

Tesis de Posgrado

Estudio de la interleuquina-1 en modelos fisiológicos y patológicos del sistema nervioso central

Depino, Amaicha Mara

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 doctoral 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. (2003). Estudio de la interleuquina-1 en modelos fisiológicos y patológicos del sistema nervioso central. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3670_Depino.pdf

Cita tipo Chicago:

Depino, Amaicha Mara. "Estudio de la interleuquina-1 en modelos fisiológicos y patológicos del sistema nervioso central". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3670_Depino.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Instituto de Investigaciones Bioquímicas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

**Tesis para optar por el título de Doctor
de la Universidad de Buenos Aires**

**Estudio de la interleuquina-1 en modelos
fisiológicos y patológicos del sistema
nervioso central**


Amaicha Mara Depino


**Dr. Fernando Pitossi
(Director)**

2003

3 6 7 0

"El hombre radical, comprometido con la liberación de los hombres, no se deja prender en 'círculos de seguridad' en los cuales aprisiona también la realidad. Por el contrario, es tanto más radical, cuanto más se inserta en esta realidad para, a fin de conocerla mejor, transformarla mejor."

Paulo Freire, "Pedagogía del oprimido"

"Que crean lo que crean. Lo que alguien cree no se puede saber. Siempre importa más lo que el hombre quiere, que lo que pueda o quiera creer. Y más importa lo que hace. Mire lo que hace."

Fogwill, "Runa"

Resumen

Las citoquinas pro-inflamatorias son inducidas en condiciones patológicas en el sistema nervioso central (SNC) en situaciones de trauma o infección, y se ha demostrado que son capaces de exacerbar y/o disminuir una lesión (Rothwell and Luheshi, 2000). Asimismo, son expresadas de manera constitutiva e inducible por las células del SNC y actúan fisiológicamente sobre las neuronas en el cerebro normal adulto, modulando la plasticidad sináptica, la transmisión sináptica, etc. (Vitkovic et al., 2000).

El sistema de la interleuquina-1 (IL-1) juega un rol decisivo en la respuesta inflamatoria. La expresión de sus ligandos (IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra) y de sus receptores ha sido demostrada en varias regiones del SNC y bajo diversas condiciones (Rothwell and Luheshi, 2000). Otros trabajos han demostrado no sólo una variedad de efectos de la IL-1 en el cerebro o en neuronas y glia *in vitro*, sino que los resultados publicados hasta la fecha resultan muchas veces contradictorios, demostrando efectos opuestos en el mismo sistema de estudio.

El objetivo general de esta tesis es estudiar de manera sistemática y profunda los roles fisiológicos y los efectos farmacológicos de la IL-1 en el cerebro. Para ello se investigó a la molécula en cuatro modelos diferentes en los cuales se estudiaron las respuestas de la glia, las citoquinas, la neurodegeneración y las variaciones en el comportamiento, de forma de obtener una visión global de la fisiología de la IL-1 en el SNC. (1) Observamos similitudes y diferencias regionales en la respuesta aguda a la IL-1 β . Por ejemplo, detectamos reclutamiento de neutrófilos en todas las regiones inyectadas, pero neurodegeneración sólo en el giro dentado. (2) En un modelo en rata de la enfermedad de Parkinson observamos la activación atípica de la microglia en la región lesionada, con una regulación particular de la expresión de citoquinas. (3) Demostramos que la neurogénesis en el mesencéfalo no es un fenómeno fisiológicamente relevante. (4) Demostramos que la IL-1 α endógena hipocámpal tiene un rol modulador del aprendizaje aversivo.

De esta manera, caracterizamos funciones y/o efectos de la IL-1 en el SNC, obteniendo evidencia empírica no sólo de funciones específicas de la IL-1 sino también de características más generales de la gliosis/inflamación en el SNC. Así, observamos que los efectos de la IL-1 dependen tanto de las concentraciones utilizadas como de la región que se está estudiando y, probablemente, de la densidad glial en la misma. Por ejemplo, observamos que la IL-1 endógena modula el aprendizaje, pero que, cuando se inoculan cantidades farmacológicas de la misma, causa degeneración en la misma región (hipocampo).

Abstract

Pro-inflammatory cytokines are induced in pathological conditions of the central nervous system (CNS) both after trauma and infection, and it was shown that they can exacerbate and/or diminish the lesion (Rothwell and Luheshi, 2000). Moreover, they are expressed by brain cells both constitutively and after induction, and act physiologically on neurons in the adult normal brain, modulating synaptic plasticity, synaptic transmission, etc. (Vitkovic et al., 2000).

The interleukin-1 (IL-1) system plays an important role in the inflammatory response. The ligands (IL-1 α , IL-1 β and IL-1ra) and their receptors are expressed in many regions of the CNS and under different conditions (Rothwell and Luheshi, 2000). IL-1 agonists have many effects both in the brain and in neurons and glia *in vitro*. Nevertheless, many reported effects are contradictory and even opposing.

The main aim of this thesis is to gain a deep insight into the physiological roles and pharmacological effects of IL-1 in the brain. We used four different models to study the glial response, cytokine expression, neurodegeneration and behavior, to achieve a global idea of the physiology of IL-1 in the CNS. (1) We observed similarities and differences in the regional response of the CNS to the acute administration of IL-1 β . For example, we detected neutrophil recruitment in all injected regions, but neurodegeneration only in the dentate gyrus. (2) In a rat model of Parkinson's disease we observed an atypical microglial activation in the lesioned region, with a tight regulation of cytokine expression. (3) We showed that there is no physiologically relevant neurogenesis in the adult rat mesencephalon. (4) We demonstrated a modulatory role of endogenous hippocampal IL-1 α in aversive learning.

In summary, we characterized the function and/or effects of IL-1 in the brain, finding evidence not only for specific functions of IL-1 but also for more general effects of gliosis/inflammation in the CNS. Indeed, we observed effects of IL-1 that depend both on the concentration used and on the region under study, and probably on the glial density in it. For example, we observed that the endogenous IL-1 modulates learning but exogenous IL-1 causes degeneration in the same region (the hippocampus).

Agradecimientos

A Fernando, por la confianza y las oportunidades, y por el sociego cada vez que entré en pánico.

Porque hacer ciencia con vos fue un placer, y porque se repita.

A Carina, porque siempre creí mejor trabajar en equipo y el nuestro fue no sólo productivo sino también muy divertido. Por guiarme por los caminos de Ramón y Cajal y porque siempre admiré a la gente que disfruta plenamente lo que hace. Y por tu amistad, obvio.

A Fede, porque todavía recuerdo los días en que nos angustiábamos juntos y porque juntos sobrevivimos, que no es poco. Por los recuerdos del 212 y los Sea-monkeys.

A Alonza, porque estuvo buenísimo trabajar juntas y porque es la culpable de mi renovado interés en el comportamiento animal. Porque compartimos juntas la angustia de terminar nuestras tesis y dejar el país. Porque encontré una amiga.

A Dani, por las charlas de 5 minutos de escritorio a escritorio. Yo también te voy a extrañar.

A Mariela, por la paciencia cuando intenté ayudarte en los primeros pasos por la biología molecular, qué paciencia.

A Fernanda, a Lu y a Nara, con quienes compartí los primeros tiempos en el lab y una amistad de por vida. Tres ejemplos de lo que la Argentina ha perdido.

A Mariana, a Osvaldo, a Salibe, a Álvarez, a Edgardo, a Diego, a Vero, a Pato, a Andrea y a los más nuevos, porque siempre es mejor estar rodeado de buena gente.

Al CONICET, por permitirme investigar en mi país.

A la Fundación Camp...ups! Leloir, por el apoyo durante mi tesis.

A todo el instituto, porque ocuparía páginas enteras nombrando a la gente que me ayudó en las formas más diversas.

A los que han conformado las Neurocenas año tras año, porque el espíritu de aprender nos congregó innumerables noches y espero que nos siga haciendo traspasar. Porque si de ahí saldrán los próximos neurocientíficos argentinos no tengo duda de que el futuro será mejor.

A mis padres, por apoyarme incondicionalmente y muchas veces aún sin entenderlo. Porque siempre estuvieron para ayudarme, para consolarme y para alegrarse conmigo.

A mi hermana, porque siendo tan distintas somos tan iguales.

A mi abuela Julieta, por su bondad, siempre un ejemplo.

A toda mi familia, porque es algo que te toca, pero yo tuve suerte.

A mis amigos del alma:

A Ale, sé que llueva, nieve o truene estás ahí. Aquí estaré yo siempre. Es más, hasta la victoria, siempre.

Amaicha Mara Depino

A Nara, la distancia no pudo menguar nuestra amistad, el tiempo tampoco creo que pueda.

A Diego, un amigo sincero y sensible con quien siempre disfruto la conversación frente a una taza de café. Porque hemos escrito nuestros sueños juntos.

A Julián, su visión crítica, su amistad incondicional. Por su pasión, siempre contagiosa, porque estoy segura de que el futuro de este país lo tendrá entre sus personas más valiosas, y sino será injusto.

A Mari, porque su amistad fue suficiente para hacerme decidir por la bella Roma.

A Marina, por siempre creer en mí.

A Male, a Lu, a Noe, a Chocha, a los Sebas, a Lachi, a Andy (quién me mostró el mundo TC), a Mario, a Lore, a Ludmila, a Rober, a Nacho, a Eugenio, a Fabricio, a Tristán, a Pedro, a German.

A los filósofos, Pablo, Santiago, Cristián, Valeria, Mariano, y a Paz, porque siempre es divertido discutir con gente inteligente y porque disfruté lo suficiente como para ir una vez por semana hasta Quilmes.

A los impaCIENTES de siempre.

Índice

Abreviaturas	12
Introducción general	14
1.El sistema de defensa del cerebro contra la pérdida de la homeostasis	16
1.1. Las células involucradas	16
1.1.1. Las células residentes del cerebro: astrocitos y microglia	16
1.1.1.1. Los astrocitos	17
1.1.1.2. La microglia	18
1.1.2. Inflamación: cuando las células del sistema inmune son reclutadas al sistema nervioso central	20
1.2. Las moléculas involucradas: citoquinas y neurotrofinas	21
1.2.1. El sistema IL-1: IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra	23
1.2.1.1. ¿Qué procesos inducen a la IL-1 en el cerebro?	25
1.2.1.1.1. Inductores periféricos	25
1.2.1.1.2. Inductores centrales	25
1.2.1.2. ¿Qué efectos tiene la IL-1 exógena en el cerebro?	26
1.2.2. Otras citoquinas y neurotrofinas	27
1.2.2.1. El factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α)	27
1.2.2.2. El factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β)	27
1.2.2.3. El factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF)	30
1.2.2.4. El factor de crecimiento nervioso (NGF)	30
2.La enfermedad de Parkinson como modelo de neurodegeneración crónica	32
2.1. Características del síndrome de Parkinson	32
2.2. Etiología de la enfermedad de Parkinson	34
2.2.1. La forma familiar	34
2.2.2. La intoxicación con MPTP	36
2.2.3. La forma esporádica	36
2.2.3.1. Polimorfismos en los genes que codifican para IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra	37
2.2.3.2. Inflamación/Glisis en la etiología de la enfermedad de Parkinson	37
2.2.3.3. Disfunción mitocondrial y daño oxidativo	38
2.2.3.4. Envejecimiento	39
2.3. Los modelos animales de la enfermedad de Parkinson	40
2.3.1. MPTP (ratón y simio)	40
2.3.2. 6OHDA (ratón y rata)	41
2.4. La glia en la enfermedad de Parkinson	43

2.5. La IL-1 en la enfermedad de Parkinson	46
2.6. Neurogénesis en la <i>substantia nigra</i> y rol de la IL-1 β	47
2.7. Hacia una terapia de la enfermedad de Parkinson	49
3. La IL-1 en el comportamiento y el aprendizaje	51
3.1. El aprendizaje y la memoria	51
3.2. Efectos de la IL-1 sobre el comportamiento	54
3.2.1. Sickness behavior	54
3.2.2. Stress y ansiedad/depresión	55
3.2.3. Dolor	56
3.2.4. Sueño	57
3.3. Efectos de la IL-1 sobre el aprendizaje y la memoria	57
3.3.1. IL-1 periférica	58
3.3.2. IL-1 central	59
3.3.3. Potenciación a largo plazo (LTP)	61
Objetivos generales	63
Materiales y métodos	65
1. Animales	66
2. Técnicas quirúrgicas	66
2.1. Inyección de la proteína recombinante humana IL-1 β	67
2.2. Lesión con 6-hidroxidopamina (6OHDA)	67
2.3. Inyección de lipopolisacárido (LPS) en la SNpc	67
2.4. Inyección de factores tróficos en el acueducto	68
3. Marcación con bromodeoxiuridina (BrdU)	68
3.1. Análisis de la proliferación celular en cerebros lesionados con 6OHDA	68
4. RT-PCR competitiva semi-cuantitativa	69
4.1. Extracción del ARN	69
4.2. Síntesis de ADNc	70
4.3. PCR semicuantitativa	71
5. ELISA para IL-1 α e IL-1 β	73
6. Procedimientos comportamentales	73
6.1. Stepping	73
6.2. Evitación pasiva	74
6.3. Campo abierto	75
6.4. Ensayos de sensibilidad al shock eléctrico	76
7. Análisis histológicos	76
7.1. Tinción de Nissl	77

7.2. Tinción de Klüver-Barrera	77
7.3. Inmunohistoquímica	78
7.3.1. Análisis de la inflamación	78
7.3.2. Tirosina hidroxilasa (TH)	78
7.3.3. β -galactosidasa	79
7.4. Inmunofluorescencia	79
7.4.1. Doble inmunofluorescencia para neuronas dopaminérgicas y microglia	79
7.4.2. Detección de activación de astrocitos y microglia	81
7.4.3. Detección de células macrofágicas	81
7.4.4. Detección de neutrófilos	81
7.4.5. Doble inmunofluorescencia anti-BrdU y lectina GSA1-B4	82
7.4.6. Doble inmunofluorescencia anti-BrdU y anti-TH	82
7.4.7. Detección de neuronas	83
7.4.8. Doble inmunofluorescencia anti- β galactosidasa y anti-NeuN	83
7.5. Análisis de neurodegeneración utilizando Fluoro-Jade B	83
7.6. Cortes semifinos	84
7.7. Otros	84
7.7.1. Preparación de paraformaldehído	84
7.7.2. Gelatinización de portaobjetos	85
7.7.3. Preparación de solución de montaje de inmunofluorescencia (Gelvatol)	85
8. Vectores adenovirales	85
8.1. β -galactosidasa (Ad β gal)	85
8.2. IL-1ra (AdIL-1ra)	85
8.3. IL-1 β (AdIL-1 β)	86
9. Análisis de datos	86
Capítulo I. Respuesta del tejido nervioso a la inoculación de la IL-1β	87
I.1. Punto de partida	88
I.2. Objetivos	90
I.3. Resultados	91
I.3.1. Sobre el hipocampo	91
I.3.1.1. Expresión del sistema IL-1 y de TGF- β 1	91
I.3.1.2. Respuesta celular	93
I.3.2. Sobre la <i>substantia nigra</i>	99
I.3.2.1. Expresión del sistema IL-1 y de TGF- β 1	99
I.3.2.2. Respuesta celular	101

I.3.3. Sobre el estriado	105
I.3.3.1. Expresión del sistema IL-1 y de TGF- β 1	105
I.3.3.2. Respuesta celular	107
I.3.4. Sobre la corteza	113
I.3.4.1. Expresión del sistema IL-1 y de TGF- β 1	113
I.3.4.2. Respuesta celular	116
I.4. Discusión	121
I.4.1. Expresión de citoquinas luego de la inyección de IL-1 β	121
I.4.2. Efectos de la IL-1 β sobre la viabilidad neuronal	122
I.4.3. Inflamación y gliosis inducidos por la IL-1 β aguda	125
Capítulo II. Rol de la IL-1β en un modelo de la enfermedad de Parkinson	127
II.1. Punto de partida	128
II.2. Objetivos	130
II.3. Resultados	131
II.3.1. Pérdida parcial y progresiva de neuronas dopaminérgicas de la <i>substantia nigra</i>	131
II.3.2. Activación de la microglia en la <i>substantia nigra</i>	133
II.3.3. Inflamación y activación glial en el estriado	136
II.3.4. Perfiles de expresión de citoquinas y neurotrofinas en la <i>substantia nigra</i>	138
II.3.5. Perfiles de expresión de citoquinas y neurotrofinas en el estriado	141
II.3.6. Expresión de las proteínas IL-1 e IL-1 β en la <i>substantia nigra</i> lesionada	144
II.4. Discusión	146
II.4.1. El modelo de la enfermedad de Parkinson	146
II.4.2. Respuesta glial a la lesión con 6OHDA	146
II.4.3. Expresión de neurotrofinas	147
II.4.4. Patrón de expresión de TGF- β 1 y TNF α	148
II.4.4.1. El TGF- β 1	149
II.4.4.2. El TNF α	150
II.4.5. Patrón de expresión del sistema IL-1 en la <i>substantia nigra</i>	150
II.4.6. Activación de la microglia y expresión atípica de citoquinas en la <i>substantia nigra</i>	152
II.4.7. Nuevas evidencias en trabajos publicados recientemente	154
Capítulo III. Análisis de la neurogénesis en el mesencéfalo y estudio del rol de IL-1β en ese proceso	156
III.1. Punto de partida	157
III.2. Objetivos	158

III.3. Resultados	159
III.3.1. Neurogénesis en animales naïve	159
III.3.2. Neurogénesis en animales lesionados con 6OHDA	161
III.3.3. Neurogénesis en animales tratados con factores de crecimiento	162
III.4. Discusión	164
III.4.1. Neurogénesis en el cerebro adulto	164
III.4.2. Evidencias y contra-evidencias de la existencia de neurogénesis en el mesencéfalo	165
III.4.3. Perspectivas de una terapia de reemplazo para la enfermedad de Parkinson	167
Capítulo IV. Modulación del aprendizaje mediada por la IL-1 endógena hipocampal	169
IV.1. Punto de partida	170
IV.2. Objetivos	171
IV.3. Resultados	172
IV.3.1. Expresión de los ligandos de IL-1 en el hipocampo luego del entrenamiento aversivo	172
IV.3.2. La IL-1 hipocampal modula el aprendizaje motivado por miedo tanto a corto como a largo plazo	175
IV.3.3. La IL-1 endógena hipocampal no modula la habituación de largo plazo a un ambiente novedoso	181
IV.4. Discusión	183
IV.4.1. Rol de la IL-1 α en el aprendizaje	183
IV.4.2. El aumento en la latencia no se debe a efectos inespecíficos del AdIL-1ra	184
IV.4.3. ¿Qué etapa del procesamiento de la memoria está modulando la IL-1 endógena?	186
IV.4.4. La modulación de distintos tipos de memoria	187
IV.4.5. Trabajos publicados recientemente	189
Conclusiones finales	192
1. Moléculas inflamatorias y aprendizaje	193
2. La presencia de glia activada no siempre implica la expresión de citoquinas	195
3. El ambiente neuronal	195
Trabajos publicados	198
Bibliografía	200

Abreviaturas

- **Ad:** vector adenoviral
- **βgal:** beta-galactosidasa
- **6OHDA:** 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.
- **BBB:** barrera hemato-encefálica
- **BDNF:** Factor de crecimiento derivado del cerebro (Brain-Derived Growth Factor).
- **f.c.:** Fragmento de competición de la PCR competitiva.
- **DA:** dopamina (3,4-dihidroxifenilamina).
- **DG:** giro dentado
- **EGF:** Factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor).
- **bFGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos básico (Fibroblast Growth Factor).
- **GDNF:** Factor de crecimiento derivado de la glia (Glial-Derived Growth Factor)
- **i.c.v.:** intra-cerebro-ventricular
- **IL-1:** interleuquina-1
- **IL-1α:** interleuquina-1 alfa
- **IL-1β:** interleuquina-1 beta
- **IL-1ra:** antagonista del receptor de interleuquina-1
- **i.p.:** intra-peritoneal
- **i.v.:** endovenosa
- **LPS:** lipopolisacárido
- **LTM:** memoria de largo plazo
- **LTP:** potenciación a largo plazo
- **MPTP:** 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina.
- **NGF:** Factor de crecimiento nervioso (Nerve Growth Factor).
- **NT:** Neurotrofina.
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- **SN:** *substantia nigra*.
- **SNC:** Sistema nervioso central.
- **SNpc:** *substantia nigra pars compacta*.
- **SNpr:** *substantia nigra pars reticulata*.
- **STM:** memoria de corto plazo

- **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).

Introducción general

“Conocer el cerebro –nos decíamos- equivale a averiguar el cauce material del pensamiento y de la voluntad, sorprender la historia íntima de la vida en su perpetuo duelo con las energías exteriores; historia resumida, y en cierto modo esculpida, en esas coordinaciones neuronales defensivas del reflejo, del instinto y de la asociación de ideas.

Santiago Ramón y Cajal
“Historia de mi labor científica”

Existen dos formas básicas de neurodegeneración del sistema nervioso central (SNC): aguda y crónica. La neurodegeneración aguda puede ser causada por embolias, trauma, hemorragias cerebrales e isquemia. Todos estos accidentes tienen una alta incidencia en la población y representan un importante aspecto socio-económico debido a las consecuencias que traen al individuo. Luego del estímulo inicial, la respuesta glial e inflamatoria continúa causando un daño aún mayor, proceso que puede durar varios días. La neurodegeneración crónica está asociada a distintas enfermedades del SNC y está adquiriendo una cada vez mayor incidencia en la salud, debido al incremento de la expectativa de vida y a que estas patologías por lo general están asociadas con la vejez. En este tipo de degeneración también se ha mostrado que la muerte neuronal está asociada con la activación de la glia, aunque su rol todavía no ha sido realmente dilucidado.

Debido a que la gliosis/inflamación aparece como un proceso común a fenómenos tan importantes tanto social como económicamente, nos propusimos en esta tesis aportar a la comprensión del mismo y a cómo afecta a las neuronas y a funciones específicas del SNC, como el aprendizaje. Considerando que la gliosis/inflamación es un fenómeno muy amplio y que puede ser provocado por los más diversos estímulos, decidimos abocarnos al estudio de la interleuquina-1, una molécula clave en la activación glial y en la inflamación y con posibilidades de estar relacionado con las consecuencias de las mismas.

Antes de discutir los resultados obtenidos introduciremos a los tipos celulares y a las moléculas involucrados en la gliosis y la inflamación del SNC, reseñaremos el conocimiento actual de la enfermedad que hemos tomado como modelo de neurodegeneración crónica (el síndrome de Parkinson) y describiremos los trabajos que han relacionado a la IL-1 y a la gliosis con alteraciones en el comportamiento.

1. El sistema de defensa del cerebro contra la pérdida de la homeostasis

El cerebro ha sido caracterizado inmunológicamente como un sitio de reactividad limitada. Este concepto, llamado inmuno-privilegio, se desarrolló a partir de experimentos clásicos de transplantes que mostraban que los tejidos y los tumores sobrevivían mejor en el cerebro que en otros lugares de la periferia. En los últimos años se ha determinado la importancia de la glia en las respuestas a daños y a infecciones, y se han caracterizado las diversas condiciones que llevan al reclutamiento de células del sistema inmune al cerebro. Además se ha demostrado que muchas de las moléculas claves en el funcionamiento del sistema inmune se expresan en el cerebro y son capaces de regular las respuestas de defensa del mismo.

En esta primera sección resumiremos el conocimiento actual sobre las células y las moléculas que responden a la pérdida de homeostasis del cerebro. Las células involucradas son tanto residentes (astrocitos y microglia) como provenientes del sistema inmune (linfocitos). Las moléculas son clásicamente las citoquinas, aunque también se han descripto roles funcionales para las neurotrofinas. Finalmente, si bien estos tipos celulares y estas moléculas están claramente involucrados en la respuesta a daños tisulares, también juegan roles importantes en el mantenimiento de la homeostasis del sistema nervioso central (SNC) en situaciones fisiológicas. Estas funciones fisiológicas de las citoquinas también serán descriptas.

1.1. Las células involucradas.

1.1.1. Las células residentes del cerebro: astrocitos y microglia.

El concepto de glia se originó con Virchow (1846) quien describió un *Nervenkitt*, lo cual quiere decir cemento o sustancia tipo pegamento (de ahí, el término glia) que mantenía al sistema nervioso central (SNC) unido. Hoy sabemos que hay dos tipos de células gliales en el SNC: la macroglia, que incluye a los astrocitos, los oligodendrocitos y las células ependimales; y la microglia.

1.1.1.1. Los astrocitos.

Los astrocitos fueron descriptos por primera vez en 1865 por O. Deiters, como células distintas a las neuronas y de forma estrellada. Sin embargo en esos tiempos todavía se discutía si las células del SNC eran verdaderas células o una red intersticial, por lo que no fue hasta la enunciación de la teoría neuronal por Ramón y Cajal (1913) cuando fueron reconocidos como un tipo de células gliales.

Los astrocitos son células de origen ectodérmico, importantes en la regulación de la homeostasis del SNC. Estas células afectan la función neuronal mediante la liberación de factores neurotróficos, guiando el desarrollo neuronal, contribuyendo al metabolismo de los neurotransmisores y regulando los niveles extracelulares del pH y del ión K^+ (Dong and Benveniste, 2001). Además los astrocitos dan soporte estructural dentro del parénquima cerebral al cerebro adulto sano e influyen en la formación y mantenimiento de la barrera hemato-encefálica (BBB), una estructura que limita la entrada de elementos sanguíneos al SNC. *In vivo*, los procesos de los astrocitos están en cercana aposición a la superficie abluminal del endotelio microvascular de la BBB, de manera que pueden interceptar o alterar la entrada de varios factores al SNC.

Por otro lado, los astrocitos están interconectados por uniones estrechas (gap junctions), creando un sincicio que permite el acoplamiento iónico y metabólico. Esto otorga un medio de comunicación de larga distancia y permite que las respuestas funcionales se extiendan a áreas considerablemente distantes del sitio primario de acción. De hecho se han observado ondas de calcio inducidas por glutamato tanto en astrocitos en cultivo como en rodajas de hipocampo (Basarsky et al., 1998).

Existe una serie de marcadores biológicos útiles para el estudio de los astrocitos, el más común es la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), cuya expresión aumenta durante la activación.

Los astrocitos también son responsables de la respuesta inmune a lesiones del cerebro. Pueden ser activados (un proceso denominado astrogliosis) en respuesta a citoquinas u otras moléculas solubles liberadas durante el daño de tejidos, lo cual desencadena la proliferación de los astrocitos y el aumento en la síntesis y la secreción de una variedad de moléculas inmunes efectoras, incluyendo citoquinas y quimioquinas, y en menor medida el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I, moléculas de adhesión celular, y radicales libres de oxígeno y nitrógeno que son citotóxicos (Dong and Benveniste, 2001).

Algunos de los resultados más impresionantes sobre el rol de los astrocitos en la respuesta a lesiones del SNC provienen de experimentos de ablación de ese tipo celular o de ratones nulos para GFAP y vimentina, dos filamentos intermedios expresados por los astrocitos. La ablación de los astrocitos luego de una lesión ha demostrado que los mismos son necesarios para limitar la infiltración de leucocitos, reparar la BBB, limitar la degeneración neuronal y limitar el crecimiento de fibras nerviosas (Bush et al., 1999). Por otro lado, los ratones nulos GFAP^{-/-}vim^{-/-} forman cicatrices menos densas (Pekny et al., 1999), mostrando la importancia de los astrocitos en la cicatrización en el cerebro. De hecho, se ha demostrado que la cicatriz formada por los astrocitos es una de las barreras más importantes a la regeneración en el SNC (Fawcett and Asher, 1999; Liuzzi and Lasek, 1987).

Preparaciones experimentales *in vitro* han mostrado tanto efectos neuroprotectivos como neurotóxicos de los astrocitos activados, de hecho no todos los astrocitos expresan los mismos receptores y astrocitos de diferentes regiones ejercen influencias tróficas y morfogénicas diferentes sobre las neuronas (Denis-Donini et al., 1984). Por ello las generalizaciones acerca de las propiedades gliales basados en estudios de una sola región muchas veces no son útiles.

1.1.1.2. La microglia.

Los macrófagos se generan en la médula ósea, la cual abandonan para circular como monocitos y entonces pasar a residir en casi todos los tejidos. En algunos lugares permanecen durante mucho tiempo, mientras que en otros existe un recambio rápido. Las funciones de los macrófagos residentes no se conocen plenamente, pero hay evidencia de que intervienen en la homeostasis tisular y de que constituyen la primer línea de defensa contra lesiones e infecciones. El número de macrófagos residentes es relativamente bajo, pero aumenta rápidamente luego de una lesión o infección mediante el reclutamiento de más macrófagos de entre los monocitos circulantes en la sangre.

La microglia fue descrita por del Río-Hortega como un tipo de células del SNC con morfología característica y porque se teñía de manera diferencial respecto a las otras células del SNC (del Río Hortega, 1932). Ahora existe consenso de que estas células representan los macrófagos residentes del SNC, las cuales derivan de la médula ósea durante el desarrollo fetal temprano e infiltran el cerebro como células mononucleares fagocíticas durante el período embrionario tardío y postnatal temprano. A medida que el cerebro madura, estas células mononucleares evolucionan en microglia, desarrollando una morfología ramificada

que es característica del estado no activado de estas células, y residen de manera permanente en el cerebro (Leong and Ling, 1992; Perry et al., 1995).

La microglia representa cerca del 10% de las células cerebrales, sin embargo la densidad y morfología de la microglia ha demostrado ser bastante heterogénea con una variación de más de 6 veces en densidad de una región del cerebro a otra (Lawson et al., 1990), además de diferencias en la expresión de citoquinas (Ren et al., 1999). La expresión de los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC), de marcadores de linfocitos T y B, y del receptor de complemento 3 (CR3), además de la capacidad de secretar citoquinas, refuerzan la idea de que comparten linaje con los monocitos y macrófagos (Streit, 2002), y permite detectar a este tipo celular en el cerebro mediante inmunohistoquímica.

De manera notable, la microglia es única en el hecho de no sólo brindar funciones de soporte típicas de otros tipos gliales sino también en representar un sistema de defensa *inmunocompetente*. De esta forma, la microglia es un híbrido entre los linfocitos y la glia, protegiendo y brindando soporte a las neuronas dentro del SNC (Streit, 2002).

La microglia es activada cuando los receptores de la superficie ligan la endotoxina bacteriana, ciertas citoquinas, prostanoïdes y proteínas de complemento, representando un rol de asistencia en las respuestas del sistema inmune y luego de una lesión (Hanisch, 2002). La microglia activada inicia una cascada neuroquímica de "fase aguda" que involucra respuestas endocrinas, autonómicas y comportamentales. Algunos de estos componentes pueden contribuir a la neuropatología: 1) aumento en la síntesis y secreción de factores solubles como citoquinas, óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, proteínas de complemento, neurotransmisores aminoacídicos y prostanoïdes (Banati et al., 1993; Hanisch, 2002); 2) el aumento en la expresión de receptores de superficie, incluyendo los MHC clase I y II y moléculas de adhesión celular (Neumann, 2001); y 3) la migración a sitios distantes de inflamación en el cerebro y la diferenciación morfológica en células fagocíticas (Kreutzberg, 1996). Estas características de la microglia activada recuerdan a los macrófagos periféricos luego de daños tisulares, una observación consistente con el origen ontogénico común entre estos dos tipos celulares.

La muerte neuronal también promueve la transformación de la microglia en células fagocíticas que remueven los debris celulares y, a su vez, la microglia reactiva puede contribuir activamente a la muerte celular en el SNC, liberando metabolitos tóxicos como aminoácidos excitatorios, intermediarios reactivos de oxígeno y de nitrógeno y citoquinas (Banati et al., 1993; Gehrmann et al., 1995). Es más, algunos tratamientos que reducen la

activación microglial resultan en un aumento en la supervivencia neuronal luego de diversos estímulos dañinos (He et al., 2001; Tikka et al., 2001; Tikka and Koistinaho, 2001; Wu et al., 2002; Yan et al., 2003; Yrjänheikki et al., 1998; Yrjänheikki et al., 1999). En cambio, estudios de axotomía del nervio facial y de lesiones de la médula espinal sugieren que la microglia tiene como rol disminuir el daño tisular primario y promover la reparación subsiguiente (revisado en Streit, 2002).

1.1.2. Inflamación: cuando las células del sistema inmune son reclutadas al sistema nervioso central.

En la periferia la inflamación es definida en términos clínicos, patológicos y moleculares. Clínicamente se definen las señales de Celsus: dolor, tumor, calor y rubor. Histopatológicamente se identifica la presencia de neutrófilos y reclutamiento de otros tipos celulares. Molecularmente se evidencia la presencia de factores de complemento activados, proteínas de fase aguda y citoquinas pro-inflamatorias. De esta manera la inflamación es considerada una respuesta estereotipada no específica y la inflamación crónica tiene lugar cuando se falla en eliminar el factor iniciador. En la mayoría de los tejidos, la lesión aguda es seguida de la liberación de histamina que tiene efectos vasculares, resulta en una exudación de fluido en el tejido lesionado y en la migración de los neutrófilos.

Una respuesta de esas características sería catastrófica en el cerebro. Por ello es conceptualmente posible que el cerebro, y la interfase con la sangre que es la BBB, se hayan adaptado de forma de evitar el daño tisular circundante a una lesión. Así, la activación glial puede ser considerada una forma especializada de respuesta del SNC a una lesión (Eikelenboom et al., 2002).

De hecho, el cerebro mantiene no sólo un aislamiento físico respecto de la sangre, sino que el cerebro representa un ambiente anti-inflamatorio, ya que la inyección de inflamógenos en el cerebro produce sólo respuestas inflamatorias modestas (Andersson et al., 1992; Perry et al., 1993). Esta dificultad en reclutar células sanguíneas no se debe a una falta de expresión de moléculas de adhesión (Andersson et al., 1992), sino a una expresión diferencial de citoquinas y quimioquinas (Anthony et al., 1997; Blond et al., 2002). Es más, es necesario el reclutamiento de neutrófilos para que se rompa la BBB (ver una revisión en Perry et al., 1997).

Las citoquinas TNF α (factor de necrosis tumoral-alfa) e IL-1 (interleuquina-1) son importantes en la iniciación y propagación de la fase aguda de la respuesta inflamatoria. En los tejidos periféricos, la administración exógena de lipopolisacáridos (LPS), IL-1 β o TNF α evoca un patrón de inducción de citoquinas muy parecido, que involucra el propio aumento autócrino y la expresión de citoquinas adicionales, todo lo cual resulta en una histopatología similar, independientemente del estímulo inicial. Sin embargo, en el SNC la IL-1 β no induce TNF α ni viceversa, y la inyección de IL-1 β induce el reclutamiento de neutrófilos pero no de monocitos, mientras que lo opuesto ocurre con TNF α (Anthony et al., 1997; Blond et al., 2002).

En la literatura el término “inflamación” es utilizado de forma laxa cuando se refiere al SNC: a veces se refiere al reclutamiento de células sanguíneas, a veces a la gliosis y otras a las dos respuestas en conjunto. Para evitar confusiones, en esta tesis nos referiremos con el término gliosis a la activación de astrocitos y microglia, y con el término inflamación al reclutamiento de células sanguíneas (neutrófilos, monocitos y otros linfocitos). Sin embargo, esta separación no es perfecta, ya que muchas veces se observan células macrofágicas de las cuales no se puede determinar su origen, ya que pueden ser monocitos que invadieron el SNC o microglia diferenciada.

1.2. Las moléculas involucradas: citoquinas y neurotrofinas.

Las citoquinas son una clase de polipéptidos pleiotrópicos y multifuncionales, que juegan un rol crucial en la comunicación célula a célula y en la activación celular. Son expresados en niveles bajos en los tejidos sanos, pero pueden ser inducidos rápidamente en respuesta al trauma tisular o a desafíos inmunes, de manera de llevar a cabo una gran variedad de funciones de señalización y efectoras. Se han identificados más de 40 citoquinas diferentes así como diversos tipos y subtipos de receptores (Hopkins and Rothwell, 1995). Varios autores han sugerido que las citoquinas debieran dividirse en “familias” sobre la base de características funcionales o moleculares. Funcionalmente, pueden ser clasificadas en pro-inflamatorias o anti-inflamatorias, dependiendo del balance final de sus efectos sobre el sistema inmune. Sin embargo, las citoquinas no sólo están involucradas en la respuesta inmune sino también en una serie de procesos fisiológicos y biológicos, en los sistemas nerviosos periférico y central. De hecho, las interacciones neuro-inmunes son bidireccionales: las citoquinas y otros productos del sistema inmune modulan la acción, diferenciación y

supervivencia de las neuronas, mientras que los neurotransmisores y neuropéptidos liberados por las neuronas juegan un rol pivote influyendo sobre el sistema inmune.

Las citoquinas pueden ejercer sus efectos en el SNC tanto directa como indirectamente (Figura 1). Las acciones directas implican que las citoquinas están presentes en el cerebro, en y/o alrededor de las neuronas, y que éstas tienen receptores para ellas. Los efectos indirectos resultan de la acción de las citoquinas en otros sistemas cuyas señales llegan al SNC por vías indirectas.

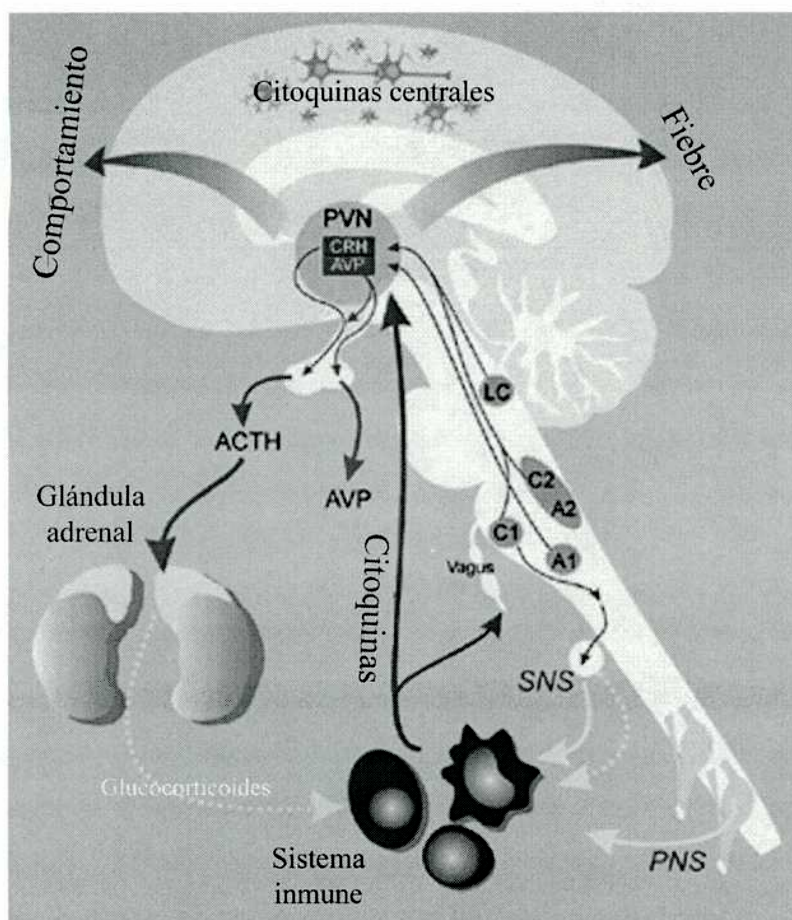


Figura 1. Esquema de la comunicación entre los sistemas inmune y nervioso.

Las citoquinas periféricas estimulan una plétora de funciones centrales, incluyendo las respuestas neuroendócrinas, el comportamiento, el sueño y la fiebre. Lo consiguen a través de vías diferentes, incluyendo el cruce de la BBB y la activación del nervio vago. Abreviaturas: PNS, sistema nervioso periférico; SNS, sistema nervioso simpático; LC, locus coeruleus; PVN, núcleo paraventricular; CRH, hormona liberadora de corticotropina; AVP, arginina vasopresina; ACTH, hormona adrenocorticotrófica. Las líneas sólidas indican vías estimulatorias y las punteadas vías inhibitorias. Adaptado de Sternberg, 1997.

Las citoquinas que se generan en la periferia pueden afectar el SNC mediante distintas vías (Licinio and Wong, 1997). La barrera hemato-encefálica (BBB) no es completamente impermeable a las citoquinas sino que existen zonas permeables (Konsman et al., 2002) y además se ha demostrado transporte activo de algunas citoquinas a través de la barrera (Plotkin et al., 1996; Plotkin et al., 2000). Además, las citoquinas circulantes pueden inducir la expresión de más citoquinas en las células endoteliales, las cuales pueden ser liberadas hacia el parénquima cerebral (Warner et al., 1987). Otra vía indirecta de acción de las

citoquinas periféricas es a través del nervio vago (Licinio and Wong, 1997; Mascarucci et al., 1998) y las células catecolaminérgicas del núcleo del tracto solitario (Ericsson et al., 1994). De cualquiera de estas formas, las citoquinas periféricas entran al cerebro o inducen nuevas moléculas en el mismo, señalizando lo que ocurre en la periferia. Así pueden participar en las complejas respuestas autonómicas, neuroendocrinas, metabólicas y comportamentales a infecciones e inflamación, pero también a isquemia y trauma cerebral.

La expresión de citoquinas en el cerebro tanto constitutiva como induciblemente, ha sido observada en todos los tipos celulares del SNC (Szelényi, 2001). Si bien la detección de receptores en distintos tipos celulares ha tenido grandes dificultades técnicas debido a los bajos niveles de expresión, se han demostrado efectos de distintas citoquinas en todos los tipos celulares. Al detectarse las proteínas y sus receptores en el SNC, los trabajos se han concentrado en identificar los efectos de las mismas (para una revisión ver Besedovsky, 1996; Hopkins and Rothwell, 1995; Rothwell and Hopkins, 1995).

Las células gliales producen una variedad de citoquinas y son capaces de responder a las mismas o a otras, liberando más citoquinas, moléculas de adhesión y otros factores. También se ha descrito la expresión de citoquinas por neuronas y efectos de aquellas sobre este tipo celular (ver más adelante IL-1 como ejemplo, siendo una de las citoquinas más estudiadas). Así se han demostrado efectos de las citoquinas sobre diversas funciones centrales como el comportamiento, el aprendizaje, el sueño, la fiebre, la regulación de los sistemas inmune y endocrino, etc. (Sternberg, 1997) y sobre la biología neuronal, incluyendo neurodegeneración, neuroprotección, regeneración, plasticidad sináptica, desarrollo del SNC, etc. (Vitkovic et al., 2000).

1.2.1. El sistema interleuquina-1 (IL-1): IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra.

La IL-1 es una citoquina responsable de la mediación de una variedad de procesos de defensa del organismo, inflamación y respuestas a lesiones, y como tal se la considera el prototipo de citoquina inflamatoria. 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 en astrocitos y células de la microglia del SNC (Arai et al., 1990).

Existen dos moléculas relacionadas, IL-1 α e IL-1 β , que están codificadas por distintos genes pero que interactúan con el mismo receptor para activarlo (Figura 2). Se sintetizan

como precursores de 31kDa que son activados por la enzima convertidora de IL-1 (ICE o caspasa-1) (Loddick et al., 1997). Estos dos agonistas actúan sobre el receptor de 80kDa IL-1RI, que requiere de la asociación de una proteína accesoria para la transducción de la señal (ver Rothwell and Luheshi, 2000 y citas allí). Existe un segundo receptor de 68kDa IL-1RII que también une IL-1 pero no es capaz de transducir la señal debido a que carece de dominio intracelular. El tercer miembro de la familia IL-1 es el antagonista competitivo natural IL-1ra, que se une al IL-1RI pero no es capaz de estimular la asociación con la proteína accesoria. Además existen formas solubles de los dos receptores, mostrando que el control del sistema IL-1 es extremadamente importante, ya que varios sistemas de regulación han sido seleccionados durante la evolución.

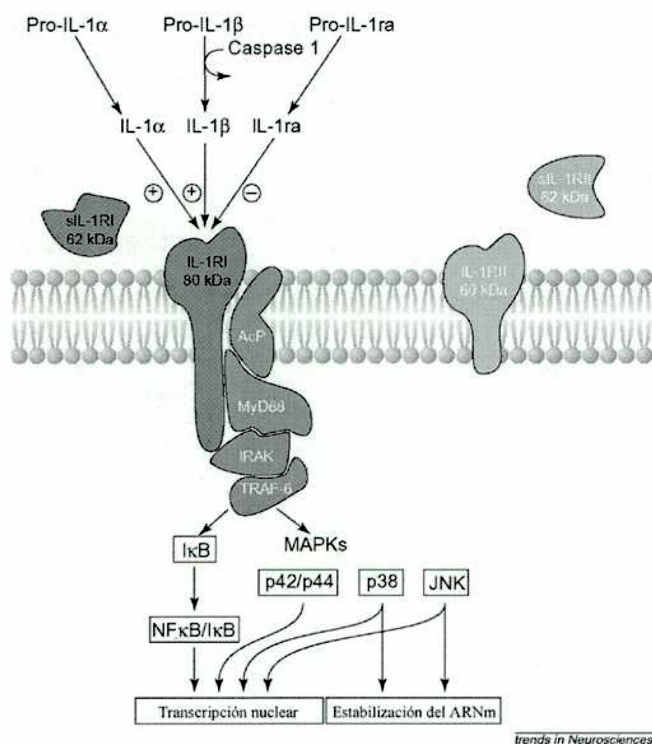


Figura 2. El sistema interleuquina-1 (IL-1). El sistema IL-1 está formado por los agonistas (IL-1 α e IL-1 β), el antagonista (IL-1ra) y a los receptores (tipo I y II). Abreviaturas: AcP, proteína accesoria; MAP, proteína activada por mitógeno; IRAK, quinasa asociada al receptor de IL-1; TRAF, factor asociado al receptor de TNF; NF- κ B, factor nuclear- κ B; JNK, quinasa del amino terminal de c-jun. Adaptado de Rothwell and Luheshi, 2000

La expresión de IL-1 en el cerebro no se limita a las células gliales, sino que también se han detectado los ligandos y los receptores en las neuronas en distintas regiones (Ban et al., 1991). Sin embargo, la expresión de IL-1 en el cerebro sano es muy baja y se regula positivamente después de diversos estímulos inflamatorios, traumáticos y neurodegenerativos. En general, aquellos estímulos que aumentan la expresión de IL-1 α e IL-1 β , estimulan IL-1ra pero con un retraso temporal (ver más adelante).

Las próximas secciones están dedicadas a revisar qué procesos inducen IL-1 en el cerebro y, a su vez, cuáles son los efectos de esa IL-1 central en el funcionamiento neuronal. Existen varios trabajos que revisan el conocimiento actual sobre la IL-1 cerebral (Allan, 2002; Arend et al., 1998; Dinarello, 1996; Dinarello, 1991; Lotan and Schwartz, 1994; Rothwell, 2003; Rothwell and Luheshi, 2000; Rothwell and Luheshi, 1994; Rothwell et al., 1996; Vitkovic et al., 2000).

