadas con FG es significativamente menor a partir de las 2 semanas, el número de células expresando TH es significativamente menor a todos los tiempos, y el número de células expresando TH y marcadas con FG es significativamente menor a partir de las 2 semanas. Prueba t de Student pareada, ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$ comparado con el contralateral.

De esta forma se evidenciaron 2 fenómenos temporales en respuesta a la lesión. Primero, el número de células marcadas con FG muestra una disminución en el intervalo medido, y el inicio de la pérdida neuronal se encuentra entre 1 y 2 semanas post-lesión. Por el contrario, el número de células positivas para TH alcanza sus valores más bajos a las 2 semanas de hacerse la lesión, después de lo cual se recuperan un poco o se mantienen esencialmente sin cambios.

Si bien los autores proponen que el fenómeno observado en el lado contralateral a la lesión podría deberse a la pérdida de FG de las neuronas y por lo tanto este parámetro sólo serviría mediante la comparación entre hemisferios del mismo animal, también han considerado otros trabajos en los que se reportan efectos de la lesión con 6-OHDA en el estriado contralateral a la inoculación.

III. Los factores neurotróficos.

Los factores neurotróficos (FNT) pueden definirse como factores de crecimiento que actúan directamente sobre las neuronas, regulando su crecimiento, diferenciación y supervivencia (Yuen and Mobley, 1996). Pero la distinción entre las diferentes familias de proteínas que componen este grupo resulta arbitraria, y se debe en general al desarrollo histórico de la investigación en este campo de la neurobiología, que no revela las múltiples y superpuestas funciones que estas moléculas tienen. Sin embargo, es posible cierta clasificación en función de similitudes estructurales tanto de las proteínas como de sus receptores, que revelarían sus historias evolutivas. Así se podrían dividir los factores neurotróficos en (1) neurotrofinas (NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5), (2) citoquinas neurotróficas (CNTF y CDF/LIF), (3) superfamilia de TGF- β (TGF- β 1, 2 y 3, GDNF, PSP y NTN), (5) citoquinas pro-inflamatorias (interleuquinas y TNF- α), (6) familia de FGF (aFGF y bFGF) y (7) familia de EGF (TGF- α y EGFs). (Ver lista de Abreviaturas).

El uso de factores neurotróficos en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas tendrá éxito en cualquiera de los siguientes escenarios. Primero, si la enfermedad es resultado, directo o indirecto, de la falta de un FNT; en este caso, la administración del FNT revertiría el déficit. Segundo, si la enfermedad involucra la disminución del número de receptores de un determinado FNT, dando cantidades farmacológicas del FNT se podría superar el déficit. Tercero, la enfermedad ha disminuido el nivel de una función metabólica o de un substrato crítico para la función

celular, y este sustrato es regulado positivamente por el FNT. Dando niveles suprafisiológicos del factor se podrían aumentar los niveles del sustrato y bloquear la disfunción y la muerte neuronal (Yuen and Mobley, 1996).

El estudio de la expresión de FNT durante la degeneración en un modelo animal, permitiría identificar potenciales moléculas relacionadas con la función y la supervivencia neuronal. Sin embargo en este estudio ha de tenerse en cuenta que los FNT presentan complicaciones adicionales en su estudio, por ciertas características que los diferencian de otros factores de crecimiento.

Primero, cada FNT tiene diversos efectos sobre distintas poblaciones neuronales. Por ejemplo, el factor de crecimiento nervioso derivado de cerebro (BDNF) aumenta la supervivencia de neuronas dopaminérgicas y no de otras en cultivos primarios (Hyman et al., 1991). Además tiene efectos postsinápticos rápidos, que incluyen el aumento en la frecuencia y la amplitud de la depolarización de la célula muscular en la unión neuromuscular en desarrollo (en *Xenopus*). Y, en las sinapsis del hipocampo del SNC adulto de mamíferos, el agregado de esta neurotrofina permite el desarrollo de LTP (potenciación a largo plazo) (Altar and DiStefano, 1998).

Segundo, los receptores de estas moléculas presentan una fuerte superposición entre sus ligandos. Por ejemplo, TrkA (tirosinquinasa A) tiene afinidad por NGF y BDNF; TrkB por BDNF, NT-3 y NT-4; TrkC sólo por NT-3; y p75 por las cuatro neurotrofinas. Lo mismo sucede con los receptores de la familia del factor de crecimiento nervioso derivado de la glía (GDNF). Esto presenta ventajas, por ejemplo permitiendo el diseño de neurotrofinas de especificidades múltiples como una alternativa a la terapia combinada (Ibañez, 1998). Pero también podría explicar la ausencia del fenotipo esperado en los animales con mutaciones nulas de los diferentes factores neurotróficos. Por ejemplo, los ratones GDNF^{-/-} no presentan déficit de neuronas dopaminérgicas ni motoras, el cual sería el fenotipo esperado ya que este FNT permite la supervivencia y función de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio ventral embrionario *in vitro* (Mildbrandt and al, 1998).

Tercero, la interacción de una molécula con uno o más de sus receptores puede estimular la diferenciación y supervivencia o la apoptosis neuronal. Estas acciones cooperativas implican que las posibilidades de señalización extracelular son enormes. La regulación de las decisiones de diferenciación y proliferación celular dependen así de los efectos combinados de múltiples receptores y de la duración de segundos mensajeros y eventos de fosforilación. Por ejemplo, el receptor p75 de neurotrofinas tiene dominios

intracelulares similares a los del antígeno Fas y al receptor p55 del factor de necrosis tumoral (TNF). La unión del factor de crecimiento nervioso (NGF) a este receptor causa la muerte celular en la retina en desarrollo del pollo, y en otros modelos neuronales. Sin embargo, la co-expresión del receptor trkA (a quien también se une NGF) suprime la transducción de señal de p75, provocando otra respuesta que puede llegar a ser la diferenciación y supervivencia (Chao et al., 1997).

Cuarto, una característica única de los factores neurotróficos es que en muchas ocasiones son sintetizados a grandes distancias de los somas de las células sensibles a ellos. De esta forma puede tener efectos locales en los axones que inervan las células que los sintetizan, así como influencias más generales en la expresión genética en el soma vía el transporte retrógrado (Snider, 1994). También existe transporte anterógrado que dirige el FNT hacia las células inervadas por la neurona que lo sintetiza. Esto hace que muchas veces no se encuentre el ARNm del FNT allí donde estudios de inmunohistoquímica han revelado su presencia, o donde se ha detectado la presencia de su receptor, y que los cambios en los niveles de expresión deban buscarse a grandes distancias del sitio donde ocurre la neurodegeneración. Esto implica conocer las conexiones de la zona de estudio con el resto del cerebro. Por ejemplo, se ha detectado la proteína de BDNF en el estriado de rata más no su ARNm. Se observó que la decortificación depleta el estriado ipsilateral de proteína BDNF en dos tercios y en aproximadamente un tercio el contralateral (estas disminuciones son proporcionales a la densidad de innervación). Por otro lado, lesiones unilaterales de la vía no cruzada nigro-estriada disminuyen BDNF en menor grado y solo en el estriado ipsilateral. La ablación selectiva de neuronas del estriado no disminuye el BDNF de esta región. De todo esto se puede deducir que BDNF deriva de transporte anterógrado de los aferentes corticales, y en menor medida de los nigrales (Altar et al., 1997; Altar and DiStefano, 1998).

Tomando esto en cuenta, el estudio relativo de la variación de la expresión de FNT durante la degeneración producida por la toxina 6-OHDA se revela como un método adecuado para el análisis de aquellos FNT que puedan estar involucrados en este fenómeno. Este es un paso inicial para el posterior estudio de una posible terapia génica en la enfermedad de Parkinson, permitiendo la potencial identificación de FNT que permitan la recuperación neuronal y/o el alivio de los síntomas.

III.a. El factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro (BDNF).

El BDNF es una proteína básica dimérica de 28kDa de dos subunidades de 14kDa no covalentemente ligadas, estructuralmente relacionadas con NGF (Connor and Dragunow, 1998). En el cerebro de rata normal (sin ningún tipo de tratamiento) se ha verificado que tanto la proteína como el ARNm que la codifica presentan una amplia distribución en todo el SNC (Conner et al., 1997). Particularmente, en ese trabajo se detectaron en la substantia nigra pars compacta fibras débilmente inmunorreactivas para BDNF así como células positivas, además de una señal moderada a alta del ARNm.

Los resultados *in vitro* sugieren un rol de BDNF en la neuroprotección de las neuronas dopaminérgicas. En neuronas de animales transgénicos (expresando el SV40Tag termolábil bajo el promotor de TH), BDNF protege contra la toxicidad de MPP⁺, glutamato y NO, pero no de DA (Son et al., 1999). En las células mesencefálicas ventrales de rata en E14 (embrión de 14 días), BDNF también aumenta la supervivencia de células positivas para TH y protege contra la toxicidad de MPP⁺ (Hyman et al., 1991).

In vivo también han habido resultados positivos con esta neurotrofina. El transplante de diferentes tipos celulares expresando BDNF, atenúa la pérdida de neuronas dopaminérgicas tanto en el modelo de lesión con 6-OHDA en rata como en el de MPTP en ratón (ver (Connor and Dragunow, 1998) y citas allí). Por otro lado, resultados recientes demuestran que la lesión mecánica induce a los macrófagos y la microglía activos a la producción tanto de BDNF como de GDNF, y que ello resulta en una activa ramificación de las neuronas dopaminérgicas (Batchelor et al., 1999).

Por otro lado, en la substantia nigra de pacientes con la PD, los niveles del receptor de BDNF (trkB) no están alterados (Benisty et al., 1998). Sin embargo en el estriado ipsilateral a la lesión con 6-OHDA en rata tiene lugar un aumento significativo en la densidad de hibridación para trkB (Numan and Seroogy, 1997).

III.b. Las citoquinas en el sistema nervioso central.

La expresión de citoquinas en el cerebro tanto constitutiva como induciblemente, ha sido observada recientemente tanto por nuestro grupo como por otros (Besedovsky, 1996; Pitossi et al., 1997). Estas moléculas tienen diversos efectos en el SNC (para una revisión del conocimiento actual ver (Besedovsky, 1996; Hopkins and Rothwell, 1995; Rothwell and Hopkins, 1995), que incluyen la regulación de la supervivencia neuronal.

De esta manera, ciertos roles de las citoquinas hacen que exista una tendencia a agruparlas con los otros FNT. Se pueden considerar, como ejemplos:

- 1) *la acción a distancia*: La infusión de IL-1 en el estriado de rata, pero no en la corteza, aumenta masivamente el daño excitotóxico cortical. IL-1 podría ser transportada (posiblemente por una vía retrógrada) desde el estriado hacia sitios específicos en la corteza, aunque no hay que descartar la posibilidad de que estimule la liberación de otros mediadores que podrían alcanzar la corteza (Rothwell et al., 1996). Esta forma posible de neuroprotección a distancia (del soma) es una característica compartida con otros FNT.
- 2) *la diferente respuesta según el fenotipo neuronal*: La infusión local de IL-6 previene a las neuronas colinérgicas del estriado de rata de los efectos excitotóxicos del NMDA, pero no a las neuronas GABAérgicas de la misma región (Gadient and Otten, 1994).
- 3) *la existencia de receptores compartidos*: La proteína gp130, que es el receptor de LIF y de CNTF, tiene un sitio de interacción común con el complejo IL-6 - IL-6R (que carece de dominio intracelular de señalización) (Taga et al., 1989).

Pero, si bien las citoquinas tienen profundos efectos neuroprotectores o neurodegenerativos que permiten incluirlas dentro de la categoría de FNT, hay ciertas características que hacen que deban ser consideradas como un grupo aparte. Por un lado, la mayoría de las neurotrofinas son producidas por las neuronas del SNC, mientras que si bien se ha descrito la producción neuronal de citoquinas (Schöbitz et al., 1993), las células que mayormente contribuyen a su síntesis parecen ser las células de la glía (por ejemplo, (Hirota et al., 1996)). Por otro lado, el estudio de animales transgénicos cuyos astrocitos expresan IL-6 reveló que presentan neurodegeneración específica de ciertas regiones del SNC (revisado en (Campbell, 1997)), mientras que este comportamiento no se observa en los animales transgénicos para diversas neurotrofinas.

III.b.1. Interleuquina-1beta (IL-1 β).

La IL-1 es una citoquina responsable de la mediación de una variedad de procesos de defensa del organismo, inflamación y respuestas a lesiones. Aunque inicialmente fue descrita como producto de macrófagos activados, se la ha detectado en una variedad de células, incluyendo fibroblastos, queratinocitos de la piel, linfocitos T y B, así como astrocitos y células de la microglía del SNC (Arai et al., 1990). Existen

dos moléculas relacionadas, IL-1 α e IL-1 β , que están codificadas por distintos genes pero interactúan con el mismo receptor. Se sintetizan como precursores de 31kDa que son activados por la enzima convertidora de IL-1 (ICE o caspasa-1) (Loddick et al., 1997).

Se han descripto complejos efectos de IL-1 en el SNC. Por ejemplo, el pretratamiento de cultivos de neuronas corticales con IL-1 β protege contra la excitotoxicidad por aminoácidos, posiblemente vía inducción de NGF, mientras que altas concentraciones de IL-1 β resultan neurotóxicas *per se* (Strijbos and Rothwell, 1995). *In vivo*, la administración de lipopolisacáridos o IL-1 β en el hipocampo produce una disminución en la expresión de BDNF (Lapchak et al., 1993).

En el modelo de la PD por lesión con MPTP, se ha demostrado un aumento específico de IL-1 α en los animales lesionados, que se correlaciona con las ramificaciones dopaminérgicas compensatorias observadas en los animales jóvenes (Ho and Blum, 1998). Esta inducción no se observa en los animales viejos y, debido a que en éstos no hay restauración de las conexiones, se sugiere un rol de IL-1 α en la recuperación de la lesión. Además, es de notar que este trabajo revela la presencia de receptores para IL-1 en las mismas neuronas dopaminérgicas, por lo cual el efecto de la citoquina podría ser directo.

Resultados previos, demostraron un aumento de IL-1 β 6 días después de la lesión con 6-OHDA en el estriado ipsilateral, en las mismas muestras analizadas en este seminario (Depino et al., 1998), sugiriendo un posible rol de esta citoquina en el modelo de neurodegeneración en estudio. En cambio, no se detectaron cambios en sus niveles de expresión en la corteza.

III.b.2. Interleuquina-6 (IL-6).

La IL-6 es una citoquina principalmente liberada (junto con IL-1 y TNF α) por monocitos/macrófagos luego de su estimulación, aunque los linfocitos T "helper" del tipo 2 también la producen. En la respuesta inmune, IL-6 está involucrada en la estimulación de la secreción de inmunoglobulinas y en la activación de las células T (Hirano et al., 1990). El receptor de IL-6 está compuesto por una subunidad de unión del ligando α y una cadena de transducción de señal gp130 (Taga et al., 1989). Se ha visto que IL-6 regula diversas funciones como la diferenciación de células "stem" del sistema inmune, la formación de plaquetas, la inhibición de la lipasa de lipoproteínas de

los adipocitos, la estimulación de la supervivencia neuronal y la alteración del fenotipo de neurotransmisor (Muñoz-Fernandez and Fresno, 1998).

En el SNC se ha detectado una amplia expresión de IL-6, tanto en células de la glía como en neuronas (Schöbitz et al., 1993). Esta citoquina, al igual que otros FNT, puede tener efectos opuestos sobre las neuronas, ya favoreciendo su supervivencia luego de una lesión como causando su degeneración. El estudio de animales transgénicos que sobre-expresan IL-6 en sus astrocitos, ha revelado que esta citoquina puede por sí misma causar una enfermedad neurológica asociada con extensos cambios neuropatológicos, que incluyen daño neuronal, astrocitosis reactiva y angiopatía proliferativa (Campbell et al., 1993). Asimismo, estos animales presentan déficits de aprendizaje asociados tanto al nivel de expresión del transgen como a la edad (Heyser et al., 1997), sugiriendo un rol de esta citoquina en enfermedades como la descrita por Alzheimer. En cambio, la sobre-expresión de IL-6 y su receptor en el sistema nervioso periférico permite una regeneración más rápida del nervio luego de una axotomía (Hirota et al., 1996). En cultivo, IL-6 protege a las neuronas dopaminérgicas fetales de rata de la toxicidad de MPP⁺ (Akaneyra et al., 1995).

Resultados previos, no demostraron ningún cambio en los niveles de IL-6 provocados por la lesión con 6-OHDA en las mismas muestras analizadas en este seminario (Depino et al., 1998), correspondientes tanto al estriado como a la corteza, en ninguno de los tiempos analizados.

III.b.3. Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α).