1.2.1.1. ¿Qué procesos inducen a la IL-1 en el cerebro?

1.2.1.1.1. *Inductores periféricos.*

En general las infecciones periféricas provocan un aumento de la IL-1 circulante en sangre. Como se mencionó previamente, existen varios mecanismos por los cuales las citoquinas periféricas pueden alcanzar el SNC. En particular, se han descrito varios mecanismos específicamente para la IL-1.

La IL-1 β cruza la BBB en ratones intactos y se ha observado que esta permeabilidad disminuye con la edad (McLay et al., 2000). La IL-1 α de rata cruza mediante un transporte saturable la BBB de rata, pero la IL-1 α humana no (Plotkin et al., 2000). Por otro lado, en ratón la IL-1 α humana sí es transportada a través de la BBB, mientras que la distribución posterior a una inyección i.c.v. de IL-1 α humana es por difusión y por vías extracelulares (Plotkin et al., 1996). Así, a pesar de evidencias preliminares que sugerían que la mayoría de los péptidos y polipéptidos cruzan la BBB a través de los órganos circunventriculares, menos del 5% de la IL-1 α inyectada en la sangre entra en estos órganos y esta proteína está restringida de difundir al resto del cerebro por la capa externa de células que forman los órganos circunventriculares (Kastin et al., 1999).

Por otro lado, las citoquinas periféricas pueden inducir la expresión de citoquinas en el cerebro por diversos mecanismos (Pitossi et al., 1997; Van Dam et al., 1998). Por ejemplo, la IL-1 induce la expresión de IL-1 en las células vasculares (Warner et al., 1987) y en las meninges (Vernet-der Garabedian et al., 2000).

Así, la IL-1 periférica puede ejercer sus efectos directamente o a través de inducciones endógenas de la citoquinas.

1.2.1.1.2. *Inductores centrales.*

Existen distintos factores que pueden inducir la expresión de IL-1 en el cerebro (toxinas liberadas por excesiva excitación neuronal, purinas, leptinas y otras citoquinas) tanto como diversos procesos (inflamación, gliosis y plasticidad sináptica).

De hecho, una gran variedad de estímulos centrales es capaz de inducir la expresión de IL-1: el daño mecánico del parénquima cerebral o trauma (Fassbender et al., 2000; Gabellec et al., 1999; Knobloch and Faden, 2000; Woodroffe et al., 1991), la inducción de convulsiones por kainato (Vezzani et al., 1999), la transección de los aferentes entorhinales del hipocampo (Fagan and Gage, 1990), la degeneración Walleriana (Shamash et al., 2002), la isquemia (Legos et al., 2000), la infección con parásitos (Quan et al., 2003) y la excitotoxicidad (Allan et al., 2001; Eriksson et al., 1999). En algunos de estos modelos se ha evaluado si la expresión endógena de IL-1 tenía efectos nocivos o protectores, utilizando el antagonista IL-1ra. Los efectos nocivos son más que los protectores: en modelos de isquemia (Boutin et al., 2001; Friedlander et al., 1997; Hara et al., 1997; Loddick et al., 1996; Loddick et al., 1997), en epilepsia (Vezzani et al., 1999; Vezzani et al., 2000), en degeneración Walleriana (Shamash et al., 2002), en neurodegeneración inducida químicamente (Brucoleri et al., 1998), en excitotoxicidad (Allan et al., 2001; Lawrence et al., 1998; Pearson et al., 1999; Strijbos and Rothwell, 1995), en la degeneración causada por el parásito *Trypanosoma brucei* (Quan et al., 2003) y en la demielinización (Mason et al., 2001). Los roles positivos de la IL-1 sobre las neuronas descriptos son: la asociación de inmunoreactividad para IL-1 con prolongaciones en activa ramificación, tanto de neuronas colinérgicas (Fagan and Gage, 1990) como dopaminérgicas (Ho and Blum, 1998), la protección contra degeneración por isquemia de concentraciones bajas pero prolongadas de IL-1 (Wang et al., 2000) y la necesidad de IL-1 para inducir la remielinización (Mason et al., 2001).

1.2.1.2. **¿Qué efectos tiene la IL-1 exógena en el cerebro?**

Los principales efectos de la inyección de IL-1 β en el parénquima cerebral tienen que ver con la activación de la glia y la inflamación. Se ha visto que la IL-1 β es capaz de reclutar neutrófilos de la sangre al SNC, aunque este efecto es mucho más marcado en ratas jóvenes que en adultas (Anthony et al., 1997). Esto conlleva la ruptura de la BBB de manera dependiente de neutrófilos, ya que no tiene lugar en animales a los cuales se les ha eliminado ese tipo celular. Por otro lado, cuando se observa a tiempos más largos (5 días después de la cirugía), la inyección de IL-1 β en la corteza causa la activación de astrocitos y el crecimiento

de vasos sanguíneos (Giulian et al., 1988). Finalmente, la infusión continua de IL-1 β en el SNC induce una encefalitis severa, con infiltrado de neutrófilos (Schöning et al., 1999).

Hasta ahora no se ha demostrado que la IL-1 β sea capaz de causar muerte neuronal directamente, sin embargo sí exacerba el daño producido por neurotoxinas. Por ejemplo, la inyección de IL-1 β en el estriado aumenta el volumen de la corteza que resulta lesionado por excitotoxicidad (Allan et al., 2000; Grundy et al., 2002). Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio exhaustivo de los efectos de la IL-1 β en distintas regiones del SNC.

1.2.2. Otras citoquinas y neurotrofinas

Otras citoquinas y neurotrofinas pueden participar junto con la IL-1 en la regulación de procesos neurológicos o inflamatorios del SNC. En particular se describirán a continuación la citoquina pro-inflamatorias TNF α , la citoquina anti-inflamatoria TGF- β 1 y las neurotrofinas BDNF y NGF. El tener un panorama de la expresión de otras moléculas efectoras a la hora de estudiar una en particular (como la IL-1) permite establecer el ambiente molecular en el cual la citoquina en cuestión está actuando.

1.2.2.1. El factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α).

El 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 secreción de 17kD, aunque también existe una forma de membrana que tiene actividad citotóxica y un rol importante en la comunicación intercelular. La producción de TNF α en la periferia se induce por varios estímulos, incluyendo mitógenos, IL-1, IL-2 e interferones. Existen dos tipos de receptores para TNF α , denominados p55 y p75, que son expresados tanto por las células de la glia 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 y/o caspasas. p75 está asociado a las proteínas citoplasmáticas TRAF1 y TRAF2 que actúan por vías de señalización como NF- κ B o MAPK.

Se ha descrito la producción de TNF α por astrocitos, microglia, 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 a la supervivencia. $\text{TNF}\alpha$ puede afectar tanto a los astrocitos y a la microglia, en los cuales induce proliferación, como a los oligodendrocitos y a las neuronas, en los que es tóxico en altas concentraciones. Además, $\text{TNF}\alpha$ puede inducir cambios de reactividad en la microglia, incluyendo la producción de superóxidos y la liberación de factores citotóxicos. Asimismo, la sobreproducción continua de $\text{TNF}\alpha$ soluble en animales transgénicos lleva al desarrollo de enfermedades neuronales, independientemente del tipo celular que lo produzca (Akassoglou et al., 1997).

En cambio, se ha demostrado que en ratones que carecen de $\text{TNF}\alpha$ o de ambos receptores para $\text{TNF}\alpha$, hay un aumento del daño neuronal provocado por distintos estímulos neurotóxicos (Bruce et al., 1996; Liu et al., 1998) pero no por otros (Rousselet et al., 2002; Sriram et al., 2002). Por ello, $\text{TNF}\alpha$ puede ejercer un rol neuroprotectivo o neurodegenerativo, dependiendo de las condiciones, el tipo celular o el estímulo inicial.

1.2.2.2. El factor de crecimiento transformante-beta ($\text{TGF-}\beta$).

Los $\text{TGF-}\beta$ s fueron primero caracterizados como proteínas que estimulan a las células normales de riñón de rata para que formen colonia (Roberts et al., 1981). Ahora los $\text{TGF-}\beta$ 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, la apoptosis y la hematopoyesis. Son los prototipos de una superfamilia de factores de crecimiento de aproximadamente 25 miembros que incluyen a las activinas, las inhibinas, las proteínas morfogénicas de hueso, los factores de crecimiento y diferenciación y el factor de crecimiento derivado de glia (GDNF) (Massagué et al., 1994).

El $\text{TGF-}\beta$ 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 forman puentes intracatenarios (Daopin et al., 1992).

En mamíferos hay 3 isoformas de $\text{TGF-}\beta$ s ($\text{TGF-}\beta 1$ 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 $\text{TGF-}\beta 1$ no tiene región TATA ni

CAAT, pero sí un número de sitios de unión de proteínas reguladoras importantes como AP-1, AP-2, 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 del 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 astrocitos como en neuronas de la *substantia nigra* y el estriado de ratas adultas (Flanders et al., 1998).

Los TGF- β s tiene múltiples efectos supresores 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 de manera cooperativa 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 microglia (Suzumura et al., 1993). Por otro lado, TGF- β 1 es quimiotáctico para astrocitos y microglia, indicando que sus efectos aportan a la generación de cicatriz en el SNC (revisado en (Benveniste, 1998; Flanders et al., 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 e inducen luego el fenotipo reactivo de estos tipos celulares. Además, el TGF- β regula la producción de moléculas de reconocimiento (como la tenascina, la molécula de adhesión neuronal, NCAM, o la glicoproteína L1) por la astroglia, revelando un posible rol indirecto en la regeneración axonal (Aubert et al., 1995).

El 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, el 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.

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

El BDNF es una proteína básica dimérica de 28kDa de dos subunidades de 14kDa unidas de manera no covalente, estructuralmente relacionadas con NGF y su receptor se denomina TrkB (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).

Además de las funciones típicas de BDNF como regulador del crecimiento neuronal y modulador de la plasticidad sináptica que no serán discutidos aquí (ver (Alonso et al., 2002; Poo, 2001)), el BDNF comparte con otras neurotrofinas un rol en la degeneración y la neuroprotección.

En particular, los resultados *in vitro* e *in vivo* sugieren un rol de BDNF en la neuroprotección de las neuronas dopaminérgicas contra la toxicidad del ión MPP⁺, del glutamato y del óxido nítrico, pero no de dopamina (Hyman et al., 1991; Son et al., 1999). El trasplante de diferentes tipos celulares expresando BDNF, atenúa la pérdida de neuronas dopaminérgicas tanto en el modelo de lesión con 6-hidroxidopamina en rata como en el de 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina (MPTP) en ratón (ver (Connor and Dragunow, 1998) y citas allí). Por otro lado, la lesión mecánica induce a los macrófagos y la microglia activos a la producción tanto de BDNF como de GDNF, y la activa ramificación de neuronas dopaminérgicas en la región (Batchelor et al., 1999).

Finalmente, en la *substantia nigra* de pacientes con la enfermedad de Parkinson, los niveles del receptor de BDNF (trkB) no están alterados (Benisty et al., 1998), sin embargo en el estriado ipsilateral a la lesión con 6OHDA en rata tiene lugar un aumento significativo en la densidad de hibridización para trkB (Numan and Seroogy, 1997).

1.2.2.4. El factor de crecimiento nervioso (NGF).

La primera evidencia de que una sustancia química podía estimular y controlar el desarrollo neuronal provino de los experimentos de los años '50, en los que Rita Levi-Montalcini y Viktor Hamburger identificaron al NGF. Desde entonces se han descripto múltiples funciones del NGF sobre las neuronas: estimula su proliferación durante el

desarrollo, luego influye sobre la diferenciación, la elaboración de procesos, la maduración y la supervivencia.

El péptido nativo de NGF consiste en 3 pares de subunidades que son clivadas de manera proteolítica, de las cuales la β es la activa (118 aminoácidos), por eso muchas veces se lo denomina NGF- β . El receptor se denomina TrkA y está presente en distintas células de los sistemas nervioso, inmune y endocrino. Sin embargo, NGF (y las otras neurotrofinas) se puede unir con baja afinidad al receptor p75 y, aunque no se autofosforila, puede interactuar con las proteínas Trk y modificar su afinidad de unión al ligando, la dosis-respuesta y la actividad quinasa (Siegel and Chauhan, 2000).

Los roles descriptos para NGF en el SNC son muy variados, incluyendo la regulación de los niveles de neurotransmisores, de la nocicepción, la supervivencia neuronal, etc. (revisado en Levi-Montalcini et al., 1996; Lewin and Mendell, 1993). En particular, se observó la disminución de los niveles de NGF en pacientes con la enfermedad de Parkinson (Siegel and Chauhan, 2000).

2. La enfermedad de Parkinson como modelo de neurodegeneración crónica.

Como se describió en las secciones anteriores, la IL-1 tiene un rol importante en la neurodegeneración aguda causada por accidentes (isquemia, hemorragia o trauma). Sin embargo, las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por ser crónicas y muchas veces de etiología desconocida.

Existe evidencia directa e indirecta de un rol de la IL-1 en este tipo de enfermedades (ver (Rothwell and Luheshi, 2000) y citas allí). En este sentido, se ha relacionado a la IL-1 con la miastenia gravis, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer y la epilepsia. A continuación se revisa el conocimiento actual sobre la fisiología de la enfermedad de Parkinson.

2.1. Características del síndrome de Parkinson.

Varios síntomas parkinsonianos (particularmente el temblor en reposo) fueron descriptos ya por Galeno (138-201 AD). Sin embargo, aún en 1817, cuando 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 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 (acinesia) o movimientos voluntarios anormalmente lentos (bradicinesia), (3) rigidez muscular que lleva a movimientos abruptos, (4) inestabilidad postural, y (5) falta de expresión facial (Figura 3A). 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).

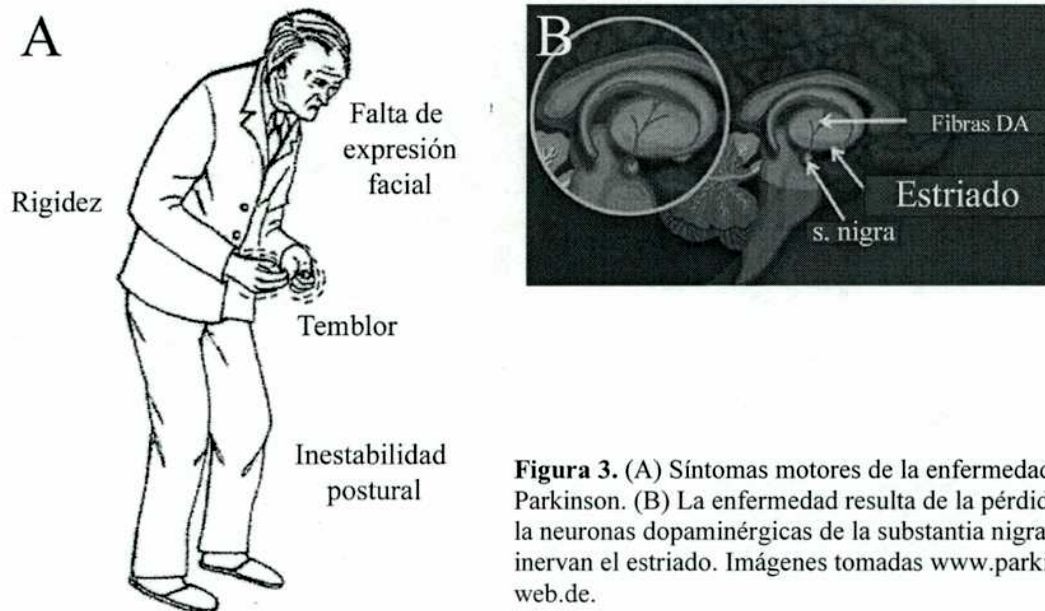


Figura 3. (A) Síntomas motores de la enfermedad de Parkinson. (B) La enfermedad resulta de la pérdida de la neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra que inervan el estriado. Imágenes tomadas www.parkinson-web.de.

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 núcleo *accumbens*, debido a la degeneración neuronal de la zona compacta de la *substantia nigra* (SNpc) (Figura 3B). Existe una pérdida gradual de neuronas de la SNpc y del contenido de dopamina de los ganglios basales con la edad, aún en la población general (Dunnet and Björklund, 1999). En la enfermedad de Parkinson idiopática, los primeros síntomas clínicos se evidencian cuando la función de estas células ha disminuido en un 70-80% del normal (Hagan et al., 1997). 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 del *globus pallidus* hacia el tálamo, provocando una disminución en la actividad de la corteza motora y los síntomas negativos de la enfermedad de Parkinson: acinesia, bradicinesia y rigidez. 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 enfermedad de Parkinson, pero con menor severidad que las proyecciones nigro-estriatales.

Además de la pérdida de las neuronas pigmentadas de la SNpc, una característica patológica relativamente específica acompaña a la degeneración neuronal: los cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, conocidos como los cuerpos de Lewy (descritos por F.H. Lewy en 1912). Los cuerpos de Lewy son encontrados en varias regiones del cerebro, incluyendo la SNpc, 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).

2.2. Etiología de la enfermedad de Parkinson

La(s) causa(s) de la muerte neuronal en la enfermedad de Parkinson 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.

De hecho se han postulado dos mecanismos mediante los cuales se llegaría a la barrera sintomática de la enfermedad, o sea a la pérdida del 70-80% de las neuronas dopaminérgicas (Dunnet and Björklund, 1999). El primero sugiere la existencia de envejecimiento acelerado, el cual aumentaría la tasa de muerte neuronal normal (5% por década) a un 45% por década, de forma que pueden aparecer síntomas que en un individuo normal y con una expectativa de vida de 70 años no aparecerían. El segundo es un modelo de dos estímulos que combina un daño tóxico agudo que disminuye la cantidad de neuronas sin llegar al umbral de inicio de los síntomas, pero que continuando la tasa normal de pérdida neuronal lleva a la aparición temprana de la enfermedad (Clarke et al., 2000). Cualquiera sea el modelo que resulte más parsimonioso con los datos clínicos que se van obteniendo con técnicas avanzadas de seguimiento de la función cerebral (tomografía de emisión de positrones –PET-, tomografía computada de emisión –SPECT-, etc.), lo cierto es que las causas del envejecimiento acelerado o del daño tóxico agudo son en casi todos los casos desconocidos.

2.2.1. La forma familiar.

La contribución genética a la enfermedad de Parkinson ha sido controvertida durante largo tiempo, debido al fracaso en estudios tendientes a demostrar un aumento en la

concordancia de la enfermedad de Parkinson 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 18 fluorodopa en los ganglios basales) se ha llegado a la conclusión de que factores genéticos contribuyen a la predisposición para la enfermedad de Parkinson (Riess et al., 1998). De los 10 genes asociados a la forma familiar de la enfermedad de Parkinson, 2 han sido caracterizados en forma exhaustiva: la α -synucleína y la parkina.

El rol de la α -synucleína en la etiología y la patología de la enfermedad de Parkinson ha sido extensamente estudiado a partir del descubrimiento de una mutación ligada a la forma familiar de la enfermedad (ver Clayton and George, 1998). La α -synucleína es una proteína de 140 aminoácidos, originalmente encontrada en los terminales nerviosos presinápticos y en porciones de la envoltura nuclear, de ahí su nombre (Maroteaux et al., 1988). En homogenatos de cerebros, 0,5-1% de la proteína citoplasmática es synucleína. 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 cuerpos de Lewy, inclusiones citoplasmáticas que son características tanto de la forma esporádica como de la familiar de la enfermedad de Parkinson (Spillantini et al., 1998). Las razones por las cuales estas proteínas se agregan en la patología se desconocen, pero análisis estructurales revelan que presentan dos estructuras estables, una de las cuales promueve la agregación. Así esta proteína semeja a la proteína prion y a la proteína amiloidea β que forma placas en la enfermedad de Alzheimer (Weinreb et al., 1996). Sin embargo, la toxicidad de los cuerpos de Lewy todavía es tema de discusión y algunos autores sugieren que éstos son en realidad neuroprotectivos (ver Maries et al., 2003, y citas allí). Sin embargo es de notar que aunque la α -synucleína se expresa en todo el cerebro sólo se agrega en la SNpc, sugiriendo una interacción con el ambiente oxidativo de las neuronas dopaminérgicas.

A pesar del entusiasmo generado a partir de la identificación de la α -synucleína, ninguno de los modelos animales generados (eliminación o sobre-expresión del gen o de las formas mutadas del gen en ratones y ratas) ha podido reproducir la mayoría de las características de la enfermedad de Parkinson (ver una descripción de la situación en Maries et al., 2003). Tal vez uno de los resultados más interesantes arrojado por el trabajo con

animales nulos para el gen de la α -synucleína sea que estos animales son resistentes a la toxicidad por MPTP (Dauer et al., 2002). Estos resultados apoyan la noción de una convergencia de factores genéticos y ambientales en el desencadenamiento de la enfermedad, mostrando cómo la modificación de un sólo gen puede alterar la susceptibilidad a distintas neurotoxinas.

En el parkinsonismo autosómico recesivo de comienzo juvenil se encontraron mutaciones en el gen de la parkina (Kitada et al., 1998). La parkina es una ligasa de ubiquitina E3, involucrada en la degradación de diversos sustratos. Un estudio sugiere que la parkina ubiquitina una forma glicosilada de α -synucleína (Shimura et al., 2001), vinculando los dos genes más importantes en la forma familiar de la enfermedad de Parkinson.

2.2.2. La intoxicación con MPTP.

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-propionoxi-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 enfermedad de Parkinson, sino que promovió el desarrollo de modelos animales para el estudio de la enfermedad de Parkinson tanto en primates no humanos como en ratones (ver más adelante, sección 2.3.1.). Además, las similitudes químicas del MPTP con herbicidas comunes estimularon la investigación epidemiológica de la enfermedad (Golbe, 1998).

2.2.3. La forma esporádica.

Como ya se mencionó, las causas de la forma esporádica de la enfermedad de Parkinson, que representa más del 90% de la incidencia de la enfermedad, siguen siendo desconocidos. La evidencia sugiere que la enfermedad de Parkinson representa el resultado final de un conjunto complejo de interacciones, durante décadas, entre factores de predisposición genética, características propias e innatas del sistema dopaminérgico nigro-estriatal y exposición a toxinas ambientales. Aquí se describen algunos de los factores que se han propuesto como causales de riesgo para la enfermedad, en particular aquellos que tienen que ver con la activación glial y la inducción de citoquinas.

2.2.3.1. Polimorfismos en los genes que codifican para IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra.

Los genes que codifican para las proteínas IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra se encuentran ubicados en el brazo largo del cromosoma 2. Se ha descrito un polimorfismo en la región promotora (C-511T) del gen de IL-1 β que influye sobre los niveles de expresión de la proteína. Lo mismo ocurre con el polimorfismo C-889T en el gen para IL-1 α y con un polimorfismo de repeticiones en tandem de número variable (VNTR) en el segundo intrón del gen para IL-1ra.

Estudios poblacionales han demostrado una mayor frecuencia del polimorfismo -511T (que conlleva mayor expresión de la proteína IL-1 β) en pacientes con la enfermedad de Parkinson (McGeer et al., 2002; Schulte et al., 2002), aunque en ciertas muestras poblacionales no se ha podido encontrar esta asociación (Nishimura et al., 2000), probablemente debido a una mayor frecuencia del alelo en la población japonesa (Schulte et al., 2002). En la población japonesa en cambio, se encontró que el alelo -511C estaba asociado a un inicio más temprano de la enfermedad (Nishimura et al., 2000).

En ninguna de las poblaciones analizadas se encontró una mayor frecuencia de algún alelo particular de los genes para IL-1 α (Dodel et al., 2001; McGeer et al., 2002; Nishimura et al., 2000; Schulte et al., 2002) ni para IL-1ra (Nishimura et al., 2000).

Si bien se necesitan estudios más amplios, que incluyan una población más heterogénea y probablemente con una revisión de sus diagnósticos (Lachenmayer, 2003), los trabajos mencionados sugieren que en las poblaciones canadiense y alemana la expresión aumentada de IL-1 β es un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.

2.2.3.2. Inflamación/Glisis en la etiología de la enfermedad de Parkinson.

Aunque no se ha establecido una relación causal, algunos estudios epidemiológicos sugieren que la inflamación relacionada con el daño cerebral post-traumático contribuiría con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Stern, 1991), probablemente mejor reflejado en algunos casos de síndrome de Parkinson en ex-boxeadores (Davie et al., 1995). En este sentido se ha observado activación de la microglia (Mirza et al., 2000), sugiriendo un rol de estas células en la enfermedad (ver sección 2.4.). Sin embargo, si la inflamación/glisis está relacionado con la etiología y/o la patología de la enfermedad, todavía es tema de investigación.

Algunas características regionales y celulares de la SNpc, podrían explicar la especial vulnerabilidad de estas células a la neurodegeneración: 1) la SN es la región del cerebro con más alta concentración de microglia (Kim et al., 2000; Lawson et al., 1990); 2) estudios *in vitro* e *in vivo* indican que, en comparación con las provenientes de otras regiones, las neuronas de la SNpc son las más sensibles al daño mediado por inflamación (Kim et al., 2000; Le et al., 2001); y 3) las neuronas dopaminérgicas tienen una menor capacidad antioxidante (Dunnet and Björklund, 1999), lo cual dificulta su respuesta a desafíos del entorno.

La sensibilidad especial de las neuronas dopaminérgicas a la respuesta inflamatoria se evidencia en la neurodegeneración producida por la inyección del lipopolisacárido bacteriano (LPS) en la SNpc de rata, el cual es un inductor de citoquinas (Herrera et al., 2000; Liu et al., 2000). Este efecto del LPS parece estar mediado por la microglia, ya que el tratamiento con la droga anti-inflamatoria dexametasona (Castaño et al., 2002) o con un antagonista de los receptores de opioide (naloxona) (Liu et al., 2000) disminuye la respuesta microglial, y esta inhibición correlaciona con una menor muerte neuronal. Sin embargo, el mecanismo por el cual el LPS induce la muerte neuronal es desconocido, habiéndose demostrado hasta ahora que no se debe a la inducción de la óxido nítrico-sintetasa (NOS) (Castaño et al., 1998) ni a las citoquinas IL-1 β , TNF α e interferón-gama (IFN γ) (Castaño et al., 2002).

Otras dos moléculas capaces de activar la microglia (el trisialoganglósido GT1b y la trombina) también provocan la degeneración de las neuronas dopaminérgicas cuando son inyectados en la SNpc (Choi et al., 2003; Ryu et al., 2002). Sin embargo, estos efectos sí están mediados por la toxicidad del óxido nítrico.

Esto muestra que existen distintos estímulos capaces de inducir la muerte de las neuronas dopaminérgicas a través de la activación de la microglia y que estos actúan mediante mecanismos diferentes. En conclusión, aún en modelos donde se ha demostrado el rol directo de la microglia en la neurodegeneración, el mecanismo por el cual tiene lugar puede variar de sistema en sistema.

2.2.3.3. Disfunción mitocondrial y daño oxidativo.

Entre los factores ambientales sospechados de incidir en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson, la exposición a agentes agroquímicos ha sido el más intensamente estudiado. La administración de herbicidas como la rotenona o el paraquat inducen parkinsonismo en roedores (Beal, 2001). La rotenona inhibe el complejo I mitocondrial de las neuronas, al igual que la neurotoxina MPTP. Sin embargo, se ha demostrado *in vitro* que

concentraciones subtóxicas del herbicida resultan tóxicas a las neuronas dopaminérgicas cuando se las combina con concentraciones subtóxicas de LPS al mismo tiempo o en manera secuencial (Gao et al., 2003). Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que la exposición a agroquímicos y episodios de inflamación cerebral, simultáneos o secuenciales, pueden promover o disparar el proceso neurodegenerativo.

Está bien documentado que la tirosina hidroxilasa y la monoamina oxidasa producen peróxido de hidrógeno como un producto colateral normal de la síntesis y del catabolismo de la dopamina (revisado en Blum et al., 2001). Es más, la auto-oxidación no enzimática de la dopamina produce la formación de neuromelanina, que potencia la formación de radicales de hidroxilo cuando se combina con hierro. Normalmente, el H_2O_2 es inactivado por la catalasa o la peroxidasa de glutatión. En la SN en neurodegeneración se ha verificado: 1) un aumento en los niveles de hierro y 2) una disminución en los niveles de defensa anti-oxidante (ver Blum et al., 2001 y citas allí).

Así se ha propuesto que la enfermedad de Parkinson podría ser explicada como una susceptibilidad genética a agentes ambientales o endógenos que lleven a daño oxidativo en una población neuronal que se encuentra previamente bajo estrés oxidativo (Blum et al., 2001).

2.2.3.4. Envejecimiento.

Tal vez uno de los factores más aceptados de susceptibilidad a la enfermedad de Parkinson es la vejez. Durante el envejecimiento se acumulan progresivamente moléculas alteradas que llevan a un metabolismo de energía defectuoso en las células del cerebro. El ADN, los lípidos y las proteínas son alterados por mecanismos diferentes (oxidación, peroxidación, modificación y agregación). Aunque las células tienen varios mecanismos adaptativos para lidiar con estas alteraciones (chaperonas, factores de crecimiento, proteínas antiapoptóticas, enzimas antioxidantes, etc.), no son capaces de evitar completamente la disfunción sináptica, la regresión de dendritas y la apoptosis que acompañan al envejecimiento. Además existe disfunción de las células gliales como la activación de la microglia, una dificultad en la detoxificación, demielinización y la inducción de cascadas de citoquinas, todo lo cual se suma a la alteración progresiva.

2.3. Los modelos animales de la enfermedad de Parkinson.

Para que tenga relevancia directa en la enfermedad de Parkinson, un modelo animal ideal debiera repetir las características más importantes de la enfermedad humana: 1) cantidades normales de DA al nacimiento, con pérdida gradual y selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en el adulto; 2) detección de déficit motores incluyendo bradicinesia, rigidez y temblor en reposo; y 3) aparición de cuerpos de Lewy. Además debe tener un curso temporal relativamente corto, para permitir el estudio de manera rápida y no tan costosa. Se han desarrollado varios modelos animales de la enfermedad, pero ninguno es capaz de recapitular todas las características de la misma.

La identificación de sustancias que son captadas de manera selectiva por las neuronas catecolaminérgicas y que provocan su neurodegeneración, ha llevado al desarrollo de lesiones químicas, las cuales son las más utilizadas hoy en día. Lamentablemente, la mayoría de los modelos no representan un adecuado paradigma de neurodegeneración progresiva, una de las características más importantes de la enfermedad (Dawson et al., 2002).

2.3.1. MPTP (ratón y simio).

La identificación de la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina (MPTP) como causante de parkinsonismo en humanos (ver más arriba y (Langston et al., 1983)), conllevó el desarrollo de modelos de la enfermedad en simios y ratones (por alguna razón desconocida la droga no es efectiva en ratas). Cuando se administra en ratones, la MPTP cruza la barrera hemato-encefálica y es convertida, por la monoamina oxidasa B presente en células gliales, en su forma activa: el ión MPP^+ . Este ión es reconocido por el transportador de dopamina y tomado así de manera selectiva por las neuronas dopaminérgicas, en las cuales se acumula mediante la formación de complejos con neuromelanina y por la confinación del ión en las vesículas sinápticas mediante los transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT). En las mitocondrias interfiere con el complejo I de la cadena de transporte de electrones, provocando la depleción de energía de la célula, lo cual genera a su vez estrés oxidativo por aumento en la concentración de radicales libres de oxígeno (Nussbaum and Polymeropoulos, 1997). La muerte neuronal inducida por MPP^+ parece ser por apoptosis, mediante la activación de la caspasa-3 (Hartmann et al., 2000).

Una única inyección de MPTP causa la degeneración completa de la SNpc en 1-2 semanas, representando así un modelo agudo de neurodegeneración. Además la inyección

sistémica de la toxina no permite una lesión específica de la SNpc, sino que todas las neuronas dopaminérgicas son afectadas. Finalmente, y de importancia para este trabajo, el hecho de que la MPTP sea transformada en su forma activa por los astrocitos permite postular que ese tipo glial sea afectado por la toxina (lo cual explicaría que en ese modelo se observe astrocitosis, mientras que en otros no, ver más adelante).

2.3.2. 6OHDA (ratón y rata).

La 6-hidroxidopamina (6OHDA) es un análogo hidroxilado del neurotransmisor natural dopamina. Si bien su uso en la generación de modelos animales proviene de ensayos de toxicidad específicos para neuronas catecolaminérgicas, existe evidencia de producción endógena de 6OHDA en el cerebro de rata y en el humano (ver (Blum et al., 2001) y citas allí).

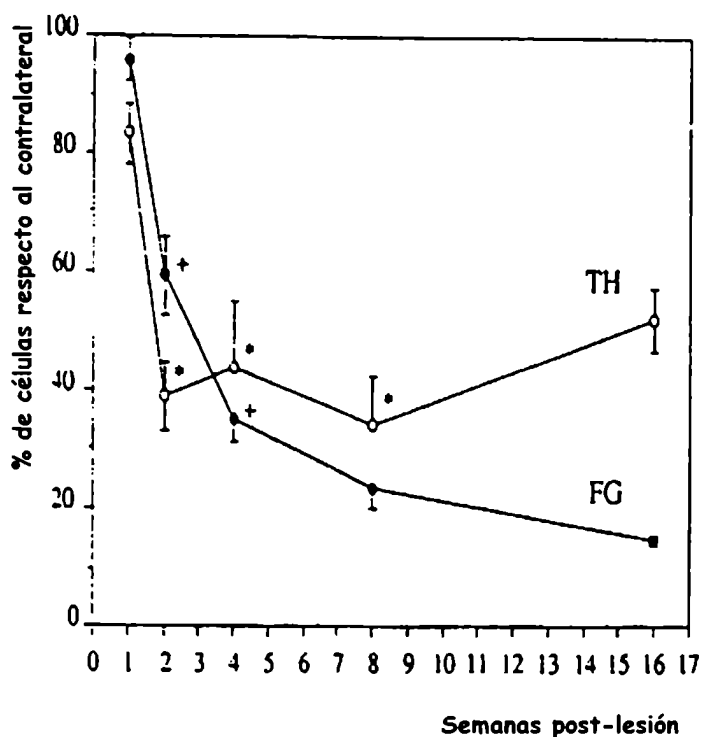
Para generar un modelo de la enfermedad de Parkinson, la 6OHDA es inyectada generalmente de manera unilateral en el haz medial del cerebro medio (MFB), el estriado o la SNpc. Esto resulta en su captación por las neuronas dopaminérgicas (y otras catecolaminérgicas vecinas) donde causa estrés oxidativo y degeneración (Blum et al., 2001). La extensión del daño neural depende de la dosis y del sitio de administración. Cuando se la inyecta en la SNpc, la neurotoxina causa una muerte celular aguda que comienza a las 12 horas y que continúa por más o menos una semana (Sotelo et al., 1973). La pérdida de la función nigro-estriatal correlaciona con el comportamiento rotacional inducido por anfetamina y apomorfina, lo cual permite evaluar comportamentalmente la neurodegeneración. Si bien este modelo no logra recapitular todas las características de la enfermedad de Parkinson esporádica, aún sus versiones agudas han predicho los resultados de las terapias sintomáticas y de reemplazo celular y son valiosos en los estudios de terapias regenerativas (Dawson et al., 2002).

El modelo de inyección de 6OHDA en el estriado de la rata utilizado en esta tesis, por otro lado, presenta características degenerativas progresivas (Sauer and Oertel, 1994). La 6OHDA es incorporada a los terminales dopaminérgicos estriatales por medio de los transportadores de DA de alta afinidad. Allí, su oxidación resulta en la formación de radicales hidroxilos, 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), 7 días antes de la lesión y en los dos hemisferios. Este

marcador permite seguir la degeneración de las neuronas 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 6OHDA causa una rápida degeneración de los terminales nigro-estriales a las 24 horas, provocando una forma de "axotomía química" que aísla a los cuerpos celulares de sus estructuras blanco. La degeneración continúa a partir de ese momento progresivamente, perdiéndose parte de la inmunoreactividad 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 4).

Figura 4. Números promedios relativos de las neuronas nigrales ipsilaterales marcadas con FG e inmunorreactivas para TH a diferentes tiempos luego de la lesión con 6-OHDA (tiempo 0). El número de células se expresa como porcentaje respecto al número de células contadas en el hemisferio contralateral, no lesionado. + $P \leq 0,05$, respecto al valor precedente; * $P \leq 0,05$, respecto al valor de una semana. Adaptado de Sauer and Oertel, 1994.



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 1).

Tabla 1. Caracterización a diferentes tiempos de las neuronas nigrales ipsilaterales y contralaterales a la lesión con 6OHDA intra-estriado. Adaptado de Sauer and Oertel, 1994.

	Número promedio 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 6OHDA (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 6OHDA (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 6OHDA (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 6OHDA (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 6OHDA (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.

Así, este modelo conlleva una muerte gradual y parcial de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, permitiendo el estudio de los procesos que tienen lugar durante la degeneración, y no las consecuencias de la misma.

2.4. La glia en la enfermedad de Parkinson.

Varios estudios sugieren que la microglia está relacionada con la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en la enfermedad de Parkinson (Orr et al., 2002; Vila et al., 2001). Como se mencionó antes, en cerebros normales los astrocitos y la microglia no se encuentran distribuidos homogéneamente, sino que, por ejemplo, la densidad de células microgliales es particularmente alta en la SN cuando se la compara con otras áreas del cerebro medio (Lawson et al., 1990). Esta observación, junto con el descubrimiento de que las neuronas de la SN son muy susceptibles al daño mediado por microglia activada (ver sección 2.2.3.2. y Kim et al., 2000), sugieren que la gliosis puede tener un rol significativo en la enfermedad de Parkinson.

Se ha demostrado la presencia de microglia activada en la SNpc de pacientes con la enfermedad de Parkinson (McGeer et al., 1988; Mirza et al., 2000), de humanos expuestos a MPTP (Langston et al., 1999), de ratones intoxicados con MPTP (Kohutnicka et al., 1998; Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999) y de ratas lesionadas con 6OHDA (Akiyama and McGeer, 1989; He et al., 2001). Varios autores han descripto que la exposición a las toxinas

MPTP o 6OHDA causan una respuesta inflamatoria alrededor de los axones y de las células en degeneración (Cicchetti et al., 2002).

En las fases tempranas de la lesión neuronal, la microglia expresa numerosas moléculas con funciones inmunes importantes y puede ser responsable de la remoción adaptativa de las neuronas lesionadas. Sin embargo, esta respuesta puede generar más daño en el tejido circundante y causar más neurodegeneración en regiones que de otra forma la hubiesen evitado.

Las muestras *post-mortem* de adictos a drogas que en los '80 se intoxicaron con MPTP sugieren un rol de las células gliales en la degeneración neuronal (Langston et al., 1999). Si bien el período de intoxicación duró sólo una semana, en reportes subsiguientes se pudo observar la progresión de las manifestaciones clínicas del síndrome parkinsoniano y de la denervación dopaminérgica, evaluada por análisis con tomografía de emisión de positrones. Es más, el examen *post-mortem* de los cerebros de estos adictos mostró evidencia de degeneración neuronal en progreso, con gran cantidad de microglia activa en la SN. Estos resultados apoyan el concepto de que un daño del sistema dopaminérgico limitado en el tiempo puede disparar un proceso neurodegenerativo que se auto-perpetúa y que involucra a las células gliales (Hirsch and Hunot, 2000).

La microglia activada puede ser neuroprotectiva, por ejemplo liberando neurotrofinas (Streit, 2002), o neurotóxica, liberando compuestos citotóxicos como intermediarios reactivos de oxígeno, óxido nítrico y proteasas (Gehrmann et al., 1995). Por ello, el rol de la microglia activada en la degeneración de las células dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson todavía es desconocida.

Entre los efectos potencialmente protectores, la glia es capaz de remover y metabolizar los compuestos tóxicos liberados por las neuronas que degeneran y también los neurotransmisores liberados al espacio extra-celular. Por otro lado, se ha descrito la expresión de neurotrofinas y de IL-1 α acompañando el desarrollo de ramificaciones en los terminales dopaminérgicos que quedan en el estriado luego de la lesión de la SNpc (Batchelor et al., 2000; Batchelor et al., 1999; Ho and Blum, 1998). De hecho, en animales nulos para el receptor tipo I de IL-1 no se observa ramificación de los terminales remanentes luego de la lesión con 6OHDA (Parish et al., 2002).

Se han detectado anticuerpos anti-neuronas dopaminérgicas en el líquido céfalo-raquídeo de pacientes con la enfermedad de Parkinson y la inyección de estos anticuerpos en la SNpc causa su degeneración (He et al., 2002). Sin embargo, no se observa

neurodegeneración si se utilizan animales nulos para el receptor microglial Fcγ, lo cual sugiere que el mecanismo de neurodegeneración por anticuerpos específicos es vía la activación de la microglia. De hecho, en los animales nulos no se observa microglia activada. Así, al menos en este modelo de neurodegeneración, la microglia juega un rol activo en la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

La inhibición farmacológica de la enzima neuronal capaz de sintetizar óxido nítrico (nNOS) atenúa la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por MPTP (Przedborski et al., 1996). También se ha demostrado el aumento de la NOS inducible (iNOS) en la microglia que rodea a las neuronas en degeneración en ratones intoxicados con MPTP (Liberatore et al., 1999). Es más, en dicho trabajo, utilizando ratones que carecen de la enzima iNOS, demostraron una supervivencia del doble de las neuronas con respecto a ratones silvestres (wild-type).

Por otro lado, los ratones intoxicados con MPTP muestran activación de la microglia en la SNpc en degeneración y en el estriado (Delgado and Ganea, 2003) y esa activación microglial está acompañada de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. En ese modelo, la inyección del péptido vasoactivo intestinal (VIP) que tienen un potente efecto anti-inflamatorio, impide la activación microglial y la expresión de citoquinas, lo cual correlaciona con una menor toxicidad del MPTP. Es más, ratones que expresan una enzima convertidora de IL-1β (ICE) mutante (dominante negativo), incapaz de procesar la pro-IL-1β (cuando son inyectados con LPS estos ratones muestran una producción 75% menor de IL-1β que ratones wild-type), son resistentes a la toxicidad por MPTP (Klevenyi et al., 1999).

La minociclina es una droga anti-microbiana, derivada de la tetraciclina, capaz de cruzar la barrera hemato-encefálica (BBB). Se ha demostrado que esta droga tiene efectos anti-inflamatorios independientes de la actividad anti-microbiana. Además, la minociclina protege a las neuronas piramidales de la región CA1 (Yrjänheikki et al., 1998) y a las de la corteza (Yrjänheikki et al., 1999) contra la neurodegeneración causada por isquemia, y contra excitotoxicidad en cultivos mixtos (Tikka et al., 2001; Tikka and Koistinaho, 2001). En todos estos modelos, la inhibición de la neurodegeneración correlaciona con la inhibición de la activación de la microglia. Es más, en un modelo murino similar al utilizado en esta tesis (dos inyecciones de 6OHDA en el estriado de ratón), la minociclina inhibe la activación de la microglia y esto es acompañado por una protección del 21% de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (He et al., 2001). Esto sugiere que en el modelo de lesión por 6OHDA la microglia, si bien no inicia la pérdida neuronal, es al menos responsable de una porción de la

neurodegeneración observada a tiempos largos. Sin embargo, el mecanismo por el cual la minociclina reduce la muerte neuronal no ha podido ser desentrañado, ya que esta droga tiene efectos muy diversos: reduce la actividad de la iNOS, reduce la expresión de caspasa-1, etc. Finalmente, la minociclina también inhibe la activación de la microglia y la neurodegeneración inducidas por la toxina MPTP en ratones (Wu et al., 2002). Otros parámetros que se ven afectados en este modelo y que pueden ser causa o consecuencia de la activación de la microglia son los niveles de IL-1 β e iNOS.

Las inmunofilinas son proteínas expresadas de manera ubicua que, en el cerebro, interfieren con la regulación de la función neuronal y que han sido identificadas como "receptores" de las drogas inmunosupresoras FK506, rapamicina y ciclosporina A. La inmunofilina para FK506 es FKBP y este complejo tiene efectos neuroprotectivos y neuroregenerativos. De hecho, utilizando un análogo que cruza la BBB (GPI 1046), se demostró una actividad neurotrófica *in vitro* y en diferentes modelos de la enfermedad de Parkinson. Otro análogo mostró ser efectivo en proteger contra la toxicidad por MPTP en ratones y en proteger y/o estimular la regeneración en ratas lesionadas con 4 inyecciones intra-estriatales de 6OHDA (Constantini et al., 2001).

2.5. La IL-1 en la enfermedad de Parkinson.

Como se describió en la sección anterior, la activación glial en la enfermedad de Parkinson tiene características que la puede hacer neuroprotectora en ciertos momentos pero causar neurodegeneración en otros. Lo mismo ocurre con las citoquinas en general y con la IL-1 en particular.

Como se mencionó antes (sección 1.2.1.1.2.), la IL-1 puede mostrar tanto efectos nocivos como protectivos sobre las neuronas frente a estímulos que causan degeneración aguda. Sin embargo mucho menos se sabe sobre sus efectos sobre la neurodegeneración crónica. Se ha descrito niveles aumentados de la IL-1 en muestras post-mortem de cerebros (Mogi et al., 1994) y en líquido cefalo-raquídeo (Nagatsu, 2002) de pacientes con la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, su rol en el desarrollo de la patología sigue siendo desconocido.

2.6. Neurogénesis en la substantia nigra y rol de la IL-1 β .

Por más de 100 años un dogma central dentro de las neurociencias ha sido que no surgen nuevas neuronas en el cerebro adulto de los mamíferos, aún a pesar de algunos trabajos que demostraban lo contrario (ver una revisión histórica del tema en Gross, 2000). Los trabajos de Fernando Nottebohm y sus colegas en los años 60, demostrando la existencia de neurogénesis en el cerebro adulto de las aves, algunas evidencias obtenidas utilizando timidina tritiada en mamíferos (Altman and Das, 1967) y la utilización de nuevos marcadores de la división celular (como la 5-bromo-3'-deoxiuridina, BrdU), lograron derrumbar el dogma, demostrando que en dos regiones específicas del cerebro de mamíferos existe neurogénesis durante toda la vida: la zona subventricular y el giro dentado. Así, desde los años 90 la investigación del fenómeno ha experimentado una verdadera explosión, mediante la utilización de distintas técnicas y distintos enfoques. Debido a la extensa bibliografía generada a partir de esta "moda" en la neurogénesis, esta parte de la introducción se limitará a revisar aquellos trabajos vinculados a esta tesis: diferenciación de las células stem (troncales) a neuronas dopaminérgicas, neurogénesis en el mesencéfalo y neurogénesis inducida por neurodegeneración.