TNF- α es una citoquina producida principalmente por las células activas del sistema inmune, mientras que en el SNC se expresa en muy bajos niveles y especialmente en los astrocitos (Mattson et al., 1996). Se produce mayormente como una proteína de 17kD secretada, aunque también existe una forma de membrana que tiene actividad citotóxica y un rol importante en la comunicación intercelular. La producción de TNF α se induce por varios estímulos, incluyendo mitógenos, IL-1 y 2, e interferones. Existen dos tipos de receptores para TNF, denominados p55 y p75, que son expresados tanto por las células de la glía como por las neuronas. El receptor de p55 activa una vía de transducción de señales que incluye a la enzima esfingomielinasa, que induce la liberación de ceramida de la esfingomielina, y que lleva finalmente a la activación del factor de transcripción NF- κ B. p75 está asociado a las proteínas

citoplasmáticas TRAF1 y TRAF2 que son miembros de la familia de las proteínas inhibitorias de la apoptosis.

Se ha descrito la producción de TNF- α por astrocitos, microglía, y neuronas frente a múltiples estímulos fisiológicos y patológicos (ver en (Muñoz-Fernandez and Fresno, 1998)). TNF- α tiene diferentes efectos en distintos tipos celulares del SNC respecto a la proliferación y/o supervivencia. TNF puede afectar tanto a los astrocitos como a la microglía, en los que induce proliferación, como a los oligodendrocitos y las neuronas, sobre los cuales es tóxico en altas concentraciones. Además, TNF puede inducir cambios de reactividad en la microglía, incluyendo la producción de superóxidos y la liberación de factores citotóxicos. Asimismo, la sobreproducción continua de TNF soluble en animales transgénicos lleva al desarrollo de enfermedades neuronales, independientemente del tipo celular que lo produce (Akassoglou et al., 1997).

En cambio, se ha demostrado que en ratones que carecen de TNF α o de ambos receptores para TNF α , hay un aumento del daño neuronal provocado tanto por convulsiones causadas por la administración de ácido kaínico en el hipocampo, por isquemia cerebral debida a la oclusión de la arteria cerebral media (Bruce et al., 1996) como por inmunización con glicoproteínas de mielina de oligodendrocitos (Liu et al., 1998). Además, en estos experimentos la activación de la microglía está reducida, por lo que el aumento en la neurotoxicidad no se debe a un aumento en la producción de toxinas por estas células. Así se muestra que TNF α tiene un rol neuroprotector en estos modelos. TNF α podría ejercer su efecto neuroprotector *in vivo* induciendo las vías antioxidantes en las neuronas, como se ha demostrado que ocurre *in vitro* (Barger et al., 1995). En cultivo, el pretratamiento de células de hipocampo con esta citoquina tiene un efecto neuroprotector que atenúa los mecanismos implicados en la toxicidad del péptido β -amiloide (hay una menor producción de RO \cdot) y del glutamato (regulación más rápida de la $[Ca^{2+}]_i$ debido a la inducción de calbindina), efectos dependientes de la activación del factor de transcripción NF- κ B (y por lo tanto de la activación del receptor p55).

III.b.4. Interleuquina-2 (IL-2).

La IL-2 fue originalmente descrita como una linfoquina presente en los medios condicionados de linfocitos humanos estimulados por antígenos o mitógenos, que aumentaba la mitogénesis de los timocitos y mantenía el crecimiento *in vitro* de líneas

de células T (Arai et al., 1990). La IL-2 es secretada principalmente por los linfocitos T "helper" luego de 4-12 horas de haber sido estimulados por la unión de un antígeno al receptor de la célula T. IL-2 induce la proliferación de los linfocitos T, estimula la secreción de citoquinas, aumenta la expresión de receptores de membrana para otros factores de crecimiento (por ejemplo, receptores de transferrina y de insulina) y de las moléculas de histocompatibilidad clase II. También actúa sobre macrófagos, células B activadas, células "natural killer", y otras células citotóxicas, lo cual ha llevado a su utilización en inmunoterapias para el cáncer y las enfermedades infecciosas.

La IL-2 se detecta en el cerebro normal de rata, principalmente en el hipocampo, el estriado y la corteza frontal, pero también en la eminencia media, en el cerebelo, en el tálamo y en el cuerpo calloso (Araujo et al., 1989). Sin embargo sólo se detectaron sitios de unión a IL-2 en el hipocampo.

IL-2 afecta directamente la función de neuronas y glía en el sistema nervioso. Especialmente puede inducir la proliferación y diferenciación o causar la muerte de los oligodendrocitos, dependiendo del estado de maduración de las células (Benveniste and Merrill, 1986). Además, la lesión del hipocampo con ácido kaínico aumenta la densidad de inmunorreactividad para IL-2, indicando que esta citoquina estaría vinculada a la respuesta a la lesión. La lesión mecánica en la región entorhinal/occipital provoca un pico de IL-2 10 días después de la lesión (7 días después del pico de IL-1 inducido por la lesión), indicando que posiblemente en el cerebro (al igual que en el sistema inmune) IL-2 sea inducida por IL-1 (Nieto-Sampedro and Chandy, 1987).

IL-2 tiene también varias funciones neuromoduladoras. Disminuye la liberación de noradrenalina evocada por potasio y altera significativamente la liberación de acetilcolina evocada por potasio (25mM) en rebanadas de hipocampo, funcionando así como modulador de la transmisión noradrenérgica y colinérgica (Araujo et al., 1989). También se ha visto que aumenta la liberación de dopamina en rebanadas de estriado, modula la liberación de dopamina por neuronas mesencefálicas evocada por potasio, NMDA y kainato (ver en (Otero and Merrill, 1997) y citas allí).

Se han detectado niveles aumentados de IL-2 en plasma (Stypula et al., 1996) y en el estriado de pacientes con PD, sin detectar diferencias en la corteza respecto a individuos controles (Mogi et al., 1996). Por otro lado, se ha detectado un aumento significativo de IL-2 en hipocampos postmortem de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, pero no en hipocampos de individuos con PD (Araujo and Lapchak, 1994), indicando que este aumento es específico para la zona en neurodegeneración.

III.c. El factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β).

Los TGF- β s fueron primero caracterizados como proteínas que estimulaban a las células normales de riñón de rata para que formaran colonia (Roberts et al., 1981). Ahora los TGF- β s son reconocidos como los prototipos de los factores de crecimiento multifactoriales. Regulan una variedad de importantes funciones celulares y tisulares, como el crecimiento celular y la diferenciación, la angiogénesis, la función inmune, la producción de matriz extracelular, la quimiotaxis celular, el proceso de apoptosis y la hematopoyesis. Son los prototipos de una superfamilia de factores de crecimiento de aproximadamente 25 miembros que incluyen las activinas, las inhibinas, las proteínas morfogénicas de hueso, los factores de crecimiento y diferenciación y el GDNF (Massagué et al., 1994). El TGF- β activo es un homodímero unido por puentes disulfuro de dos cadenas de 112 aminoácidos. Cada monómero tiene 9 cisteínas, las que se encuentran en posición 77 forman la unión del dímero y el resto forma puentes intracatenarios (Daopin et al., 1992).

En mamíferos hay descritas 3 isoformas de TGF- β s (TGF- β 1 al 3) que comparten la misma estructura básica y en general muestran actividades similares en los ensayos *in vitro*, aunque la multiplicidad de formas y la fuerte conservación entre las especies animales, sugieren la existencia de roles específicos para cada una (Flanders et al., 1998). Las 3 formas tienen distintos promotores y diferentes regiones no traducidas 5' y 3' que regulan la transcripción y la traducción, respectivamente. Por ejemplo, el promotor de TGF- β 1 no tiene región TATA ni CAAT, pero sí un número de sitios de unión de proteínas regulatorias importantes como AP-1, AP2, NF- κ B, entre otras (Guron et al., 1995). De esta forma, el promotor de TGF- β 1 se activa por heridas, isquemia o anoxia, mientras que TGF- β 2 y 3 (que sí tienen región TATA con una zona de respuesta a AMP cíclico 5' de ella) se regulan principalmente por hormonas y señales de desarrollo.

En el SNC de rata, los TGF- β s se expresan en todas las áreas, incluyendo corteza, hipocampo, estriado, bulbo raquídeo, cerebelo y médula espinal. Además, se han detectado inmunorreactividades para TGF- β s tanto en astroglia como en neuronas de la substantia nigra y el estriado de ratas adultas (Flanders et al., 1998).

Los TGF- β s tienen múltiples efectos sobre los astrocitos. En cultivo inducen la producción de matriz extracelular, mostrando así un rol en la formación de cicatriz, que se cree impide el crecimiento de neuritas y la regeneración (Toulmond et al., 1996).

Además, estimulan la expresión de IL-6, tanto por sí mismos como sinérgicamente con IL-1 β y TNF α (Benveniste et al., 1994). En cambio, TGF- β inhibe la producción de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12 por la microglía (Suzumura et al., 1993). Por otro lado, TGF- β 1 es quimiotáctico para astrocitos y microglia, indicando que sus efectos son al mismo tiempo pro- y anti-inflamatorios (revisado en (Flanders et al., 1998) y (Benveniste, 1998)). Todo esto sugiere que los TGF- β s, frente a una lesión en el SNC, estimulan la migración de astrocitos y microglia hacia la región y regulan luego el fenotipo reactivo de estos tipos celulares. Además, TGF- β regula la producción de moléculas de reconocimiento (como tenascina, molécula de adhesión neuronal –NCAM- o la glicoproteína L1) por la astrogliá, revelando un posible rol indirecto en la regeneración axonal (Aubert et al., 1995).

TGF- β también puede influir en la supervivencia y la diferenciación neuronal *in vitro*, pero sus efectos dependen de las condiciones de cultivo (por ejemplo la presencia de otros factores de crecimiento). Entre las células sobre las que actúan, los TGF- β s mantienen la supervivencia y modulan el fenotipo de las neuronas dopaminérgicas embrionarias del cerebro medio de rata (Poulsen et al., 1994). Además, el tratamiento de cultivos de neuronas de hipocampo de rata con TGF- β 1 protege contra la excitotoxicidad mediada por el receptor de NMDA (regulando la $[Ca^{2+}]_i$ mediante la inducción de un mayor potencial mitocondrial), impide la apoptosis causada por la remoción de factores neurotróficos (estimulando la expresión de la oncoproteína Bcl-2) y reduce el daño neuronal causado por radicales libres de oxígeno (Prehn et al., 1994). Por otro lado, TGF- β induce la apoptosis de las neuronas granulares del cerebelo (de Luca et al., 1996). Así, dependiendo del tipo de neuronas en estudio y la etapa del desarrollo, TGF- β puede tener un efecto neuroprotector o neurotóxico.

En pacientes con la PD, se han detectado niveles significativamente mayores de TGF- β 1 en las regiones dopaminérgicas estriales y en el líquido cefalorraquídeo comparado con los controles, sin diferencias significativas en la corteza (Mogi et al., 1995). Además, el tratamiento de cultivos de neuronas dopaminérgicas con TGF- β 1 antes de agregar la neurotoxina MPTP, mejora 2 veces la supervivencia de ese tipo neuronal (Krieglstein et al., 1995). Sin embargo, la administración de TGF- β 3 en el modelo de lesión con 6-OHDA utilizado en este seminario no afectó la muerte neuronal de las células de la substantia nigra ni su atrofia (Sauer et al., 1995). Por otra parte, el grupo de Krieglstein (Krieglstein et al., 1998) ha demostrado que GDNF necesita de la

presencia de TGF- β para ejercer su efecto neuroprotector y/o neuroregenerador. De esta forma los autores sugieren un nuevo tipo de FNT, dos moléculas que carecen de actividad neurotrófica por separado pero que juntas son neurotróficas.

De todo lo dicho se ve que, basándose en resultados *in vitro* es difícil predecir los efectos precisos que una molécula multifuncional (como las citoquinas descritas) puede tener en un órgano *in vivo*. La mayoría de los estudios *in vitro* estudian el efecto de la molécula en un tipo celular aislado, mientras que *in vivo* hay complejas interacciones entre múltiples tipos celulares. Los efectos de muchas citoquinas son dependientes del contexto, ya que las células producen otras citoquinas, matriz celular y pequeños mediadores (NO, iones) que modulan los efectos biológicos del agente de interés. Es así crítico expandir los estudios *in vitro* con experimentos usando modelos animales. Por otra parte, la mayoría de los estudios iniciales en este campo han sido farmacológicos, utilizando cantidades elevadas de citoquinas administradas en forma exógena. Para el estudio de la función de las citoquinas cerebrales *endógenas* que podrían tener un rol biológico a muy bajas concentraciones locales, se necesita de una técnica de detección de muy alta sensibilidad.

IV. Reacción en cadena de la polimerasa competitiva, semi-cuantitativa.

El estudio de la expresión y el rol de las citoquinas y factores neurotróficos en el cerebro se ve limitado por los bajos niveles en que estos se expresan. Así, no sólo las metodologías de análisis de proteínas sino también las técnicas habituales de detección de ARNm (Northern blots y ensayos de protección a ARNasas) carecen de la sensibilidad adecuada para la detección de estas moléculas en el sistema nervioso central, o requieren la obtención de numerosas muestras y su posterior concentración. La técnica de PCR se revela así como la elegida para estos estudios debido a su extraordinariamente alta sensibilidad, entre 100 y 1000 veces mayor a la de las técnicas antes mencionadas.

En teoría la amplificación por PCR sigue una cinética exponencial según

$$N = N_0 \cdot 2^n \quad (1)$$

donde N_0 es el número de moléculas iniciales, n el número de ciclos de amplificación y N el número de amplicones. Así, N y N_0 se relacionan por una recta de pendiente 2^n . Partiendo de esto, sería posible cuantificar N y calcular directamente N_0 .

Sin embargo, empíricamente se observa que la ecuación (1) no se cumple, y que la ecuación que describe el comportamiento de la PCR es

$$N = N_0 \cdot (1 + E)^n \quad (2)$$

donde E es la eficiencia de amplificación (que adquiere valores entre 0 –no hay amplificación- y 1 –amplificación del 100%). E depende de diversos factores como la secuencia del ADN molde, la secuencia del primer, la longitud del amplicón, la concentración de Mg^{2+} , la concentración de primers, la concentración de Taq polimerasa, el nivel de impureza de la muestra, errores experimentales, etc. Siendo así, pequeñas diferencias en las eficiencias pueden alterar considerablemente las cantidades de producto obtenidas, por lo que no es posible cuantificar a menos que se conozca o controle la eficiencia de la reacción.

Para cuantificar ARNm, se han desarrollado varias aproximaciones basadas en la PCR. La primera descripta utiliza estándares heterólogos externos, aquellos ARNm que no varían mayormente su expresión ($\beta 2$ -microglobulina o β -actina), que se amplifican en tubos separados o en el mismo tubo (Sugimoto et al., 1993). Esta técnica necesita que los dos pares de primers sean compatibles y tengan un comportamiento similar en las diferentes reacciones, condición difícil de lograr empíricamente. En cambio, otra forma de controlar E es incluir en la mezcla de reacción una secuencia de ADN en cantidad conocida que tenga ciertas características que permitan considerar que tendrá eficiencia igual o similar a la de la secuencia de interés (cDNA). La técnica que incluye este tipo de ADN control se llama PCR competitiva, y el ADN en cuestión fragmento de competición (f.c.) (Raeymaekers, 1998). Para ser un f.c. una molécula de ADN debe compartir las dos secuencias de apareamiento de primers con el cDNA, y poseer al mismo tiempo alguna característica que permita diferenciarlo del cDNA (tamaño del amplicón, sitio de reconocimiento de una enzima de restricción). También puede ser una molécula que contenga múltiples secuencias de apareamiento de primers de modo de permitir la cuantificación de diversos cDNAs (f.c. multiespecífico) (Pitossi and Besedovsky, 1996).

Describiendo el comportamiento de esta reacción según la ecuación (2), se puede calcular la cantidad de moléculas de cDNA y de f.c. al ciclo número n como

$$cDNA_n = cDNA_{n-1} (1 + E^{cDNA}_{n-1}) \quad (3)$$

$$f.c._n = f.c._{n-1} (1 + E^{f.c.}_{n-1}) \quad (4)$$

donde E^{cDNA} y $E^{f.c.}$ son las eficiencias de amplificación del cDNA y del f.c. respectivamente.

Si E^{cDNA} y $E^{f.c.}$ son constantes, lo cual sólo es cierto durante la fase exponencial de la reacción, las ecuaciones (3) y (4) se pueden expresar como

$$\log (cDNA/f.c.) = \log cDNA_0 - \log f.c._0 + n \log ((1+E^{cDNA})/(1+E^{f.c.})) \quad (5)$$

donde $cDNA_0$ y $f.c._0$ son las cantidades iniciales de ADNc y f.c. respectivamente. Así, al construir una curva de calibración con diferentes cantidades de f.c. inicial ($\log cDNA_n/f.c._n$ versus $\log f.c._0$, (Gilliland et al., 1990)), si las eficiencias de amplificación son iguales se obtiene una recta de pendiente -1 , permitiendo la cuantificación tanto relativa como absoluta del ARNm.

Sin embargo, la constancia de las eficiencias de amplificación sólo es válida durante la fase exponencial ya que a medida que avanzan en los ciclos y se acercan a las concentraciones saturantes de productos, las eficiencias decrecen hasta hacerse cero. Si $E^{cDNA} \neq E^{f.c.}$, pero la relación se mantiene constante durante la amplificación, la curva de la ecuación (5) se desplazará paralelamente afectando la cuantificación absoluta pero no la relativa (que depende solamente de la pendiente).

Así, la falta de un modelo alternativo ha llevado a exigir el cumplimiento de la igualdad de eficiencias aún para ensayos de semi-cuantificación por PCR (Raeymaekers, 1994). Sin embargo, y a pesar de esto, se han publicado varios trabajos con pendientes distintas de -1 en sus curvas de calibración (Gilliland et al., 1990; Siebert and Larrick, 1992) que han utilizado de todos modos este modelo, incurriendo en errores importantes en la cuantificación. Para superar estos obstáculos y poder cuantificar más allá de la zona exponencial de la reacción, se deben construir curvas de referencia según (Zachar et al., 1993) y (Hayward et al., 1998), para cada molécula de interés, coamplificando el ADNc con el f.c. multiespecífico pRat6 (Pitossi and Besedovsky, 1996). Así se puede observar el comportamiento de ambos amplicones a medida que se aumenta la cantidad de $cDNA_0$ en el número de ciclos que permite detectar la molécula de interés, aumentando considerablemente la sensibilidad y evitando cualquier error producto de las suposiciones de un comportamiento determinado de la reacción.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La lesión de la substantia nigra de rata con la neurotoxina 6-OHDA modula la expresión de factores neurotróficos específicos que se oponen y/o favorecen la neurodegeneración.

OBJETIVOS

- 1) Puesta a punto y análisis del comportamiento de un método de detección y cuantificación de alta sensibilidad no radioactivo, la reacción en cadena de la polimerasa competitiva.
- 2) Análisis de la expresión de los factores neurotróficos BDNF, TGF- β 1, IL-2 y TNF α en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y procedimientos quirúrgicos.

La lesión de la substantia nigra con 6-OHDA se realizó en el laboratorio del Profesor W.H.Oertel (Zentrum für Nervenheilkunde, Neurologische Klinik, Philipps-Universität, Marburg, Alemania), quien describió por primera vez este modelo, como parte de una colaboración con nuestro laboratorio. Brevemente, se inyectan unilateralmente ratas macho adultas Wistar con 6-OHDA (20µg disueltos en 4µl NaCl suplementado con 0,2mg/ml de ácido L-ascórbico como antioxidante) en el estriado derecho siguiendo las coordenadas estereotáxicas adecuadas (Sauer and Oertel, 1994). Los animales se mantienen en un régimen de 12 horas de luz y oscuridad, con comida y agua *ad libitum*. Como controles se inyectaron en nuestro laboratorio ratas Wistar macho con vehículo (0,9% NaCl, 0,2 mg/ml Ácido ascórbico) en las mismas coordenadas estereotáxicas, y se analizaron a los mismos tiempos que los animales lesionados (grupo "salina"). También se analizaron ratas Wistar macho sin tratar (grupo "normal").

Los animales inyectados son sacrificados luego de 1 día (grupo 6-OHDA: n=3, 284±2 g; grupo salina: n=2, 347±174 g), 6 días (grupo 6-OHDA: n=3, 297,3±14,5 g; grupo salina: n=2, 330g), 12 días (grupo 6-OHDA: n=4, 311±4,8 g; grupo salina: n=2, 370±70,7) o 30 días (grupo 6-OHDA: n=3, 320,7±29,3 g; grupo salina: n=2, 300±35,3 g). Se extraen rápidamente los cerebros y se disecciona cada hemisferio en: corteza, estriado e hipocampo para su posterior análisis. Se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardan a -70°C.

Extracción del ARN.

Para la extracción del ARN de los tejidos se utiliza el reactivo TRIzol de GIBCO BRL (Gaithersburg, MD) con pequeñas modificaciones respecto al protocolo original (Chomczynski and Sacchi, 1987; Pitossi et al., 1997). Los tejidos se homogeneizan en 1ml de TRIzol por cada 50-100mg de tejido, utilizando un homogeneizador Polytron, 10 segundos a máxima velocidad. Se incuba 5 minutos a temperatura ambiente y se agrega cloroformo (un quinto del volumen de TRIzol). Se agitan e incuban las muestras 15 minutos en hielo. Se centrifuga 10 minutos a 12000g a 4°C. Luego de precipitar la fase acuosa con isopropanol durante 45 minutos a -20°C, se lava con etanol 75%, se seca

brevemente, y se disuelve el pellet en agua libre de ARNasas. La integridad del ARN se chequea mediante electroforesis en un gel de 1% agarosa en buffer Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) y la cantidad se calcula midiendo la absorbancia a 260 y 280nm.

Alternativamente, se agrega 10µg de ácido poli-inosínico (poli I) por cada 1ml de TRIzol como carrier del ARN (Winslow and Henkart, 1991), de forma de aumentar la eficiencia de extracción del ARN. En estos casos se verifica la integridad del ARN por electroforesis en gel de 1% agarosa en TBE, pero la cuantificación no es posible debido a la presencia del ácido.

En los casos en que se desea analizar la presencia de ARNm de genes sin intrones (neurotrofinas) se trata la muestra de ARN con ADNasa libre de ARNasa (Gibco) durante 15 minutos a 37°C, de forma de evitar la contaminación con ADN genómico. Luego se elimina la nucleasa por tratamiento térmico y extracción con fenol ácido.

Síntesis de ADNc.

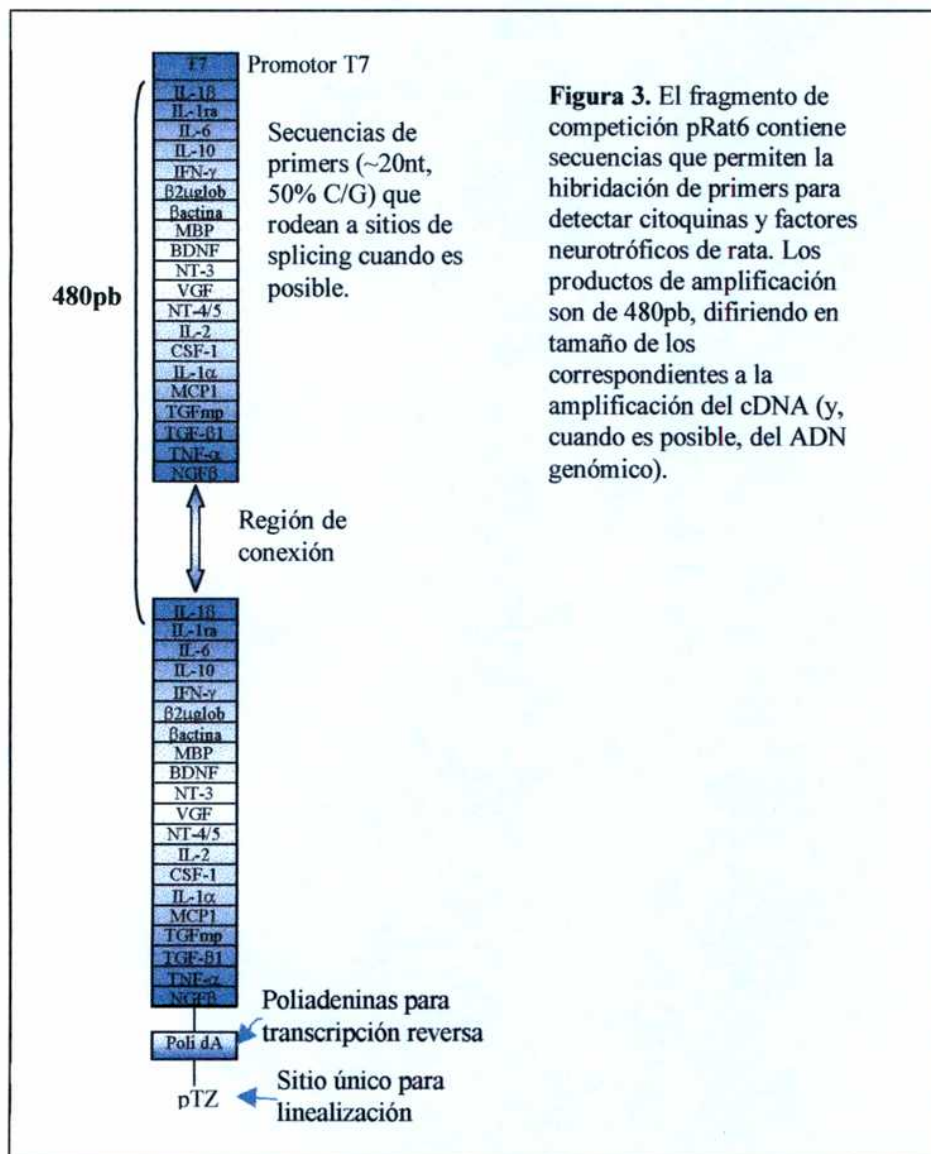
El ADNc fue sintetizado utilizando un kit comercial (Gibco BRL) de transcripción reversa. Se mezclan primero en 12µl de volumen de reacción 5µg de ARN total (o 4µl de 10µl de preparación con poli I) del grupo a analizar, tomando proporciones iguales de cada animal, con 0,5µg de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Promega). Se calienta a 70°C durante 10 minutos e incuba luego en hielo al menos 1 minuto. Luego se agregan hasta concentración final 10mM dithiothreitol, 0,5mM dNTP, 40mM Tris-HCl, pH 8,4, 100mM KCl, 5mM MgCl₂, 0,2mg/ml BSA y 200 unidades de la enzima Super Script II (Gibco). Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente, se mantiene la reacción a 42°C por una hora y finalmente se calienta 15 minutos a 70°C. Luego se agregan 40µl de agua. Se guardan las muestras a -20°C.

Como control de contaminación genómica de las secuencias a analizar se incluye en cada experimento de transcripción reversa un control negativo sin la enzima Super Script II ("control sin RT").

PCR semi-cuantitativa.

1) Fragmento de competición. Para la cuantificación de las muestras se utilizó un fragmento de competición con sitios de hibridación de primers con secuencias de ADNc de rata, llamado pRat6 (**Figura 3**, (Pitossi and Besedovsky, 1996)). Se linealiza el ADN

con la enzima de restricción EcoRI y se diluye a la concentración adecuada en 0,1mg/ml de seroalbúmina bovina (Amersham).



Para la obtención de los amplicones se utilizaron oligonucleótidos con las siguientes secuencias (**Tabla 3**), de forma que cada par de ellos permite la amplificación de una secuencia de ADNc y de una porción del fragmento de competición. En los casos en que es posible, la amplificación de ADNc y de ADN genómico dan amplicones de diferentes tamaños.

Tabla 3. Se especifican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y los tamaños de los productos.

Gen	Primer sentido		Primer antisentido		Largo amplicón pb	Largo genómico pb
	5'	3'	5'	3'		
TNF α	AAATGGGCTCCCTCTCATCA		AGCCTTGTCCCTTGAAGAGA		248	661
BDNF	TCACAGTCCTGGAGAAAGTC		ATGAACCGCCAGCCAATTCT		202	202
IL-2	GCAGGCCACAGAATTGAAAC		AGATGGCTATCCATCTCCTC		233	1600/3600
TGF β 1	ACCAACTACTGCTTCAGCTC		TGTTGGTTGTAGAGGGCAAG		189	>5000
β 2	TCTTTCTGGTGCTTGTCTC		AGTGTGAGCCAGGATGTAG		241	>3000

Abreviaturas: TNF α , factor de necrosis tumoral-alfa; BDNF, factor de crecimiento nervioso derivado de cerebro; IL-2, interleuquina-2; TGF β 1, factor de crecimiento transformante-beta1; β 2, microglobulina-beta 2.

2) Amplificación por PCR. La amplificación del ADN se realiza en 5 μ l de buffer de reacción (20mM Tris-HCl, pH 8, 50mM KCl, Gibco BRL) suplementado con 2,5mM de MgCl₂ y 0,2mM de cada dNTPs, además de 0,2 μ M de cada uno de los primers específicos, y 2,5 unidades de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Gibco BRL) en un volumen final de 50 μ l. En los casos de cuantificación por radioactividad se agregaron a la mezcla 2 μ Ci de [α -³²P]dCTP (3000Ci/mmol, NEN Life Science Products).

La mezcla se amplificó en un termociclador PTC-200 (MJ Research) de la siguiente manera: 2,5 minutos a 94°C, seguidos de 30 o 42 ciclos de: 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C, y finalmente 3 minutos a 72°C.

3) Detección de los productos de amplificación. Durante el desarrollo del seminario se puso a punto la cuantificación no radioactiva de los amplicones. Para ello se compararon 3 métodos de cuantificación de los productos:

- Radioactivo: la reacción se realiza en presencia de [α -³²P]dCTP, el producto se siembra en gel de poliacrilamida 10% en TBE (Ready Gel BIORAD) y se corre 2 horas a 90V. Luego se tiñe el gel durante 15 minutos con bromuro de etidio y bajo luz UV se cortan las bandas correspondientes al f.c. y al cDNA. La radioactividad se mide en un contador de centelleo. Esta metodología ya ha sido descripta (Bouaboula et al., 1992).
- Poliacrilamida: el producto de la reacción de PCR se siembra en gel de poliacrilamida 10% en TBE (Ready Gel BIORAD) y se corre 2 horas a 90V. Luego se tiñe el gel con bromuro de etidio durante 15 minutos y se cuantifican las bandas (se detecta con el equipo White/UV Transilluminator UVP y cuantifica utilizando el programa Gelworks 1D Intermediate, versión 3.01 UVP).

- c) Agarosa: el producto se siembra en gel de agarosa 1,5% en TBE con 0,5 mg/ml de bromuro de etidio y se corre 1 hora a 75V. Luego se visualizan las bandas bajo UV (se detecta con el equipo White/UV Transilluminator UVP y cuantifica utilizando el programa Gelworks 1D Intermediate, versión 3.01 UVP).

El tamaño de los productos de amplificación es estimado en todos los casos mediante la corrida paralela del marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Gibco BRL). Para corregir las diferencias en la cantidad de ARN transcripto de forma reversa en cada una de las muestras, se cuantifica mediante la misma metodología el ADNc de β 2-microglobulina. Las muestras son normalizadas según la cantidad de β 2-microglobulina presente.

Ensayos de titulación

1) Curvas estándar: Se hicieron diluciones (1/100, 1/500 y 1/625) del producto de transcripción reversa de 5 μ g de ARN total extraído de bazo de rata inyectada intraperitonealmente con 1 μ g de LPS (lipopolisacáridos) 2 horas antes de ser sacrificadas. Cada una de estas diluciones fue co-amplificada con una concentración determinada de f.c. mediante 30 ciclos térmicos.

2) Curvas de referencia: Las curvas de referencia para β 2-microglobulina y TGF- β 1 fueron realizadas con diluciones seriadas del producto de transcripción reversa de 5 μ g de ARN total extraído de bazo de rata tratada con LPS. Las curvas para BDNF fueron realizadas con diluciones seriadas del producto de transcripción reversa de 5 μ g de ARN total extraído del hipocampo de una rata normal. Las curvas de referencia para IL-2 fueron hechas con diluciones seriadas del ADNc sintetizado a partir de ARN extraído del estriado de animales lesionados con 6-OHDA. El ADNc fue co-amplificado con una determinada masa de f.c. durante 30 o 42 ciclos térmicos.

Ensayos cinéticos

Las curvas de paralelismo representan el resultado de la amplificación de 1pg de f.c. junto con una dilución 1/50 del ADNc sintetizado a partir de 5 μ g de ARN total de bazo de rata, utilizando primers para la detección de β 2-microglobulina.

Cuantificaciones de las muestras

Para la cuantificación de los ADNc codificando para las diferentes moléculas a analizar, se utilizaron diferentes cantidades de producto de transcripción reversa (se expresan con μg de ARN total utilizados para la reacción), junto con 100fg de f.c. pRat6, durante 30 o 42 ciclos térmicos.

Molécula a cuantificar	μg de ARN total	Número de ciclos
$\beta 2$ -microglobulina	0,08	30
TGF- $\beta 1$	0,5	30
IL-2	0,25	30
BDNF (estriado)	0,5	42
BDNF (corteza)	0,25	42
TNF- α	0,5	42

Se determinó el nivel de ADNc codificante para el factor neurotrófico en cuestión en la muestra mediante 4 determinaciones. En reacciones separadas se determinó la cantidad de ADNc para $\beta 2$ -microglobulina en las mismas muestras, por cuadruplicado. Los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones para el factor neurotrófico normalizadas por $\beta 2$ -microglobulina, con su desvío estándar.

RESULTADOS

Controles de la RT-PCR semi-cuantitativa.