Las células stem neurales son células pluripotentes, capaces de generar los tipos celulares que pueblan el SNC. Esta potencialidad ha sido vista como la gallina de los huevos de oro, ya que se podría obtener cualquier tipo celular que se necesite para una terapia de reemplazo, generando un tejido inmunocompetente con el paciente y evitando los rechazos típicos de las otras terapias de reemplazo. En este sentido, cada grupo que trabaja en distintos modelos de enfermedades neurológicas se ha abocado en diferenciar a estas células pluripotentes en el tipo celular deseado. En particular, los grupos que estudian la enfermedad de Parkinson se han esforzado en inducir la diferenciación a neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, la mayoría de los trabajos *in vitro* han sido realizados con células stem de origen embrionario, y el comportamiento de las células provenientes de adultos es en gran medida desconocido.

El trabajo con animales nulos ha demostrado la necesidad de diversas neurotrofinas como BDNF y GDNF (Erickson et al., 2001) y factores de transcripción como engrailed-1 y 2 (Simon et al., 2001), Nurr1 (Saucedo-Cardenas et al., 1998) y Lmx1b (Smidt et al., 2000) para la supervivencia y la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas. El trabajo en células stem embrionarias en cultivo ha identificado factores tróficos necesarios para la

diferenciación a ectodermo (NGF, EGF, bFGF, TGF- β 1; Schuldiner et al., 2000) y en cultivos de progenitores mesencefálicos embrionarios la IL-1, el factor inhibitorio de leucemia (LIF) y el GDNF aumentaron el número de células dopaminérgicas (Ling et al., 1998). Este último trabajo resulta particularmente interesante, ya que después de evaluar 19 citoquinas diferentes, sólo la IL-1 resultó efectiva como estimulador de la diferenciación dopaminérgica.

Una hipótesis evaluada por varios grupos es que el ambiente determina el destino de la diferenciación de las células pluripotentes, en ese sentido no es necesario conocer los estímulos para la diferenciación, sino que implantando las células en el medio ambiente adecuado las mismas se diferenciarán al tipo celular correspondiente. En ese sentido se ha demostrado que las células stem embrionarias se pueden incorporar a un cerebro adulto lesionado con 6OHDA y llevar a una recuperación funcional del sistema dopaminérgico (Björklund et al., 2002; Kim et al., 2002). Lo mismo se ha demostrado para células precursoras del mesencéfalo (Sawamoto et al., 2001).

Como se ve, la mayor parte de los trabajos realizados para identificar los factores necesarios para la diferenciación de células precursoras a neuronas dopaminérgicas han sido llevado a cabo en sistemas embrionarios. El estudio de las células stem adultas permanece en gran medida inexplorado.

Un enfoque alternativo, y tal vez más interesante, de evaluar la potencialidad de las stem adultas para terapias de reemplazo en la enfermedad de Parkinson, es evaluar la existencia de células stem en el mesencéfalo y estudiar las formas en que esas células puedan dirigirse a la región que degenera y diferenciarse al tipo neuronal adecuado. Al inicio de esta tesis sólo existían trabajos muy preliminares que ponían a prueba estas hipótesis. De hecho, sólo un trabajo muy poco citado demostraba la presencia de nuevas neuronas en el mesencéfalo luego de la administración i.c.v. de los factores tróficos EGF y bFGF (Alonso, 1999).

Finalmente, existe evidencia que lesiones del SNC son capaces de estimular neurogénesis en la región CA1 del hipocampo (Nakatomi et al., 2002), una zona donde normalmente no se observa el fenómeno. Esto sugiere que ciertos estímulos son capaces de estimular neurogénesis en regiones que fisiológicamente no proliferan.

2.7. Hacia una terapia de la enfermedad de Parkinson.

En los años 50, el premio Nobel Arvid Carlsson mostró en experimentos farmacológicos clásicos que la depleción de dopamina en el cerebro medio inducía acinesia en animales y propuso que los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson se debían a una disfunción dopaminérgica. Poco tiempo después se inició el tratamiento de los pacientes con el precursor de dopamina capaz de cruzar la BBB: la L-3,4-dihydroxyphenylalanina (L-DOPA). Sin bien este tratamiento farmacológico es eficaz en las etapas tempranas de la enfermedad, su uso prolongado conlleva la aparición de efectos colaterales que causan fluctuaciones en la efectividad de la droga (ver Obeso et al., 2000). Estos problemas han renovado el interés en nuevos tratamientos que puedan detener, revertir o reparar la progresión de la enfermedad.

De hecho, la naturaleza progresiva de la enfermedad de Parkinson y el hecho de que la degeneración neuronal de la SNpc es lenta, brinda la oportunidad de una intervención terapéutica que busque bloquear o disminuir la velocidad del proceso degenerativo (Dunnet and Björklund, 1999). Como se describió en las secciones anteriores, el proceso neurodegenerativo parece involucrar una cascada de eventos interrelacionados, que incluyen el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la excitotoxicidad acompañada por la formación excesiva de radicales libres de oxígeno y la inflamación. Se deriva de ello que cada uno de estos fenómenos se ofrece como un objetivo potencial de estrategias terapéuticas neuroprotectoras.

El uso de agentes antioxidantes (vitamina E y selegilina) no ha dado resultados satisfactorios en humanos (revisado en Dunnet and Björklund, 1999), a pesar de los resultados prometedores en los modelos animales. A propósito es importante tener en cuenta que en estos casos la causa de la muerte neuronal es conocida y sigue de hecho vías oxidativas, mientras que en humanos esto no está tan claro.

Los factores neurotróficos son candidatos naturales a la neuroprotección, ya que fueron descubiertos como moléculas que regulan la supervivencia y el crecimiento neuronal durante el desarrollo. Una gran variedad de neurotrofinas han sido identificadas en modelos animales de la enfermedad de Parkinson (BDNF, GDNF, NT-3, bFGF, TGF- β) y la mayoría ha sido evaluada en los modelos animales y aún en pacientes (para una revisión ver Alexi et al., 2000). De hecho, la familia de proteínas similares a GDNF ha mostrado efectos más que potentes en los modelos: rescata a las neuronas dañadas por axotomía cuando se las aplica

antes o poco después del daño, promueven la ramificación o regeneración en animales lesionados de manera crónica y estimulan la función dopaminérgica. Sin embargo, los ensayos clínicos con GDNF han resultado decepcionantes, debido principalmente a que el mismo ha sido administrado sistémicamente o a que no se ha podido controlar su expresión. De esta manera surge la necesidad de identificar nuevas moléculas para el tratamiento de la enfermedad, que sean efectivas en las etapas tardías de la misma, que es cuando los pacientes acceden a los ensayos clínicos y cuando hoy por hoy pueden ser tratados.

Si la inflamación surge como uno de los factores que aportan a la neurodegeneración, es posible imaginar terapias de inmunosupresión para la enfermedad de Parkinson. Por otro lado, podrían desarrollarse nuevas drogas que permitan la regulación de la gliosis, sin afectar al sistema inmune, de forma de minimizar los efectos no deseados.

Otra forma de pensar el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas son las terapias de reemplazo. Se han postulado diversas fuentes de las cuales obtener células dopaminérgicas que puedan ser transplantadas a pacientes con la enfermedad de Parkinson. Las células catecolaminérgicas de la glándula adrenal han mostrado mejorías sólo transitorias, probablemente debido a su baja supervivencia en el cerebro, mientras que otros órganos que sintetizan catecolaminas, como el órgano de Zuckerlandl, han mostrado mejorías más duraderas y mayor supervivencia (Fernandez Espejo et al., 2001). El trasplante de neuronas dopaminérgicas embrionarias y de células stem embrionarias, si bien han arrojado resultados promisorios en animales, han generado también discusiones éticas importantes acerca de su aplicabilidad en humanos que han llevado a la búsqueda de nuevas fuentes de estas células. Así se ha estudiado el uso de células porcinas, lo cual a su vez ha generado controversias en cuanto a la inmunosupresión necesaria para los xenotransplantes y al riesgo de transferencia interespecífica de agentes infecciosos, en particular retrovirus animales. Finalmente, la descripción de la neurogénesis en el cerebro humano adulto, ha despertado fuertes expectativas en la utilización de esas células tanto para trasplantes como mediante su manipulación para repoblar las áreas en degeneración (ver más arriba). Sin embargo, la biología de las células stem adultas es mayormente desconocida, por lo cual una terapia utilizándolas no ha de esperarse en un futuro cercano.

3. La IL-1 en el comportamiento y el aprendizaje.

3.1. El aprendizaje y la memoria.

El aprendizaje se define como el proceso de adquisición de nuevos hábitos y comportamientos mediante la experiencia. Por lo general, el cambio en el comportamiento implica un valor adaptativo que le otorga al animal ventajas en la supervivencia y la reproducción. Para que el aprendizaje tenga lugar es necesario que exista una memoria, esto es un almacenamiento y una evocación de las experiencias previas. A pesar de algunos intentos de establecer que la memoria no es guardada en un lugar físico determinado (como el trabajo de Karl Lashley; Lashley, 1950), existen numerosas evidencias de que la adquisición, almacenamiento y evocación de memorias es una de las funciones principales de ciertas estructuras del sistema nervioso central (SNC). Entre ellas, se ha demostrado de forma extensa que el hipocampo tiene un rol crucial en la consolidación de la memoria en varias especies y en diversas tareas.

Las memorias han sido divididas en explícitas e implícitas. Las memorias explícitas son por definición aquellas que almacenan eventos autobiográficos y de nuestro conocimiento fáctico, pudiendo ser evocadas por un acto deliberado de recolección. No hay acuerdo general acerca de si los animales son capaces de recolectar información en forma conciente, y por ello este tipo de memoria es mayormente evidenciado y estudiado en seres humanos. En cambio, las memorias implícitas tienen una calidad automática y de reflejos, y su formación y evocación no dependen de procesos concientes. En general este tipo de memoria se acumula lentamente, se expresa mediante una mejoría en el desempeño y no puede ser expresado en palabras, características que la hacen plausible de estudio en animales.

Existen dos paradigmas principales para el estudio del aprendizaje implícito: los simples y los asociativos. Los aprendizajes simples o no asociativos tienen lugar cuando un animal modifica su comportamiento a partir de la presentación repetida de un estímulo. Así, el individuo aprende sobre las propiedades de ese estímulo y deja de responder a él si es inocuo (proceso llamado habituación) o responde de manera más fuerte si es nocivo (proceso llamado sensibilización). Por otro lado, en los aprendizajes asociativos el animal conecta un estímulo neutral (o indiferente) con un segundo estímulo que es recompensante o nocivo. De esa forma, luego de adquirir la asociación el animal responde al estímulo neutral como si fuera el otro, o previendo la aparición del otro. Una forma de aprendizaje asociativo es el condicionamiento operante: el animal aprende que de entre todos los comportamientos

posibles (acicalarse, levantarse en dos patas, caminar, etc.) sólo uno, por ejemplo presionar una palanca, es seguido por una recompensa (por ejemplo una porción de comida), o por un estímulo aversivo (por ejemplo un shock eléctrico).

La habituación.

Entre los aprendizajes simples o no asociativos se encuentra la habituación, que es la disminución de una respuesta comportamental que tiene lugar durante la presentación repetida de un estímulo, y que no depende de la fatiga muscular. La habituación se evidencia tanto a nivel celular como de organismo, y es una de las formas más elementales de aprendizaje tanto en animales como en humanos.

Uno de los paradigmas de habituación más utilizado es aquella a un ambiente novedoso. En roedores, esto se analiza en general sobre el comportamiento exploratorio, que es alto cuando el ambiente es novedoso, pero disminuye cuando el ambiente es familiar (Thiel et al., 1998). Además, se sabe que la exploración en campo abierto y su habituación dependen del hipocampo, ya que la inyección intra-hipocampal de antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA y AMPA/kainato inhiben la habituación a largo plazo (Vianna et al., 2000).

La evitación inhibitoria.

Entre los condicionamientos operantes de tipo aversivo se encuentra el aprendizaje denominado evitación inhibitoria. Originalmente fue descrito como la capacidad de asociar un gusto con el sentimiento de malestar causado por una enfermedad (Garcia and Koelling, 1966). Aunque se asocia un estímulo no condicionado (por ej., el malestar) con uno condicionado (por ej., el gusto), esta forma de aprendizaje presenta diferencias respecto al condicionamiento clásico: un sólo ensayo es suficiente para adquirir la asociación y esta asociación tarda algunas horas en consolidarse.

Hay distintas variantes de evitación inhibitoria, por ejemplo: 1) en roedores: no pasar por una puerta hacia un compartimiento donde reciben un shock eléctrico o no bajar desde una plataforma hacia un piso electrificado; 2) en moscas: no entrar a un área con olor desagradable; 3) en pollos: no picotear una bolilla amarga; 4) en humanos: refrenarse en poner los dedos en el enchufe o en cruzar la calle sin mirar. Obviamente, esta habilidad representa uno de los mayores determinantes en el comportamiento de supervivencia en todas

las especies (Gold, 1986), y la brevedad de su adquisición no debiera llevar a la idea errónea de que es innata o implícita.

En particular, la evitación pasiva a bajar de la plataforma requiere aprender a no bajar de la misma de forma de evitar un shock eléctrico leve en las patas. El hecho de ser adquirido en un sólo ensayo lo hace ideal para estudiar procesos iniciados por el entrenamiento, sin contaminaciones de ensayos previos o subsiguientes, o de la evocación (Gold, 1986). El evitar bajar involucra la represión específica de la tendencia natural de las ratas a explorar más allá de la plataforma, sin afectar el comportamiento exploratorio sobre la misma. De hecho se observa la aproximación repetida al borde de la plataforma y que el animal apoya las patas delanteras en el piso y las vuelve a subir a la plataforma. Es en este sentido que el comportamiento es mejor descrito por el término "inhibitorio" que "pasivo" (Izquierdo and Medina, 1997).

La formación de una memoria de evitación inhibitoria requiere de una serie de eventos que tienen lugar en el hipocampo de la rata. Primero se activan tres tipos de receptores de glutamato (NMDA, AMPA y metabotrópicos) (Izquierdo and Medina, 1997), seguido de cambios en cascadas de segundos mensajeros que llevan al aumento de la actividad de las quinasas de proteínas A (PKA), C (PKC) y G (PKG), y de la quinasa II dependiente de calcio-calmodulina (CaMKII). Finalmente ocurren cambios en las subunidades y en las afinidades de los receptores de glutamato y aumenta la expresión de factores de transcripción constitutivos e inducibles (revisado en Izquierdo and Medina, 1997).

Los eventos bioquímicos son regulados de manera temprana por mecanismos hormonales y neurohumorales relacionados con el estado de alerta, la ansiedad y el estrés, y entre 3 y 6 horas después del entrenamiento por vías relacionadas al estado de ánimo y al afectivo. Así, los eventos tempranos (menos de 30 minutos después del entrenamiento) están sujetos a la inhibición mediante los receptores GABA_A, modulados por sustancias endógenas del tipo benzodiazepinas y que son, además, moduladas por sinapsis colinérgicas muscarínicas y β -noradrenérgicas (revisado en Izquierdo and Medina, 1997). Es más, una variedad de sistemas moduladores centrales y periféricos influyen sobre la memoria en el período temprano post-entrenamiento: β -endorfina, receptores colinérgicos nicotínicos, serotonina, adrenocorticotrofina, vasopresina, oxitocina, glucocorticoides, epinefrina, norepinefrina y glucosa (ver McGaugh, 2000). La mayoría de estas sustancias son en realidad liberadas durante diversas formas de entrenamiento, lo cual significa que muchas o la mayoría de las memorias son formadas y a veces evocadas bajo su influencia. Además muchas de estas

sustancias actúan a través de interacciones con los mecanismos noradrenérgicos en la amígdala y por ello su influencia sobre el hipocampo es indirecta.

Por otro lado, los eventos más tardíos (3-6 horas después del entrenamiento) son modulados por receptores hipocampales de dopamina D_1 , β -noradrenérgicos y de serotonina tipo 1A. Las vías dopaminérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas que inervan el hipocampo están involucradas en la regulación del ánimo y del afecto. Así, las alteraciones en la memoria que se observan en desórdenes de estos sistemas (por ejemplo, en esquizofrenia, depresión, la enfermedad de Parkinson) pueden estar relacionadas con alteraciones en la regulación de la fase tardía de formación de la memoria. Es más, estas vías transmiten componentes de alerta, emocionales y afectivos que pueden alterar el aprendizaje.

3.2. Efectos de la IL-1 sobre el comportamiento.

Tanto la IL-1 periférica como la central han mostrado tener diversos efectos sobre el comportamiento. Hay una serie de señales comportamentales, observadas luego de una infección (que induce IL-1) o luego de la inyección de IL-1, que son asociadas a enfermedades (denominadas en conjunto "sickness behavior"). Otros efectos de la IL-1 sobre el comportamiento animal incluyen: la regulación de comportamientos de ansiedad/depresión, de la sensación de dolor y del sueño. Debido a que el aprendizaje en los animales es analizado a través del comportamiento, cualquier análisis del rol de la IL-1 en el primero debe tener en cuenta estos efectos generales, ya que pueden inducir a conclusiones erróneas.

3.2.1. *Sickness behavior.*

Los animales y los humanos que sufren de infecciones bacterianas muchas veces exhiben una serie de cambios comportamentales a los cuales se los engloba en el término "sickness behavior" o comportamiento de enfermedad (ver una revisión del tema en Dantzer, 2001). Estas señales comportamentales incluyen: anorexia, somnolencia, disminución de la actividad locomotora, disminución de la exploración de estímulos sociales y novedosos, disminución de la actividad sexual, debilidad, malestar e incapacidad para la concentración. De esta manera, el individuo se encuentra deprimido y letárgico, muestra poco interés en lo que lo rodea y deja de comer y beber. Este comportamiento es interpretado como una estrategia altamente organizada del organismo para combatir una infección. Es más se ha propuesto que esta serie de respuestas organizadas tienen como propósito "apoyar a la fiebre",

a través de la conservación de la energía metabólica, de forma de combatir más efectivamente al patógeno. De hecho, la IL-1 es un pirógeno que actúa en sitios precisos del SNC para regular la fiebre (Cartmell et al., 1999).

En años recientes se ha acumulado evidencia que demuestra que la sincronía entre los componentes metabólicos, fisiológicos y comportamentales necesaria para la respuesta sistémica a la infección depende de las mismas señales moleculares responsables de la respuesta inflamatoria local: las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6, TNF α e IFN γ , que son liberadas por los monocitos y macrófagos activados durante la infección. En este sentido, la infusión sistémica o central de citoquinas recombinantes inducen un plétora de síntomas inespecíficos de la enfermedad, tanto en animales de experimento como en seres humanos. Además los mismos efectos son obtenidos luego de la administración de moléculas que inducen la síntesis de citoquinas endógenas (por ejemplo, el LPS, el fragmento activo de endotoxina obtenido de bacterias gram negativas) (Konsman et al., 2002).

Por estas razones, utilizar un sistema de administración exógena (y en cantidades nanomolares) de citoquinas, no aparece como un modo preciso de evaluar el rol de estas moléculas en el aprendizaje y la memoria, ya que los resultados obtenidos pueden estar opacados o desviados de la situación normal debido a los efectos inespecíficos en el comportamiento.

3.2.2. Stress y Ansiedad / Depresión.

La administración central o sistémica de IL-1 β aumenta la liberación de neuropéptidos y neurotransmisores hipotalámicos, de manera similar a los efectos de los factores estresantes psicológicos o físicos (ver Anisman and Merali, 2002). Por otro lado, factores estresantes causan variaciones hormonales y alteraciones neuroquímicas centrales que favorecen el desarrollo o la exacerbación de desórdenes afectivos, como la enfermedad conocida como depresión. De hecho, la mayoría de los efectos de los factores estresantes son similares a las alteraciones neuroquímicas que se creen asociadas a la depresión, y en animales los factores estresantes inducen cambios comportamentales similares a los que caracterizan a la patología, los cuales son mitigados por el tratamiento con agentes anti-depresivos (Castanon et al., 2002). Finalmente, se ha comprobado que los agentes anti-depresivos reducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias estimulada por LPS y atenúan varios síntomas del "sickness behavior" (Castanon et al., 2002).

Dada la similitud en los efectos neuroquímicos que tienen los factores estresantes y las citoquinas pro-inflamatorias, y el hecho de que el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) parece estar involucrado en la depresión, varios trabajos han evaluado la posibilidad de que las citoquinas favorezcan el desarrollo de desórdenes afectivos (Anisman and Merali, 2002). De hecho, la inmunoterapia con IFN γ y/o IL-2 para el tratamiento de ciertos cánceres o de la hepatitis C crónica está acompañada por la emergencia de síntomas de depresión en gran parte de los pacientes (Capuron et al., 2002). De manera similar, la administración sistémica de IL-2 causa anhedonia (disminución en la ganancia de placer a través de estímulos normalmente recompensantes), un síntoma de la depresión (Anisman et al., 2002).

Correlacionando de manera recíproca, la depresión en humanos está asociada a alteraciones en varios aspectos de la respuesta inmune, incluyendo altos niveles de citoquinas circulantes y de sus receptores solubles (entre las cuales se encuentran IL-1 β e IL-1ra). Es más, se ha observado que los efectos son más pronunciados en pacientes severamente deprimidos (aquellos que exhiben melancolía) y que los niveles de IL-1 β e IL-6 se normalizan con medicación anti-depresiva (Anisman and Merali, 2002).

Finalmente, los animales inyectados con IL-1 β i.c.v. entran menos y pasan menos tiempo en los brazos abiertos de un laberinto elevado en cruz ("elevated plus maze"), exhibiendo un comportamiento similar a la ansiedad, al mismo tiempo que aumenta significativamente la concentración de la hormona de estrés corticosterona (Song et al., 2003). Por otro lado, la inyección i.p. de 10 o 100 ng/kg de IL-1 α causa un aumento en las ambulaciones en animales habituados a un campo abierto, efecto similar al producido por el estrés. Este efecto correlaciona con un aumento en los niveles hipocampales de serotonina y con una disminución de los de norepinefrina, sugiriendo un mecanismo de acción de la IL-1 α sobre este comportamiento (Broderick, 2002). Así, los resultados sugieren que tanto la IL-1 β central como la periférica inducen un comportamiento de estrés y de ansiedad.

3.2.3. Dolor.

La IL-1 también está implicada en la modulación de la sensibilidad al dolor. La administración exógena de IL-1 sensibiliza los receptores de dolor, causando hiperalgesia (Sachs et al., 2002). De hecho, la IL-1 y otras citoquinas son responsables del dolor observado en situaciones de inflamación.

De manera notable, la inyección de IL-1 β en el cerebro también es capaz de modular la nocicepción. Sin embargo, los efectos sobre el dolor son bifásicos ya que la IL-1 causa hiperalgesia o analgesia dependiendo de los niveles utilizados: niveles bajos a moderados causan hiperalgesia, mientras que niveles altos producen analgesia (Yabuuchi et al., 1996). Así, la IL-1 exógena es capaz de modular los umbrales de nocicepción térmica, tanto aumentándolos (a través de la modulación de CRH y de adrenoreceptores) como disminuyéndolos (a través de prostaglandinas y α -MSH) (revisado en Bianchi et al., 1998). Por otro lado, se ha demostrado que la IL-1 central media la analgesia a corto plazo inducida por un choque en la planta de las patas (Zou et al., 2001). Es más, el bloqueo de la señalización de IL-1 utilizando ratones que no expresan el receptor tipo I o la proteína accesoria del receptor, o que sobre-expresan el IL-1ra en el cerebro presentan analgesia en distintos ensayos de dolor (Wolf et al., 2003). También el tratamiento sistémico prenatal o en animales adultos con el IL-1ra causa analgesia.

3.2.4. Sueño.

Existe abundante evidencia de que existe una relación bi-direccional entre el dormir y el sistema inmune. Así, tanto dormir como la falta de sueño modulan la expresión de citoquinas (Irwin, 2002). Por otro lado, varias citoquinas influyen sobre el sueño y sobre la profundidad del sueño. Por ejemplo, la inoculación de IL-1 β en el núcleo rafe dorsal aumenta el sueño sin movimiento rápido de los ojos (NREM) a través de la inhibición de las neuronas serotoninérgicas de ese núcleo (Manfridi et al., 2003). Otra vez, este fenómeno es independiente del efecto de la IL-1 sobre la fiebre. Por todo esto, cualquier estudio de las citoquinas debe ser realizado en ciclos controlados de luz-oscuridad, para evitar variaciones que se deban a alteraciones en los ritmos circadianos de los animales.

3.3. Efectos de la IL-1 sobre el aprendizaje y la memoria.

Existe una serie de evidencias que sugieren fuertemente un rol de las citoquinas en el aprendizaje y la memoria. Por un lado, la experiencia clínica muestra que algunas formas de cognición son menos eficientes durante la enfermedad, tanto en infecciones periféricas como en enfermedades que afectan al SNC (Dantzer, 2001). Por otro lado, la alteración artificial de los niveles de la IL-1 (y otras citoquinas) en animales también causa alteraciones en la

adquisición de tareas comportamentales. Finalmente, formas celulares de memoria (como la potenciación a largo plazo, LTP) también son afectadas por las citoquinas.

Se ha demostrado que distintos tipos de tareas que requieren una memoria de corto o largo plazo dependen del funcionamiento normal del hipocampo. Así, para que la IL-1 pueda regular estos procesos, debiera poder actuar sobre las células responsables del mismo. De hecho, se ha mostrado la presencia de receptores para IL-1 en el giro dentado (Ban et al., 1991), apoyando la idea de una función de la IL-1 en el aprendizaje.

3.3.1. IL-1 periférica.

Existen varios mecanismos por los cuales las citoquinas sanguíneas pueden llevar información al SNC (ver sección 1.2.1.1.1.). Asimismo, una serie de condiciones que aumentan los niveles circulantes de citoquinas pro-inflamatorias (enfermedades autoinmunes, períodos post-quirúrgicos, infecciones, quimioterapia, depresión) están asociados con perturbaciones en la cognición y la memoria (Swedo et al., 1998). Además, la administración periférica de citoquinas o endotoxinas a humanos producen impedimentos cognitivos y de memoria pronunciados (Poutiainen et al., 1994; Reichenberg et al., 2001).

En animales también hay evidencias de esta regulación. El aprendizaje de navegación espacial en el laberinto de agua de Morris es impedido por infecciones periféricas agudas con la bacteria gram negativa *Legionella pneumophila* (Gibertini et al., 1995). Estos efectos de una infección sobre la memoria se deben a la acción de la IL-1 β , ya que la inoculación de anticuerpos que bloquean la unión de la citoquina IL-1 β a su receptor revierten los efectos sobre el aprendizaje. Como los anticuerpos no afectan la fiebre inducida por la bacteria, ni hay diferencias en la motivación ni en la capacidad de nado, los resultados sugieren que los efectos de la infección sobre la termorregulación y sobre la cognición no están vinculados. Por otro lado, la inyección de IL-1 α humana endovenosa (i.v.) bloquea la consolidación de una memoria adquirida en un laberinto en T, en el cual los animales deben evitar el brazo donde reciben un shock (Banks et al., 2001). Esto muestra que distintos tipos de aprendizaje pueden ser modulados por la IL-1 periférica.

Por otro lado, para poder independizarse de los efectos sobre la actividad locomotora que puede tener la IL-1, Aubert et al. (1995) utilizaron un paradigma de aprendizaje que no requiere de una locomoción importante: esa tarea es conocida como "autoshaping". En ese paradigma, los autores demostraron que tanto inductores de IL-1 (LPS y levadura) como la

IL-1 β inyectados i.p. impiden la adquisición de una tarea de características pavlovianas. El hecho de que el LPS tenga efectos sobre la tarea mucho más prolongados que los efectos sobre la fiebre o el malestar, sugiere otra vez un efecto directo sobre la cognición (Aubert et al., 1995).

Sin embargo, la IL-1 β i.p. puede funcionar como estímulo no condicionado, al menos en un modelo de aversión a un lugar que utiliza un compartimiento con olor como el estímulo condicionado (Mormede et al., 2003). Este condicionamiento no es acompañado por ninguna alteración en los niveles de citoquinas periféricas (bazo) ni cerebrales (hipotálamo). Esto hace notar que los trabajos que utilicen la IL-1 periférica como modulador de la formación de memoria deben controlar que la inyección no actúe por sí misma como estímulo no condicionado.

3.3.2. IL-1 central.

En los últimos tiempos ha habido un creciente interés en la influencias que las citoquinas pro-inflamatorias centrales pueden tener en la memoria y el aprendizaje. Parte de este interés deriva del hecho de que la IL-1 cerebral se encuentra aumentada en patologías de origen diferente pero con alteraciones cognitivas importantes como el síndrome de Down, la enfermedad de Alzheimer (Griffin et al., 1989) y la demencia compleja asociada al SIDA (Zink et al., 2002). Además, estudios genéticos de familias con retardo mental asociado al cromosoma X mostraron mutaciones en un gen que codifica para una proteína con alta homología (52% en identidad y similitud) con la proteína accesoria del receptor de la IL-1 (Carrie et al., 1999). El homólogo en ratón de esta proteína se encuentra altamente expresado en el hipocampo en desarrollo y post-natal, sugiriendo un rol de esta proteína en el desarrollo y/o la función de esta estructura. Finalmente, una serie de trabajos ha sugerido que la desregulación de procesos inmunes cerebrales estaría implicada en la patogénesis de numerosas enfermedades neuropsicológicas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia, la esclerosis múltiple, las enfermedades esponjiformes humanas y otras demencias (revisado en Gahtan and Overnier, 1999).

Por otro lado, algunos trabajos han evaluado los efectos de la IL-1 sobre el aprendizaje y la memoria en animales. Sin embargo, los trabajos no siempre son concluyentes ya que muchas veces además de los efectos sobre el aprendizaje se observan efectos inespecíficos que relativizan los resultados obtenidos.

Uno de los trabajos pioneros en el análisis de los efectos de la IL-1 central sobre el aprendizaje y la memoria demostró que la IL-1 i.c.v. no afecta la adquisición de una memoria espacial, pero sí altera la performance 24 hs después, mientras que la IL-6 no causa ningún efecto (Oitzl et al., 1993). Como ambas citoquinas aumentaron significativamente la temperatura corporal (aunque con una dinámica distinta), los efectos de la IL-1 sobre la cognición no deben ser consecuencia de las propiedades pirogénicas de esta citoquina. Estos resultados sugieren fuertemente que el aumento de temperatura que indica una enfermedad no está necesariamente acompañada por un bloqueo del aprendizaje, y que entonces la IL-1 puede tener un efecto directo sobre la cognición independiente del que tiene sobre la regulación de la temperatura (de manera similar a los resultados obtenidos con la IL-1 periférica). Por otro lado, la IL-1 afecta la performance a las 24 hs sólo si es inyectada 60 minutos antes de la primera sesión de entrenamiento, pero no si se inyecta en el mismo momento, sugiriendo un efecto de la IL-1 sobre la consolidación y/o la evocación, y no sobre la adquisición. En la misma línea, otro trabajo demostró que la inyección de IL-1 β evita la consolidación y/o evocación, sin afectar la adquisición, utilizando un paradigma que permite evaluar memoria de trabajo, el laberinto de 8 brazos (Song, 2002). Sin embargo, la inyección i.c.v. de IL-1 β altera los niveles de corticosterona circulante y de neurotransmisores en distintas regiones del SNC (Song, 2002), por lo que el efecto de la IL-1 puede no ser directo sino mediado por cualquiera de estos mecanismos.

Por otro lado, la inyección crónica (4 semanas) de LPS i.c.v. impide la adquisición de una tarea de alternancia espontánea en un laberinto en T (memoria espacial), sin causar anorexia (Hauss-Wegrzyniak et al., 1998). El tratamiento crónico con LPS también está asociado a una muy importante activación de la microglia y un aumento de tres veces en los niveles de ARNm para IL-1 β . El tratamiento también causa la pérdida de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo y alteraciones generales en las neuronas hipocampales (Hauss-Wegrzyniak et al., 2000; Hauss-Wegrzyniak et al., 2000), por lo que los efectos observados sobre el aprendizaje pueden deberse en realidad a la pérdida de estas neuronas.

Una serie de trabajos realizados en el Departamento de Psicología de la Universidad de Colorado, han analizado los efectos de la IL-1 β i.c.v. o de tratamientos que aumentan IL-1 β en el hipocampo en un paradigma de condicionamiento de miedo (revisado en Pugh et al., 2001). Este grupo demostró que la inoculación i.c.v. de 10 o 20 ng de IL-1 β impide el

condicionamiento de miedo al contexto, pero no afecta el condicionamiento cuando el estímulo no condicionado es un sonido (Pugh et al., 1999). Lo mismo fue demostrado con estímulos que inducen la expresión central de citoquinas (el stress causado por el aislamiento social (Pugh et al., 1999) y la inyección de LPS en la periferia (Pugh et al., 1998)) y luego de la inyección i.c.v. de la proteína de la cápside del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), gp120, que induce la expresión de citoquinas (Pugh et al., 2000). Todos estos efectos fueron bloqueados por la inyección i.c.v. del antagonista IL-1ra, demostrando que se deben efectivamente a la acción central de la proteína IL-1 β . Sin embargo, la estructura del cerebro que es realmente responsable de estos efectos no ha sido dilucidada, ya que la inyección i.c.v. de la IL-1 β permite la acción de esta citoquina sobre estructuras diversas como el hipocampo, la amígdala y el hipotálamo, pero también en el plexo coroideo, las células endoteliales, la vasculatura cerebral y la meninges (Konsman et al., 2000).

Un único trabajo evaluó el efecto de la inyección de la IL-1 en una estructura del cerebro en particular. Así, la inyección de cantidades importantes de IL-1 β (100ng) en el hipocampo impide la formación de memoria de trabajo (Matsumoto et al., 2001), probablemente porque altera la liberación de glutamato y de acetilcolina. Sin embargo, como se verá en el Capítulo I de esta tesis, hemos observado una importante neurodegeneración en el giro dentado de ratas inyectada con 10ng de IL-1 β , por lo que la falta de análisis histológico de estos animales no permite desestimar que los efectos se deban a la pérdida de neuronas en la región y/o a una importante respuesta glial.

3.3.3. Potenciación a largo plazo (LTP).

Para que un animal aprenda diversos mecanismos moleculares y celulares deben tener lugar, de forma que lo aprendido pueda ser guardado y evocado cuando se lo necesita. Una de las formas celulares de guardar información es la plasticidad sináptica, o sea los cambios en la eficacia de una sinapsis que son causados por el aprendizaje. Uno de estos cambios, el cual se ha propuesto como una base celular para el aprendizaje, es la potenciación a largo plazo (LTP), observada principalmente en el hipocampo (ver una revisión del tema en Bliss and Collingridge, 1993). En 1973, Bliss y Lømo demostraron que luego de una estimulación tetánica cualquier estímulo pre-sináptico evoca una respuesta post-sináptica mayor que la lograda antes del tétano (Bliss and Lomo, 1973) y que esta potenciación dura varias horas.

Este fenómeno ha sido estudiado tanto *in vitro* en rodajas de hipocampo como *in vivo*, en animales anestesiados o despiertos. Una gran variedad de proteínas señalizadoras intercelulares modulan la LTP hipocampal. Entre ellos se han identificado varias citoquinas y neurotrofinas. En particular, la IL-1 tiene un rol tanto en la formación como en el mantenimiento de la LTP.

Uno de los datos más sorprendentes obtenidos a raíz del estudio del rol de las citoquinas en el fenómeno de la LTP, es que tanto el cortar al hipocampo en rodajas (Jankowsky et al., 2000; Schneider et al., 1998), como el insertar electrodos en el hipocampo (Jankowsky et al., 2000), induce la expresión de citoquinas (en particular IL-1 β). Este resultado es muy importante porque revela que la gran mayoría de las conclusiones obtenidas hasta la fecha sobre la LTP son obtenidas bajo la influencia de citoquinas.

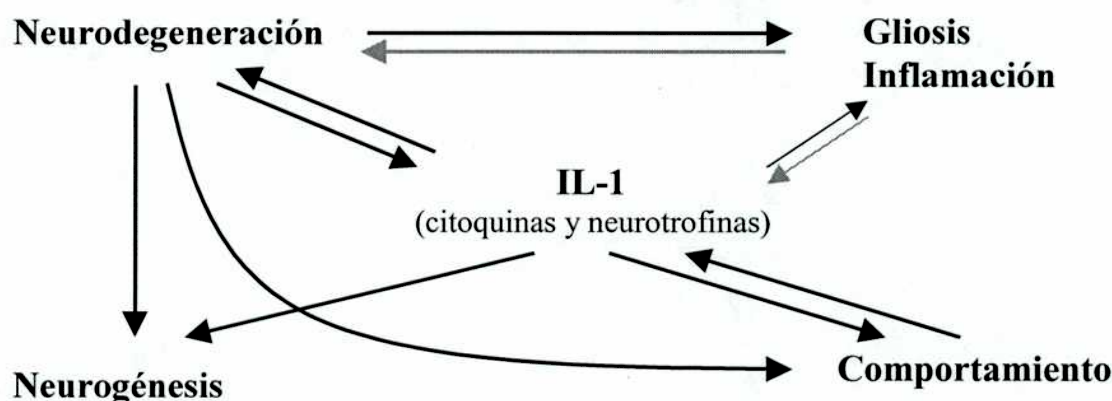
Sobre los efectos de la IL-1 sobre la LTP, existen evidencias tanto *in vitro* como *in vivo*. Así se ha encontrado que la administración de IL-1 β inhibe la formación de la LTP tanto en el giro dentado (Cunningham et al., 1996; Vereker et al., 2000), como en las regiones CA1 (Bellinger et al., 1993) y CA3 (Katsuki et al., 1990) del hipocampo. Si bien el mecanismo a través del cual la IL-1 afecta la LTP es desconocido, se ha demostrado que involucra un aumento en las especies reactivas de oxígeno y de la actividad de las quinasas JNK y p38 (Vereker et al., 2001; Vereker et al., 2000), que el efecto es contrarrestado con un antagonista de la quinasa p38 (Coogan et al., 1999) y que la IL-1 aumenta la entrada de Ca²⁺ (Cunningham et al., 1996).

Por otro lado, la IL-1 β es inducida por la LTP y la perfusión con el antagonista IL-1ra no afecta la formación de la LTP pero impide su mantenimiento (Schneider et al., 1998). De esta forma, se puede ver que el efecto de la IL-1 sobre la LTP no sólo depende de las concentraciones analizadas (algo que se evidencia cuando se aplica IL-1 en comparación con la inhibición de la IL-1 endógena) sino también de la fase temporal del fenómeno que se está estudiando.

Objetivos generales

El objetivo general de esta tesis es estudiar el rol de la interleuquina-1 (IL-1) en modelos fisiológicos y patológicos del sistema nervioso central (SNC). Decidimos enfocarnos en una molécula en particular (la IL-1) y estudiarla en distintos modelos, de forma de obtener una visión amplia y lo más completa posible de las formas de actuar y de los efectos que esta molécula tiene en el SNC. Así el objetivo último de esta tesis es obtener evidencia empírica acerca del rol que juega la IL-1 en el cerebro.

El esquema presentado abajo representa las distintas conexiones que buscamos a lo largo de esta tesis (flechas) entre los fenómenos en los cuales nos concentramos. Así, primero nos preguntamos (capítulo I) qué efectos tiene la inoculación de la IL-1 β en distintas regiones del cerebro. En el capítulo II estudiaremos el rol de la IL-1 en la neurodegeneración, en particular en un modelo en rata de la enfermedad de Parkinson. En el capítulo III investigaremos la neurogénesis en el mesencéfalo y los efectos de la IL-1 sobre la misma. Y, finalmente, en el capítulo IV evaluaremos si la IL-1 está involucrada en el aprendizaje. Sin embargo, no debe pensarse cada capítulo como independiente del resto, sino que están en estrecha interrelación, ya que la presencia de IL-1 deberá tener los mismos efectos independientemente de qué se esté mirando en el experimento en particular. De hecho los proyectos fueron avanzando paralelamente y los resultados de unos fueron guiando el camino de los otros.



Materiales y métodos

1. Animales.

En toda la tesis fueron utilizados ratas macho Wistar (160-250g) de nuestra cría. Se mantuvieron en grupos de 2 o 4 animales en jaulas plásticas o metálicas, en un ambiente con temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y con luz artificial en ciclos de 12 horas. Los animales son aclimatados a la colonia durante una semana antes de cualquier procedimiento. Los animales disponen de libre acceso a comida y agua.

2. Técnicas quirúrgicas.

Para las inyecciones centrales los animales son anestesiados con clorhidrato de ketamina (80 mg/kg) y xilazina (8 mg/kg) y ubicados en una aparato para estereotaxis. Luego de ubicar el bregma, se utilizan las coordenadas determinadas en el atlas de cerebro de rata (Paxinos and Watson, 1986) para la inyección en la región deseada (ver tabla 2).

Tabla 2. Coordenadas estereotáxicas utilizadas en la tesis, según región Paxinos and Watson, 1986.

Región	Antero-posterior (mm)	Lateral (mm)	Ventral (mm)
Estriado	0,7	3,0	-5,0
Substantia nigra	-5,3	2,0	-7,2
Corteza	0,7	2,7	-2,0
Giro dentado	-3,8	1,5	-3,5
Región CA1	-4,2	3	-2,4
Ventrículo lateral	-0,09	0,14	-0,36
Acueducto	-0,45	0	-0,5

Para las inyecciones se utilizaron jeringas Hamilton con agujas de 26G (punta redonda o con bisel, según indicado) o capilares ultrafinos. Los capilares ultrafinos son fabricados utilizando capilares graduados (Drummond Scientific Company, Pennsylvania, USA) cuyo extremo es afinado en un "puller" de capilares (Modelo PC-10, Narishige). La punta que se introduce en el tejido nervioso tiene así un diámetro aproximado de 50 μm y causa una lesión mecánica mínima. El flujo de administración de las soluciones también es muy controlado de modo de minimizar los daños causado por la infusión *per se* (ver especificaciones en cada capítulo).

2.1. Inyección de la proteína recombinante humana IL-1 β .

Se inyectaron 12 ratas macho Wistar con 10ng de IL-1 β humana recombinante (hrIL-1 β , BD Biosciences, San Diego, CA, USA; disuelta en 2 μ l de una solución salina conteniendo 0,1mg/ml de albúmina sérica bovina) en cada región a analizar (ver Capítulo I y tabla 2) y otras 12 con vehículo. La mitad de los animales fueron sacrificado 24 horas después de la cirugía y la otra mitad a los 6 días. Finalmente, 3 animales por tiempo y tratamiento fueron analizado mediante inmunohistoquímica y los otros 3 mediante RT-PCR competitiva semicuantitativa. Además, se utilizaron 3 animales naïve pertenecientes a la misma camada para normalizar los valores de cuantificación por RT-PCR.

Las inyecciones fueron realizadas utilizando una jeringa Hamilton con aguja 26G de punta roma y con un flujo de 0,5 μ l/min, dejando la aguja en su lugar 2 minutos adicionales antes de su remoción. Para verificar que los resultados obtenidos (a menos a nivel celular), no se debían al trauma causado por la aguja Hamilton, 1 rata por tiempo fue inyectada con capilares ultrafinos.

Finalmente, inyectamos la misma cantidad de hrIL-1 β pero desnaturalizada por calor (10 minutos a 65°C) en el hipocampo, para controlar que los efectos obtenidos no se debieran a la inyección de nanogramos de proteína (sin importar su actividad).

2.2. Lesión con 6-hidroxidopamina (6OHDA).

La 6OHDA es una molécula muy reactiva por lo cual se diluye en solución salina conteniendo 2 μ g/ μ l de ácido ascórbico (vehículo), para reducir su oxidación, inmediatamente antes de utilizarla. Además es mantenida en hielo y en oscuridad durante el procedimiento quirúrgico.

Se inyectaron 20 μ g de 6OHDA (ICN Biochemicals, Irvine, CA, USA) disueltos en 4 μ l de vehículo en el estriado izquierdo (tabla 2), utilizando una jeringa Hamilton con aguja 26G de punta con bisel. La infusión se realiza a un flujo de 0,5 μ l/min y se deja la aguja 2 minutos adicionales antes de removerla, de modo de evitar el reflujo. Como control se inyectaron 4 μ l de vehículo en las mismas coordenadas y siguiendo el mismo procedimiento.

2.3. Inyección de lipopolisacárido (LPS) en la SNpc.

Como estímulo inflamatorio bien caracterizado, se inyectaron 2 μ g de LPS (cepa 0111:B4, Sigma-Aldrich, MA, USA) diluidos en 2 μ l de PBS en la *substantia nigra* (tabla 2).

La inyección fue realizada utilizando una jeringa Hamilton con aguja de 26G de punta redonda, y un flujo de 0,5µl/min, dejando la aguja en lugar durante 2 minutos adicionales. Como control se inyectó el mismo volumen de PBS, siguiendo el mismo procedimiento.

2.4. Inyección de factores tróficos en el acueducto.

18 ratas Wistar macho (204 ± 7 g al inicio del experimento) fueron divididos en 6 grupos de 3 animales cada uno. Cada grupo recibió una inyección de un factor trófico o una combinación de factores: 1) 200 ng de factor de crecimiento de fibroblastos básico, humano recombinante (hrbFGF, PeproTech, Veracruz, México); 2) 200 ng de factor de crecimiento de epidermis de ratón (mEGF, Sigma); 3) 200 ng de IL-1 β recombinante de rata (rrIL-1 β , NIBSC); 4) 100 ng de hrbFGF + 100 ng mEGF; 5) 100 ng hrbFGF + 100 ng mEGF + 100 ng rrIL-1 β ; y 6) PBS. Todos los factores fueron diluidos en PBS estéril. Se inyectaron 10µl en el acueducto (ver Tabla 2) utilizando una jeringa Hamilton con punta redonda de 26G y un flujo de 0,5µl/min.

3. Marcación con bromodeoxiuridina (BrdU)

Para la marcación de células en activa proliferación, se administró 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, Sigma) intra-peritonealmente. La dosis inyectada fue de 50 mg /kg de peso del animal (disuelta en 0,1N NaOH, 0,9% NaCl a una concentración de 25mg/ml).

3.1. Análisis de la proliferación celular en cerebros lesionados con 6OHDA.

Para evaluar si existía neurogénesis en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) lesionada con 6OHDA, se inyectaron animales con BrdU según el esquema de la Figura 5 y se analizaron sus cerebros mediante doble inmunofluorescencia para BrdU y TH (ver sección 7.4.6. y Capítulo III). El protocolo de inyección se grafica en la Figura 5, donde cada flecha representa el día en que los animales fueron inyectados. Se administraron 2 dosis diarias, una hora después de que se prenden las luces (9:00hs) y 2 horas antes de que se apaguen (18:00hs). De esta forma los animales sacrificados a los 12 días post-lesión recibieron 12 inyecciones mientras que los sacrificados a los 28 días recibieron 18.