Según el modelo vigente, para poder cuantificar por PCR competitiva (Raeymaekers, 1998), la eficiencia de amplificación del cDNA debe ser igual a la del fragmento de competición (f.c.) durante los ciclos sucesivos y en todo el rango de concentraciones. Para verificar esto se realizan dos tipos de experimento: una curva estándar (ensayo de titulación) y una curva de paralelismo (ensayo cinético).

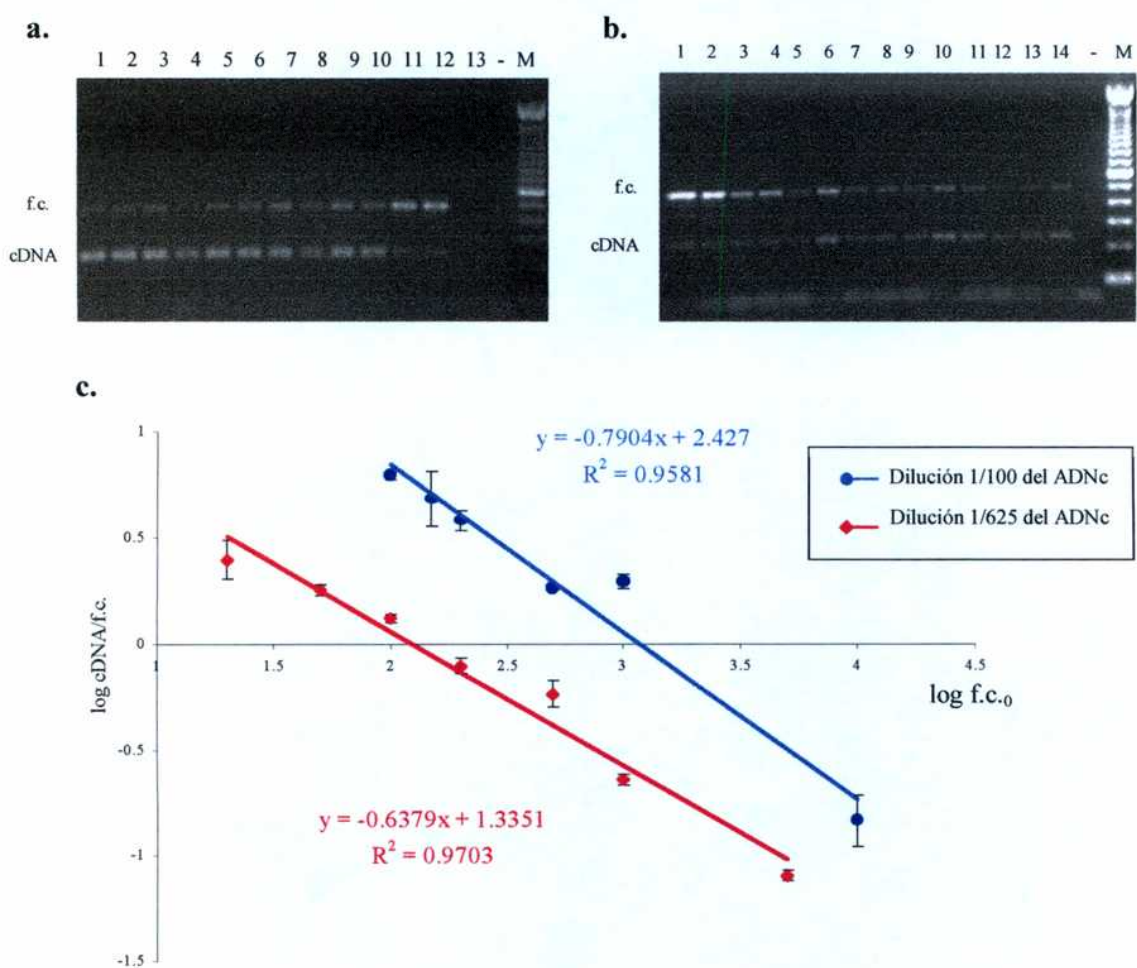
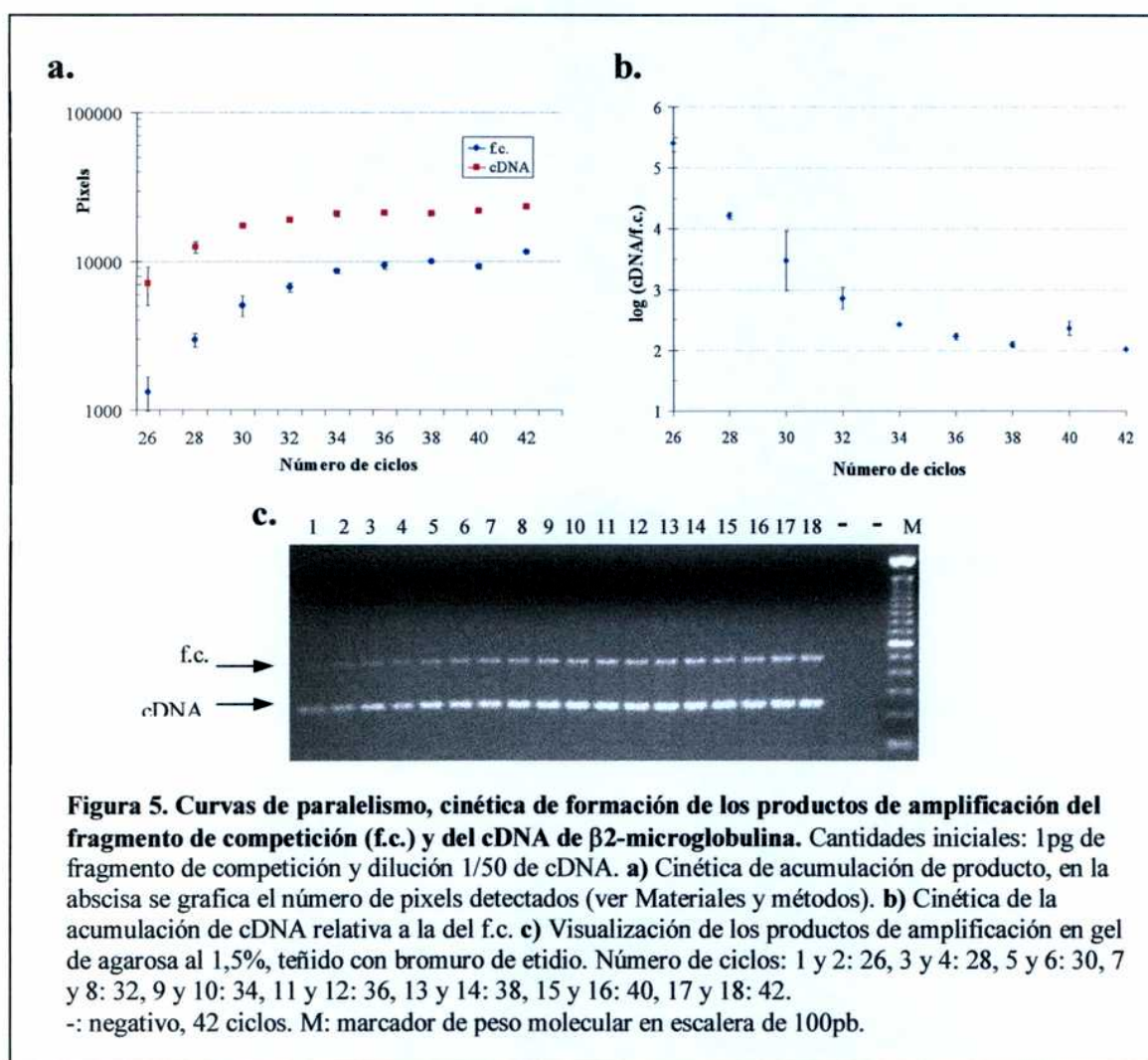


Figura 4. Curvas estándar con diferente cantidad de cDNA inicial. **a)** Visualización en gel de agarosa al 1,5% de los amplicones de la curva estándar utilizando una dilución 1/100 del cDNA. Fragmento de competición: 1 y 2: 100fg, 3 y 4: 150fg, 5 y 6: 200fg, 7 y 8: 500fg, 9 y 10: 1pg, 11 y 12: 10pg, 13: ARN sin transcriptasa reversa. **b)** Visualización en gel de agarosa al 1,5% de los amplicones de la curva estándar con una dilución 1/625 del cDNA. Fragmento de competición: 1 y 2: 5pg, 3 y 4: 1pg, 5 y 6: 500fg, 7 y 8: 200fg, 9 y 10: 100fg, 11 y 12: 50fg, 13 y 14: 20fg. **c)** Comparación de las pendientes de las curvas estándar. -: control negativo. M: marcador de peso molecular en escalera de 100pb.

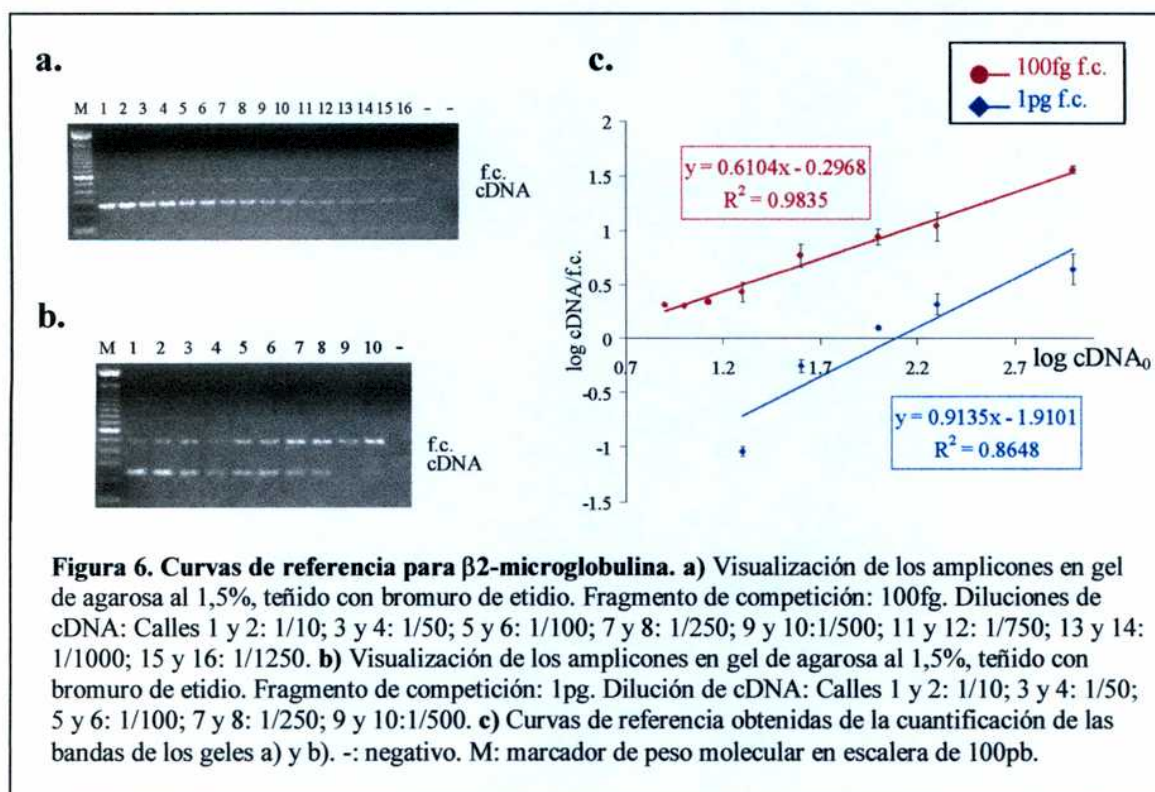
Como control de la linealidad de la cuantificación, se realizó un ensayo de titulación amplificando el cDNA obtenido del bazo de una rata inyectada con LPS (cDNA₀) junto con distintas concentraciones del f.c. (f.c.₀) según (Gilliland et al., 1990). Se puede ver (**Figura 4**) una relación lineal entre el logaritmo de la relación cDNA_n/f.c._n y las diferentes concentraciones de f.c.₀. Sin embargo, la pendiente cambia según la cantidad de cDNA que se utilice, mostrando un comportamiento que si bien se observa en varios trabajos publicados (por ej. (Siebert and Larrick, 1992; Gilliland et al., 1990), no ha sido descripto teóricamente ni tenido en cuenta en las cuantificaciones.

Para evidenciar el comportamiento de las eficiencias de amplificación a lo largo de los ciclos se construyó una curva de paralelismo según (Bouaboula et al., 1992), amplificando 1pg del f.c. con una dilución 1/50 del cDNA. Al graficar los logaritmos de los productos en función de los ciclos, se puede observar que alrededor de los 30 ciclos empieza a tener lugar la saturación, donde ambas eficiencias se aproximan a cero (**Figura 5.a.**). Sin embargo, en la fase exponencial se observa que la eficiencia de



amplificación del fragmento de competición es mayor que la del cDNA (**Figura 5.b.**). Esto se opone al requisito exigido según Raeymaekers (Raeymaekers, 1994) de que las eficiencias sean iguales, modelo que considera que no se pueden utilizar fragmentos de competición cuyas eficiencias sean diferentes a las del cDNA.

Debido a las diferencias en las eficiencias de amplificación de los dos templados, la cuantificación del cDNA asumiendo una recta de pendiente -1 introduce importantes errores en la cuantificación. Para evitar incurrir en tales errores, se construyeron curvas de referencia coamplificando una determinada cantidad de f.c. (100fg, utilizados en la posterior cuantificación) con diluciones de ADNc de bazo de rata tratada con LPS. En estas curvas se puede evidenciar el mismo fenómeno que se observa en las curvas estándar: dependiendo de la cantidad de f.c. utilizada, la pendiente varía. Además la linealidad que se observa al utilizar una baja cantidad de f.c. se pierde al usar 1pg (ver R^2 de la curva de 1pg en la **Figura 6**). Aunque la línea de tendencia forzada sobre esos datos tenga una pendiente cercana a -1 , su utilización llevaría a errores en la cuantificación, ya que se puede verificar que los mismos valores ajustan a la curva logarítmica $y = 1,9372 \ln(x) - 1,3474$ con un $R^2 = 0,9355$.



Según Zachar (Zachar et al., 1993), es posible cuantificar absolutamente con este tipo de curvas de referencia aunque la pendiente sea diferente de 1, si abarcan el rango de las muestras a analizar y son repetibles. Se construyeron así curvas de referencia para las citoquinas y neurotrofinas a cuantificar, y su pendiente fue utilizada para corregir los valores obtenidos para las muestras. En este trabajo, como se desconoce la cantidad de moléculas de partida en las curvas de referencia, esto lleva a una semi-cuantificación y no a una cuantificación.

Las curvas de referencia utilizadas son:

para $\beta 2$ -microglobulina (30 ciclos): $\log(\text{cDNA}/\text{f.c.}) = 0,6104 * \log(\text{cDNA}_0) - 0,2968$;

para TGF- $\beta 1$ (30 ciclos): $\log(\text{cDNA}/\text{f.c.}) = 0,9092 * \log(\text{cDNA}_0) - 0,7935$;

para IL-2 (30 ciclos): $\log(\text{cDNA}/\text{f.c.}) = 0,8445 * \log(\text{cDNA}_0) - 0,8330$;

y para BDNF (42 ciclos): $\log(\text{cDNA}/\text{f.c.}) = 0,6435 * \log(\text{cDNA}_0) - 1,3892$;

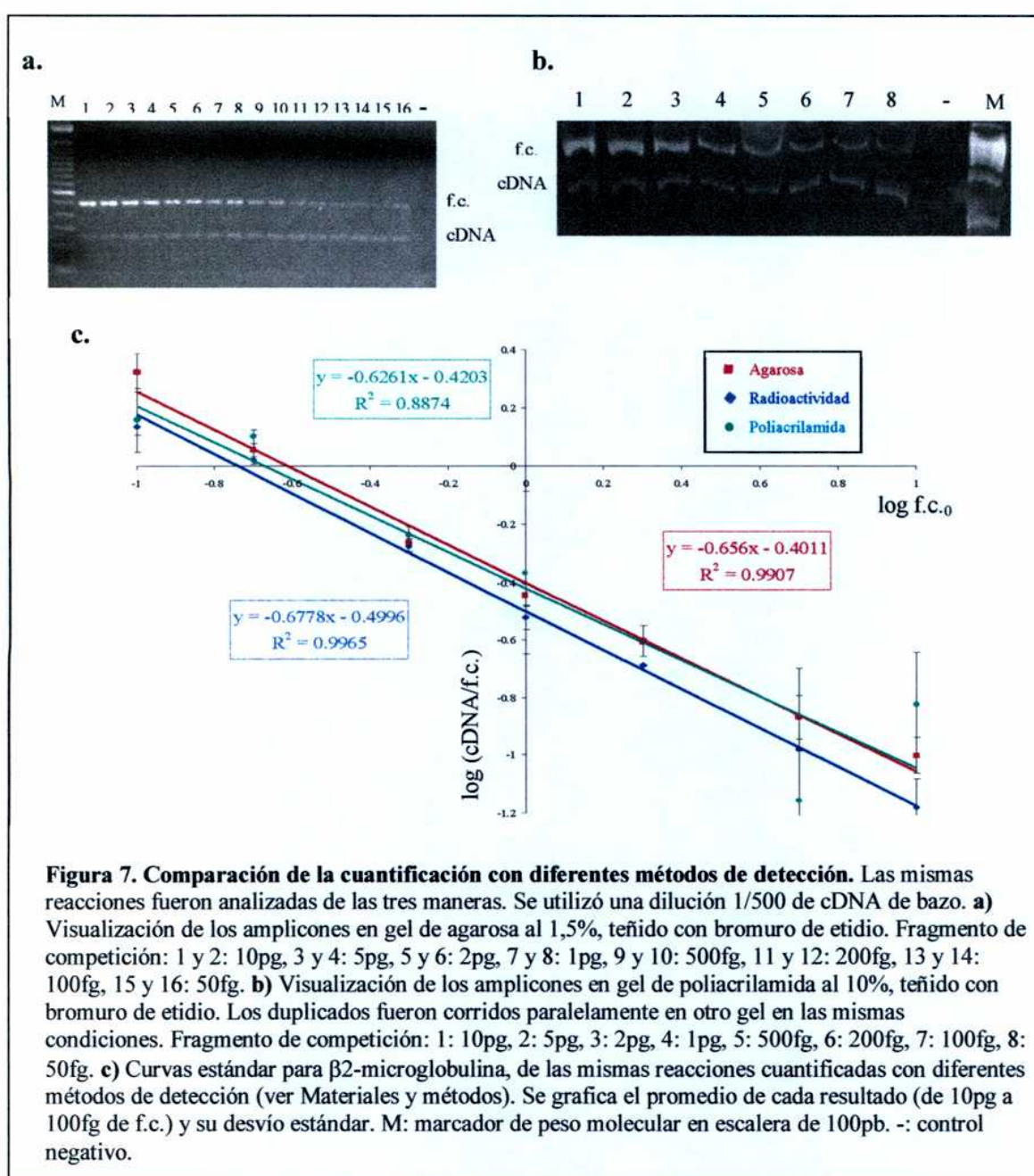
donde cDNA_0 es un número que indica la dilución del ADNc original en la curva de referencia y $\text{cDNA}/\text{f.c.}$ es la relación entre la cuantificación del amplicón correspondiente al cDNA y la del f.c. (ambas en píxeles, según lo indica el programa de cuantificación de imágenes).

Comparación de métodos de detección de los amplicones

La detección de los productos de amplificación ha sido ya descripta mediante la utilización de nucleótidos marcados radiactivamente ya sea con un Phosphoimager (Pitossi et al., 1997) o mediante el corte de las bandas visualizadas por tinción con bromuro de etidio y su cuantificación en un contador de centelleo (Bouaboula et al., 1992). En el presente seminario se analizó la posibilidad de cuantificar utilizando directamente tinción con bromuro de etidio, de forma de evitar la utilización de radioactividad.

Se realizó una curva estándar coamplificando diluciones seriadas de f.c. (10pg a 5fg) con una dilución 1 en 500 del ADNc obtenido a partir de ARN de bazo de una rata tratada con LPS, en presencia de trazas de radioactividad. Los productos de amplificación fueron corridos en geles de poliacrilamida, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados. La cuantificación de las bandas visualizadas por excitación con luz UV se grafican como "Poliacrilamida". Luego se cortaron las bandas y se midieron sus actividades en un contador de centelleo, curva "Radioactividad". Otras alícuotas de los productos de amplificación fueron corridas en un gel 1,5% de agarosa en TBE, en

presencia de bromuro de etidio. Las bandas fueron visualizadas por excitación con luz UV y cuantificadas, curva "Agarosa". Se puede observar que los diferentes métodos de detección son equivalentes tanto en sus resultados como en su sensibilidad (**Figura 7**). Así, para los tres métodos las cuantificaciones de los productos de menos de 100fg se desvían de la linealidad y los productos de amplificación de 20 y 5fg de f.c. no se pueden detectar, indicando que en estas condiciones la sensibilidad para $\beta 2$ -microglobulina es de 2000 moléculas de pRat6 por reacción (lo que da la posibilidad de cuantificar alrededor de 15 moléculas de cDNA cada 100 células analizadas). Por todo esto, se utilizaron geles de agarosa con bromuro de etidio para la cuantificación por tratarse del método más sencillo.



Cuantificación del ARNm para BDNF en estriado y corteza.

Para determinar si BDNF es regulado en respuesta a la lesión de la substantia nigra con 6-OHDA, se analizó por PCR semi-cuantitativa el ARN obtenido de distintas áreas del cerebro de animales lesionados y se lo comparó con aquellos a los cuales se les había inyectado solución salina (**Figuras 8 y 9**). La amplificación mediante 30 ciclos térmicos no permitió la detección de BDNF en el estriado ni en la corteza, por lo cual se incrementaron a 42 ciclos. Por ser un gen sin intrones, las muestras destinadas al análisis de niveles de ARNm de BDNF fueron tratadas con ADNasa antes de la transcripción reversa. La no-contaminación con ADN genómico fue sucesivamente confirmada mediante la inclusión en cada experimento de PCR de un control de ARN sin transcriptasa reversa.

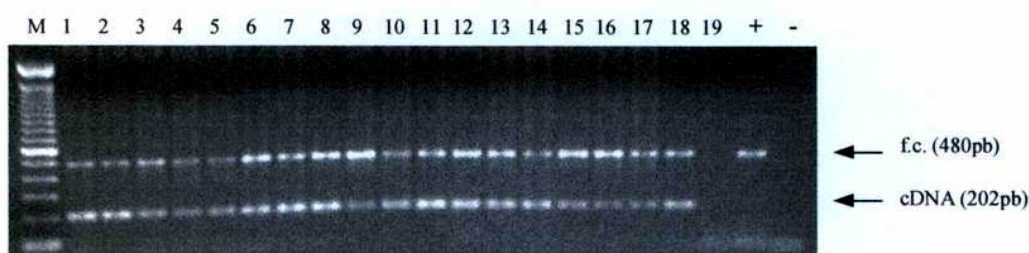
En los gráficos de los resultados de la cuantificación (**Figuras 8 (b. y c.) y 9.b.**), los valores en abscisas sólo representan valores arbitrarios, los cuales resultan de corregir mediante la curva de referencia correspondiente las relaciones cDNA/f.c. estimadas, y luego normalizar ese valor por la cantidad de β 2-microglobulina determinada de la misma manera, en reacciones separadas. Como las curvas de referencia están hechas con diferentes ADNc (ver Materiales y Métodos), estas correcciones hacen que los valores sólo permitan comparaciones dentro del experimento (y no con otros factores neurotróficos). El tiempo cero corresponde a un animal no lesionado ("normal", ver Materiales y métodos). También debe notarse que la forma del gráfico no debe dar la errónea impresión de representar una cinética total de la inducción de BDNF, la cual tiene una forma desconocida. Sólo representa una tendencia, ya que se desconoce el comportamiento en los intervalos no analizados, y busca exclusivamente facilitar la visualización de los resultados.

En el estriado ipsilateral a la lesión (**Figura 8.b.**), BDNF aumenta significativamente (5 veces) 12 días después de la lesión y se mantiene elevado (10 veces) a los 30 días, comparado con las muestras provenientes de los animales a los cuales se les inyectó solución salina. Además, se registró un aumento no significativo de la expresión de BDNF en el estriado ipsilateral al día siguiente de la lesión. En el estriado contralateral (**Figura 8.c.**), en cambio, la inducción de BDNF se comporta de manera diferente. Un día luego de la lesión con 6-OHDA hay un aumento en los niveles de ARNm codificante para BDNF (4 veces comparado con los de salina). Si bien a partir de los 12 días también se mantiene elevado (9 veces), a los 30 días presenta una

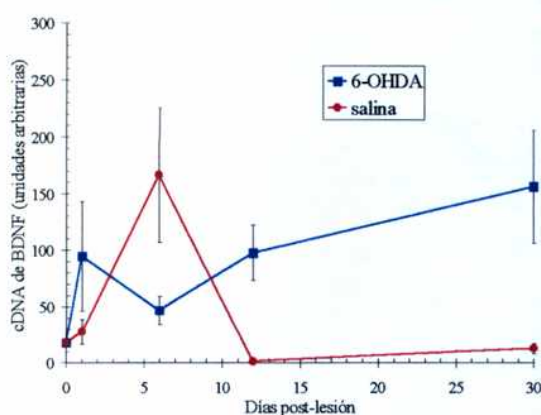
tendencia a volver a niveles normales ($38,12 \pm 12,02$ comparado con $18,21 \pm 1,06$ del normal).

Es de destacar que en ambos hemisferios la inoculación de solución salina también induce BDNF a diferentes tiempos, con respecto a los animales no tratados. A los 6 días de inyectados, tiene lugar una inducción de BDNF en el estriado ipsilateral (10 veces respecto a los animales no tratados). En el hemisferio contralateral, BDNF aumenta 1 y 6 días después de la inoculación (3,5 y 4 veces).

a.



b. Ipsilateral



c. Contralateral

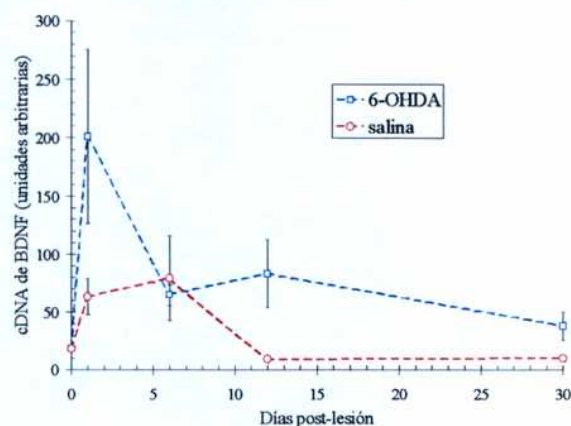
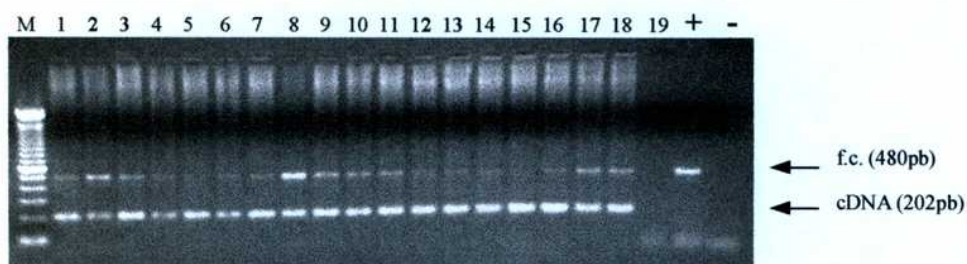


Figura 8. Expresión de BDNF en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA o inyectadas con solución salina. **a)** Visualización de los amplicones de BDNF en gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio. Calles 1 a 8: muestras de animales lesionados con 6-OHDA (1 y 2: 1 día, 3 y 4: 6 días, 5 y 6: 12 días, 7 y 8: 30 días post-lesión, estriados ipsi y contralateral respectivamente). Calles 9 y 10: muestras de estriados de animales intactos, derecho e izquierdo. Calles 11 a 18: muestras de animales inyectados con solución salina (11 y 12: 1 día, 13 y 14: 6 días, 15 y 16: 12 días, 17 y 18: 30 días post-inyección, estriados contra e ipsilateral respectivamente). 19: control de contaminación genómica, ARN sin transcriptasa reversa. +: 100fg de f.c. -: control negativo. M: marcador de peso molecular en escalera de 100pb. **b)** Resultados de la cuantificación de BDNF en el estriado ipsilateral a la lesión. Tiempo cero: animales intactos. 6-OHDA: animales lesionados con la neurotoxina. Salina: animales inyectados con vehículo. **c)** Resultados de la cuantificación de BDNF en el estriado contralateral a la lesión. Tiempo cero: animales intactos. 6-OHDA: animales lesionados con la neurotoxina. Salina: animales inyectados con vehículo.

En la corteza de los animales lesionados con 6-OHDA, BDNF no presenta diferencias en sus niveles en el hemisferio ipsilateral a la lesión respecto a los animales inyectados con solución salina (**Figura 9.b.**). Sin embargo, ambos tratamientos (neurotoxina y salina) inducen aumentos a diferentes tiempos en la corteza contralateral a la inyección (especialmente, hay 5 veces más ARNm para BDNF en la corteza contralateral de los animales al día siguiente de ser lesionados con 6-OHDA y 10 veces más a los 30 días, que en cualquiera de los otros tratamientos).

a.



b.

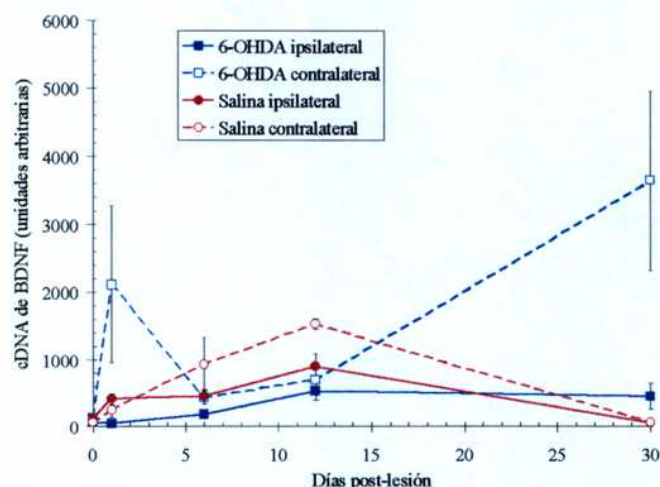
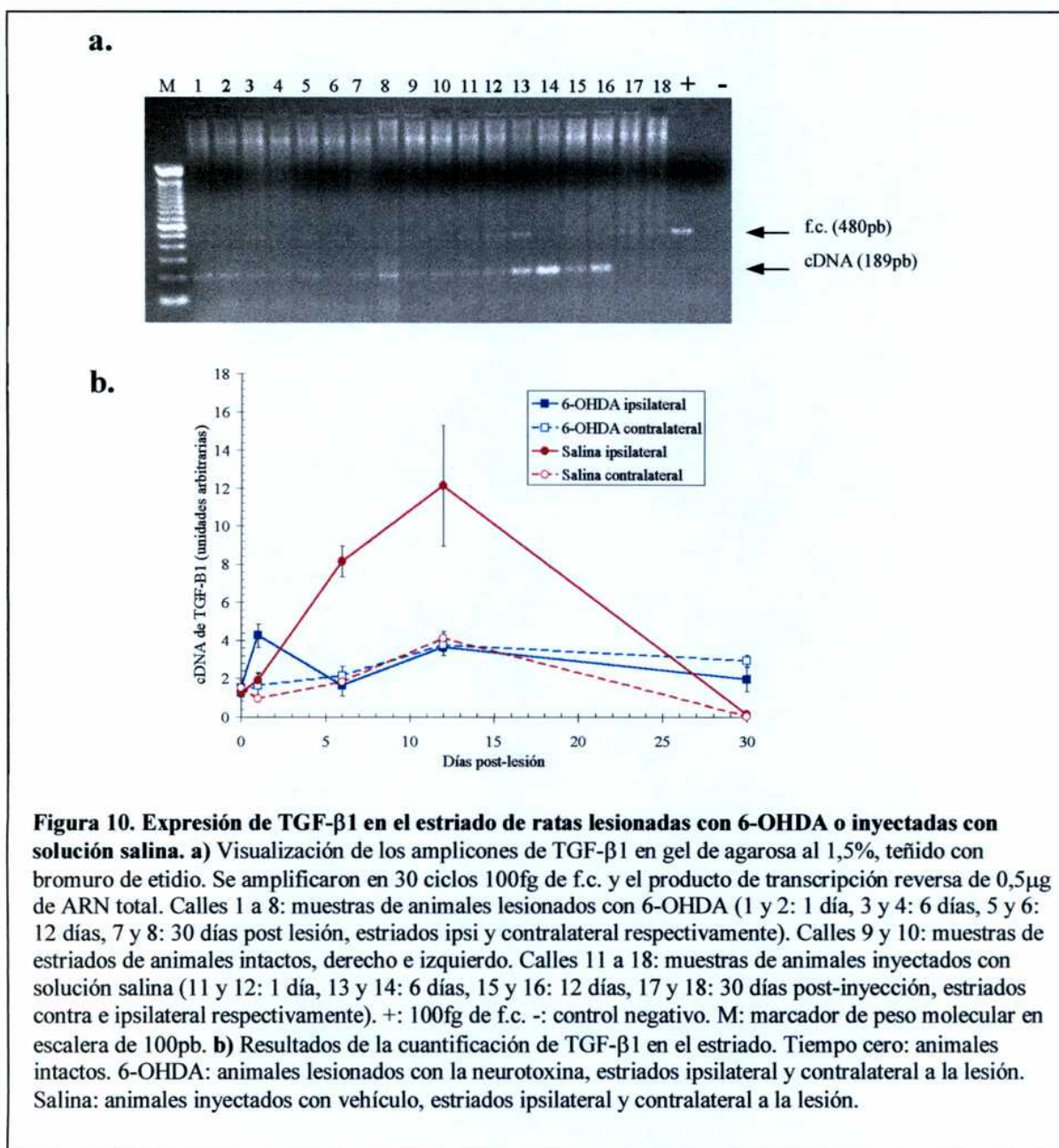


Figura 9. Expresión de BDNF en la corteza de ratas lesionadas con 6-OHDA o inyectadas con solución salina. **a)** Visualización de los amplicones de BDNF en gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio. Calles 1 a 8: muestras de animales lesionados con 6-OHDA (1 y 2: 1 día, 3 y 4: 6 días, 5 y 6: 12 días, 7 y 8: 30 días post lesión, cortezas ipsi y contralateral respectivamente). Calles 9 y 10: muestras de cortezas de animales intactos, derecha e izquierda. Calles 11 a 18: muestras de animales inyectados con solución salina (11 y 12: 1 día, 13 y 14: 6 días, 15 y 16: 12 días, 17 y 18: 30 días post-inyección, cortezas contra e ipsilateral respectivamente). 19: control de contaminación genómica, ARN sin transcriptasa reversa. +: 100fg de f.c. -: control negativo. M: marcador de peso molecular en escalera de 100pb. **b)** Resultados de la cuantificación de BDNF en la corteza. Tiempo cero: animales intactos. 6-OHDA: animales lesionados con la neurotoxina, cortezas ipsilateral y contralateral a la lesión. Salina: animales inyectados con vehículo, cortezas ipsilateral y contralateral a la inyección.