A pesar de realizar este experimento para detectar neurogénesis en el modelo de la enfermedad de Parkinson, nos encontramos con que la inmensa mayoría de las células

positivas para BrdU en los animales lesionados eran microglia en activa proliferación (ver sección 7.4.5. y Capítulo II, sección II.3.2.).

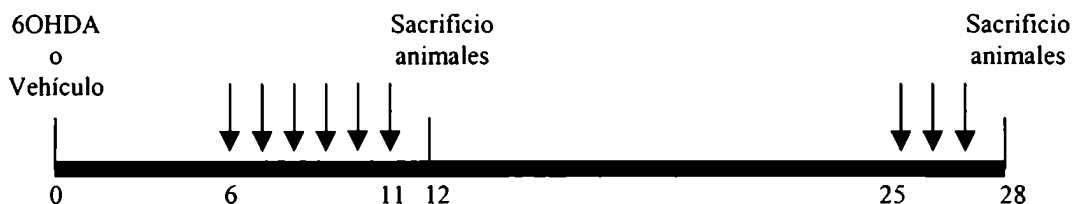


Figura 5. Protocolo de administración de BrdU en animales lesionados con 6OHDA y controles. Las flechas representan dos inyecciones diarias del marcador. Los animales sacrificados a los 12 días recibieron 12 dosis y los sacrificados a los 28 días 18 dosis.

4. RT-PCR competitiva semi-cuantitativa.

4.1. Extracción del ARN.

Para la extracción del ARN de los tejidos se utiliza el reactivo TRIzol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) o una solución de extracción compuesta por un volumen de solución desnaturante (33,3%p/v tiocianato de guanidinio, 0,02M citrato de sodio pH=7, 0,35p/v sarcosyl, 0,3% β -mercaptoetanol y 0,1M acetato de sodio pH=7) y un volumen de fenol ácido. El protocolo seguido es el original con pequeñas modificaciones (Chomczynski and Sacchi, 1987; Pitossi et al., 1997). Los tejidos se homogenizan en 1ml de TRIzol por cada 50-100mg de tejido (ver Tabla 3), utilizando un homogeneizador Polytron (IKA, Alemania), 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 RNAsas. La integridad del RNA se chequea 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.

Tabla 3. Especificación de los volúmenes utilizados durante la extracción del ARNm para cada hemirregión o hipocampo completo, y el volumen utilizado para la transcripción reversa.

Región	TRIZOL utilizado en la extracción (ml)	Volumen de resuspensión del pellet (μ l)	Volumen utilizado para la transcripción reversa (μ l)
Estriado	1	40	10
Corteza	1,5	60	10
<i>Substantia nigra</i>	0,7	20	10
Hipocampo	1	20	10
Hipocampo total	1,5	60	10

Alternativamente, se agrega 10 μ g de ácido poliinosínico (poli I, Sigma) 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 en gel de 1% agarosa en TBE pero la cuantificación por absorbancia a 260nm no es posible debido a la presencia del ácido, que absorbe a la misma longitud de onda.

En los casos en que se desea analizar la presencia de ARNm de genes sin intrones (neurotrofinas) se trata la muestra de ARN con DNAsa libre de RNAsa (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.

4.2. Síntesis de ADNc.

El ADNc fue sintetizado utilizando un kit comercial (Gibco) de transcripción reversa. Se toman 5 μ g de ARN total (o 4 μ l de 10 μ l de preparación con poly I) de cada muestra o cuando se desean juntar varios animales en un tubo se toman proporcionalmente de cada ARN total de forma de obtener una cantidad final de 5 μ g. El ARN es mezclado con 0,5 μ g 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 40 μ l 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").

4.3. PCR semicuantitativa.

1) Fragmento de competición. Para la cuantificación de las muestras se utilizó un fragmento de competición con sitios de hibridación de primers correspondientes a secuencias de ADNc de rata, llamado pRat6 (Pitossi and Besedovsky, 1996). Se linealiza el plásmido 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 4), de forma que cada par de ellos permite la amplificación de una secuencia de cDNA 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 4. Se especifican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación, los tamaños de los productos y el número de ciclos y cantidad de ARN utilizados en la amplificación.

Gen	Primer sentido 5' 3'	Primer antisentido 5' 3'	Largo del amplicon bp	Producto genómico bp	Número de ciclos	µg de ARN total
IL-1α	AACTGGGTCAGTCTTTGCC	TTGTGACACCCTGGTTTGAG	207	¿?	42	0.16
IL-1β	TCCATGAGCTTTGTACAAGG	GGTGCTGATGTACCAGTTGG	237	959	30	0.64
IL-1ra	GACCTGCAAGATGCAAGCC	AGAGGAACCATCTGGACAG	349	>5000	42	0.5-0.64
TNFα	AAATGGGCTCCCTCTCATCA	AGCCTTGTCCTTGAAGAGA	248	661	42	0.5
TGF-β1	ACCAACTACTGCTTCAGCTC	TGTTGGTTGTAGAGGGCAAG	189	>5000	30	0.5
BDNF	TCACAGTCTGGAGAAAGTC	ATGAACCGCCAGCCAATTCT	202	202	42	0.25-0.5
NGFβ	CGGACACTCTGGATTAGAC	TCCACTCTACAGGATTG	271	271	42	0.25
β-actina	CAATGTGGCTGAGGACTTTG	ACAGAAGCAATGCTGTCACC	193	¿?	30	0.08
β2-micro	TCTTCTGGTGCTTGTCTC	AGTGTGAGCCAGGATGTAG	241	>3000	30	0.016-0.08

Abreviaturas: IL-1α e IL-1β, interleuquina-1alfa y beta; IL-1ra, antagonista del receptor de IL-1; TNFα, factor de necrosis tumoral-alfa; TGF-β1, factor de crecimiento transformante-beta1; BDNF, factor de crecimiento nervioso derivado de cerebro; NGFβ, fragmento β del factor de crecimiento nervioso; β2-micro, microglobulina-beta 2.

2) Amplificación por PCR. La amplificación del ADN se realiza en 5µl de buffer de reacción (20mM Tris-HCl, pH 8, 50mM KCl; Gibco) suplementado con 2,5mM de MgCl₂ y 0,2mM de cada dNTPs, además de 0,2µM de cada uno de los primers específicos, y 2,5 unidades de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Gibco) en un volumen final de 50µl.

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.

Como controles dentro de la amplificación se incluyeron: 1) un control negativo, al cual no se le agregó AND; y 2) un control "sin RT", en el cual se amplificó el f.c. en presencia de una muestra de ARNm total al cual no se le agregó transcriptasa reversa durante la síntesis de

ADNc. El control negativo permite identificar la presencia de contaminantes en los reactivos utilizados. El control "sin RT" permite detectar la contaminación con ADN genómico.

3) Detección de los productos de amplificación. 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, tomándose la imagen con el equipo White/UV Transilluminator UVP. Las bandas se cuantifican utilizando el programa Gelworks 1D Intermediate, versión 3.01 UVP, cuidando que no exista saturación en la imagen a cuantificar.

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). 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 $\beta 2$ -microglobulina. Las muestras son normalizadas según la cantidad de $\beta 2$ -microglobulina presente.

4) Curvas de referencia. Durante la puesta a punto de la técnica de semicuantificación por RT-PCR competitiva se observaron diferencias entre las eficiencias de amplificación del ADNc y del competidor (Depino, 1999). Por ello se construyeron curvas de referencia para cada una de las moléculas a cuantificar (Alvarez et al., 2000). Se amplificaron 100 fg del fragmento de competición (f.c.) con diluciones seriadas de ADNc extraído de bazo de una rata que fue inyectada dos horas antes con la endotoxina LPS (citoquinas) o de hipocampo de una rata naïve (neurotrofinas). El logaritmo de la relación ADNc/competidor se relaciona linealmente con el logaritmo de dilución de ADNc amplificado, dentro de un rango de relaciones entre los amplicones (Tabla 5).

Tabla 5. Curvas de referencia para las distintas moléculas analizadas en esta tesis. Se especifica la ecuación de la recta que mejor ajusta a los datos, el número de ciclos y la temperatura de apareamiento de la amplificación, la cantidad de fragmento de competición (f.c.) utilizada y el rango en que se mantiene la linealidad.

Factor neurotrófico	Curva	Número de ciclos	Temperatura de annealing (°C)	Masa de fc (fg)	Relación mínima	Relación máxima
IL-1 α	$y=1,3422x-2,7772$	30	55	100	-0,7	0,9
IL-1 β	$y=0,8006x-1,1233$	30	55	100	-0,5	2
IL-1ra	$y=1,0351x-3,0744$	42	60	100	-1,5	0,7
TGF β 1	$y=0,8924x-0,8021$	30	55	100	-0,4	1
BDNF	$y=0,6435x-1,3892$ $y=0,4809x-0,8683$	42	55	100	-0,1 -0,8	1,2 0,4
NGF	$y=1,0793x-3,3615$	42	55	100	-1	1,3
$\beta 2$ -micro	$y=0,6351x-0,2963$	30	55	100	0,2	1,6
-ac β na	$y=0,7766x-1,349$	30	55	1000	-1,3	0,2

Así, se pueden utilizar estas pendientes para obtener un valor relativo de dilución de ADNc a partir de las relaciones ADNc/competidor obtenidas en la amplificación, permitiendo así un análisis semicuantitativo preciso (Alvarez et al., 2000).

En resumen, para cada molécula medida la cuantificación por UV del amplicón de ADNc es normalizada por el amplicón del competidor del mismo tubo y a partir de esa relación se obtiene un valor de dilución de ADNc en la curva de referencia. Luego las mediciones para los factores neurotróficos son normalizados por la cuantificación de β 2-microglobulina (que representa la cantidad de ADNc en la muestra). Para una visualización más fácil de los datos, se muestra el porcentaje respecto a la media de los animales naïve.

5. ELISA para IL-1 α e IL-1 β .

Para medir los niveles de las proteínas IL-1 α e IL-1 β en el cerebro, los animales fueron sacrificados mediante decapitación, el cerebro inmediatamente removido y disectado. Los tejidos se mantuvieron a -70°C hasta su procesamiento. Se homogenizaron los tejidos en 400 μl de TBS (Tris-Hcl 50mM pH=7,3, NaCl 150mM) con 0,1% de Tween 20 y una mezcla de inhibidores de proteasas (10 $\mu\text{g/ml}$ de aprotinina, 5 $\mu\text{g/ml}$ de peptastina, 5 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina y 1mM PMSF). Luego se los centrifugó a 1000g a 4°C por 10 minutos y el sobrenadante fue ultracentrifugado a 40000rpm por 2 horas. Las muestras fueron alicuotadas y guardadas a -70°C hasta su uso. La cantidad de proteína total fue medida en cada muestra según la técnica de Bradford. Se utilizaron kits comerciales para medir las concentraciones de IL-1 α e IL-1 β de rata (ELISA kits, R&D Systems, Minneapolis, MN) con alta sensibilidad ($<15\text{ pg/ml}$). Se analizaron al menos 3 animales por tiempo, y cada muestra por duplicado.

6. Procedimientos comportamentales.

6.1. Stepping.

El ensayo de ajuste de pasos ("stepping") fue realizado según lo descrito en Olsson et al. (1995) con animales lesionados con 6OHDA (n=7-43) y con animales inyectados con vehículo (n=7-28). Se toma a la rata con una mano fijándole las patas posteriores y elevando la parte trasera levemente respecto a la superficie. Con la otra mano se toma la pata delantera

de la rata que no será evaluada. Luego se mueve la rata sobre una mesa hacia el lateral, lentamente (1 metro en 5 segundos), primero en dirección derecha-izquierda (D-I) y luego izquierda-derecha (I-D) (Figura 6). Se contó el número de pasos con que el animal ajustó el desplazamiento lateral para ambas patas delanteras y en ambas direcciones. La secuencia de evaluación fue pata derecha (contralateral) en dirección D-I (palma) y luego I-D (dorso), seguido de la pata izquierda (ipsilateral) en dirección D-I (dorso) y luego I-D (palma). Se realizó el ensayo al menos 3 veces antes de la cirugía para permitir que los animales se acostumbren al agarre por el experimentador. El último ensayo realizado antes de la cirugía fue considerado el pre-lesión.

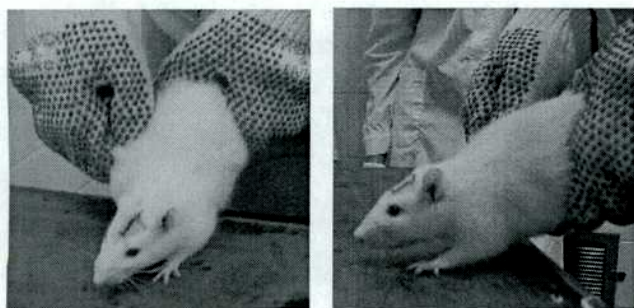


Figura 6. Stepping: ensayo para evaluar la acinesia de las patas anteriores. Los animales son sostenidos por la parte trasera y se le inmoviliza la pata delantera que no va a ser evaluada. Luego se desplaza al animal lateralmente, de forma que para no arrastrar la pata deba realizar pasos de ajuste.

6.2. Evitación pasiva.

Los ensayos de evitación pasiva fueron realizados en colaboración con el grupo del Dr. Jorge Medina (Bernabeu et al., 1997; Izquierdo et al., 1998). Las ratas fueron ubicadas en una plataforma de 8 cm de ancho elevada 2,5 cm respecto al piso, que se encuentra en el lado izquierdo de un aparato de entrenamiento de acrílico amarillo (50 x 25 x 25 cm) (Figura 7). El piso de la caja consta de una serie de barras de bronce paralelas de 0,2 cm de diámetro espaciadas cada 0,1 cm.

Se determinó la latencia a bajar de la plataforma, como el tiempo transcurrido hasta que el animal apoya las cuatro patas en las barras. En el entrenamiento, inmediatamente después de bajar, los animales recibieron 0,4 mA durante 4 segundos en las patas a través de las barras. Las sesiones de prueba fueron realizadas 1,5 horas después (memoria de corto plazo, STM) o a las 24 horas (memoria de largo plazo, LTM). En ellas, el procedimiento es el mismo que en el entrenamiento pero se omite el shock. Se realizaron tres experimentos independientes en los cuales el operador era ciego al tratamiento.

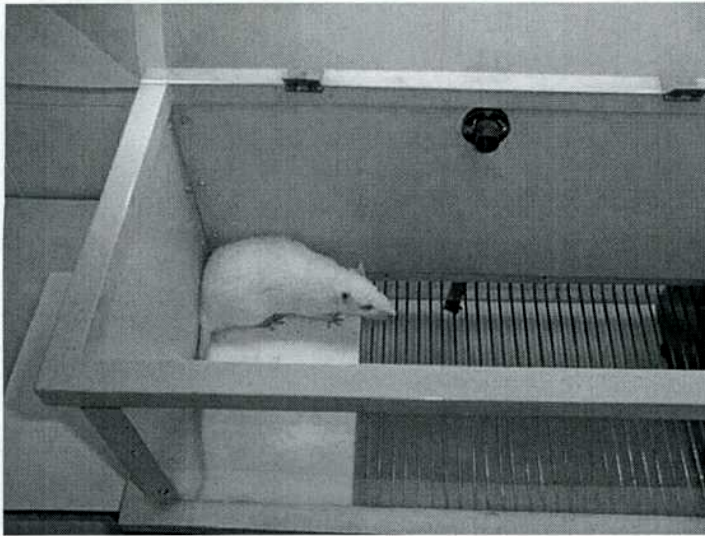


Figura 7. Caja de evitación pasiva.
La rata es ubicada en la plataforma elevada y se mide el tiempo que tarda en bajar al piso formado por barras.

Debido a que los animales con una adquisición fuerte de la tarea se pueden quedar en la plataforma varios minutos y hasta horas, se estableció un techo de espera de 180 segundos. Si luego de 3 minutos los animales aún no han descendido de la plataforma, se los retira de la caja de entrenamiento y se les asigna un valor de latencia de 180 seg. Esta imposición de un techo a los valores de latencia, obliga la utilización de pruebas estadísticas no paramétricas. Utilizamos la prueba de Kruskal-Wallis tanto para los valores de latencia a corto (STM) como a largo (LTM) plazo, seguida de la prueba individual *U* de Mann-Whitney.

6.3. Campo abierto.

Los animales fueron expuestos a un campo abierto de 50 x 50 cm y paredes de 39 cm de altura todos recubiertos de fórmica negra (Figura 8). El piso se encuentra dividido en 9 cuadrantes por líneas rojas. Los animales se ubicaron en el cuadrante medio más cercano al observador y se determinaron durante 5 minutos el número de veces que el animal cambió de cuadrante y el número de rearings (pararse en las patas traseras) (Izquierdo et al., 1999). Para evaluar la habituación a largo plazo, 24 horas después de la primera sesión se sometieron los animales a otra similar (segunda sesión o sesión de prueba).

La habituación al ambiente novedoso dentro de cada grupo se analizó mediante pruebas *t* de Student pareadas entre la sesión de entrenamiento y la de prueba. La

comparación entre tratamientos en la sesión de prueba fue realizada mediante una prueba *t* de Student no pareada.

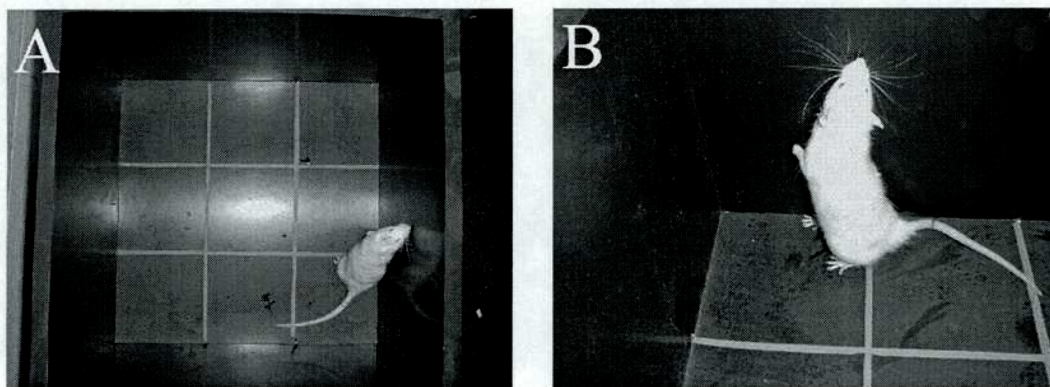


Figura 8. Campo abierto utilizado para evaluar la habituación. (A) Los "crossings" son evaluado como veces que el animal cruza las líneas grises. (B) "Rearings": el animal se para sobre las patas traseras.

6.4. Ensayos de sensibilización al shock eléctrico.

Se ubicaron a los animales en el aparato de entrenamiento de evitación pasiva, al cual se le removió previamente la plataforma. Luego de 30 segundos de exploración libre, los animales recibieron shocks de 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 y 0,6 mA durante 1 segundo, en ensayos sucesivos separados por 15 segundos. Se determinó el umbral de vocalización y de saltos para cada animal.

7. Análisis histológicos.

Para los análisis histológicos los animales son anestesiados profundamente con clorhidrato de ketamina y xylazina y perfundidos transcardíacamente con solución salina heparinizada (0,9% NaCl, 0,25 U/ml de heparina; aproximadamente 50ml por rata) seguido de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (PB) 0,1M pH=7,2 (200ml por animal). Las perfusiones se realizan a un flujo constante (200ml en 30 minutos) utilizando una bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Palmer Instrument Co., IL, USA). Los cerebros son extraídos y post-fijados durante 24hs en la misma solución fijadora a 4°C. Luego los tejidos son criopreservados mediante inmersión en una solución conteniendo 30% de sacarosa (en 0,1M PB), hasta que los cerebros adquieren mayor densidad que la solución. Finalmente son

congelados en una solución de isopentano (J.T.Baker, NJ, USA) enfriada en un baño de etanol puro y hielo seco.

Las regiones del cerebro a estudiar son entonces seccionadas de manera seriada en un criostato (Leica). Las secciones de 40µm de grosor son guardadas en solución de criopreservación (3 vol glicerol, 3 vol etilenglicol, 4 vol 0,1M buffer fosfato) a -20°C hasta ser usadas. Luego son utilizadas para inmunohistoquímica o inmunofluorescencia en flotación o montadas en portaobjetos gelatinizados y teñidos con una solución de violeta de cresilo (tinción de Nissl).

7.1. Tinción de Nissl.

Esta tinción, modificada de Burck (1969), permite observar los grumos de Nissl y las formas celulares. Las secciones acomodadas en portaobjetos gelatinizados se dejan secar para que el tejido se adhiera al vidrio. Las secciones son entonces rehidratadas mediante pasajes sucesivos por etanol 100%, 96% y 70% (aproximadamente 1 min cada uno) y finalmente en agua. Luego los tejidos son teñidos durante el tiempo necesario para obtener la coloración deseada (5 a 15 min) en una solución de acetato de violeta de cresilo (0,1g en 100ml de acetato de sodio 0,2M, pH=3,8, filtrada). El exceso de colorante es lavado con agua destilada. Finalmente los tejidos son deshidratados mediante pasajes por 3 soluciones de etanol 70%, tres de 96%, tres de 100%, y tres de xileno puro. Finalmente son montadas utilizando solución de montaje DPX (Fluka, Buchs, Suiza).

7.2. Tinción de Klüver-Barrera.

Esta técnica consiste en la tinción de la mielina con luxol fast blue y de las neuronas con Nissl (modificado del original, Klüver and Barrera, 1953). Se utilizaron secciones de 14µm de grosor, montadas en portaobjetos gelatinizados. Se las rehidrató parcialmente en etanol 96° y se las tiñó en una solución de Luxol Fast blue (1g Solvent Blue 38, Sigma, 0,05% ácido acético, en etanol 96°) a 60°C durante toda la noche. Al día siguiente se dejan enfriar las secciones a temperatura ambiente y se lava el exceso de luxol en alcohol 96°. Luego se lava con agua destilada y se diferencia sumergiendo de forma homogénea y rápida los portaobjetos en una solución saturada de carbonato de litio, o para hacer la diferenciación más lenta se utilizó una solución de carbonato de litio al 0,05%. La diferenciación más fina se realiza en etanol 70%. Cuando al microscopio la sustancia blanca permanece azul y la gris

pierde el color se dejan los cortes en agua destilada. Luego se tiñen con la técnica de Nissl (ver sección 7.1.) y se montan las secciones utilizando DPX como medio de montaje.

Al finalizar la tinción la mielina estará teñida de azul y la heterocromatina y nucléolo en violeta.

7.3. Inmunohistoquímica.

Para los análisis por inmunohistoquímica se utilizaron anticuerpos primarios específicos, reconocidos por anticuerpos secundarios biotinilados y el kit de amplificación Vectastain Standard ABC (Vector). Luego se reveló la peroxidasa utilizando como sustrato a la 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, 0,5mg/ml en 0,1M buffer fosfato, filtrado). Las secciones se montaron utilizando DPX (Fluka).

7.3.1. Análisis de la inflamación.

Luego del análisis bajo la tinción de Nissl, se estudió la presencia de células del sistema inmune mediante inmunohistoquímica. Secciones de 40µm fueron permeabilizadas y lavadas de la solución de criopreservación mediante 3 lavados en buffer fosfato-salina (PBS) conteniendo 0,1% del detergente Triton-X100 (PBS-Tx). La actividad de las peroxidasas endógenas fue eliminada mediante tratamiento con H₂O₂ en metanol (20µl por ml) durante 20 min. Los tejidos fueron luego lavados 3 veces en PBS-Tx y la unión inespecífica fue bloqueada por incubación durante 40 min en PBS-Tx conteniendo 1% de suero de burro. Luego se los incubó durante toda la noche en solución de bloqueo conteniendo algún anticuerpo de los que detectan los antígenos de macrófagos (anti-ED1 y anti-ED2 generados en ratón, diluidos 1:400, Serotec, Kidlington, Oxford, UK) o al complejo mayor de histocompatibilidad clase I (anti-MHC clase I generado en ratón, diluido 1:200, Serotec). Después de lavar, se incubaron los tejidos durante 2 horas en solución de bloqueo conteniendo una IgG de burro anti-Fc de ratón, biotinilada (diluida 1:200, Jackson). Después de 3 lavados en PB, se los incubó 2 horas con el kit Vectastain Standard ABC (Vector), se reveló con DAB y se montaron las secciones utilizando DPX.

7.3.1. Tirosina hidroxilasa (TH).

Para estudiar la pérdida de neuronas dopaminérgicas y de sus terminales en el estriado, se analizó la expresión de la enzima limitante para la síntesis de dopamina: la tirosina hidroxilasa (TH). El protocolo fue igual al de la sección anterior, utilizando la

inmunoglobulina de tipo G (IgG) anti-TH generada en conejo (dilución 1:1000; Chemicon, Temecula, CA, USA) como anticuerpo primario y el anticuerpo secundario anti-Fc de conejo generado en burro y biotinilado (dilución 1:200; Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA).

7.3.2. β -galactosidasa

Para estudiar la distribución del Ad β gal en el cerebro, se analizó la expresión de la enzima β -galactosidasa utilizando la inmunoglobulina de tipo G (IgG) anti- β galactosidasa generada en conejo (dilución 1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, USA), de manera similar a la de las secciones anteriores, seguido del anticuerpo anti-Fc de conejo generado en burro y biotinilado (dilución 1:200; Jackson).

7.4. Inmunofluorescencia.

Todas las inmunofluorescencias (simples o dobles) fueron realizadas en cortes flotantes de 40 μ m de grosor, tomando 1 corte cada 200 μ m de forma de tener una representación de toda la zona del cerebro en estudio.

Luego de incubar con los anticuerpos adecuados, los cortes son lavados en PB (ya que el detergente distorsiona la señal fluorescente) y son ubicados en portaobjetos previamente gelatinizados. Luego de dejarlos secar (para permitir que los tejidos se adhieran al vidrio), los cortes son rehidratados y montados con gelvatol (ver sección 7.7.3.). La marca es analizada utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 equipado con láser de argón y de He/Ne que emiten a 488 nm y 568 nm, respectivamente. Las imágenes de cada longitud de onda son obtenidas de manera independiente y superpuestas *a posteriori*.

7.4.1. Doble inmunofluorescencia para neuronas dopaminérgicas y microglia.

Para detectar la microglia rodeando la SNpc, se lavaron los tejidos de la solución de criopreservación con PBS-Tx (2 lavados de 10 min cada uno) y se los bloqueó durante 40 min en una solución de PBS-Tx conteniendo 0,1% de suero normal de burro. Luego los cortes se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en solución de bloqueo conteniendo la isolectina B4 biotinilada de *Griffonia simplicifolia* (GSA1-B4, diluida 1:50, Vector; Streit and Kreutzberg, 1987) y el suero de un conejo inmunizado contra la tirosina hidroxilasa (TH, diluida 1:1000, Chemicon). Esta lectina se une a los residuos de α -D-galactosa en la

membrana plasmática y se ha demostrado su especificidad por la microglia en todas sus formas, monocitos y células supraependimales (Kaur and Ling, 1991). Luego de lavarlos en PB, los tejidos fueron incubados 2 horas a temperatura ambiente en PB conteniendo IgG anti-Fc de conejo conjugada con Cy2 (diluido 1:200, Jackson) y estreptoavidina conjugada a Cy3 (diluida 1:250, Jackson), a temperatura ambiente y en oscuridad.

Adaptamos la clasificación de la microglia activada según Kreutzberg (1996) (Figura 9). Microglia en reposo: células con cuerpo en forma de cono y procesos finos y ramificados. Microglia activa ramificada: cuerpo celular alargado con procesos largos pero gruesos. Microglia ameboide: cuerpo celular redondo con escasos procesos cortos. Células fagocíticas: cuerpo celular redondo con citoplasma vacuolado en las que no se pueden observar procesos en el microscopio óptico. Todas estas células unen la lectina B4 de *G. simplicifolia*. Consideramos microglia activada a todas las etapas a excepción de las denominadas "en reposo".

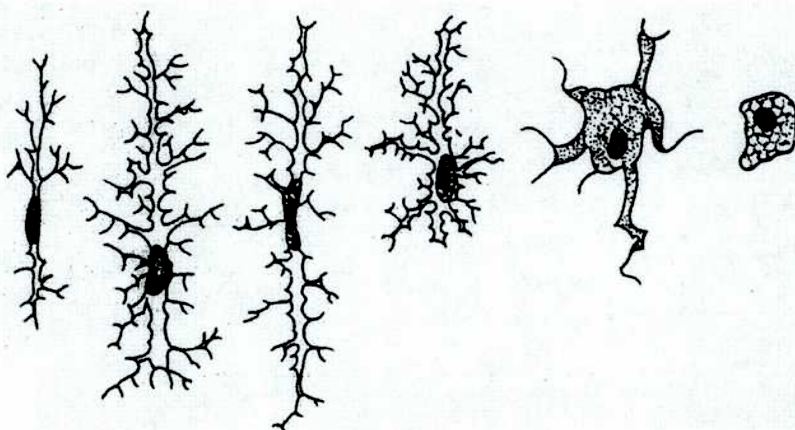


Figura 9. Morfología de la microglia. De izquierda a derecha, transformación de la microglia en reposo en células activas. Todas estas células son positivas para la lectina GSA1-B4. En su estado final se identifican como células fagocíticas, las cuales son también positivas para el marcador ED1. Adaptado de Kreutzberg, 1996.

Para la cuantificación de la microglia activada, se contaron las células descriptas en el párrafo anterior presentes en la SNpc, en un microscopio de fluorescencia. La SNpc fue identificada como la región en la que se evidencia tinción para TH, a diferencia de la SNpr donde la presencia de microglia es abundante pero no existen neuronas dopaminérgicas. Para evitar variaciones entre las secciones contadas en los distintos animales, se contaron las células microgliales presentes en la SNpc lateral al núcleo lateral medio del tracto óptico accesorio (Figura 10). Se cuantificaron las células en 3 animales por tiempo. En las SNpc contralaterales o las de animales inyectados con vehículo no se observaron células positivas para la lectina (ver Figura II.3.D y E).

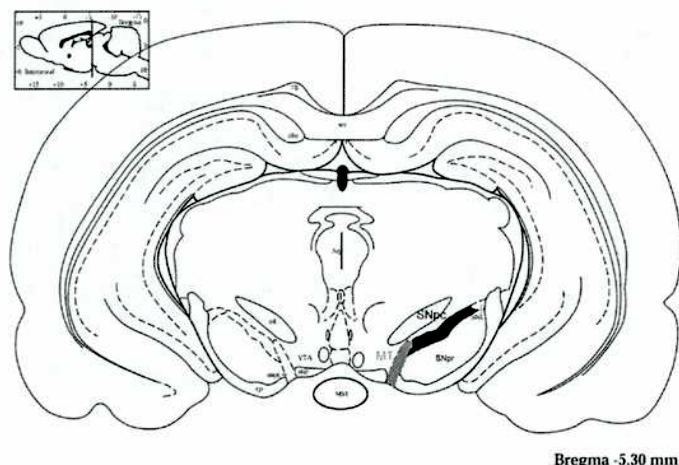


Figura 10. Sección utilizada para cuantificar la activación de la microglia. Se cuantifican las células en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc, en negro) lateral al núcleo lateral medio del tracto óptico (MT, en gris).

7.4.2. Detección de activación de astrocitos y microglia.

Se incubaron los tejidos en solución de bloqueo 40 minutos a temperatura ambiente. Luego se los incubó toda la noche en solución de bloqueo conteniendo la lectina GSA1-B4 (diluida 1:50) y el suero de conejo inmunizado con la proteína glial ácida fibrilar (GFAP, diluida 1:700, Chemicon). Luego de lavarlos se los incubó 2 horas con los anticuerpos descriptos en la sección anterior. En los resultados se muestran las imágenes obtenidas en el microscopio confocal, cada canal por separado y en blanco y negro.

7.4.3. Detección de células macrofágicas.

Luego de lavarlos y permeabilizarlos, se incubaron los tejidos en solución de bloqueo 40 minutos a temperatura ambiente. Se los incubó toda la noche en solución de bloqueo conteniendo la IgG policlonal anti-ED1 obtenida de ratón (diluida 1:400; Serotec). Luego de lavarlos se los incubó 2 horas con el anticuerpo anti-Fc de ratón generado en burro y biotinilado (diluido 1:200; Jackson). Se lavaron los cortes 3 veces en PB y se los incubó por dos horas más con una estreptoavidina conjugada con Cy2 (diluida 1:250 en PB; Amersham).

7.4.4. Detección de neutrófilos.

Las células polimorfonucleares fueron identificadas en secciones de 40µm teñidas con violeta de cresilo. Para confirmar la identificación se realizaron inmunofluorescencias utilizando el anticuerpo MBS2 generado en conejo (diluido 1:100, generosamente provisto por el Dr. Daniel Anthony). Se incubaron los cortes toda la noche a temperatura ambiente en

solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo primario. Luego de 3 lavados se los incubó con el anticuerpo anti-Fc de conejo generado en burro y conjugado con Cy2 (diluido 1:200, Jackson). Finalmente los cortes se montaron y analizaron en un microscopio confocal.

7.4.5. Doble inmunofluorescencia anti-BrdU y lectina GSA1-B4.

Para detectar la proliferación de células microgliales, se utilizaron cerebros de animales previamente inyectados intraperitonealmente con BrdU (ver sección 3.). Los tejidos fueron lavados de la solución de criopreservación en TBS-Tx (Tris-HCl 50mM pH=7,3, NaCl 150mM, Tritón-X100 0,1%). Luego se los incubó 2 horas en formamida 50% en 2xSSC (0,3M NaCl, 0,03M citrato de sodio) a 65°C, se los lavó en 2xSSC y se los incubó otros 30 minutos en 2N HCl. Este tratamiento permite la desnaturalización del ADN genómico, facilitando la detección del análogo del nucleótido mediante el anticuerpo. Luego se neutralizaron los tejidos incubándolos 15 minutos en buffer borato 0,1M y se los lavó en TBS. Se bloquearon los sitios inespecíficos de unión de los anticuerpos mediante la incubación en TBS-Tx conteniendo 1% de suero de burro. Luego se incubaron las secciones toda la noche en solución de bloqueo conteniendo la inmunoglobulina tipo G monoclonal de ratón anti-BrdU (dilución 1:200; Boehringer) y la lectina GSA1-B4 (dilución 1:50; Vector). Luego de lavar las secciones 3 veces con PB, se las incubó con un anticuerpo hecho en burro anti-Fc de ratón, conjugado con el fluoróforo Cy2 (dilución 1:200 en PB; Jackson) y con una estreptoavidina conjugada con Cy3 (dilución 1:250; Jackson).

7.4.6. Doble inmunofluorescencia anti-BrdU y anti-TH

El protocolo para la detección de neuronas dopaminérgicas que hayan incorporado el análogo de nucleótido BrdU es el mismo que el de la sección anterior hasta el bloqueo de los sitios inespecíficos. Luego se incubaron las secciones toda la noche con el anticuerpo anti-BrdU antes mencionado y con el anticuerpo hecho en conejo anti-TH (dilución 1:1000; Chemicon). Luego de lavar las secciones 3 veces con PB, se las incubó con los anticuerpos hechos en burro anti-Fc de ratón, conjugado con el fluoróforo Cy2 (dilución 1:200 en PB; Jackson) y anti-Fc de conejo, conjugado con el fluoróforo Cy3 (dilución 1:200 en PB; Jackson).

7.4.7. *Detección de neuronas.*

Para identificar a las neuronas (particularmente en el hipocampo) se analizó la distribución de un marcador específico neural (NeuN; Mullen et al., 1992). Los tejidos fueron lavados de la solución de criopreservación en PBS-Tx (2 lavados de 10 min cada uno) y bloqueados durante 40 min en una solución de PBS-Tx conteniendo 0,1% de suero normal de burro. Luego los cortes se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en solución de bloqueo conteniendo un anticuerpo monoclonal anti-NeuN generado en ratón (dilución 1:100; Chemicon). A continuación, las secciones fueron lavadas dos veces en PBS-Tx e incubadas 2 horas a temperatura ambiente en solución de bloqueo conteniendo el anticuerpos secundarios anti-ratón generados en burro y conjugado con biotina (diluido 1:200, Jackson). Finalmente, se lavaron los cortes 2 veces en PB y se incubaron 2 horas (temperatura ambiente y oscuridad) en PB conteniendo una dilución 1:250 de estreptoavidina conjugada con el fluróforo indocarbocianina 2 (Cy2, Jackson).

7.4.8. *Doble inmunofluorescencia anti- β galactosidasa y anti-NeuN.*

Para estudiar la expresión neural del gen reportero lacZ expresado por el correspondiente vector adenoviral, se combinó la detección de la correspondiente proteína reportera con la del marcador específico neural NeuN. Luego de lavar y bloquear, los cortes se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en solución de bloqueo conteniendo un anticuerpo anti- β galactosidasa generado en conejo (dilución 1:1000; Molecular Probes) y un anticuerpo monoclonal anti-NeuN generado en ratón (dilución 1:100; Chemicon). A continuación, las secciones fueron lavadas dos veces en PB e incubadas 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad en PB conteniendo los anticuerpos secundarios anti-conejo conjugado con el fluoróforo indocarbocianina 2 (Cy2, diluido 1:200; Jackson) y anti-ratón conjugado con biotina (diluido 1:200; Jackson), ambos generados en burro. Finalmente, se lavaron los cortes 2 veces en PB y se incubaron 2 horas en PB conteniendo una dilución 1:250 de estreptoavidina conjugada con el fluróforo indocarbocianina 3 (Cy3, Jackson).

7.5. **Análisis de neurodegeneración utilizando Fluoro-Jade B.**

Se realizaron tinciones para neuronas en degeneración segun Schmued et al. (1997) y Schmued and Hopkins (2000). Se utilizaron cortes congelados de 14 μ m de grosor, montados en portaobjetos gelatinizados. Los portas son primero sumergidos en una solución de 1% de hidróxido de sodio en 80% de alcohol, durante 5 minutos. Luego se los lavó 2 minutos en

alcohol 70% y 2 minutos en agua destilada. Luego se los transfirió a una solución 0,06% de permanganato de potasio por 10 minutos, con movimientos constantes.

Se preparó una solución madre 0,01% de Fluoro-Jade B (Histo-Chem Inc., Jefferson, AR, USA) en agua destilada. Para teñir se realizó una dilución 1:25 de la solución madre en ácido acético 0,1% (concentración final del colorante: 0,0004%), no más de 10 minutos antes de usarla y la cual no puede ser re-usada. Se sumergen las secciones 20 minutos en esa solución, se lava un minuto 3 veces en agua destilada. Se secan y montan con DPX.

La tinción fue visualizada por excitación con 480nm, en un microscopio de fluorescencia (modelo BX60, Olympus) y las imágenes tomadas con una cámara refrigerada (CoolSNAP-Pro, Media Cybernetics).

7.6. Cortes semifinos.

Para realizar cortes semifinos los animales fueron perfundidos primero con una solución de lavado filtrada (0,8% NaCl, 0,8% sacarosa y 0,1% glucosa en agua destilada) con heparina. Luego se perfundieron con fijador (2% glutaraldehído, 2% paraformaldehído y 0,1M buffer cacodilato en agua destilada), preparado justo antes de usar. Se disectaron piezas de aproximadamente 1mm³, que fueron dejadas 5 horas más en fijador a 4°C y luego se las guardó hasta su procesamiento en 0,2M de sacarosa en 0,1M de buffer cacodilato a 4°C.

Luego de 3 lavados de 5 minutos en el mismo buffer, fueron post-fijadas durante 1 hora en 1% OsO₄ en el mismo buffer. Posteriormente, se lavaron de la misma forma que en el paso anterior, se deshidrataron con etanol a concentraciones crecientes, se aclararon con acetona y se infiltraron con araldita. Se obtuvieron secciones semifinas con un ultramicrotomo Sorvall Porter-Blum MT2-B. Posteriormente, las secciones fueron teñidas con azul de toluidina-bórax. Las secciones fueron analizadas en un microscopio óptico (modelo BX60, Olympus) y las imágenes tomadas con una cámara refrigerada (CoolSNAP-Pro, Media Cybernetics).

7.7. Otros

7.7.1. Preparación de paraformaldehído.

Se preparó una solución 8% de paraformaldehído (Fluka) en agua destilada. Para ello se llevó la solución a 60°C y se agregó NaOH 10N hasta que la clarificación de la solución. Esta solución fue filtrada utilizando papel Whatmann 3M y guardada a 4°C no más de 12

horas. Justo antes de su utilización se la diluyó a una concentración del 4% con PB 0,2M y se la llevó a pH 7,4.

7.7.2. Gelatinización de portaobjetos.

Para poder utilizar los portaobjetos comerciales para histología, los mismos deben ser gelatinizados de manera de favorecer la unión de las secciones al vidrio. Para ello los portaobjetos fueron desgrasados en una solución 1N de HCl durante 20 minutos y lavados con agua de la canilla corriendo constantemente durante 45 minutos. Luego se los lavó dos veces con agua destilada y se los sumergió en gelatina (0,5% gelatina 275 Bloom, Fisher, en agua destilada a 50°C con 0,005% Chrome Alum, $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) a 50°C. Los portaobjetos se dejaron secar en un lugar libre de polvo.

7.7.3. Preparación de solución de montaje de inmunofluorescencia (Gelvatol).

Se mezclaron 2,4g de Mowiol 4-88 (Calbiochem) con 6g de glicerina. Se agregaron 6ml de agua destilada y se dejaron varias horas a temperatura ambiente. Luego se agregaron 12ml de Tris 0,2M, pH 8,5, y se calentó a 50°C durante 10 minutos mezclando ocasionalmente. Luego de que su disolución, se clarificó la solución centrifugando a 5000g por 15 minutos. La solución se alicuotó y guardó a -20°C hasta ser usada.

8. Vectores adenovirales.

8.1. β -galactosidasa (Ad β gal).

El vector adenoviral que expresa el gen reportero lacZ fue provisto por el Dr. J. Mallet, del Hospital Pitie Salpetriere, Paris (Le Gal La Salle et al., 1993). Los stocks fueron generados en el laboratorio mediante purificación en gradientes de cloruro de cesio de vectores amplificados en células HEK293 y cuantificados por ensayo de placa (título final: $1,5 \times 10^{10}$ pfu/ μ l) o por dosis infectiva de cultivo de tejido 50 (título final: 4×10^{11} DICT50/ml).

8.2. IL-1ra (AdIL-1ra)

El vector adenoviral que expresa al antagonista natural IL-1ra fue construido en el laboratorio, utilizando la secuencia de ADNc de IL-1ra de rata y el brazo izquierdo del

adenovirus tipo 5 (Revah et al., 1996). La recombinación correcta fue verificada mediante la digestión con enzimas de restricción del ADN viral purificado mediante el procedimiento de Hirt (Hirt, 1967) y confirmada mediante Southern blot. La expresión del transgén fue analizada mediante Western blot. Finalmente la actividad biológica se determinó en un ensayo de inhibición de la proliferación de timocitos inducida por fitohemoaglutinina y estimulada por la IL-1 (Depino et al., 2003a). Los stocks fueron generados como los del Ad β gal, con un título final de 1×10^{10} pfu/ μ l.

8.3. IL-1 β (AdIL-1 β).

El vector adenoviral que expresa la IL-1 β fue construido en el laboratorio, utilizando la secuencia de ADNc de IL-1 β humana según lo descrito en Kolb et al. (2001). Los stocks fueron generados como los del Ad β gal, con un título final de 1×10^{10} pfu/ μ l.

9. Análisis de datos.

El análisis estadístico de los datos fue realizado utilizando el programa Prism versión 3.0 (GraphPad Software Incorporated), teniendo en cuenta el diseño experimental. Para mayor claridad el test estadístico utilizado en cada experimento es aclarado en la correspondiente capítulo. En todos los casos las diferencias son consideradas significativas si la probabilidad es menor a 0,05.

Capítulo I.

Respuesta del tejido nervioso a la inoculación de la IL-1 β

"Mis observaciones revelaron también que las neuronas comprometidas por presiones, conmociones o traumatismos recaídos en la vecindad, no sucumben siempre súbitamente, presa de la desintegración granulosa, sino que se necrosan por grados, propagándose el proceso destructivo desde las capas protoplasmáticas superficiales hasta las profundidades."

Santiago Ramón y Cajal
"Historia de mi labor científica"

I.1. Punto de partida

Se han descripto numerosos efectos de la IL-1 en el cerebro o en neuronas y glia *in vitro*, incluyendo algunos efectos contradictorios (ver Introducción, sección 1.2.1.). En este sentido, la IL-1 puede desencadenar respuestas adaptativas pero también dañinas de la macroglia y de la microglia: induce la producción de factores de crecimiento (por ejemplo, bFGF, TGF- β 1, NGF) pero también de mediadores inflamatorios (por ejemplo, fosfolipasa A2, ciclooxigenasa-2, prostaglandinas, óxido nítrico, metaloproteasas y colagenasas de matriz) (Rothwell and Luheshi, 2000). Es más, concentraciones bajas de IL-1 β protegen contra excitotoxicidad, pero concentraciones altas son tóxicas *per se* (Strijbos and Rothwell, 1995).

Por otro lado, se han demostrado diferencias regionales en la expresión de mediadores de la inflamación tanto para astrocitos (Denis-Donini et al., 1984) como para la microglia (Ren et al., 1999). Esto podría explicar la susceptibilidad diferencial de las neuronas de distintas regiones del cerebro a la neurotoxicidad por lipopolisacáridos (Kim et al., 2000). Sin embargo no se puede descartar que el tipo neuronal también sea un factor que determine la susceptibilidad a la toxicidad por la IL-1.

Finalmente, los infartos, los traumas, las hemorragias cerebrales y el daño cerebral por isquemia causan neurodegeneración aguda, o sea la pérdida rápida de las neuronas dañadas como respuesta a la lesión. Sin embargo, en muchas ocasiones se observa que, a pesar de la naturaleza aguda del estímulo, la pérdida de neuronas puede durar horas y hasta días (Allan and Rothwell, 2001). Este daño celular tardío resulta de factores endógenos que son liberados en respuesta al estímulo inicial.

En función de todo esto, una citoquina en particular (como la IL-1 β) puede tener diversos efectos en el SNC, dependiendo de las moléculas que induce y de la respuesta inflamatoria o glial que provoca. Además el efecto sobre las neuronas puede depender del fenotipo de las mismas. Sin embargo no existen estudios sistemáticos de citoquinas particulares que permitan evaluar estas hipótesis.

Para estudiar las diferencias regionales en la respuesta a la citoquina IL-1 β , se inyectaron 10ng de IL-1 β humana recombinante (hrIL-1 β) y se sacrificaron los animales 24 horas y 6 días después. Se determinaron las respuestas moleculares estudiando los niveles de ARNm de los ligandos del receptor de la IL-1 (IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra) y de la citoquina anti-

inflamatoria TGF- β 1 por RT-PCR semicuantitativa. Como respuestas celulares se evaluaron el grado de activación de la glia, la existencia de inflamación y la integridad de las neuronas.

El análisis fue realizado en cuatro regiones del SNC con características celulares bien diferenciadas: 1) el hipocampo: estructura altamente laminar compuesta de neuronas glutamatérgicas y de grandes espacios ocupados por procesos neuronales y astrocitos; 2) la *substantia nigra*: la región del cerebro con más alta densidad de microglia y con una población neuronal altamente susceptible a daños oxidativos, las células dopaminérgicas; 3) el estriado: región organizada en grupos que además de neuronas tiene una alta densidad de axones mielinizados, o sea, de oligodendrocitos; y 4) la corteza: organización laminar de neuronas glutamatérgicas que se encuentran cerca de la meninges. También se analizaron las regiones contralaterales y algunas regiones distales.

I.2. Objetivos

El objetivo general de esta parte de la tesis es evaluar la respuesta tisular de las distintas regiones del sistema nervioso central a la inoculación de la proteína recombinante humana IL-1 β (hrIL-1 β).

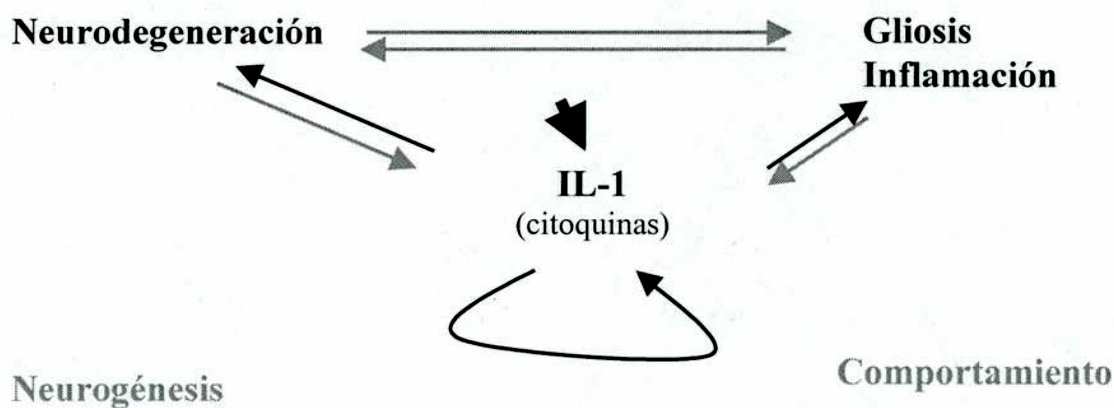


Figura I.1. Esquema de los objetivos del Capítulo I en el marco de los objetivos generales de la tesis. Realizando inyecciones estereotáxicas de la proteína IL-1 β en distintas regiones del cerebro, se evaluará la gliosis/inflamación y la expresión de IL-1 y otras citoquinas. Además se determinará si existe neurodegeneración en cada una de las regiones. Las flechas en gris indican que en el trabajo no podrá determinarse si los efectos son directos o a través de algún otro fenómeno. La cabeza de flecha indica la variable alterada en el marco de este capítulo.

I.3. Resultados

I.3.1. Sobre el hipocampo.

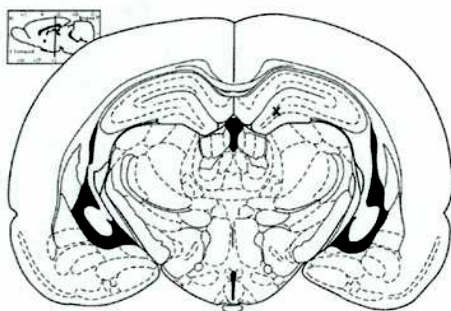


Figura I.2. Sitio de inyección en el hipocampo.
Figura del atlas de cerebro de rata (Paxinos and Watson, 1986) correspondiente al sitio de inyección en el hipocampo.

I.3.1.1. Expresión del sistema IL-1 y de TGF- β 1.

En todas las RT-PCRs semicuantitativas realizadas durante esta parte de la tesis se consideró inducción o inhibición de la expresión cuando las variaciones de las medias obtenidas fueron de al menos dos veces y resultaron significativas estadísticamente (ver Materiales y Métodos, sección 4 para los detalles de la RT-PCR semicuantitativa).

En los hipocampos inyectados con hrIL-1 β observamos una disminución en los niveles basales de ARNm para IL-1 α ($p=0,0176$, prueba t de Student no pareada; Figura I.3.A). En cambio, los niveles de ARNm para IL-1 β aumentan al día siguiente de inoculada la citoquina en el hipocampo, tanto ipsi- como contralateral a la inyección (respecto a los animales naïve, $p=0,0366$ ipsilateral y $p=0,0009$ contralateral, prueba t de Student no pareada; Figura I.3.B). Además, el IL-1ra muestra un patrón similar: si bien los niveles no difieren significativamente de los naïve, en el hipocampo ipsilateral son 2 veces mayores ($p=0,0282$, prueba t de Student no pareada) y en el contralateral son 3 veces mayores ($p=0,015$, prueba t de Student no pareada) que los de los animales inyectados con vehículo (Figura I.3.C). Finalmente, TGF- β 1 no muestra diferencias entre los tratamientos (Figura I.3.D).

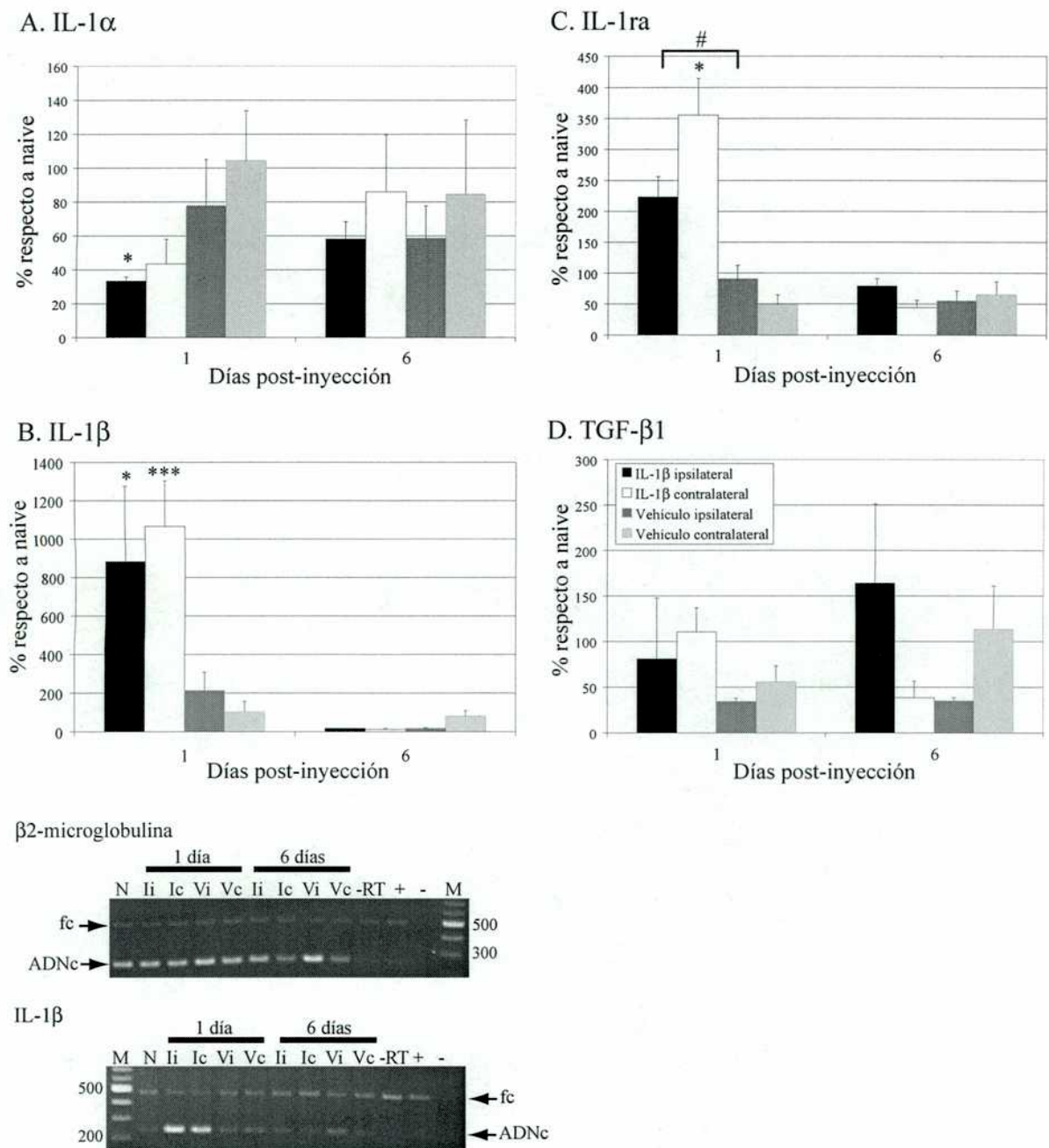


Figura I.3. Análisis de la expresión del sistema IL-1 y de TGF- β 1 en el hipocampo de animales inyectados con hrIL-1 β o vehículo en el hipocampo (RT-PCR semicuantitativa). Patrones de expresión de (A) IL-1 α , (B) IL-1 β , (C) IL-1ra y (D) TGF- β 1. Se grafica la media + error estándar de la media como porcentaje respecto a animales naive. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ en prueba t de Student no pareada, comparada con animales naive. # $p < 0,05$ en prueba t de Student no pareada, comparado con el vehículo correspondiente. Barras negras y blancas, hipocampos ipsilaterales y contralaterales a la inyección de hrIL-1 β . Barras grises oscuras y claras, hipocampos ipsilaterales y contralaterales a la inyección de vehículo. En (B) se muestran dos geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando una RT-PCR representativa para IL-1 β y β 2-microglobulina. N, naive. Li e Ic, hipocampo ipsilateral y contralateral a la inyección de hrIL-1 β . Vi y Vc, hipocampo ipsilateral y contralateral a la inyección de vehículo. -RT, control sin transcriptasa reversa. + y -, controles positivo y negativo. M, marcador de peso molecular. fc, fragmento de competición.

I.3.1.2. Respuesta celular.

El mayor efecto observado en el hipocampo luego de la inoculación de la proteína hrIL-1 β fue una hemorragia subgranular 1 día después de la inyección, rodeada de núcleos apoptóticos (Figura I.4.A y A'). La inyección con IL-1 β en el giro dentado conlleva la condensación de la cromatina de las neuronas granulares del hipocampo, la cual es una característica de la apoptosis. En cambio en el giro dentado de los animales inyectados con vehículo la cromatina de las neuronas granulares se mantiene relajada. Por otro lado, también observamos pérdida de inmunofluorescencia para NeuN en el giro dentado cercano a la hemorragia (Figura I.4.B). Esto sugiere fuertemente que los núcleos apoptóticos pertenecen mayoritariamente a neuronas granulares, las cuales mueren debido a la inyección de hrIL-1 β . Además, en los hipocampos inyectados con hrIL-1 β a los 6 días se confirma la pérdida de células granulares del giro dentado tanto en secciones teñidas con violeta de cresilo (Figura I.4.C y C') como luego de inmunofluorescencia contra el marcador neuronal NeuN (Figura I.4.D). Ni la hemorragia ni la pérdida de neuronas granulares fueron observados luego de la inoculación de vehículo, aún cuando la lesión traumática causada por la aguja de la Hamilton todavía era evidente a los 6 días (Figura I.4.E). Es de notar que se observó una similar pérdida de neuronas granulares cuando la IL-1 β fue inyectada utilizando un capilar ultrafino, lo cual sugiere que la pérdida no se debe a la lesión traumática causada por la aguja de la jeringa Hamilton.

Para controlar que la hemorragia y subsiguiente neurodegeneración no se deben a la inyección de grandes cantidades de proteína *per se*, inyectamos la misma hrIL-1 β pero desnaturalizada por calor. En estos animales observamos una respuesta similar a aquella de los hipocampos inyectados con vehículo, con una pérdida de las neuronas granulares ubicadas directamente en el tracto de inyección pero sin hemorragia subgranular ni signos de la neurodegeneración extendida observada con la proteína nativa (Figura I.4.F).

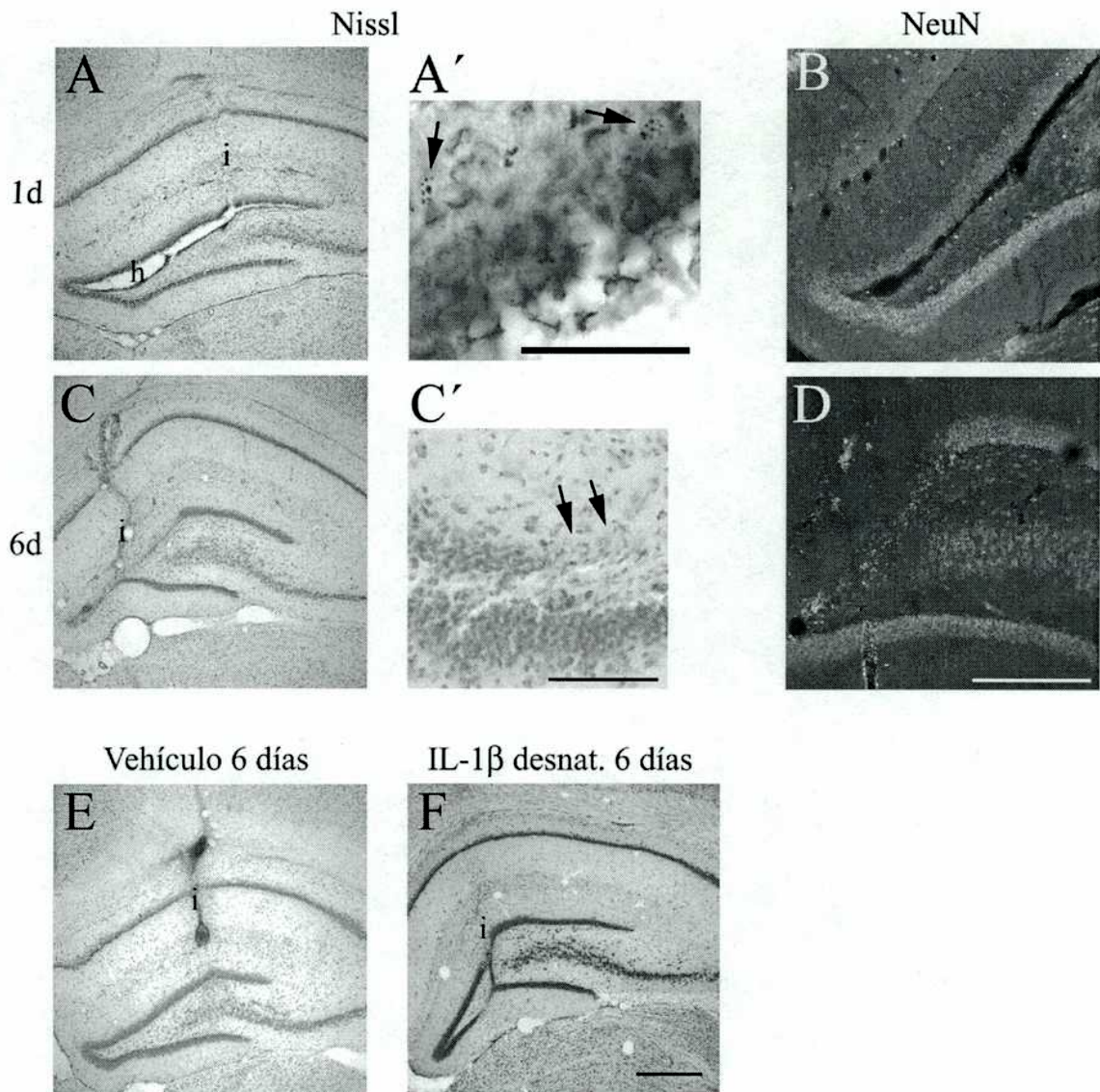


Figura 1.4. Estudio de la integridad neuronal en hipocampos inyectados. (A) Tinción de Nissl de hipocampo inyectado con hrIL-1 β 1 día antes, mostrando una importante hemorragia subgranular y núcleos apoptóticos en el giro dentado (flechas en A'). (B) En la inmunofluorescencia anti-NeuN se observa una pérdida parcial de inmunoreactividad en las neuronas granulares cercanas a la hemorragia. (C y D) A 6 días se evidencia la pérdida de neuronas del giro dentado, no sólo en el tracto de inyección sino también lateralmente a éste (ver C', flechas). A este tiempo no se observa neurodegeneración en animales inyectados con vehículo (E) o con proteína desnaturalizada (F). i, inyección; h, hemorragia. Barras de escala: A-F, 500 μ m; A', 20 μ m; C', 100 μ m.

Por otro lado, nos preguntamos si podríamos obtener el mismo efecto expresando la proteína IL-1 β de forma crónica mediante un vector adenoviral (AdIL-1 β). A los 15 días después de la inoculación (tiempo de máxima expresión del vector cuando es inyectado en el estriado según lo determinado por ELISA [Ferrari et al., manuscrito en preparación]), observamos una extendida inflamación con reclutamiento de neutrófilos, pero las neuronas no se ven afectadas (Figura I.5.).

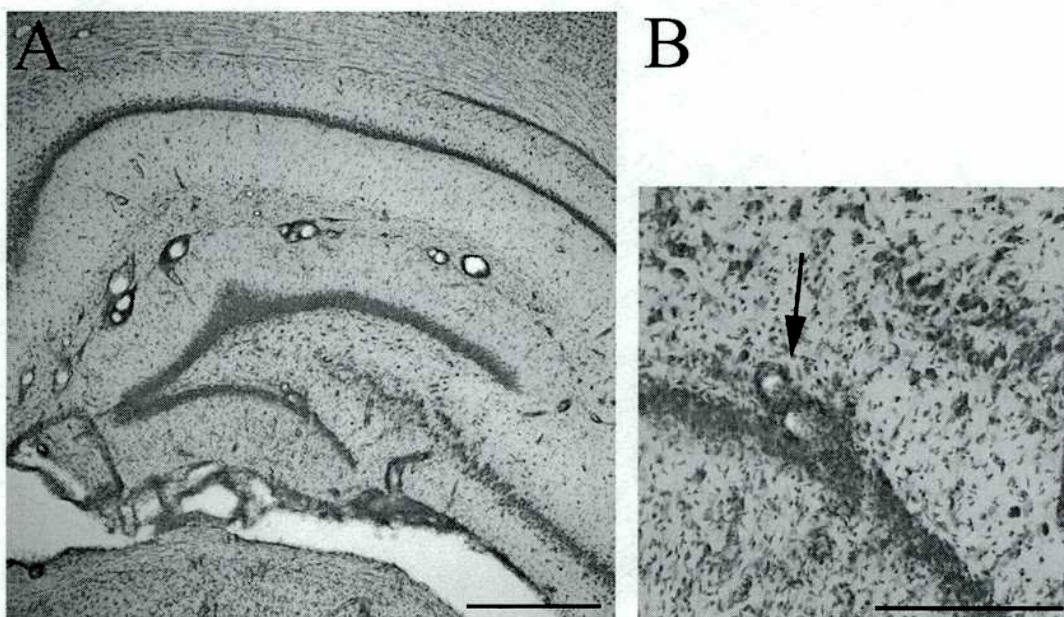


Figura I.5. Tinción de Nissl de hipocampos inyectados con el AdIL-1 β . 15 días después de la inyección de 10^7 unidades formadoras de placa (pfu), se observa una importante inflamación en todo el hipocampo la cual no es acompañada por pérdida de neuronas. (B) Se observa el reclutamiento perivascular de neutrófilos (flecha). Barras de escala: A, 500 μ m; B, 200 μ m.

En los cortes analizados luego de la tinción con violeta de cresilo no fue posible observar alteraciones en las neuronas piramidales del hipocampo. Sin embargo, el análisis de cortes semifinos mostró que las neuronas piramidales de la región CA1 que están ubicadas en el tracto de inyección presentan signos de degeneración (Figura I.6.A y B). Esas mismas células se tiñeron con Fluoro-jade B, que tiñe neuronas en degeneración (ver Materiales y Métodos, sección 7.5.; Figura I.6.C).

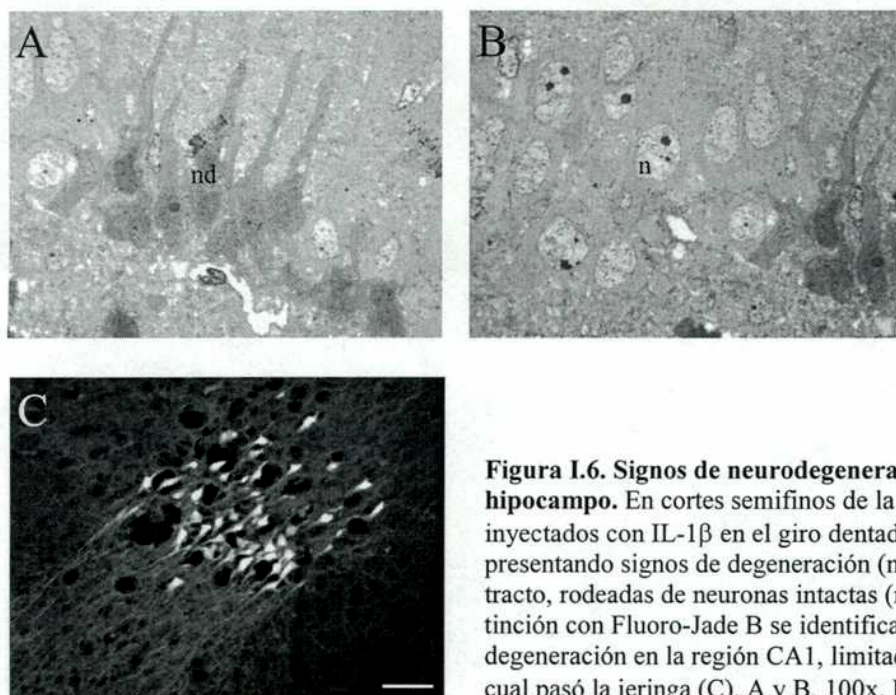


Figura I.6. Signos de neurodegeneración en la región CA1 del hipocampo. En cortes semifinos de la región CA1 de animales inyectados con IL-1 β en el giro dentado observamos neuronas presentando signos de degeneración (nd, en A), pero sólo en el tracto, rodeadas de neuronas intactas (n, en B). Mediante la tinción con Fluoro-Jade B se identificaron neuronas en degeneración en la región CA1, limitadas a la zona a través de la cual pasó la jeringa (C). A y B, 100x. Barra de escala en C, 40 μ m.

El análisis de la respuesta tisular a la administración aguda de IL-1 β mostró un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por neutrófilos. La distribución de neutrófilos en los hipocampos analizados siguió el patrón de inducción del ARNm para IL-1 β : un día después de la inyección se observaron neutrófilos tanto en el hipocampo ipsilateral como en el contralateral (Figura I.7.A-D). En los animales inyectados con vehículo, los neutrófilos se encuentran distribuidos a lo largo del tracto de inyección (Figura I.7.E). Además, no se observaron neutrófilos en los hipocampos analizados 6 días después de las cirugías.

Por otro lado, un día después de la inyección de IL-1 β se observaron pocas células positivas para la lectina GSA1-B4 (marcador de microglia, Figura I.8.A) mientras que numerosas células macrofágicas (positivas para ED1) son detectadas a lo largo del tracto de inyección, en la hemorragia y dispersas por todo el hipocampo inyectado (Figura I.8.B). En cambio, a los 6 días sólo se observan células macrofágicas en la capa granular degenerada, representadas por la morfología redonda de células positivas para la lectina (Figura I.8.D) y por su inmunoreactividad anti-ED1 (Figura I.8.E). En los animales inyectados con vehículo, se observaron células macrofágicas a lo largo del tracto de inyección a los dos tiempos analizados (Figura I.8.C y F).

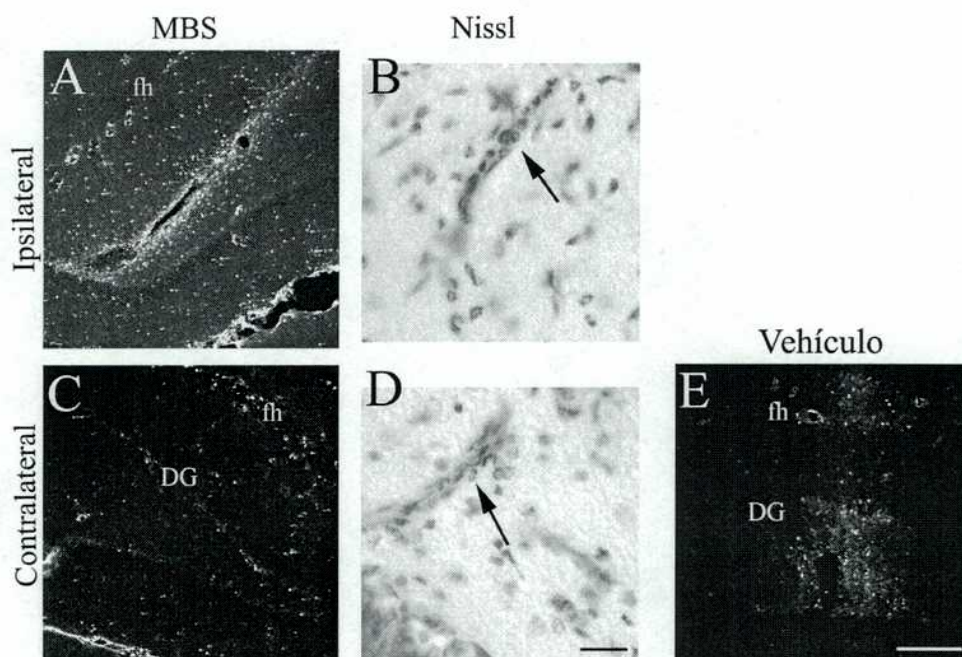


Figura 1.7. Distribución de neutrófilos en hipocampus inyectados. Un día después de la inoculación con hrIL-1 β se observan neutrófilos tanto en el hipocampo inyectado (A y B) como en el contralateral (C y D). Mediante inmunofluorescencia con MBS2 se identifican neutrófilos en toda la formación hipocampal (A y C), los cuales se ven perivasculares mediante la tinción de Nissl (flechas en B y D). En cambio en el hipocampo inyectado con vehículo los neutrófilos se ubican a lo largo del tracto de inyección (E). Barras de escala: A, C y E, 200 μ m; B y D, 20 μ m. DG, capa granular del giro dentado; fh, fisura hipocampal.

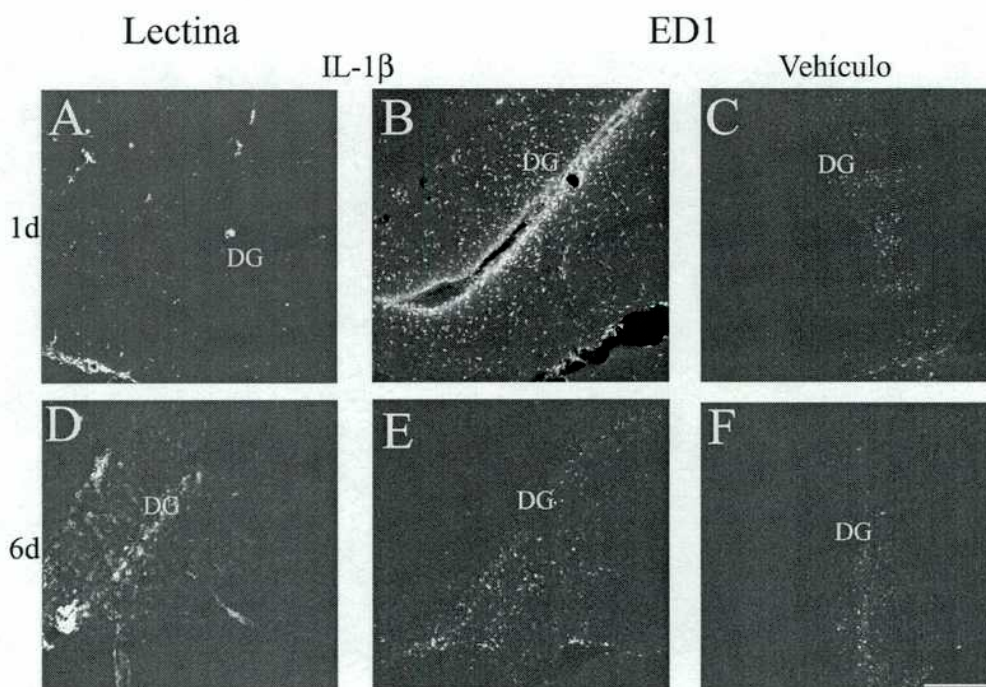


Figura 1.8. Distribución de células macrofágicas en los hipocampus inyectados. 1 día después de la inyección de hrIL-1 β se observaron pocas células positivas para GSA1-B4 (A), mientras que las células ED1-positivas se distribuyen alrededor de la hemorragia y en todo el hipocampo tratado (B). En cambio, en los hipocampus inyectados con vehículo sólo se observan células ED1-positivas a lo largo del tracto de inyección (C). A los 6 días se observan células positivas para lectina (D) y células ED1-positivas (E) en donde previamente se ubicaban las neuronas granulares. Otra vez, en los hipocampus inyectados con vehículo sólo se observan células ED1-positivas a lo largo del tracto de inyección (F). Barra de escala: 200 μ m. DG, capa granular del giro dentado.

Se detectaron astrocitos en los hipocampos, independientemente del tratamiento. Sin embargo, en las regiones inyectadas con hrIL-1 β los mismos adquirieron una morfología activada y una tinción intensa para los filamentos astrocíticos (GFAP), indicando la actividad hipertrófica de la astroglia (Figura I.9.A y C) cuando se compara con animales inyectados con vehículo (Figura I.9.B y D). Cabe mencionar también, que los hipocampos contralaterales a la inyección de la IL-1 β muestran morfología activada 6 días después de la cirugía (Figura I.9.E), mientras que los de los inyectados con vehículo no (Figura I.9.F).

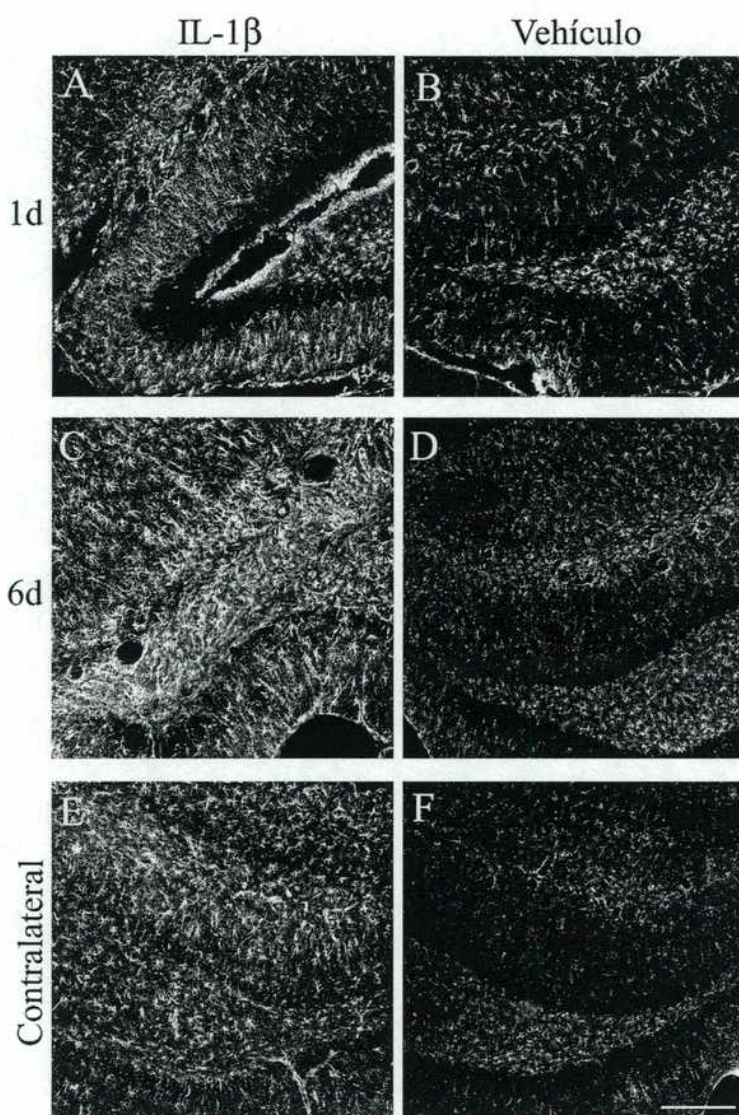


Figura I.9. Distribución de astrocitos en hipocampos inyectados y contralaterales. En los giros dentados inyectados con hrIL-1 β se observa activación de la astroglia a 1 (A) y 6 días (C), así como en el contralateral a 6 días (E), evidenciada como células GFAP-positivas con morfología activada. En cambio en los animales inyectados con vehículo la mayoría de los astrocitos se encuentran en reposo, tanto a 1 (B) como a 6 días (D), y no se observa activación contralateral (F). Barra de escala: 200 μ m.

I.3.2. Sobre la *substantia nigra*.

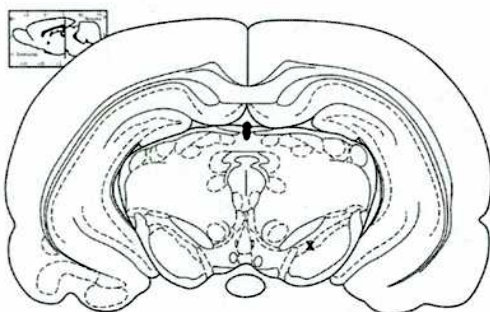


Figura I.10. Sitio de inyección en la *substantia nigra*. Figura del atlas de cerebro de rata (Paxinos and Watson, 1986) correspondiente al sitio de inyección en la *substantia nigra*.

I.3.2.1. Expresión del sistema IL-1 y de TGF- β 1.

Luego de la inyección de 10ng de hrIL-1 β en la *substantia nigra*, no observamos un comportamiento diferente del ARNm que codifica para IL-1 α del observado cuando inyectamos vehículo (Figura I.11.A). En cambio, la IL-1 β y el IL-1ra son inducidos a las 24 hs de inyectada la citoquina (cuando se comparan con los animales naïve, IL-1 β $p=0,0345$ e IL-1ra $p=0,0172$, prueba t de Student no pareada), recuperando los niveles basales a los 6 días (Figuras I.11.B y C). Finalmente, TGF- β 1 fue inducido en los animales inyectados con IL-1 β aunque este aumento no alcanzó significancia estadística (más de 9 veces respecto a los animales naïve, $p=0,0646$, prueba t de Student no pareada; Figura I.11.D).

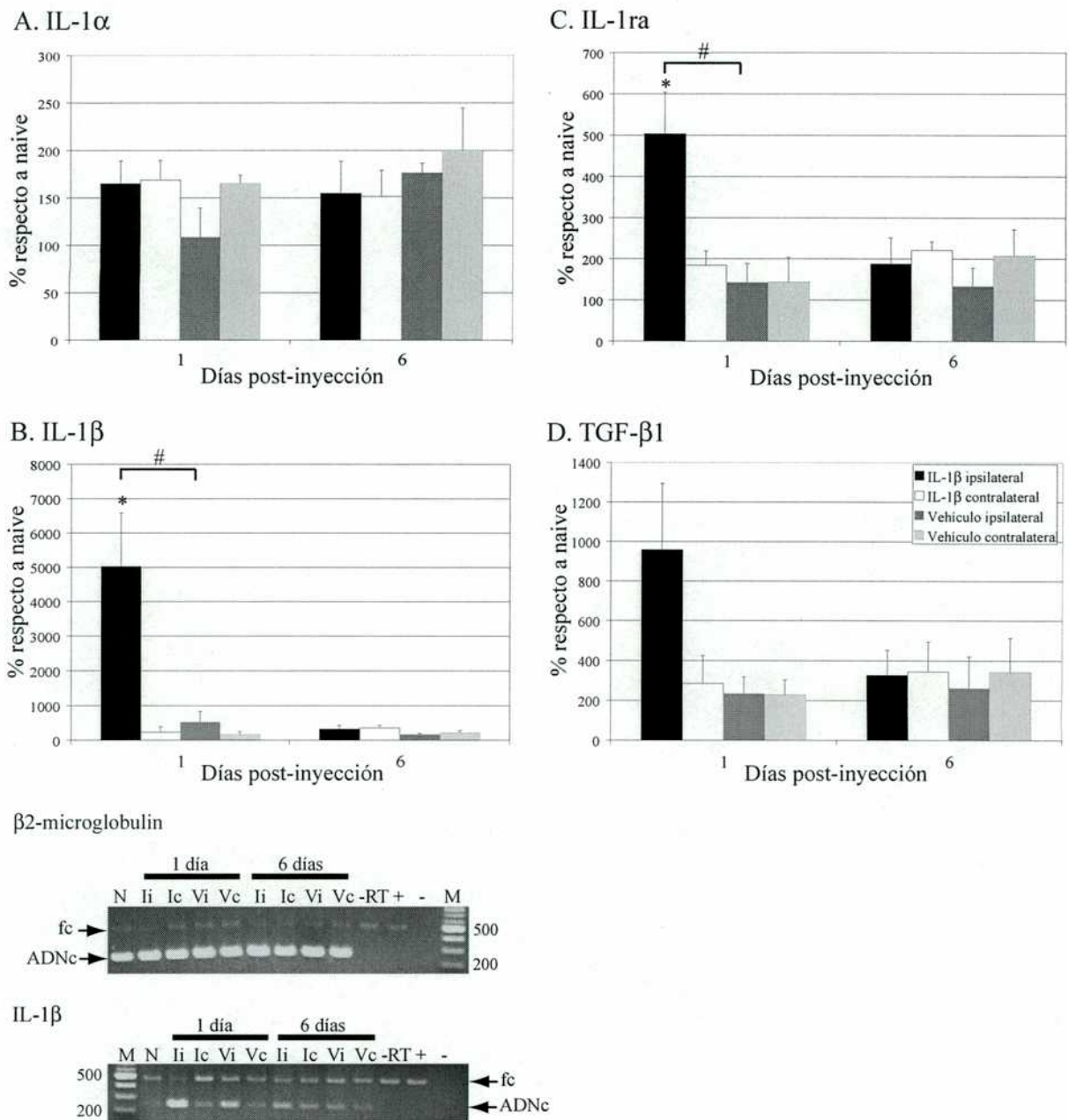


Figura I.11. Análisis de la expresión del sistema IL-1 y de TGF- β 1 en la *substantia nigra* de animales inyectados con hrIL-1 β o vehículo en la *substantia nigra* (RT-PCR semicuantitativa). Patrones de expresión de (A) IL-1 α , (B) IL-1 β , (C) IL-1ra y (D) TGF- β 1. Se grafica la media + error estándar de la media como porcentaje respecto a animales naïve. * $p < 0,05$, en prueba t de Student no pareada, respecto a animales naïve. # $p < 0,05$, en prueba t de Student no pareada, comparada con el vehículo correspondiente. Barras negras y blancas, *substantia nigra* ipsilaterales y contralaterales a la inyección de hrIL-1 β . Barras grises oscuras y claras, *substantia nigra* ipsilaterales y contralaterales a la inyección de vehículo. En (B) se muestran dos geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando una RT-PCR representativa para IL-1 β y β 2-microglobulina. N, naïve. Ii e Ic, *substantia nigra* ipsilateral y contralateral a la inyección de hrIL-1 β . Vi y Vc, *substantia nigra* ipsilateral y contralateral a la inyección de vehículo. -RT, control sin transcriptasa reversa. + y -, controles positivo y negativo. M, marcador de peso molecular. fc, fragmento de competición.

I.3.2.2. Respuesta celular.

La distribución de neutrófilos siguió la de la inducción de ARNm para IL-1 β : un día después de la inyección estaban presentes en el mesencéfalo y en la hemorragia de la inyección con hrIL-1 β (Figura I.12.A y B), pero no en los inyectados con vehículo (Figura I.12.C). A 6 días no se observaron neutrófilos en el mesencéfalo, independientemente del tratamiento (Figura I.12.D).

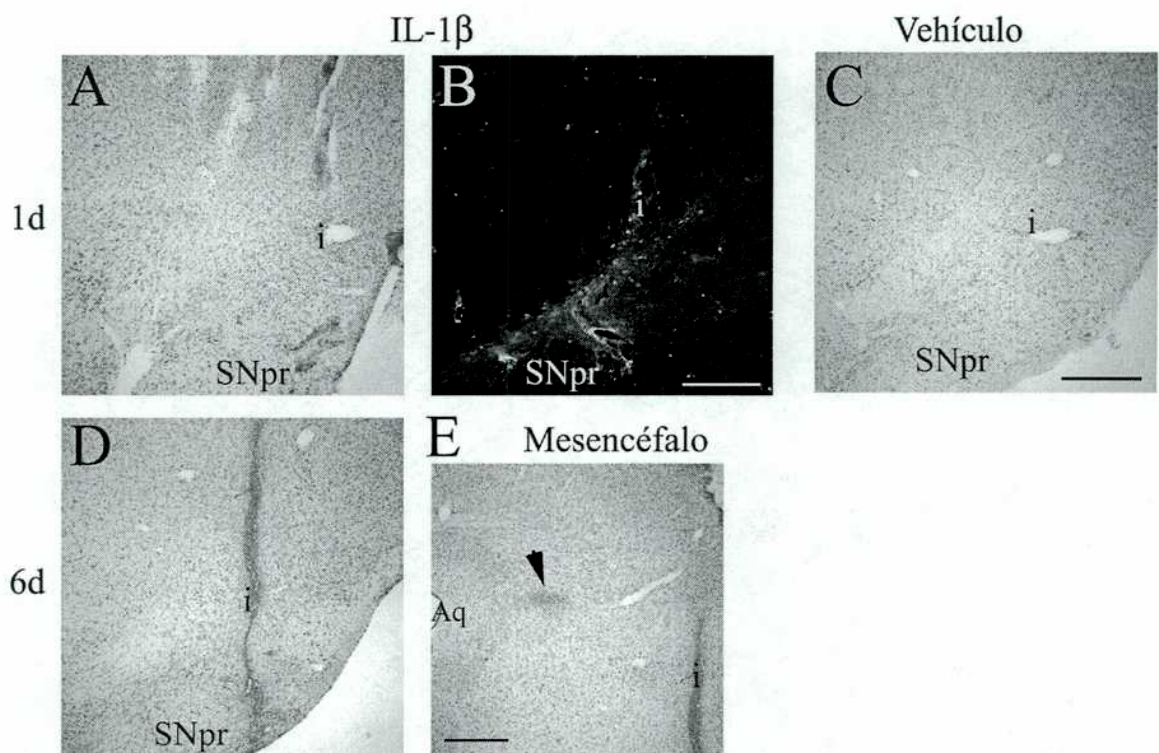


Figura I.12. Tinción de Nissl y detección de neutrófilos en las *substantia nigra* inyectadas. Tinciones de Nissl de *substantia nigra* inyectadas. Un día después de la inyección de hrIL-1 β se observa hemorragia en el tracto de inyección (A) y mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo MBS se detectaron neutrófilos en la hemorragia y distribuidos en la SNpc (B). En los animales inyectados con vehículo no se observa hemorragia ni neutrófilos (C). 6 días después de la inyección de hrIL-1 β se puede visualizar el tracto de inyección mediante la tinción de Nissl por la alta densidad de células en el mismo (D). En el mesencéfalo ipsilateral, lateralmente al tracto, se observó un cúmulo de células (flecha) (E). i, inyección; SNpr, *substantia nigra pars reticulata* (la SNpc se encuentra por encima de esta región). Barras de escala: B, 200 μ m; A, C, D y E, 500 μ m.

Se detectaron células positivas para ED1 a lo largo del tracto de inyección a ambos tiempos e independientemente del tratamiento (Figura I.13.A-C). Sin embargo, 6 días después de la inyección de la hrIL-1 β se observó un cúmulo de células lateral al tracto de inyección (Figura I.12.E), las cuales resultaron positivas para los marcadores de células macrofágicas

ED1 (Figura I.13.D) y lectina (Figura I.14.E). Cúmulos similares se observaron en la *substantia nigra pars reticulata* (SNpr) (Figura I.14.C), cercanos a la pía madre.

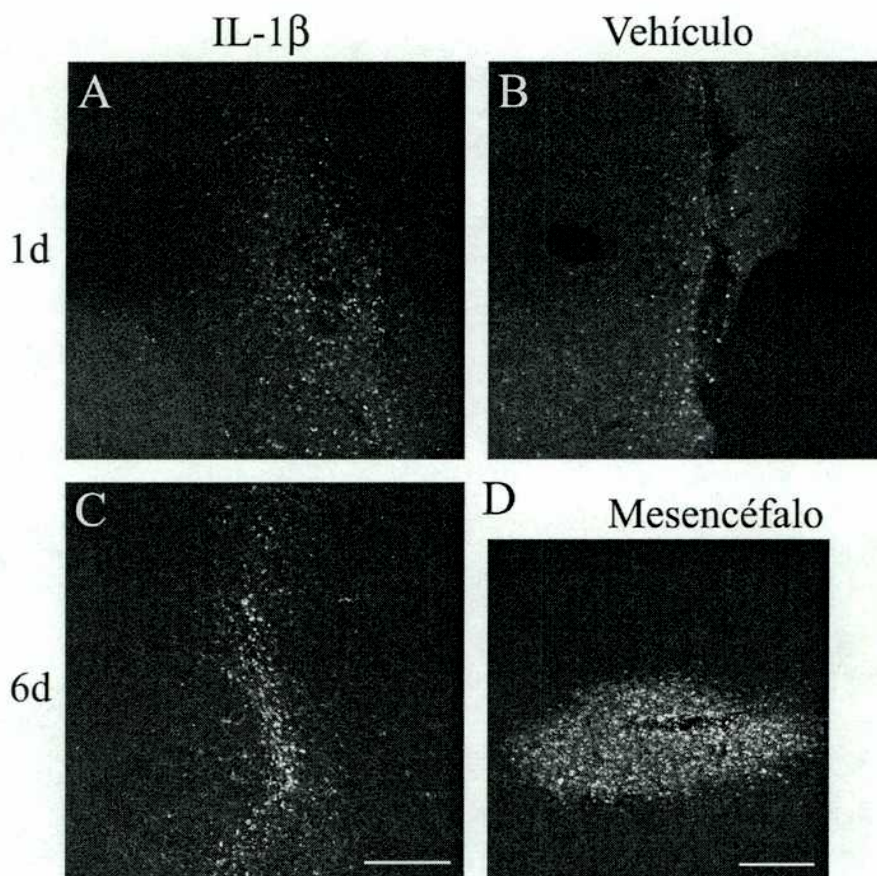


Figura I.13. Distribución de células macrofágicas en los mesencéfalos inyectados. (A y B) Al día siguiente de la inyección las células ED1-positivas se encuentran distribuidas a lo largo del tracto, independientemente del tratamiento. (C) A los 6 días muestran la misma distribución, aunque algo más circunscripta al tracto de inyección. (D) En el cúmulo observado en la tinción de Nissl (Figura I.19.E) se observan células ED1-positivas. Barra de escala: 200µm.