Cuantificación del ARNm para TGF- β 1 en estriado.

Estudiando la regulación de TGF- β 1 en respuesta a la lesión de las neuronas dopaminérgicas que inervan el estriado, se analizaron por PCR semi-cuantitativa los ARN provenientes de animales tratados con 6-OHDA y se los comparó con aquellos de animales inyectados intra-estriatalmente con vehículo (**Figura 10**).



En el estriado lesionado con la neurotoxina, se observa un incremento en los niveles de ARNm codificando para esta citoquina al día siguiente de la inyección (2 veces), volviendo 5 días después a los niveles normales y manteniéndose así.

Por otro lado, la inyección de solución salina induce TGF- β 1 en el estriado tratado a los 6 días (4 veces, comparado con cualquiera de los otros tratamientos). Este aumento se mantiene a los 12 días, pero a los 30 vuelve a niveles basales.

Cuantificación del ARNm para IL-2 en estriado.

El análisis de los niveles de IL-2 en la región estriada de los ganglios basales en que se inyectó 6-OHDA, evidenció un marcado aumento en los niveles del ARN codificante para esta citoquina a 12 días de la lesión (6,5 veces el contenido de la misma citoquina en la muestra proveniente de los animales a los que se les inyectó solución salina). A los 30 días los niveles no se diferencian de aquellos en los animales control, pero ambos se mantienen elevados respecto a las ratas intactas (3,4 y 2,9 veces respectivamente).

En el hemisferio contralateral, por otro lado, esta citoquina aumenta a los días 1 (4 veces) y 6 (5,6 veces) respecto a los niveles en la región correspondiente en los animales inyectados con solución salina. A los 12 días no hay diferencias entre los dos grupos. A los 30 días ambos grupos presentan niveles aumentados del ARNm de esta citoquina respecto a los normales (5,4 veces los lesionados y 3 veces los controles), la cantidad de IL-2 en el grupo 6-OHDA es mayor que en el grupo salina ($1,08 \pm 0,23$ contra $0,42 \pm 0,14$).

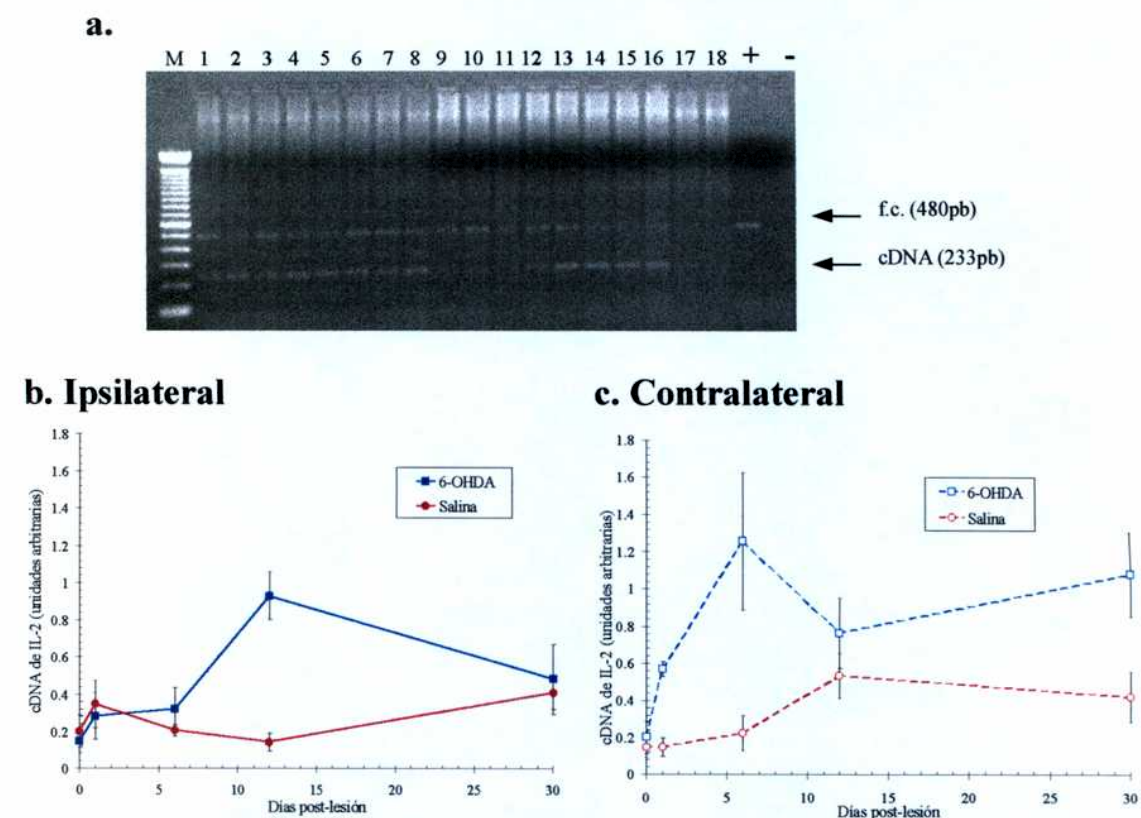


Figura 11. Expresión de IL-2 en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA o inyectadas con solución salina. **a)** Visualización de los amplicones de IL-2 en gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio. Calles 1 a 8: muestras de animales lesionados con 6-OHDA (1 y 2: 1 día, 3 y 4: 6 días, 5 y 6: 12 días, 7 y 8: 30 días post lesión, estriados ipsi y contralateral respectivamente). Calles 9 y 10: muestras de estriados de animales intactos, derecho e izquierdo. Calles 11 a 18: muestras de animales inyectados con solución salina (11 y 12: 1 día, 13 y 14: 6 días, 15 y 16: 12 días, 17 y 18: 30 días post-inyección, estriados contra e ipsilateral respectivamente). +: 100fg de f.c. -: control negativo. M: marcador de peso molecular en escalera de 100pb. **b)** Resultados de la cuantificación de IL-2 en el estriado ipsilateral a la inyección. Tiempo cero: animales intactos. 6-OHDA: animales lesionados con la neurotoxina. Salina: animales inyectados con vehículo. **c)** Resultados de la cuantificación de IL-2 en el estriado contralateral a la inyección. Tiempo cero: animales intactos. 6-OHDA: animales lesionados con la neurotoxina. Salina: animales inyectados con vehículo.

No se detecta $\text{TNF}\alpha$ en estriado a ningún tiempo.

Esta metodología no permitió la detección del ARNm para $\text{TNF}\alpha$ a ninguno de los tiempos analizados en los animales lesionados con 6-OHDA ni en las ratas normales. Se amplificó por PCR el producto de transcripción reversa de 0,5 μg de ARN total junto con 100fg de fragmento de competición durante 42 ciclos. Se pueden ver (**Figura 12**) que se detectan los amplicones del pRat6 y del ADN genómico, pero no hay productos de tamaño esperado (248pb) de la amplificación del cDNA.

Para descartar la posibilidad de que el ADN genómico impidiera la detección del cDNA por competencia, se repitió el experimento utilizando ADNc proveniente de ARN tratado con ADNasa antes de la transcripción reversa. La amplificación de este cDNA en presencia o ausencia de fragmento de competición (que podría también impedir la detección), tampoco llevó a la obtención de productos del tamaño esperado en ninguna de las muestras analizadas (experimentos no mostrados).

Mediante una curva con diferentes cantidades de fragmento de competición, se observó una sensibilidad de 800 moléculas de pRat6 detectadas luego de 42 ciclos de amplificación. Esto indica una alta sensibilidad, que sin embargo no permite detectar los niveles basales de $\text{TNF}\alpha$ antes descriptos (Tchelingirian et al., 1992).

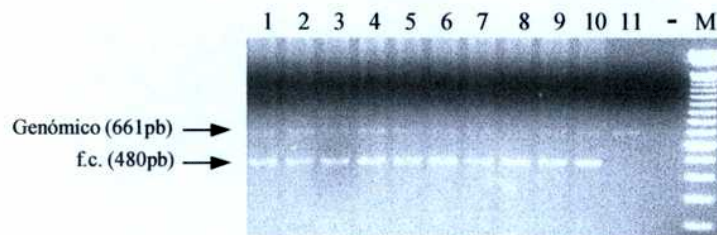


Figura 12. Detección de $\text{TNF}\alpha$ en estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA y en animales intactos. Calles 1 y 2: animales normales, estriado derecho e izquierdo. Calles 3 al 10: animales lesionados con 6-OHDA (3 y 4: 1 día, 5 y 6: 6 días, 7 y 8: 12 días, 9 y 10: 30 días después de la inyección, estriado ipsilateral y contralateral respectivamente). Calle 11: control de contaminación genómica (ARN sin transcriptasa reversa).

-: control negativo. M: marcador de peso molecular en escalera de 100pb.

Discusión

PCR competitiva.

La búsqueda de validar la utilización de la técnica de PCR competitiva para la cuantificación de factores neurotróficos en el SNC durante este seminario, condujo a resultados que no se amoldaban a los modelos matemáticos vigentes para esta técnica pero que, por ser altamente repetibles, no podían ser considerados errores experimentales sino que parecían revelar un comportamiento intrínseco a la reacción.

El modelo de amplificación descrito en la introducción (Raeymaekers, 1993), considera que las eficiencias son constantes a lo largo de la reacción. Sin embargo, en la **Figura 5** se puede ver que en las condiciones experimentales utilizadas en este seminario esto no ocurre. Luego de 26-28 ciclos de amplificación se abandona la fase exponencial de la reacción y ésta se empieza a saturar, de forma que a los 42 ciclos la reacción ya está saturada. Siendo así, el pre-requisito del modelo no se está cumpliendo y, debido a que con menos ciclos de amplificación no es posible detectar las moléculas que se quieren analizar, es necesario tener todo esto en cuenta para no incurrir en errores en la determinación.

La forma más simple de evitar errores es la cuantificación utilizando curvas de referencia empleada en este seminario y en otros trabajos (por ejemplo, (Zachar et al., 1993)). De esta manera no es necesario suponer ningún tipo de comportamiento de la reacción y los errores cometidos sólo serán debidos a la técnica en sí, y no a suposiciones erróneas.

Sin embargo, es relevante comentar brevemente una explicación teórica de los resultados obtenidos en la caracterización de la reacción de PCR competitiva.

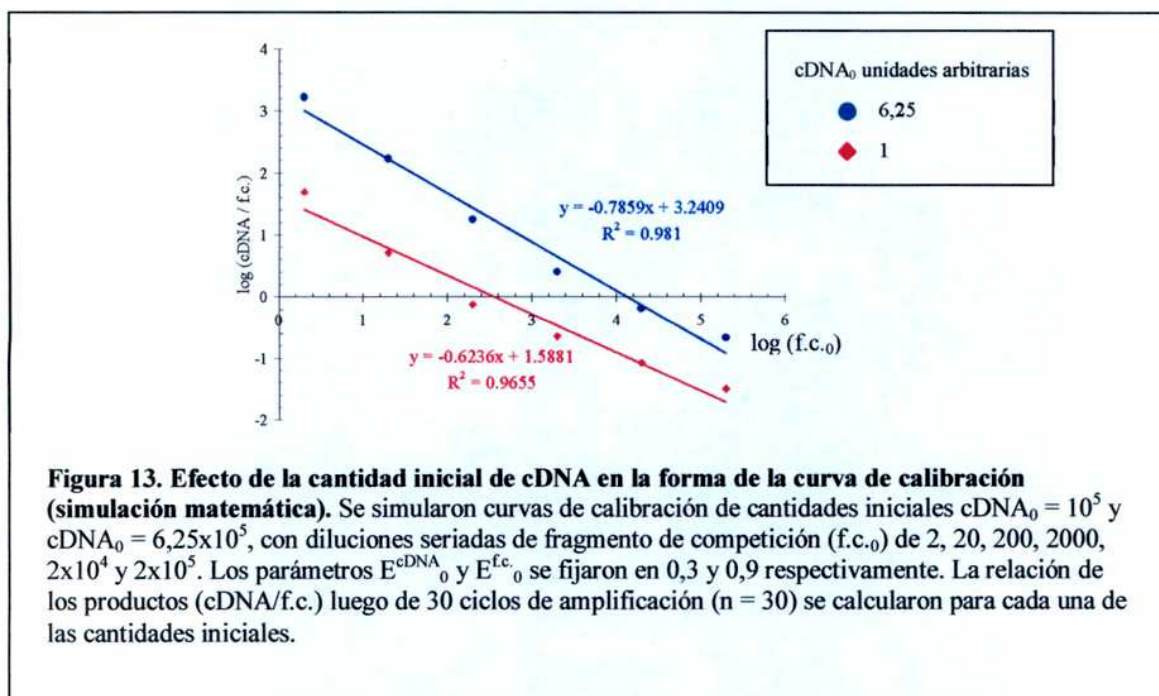
Debido a que a los 26 ciclos se ha abandonado la fase exponencial de la reacción, es necesario en el análisis de ésta tener en cuenta los productos que están llevando a esa saturación. Otros autores han hecho depender a la acumulación de producto de lo acumulado hasta el ciclo anterior y de la máxima cantidad de producto sintetizable (Raeymaekers, 1993; Schnell and Mendoza, 1997). Así, asumiendo que los híbridos primer-cDNA compiten por una cantidad limitante de ADN polimerasa, la manera más simple de describir la eficiencia de amplificación es mediante una relación lineal inversamente proporcional a la cantidad total de templados

$$E^{\text{cDNA}}_n = E^{\text{cDNA}}_0 (1 - (\text{cDNA}_n + \text{f.c.}_n) / P_{\text{max}})$$

$$E_{n}^{f.c.} = E_{0}^{f.c.} (1 - (cDNA_n + f.c._n) / P_{max})$$

donde E_0 es la eficiencia de amplificación cuando $cDNA_n + f.c._n = 0$ y P_{max} es la máxima cantidad de producto que puede formarse (Álvarez et al., manuscrito en preparación). E_0 debe tener un valor entre 0 y 1, y depende de condiciones inherentes a la PCR y a los primers utilizados (largo y composición en bases del cDNA, concentración inicial de ADN polimerasa, dNTPs y primers, temperaturas de desnaturalización, hibridación y elongación, el largo de los ciclos y la presencia de inhibidores en la muestra).

Utilizando este modelo se pueden simular curvas estándar fijando las eficiencias iniciales, el P_{max} y las cantidades iniciales del fragmento de competición y del cDNA. En la **Figura 13** se muestra una simulación para dos cantidades iniciales de cDNA cuando $E^{f.c.} > E^{cDNA}$ (de forma de ser comparables a los resultados experimentales, donde también las eficiencias tienen esta relación –ver **Figura 5**). Si se comparan las **Figuras 4 y 13**, se puede ver un comportamiento similar del modelo matemático y de los resultados experimentales respecto a los cambios en las cantidades iniciales de cDNA.