No se observaron diferencias en la activación de astrocitos o de microglia entre los tratamientos. Sin embargo, 6 días después de la inyección de IL-1 β se observaron astrocitos activos rodeando los cúmulos de células macrofágicas (Figura I.14. D y F).

El daño tisular en la SNpc fue evidente a lo largo del tracto de inyección, donde se observa la falta de inmunoreactividad para la enzima tirosina hidroxilasa (TH) (Figura I.15.A y C). Sin embargo, no se evidenció daño en el resto de la SNpc ni pérdida de terminales positivos para TH en el estriado, independientemente del tratamiento (Figura I.15.).

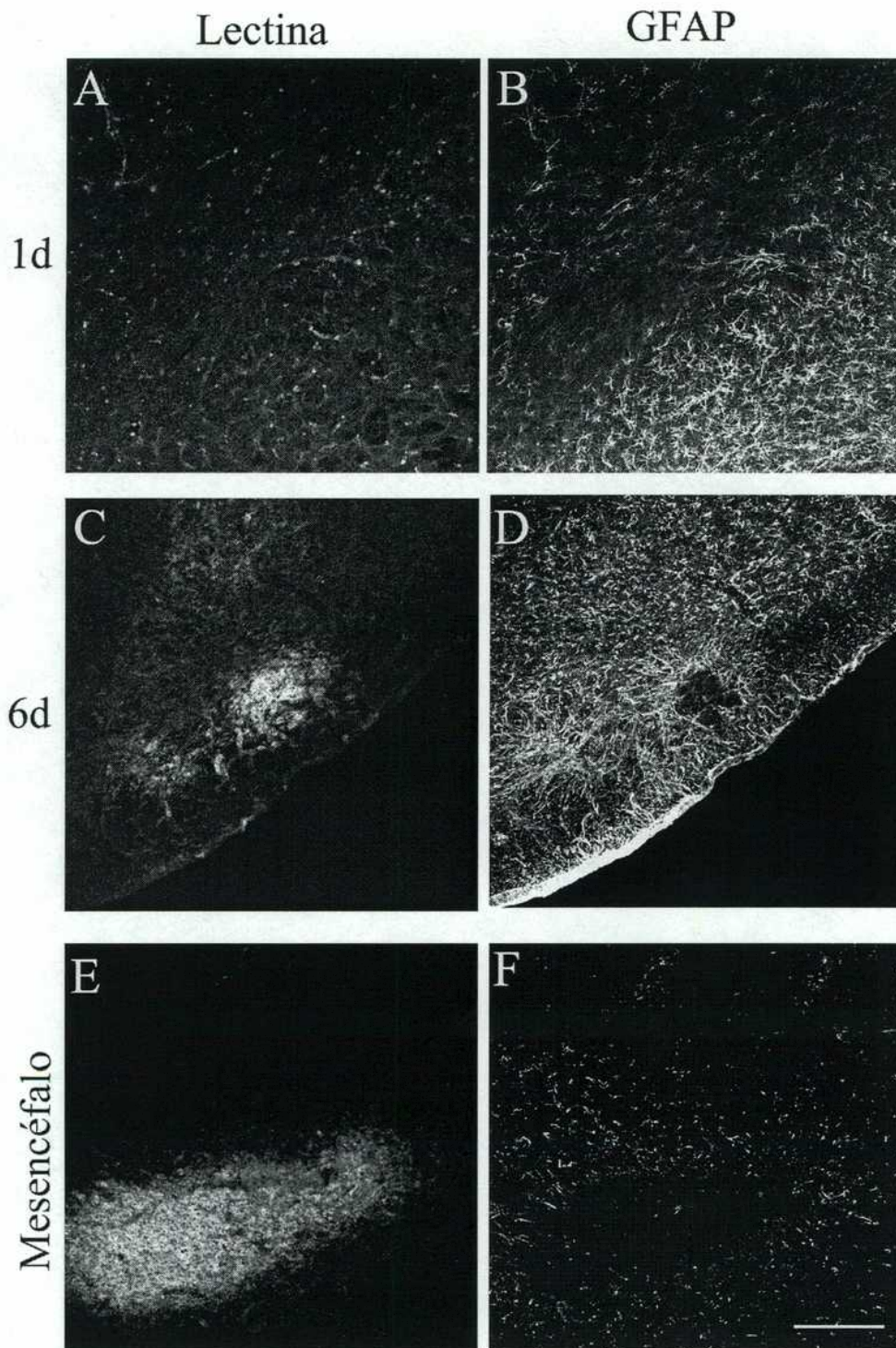


Figura I.14. Distribución de la células gliales en los mesencéfalos inyectados con hrIL-1 β . Un día después de la inyección se observan células microgliales marcadas con la lectina GSA1-B4 tanto en la SNpr como en la SNpc (A) y astrocitos que reaccionan con el anticuerpo anti-GFAP sin una marcada morfología de activación en la SNpr (B). A los 6 días se observan cúmulos de células positivas para la lectina tanto en la SNpr (C) como en el mesencéfalo (E), los cuales están rodeados por astrocitos activados (D y F). Excepto por la presencia de cúmulos de células, que sólo se evidenció en los animales inyectados con hrIL-1 β , no se observaron diferencias entre ellos y los controles. Barra de escala: 200 μ m.

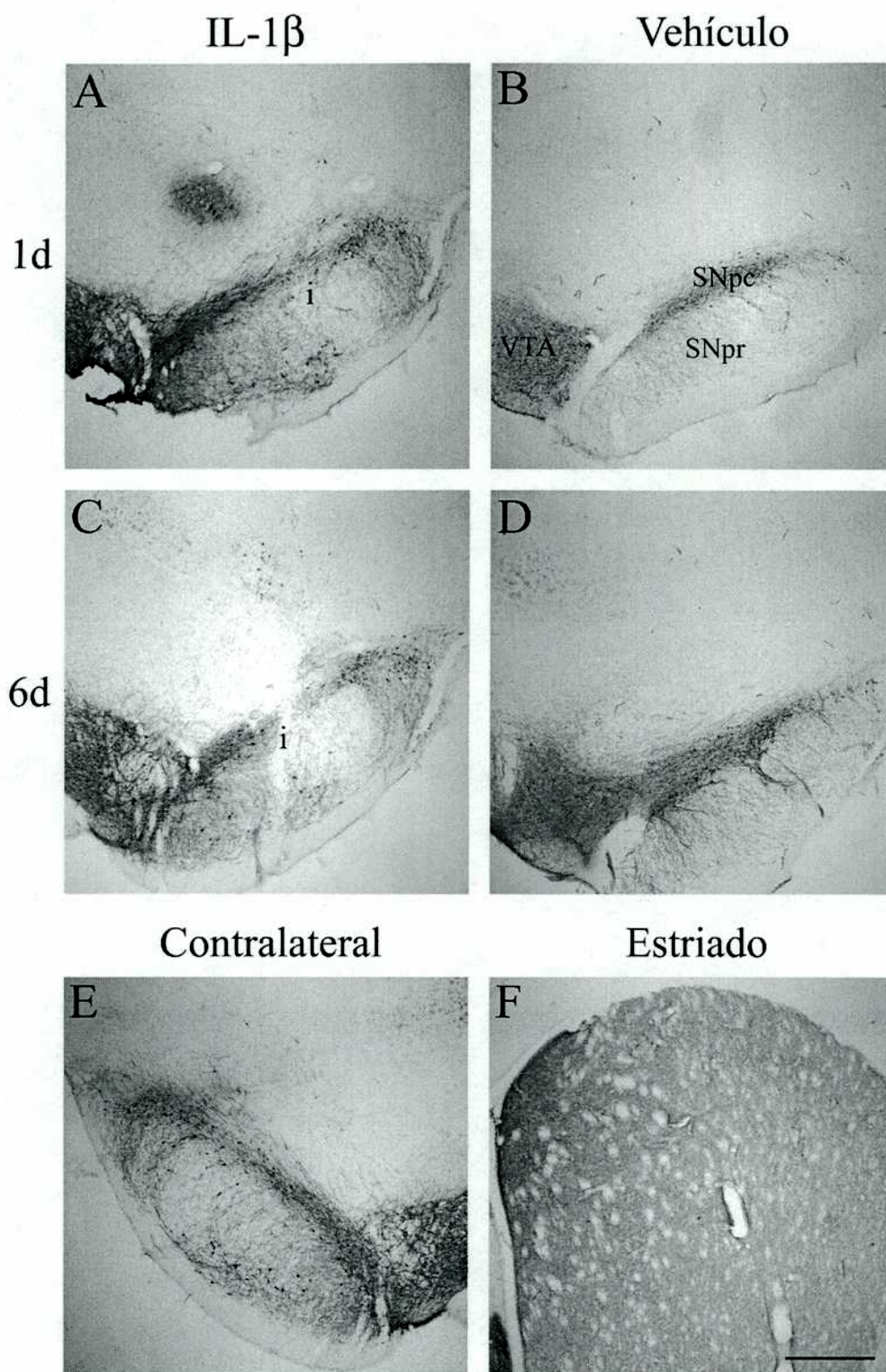


Figura I.15. Estudio de la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en la SNpc inyectada.

Se observa pérdida de TH en la SNpc inyectada con hrIL-1β tanto a 1 (A) como a 6 días (C), limitada al tracto de inyección. Mientras que las SNpc inyectadas con vehículo no presentan alteraciones (B y D). 6 días después de la inyección de IL-1β no se observa pérdida de TH en la SNpc contralateral (E) ni en el estriado ipsilateral (F). i, inyección; SNpr, *substantia nigra pars reticulata*; SNpc, *substantia nigra pars compacta*; VTA, área tegmental ventral. Barra de escala: 500μm.

I.3.3. Sobre el estriado.

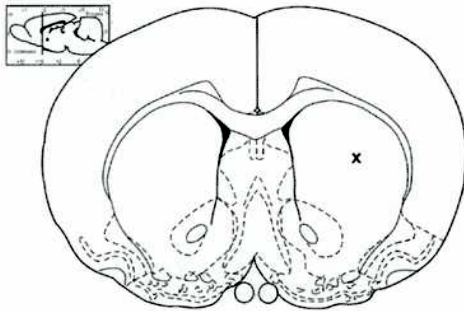


Figura I.16. Sitio de inyección en el estriado. Figura del atlas de cerebro de rata (Paxinos and Watson, 1986) correspondiente al sitio de inyección en el estriado.

I.3.3.1. Expresión del sistema IL-1 y de TGF- β 1.

La expresión de IL-1 α no es alterada en el estriado independientemente del tratamiento (Figura I.17.A). Sin embargo, observamos la inducción de IL-1 β en el hemisferio inyectado tanto con hrIL-1 β como con vehículo, pero a 6 días los niveles vuelven a valores basales (Figura I.17.B). El mismo patrón fue observado en la expresión de IL-1ra, aunque la inducción en los animales inyectados con hrIL-1 β es mayor que la de los inyectados con vehículo ($p=0,013$, prueba t de Student no pareada; Figura I.17.C). Finalmente, TGF- β 1 muestra niveles basales significativamente más altos en los animales naïve que en los inyectados con vehículo ($p=0,0128$, prueba t de Student no pareada; Figura I.17.D). Además, los niveles de TGF- β 1 a las 24 horas son significativamente mayores en los estriados inyectados con hrIL-1 β que en los controles ($p=0,0205$, prueba t de Student no pareada).

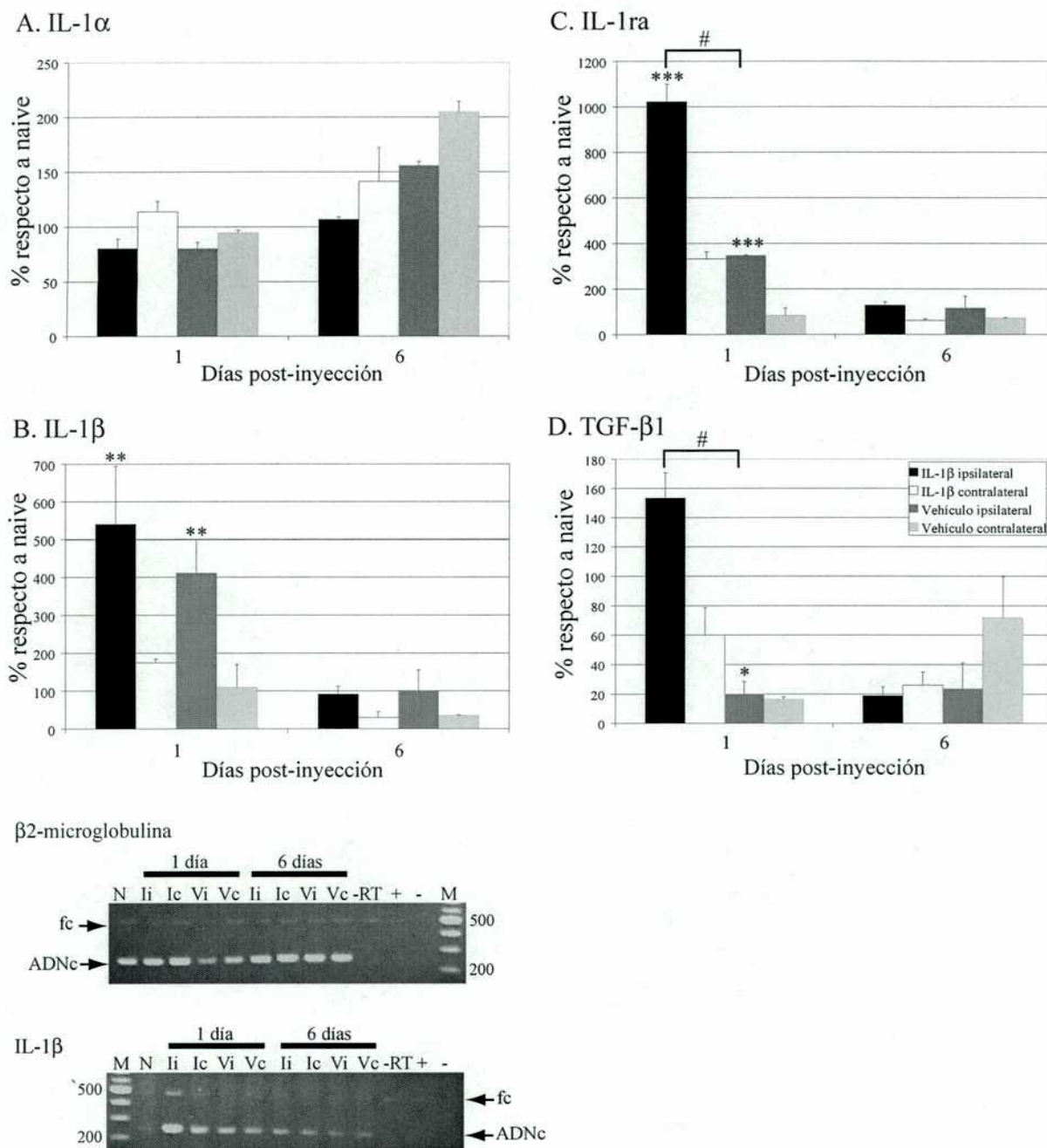


Figura I.17. Análisis de la expresión del sistema IL-1 y de TGF- β 1 en el estriado de animales inyectados con hrIL-1 β o vehículo en el estriado (RT-PCR semicuantitativa). Patrones de expresión de (A) IL-1 α , (B) IL-1 β , (C) IL-1ra y (D) TGF- β 1. Se grafica la media + error estándar de la media como porcentaje respecto a animales naive. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ en prueba t de Student no pareada, comparada con animales naive. # $p < 0,05$ en prueba t de Student no pareada, comparado con el vehículo correspondiente. Barras negras y blancas, estriados ipsilaterales y contralaterales a la inyección de hrIL-1 β . Barras grises oscuras y claras, estriados ipsilaterales y contralaterales a la inyección de vehículo. En (B) se muestran dos gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando una RT-PCR representativa para IL-1 β y β 2-microglobulina. N, naive. Li e Ic, estriado ipsilateral y contralateral a la inyección de hrIL-1 β . Vi y Vc, estriado ipsilateral y contralateral a la inyección de vehículo. -RT, control sin transcriptasa reversa. + y -, controles positivo y negativo. M, marcador de peso molecular. fc, fragmento de competición.

I.3.3.2. Respuesta celular.

La distribución de neutrófilos sigue el patrón de inducción del ARNm para IL-1 β : al día siguiente a la inyección se encuentran presentes en todo el estriado inyectado con hrIL-1 β pero también cerca del tracto de inyección en los estriados inoculados con vehículo (Figura I.18). En cambio, a 6 días no se observan neutrófilos en los estriados analizados. Curiosamente, también se observaron neutrófilos en la corteza ipsilateral 24 horas después de la inyección de hrIL-1 β en el estriado (Figura I.19.A y B). Analizamos la expresión de IL-1 β en las cortezas de los animales inyectados en los estriados y observamos una inducción de 48 veces de la citoquina 1 día después de su inyección (Figura I.19.C) Este análisis fue realizado mezclando los ADNc obtenidos de las 3 ratas correspondientes al mismo tratamiento, y realizando la PCR competitiva por triplicado. Por esta razón, el error estándar representa el error de la técnica y no es posible analizar los datos estadísticamente.

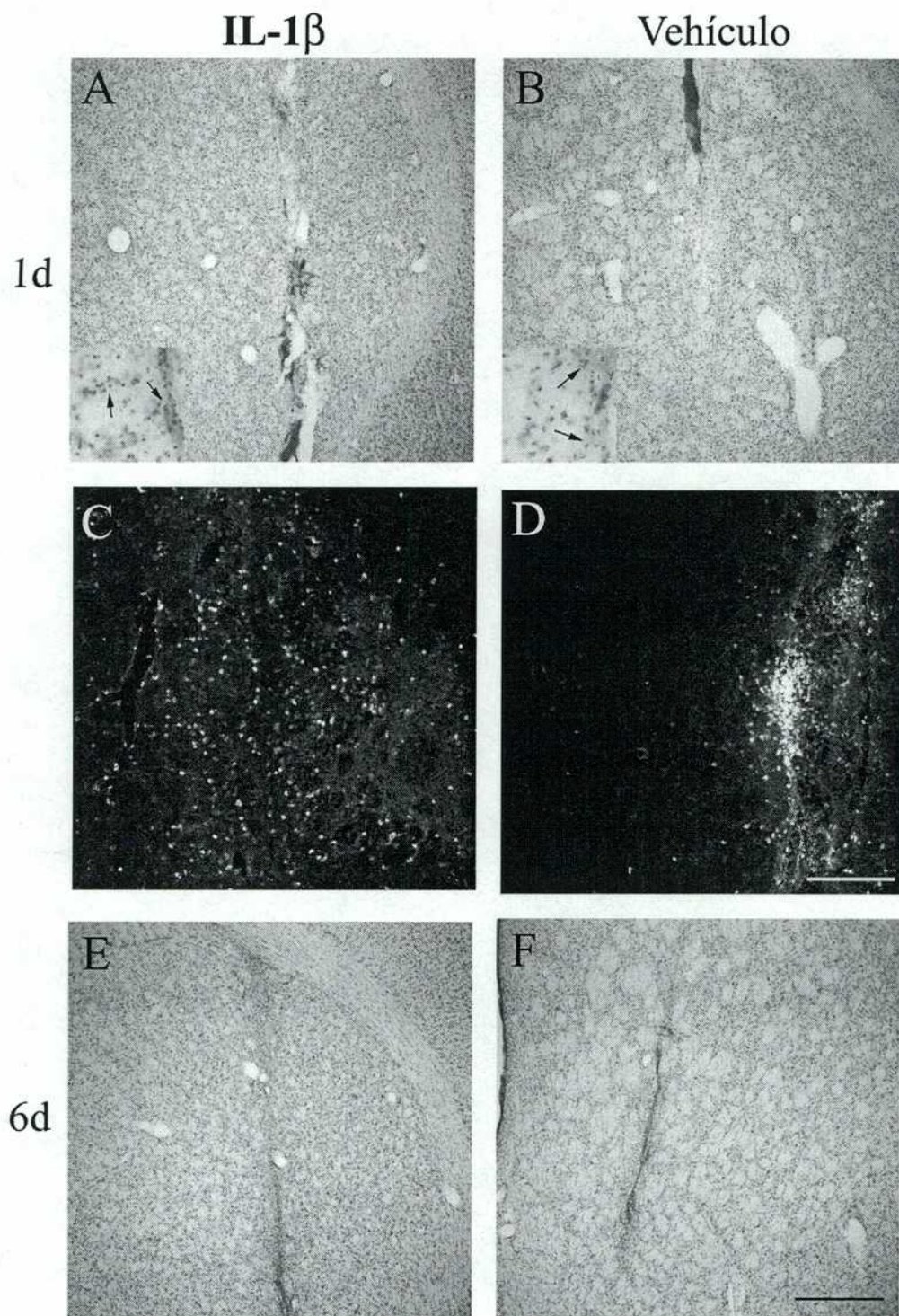
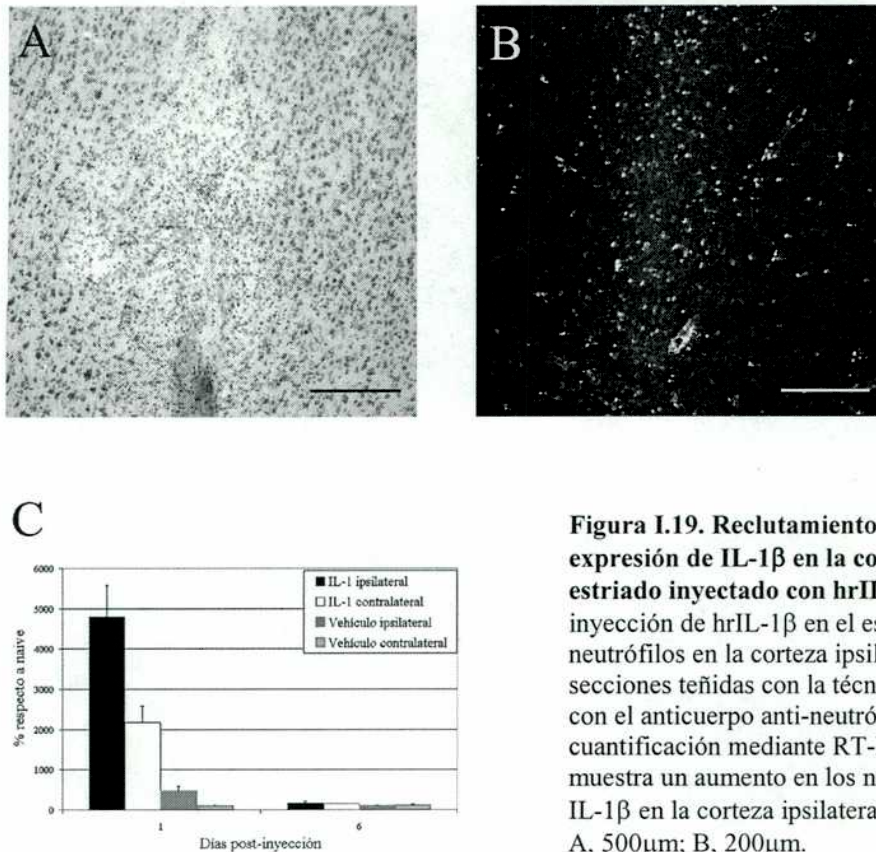


Figura I.18. Tinción de Nissl y detección de neutrófilos en los estriados inyectados. En los animales inyectados con hrIL-1 β se puede observar el reclutamiento de neutrófilos en el estriado ipsilateral tanto en secciones teñidas con la técnica de Nissl (A) como luego de inmunofluorescencia con el anticuerpo MBS2 (C). En animales inyectados con vehículo los neutrófilos están limitados al tracto de inyección (B y D). A los 6 días se observa una cicatriz a lo largo del tracto de inyección, con ausencia de neutrófilos, independientemente del tratamiento (E y F). Barra de escala: A, B, E y F, 500 μ m; C y D, 200 μ m. Magnificación en A y B: 40x.



Se observaron células ED1-positivas (células macrofágicas) a lo largo del tracto de inyección en todos los tratamientos, aunque se puede observar una distribución algo más dispersa en el parénquima de animales inyectados con la hrIL-1 β (Figura I.20.A-D). El mismo patrón es observado con la lectina específica para células microgliales (GSA1-B4), lo cual sugiere que se tratan de las mismas células (Figura I.20.E-H).

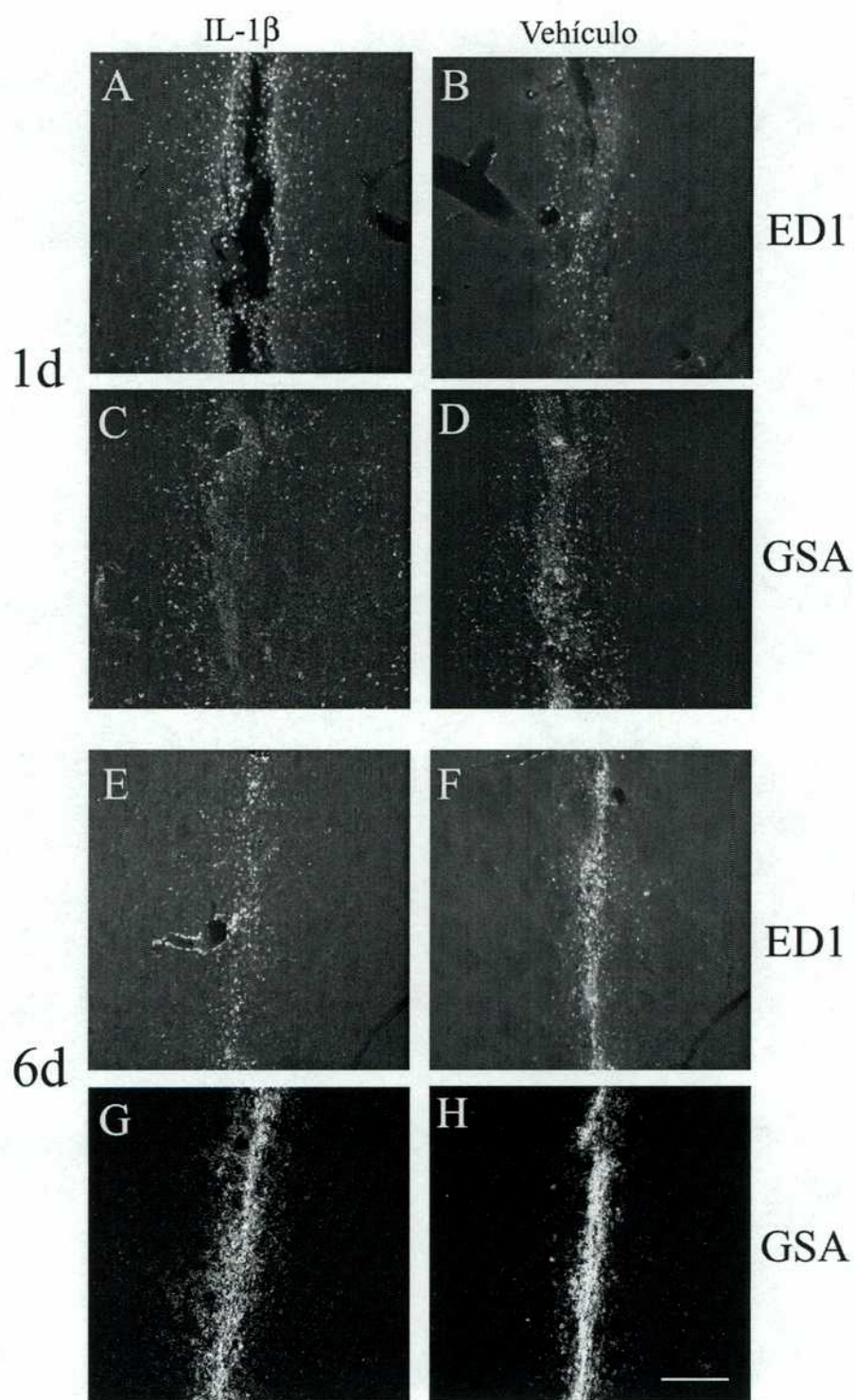
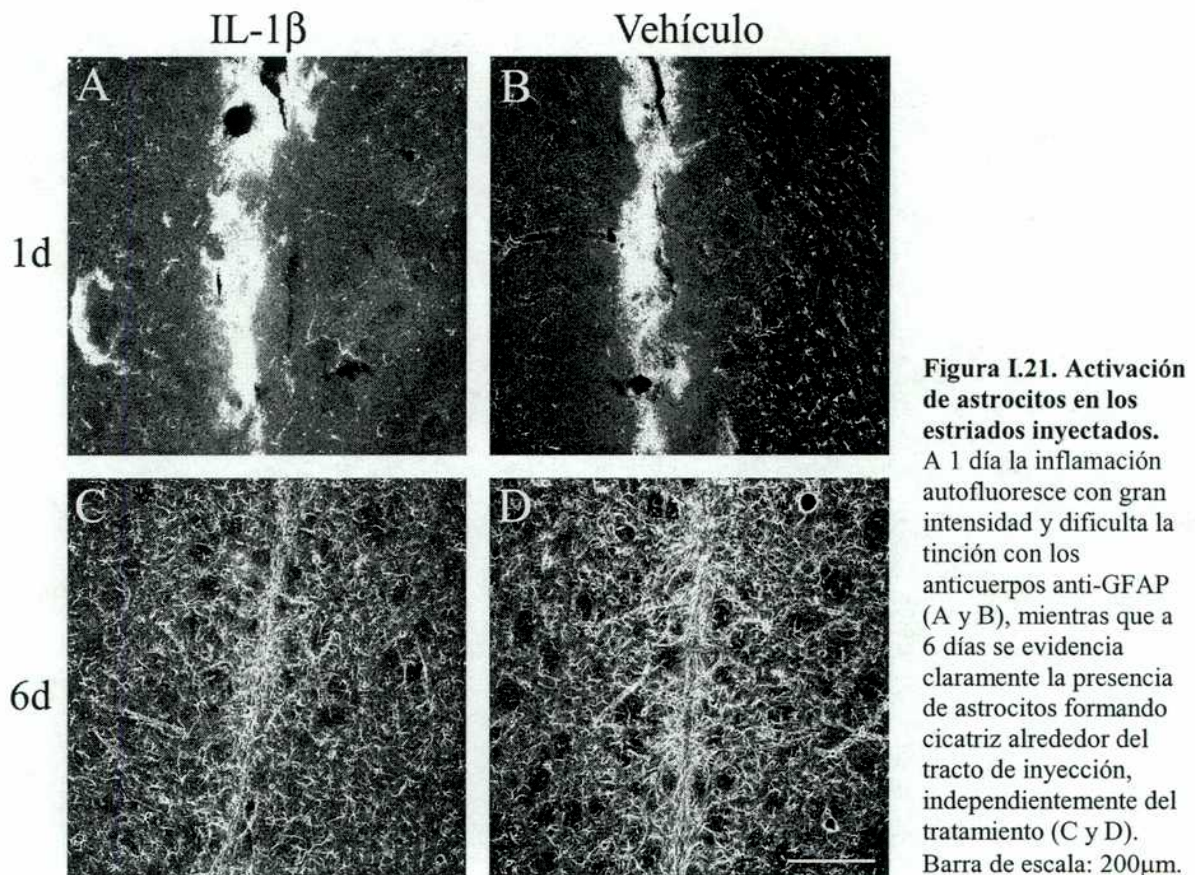


Figura I.20. Distribución de células macrofágicas en los estriados inyectados. La distribución de células ED1-positivas (macrofágicas) y lectina-positivas (microglia) es muy similar dentro de cada tratamiento, sugiriendo que se trata de las mismas células. (A-D) A un día las células macrofágicas se encuentran más dispersas alrededor del tracto de inyección, en mayor medida en los estriados inyectados con IL-1 β (A y C) pero también en los inyectados con vehículo (B y D). A los 6 días la marca es observada casi exclusivamente en el tracto, independientemente del tratamiento (E y G, hrIL-1 β ; F y H, vehículo). Barra de escala: 200 μ m.

Respecto a la activación de astrocitos, si bien la importante inflamación dificultó la tinción con los anticuerpos anti-GFAP en los animales sacrificados 1 día después de la operación, se observaron astrocitos activos en todos los tratamientos (Figura I.21.). Es más, a 6 días se observan astrocitos activados en la cicatriz del tracto de inyección de todos los animales (Figura I.21.).



Finalmente, no se observó demielinización ni pérdida de integridad de los fascículos axonales al ser analizados los tejidos con la técnica de Klüver-Barrera (Figura I.22.). Esto muestra que la respuesta inflamatoria y la presencia aguda de la hrIL-1 β no tienen ningún efecto sobre los oligodendrocitos.

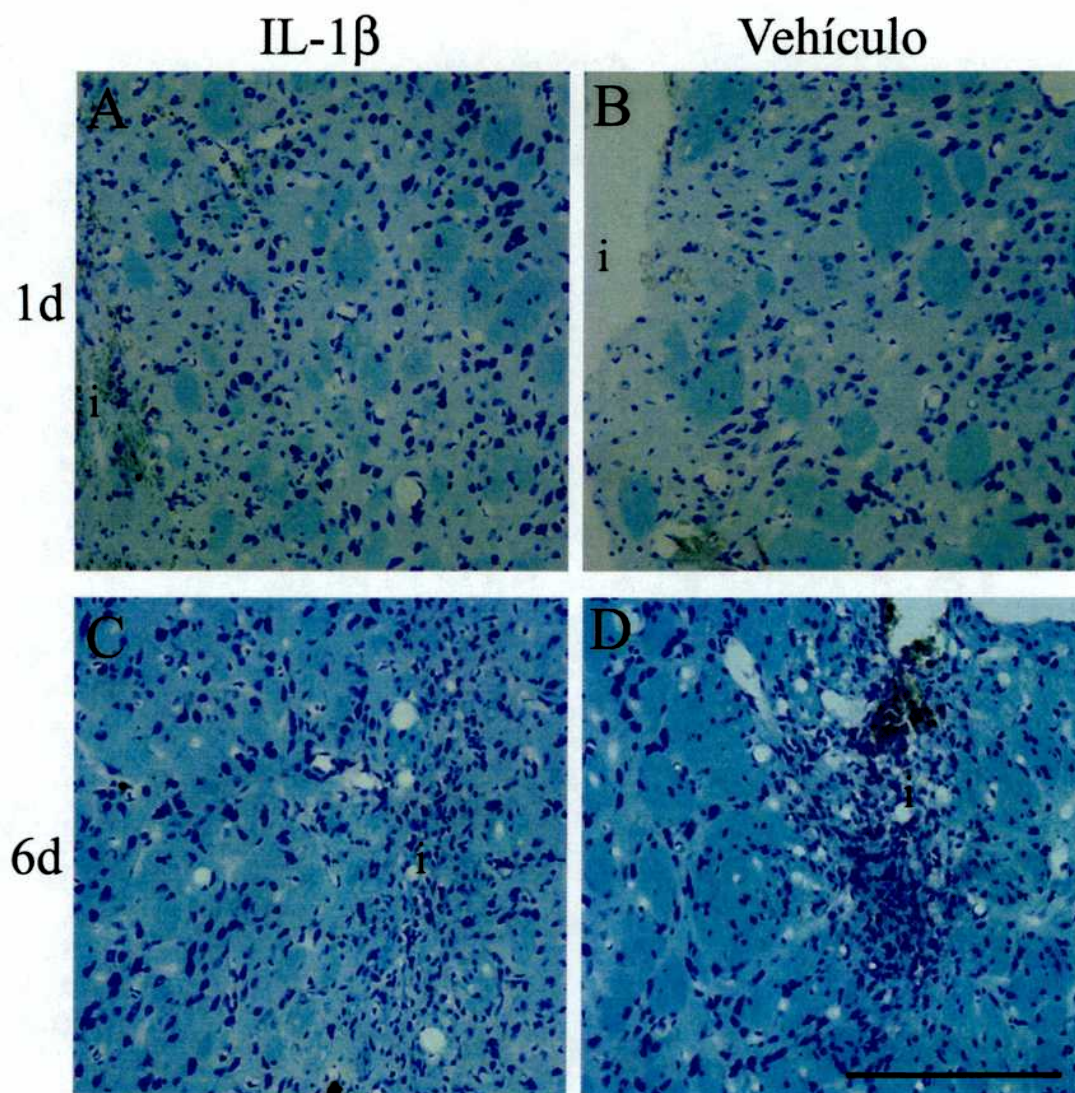


Figura I.22. Organización de los haces mielinizados en los estriados inyectados. Mediante la tinción de Klüver-Barrera no se observó pérdida de mielina en los estriados inyectados con hrIL-1 β (A y C) ni en los inyectados con vehículo (B y D). i, tracto de inyección. Barra de escala: 200 μ m.

I.3.4. Sobre la corteza.

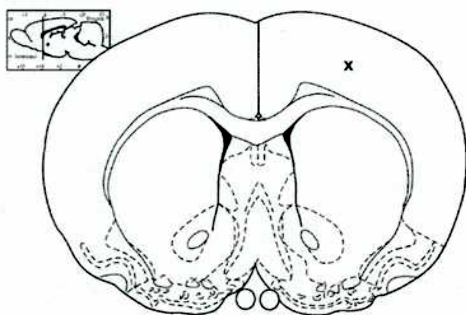


Figura I.23. Sitio de inyección en la corteza.
Figura del atlas de cerebro de rata (Paxinos and Watson, 1986) correspondiente al sitio de inyección en la corteza.

I.3.4.1. Expresión del sistema IL-1 y de TGF- β 1.

La IL-1 α tiende a aumentar en la corteza contralateral a la inyección de la hrIL-1 β , aunque no alcanza significancia estadística (Figura I.24.A). Por otro lado, la IL-1 β es inducida por la inyección de la hrIL-1 β tanto en la corteza ipsilateral como en la contralateral, aunque sólo en la ipsilateral la inducción es estadísticamente significativa ($p=0,0365$, comparado con naïve, prueba t de Student no pareada; Figura I.24.B). Los niveles de ARNm para IL-1 β son similares a los de los animales naïve en todos los demás tratamientos. Por otro lado, la expresión de IL-1ra mostró una tendencia a aumentar en ambos hemisferios 24 horas después de la inyección de la hrIL-1 β , pero la variabilidad entre los animales fue muy alta, de manera que no alcanzaron significancia estadística (Figura I.24.C). Finalmente, no se observaron alteraciones en los niveles de TGF- β 1 en las cortezas independientemente del tratamiento (Figura I.24.D). Cabe mencionar aquí que la variabilidad entre animales fue máxima en la corteza, si se compara con lo observado en las otras regiones.

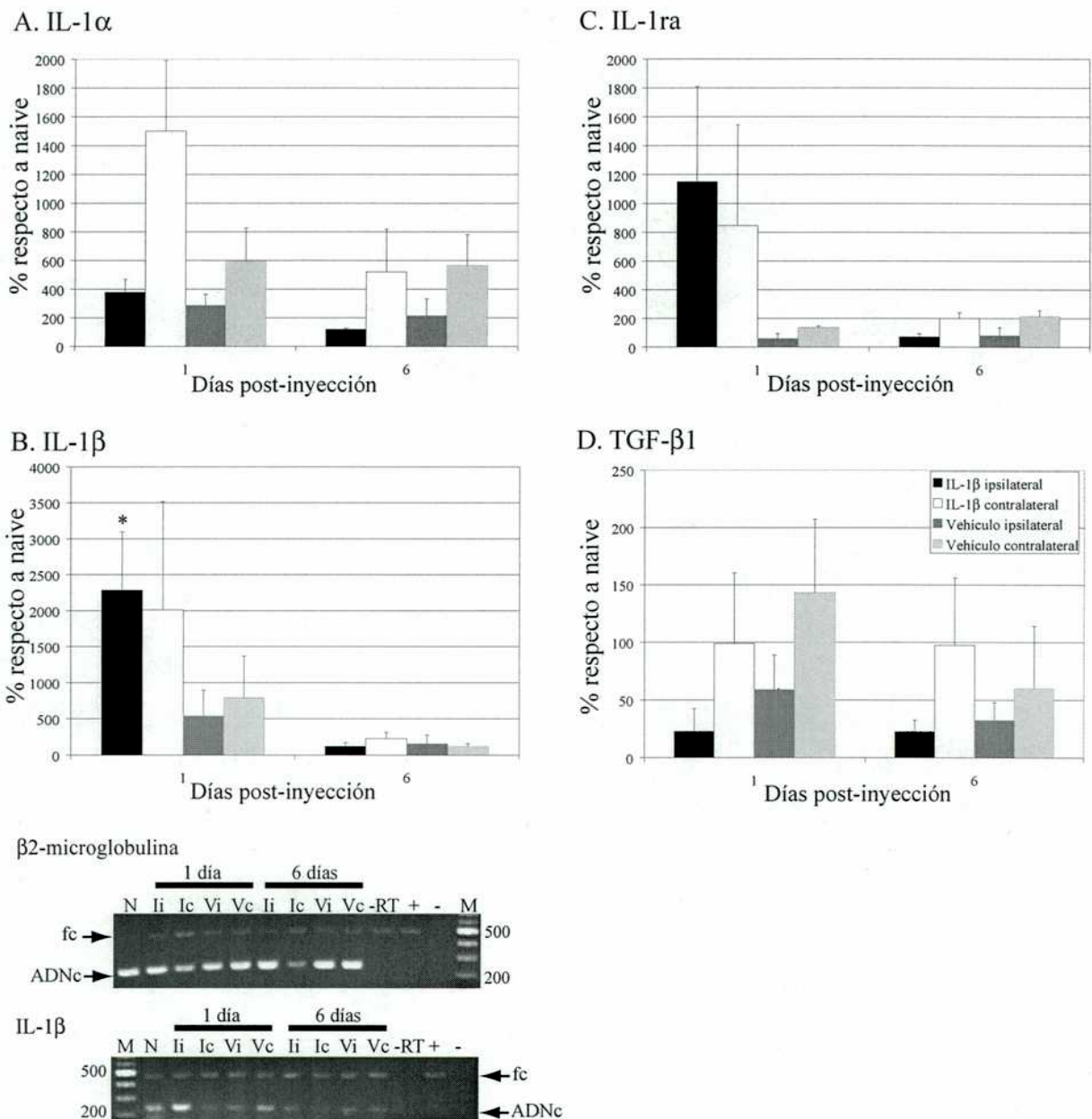


Figura I.24. Análisis de la expresión del sistema IL-1 y de TGF- β 1 en la corteza de animales inyectados con hrIL-1 β o vehículo en la corteza (RT-PCR semicuantitativa). Patrones de expresión de (A) IL-1 α , (B) IL-1 β , (C) IL-1ra y (D) TGF- β 1. Se grafica la media + error estándar de la media como porcentaje respecto a animales naive. * $p < 0,05$, en prueba t de Student no pareada, comparada con el vehículo correspondiente. Barras negras y blancas, cortezas ipsilaterales y contralaterales a la inyección de hrIL-1 β . Barras grises oscuras y claras, cortezas ipsilaterales y contralaterales a la inyección de vehículo. En (B) se muestran dos gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando una RT-PCR representativa para IL-1 β y β 2-microglobulina. N, naive. li e lc, corteza ipsilateral y contralateral a la inyección de hrIL-1 β . Vi y Vc, cortezas ipsilateral y contralateral a la inyección de vehículo. -RT, control sin transcriptasa reversa. + y -, controles positivo y negativo. M, marcador de peso molecular. fc, fragmento de competición.

Por otro lado, en un experimento independiente en el cual se inyectó 1ng de hrIL-1 β (un décimo de la dosis de los otros experimentos), la administración subcutánea de la droga anti-inflamatoria dexametasona (12 μ g en 0,3ml de solución fisiológica) inmediatamente después de la cirugía inhibió la auto-inducción de la IL-1 β (Figura I.25.), demostrando que, al igual que ocurre en la periferia, en el cerebro la citoquina regula su propia expresión por una vía inhibible por corticoides. Es de notar que 1ng de proteína induce una menor producción de ARNm para IL-1 β y que no lo induce en la corteza contralateral.

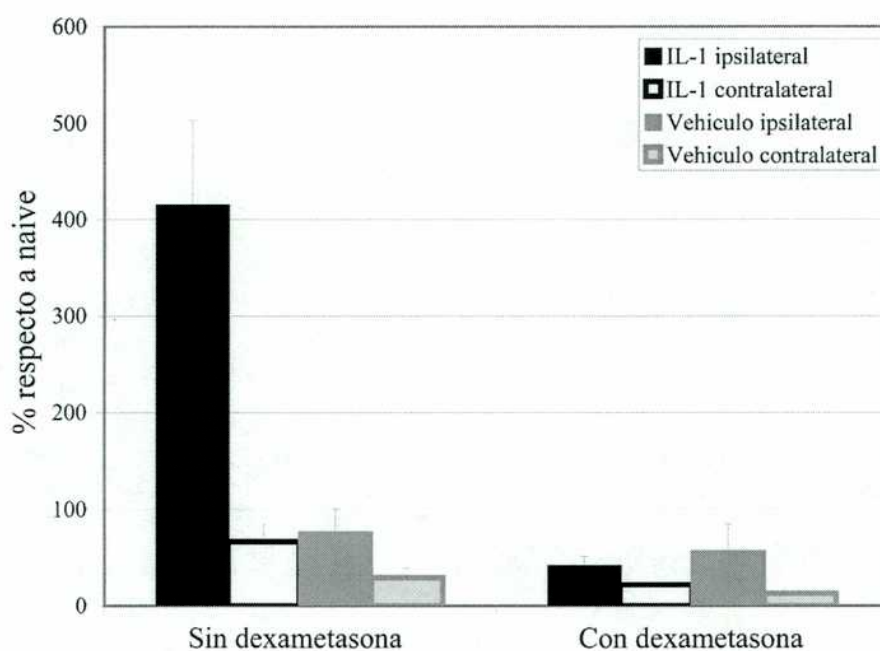


Figura I.25. Inhibición de la inducción de ARNm para IL-1 β en la corteza mediante dexametasona. El análisis mediante RT-PCR semicuantitativa mostró que la inyección de 1ng de hrIL-1 β induce la expresión del ARNm para IL-1 β en la corteza ipsilateral a las 24 hs, pero esta inducción no se evidencia cuando los animales son tratados con dexametasona inmediatamente después de la cirugía. Se grafica la media + error estándar de la media como porcentajes respecto a animales naïve.

I.3.4.2. Respuesta celular.

Al día siguiente a la cirugía, se observaron neutrófilos en la corteza inyectada con hrIL-1 β y en un animal (de tres) también se detectaron en la corteza contralateral (Figura I.26.). A los 6 días, ya no se observan neutrófilos en ningún tratamiento, mostrando de esta manera un patrón similar al de la expresión del ARNm para IL-1 β (Figura I.24.B). Curiosamente, también se detectaron neutrófilos en el estriado ipsilateral a la inyección cortical (Figura I.27.A y B) y la cuantificación del ARNm para IL-1 β en esa región mostró una inducción de 39 veces respecto a los animales naïve (Figura I.27.C). Este análisis fue realizado mezclando los ADNc obtenidos de las 3 ratas correspondientes al mismo tratamiento, y realizando la PCR competitiva por triplicado. Por esta razón, el error estándar representa el error de la técnica y no es posible analizar los datos estadísticamente.

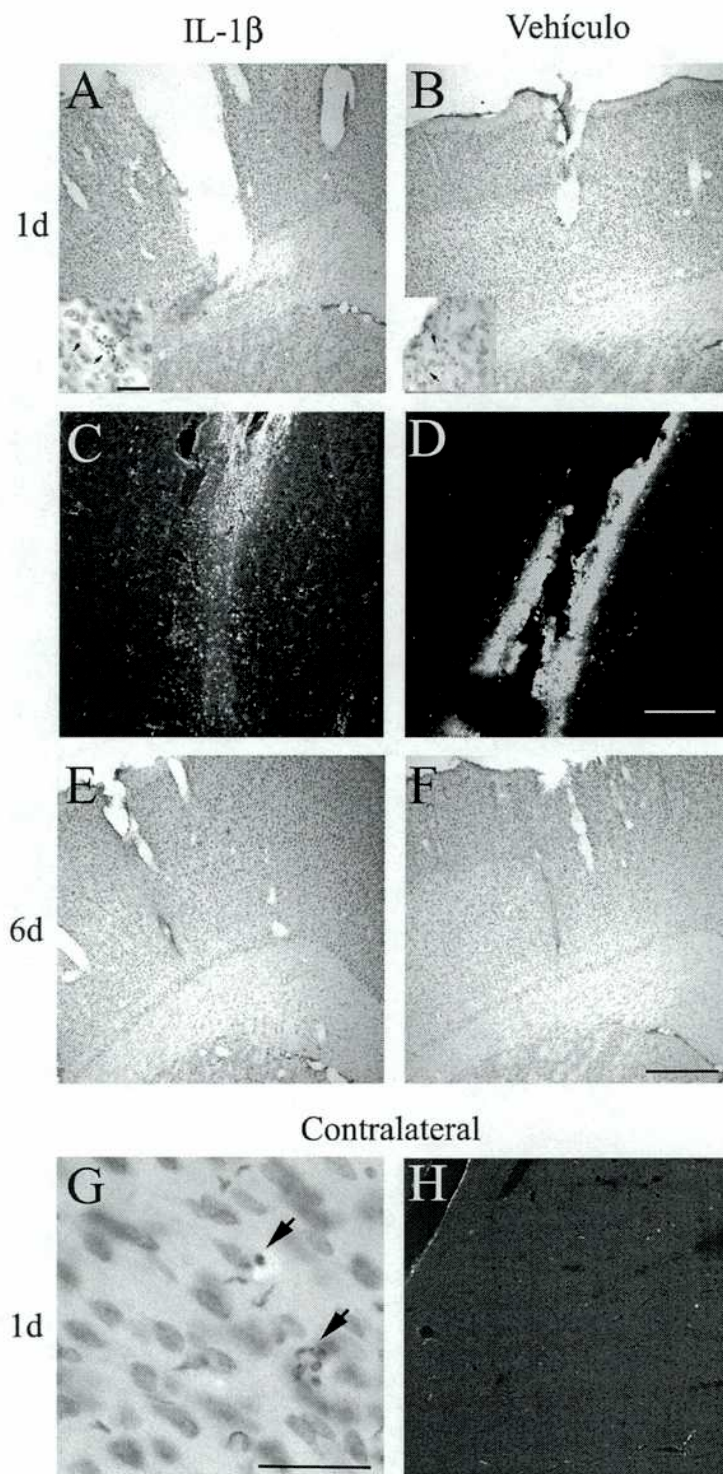


Figura I.26. Tinción de Nissl y detección de neutrófilos en las cortezas inyectadas. En los animales inyectados con hrIL-1 β se puede observar el reclutamiento de neutrófilos tanto en secciones teñidas con la técnica de Nissl (A) como luego de una inmunofluorescencia con el anticuerpo específico para polimorfonucleares MBS2 (C). En animales inyectados con vehículo, los neutrófilos están limitados al tracto de inyección (B y D). En un animal pudimos observar la presencia de neutrófilos en la corteza contralateral 1 día después de la inyección de hrIL-1 β (G y H). A los 6 días la tinción de Nissl evidencia una cicatriz a lo largo del tracto de inyección, con ausencia de neutrófilos, independientemente del tratamiento (E y F). Barras de escala: A, B, E y F, 500 μ m; C, D y H, 200 μ m; G y magnificaciones en A y B, 40 μ m.

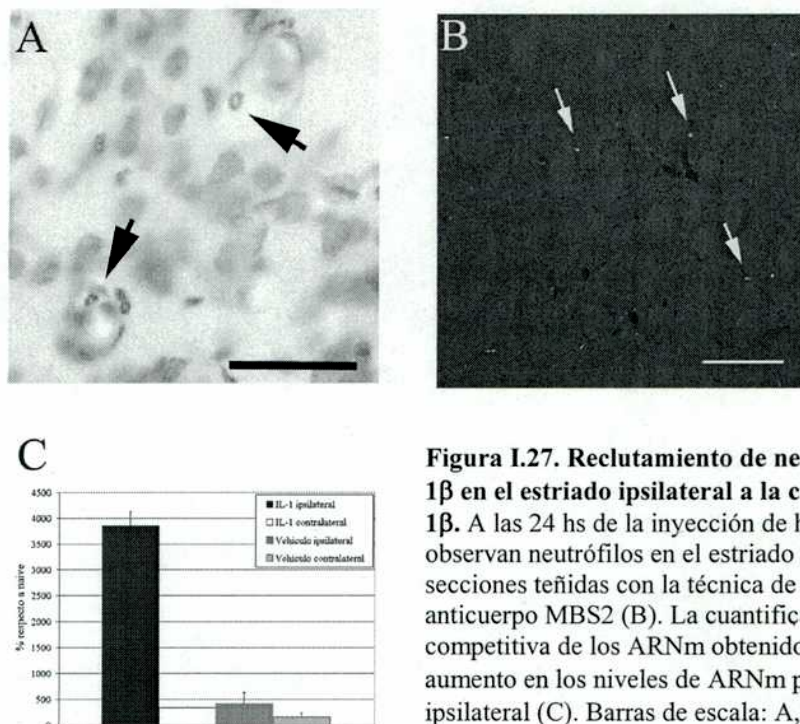


Figura I.27. Reclutamiento de neutrófilos y expresión de IL-1 β en el estriado ipsilateral a la corteza inyectada con hrIL-1 β . A las 24 hs de la inyección de hrIL-1 β en la corteza se observan neutrófilos en el estriado ipsilateral (flechas), tanto en secciones teñidas con la técnica de Nissl (A) como con el anticuerpo MBS2 (B). La cuantificación mediante RT-PCR competitiva de los ARNm obtenidos de los estriados muestra un aumento en los niveles de ARNm para IL-1 β en el estriado ipsilateral (C). Barras de escala: A, 40 μ m; B, 200 μ m.

Se detectaron células ED1-positivas a lo largo del tracto de inyección en todos los tratamientos y tiempos, pero un día después de la inyección de la hrIL-1 β también se detectaron macrófagos fuera del tracto en el parénquima ipsilateral y en los vasos (Figura I.28.).

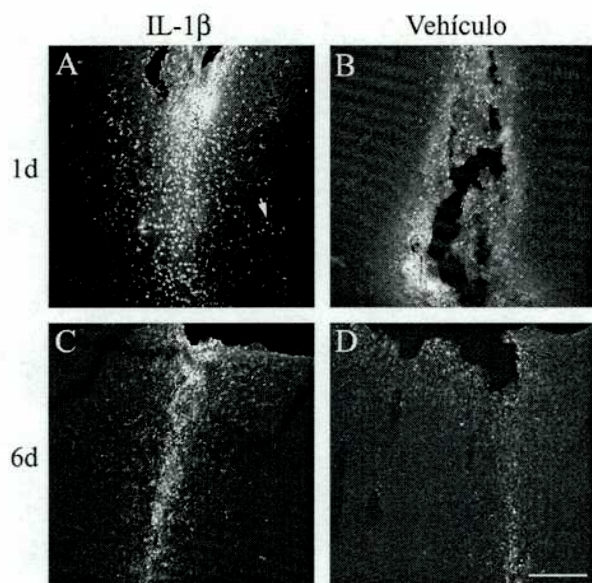


Figura I.28. Presencia de células macrofágicas en las cortezas inyectadas. Se observan células ED1-positivas en el tracto de inyección de hrIL-1 β a 1 (A) y 6 días (C) y de vehículo a ambos tiempos (B y D). En los animales inyectados con hrIL-1 β las células macrofágicas se distribuyen por fuera del tracto, algo que es más notorio a 1 día (A) pero que también se observa a 6 días (C). Barra de escala: 200 μ m.

Un día después de la inoculación de la hrIL-1 β , se observaron microglia (células positivas para la lectina GSA1-B4) no sólo en el tracto de inyección (donde mostraron una morfología fagocítica), sino también distribuidas en toda la corteza inyectada (mostrando una morfología ramificada) (Figura I.29.A, comparado con los controles en B). Sin embargo, a los 6 días, e independientemente del tratamiento, las células que unen a la lectina se encuentran circunscriptas al tracto de inyección y muestran tanto morfología redonda como ameboidea (Figura I.29.C y D).

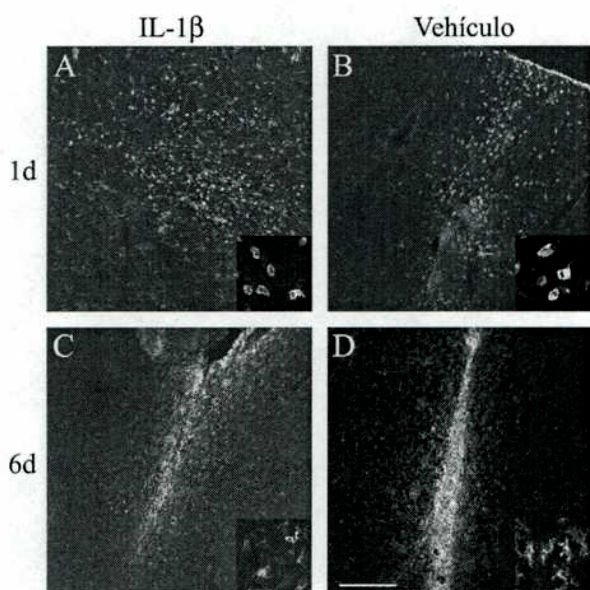


Figura I.29. Tinción con la lectina GSA1-B4 de cortezas inyectadas. (A) Distribución de células positivas por toda la corteza ipsilateral a la inyección de hrIL-1 β a las 24hs, las cuales presentan morfología fagocítica (magnificación). (B) En los animales inyectados con vehículo las células positivas para lectina se encuentran más limitadas al tracto de inyección, pero también son fagocíticas (magnificación). (C y D) A los 6 días, e independientemente del tratamiento, las células lectina-positivas se encuentran confinadas al tracto de inyección, con morfología de activación tardía pero sin llegar a ser macrofágicas (magnificaciones). Barra de escala: 200 μ m. Magnificación: 63x.

La distribución de astrocitos activos fue similar en ambos tratamientos: a las 24 hs se observaron en la corteza ipsilateral, pero a los 6 días la distribución se circunscribió a la cicatriz de la inyección (Figura I.30.).

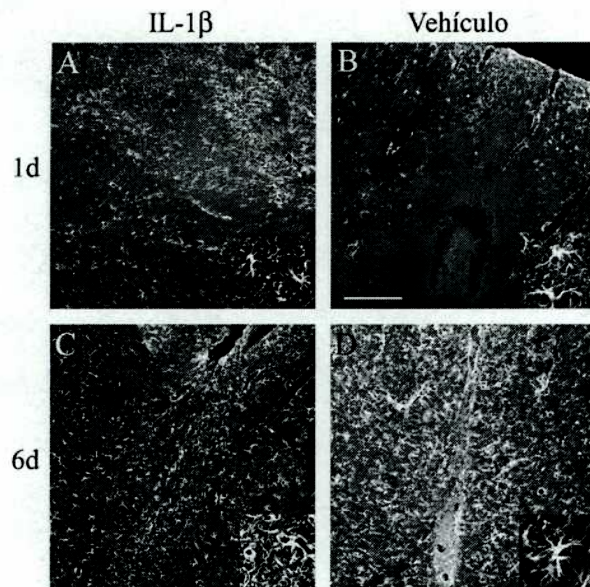


Figura I.30. Activación de astrocitos en las cortezas inyectadas. A 1 día post-inyección la inmunofluorescencia anti-GFAP se ve dificultada por la importante hemorragia (A y B), sin embargo alejados del sitio de inyección se observan astrocitos activados, independientemente del tratamiento (magnificaciones en A y B). A los 6 días los astrocitos están formando cicatriz a lo largo del tracto de inyección, independientemente del tratamiento (C y D). Barra de escala: 200µm. Magnificación: 63x.

El análisis de los tejidos teñidos con violeta de cresilo no mostró ningún efecto sobre las neuronas, más allá del gran trauma y hemorragia causados por la inyección y que parece ser algo mayor en los animales inyectados con la hrIL-1 β (Figura I.26.).

I.4. Discusión.

En esta parte de la tesis hemos comprobado que existen diferencias regionales en la respuesta tisular a la proteína IL-1 β , tanto a nivel de expresión de citoquinas y de inflamación, como en los efectos sobre la supervivencia neuronal (Tabla I.1.).

Tabla I.1. Resumen de los resultados obtenidos en el Capítulo I.

Región	IL-1 α	IL-1 β	IL-1ra	TGF- β 1	Neutrófilos	MØ	Astroцитos	Neurodeg.
Hi	↓	i, c	i, c	=	i, c, vt	+	+	+
SN		i			i	+	+/-	
Estriado		i, v, Ci, Cc		i	i, v, Ci	+	+	
Corteza	=	i, c, Sti	i, c	=	i, c, vt, Sti	+	+	-

Abreviaturas: Hi, hipocampo; SN, *substantia nigra*; MØ, células macrofágicas; sitios donde se observaron efectos: i, región inyectada con IL-1 β ; c, región contralateral a la inyección de IL-1 β ; v, región inyectada con vehículo; vt, tracto de la inyección de vehículo; Ci y Cc, cortezas ipsilateral y contralateral a la inyección de IL-1 β en el estriado; Sti, estriado ipsilateral a la inyección de IL-1 β en la corteza. =, sin diferencias entre los tratamientos; ↓, disminución ipsilateral.

I.4.1. Expresión de citoquinas luego de la inyección de IL-1 β .

En las células de la sangre, la IL-1 β induce la transcripción de IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra (revisado en Dinarello, 1996), mostrando una autorregulación importante en el control de las respuestas inflamatorias e inmunes. Aunque IL-1 β indujo su propia expresión y la del antagonista en todas las regiones analizadas, observamos una falta de inducción de IL-1 α y en el hipocampo una reducción de los niveles basales (ver Tabla I.1.). Esto muestra una regulación diferente del sistema IL-1 en el cerebro cuando se lo compara con la periferia, algo que ya se ha demostrado para la regulación recíproca entre IL-1 β y TNF α (Blond et al., 2002).

Si bien el TGF- β 1 se sugiere como un factor importante para limitar los efectos colaterales de la respuesta inmune en el cerebro (Benveniste et al., 1994; Jones et al., 1998; Suzumura et al., 1993), en este trabajo no nos fue posible asociar la regulación de TGF- β 1 con la formación de cicatriz o la activación de la microglia. Las únicas regiones que presentaron inducciones de TGF- β 1 fueron las que componen el sistema nigro-estriatal, mostrando un posible mecanismo anti-inflamatorio que no se ve en la corteza ni en el hipocampo. Como veremos en el Capítulo II, la *substantia nigra* tendría mecanismos para el

mantenimiento de un ambiente anti-inflamatorio, con los cuales la inducción de TGF- β 1 podría contribuir.

Vale la pena llamar la atención sobre el estriado como la única región en la cual la inyección de vehículo fue acompañada por la inducción de citoquinas. Esto ha de tenerse en cuenta sobre todo porque su tamaño lo ha convertido en la región elegida para probar los efectos de la administración de citoquinas en el cerebro (ver por ejemplo, Blond et al., 2002). Esta respuesta diferencial a la lesión mecánica hace del estriado una región más reactiva que el resto, algo que debe ser tenido en cuenta a la hora de extrapolar los resultados al resto del cerebro.

Por otro lado, se observaron inductores contralaterales de citoquinas en el hipocampo y en la corteza, pero no en la substantia nigra ni en el estriado. Esto no nos llama mayormente la atención, ya que se trata de regiones en las cuales las conexiones laterales pueden adivinarse. Si bien el hipocampo es una estructura bilateral, forma un todo con fuertes interconexiones, las cuales podrían llevar las señales de un hemisferio a otro. Además tiene una importante distribución de astrocitos que podrían colaborar con la comunicación lateral. Por otro lado, la corteza se encuentra inmediatamente contigua a las meninges y la pía matter. Las señales pueden transmitirse a través de estas células y alcanzar la corteza contralateral. En cambio las regiones con menos conexiones laterales (*substantia nigra* y estriado) no presentaron estos efectos.

Finalmente, nos resultó interesante la falta de inducción de citoquinas 6 días después de la cirugía, a pesar de que a ese tiempo es posible observar astrocitos activados y células macrofágicas en la región. Esto indica que la presencia de células gliales e inflamatorias no siempre está acompañada por la expresión de citoquinas. Es importante remarcar esto ya que, en general, frente a la presencia de glia activada y/o células inflamatorias se asume la expresión de citoquinas. Al menos en este caso no es así.

I.4.2. Efectos de la IL-1 β sobre la viabilidad neuronal.

El daño tisular que tiene lugar después de un trauma cerebral resulta tanto del daño mecánico como de las reacciones secundarias autodestructivas. Este daño secundario involucra a una serie de cascadas bioquímicas que contribuyen al daño tisular y a la muerte celular retardados. Como en los giros dentados inyectados con vehículo y con la hrIL-1 β desnaturalizada no observamos degeneración de las neuronas granulares y como la inyección

de la IL-1 β por medio de un capilar ultrafino llevó a la misma neurodegeneración que cuando se utilizó una aguja de jeringa Hamilton, proponemos que la neurodegeneración observada no se debe directamente al trauma. En cambio proponemos que la IL-1 β puede ser responsable de las reacciones secundarias autodestructivas que llevan a la muerte neuronal extendida.

Aunque en base a los resultados obtenidos no podemos determinar el mecanismo responsable de la muerte de las neuronas granulares del giro dentado, trabajos previos han mostrado que las neuronas del giro dentado poseen una alta densidad de receptores para IL-1 (Ban et al., 1991), sugiriendo que el efecto de la IL-1 sobre estas células puede ser directo. Sin embargo, cuando quisimos poner a prueba esta hipótesis inoculando un adenovector que expresa la hIL-1 β observamos una importante inflamación (reclutamiento de neutrófilos) 15 días después de la operación, la cual no es acompañada por la pérdida de neuronas granulares.

El análisis de la expresión de hIL-1 β por este vector adenoviral, realizado luego de su inyección en el estriado, muestra que el mismo expresa 40ng de proteína a los 15 días (Ferrari *et al.*, manuscrito en preparación). Si la cinética de expresión del transgén es similar en ambas regiones (estriado e hipocampo), a 15 días la cantidad de hIL-1 β presente en el hipocampo inyectado con AdIL-1 β es mayor que la cantidad de proteína recombinante inyectada en el modelo agudo. Esto sugiere que la sola presencia de cantidades farmacológicas de la citoquina no es suficiente para provocar la neurodegeneración, y sugiere que probablemente la cinética de esta presencia juegue un rol en los efectos neurotóxicos.

De hecho, utilizando un ensayo de ELISA observamos que la expresión de hIL-1 β por el adenovector en el estriado es gradual (2,5ng, 41,1ng, 40,6ng y 2,1ng a 2, 8, 14 y 30 días, respectivamente). En ese trabajo observamos que los neutrófilos y la glia sufren un fenómeno de taquifilaxis, ya que las mismas cantidades de IL-1 β que eran suficientes para reclutar a unos o para activar a las otras no eran efectivos luego de la expresión crónica del transgén. En esta línea, se ha observado que una isquemia corta (Wang et al., 2000) o la depresión expandida cortical (Jander et al., 2001) protegen contra la neurodegeneración causada por isquemia (que a su vez depende de la IL-1 β (Loddick et al., 1996)), y que este efecto correlaciona con la expresión baja y prolongada de IL-1 β . Así, nuestros resultados y trabajos previos sugieren que los niveles bajos y crónicos de las citoquinas pueden proteger contra los efectos dañinos de concentraciones subsecuentes mayores. En este marco, proponemos que en el caso de la inoculación del AdIL-1 β los tiempos más tempranos, cuando sólo algunas de las células transducidas están expresando la citoquinas, hacen a las neuronas resistentes a la

expresión máxima observada el día 15. En cambio, en el modelo agudo esta protección no tiene lugar. Sin embargo, se necesitarán trabajos que evalúen directamente esta hipótesis.

Resulta interesante que las neuronas granulares hayan sido sensibles a la IL-1 β . Mientras que las células piramidales de las regiones CA4, CA3 y particularmente de la CA1, son sensibles a una gran variedad de insultos, incluyendo por ejemplo la isquemia (Sugawara et al., 2002), las células granulares del giro dentado son de las más resistentes dentro de la formación hipocampal (Fiedorowicz et al., 2001). Además, la continua neurogénesis que tiene lugar en el giro dentado sugiere que esta región es capaz de recuperarse luego de la pérdida neuronal. Así, la pérdida de la capa de células granulares luego de la inoculación de 10ng de hrIL-1 β observada en este trabajo aparece como un modelo atractivo para el estudio de la neurodegeneración y regeneración en esta región, la cual todavía no ha sido analizada.

Otro estímulo pro-inflamatorio que ha mostrado una especificidad en el tipo neuronal que afecta es el lipopolisacárido bacteriano (LPS): causa la degeneración de las neuronas dopaminérgicas pero no afecta la serotoninérgicas ni las GABAérgicas (Herrera et al., 2000). Además la inyección intra-hipocampal de LPS no afecta mayormente a las neuronas, aunque se ha reportado una alta variabilidad en la pérdida de neuronas piramidales de la región CA1 (los autores afirman que 2 de las 8 ratas inyectadas presentaron una extensa destrucción de la CA1; Andersson et al., 1992). A pesar de que el LPS es un fuerte inductor de IL-1 β (ver Capítulo II, Figura II.15), al menos los efectos sobre las neuronas dopaminérgicas no están mediados por esta citoquina (Castaño et al., 2002). Esto sugiere que los mecanismos neurotóxicos del LPS y de la IL-1 β son diferentes y explicaría la diferente sensibilidad de las distintas neuronas a los dos estímulos inflamatorios.

Finalmente, en la substantia nigra inyectada con hrIL-1 β observamos una falta de tinción con el anticuerpo anti-tirosina hidroxilasa a lo largo del tracto de inyección 6 días después (Figura I.15.C). Sin embargo, si comparamos esta imagen con la obtenida mediante la tinción de Nissl (Figura I.12.D) y la inmunofluorescencia para detectar células macrofágicas (Figura I.13.C), podemos ver que hay un importante reclutamiento de células a lo largo del tracto de inyección. Así, proponemos que la falta de inmunoreactividad se debe a un desplazamiento de las células dopaminérgicas por las macrofágicas y no a la neurodegeneración.

I.4.3. Inflamación y gliosis inducidos por la IL-1 β aguda.

La respuesta inflamatoria involucra el reclutamiento de neutrófilos y monocitos circulantes al sitio donde se encuentra la infección o el daño. Estos fagocitos profesionales tienen como función matar a los microorganismos invasores, remover los restos celulares y facilitar la reparación del tejido de forma de recuperar la homeostasis tisular (revisado en Perry et al., 1993). Una herida penetrante en el SNC (por ejemplo la realizada con una aguja) causa una destrucción neuronal aguda y el daño directo de los vasos sanguíneos, lo cual es seguido por el reclutamiento de neutrófilos y otras células fagocíticas en los bordes de la herida. Las células mielomonocíticas reclutadas fagocitan los restos celulares y pueden tener un rol en el reestablecimiento de la barrera hemato-encefálica, el cual es una parte importante de la recuperación de la homeostasis del cerebro lesionado. Los macrófagos reclutados sintetizan tanto IL-1 β como TGF- β 1, y se ha demostrado que TGF- β 1 favorece la formación de cicatriz (Fassbender et al., 2000; Fawcett and Asher, 1999).

En todas las regiones estudiadas, la inyección de IL-1 β en el parénquima resulta en el reclutamiento de neutrófilos a las 24 hs y en el aumento de los ARNm para IL-1 β e IL-1 α . Un trabajo previo demostró que la inyección de IL-1 β en el estriado estimula el reclutamiento de neutrófilos al sitio de inyección 24 horas después (Blond et al., 2002). Nosotros no sólo verificamos ese resultado, sino que comprobamos lo mismo en las otras tres regiones. Es más, detectamos inducciones de IL-1 β contralaterales y alejadas de la inyección, las cuales correlacionaron con la presencia de neutrófilos en esos tejidos. Por ejemplo, en la corteza inyectando en el estriado y en el estriado inyectando en la corteza.

Vale la pena mencionar aquí que trabajos previos sugieren que la IL-1 β no es quimioattractante de neutrófilos *per se*, sino a través de otras moléculas como los quimioattractantes de neutrófilos inducidos por citoquinas (CINC-1 y 3) (Campbell et al., 2003). Sin embargo, IL-1 induce directamente la proliferación de astrocitos (Giulian and Lachman, 1985) y de microglia (Suzumura et al., 1993), al menos *in vitro*. De esta forma, la IL-1 actúa tanto directa como indirectamente para reclutar células fagocíticas (microglia, monocitos y neutrófilos) necesarias para remover el tejido dañado, y astrocitos necesarios para la cicatrización. De hecho, se ha demostrado que la señalización a través del receptor tipo I de IL-1 es necesaria para activar de manera eficiente la respuesta inmune innata en el cerebro (Basu et al., 2002).

Además, en el mesencéfalo se evidenciaron cúmulos de células macrofágicas alejados del tracto de inyección. La distancia entre estos cúmulos y el sitio de inyección sugiere que éstos no se deben a la proteína hrIL-1 β inyectada, sino a la IL-1 β u otras moléculas inducidas en estructuras distales y que son capaces de reclutar macrófagos. Sumado esto a la inducción del ARNm para IL-1 β y el reclutamiento de neutrófilos en regiones alejadas del sitio de inyección, podemos concluir que existen mecanismos que permiten transmitir la señal a otras regiones y terminan afectando a las mismas no sólo en la expresión de moléculas sino también en el reclutamiento de células sanguíneas. Si bien en base a estos resultados no podemos deducir el mecanismo de señalización, los mismos no parecen ser por difusión (debido a que *no se observan* en regiones más cercanas, sino que son específicos) y pueden involucrar tanto a neuronas como a astrocitos. Así, se comienza a visualizar una red de comunicación intercelular en el SNC en base a moléculas relacionadas con el sistema inmune.

Se ha propuesto que la inducción extendida de IL-1 β está involucrada con el daño cerebral por excitotoxicidad (Pearson et al., 1999). Además se ha reportado la exacerbación de la lesión cortical causada por la oclusión de la arteria media cuando se inyecta IL-1 β en el estriado (Lawrence et al., 1998). Esta inyección de IL-1 β en el estriado induce la expresión de IL-1 β en el hipotálamo, y de hecho la inyección de la citoquina en el hipotálamo también aumenta el daño cortical (Allan et al., 2000). Nuestros resultados sugieren que los efectos distales de la IL-1 β pueden deberse no sólo a la expresión de la citoquina en regiones que no han sido inyectadas, sino que pueden ser causa o estar modificados por el reclutamiento de células sanguíneas.

Finalmente, este es el primer trabajo (dentro de nuestro conocimiento) que analiza los efectos tardíos de la inoculación aguda de IL-1 β en distintas regiones. En ese sentido llama la atención la persistencia de células macrofágicas 6 días después de la inyección en todas las regiones. Estas células pueden tanto jugar un rol en la recuperación del tejido como ser responsables de daños subsecuentes. Sin embargo, la falta de expresión de citoquinas a los 6 días permite descartar un rol inflamatorio de estas células y apoya la idea de una función de reparación.

Capítulo II.

Rol de la IL-1 β en un modelo de la enfermedad de Parkinson

"But taking all circumstances into due consideration, particularly the very gradual manner in which the disease commences, and proceeds in its attacks; as well as the inability to ascribe its origin to any more obvious cause, we are led to seek for it in some slow morbid change in the structure of the medulla, or its investing membranes, or theca, occasioned by simple inflammation, or rheumatic or scrophulous affection."

James Parkinson, en "An Essay on the Shaking Palsy"

II.1. Punto de partida

La activación microglial es un fenómeno observado en muchas enfermedades del cerebro y se considera generalmente como una reacción tisular a la muerte celular o a la infección, siendo su función más importante la remoción de restos celulares (Vila et al., 2001). En particular, la enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la pérdida progresiva de las neuronas de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (Dunnet and Björklund, 1999), la región con más alta densidad de microglia (Lawson et al., 1990). Tanto en los modelos animales de la enfermedad como en los pacientes se ha encontrado una activación microglial robusta (Cicchetti et al., 2002; Kohutnicka et al., 1998; Mirza et al., 2000; Nagatsu, 2002), mientras que sólo se ha observado astrogliosis en algunos modelos animales de la enfermedad (Kohutnicka et al., 1998). Por otro lado, las neuronas de la SNpc son particularmente susceptibles a la toxicidad mediada por la microglia tanto *in vitro* como *in vivo* (Castaño et al., 1998; Kim et al., 2000), y este efecto puede revertirse mediante la administración de drogas anti-inflamatorias (Castaño et al., 2002). Es más, el bloqueo de la activación microglial ha demostrado ser neuroprotectivo en modelos murinos de la enfermedad de Parkinson (He et al., 2001; Wu et al., 2002). Todo esto sugiere un rol de la microglia en esta enfermedad.

Las células microgliales pueden mediar la neurodegeneración a través de la liberación de radicales libres, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, prostaglandinas y/o citoquinas (Hunot et al., 1999), pero también pueden proteger a las neuronas removiendo y neutralizando a los radicales libres y/o secretando factores tróficos o citoquinas (Vila et al., 2001; Zietlow et al., 1999). Asimismo, las citoquinas pueden modular la respuesta microglial, creando una cadena de respuestas disparadas por el fenómeno inicial (la pérdida de neuronas dopaminérgicas).

Trabajos previos han estudiado la expresión de citoquinas en muestras post-mortem de pacientes con la enfermedad de Parkinson (Mogi et al., 1994; revisado en Nagatsu, 2002), sin embargo no se había evaluado la expresión de diferentes citoquinas durante la neurodegeneración. En esta parte de la tesis evaluamos el patrón temporal de expresión de citoquinas claves involucradas en las respuestas inflamatorias e inmunes (el sistema IL-1, TNF α y TGF- β 1) y de neurotrofinas (BDNF y NGF) en un modelo en rata de la enfermedad de Parkinson. Este modelo ha sido bien caracterizado (Sauer and Oertel, 1994) y lleva a la

pérdida gradual y parcial de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, permitiendo la evaluación del proceso degenerativo al estudiar los tiempos entre un día y un mes. En paralelo evaluamos la respuesta glial e inflamatoria a la neurodegeneración.

II.2. Objetivos

El objetivo particular de este capítulo es caracterizar la respuesta comportamental, celular y molecular a la inyección de la toxina 6-hidroxidopamina (6OHDA) en el estriado.

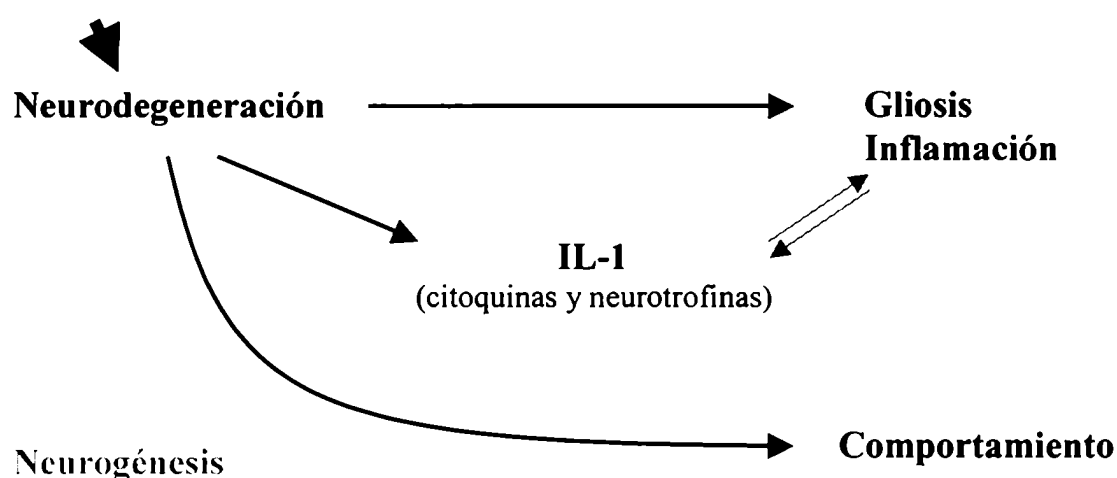


Figura II.1. Esquema de los objetivos del Capítulo II en el marco de los objetivos generales de la tesis. Utilizando un modelo de neurodegeneración, se evaluará la gliosis/inflamación y la expresión de IL-1 y otras citoquinas inducidos. Además se evaluarán los efectos de la degeneración sobre el comportamiento. Las flechas en gris entre IL-1 y gliosis indican que en el trabajo no se evalúa directamente si la neurodegeneración afecta estos procesos directamente o si afecta uno y el otro aparece como resultado del primero. La cabeza de flecha indica la variable modificada en este capítulo.

II.3. Resultados

II.3.1. Pérdida parcial y progresiva de neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*.

La inyección de una sola dosis de 20µg de la toxina 6-hidroxidopamina (6OHDA) en el estriado (ver Materiales y Métodos, sección 2.2.) causa una pérdida limitada y progresiva de células dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) ipsilateral (ver Introducción, sección 2.3.2.; Sauer and Oertel, 1994). Mediante inmunohistoquímicas para detectar la enzima limitante en la síntesis de dopamina (tirosina hidroxilasa, TH) en los estriados de animales inyectados con 6OHDA o con vehículo, comprobamos la pérdida gradual de terminales dopaminérgicos (expansión de la región negativa para TH) (Figura II.2.). La parcialidad de la lesión también puede evidenciarse ya que a los tiempos más largos evaluados en este trabajo (30 días) subsisten terminales dopaminérgicos especialmente en las regiones ventrales e internas del estriado (Figura II.2.D).

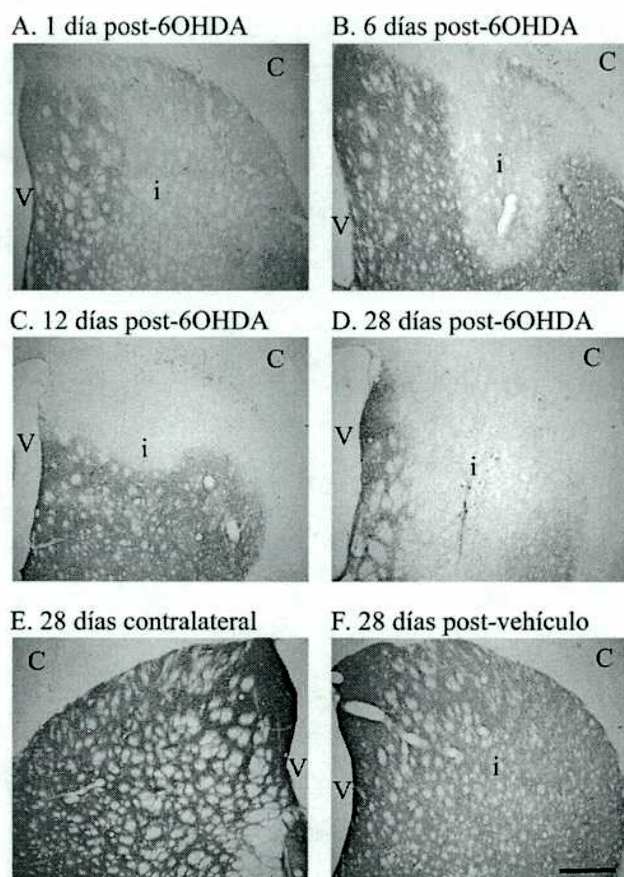


Figura II.2. Análisis de la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) en el estriado de ratas lesionadas con 6OHDA. En los estriados inyectados con la toxina se observa la pérdida gradual de inmunoreactividad para TH a los 1 (A), 6 (B), 12 (C) y 28 (D) días post-lesión. En cambio, la tinción es homogénea en el estriado contralateral (E) y en el estriado inyectado con vehículo (F) a los 28 días. V, ventrículo lateral; C, corteza; I, sitio de inyección. Barra de escala = 500µm.

Debido a la parcialidad de la lesión, estos animales muchas veces no pueden ser analizados utilizando pruebas comportamentales típicas como la rotación inducida por anfetamina o apomorfina (Deumens et al., 2002). Además, la utilización de esas drogas agregan una variable más al análisis que deseábamos realizar respecto de las respuestas gliales a la neurodegeneración, ya que no está estudiado si la liberación masiva de dopamina o la activación simultánea de todos los receptores dopaminérgicos causan algún tipo de respuesta glial. En consecuencia decidimos caracterizar el comportamiento de los animales lesionados, utilizando un ensayo que permite evaluar la acinesia de los miembros anteriores (Olsson et al., 1995). Este ensayo comportamental es considerado uno de los más sensibles, permitiendo evaluar los impedimentos motores causados tanto por la pérdida parcial como total de los terminales dopaminérgicos en el estriado (Deumens et al., 2002).

Observamos una dificultad para realizar pasos de ajuste con la pata derecha (contralateral a la lesión) tanto en la dirección derecha-izquierda (Figura II.3.A; ANOVA $F(8,183)=7,307$, $p<0,0001$) como en la opuesta (Figura II.3.B; ANOVA $F(8,183)=8,439$, $p<0,0001$), lo cual resulta en el arrastre de la pata cuando la rata es movida lateralmente (Figura 6, Materiales y Métodos). En cambio, los mismos animales no ven afectada su performance en el ensayo cuando se analiza la pata izquierda (ipsilateral) (Figuras II.3.C y D). También se puede notar que con la evaluación repetida los animales control muestran una disminución de entre 2-3 pasos en el número de pasos de ajuste, sugiriendo así algún grado de habituación al ensayo, algo que ya ha sido descripto (Olsson et al., 1995).

De esta manera demostramos el desarrollo de acinesia en animales inyectados con 20µg de 6OHDA en el estriado, evidenciando comportamentalmente la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

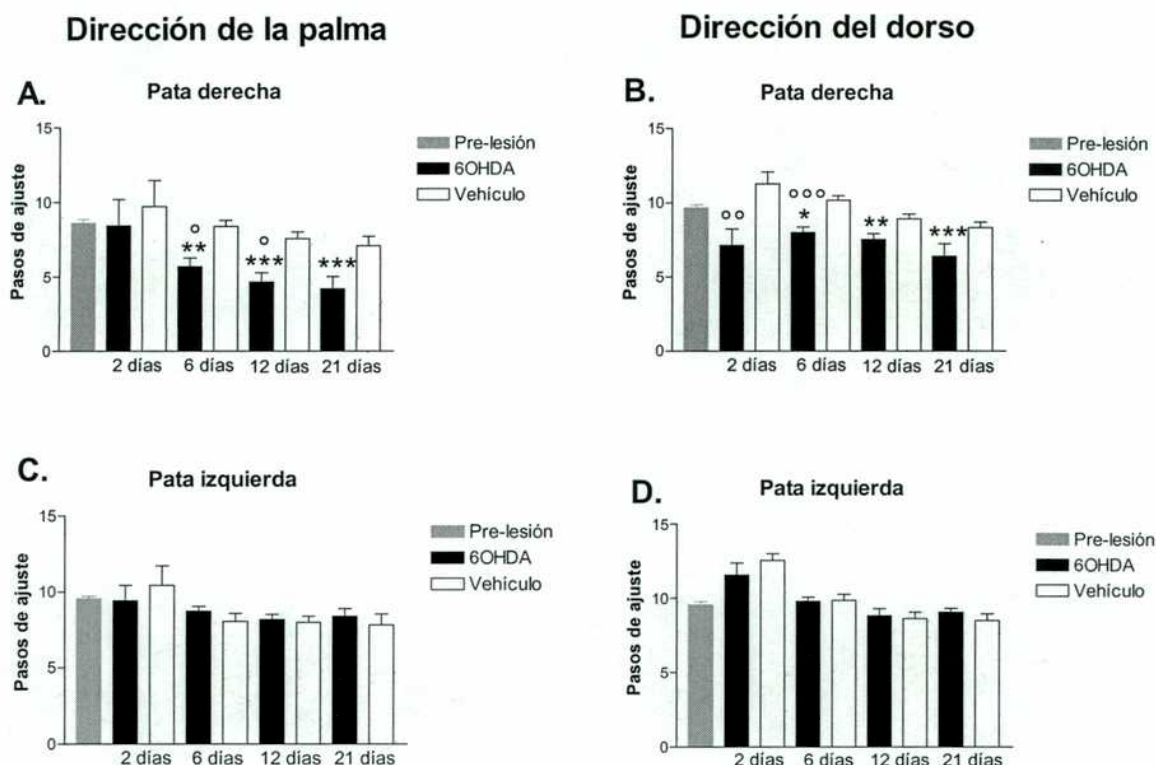


Figura II.3. Evaluación de la acinesia en animales inyectados con 6OHDA o con vehículo 2, 6, 12 y 21 días post-inyección. Se evaluó la performance de la pata derecha (contralateral) en la dirección derecha-izquierda (A) e izquierda-derecha (B), y de la pata izquierda (ipsilateral) en la dirección izquierda-derecha (C) y derecha-izquierda (D). Sólo el ajuste con la pata derecha (contralateral) se vio impedida y en ambas direcciones. Los datos se representan como la media $\pm$ error estándar de la media. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ o *** $p < 0,001$, diferencia significativa cuando se compara con el ensayo pre-lesión; ° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$ o °°° $p < 0,001$, diferencia significativa entre el grupo lesionado y su respectivo control al mismo tiempo: ANOVA de un factor significativa seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni ($n = 7-43$ por grupo).

II.3.2. Activación de la microglia en la *substantia nigra*.

En este modelo bien caracterizado estudiamos si la administración de 6OHDA en el estriado inducía activación glial y/o inflamación en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc). Para ello se detectó la presencia de microglia activada utilizando la isolectina B4 de *G. simplicifolia* como marcador específico de estas células (Streit and Kreutzberg, 1987) y se caracterizó su morfología según lo descrito en Materiales y Métodos, sección 7.4.1. Así, detectamos células microgliales con distinta morfología: desde aquellas típicamente en reposo (con procesos celulares finos y altamente ramificados) pasando varias etapas de reacción en las cuales los procesos se van acortando y engrosando, alcanzando la morfología característica de microglia activada.

Observamos activación de microglia en la SNpc ipsilateral a la inyección de 6OHDA a partir de los 6 días post-cirugía (Figuras II.4.A-C). En cambio, en la SNpc contralateral (Figura II.4.E) y en la SNpc ipsilateral a la inyección de vehículo (Figura II.4.D) no se observan células positivas para la lectina. Es de notar que en las SN *pars reticulata* (SNpr) se observan células positivas para lectina, independientemente del tratamiento (Figura II.4.D), mostrando que esta región tiene una alta densidad de este tipo glial. Sin embargo, en los animales inyectados con vehículo y en las regiones contralaterales a la lesión, la microglia de la SNpr presenta morfología de célula inactiva, mientras que en la SNpr vecinas a las SNpc lesionadas la morfología cambia mostrando su activación. Además, a 28 días se observan aglomerados de 2-4 células positivas para la lectina en la SNpc lesionada (Figura II.4.F, inserto).

Como se mencionó antes, se empezó a evidenciar microglia activada en la SNpc lesionada a los 6 días post-inyección, se observó un incremento no significativo estadísticamente a los 12 días y una tendencia a disminuir 16 días después (Figura II.4.G). Para evaluar si esta microglia activa prolifera inyectamos intraperitonealmente a animales lesionados y controles con BrdU (Materiales y Métodos, sección 3.1.). La BrdU es un análogo de la timidina que es incorporado al ADN durante su replicación y que puede ser detectado por inmunohistoquímica. Así encontramos que, tanto a 12 como a 28 días post-cirugía las células lectina-positivas incorporan el marcador de proliferación celular BrdU, mostrando que no sólo están activadas sino que también proliferan en la zona lesionada (Figura II.4.F).

Por otro lado, no se observaron células inflamatorias en la SNpc, independientemente del tratamiento, cuando se analizaron las secciones luego de la tinción con violeta de cresilo o mediante inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos ED1, ED2 o anti-MHC clase I. Además, no se observaron astrocitos expresando el marcador GFAP en la SNpc en ninguno de los animales lesionados.