Si bien estos resultados no afectan las cuantificaciones realizadas durante el desarrollo de este seminario (por haberse utilizado curvas de referencia), apoyan la necesidad de re-evaluar los modelos vigentes de cuantificación por PCR de forma de evitar incurrir en errores innecesarios que conducen a conclusiones erróneas. Además

supone una explicación intrínseca a la técnica que describiría los resultados de este trabajo así como de otros publicados.

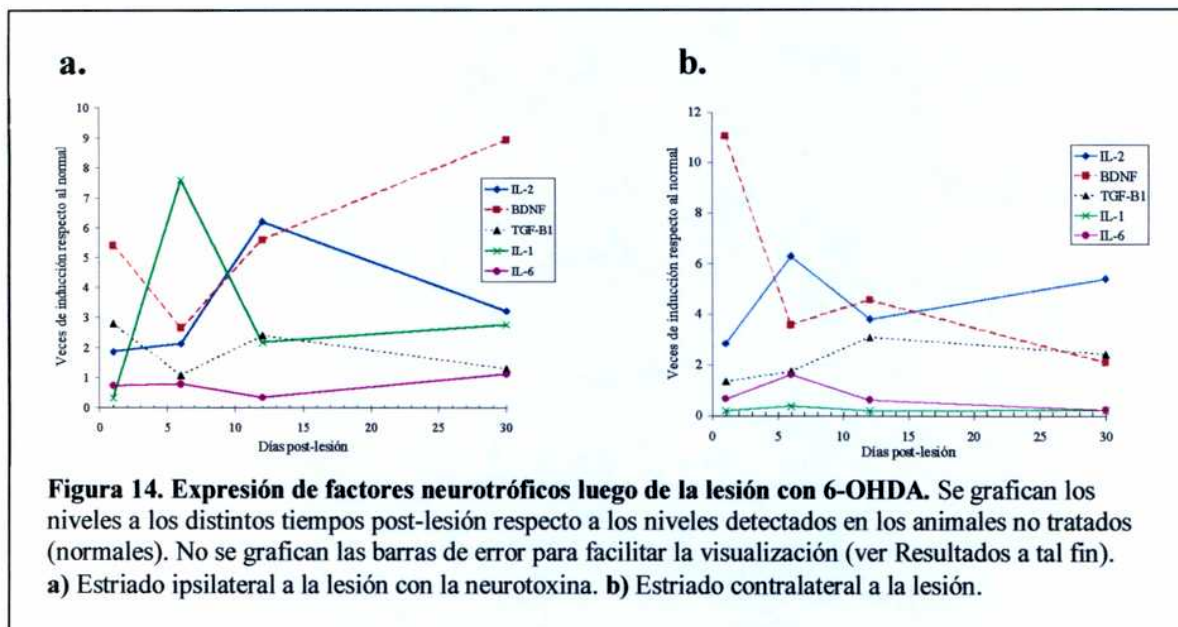
Nota: El modelo matemático presentado ha sido elaborado por el Lic. Mariano Álvarez (datos no publicados), y se presenta sólo para la discusión de los resultados obtenidos y no como parte de esta tesis de licenciatura.

Factores neurotróficos en el modelo de la enfermedad de Parkinson.

Los roles de las diferentes citoquinas y neurotrofinas en el SNC y en las diferentes patologías cerebrales todavía son temas de amplias discusiones. Como se remarcó en la introducción, cada factor neurotrófico ha revelado diferentes efectos en los distintos tipos celulares que integran el cerebro y también en las diversas situaciones en que se expresan. Pero, si bien procesos complejos regulan la presencia de estas moléculas en el SNC, el objetivo de este seminario era intentar distinguir aquellas que presentaran la posibilidad de estar relacionadas con la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra y no con otra intervención invasiva en el SNC, como es la simple inyección.

En este marco, fue sorprendente encontrar patrones de expresión de FNT tan diferentes entre los animales lesionados y los controles (inyectados con solución salina). En la **Figura 14** se muestran de manera simplificada (sin desvíos estándar) los resultados de la cuantificación de los factores neurotróficos analizados hasta la fecha en el modelo de la enfermedad de Parkinson de lesión con 6-OHDA intra-estriatal. Se incluyen los resultados previos al desarrollo de este seminario para ampliar la discusión (IL-1 β e IL-6, (Depino et al., 1998)).

A partir de estos resultados se pueden generar nuevas hipótesis de trabajo, que en este momento son altamente especulativas, ya que el presente trabajo es sólo descriptivo. Así, comparando la expresión de los FNT con el proceso de neurodegeneración evaluado por Sauer *et al* (Sauer and Oertel, 1994), se pueden separar las respuestas en dos etapas: una etapa inicial en la que podrían estar migrando y activándose las células de la microglía y los astrocitos (primera semana), y una segunda etapa de respuesta a la lenta neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas (semanas subsiguientes).



En la **Figura 2** y en la **Tabla 2** (Introducción) se muestra que a la semana de haberse inyectado la neurotoxina no ha ocurrido todavía una importante pérdida de neuronas marcadas con FG ni inmunorreactivas para TH. Por otro lado, durante esta primera semana se inducen diversas citoquinas relacionadas con la activación y atracción de células de la glía. TGF- β 1, por ejemplo, un potente agente quimiotáctico tanto de células microgliales como de astrocitos, presenta un aumento de expresión al día siguiente de inyectarse la neurotoxina en el estriado ipsilateral. El aumento de IL-1 β a los 6 días post-lesión podría estar favoreciendo la activación de las células de la glía que han migrado. Estos aumentos no tienen lugar en los animales controles. Para poder confirmar si la 6-OHDA es un potente desencadenador de procesos inflamatorios tempranos, debería determinarse la presencia de astrocitos y microglía activos en la semana posterior a la inyección de la neurotoxina, mediante inmunohistoquímica.

Durante la segunda etapa (2 a 4 semanas) tiene lugar la pérdida de neuronas positivas para TH mientras que la expresión de FNT es diferente. TGF- β 1 e IL-1 β no se encuentran inducidos, mientras que los niveles de BDNF y de IL-2 se elevan. Otra vez no es posible deducir el(los) rol(es) de estas citoquinas durante este período a partir de la descripción de la cinética de su inducción. Sin embargo, sobre la base del conocimiento previo resulta destacable la inducción de BDNF, un potente factor de supervivencia de las neuronas dopaminérgicas (Hyman et al., 1991). La posibilidad de que esta neurotrofina esté inducida como mecanismo de protección ante la neurodegeneración representa una interesante hipótesis de trabajo. La utilización de

vectores adenovirales que permitan la expresión controlada de BDNF en este modelo de la PD podría permitir aclarar, al menos en parte, el rol de esta molécula en este paradigma.

El rol de IL-2 es aún menos claro, principalmente por la escasez de trabajos estudiando el rol de esta citoquina en el SNC normal y/o patológico. Si bien la IL-2 es la molécula coordinadora de la respuesta inmune, su función en el cerebro se desconoce. Un posible rol de IL-2 podría así ser regular la función de células inmunes que estuviesen en el tejido analizado. Más allá de estas y otras posibles especulaciones, resulta interesante que el pico de expresión de esta citoquina se encuentre 6 días después del de IL-1 β y que ninguna de las dos se mantenga en el tiempo, ya que IL-1 β induce IL-2 en la periferia. Además, otro trabajo (Nieto-Sampedro and Chandy, 1987) había llamado la atención de que si bien, al igual que en el sistema inmune, IL-1 precede la aparición de IL-2, el período resulta muy largo en el SNC para una inducción clásica (en ese trabajo se detectó IL-2 7 días después de IL-1 y 10 días después de la lesión mecánica del cerebro). El mecanismo de inducción así como las células involucradas son desconocidos. Sería necesario identificar primero qué población de células es responsable de la producción de IL-2 (ver más adelante) para luego analizar los mecanismos de inducción.

Otro resultado interesante durante la segunda etapa de este paradigma es la importante inducción de TGF- β 1 en los animales inyectados con salina que no se observa en los animales lesionados con 6-OHDA. TGF- β 1 es un fuerte supresor de la función tanto de las células microgliales (Suzumura et al., 1993) como de los astrocitos (Benveniste, 1998). La ausencia de inducción de TGF- β 1 en los animales con 6-OHDA podrían estar afectando la presencia o no de actividad inflamatoria durante la degeneración neuronal. Para evaluar esta posibilidad debería estudiarse por inmunohistoquímica la presencia de células de la glía activadas durante esta segunda etapa en ambos grupos experimentales (los astrocitos reactivos expresan altos niveles de GFAP y las células fagocíticas activas, como las microgliales, se pueden identificar con el anticuerpo Mac-1, que reconoce al receptor de complemento tipo 3). Por otro lado, los procesos inflamatorios prolongados podrían acarrear efectos positivos o negativos que también han de ser evaluados. Tanto la actividad de la glía como la formación de cicatrices, normalmente reguladas por TGF- β 1, son importantes en la regeneración y la neurodegeneración. El análisis funcional de TGF- β 1 en este paradigma puede ser

investigado mediante técnicas de inmunohistoquímica, PCR in situ y estudios *in vitro*, y se revelan como fuentes de información acerca de los procesos involucrados en la neurodegeneración.

Como en los trabajos previos no queda claro el tipo celular responsable de la expresión de estos FNT ni la cantidad que cada célula expresa (¿son expresados por las neuronas o por las células de la glía?, ¿hay pocas células expresando mucho o muchas células expresando poco?) sería necesario contestar estas preguntas mediante PCR in situ (técnica a elegir para alcanzar la sensibilidad necesaria). Otra posible fuente de citoquinas son las células del sistema inmune, para evaluar lo cual sería necesario realizar ensayos de inmunohistoquímica de forma de detectar linfocitos, macrófagos, etc. que puedan haber migrado al parénquima desde los capilares (esto es factible utilizando marcadores de células del sistema inmune como CD4, CD8, etc.).

La falta de detección de TNF α fue sorprendente por ser ésta una citoquina habitualmente hallada en modelos de neurodegeneración. Sin descartar la posibilidad de que TNF α no se exprese en el estriado de rata, otra posibilidad es que su expresión sea muy localizada y en concentraciones muy bajas, que impidan su detección con la metodología utilizada en este seminario. Sería necesario, antes de descartar la expresión de esta citoquina y un rol en este paradigma, evaluar su expresión en porciones de tejido más pequeñas para evitar un posible efecto de dilución, o realizar PCR in situ. Además, se ha mostrado que TNF α se induce más rápidamente (entre 3 y 6 horas luego de la lesión isquémica del cerebro) que otras citoquinas y neurotrofinas (Bruce et al., 1996), por lo que su expresión podría no evidenciarse en los momentos analizados en este seminario.

Los resultados acerca de la expresión de FNT en los estriados contralaterales a la lesión parecen sugerir algún tipo de conexión entre los dos estriados y/o núcleos dopaminérgicos. La inducción de BDNF e IL-2 a distintos tiempos luego de la inyección de la neurotoxina resultan interesantes a la hora de evaluar el comportamiento del cerebro en su conjunto frente a la neurodegeneración de un grupo de neuronas: ¿Están estos FNT involucrados en los procesos de compensación?, ¿es el contralateral un sensor de fenómenos que tienen lugar en el otro hemisferio?. Lo que parece sobresalir en estos resultados es que los controles de los experimentos en el sistema nervioso central deben ser escogidos con mucha cautela y teniendo en cuenta la hipótesis puesta a prueba.

Por otro lado, las conexiones neuronales entre el estriado y la corteza son ampliamente conocidas. Otros trabajos habían postulado la síntesis de la proteína BDNF en la corteza y su direccionamiento, vía transporte anterógrado, hacia el estriado (Altar et al., 1997; Altar and DiStefano, 1998). Sin embargo en este seminario no se observaron cambios significativos en la síntesis de ARNm codificando para BDNF en la corteza ipsilateral a la lesión, sugiriendo que en este paradigma existen fuentes locales de esta neurotrofina. Sorprendentemente, sí hubo cambios en la corteza contralateral (que constituye un tercio de la innervación cortical del estriado) al día siguiente y a los 30 días post-lesión. Estos resultados deben ser estudiados con más detalle para poder evaluar la contribución cortical durante la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigrales.

En resumen, los resultados obtenidos contribuyen al establecimiento de una técnica necesaria para la cuantificación de FNT endógenos que se expresan a bajas concentraciones en el SNC durante procesos como los neurodegenerativos. Además este trabajo aporta datos experimentales para la elaboración de nuevas hipótesis de trabajo a ser evaluadas en análisis funcionales.



A. DEPINO



F. Rossi

Agradecimientos.

Quiero agradecer a los responsables y víctimas de este seminario de Licenciatura,
. a Fernando Pitossi y a Osvaldo Podhajcer, por darme la libertad investigar y la
posibilidad de hacer ciencia en este país,
. a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Nara, Federico, Fernanda y
Cecilia por compartir una forma de trabajar y por la ayuda cada vez que la necesité,
. a Mariano Álvarez, por la paciencia en las múltiples discusiones acerca del modelo
matemático de PCR competitiva,
. a mi familia.

También quiero agradecer a aquellos que me acompañaron en estos últimos cinco años
de formación académica y humana,
. a Marina, por su amistad y por siempre creer en mí,
. a Diego, por su confianza, por las ricas discusiones acerca de la ciencia argentina y
porque nuestra realidad siempre le quitó el sueño,
. a Julián, porque no conozco a nadie que le guste más la biología o que defina mejor a
los malos de la Historia, y esas cosas por suerte son contagiosas,
. a Ale, por su amistad y por Cortázar,
. a Sebas, porque hubo un tiempo en que soñábamos y sufríamos juntos,
. a mi familia, por todas las oportunidades,
. a los pocos profesores que transmiten una pasión y creen que la distancia con el
alumno no da prestigio, sino que simplemente les quita a ambos la posibilidad de
aprender,
. a impaCIENCIA, porque ser honestos y dudar de todo no es una forma de llegar al
poder pero sí es hacer política y es la única forma de crear una alternativa,
. a las utopías, sin las cuales la vida sería intolerable,
. a Mari, Lea, Nara, Lore (con quien compartí muchas aventuras por el mundo), Lucas,
Malena, Ludmila, Seba Lotito, Paula, Caco, Maísa, Isa, el Flaco, Ana (quien además
me habló de Saramago), Osvaldo Soriano y Marcos (dos muertes incomprensibles),
Pablo, Hoch, Sheila, Laura, Tincho, Greg, Vale, Tunchi, Borges, Chocha, Noe,
Claudia, Rober, Tere, Andrea, Mariano, Ana, Jose, Adriana, Nacho, Seba Laría, Vale,
Vero, Silvio, Galeano, y a todos los que me acabo de olvidar o los que me ayudaron a
ser quien soy sin que yo me diera cuenta

Bibliografía

Akaneyra, Y., Takahashi, M., and Hatanaka, H. (1995). Interleukin-1 β enhances survival and interleukin-6 protects against MPP⁺ neurotoxicity in cultures of fetal rat dopaminergic neurons. *Experimental Neurology* 136, 44-52.

Akassoglou, K., Probert, L., Kontogeorgos, G., and Kollias, G. (1997). Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *The Journal of Immunology* 158, 438-445.

Altar, C. A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J. M., Acheson, A. L., Lindsay, R. M., and Wiegand, S. J. (1997). Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389, 856-860.

Altar, C. A., and DiStefano, P. S. (1998). Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends in Neuroscience* 21, 433-437.

Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N., and Yokota, T. (1990). Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual Reviews in Biochemistry* 59, 783-836.

Araujo, D. M., and Lapchak, P. A. (1994). Induction of immune system mediators in the hippocampal formation in Alzheimer's and Parkinson's diseases: selective effects on specific interleukins and interleukin receptors. *Neuroscience* 61, 745-754.

Araujo, D. M., Lapchak, P. A., Collier, B., and Quirion, R. (1989). Localization of interleukin-2 immunoreactive and interleukin-2 receptors in the rat brain: interactions with the cholinergic system. *Brain Research* 498, 257-266.

Aubert, I., Ridet, J.-L., and Gage, F. H. (1995). Regeneration in the adult mammalian CNS: guided by development. *Current Opinion in Neurobiology* 5, 625-635.

Barger, S. W., Hörster, D., Katsutoshi, F., Goodman, Y., Krieglstein, J., and Mattson, M. P. (1995). Tumor necrosis factor α and β protect neurons against amyloid β -peptide toxicity: Evidence for involvement of a κ B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca^{2+} accumulation. *Proceedings of National Academy of Sciences* 92, 9328-9332.

Batchelor, P. E., Liberatore, G. T., Wong, J. Y. F., Porritt, M. J., Frerichs, F., Donnan, G. A., and Howells, D. W. (1999). Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *The Journal of Neuroscience* 19, 1708-1716.

Benisty, S., Boissiere, F., Faucheux, B., Agid, Y., and Hirsch, E. C. (1998). *trkB* messenger RNA expression in normal human brain and in the substantia nigra of parkinsonian patients: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 86, 813-826.

Benveniste, E. N. (1998). Cytokines actions in the central nervous system. *Cytokine&Growth Factor Reviews* 9, 259-275.

Benveniste, E. N., Kwon, J., Chung, W. J., Sampson, J., Pandya, K., and Tang, L. P. (1994). Differential modulation of astrocyte cytokine gene expression by TGF- β . *The Journal of Immunology* 153, 5210-5221.

Benveniste, E. N., and Merrill, J. E. (1986). Stimulation of oligodendroglial proliferation and maturation by interleukin-2. *Nature* 321, 610-613.

Besedovsky, H. (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: Facts and Hypotheses. *Endocrine Reviews* 17, 64-102.

Bilang-Bleuel, A., Revah, F., Colin, P., Locquet, I., Robert, J., Mallet, J., and Horello, P. (1997). Intrastriatal injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proceedings of National Academy of Sciences* 94, 8818-8823.

Bouaboula, M., Legoux, P., Pességué, B., Delpech, B., Dumont, X., Piechaczyk, M., Casellas, P., and Shire, D. (1992). Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with a multispecific internal control. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 21830-21838.

Bruce, A. J., Boling, W., Kindy, M. S., Peschon, J., Kraemer, P. J., Carpenter, M. K., Holtsberg, F. W., and Mattson, M. P. (1996). Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nature Medicine* 2, 788-794.

Campbell, I. L. (1997). Transgenic mice and cytokine actions in the brain: bridging the gap between structural and functional neuropathology. *Brain Research Reviews*, 1-9.

Campbell, I. L., Abraham, C. R., Masliah, E., Kemper, P., Inglis, J. D., Oldstone, M. B. A., and Mucke, L. (1993). Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proceedings of National Academy of Sciences* 90, 10061-10065.

Clayton, D. F., and George, J. M. (1998). The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends in Neuroscience* 21, 249-254.

Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M., and Varon, S. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: Evidence for anterograde axonal transport. *The Journal of Neuroscience* 17, 2295-2313.

Connor, B., and Dragunow, M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Research Reviews* 27, 1-39.

Cotzias, G. C., Van-Woert, M. H., and Schiffer, L. M. (1967). Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *New England Journal of Medicine* 276, 374-379.

Chao, M., Casaccia-Bonofil, P., Carter, B., Chittka, A., Kong, H., and Yoon, S. (1997). Neurotrophin receptors: mediators of life and death. *Brain Research Reviews*.

Choi-Lundberg, D. L., Lin, Q., Chang, Y., Chiang, Y. L., Hay, C. M., Mohajeri, H., Davidson, B. L., and Bohn, M. C. (1997). Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* 275, 838-841.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159.

Daopin, S., Piez, K. A., Ogawa, Y., and Davies, D. R. (1992). Crystal structure of transforming growth factor- β 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* 257, 369-373.

de Luca, A., Weller, M., and Fontana, A. (1996). TGF- β -induced apoptosis of cerebellar granule neurons is prevented by depolarization. *Journal of Neuroscience* 16, 4174-4185.

Depino, A., Earl, C. D., Podhajcer, O., Oertel, W. H., and Pitossi, F. (1998). Cambios en los niveles de citoquinas en el SNC de rata en un modelo de Parkinson. In SAN-SABRO (Puerto Iguazú, Argentina).

During, M. J., Samulski, R. J., Elsworth, J. D., Kaplitt, M. G., Leone, P., Xiao, X., Li, J., Freese, A., Taylor, J. R., Roth, R. H., Sladek, J. R., O'Malley, K. L., and Redmond, D. E. (1998). In vivo expression of therapeutic human genes for dopamine production in the caudates of MPTP-treated monkeys using an AAV vector. *Gene Therapy* 5, 820-827.

Flanders, K. C., Ren, R. F., and Lippa, C. F. (1998). Transforming growth factor- β s in neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology* 54, 71-85.

Gadient, R. A., and Otten, U. (1994). Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development. *Brain Research* 637, 10-14.

Gash, D. M., Zhang, Z., Ovadia, A., Cass, W. A., Yi, A., Simmerman, L., Russell, D., Martin, D., Lapchak, P. A., Collins, F., Hoffer, B. J., and Gerhard, G. A. (1996). Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380, 252-255.

Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., and Bunn, F. (1990). Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87, 2725-2729.

Golbe, L. I. (1998). Parkinson's disease: nature meets nurture. *The Lancet* 352, 1328-1329.

Graeber, M. B., and Müller, U. (1998). Recent developments in the molecular genetics of mitochondrial disorders. *Journal of Neurological Sciences* 153, 251-263.

Graybiel, A. M. (1996). Basal ganglia: new therapeutic approaches to Parkinson's disease. *Current Biology* 6, 368-371.

Guron, C., Sudarshan, C., and Raghov, R. (1995). Molecular organization of the gene encoding murin transforming growth factor beta1. *Gene* 165, 325-326.

Hagan, J. J., Middlemiss, D. N., Sharpe, P. C., and Poste, G. H. (1997). Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. *Trends in Pharmacological Science* 18, 156-163.

Hardy, J., and Gwinn-Hardy, K. (1998). Genetic classification of primary neurodegenerative disease. *Science* 282, 1075-1079.

Hayward, A. L., Oefner, P. J., Sabatini, S., Kainer, D. B., Hinojos, C. A., and Doris, P. A. (1998). Modeling and analysis of competitive RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 26, 2511-2518.

Heyser, C. J., Masliah, E., Samimi, A., Campbell, I. L., and Gold, L. H. (1997). Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory

neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proceedings of National Academy of Sciences* 94, 1500-1505.

Hirano, T., Akira, S., Taga, T., and Kishimoto, T. (1990). Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunology Today* 11, 443-449.

Hirota, H., Kiyama, H., Kishimoto, T., and Taga, T. (1996). Accelerated nerve regeneration in mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *Journal of Experimental Medicine* 183, 2627-2634.

Ho, A., and Blum, M. (1998). Induction of interleukin-1 associated with compensatory dopaminergic sprouting in the denervated striatum of young mice: model of aging and neurodegenerative disease. *The Journal of Neuroscience* 18, 5614-5629.

Hopkins, S. J., and Rothwell, N. J. (1995). Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Trends in Neuroscience* 18, 83-88.

Horellou, P., Vigne, E., Castel, M.-N., Barnéoud, P., Colin, P., Perricaudet, M., Delaère, P., and Mallet, J. (1994). Direct intracerebral gene transfer of an adenoviral vector expressing tyrosine hydroxylase in a rat model of Parkinson's disease. *NeuroReport* 6, 49-53.

Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y., Juhasz, M., Yancopoulos, G. D., Squinto, S. P., and Lindsay, R. M. (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350, 230-232.

Ibañez, C. F. (1998). Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends in Neuroscience* 21, 438-444.

Kordower, J. H., Freeman, T. B., Snow, B. J., Vingerhoets, F. J. G., Mufson, E. J., Sanberg, P. R., Hauser, R. A., Smith, D. A., Nauert, G. M., Perl, D. P., and Olanow, C. W. (1995). Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine* 332, 1118-1124.

Kriegstein, K., Henheik, P., Farkas, L., Jaszai, J., Galter, D., Krohn, K., and Unsicker, K. (1998). Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor- β for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons. *Journal of Neuroscience* 18, 9822-9834.

Kriegstein, K., Suter-Crazzolara, C., Fischer, W. H., and Unsicker, K. (1995). TGF- β superfamily members promote survival of midbrain dopaminergic neurons and protect them against MPP⁺ toxicity. *EMBO Journal* 14, 736-742.

Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., and Irwin, I. (1983). Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219, 979-980.

Lapchak, P. A., Araujo, D. M., and Hefti, F. (1993). Systemic interleukin-1 β decreases brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 53, 297-301.

Liu, J., Marino, M. W., Wong, G., Grail, D., Dunn, A., Bettadapura, J., Slavin, A. J., Old, L., and Bernard, C. C. A. (1998). TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nature Medicine* 4, 78-83.

Liuzzi, F. J., and Lasek, R. J. (1987). Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway. *Science* 237, 642-645.

Loddick, S. A., Liu, C., Takao, T., Hashimoto, K., and De Souza, E. B. (1997). Interleukin-1 receptors: cloning studies and role in central nervous system disorders. *Brain Research Reviews*, 1-14.

Maroteaux, L., Campanelli, J. T., and Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *Journal of Neuroscience* 8, 2804-2815.

Massagué, J., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1994). The TGF- β family and its composite receptors. *Trends in Cell Biology* 4, 172-178.

Matsunaga, J., Sinha, D., Pannell, L., Santis, C., Solano, F., Wistow, G. J., and Hearing, V. J. (1999). Enzyme activity of macrophage migration inhibitory factor toward oxidized catecholamines. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 3268-3271.

Mattson, M. P., Bruce, A. J., and Blane, E. M. (1996). Cellular actions of tumor necrosis factor in ischemic brain injury. In *Pharmacology of Cerebral Ischemia*, J.Krieglstein, ed., pp. 93-105.

Merrill, J. E., and Benveniste, E. N. (1996). Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends in Neurosciences* 19, 331-338.

Mildbrandt, J., and al, e. (1998). Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* 20, 245-253.

Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Matsumoto, H., Riederer, P., and Nagatsu, T. (1995). Transforming growth factor-beta 1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. *Neuroscience Letter* 193, 129-132.

Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., and Nagatsu, T. (1996). Interleukin-2 but not basic fibroblast growth factor is elevated in parkinsonian brain. Short communication. *Journal of Neural Transmission* 103, 1077-1081.

Muñoz-Fernandez, M. A., and Fresno, M. (1998). The role of tumor necrosis factor, interleukin 6, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Progress in Neurobiology* 56, 307-340.

Nieto-Sampedro, M., and Chandy, K. G. (1987). Interleukin-2-like activity in injured rat brain. *Neurochemical Research* 12, 723-727.

Numan, S., and Seroogy, K. B. (1997). Increased expression of trkB mRNA in rat caudate-putamen following 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Eur.J.Neurosci.* 9, 489-495.

Nussbaum, R. L., and Polymeropoulos, M. H. (1997). Genetics of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics* 6, 1687-1691.

Olanow, C. W., Kordower, J. H., and Freeman, T. B. (1996). Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences* 19, 102-109.

Otero, G. C., and Merrill, J. E. (1997). Response of human oligodendrocytes to interleukin-2. *Brain, Behaviour and Immunity* 11, 24-38.

Parkinson, J. (1817). *On the Shaking Palsy*. Sherwood, Heely and Jones.

Patterson, P. H. (1995). Cytokines in Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurobiology* 5, 642-646.

Pitossi, F., del Rey, A., Kabiersch, A., and Besedovsky, H. (1997). Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *Journal of Neuroscience Research* 48, 287-298.

Pitossi, F. J., and Besedovsky, H. O. (1996). A multispecific internal (pRat6) for the analysis of rat cytokine mRNA levels by quantitative RT-PCR. *European Cytokine Network* 7, 377-379.

Poulsen, K. T., Armanini, A. P., Klein, R. D., Hynes, M. A., Phillips, H. S., and Rosenthal, A. (1994). TGF- β 2 and TGF- β 3 are potent survival factors for midbrain dopaminergic neurons. *Neuron* 13, 1245-1252.

Prehn, J. H. M., Bindokas, V. P., Marcuccilli, C. J., Krajewski, S., Reed, J. C., and Miller, R. J. (1994). Regulation of neuronal Bcl2 protein expression and calcium homeostasis by transforming growth factor type β confers wide-ranging protection of

rat hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 12599-12603.

Raeymaekers, L. (1994). Comments on Quantitative PCR. *European Cytokine Network* 5, 57.

Raeymaekers, L. (1998). Quantitative PCR. *Methods in Molecular Medicine* 16, 27-38.

Raeymaekers, L. (1993). Quantitative PCR: Theoretical considerations with practical implications. *Analytical Biochemistry* 214, 582-585.

Riess, O., Jakes, R., and Krüger, R. (1998). Genetic dissection of familial Parkinson's disease. *Molecular Medicine Today*, 438-444.

Roberts, A. B., Anzano, M. A., Lamb, L. C., Smith, J. M., and Sporn, M. B. (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor. *Proceedings of National Academy of Sciences* 78, 5339-5343.

Rosenthal, A. (1998). Auto transplants for Parkinson's disease? *Neuron* 20, 169-172.

Rothwell, N. J., and Hopkins, S. J. (1995). Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. *Trends in Neuroscience* 18, 130-136.

Rothwell, N. J., Stroemer, P., Lawrence, C., and Davies, C. (1996). Actions of IL-1 in neurodegeneration. In *Pharmacology of cerebral ischemia*, J.Kriegelstein, ed., pp. 125-129.

Sanberg, P. R., Borlongan, C. V., Othberg, A. I., Saporta, S., Freeman, T. B., and Cameron, D. F. (1997). Testis-derived Sertoli cells have a trophic effect on dopamine neurons and alleviate hemiparkinsonism in rats. *Nature Medicine* 3, 1129-1132.

Sauer, H., and Oertel, W. H. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59, 401-415.

Sauer, H., Rosenbland, C., and Björklund, A. (1995). Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor β prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proceedings of National Academy of Science* 92, 8935-8939.

Schnell, S., and Mendoza, C. (1997). Enzymological considerations for a theoretical description of the quantitative competitive polymerase chain reaction (QC-PCR). *Journal of Theoretical Biology* 184, 433-440.

Schöbitz, B., de Kloet, E. R., Sutanto, W., and Holsboer, F. (1993). Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *European Journal of Neuroscience* 5, 1426-1435.

Shoulson, I. (1998). Experimental therapeutics of neurodegenerative disorders: unmet needs. *Science* 282, 1072-1074.

Siebert, P. D., and Larrick, J. W. (1992). Competitive PCR. *Nature* 359, 557-558.

Snider, W. D. (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77, 627-638.

Son, J. H., Chun, H. S., Joh, T. H., Cho, S., Conti, B., and Lee, J. W. (1999). Neuroprotection and neuronal differentiation studies using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos. *The Journal of Neuroscience* 19, 10-20.

Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998). α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of National Academy of Science* 95, 6469-6473.

Strijbos, P. J. L. M., and Rothwell, N. J. (1995). Interleukin-1 β attenuates excitatory amino acid-induced neurodegeneration *in vitro*: Involvement of nerve growth factor. *The Journal of Neuroscience* 15, 3468-3474.

Studer, L., Tabar, V., and McKay, R. D. G. (1998). Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nature Neuroscience* 1, 290-295.

Stypula, G., Kunert-Radek, J., Stepień, H., Zylinska, K., and Pawlikowski, M. (1996). Evaluation of interleukins, ACTH, cortisol and prolactin concentrations in the blood of patients with parkinson's disease. *Neuroimmunomodulation* 3, 131-134.

Sugimoto, T., Fujita, M., Taguchi, T., and Morita, T. (1993). Quantitative detection of DNA by coamplification polymerase chain reaction: A wide detectable range controlled by the thermodynamic stability of primer template duplexes. *Analytical Biochemistry* 211, 170-172.

Suzumura, A., Sawada, M., Yamamoto, H., and Marunouchi, T. (1993). Transforming growth factor- β suppresses activation and proliferation of microglia *in vitro*. *The Journal of Immunology* 151, 2150-2158.

Svennilson, E., Torvik, A., Lowe, R., and Leksell, L. (1960). Treatment of Parkinsonism by stereotactic thermolesions in the pallidal region. *Acta Psychiatrica et Neurologica Scandinavica*, 358-377.

Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58, 573-581.

Tchelinguerian, J.-L., Quinonero, J., Booss, J., and Jacque, C. (1992). Localization of TNF α and IL-1 α immunoreactivities in striatal neurons after surgical injury to the hippocampus. *Neuron*, 213-224.

Tomac, A., Lindqvist, E., Lin, L.-F. H., Ögren, S. O., Young, D., Hoffer, B. J., and Olson, L. (1995). Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature* 373, 335-339.

Toulmond, S., Parnet, P., and Linthorst, A. C. E. (1996). When cytokines get on your nerves: cytokine networks and CNS pathologies. *Trends in Neurosciences* 19, 409-410.

United Nations, P. D., Department of Economic and Social Affairs (1998). Revision of the World Population Estimates and Projections. .

Verma, I. M., and Somia, N. (1997). Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239-242.

Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A., and Lansbury, P. T. (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35, 13709-13715.

Winslow, S. G., and Henkart, P. A. (1991). Polyinosinic acid as a carrier in the microscale purification of total RNA. *Nucleic Acids Research* 19, 3251-3253.

Yuen, E. C., and Mobley, W. C. (1996). Therapeutic potential of neurotrophic factors for neurological disorders. *Annals of Neurology* 40, 346-354.

Zachar, V., Thomas, R. A., and Goustin, A. S. (1993). Absolute quantification of target DNA: a simple competitive PCR for efficient analysis of multiple samples. *Nucleic Acids Research* 21, 2017-2018.

Zhou, F. C., Chiang, Y. H., and Wang, Y. (1996). Constructing a new nigrostriatal pathway in the parkinsonian model with bridged neural transplantation in substantia nigra. *The Journal of Neuroscience* 16, 6965-6974.