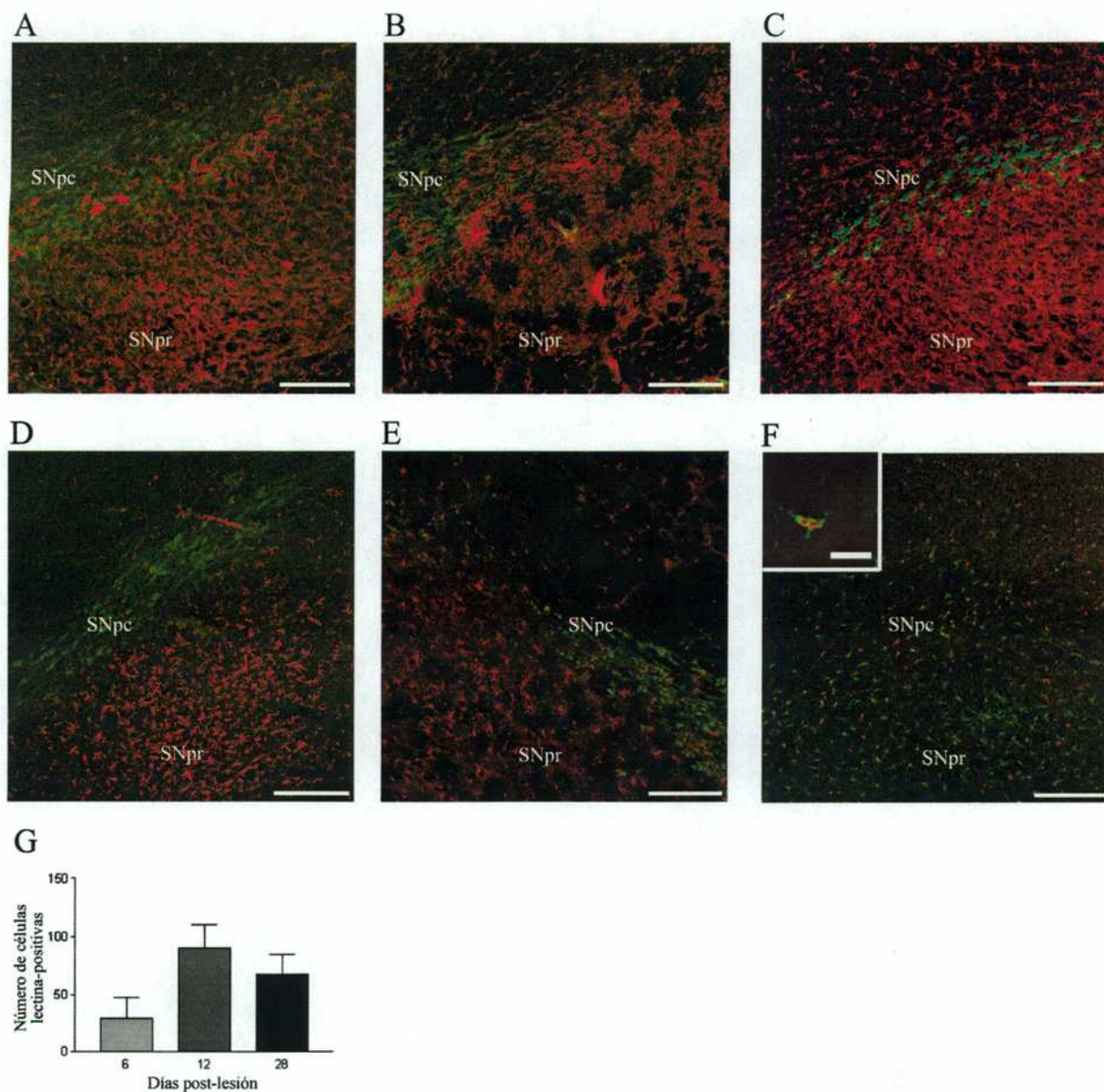


Figura II.4. Activación de la microglia en la *substantia nigra* luego de la administración de 6OHDA en el estriado. Análisis mediante inmunofluorescencia mostrando células que unen la isolectina B4 de *G. simplicifolia* (rojo) rodeando células dopaminérgicas (immunoreactivas para TH, verdes) en la SN. Se analizaron las SN ipsilaterales a la inyección de 6OHDA a 6 (A), 12 (B) y 28 (C) días post-inoculación, y se las comparó con la SN ipsilateral a la inyección del vehículo a los 6 días (D) y con la SN contralateral a la lesión a los 12 días (E). A los 28 días se observan células positivas para el marcador de proliferación celular BrdU (rojas), el cual localiza con la lectina específica para microglia (F, inserto: magnificación de microglia en proliferación). SNpr y SNpc: *substantia nigra pars reticulata* y *pars compacta*, respectivamente. Barra de magnificación: 200µm; inserto en F, 20µm. (G) Cuantificación de la microglia activada (células positivas para la lectina con cambios morfológicos característicos de microglia activada) en la SNpc lateral al núcleo terminal medio del tracto óptico accesorio (ver Materiales y Métodos 7.4.1.).

II.3.3. Inflamación y activación glial en el estriado.

Al analizar la respuesta glial e inflamatoria en el estriado inyectado con 6OHDA o con vehículo, se evidenciaron astrocitos GFAP-positivos a lo largo del tracto de inyección a partir del día 6 post-cirugía. Sin embargo, a los 12 días el estriado inyectado con 6OHDA mostró una inmunoreactividad extendida a toda la estructura mientras que en los estriados inyectados con vehículo ésta se limitó al tracto de inyección (Figura II.5.A y B).

Por otro lado, se detectó activación de microglia alrededor del sitio de inyección un día después de la cirugía, y a 12 días era algo mayor en los estriados inyectados con 6OHDA que en los controles (Figuras II.5.C y D). Finalmente, se detectaron células positivas para ED1 tanto en las cortezas como en los estriados ipsilaterales a cualquier inyección, donde la hemorragia era evidente (Figuras II.5.E y F), manteniéndose la misma inmunoreactividad aún a los 30 días post-inyección.

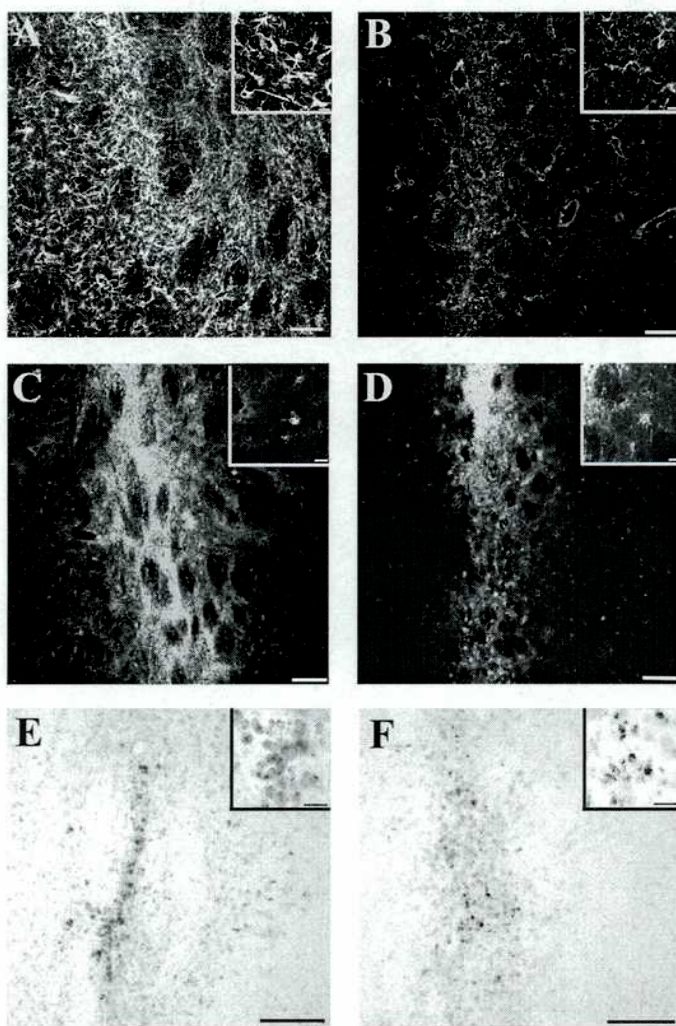


Figura II.5. Signos de inflamación y gliosis en los estriados 12 días después del tratamiento. Análisis mediante inmunofluorescencia de la activación de astrocitos (células que expresan GFAP) en estriados inyectados con 6OHDA (A) y vehículo (B). Activación de microglia (células a las que se une la GSAI-B4) en estriados inyectados con 6OHDA (C) y vehículo (D). Mediante inmunohistoquímica se detectaron células fagocíticas (ED1 positivas) a lo largo del tracto de inyección de 6OHDA (E) y vehículo (F). Barras de escala: 100µm; insertos, 20µm.

El análisis de los haces mielinizados utilizando la tinción de Klüver-Barrera (Materiales y Métodos, sección 7.2.) evidenció la pérdida moderada de mielina en haces cercanos a la inyección de 6OHDA a los 12 días (Figura II.6.).

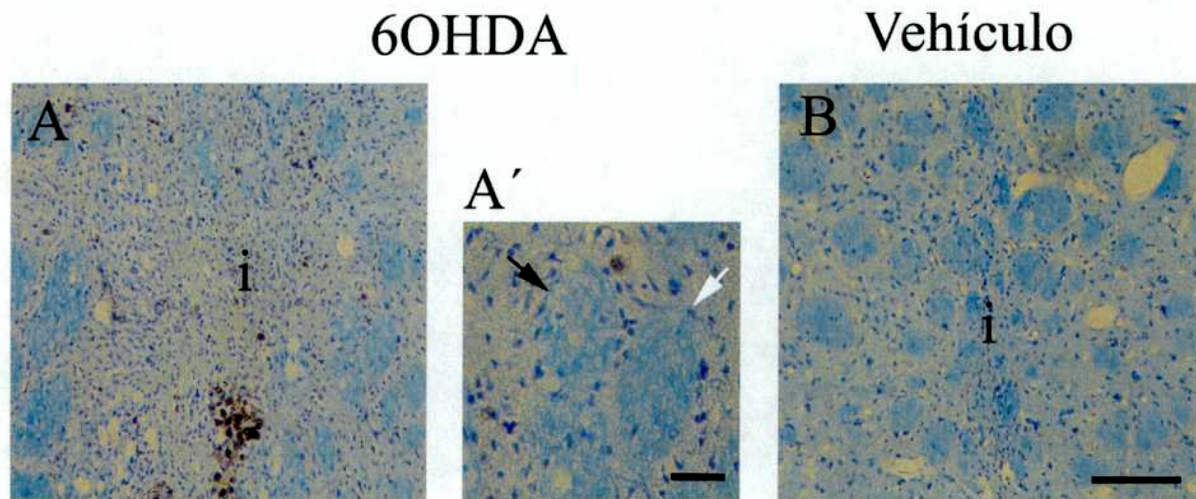


Figura II.6. Tinción de estriados inyectados con 6OHDA y con vehículo según la técnica de Klüver-Barrera. Tinción de los haces mielinizados del estriado (azul) seguido de tinción de Nissl (violeta). En los estriados inyectados con 6OHDA se observa la desorganización del tejido y la pérdida de mielina a los 12 días (A y A'). En cambio la mielina se encuentra intacta en los estriados inyectados con vehículos (B). Barras de escala: A, B, C y D, 50µm; A' y C', 200µm.

De esta forma, la única respuesta glial diferencial a la 6OHDA observada en el estriado es la activación de astrocitos a tiempos largos post-inyección, aún cuando la pérdida de dopamina (Figura II.2.) y cierta demielinización es evidente.

II.3.4. Perfiles de expresión de citoquinas y neurotrofinas en la *substantia nigra*.

Con el objetivo de identificar moléculas que podrían estar implicadas en el proceso de neurodegeneración y/o en la respuesta del tejido nervioso a la muerte neuronal, analizamos por RT-PCR competitiva la expresión de citoquinas claves en la regulación de las respuestas inflamatorias e inmunes (IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, TNF α y TGF- β 1) y de neurotrofinas (BDNF y NGF), en la *substantia nigra* (SN) a distintos tiempos luego de la administración de 6OHDA en el estriado. El criterio para considerar a una molécula como inducida es que presente un aumento de sus niveles de ARNm de al menos 2 veces y que este aumento alcance significancia estadística.

IL-1 α e IL-1 β mostraron una tendencia a aumentar a partir de los 12 días post-inyección de 6OHDA. A los 30 días estas tendencias alcanzaron valores significativos, representando aumentos de 2 (IL-1 α) y 16 (IL-1 β) veces en la SN ipsilateral a la inoculación de la toxina respecto a los valores contralateral o a los de los animales inyectados con vehículo (Figuras II.7.A y B). Por otro lado, el antagonista IL-1ra no presenta cambios significativos en su expresión en la SN a ninguno de los tiempos analizados, aunque se evidenció una disminución no significativa en la SN lesionada a los 6 días (Figura II.7.C).

A pesar de la alta sensibilidad de la técnica, la expresión de TNF α se encontró muy cerca de los límites de detección, por lo que no se pudieron detectar inducciones o inhibiciones consistentes. La sensibilidad de la detección de TNF α es de 2 moléculas de ARNm de la citoquina por cada célula analizada (Depino et al., 2003b).

Un resultado no esperado fue la inducción de TGF- β 1 en las SN ipsi- y contralaterales a la inyección de vehículo 6 días después de la operación, la cual alcanzó valores 4 veces mayores que en los animales lesionados con 6OHDA (Figura II.7.D y E).

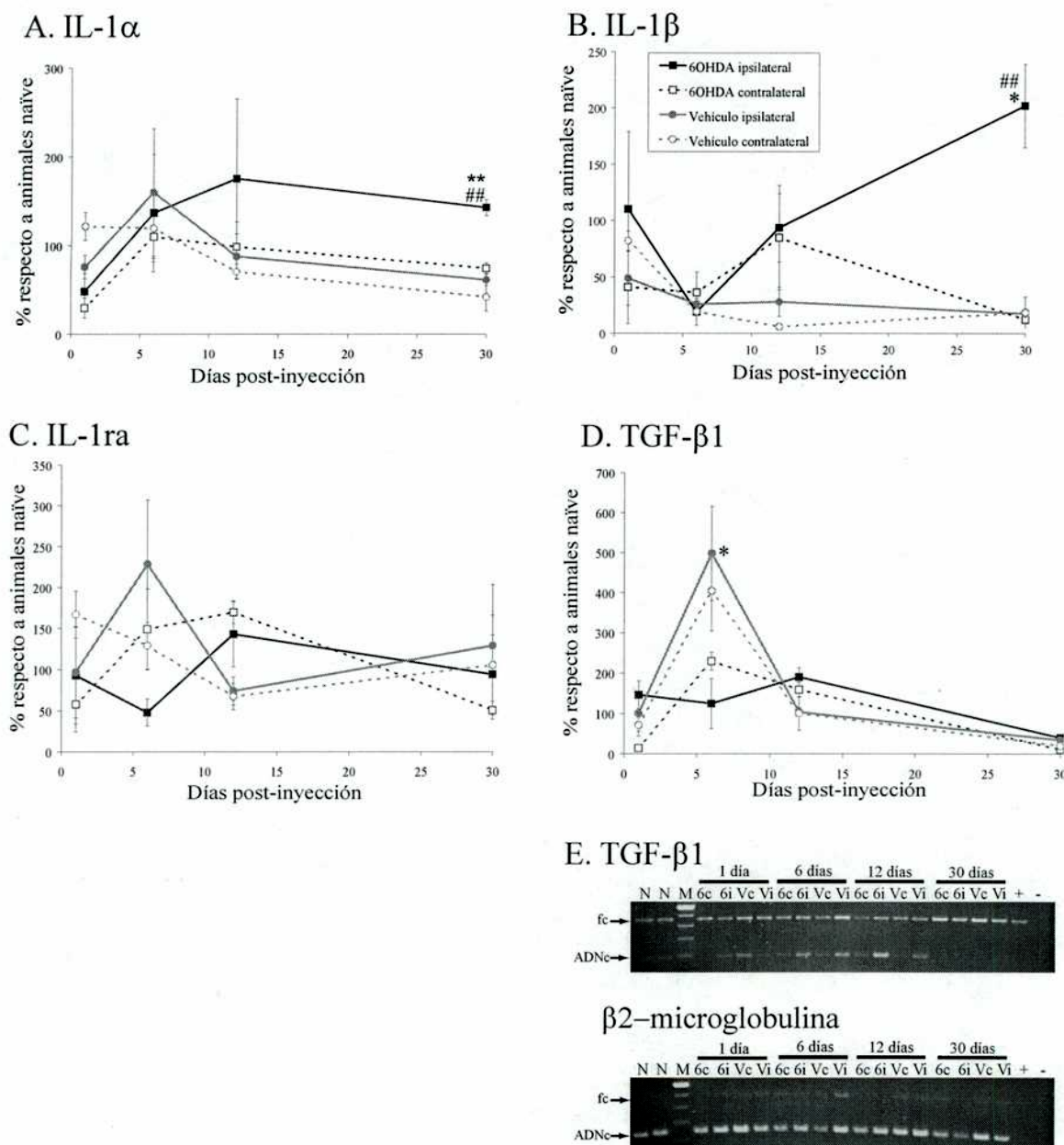


Figura II.7. Análisis de la expresión de citoquinas en la SN de animales lesionados con 6OHDA y animales control, por RT-PCR semicuantitativa. Patrones de expresión de (A) IL-1 α , (B) IL-1 β , (C) IL-1ra y (D) TGF- β 1. Se grafica la media $\pm$ error estándar de la media. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, en pruebas t de Student no pareadas, comparados con el vehículo correspondiente. ## $p < 0,01$, en pruebas t de Student pareadas, comparados con el contralateral. (E) Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando una RT-PCR representativa para TGF- β 1 y β 2-microglobulina. SN de animales: N, naïve; 6i, 6OHDA ipsilateral, 6c, 6OHDA contralateral, Vi, vehículo ipsilateral, Vc, vehículo contralateral, a 1, 6, 12 y 30 días post-inyección. + y -, controles positivo y negativo respectivamente. fc: fragmento de competición.

Finalmente, no se detectaron cambios significativos en las expresiones de las neurotrofinas BDNF y NGF, independientemente del grupo experimental analizado (Figura II.8.A y B). Sin embargo, se observó un aumento no significativo tanto del ARNm que codifica para BDNF como el de NGF en la SN a los 12 días de haber sido lesionada.

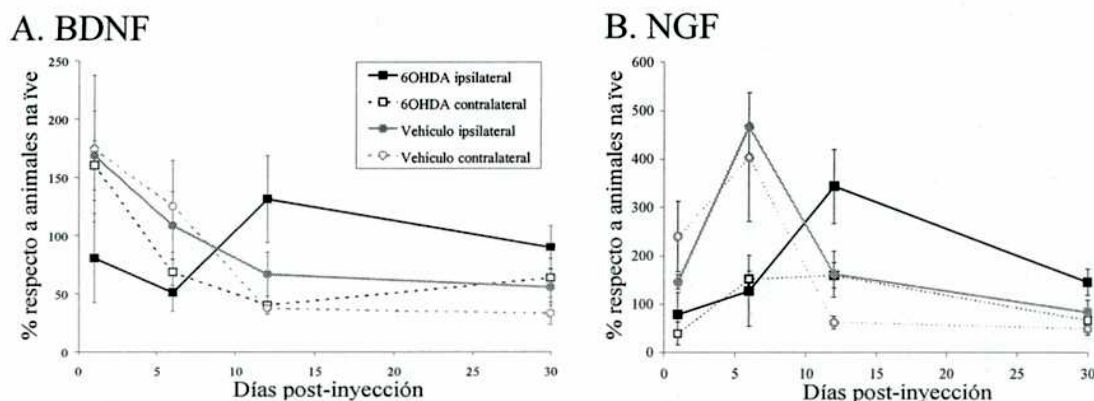


Figura II.8. Análisis de la expresión de neurotrofinas en la SN de animales lesionados con 6OHDA y animales control. Patrones de expresión de (A) BDNF y (B) NGF. Se grafica la media $\pm$ error estándar de la media.

La utilización de $\beta 2$ -microglobulina para normalizar el contenido de ADNc en la muestra podría alterar los resultados, si la expresión de esta proteína estuviese regulada durante el proceso en estudio. De hecho es difícil contar con una molécula cuya expresión no esté afectada cuando el fenómeno en estudio lleva a cambios en el número de células del tejido, como en este caso ocurre debido a la muerte de las neuronas dopaminérgicas y a la proliferación de la microglia. Para tener una idea de lo que ocurre con el gen utilizado para normalizar, medimos la expresión de β -actina en las mismas muestras. Normalizamos los valores obtenidos a cada tiempo para cada uno de los genes por los valores obtenidos de los animales naïve. La relación $\beta 2$ -microglobulina/ β -actina muestra que en los tiempos más significativos a este análisis (30 días en la SN lesionada, cuando IL-1 α e IL-1 β están aumentados, y 6 días en las animales controles, cuando TGF- $\beta 1$ está aumentada) la expresión de $\beta 2$ -microglobulina está aumentada respecto a la de la β -actina (Figura II.9.). En esos casos, la normalización con $\beta 2$ -microglobulina puede llevar a una subvaloración de los aumentos en los niveles de ARNm para las citoquinas, pero nunca a una sobrevaloración. Por ello podemos afirmar que los aumentos observados son verdaderos incrementos en los niveles de ARNm para esas citoquinas y no artefactos causados por la forma en que se expresan los datos.

β 2-microglobulina/ β -actina

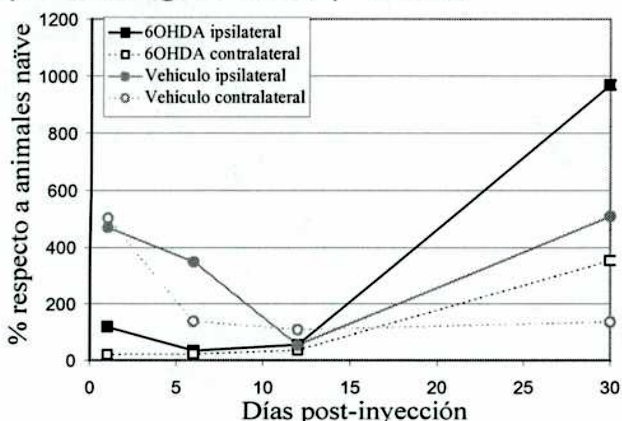


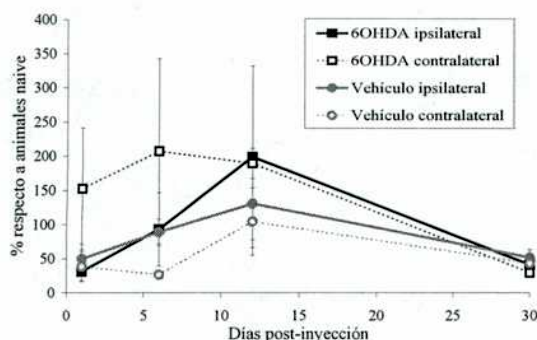
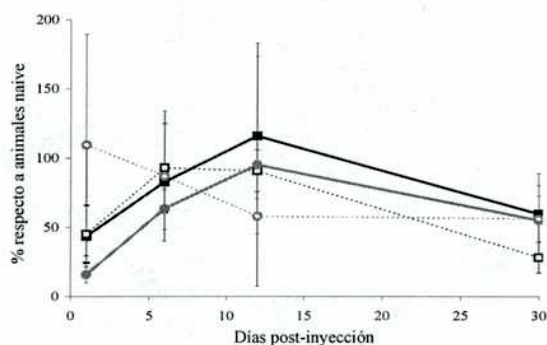
Figura II.9. Niveles de expresión de β 2-microglobulina respecto a los niveles de β -actina en las SN de los animales analizados. El 100% corresponde a la relación β 2-microglobulina/ β -actina en los animales naïve. Se grafica la media de la relación para cada tratamiento (n=3 por grupo) respecto a la relación en los animales naïve.

II.3.5. Perfiles de expresión de citoquinas y neurotrofinas en el estriado.

Debido a que la muerte de las neuronas dopaminérgicas también puede afectar a la región que inervan (el estriado), decidimos estudiar también la expresión de citoquinas y neurotrofinas en esta región. Como el objetivo principal de esta parte del trabajo era realizar un paneo de diversas moléculas relacionadas con la neurodegeneración, cada grupo experimental fue analizado mezclando en partes iguales los ARNm provenientes de los animales tratados de la misma manera. Por esta razón no es posible analizar los datos estadísticamente (ya que se desconoce la variabilidad entre individuos) y los datos presentados representan la media y el error de la técnica.

En el estriado, a diferencia de lo observado en la SN, no se evidenciaron cambios significativos en los niveles de ARNm para IL-1 α o IL-1 β (Figuras II.10.A y B). Los niveles de ARNm para IL-1ra en los estriados inyectados con vehículo duplican los valores obtenidos en los estriados inyectados con 6OHDA, representando probablemente una regulación negativa en estos últimos (Figura II.10.C.). Por otro lado, los niveles de ARNm para TNF α se encontraron debajo del límite de detección en todas las muestras analizadas. Finalmente, la expresión de TGF- β 1 presentó incrementos de 3 veces en los estriados lesionados el día siguiente a la cirugía, pero a tiempos posteriores sólo los estriados inyectados con vehículo mostraron aumentos en los niveles de ARNm para TGF- β 1 (Figura II.10.E e F)¹.

¹ La cuantificación de TGF- β 1, BDNF y TNF α en el estriado fueron presentados como tesis de Licenciatura en el Departamento de Ciencias Biológicas, FCEyN, UBA (31 de Marzo de 1999). Se repiten aquí para la discusión general de la expresión de factores neurotróficos en este modelo de la enfermedad de Parkinson, trabajo cuya finalización fue tema sustancial de esta tesis de doctorado.

A. IL-1 α B. IL-1 β 

C. IL-1ra

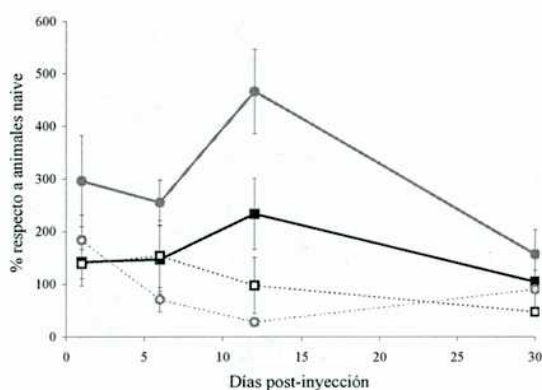
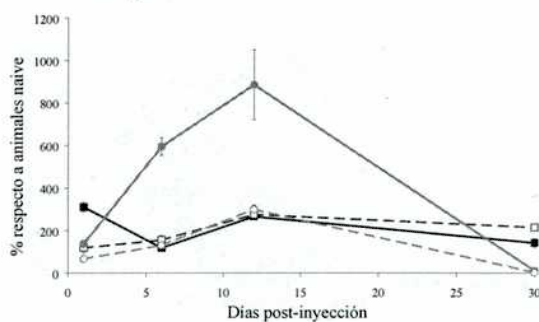
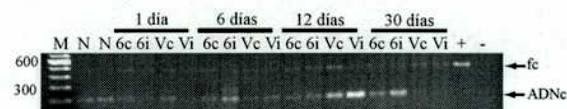
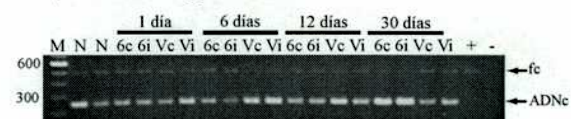
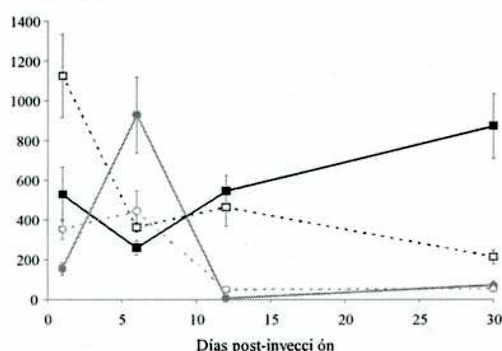
D. TGF- β 1E. TGF- β 1 β 2-microglobulina

Figura II.10. Análisis de la expresión de citoquinas en el estriado de animales lesionados con 6OHDA y animales control, por RT-PCR semicuantitativa. Patrones de expresión de (A) IL-1 α , (B) IL-1 β , (C) IL-1ra, y (D) TGF- β 1. Se grafica la media $\pm$ error estándar de la media, el cual corresponde al error de la técnica. (E) Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando una RT-PCR representativa para TGF- β 1 y β 2-microglobulina. Estriados de animales: N, naïve; 6i, 6OHDA ipsilateral, 6c, 6OHDA contralateral, Vi, vehículo ipsilateral, Vc, vehículo contralateral, a 1, 6, 12 y 30 días post-inyección. + y -, controles positivo y negativo respectivamente. fc: fragmento de competición.

Respecto a la expresión de neurotrofinas, se observaron incrementos en los estriados lesionados sólo a los tiempos más tardíos. La expresión de BDNF es similar en todas las muestras a 1 y 6 días post-cirugía, pero se encuentra aumentada en los animales lesionados en ambos hemisferios a los 12 días y en el ipsilateral a los 30 días (Figura II.11.A.). NGF también presenta un aumento tardío y marcado en el estriado lesionado con 6OHDA (Figura II.11.B.).

A. BDNF



B. NGF

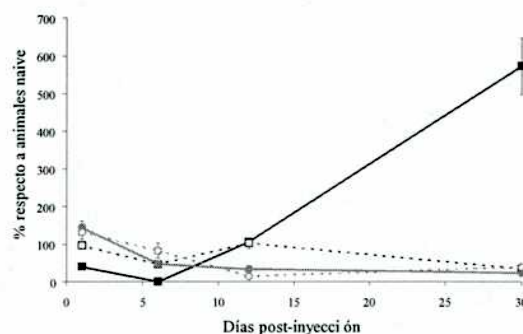


Figura II.11. Análisis de la expresión de neurotrofinas en el estriado de animales lesionados con 6OHDA y animales control, por RT-PCR semicuantitativa. Patrones de expresión de (A) BDNF y (B) NGF. Se grafica la media $\pm$ error estándar de la media, el cual corresponde al error de la técnica.

Nuevamente, para cerciorarnos que los aumentos observados en citoquinas y neurotrofinas no se deben a la normalización con β 2-microglobulina, medimos los niveles de β -actina en las distintas muestras. Si bien en algunos puntos los niveles de β 2-microglobulina duplican los de β -actina (Figura II.12.), estas diferencias no pueden explicar los resultados obtenidos. Por ejemplo, en el punto que más difieren (30 días después de la inyección de vehículo), los aumentos descriptos son de 10 veces (BDNF) o 20 veces (NGF) por lo cual una sobrevaloración por β 2-microglobulina arrojaría aumentos aún importantes de 5 y 10 veces, respectivamente.

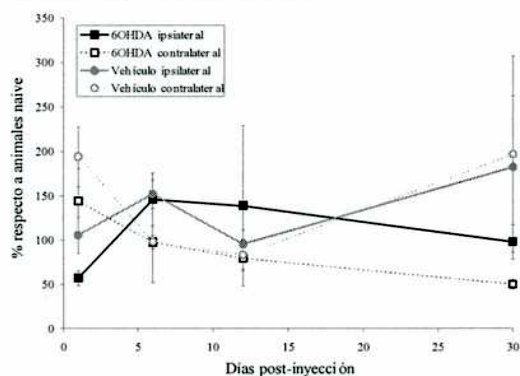
 β 2-microglobulina/ β -actina

Figura II.12. Niveles de expresión de β 2-microglobulina respecto a los niveles de β -actina en los estriados de los animales analizados. El 100% corresponde a la relación β 2-microglobulina/ β -actina en los animales naïve. Se grafica la media de la relación para cada tratamiento, estimados por cuadruplicado, respecto a la relación en los animales naïve.

II.3.6. Expresión de las proteínas IL-1 α e IL-1 β en la *substantia nigra* lesionada.

Debido a que se había detectado una inducción específica de IL-1 α e IL-1 β en las SN en degeneración y a que habíamos observado la presencia de microglia activada en la región, (siendo estas células consideradas la fuente principal de IL-1 en el cerebro), quisimos estudiar si este aumento de ARNm se traduciría en un aumento de las respectivas proteínas. Para ello utilizamos dos kits comerciales de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) de alta sensibilidad (detectan hasta 15pg de citoquina/ml), el método de detección de proteínas más sensible que se ha desarrollado hasta hoy (ver Materiales y Métodos, sección 5.). Sin embargo, no nos fue posible detectar ninguna de las dos proteínas en la SN de animales lesionados o controles, ni a 12 ni a 30 días después de la inyección (Figura II.13.A y B).

Para verificar que la falta de detección de la proteína no se debiese a un problema técnico, inyectamos 2 μ g de la endotoxina LPS en la SN (ver Materiales y Métodos, sección 2.3.). El LPS es un clásico inductor de respuesta inflamatoria, y como tal se ha descrito su capacidad para inducir la expresión de IL-1. En los animales inyectados con la endotoxina comprobamos la inducción tanto de los ARNm como de las proteínas IL-1 α e IL-1 β (Figura II.13.A-C). Además, nos resultó particularmente interesante el hecho de que los animales inyectados en la SN con PBS (vehículo de la endotoxina) muestran una inducción tanto del ARNm como de la proteína IL-1 β , probablemente debido a la lesión mecánica producida por la aguja Hamilton (vale la pena recordar aquí que las inyecciones de 6OHDA se realizan en el estriado, y no en la SN, por lo cual en esos animales la SN no es lesionada de manera mecánica). Los niveles de inducción de ARNm para IL-1 β son similares en los animales inyectados con PBS que en los animales lesionados con 6OHDA 30 días antes, sin embargo sólo en los primeros es posible detectar la proteína.

Esto sugiere un verdadero control post-transcripcional de la expresión de IL-1, y no un problema técnico que impide la detección de la proteína.

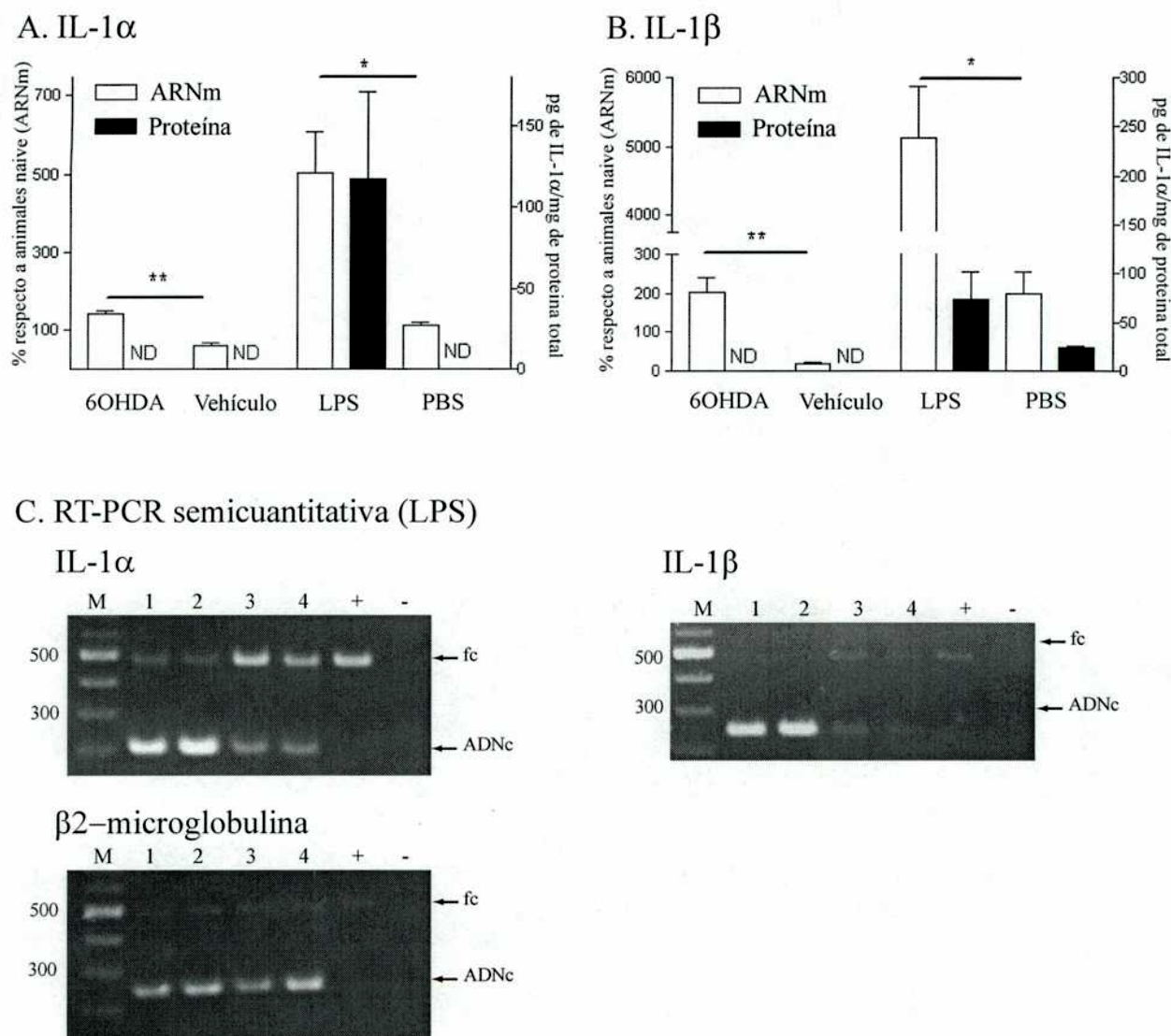


Figura II.13. Regulación de la expresión de IL-1 α e IL-1 β frente a dos estímulos inflamatorios. La inyección de LPS en la SN estimula la expresión de IL-1 α (A) e IL-1 β (B), tanto a nivel de ARNm como de proteína. Sin embargo, la expresión aumentada de ambas citoquinas a nivel ARNm en los animales lesionados con 6OHDA no es traducida en un aumento de proteína. 6OHDA, SN lesionada con 6OHDA intra-estriatal 28 días antes. Vehículo, SN ipsilateral de animales inyectados en el estriado con el vehículo de la 6OHDA, a los 28 días. LPS, SN inyectada con 2 μ g de LPS, a las 4 horas. PBS, SN inyectada con PBS a las 4 horas. Los valores de ARNm provienen de cuantificaciones por RT-PCR competitiva, de 2-3 animales por grupo. Los valores de proteína se obtuvieron mediante ELISA, 3 animales por grupo. Se grafica la media + error estándar de la media. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ en pruebas t de Student no pareadas, respecto a los vehículos correspondientes. (C) Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando una RT-PCR representativa para IL-1 α , IL-1 β y β 2-microglobulina en las SN de animales inyectados con LPS o PBS. M, marcador de peso molecular. 1 y 2, SN ipsilateral y contralateral al LPS. 3 y 4, SN ipsilateral y contralateral al PBS. + y -, controles positivo y negativo, respectivamente.

II.4. Discusión

En esta parte de la tesis estudiamos los perfiles temporales de expresión de varias citoquinas y neurotrofinas en distintas regiones del SNC durante la neurodegeneración de las células dopaminérgicas de la SNpc, inducida mediante la toxina 6OHDA. Este patrón de expresión está acompañado por una respuesta celular específica a la neurodegeneración. Parte de estos resultados fueron aceptados para su publicación (Depino et al., 2003b).

II.4.1. El modelo de la enfermedad de Parkinson.

Para poder analizar los fenómenos que tienen lugar mientras las neuronas dopaminérgicas de la SNpc degeneran, es necesario utilizar un modelo que sea gradual. Por otro lado, en humanos la enfermedad no lleva a una pérdida total de estas células, sino que 10-30% de las mismas suelen permanecer funcionales aunque no pueden evitar los síntomas. El modelo utilizado en este trabajo (inyección de una única dosis de 20µg de 6OHDA en el estriado dorsal) causa la pérdida de 5, 40, 65 y 75% de las neuronas de la SNpc a 1, 2, 3 y 4 semanas después de la inyección (Sauer and Oertel, 1994). Así, este modelo presenta las condiciones de gradualidad y parcialidad requeridas, las cuales no se observan en otros modelos como el logrado con varias inyecciones de 6OHDA en distintas zonas del estriado, la inyección de la 6OHDA directamente en la SNpc o en la MBF (revisados en Deumens et al., 2002), así como tampoco en el modelo de toxicidad con MPTP en ratones (ver Beal, 2001, y citas allí).

El ensayo de acinesia (stepping) no había sido evaluado en este modelo como método no invasivo para evaluar la progresión y efectividad de la lesión. En este trabajo demostramos que es posible detectar con seguridad la lesión ya a los 6 días, aunque la acinesia es menor en este modelo que en otros que causan una pérdida mayor de neuronas dopaminérgicas (Deumens et al., 2002).

II.4.2. Respuesta glial a la lesión con 6OHDA.

Trabajos recientes se han concentrado en el rol de la microglia en la pérdida de las células dopaminérgicas de la SNpc y han postulado un rol de estas células gliales en la exacerbación de la lesión (Cicchetti et al., 2002; He et al., 2001; Herrera et al., 2000; Liberatore et al., 1999; Vila et al., 2001). En este trabajo mostramos el curso temporal de la

activación microglial en la SNpc debida a la lesión parcial con 6OHDA, de manera similar a lo descrito por otros autores con otras técnicas o marcadores antigénicos en otros modelos (Cicchetti et al., 2002; He et al., 2001; Kim et al., 2000; Kohutnicka et al., 1998; Liberatore et al., 1999). Además, hemos detectado la proliferación de las células gliales en este área y la presencia de aglomeraciones de células, lo cual se considera indicio de neuronofagia (Streit and Kreutzberg, 1987).

En este análisis no encontramos astrocitos reactivos en la SNpc de ratas tratadas con 6OHDA, una ausencia que también se ha descrito en muestras *post-mortem* de pacientes con la forma idiopática de la enfermedad de Parkinson (Mirza et al., 2000). En cambio, se ha descrito una reacción astrocitaria entre leve y fuerte en la SNpc de ratones lesionados con MPTP (Kohutnicka et al., 1998; Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999; Liberatore et al., 1999) y en muestras *post-mortem* de pacientes intoxicados con MPTP (Langston et al., 1999). Una posible explicación para esta diferencia entre los modelos es que la droga MPTP es convertida en el ión neurotóxico MPP⁺ por los astrocitos (ver Introducción, sección 2.3.1.), lo cual puede provocar cierta respuesta en este tipo celular que no es observada en el modelo de toxicidad por 6OHDA. Sin embargo, el rol de los astrocitos en distintos modelos de la enfermedad de Parkinson necesita ser estudiado en más detalle.

Por otro lado, en el sitio de la lesión en el estriado observamos tanto activación microglial como astrocítica a todos los tiempos estudiados, presentando sólo leves diferencias entre la inyección de 6OHDA y la de vehículo.

En este contexto inflamatorio y conociendo en detalle la dinámica de degeneración progresiva de las neuronas de la SNpc, evaluamos los patrones de expresión de varias citoquinas y neurotrofinas en las regiones afectadas.

II.4.3. Expresión de neurotrofinas.

De los patrones de expresión de BDNF y NGF, es interesante notar su inducción 30 días después de la inyección de 6OHDA en el estriado lesionado. Aunque observamos activación glial e inflamación tanto en los estriados inyectados con 6OHDA como con vehículo, sólo en los animales lesionados los niveles de BDNF y NGF estaban aumentados a los 30 días. Esto sugiere que estas neurotrofinas son inducidas por la pérdida de terminales dopaminérgicos en la región, y no por el trauma causado por la inyección.

En lesiones parciales, como la realizada en este trabajo, se ha observado que a tiempos largos los terminales que quedan empiezan a ramificarse en el estriado, probablemente para

ocupar las dendritas que quedaron sin conexión ya que luego de meses se ven mejoras en la función motora (Finkelstein et al., 2000). Este fenómeno no depende de la lesión con 6OHDA, sino de la falta de señalización a través de los receptores dopaminérgicos tipo D2 (Parish et al., 2001; Parish et al., 2002). La lesión mecánica del estriado también aumenta el número de ramificaciones de los axones dopaminérgicos (Liberatore et al., 1999), y en este modelo se vio que macrófagos y microglia en la lesión expresan GDNF y BDNF, respectivamente (Batchelor et al., 1999), y que la inhibición de estas neurotrofinas impide el aumento en ramificaciones dopaminérgicas (Batchelor et al., 2000). Una posible explicación acerca del incremento tardío que observamos en los estriados lesionados es que estos factores neurotróficos contribuyan a la ramificación compensatoria de las fibras que quedan en el estriado. Sin embargo, la existencia del proceso de ramificación activa de los axones remanentes no ha sido evaluada en este modelo.

Por otro lado, en la *substantia nigra* de pacientes con la enfermedad de Parkinson los niveles del receptor de BDNF (trkB) no están alterados (Benisty et al., 1998). Sin embargo en el estriado ipsilateral a la lesión con 6OHDA en rata tiene lugar un aumento significativo en la densidad de hibridización para trkB (Numan and Seroogy, 1997). Nuestros resultados muestran un aumento no significativo de los ARNm para BDNF y NGF a los 12 días post-lesión y sólo en la SNpc en degeneración. Esto sugiere que las neurotrofinas actúan sólo en forma transitoria sobre los cuerpos neuronales dopaminérgicos, pero el rol o efecto de estas neurotrofinas debe ser evaluado en experimentos de sobre-expresión o bloqueo directo de estos factores tróficos.

II.4.4. Patrón de expresión de TGF- β 1 y TNF α .

Las regulaciones de la expresión de citoquinas observadas durante la degeneración de la SNpc sugieren un rol o diversos roles de estas moléculas en la respuesta a la lesión. Por un lado permiten armar un mapa molecular y celular, tanto regional como temporal, que nos ayuda a entender los procesos que tienen lugar durante la neurodegeneración. Por otro lado, permiten identificar moléculas con potencial terapéutico que pueden ser estudiadas en experimentos farmacológicos específicos.

II.4.4.1. *El TGF- β 1.*

El TGF- β 1 es inducido tanto en la SN como en el estriado de los animales inyectados con vehículo, pero no en los lesionados. Este aumento de TGF- β 1 no puede deberse al trauma causado por la cirugía ya que ha sido observado en regiones que no sufren lesión mecánica como la SN. Por otro lado, este aumento también podría interpretarse como una disminución en los niveles de TGF- β 1 en los animales lesionados, sin embargo los niveles basales detectados en los animales naïve sugieren que se trata de una verdadera inducción.

Se han descripto diversos efectos de TGF- β sobre las células del cerebro, incluyendo la regulación de la gliosis y de la cicatrización, y efectos sobre la supervivencia neuronal frente a distintas lesiones (Flanders et al., 1998). Resultados *in vitro* e *in vivo* sugieren un rol de esta citoquina en el mantenimiento de un ambiente anti-inflamatorio en el cerebro, ya que suprime la activación y la proliferación de la microglia *in vitro* (Jones et al., 1998; Suzumura et al., 1993) e inhibe la expresión de citoquinas por astrocitos y microglia (Benveniste et al., 1994; Suzumura et al., 1993). Además, el TGF- β puede regular la expresión de moléculas de adhesión (como tenascina, NCAM o L1) las cuales son necesarias para la regeneración axonal, jugando de esta manera un rol en la cicatrización y en la regeneración (Aubert et al., 1995). Por todo esto, sería interesante estudiar el rol funcional de esta falta de inducción de TGF- β 1 en los animales lesionados con 6OHDA y su posible vinculación con la activación de la microglia en la SNpc.

La evidencia de un posible rol de TGF- β en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas proviene de experimentos dispares. Los TGF- β 2 y 3 son expresados durante el desarrollo y contribuyen a la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio (Poulsen et al., 1994). 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 6OHDA utilizado en esta tesis no afectó la muerte neuronal de las células de la SNpc ni su atrofia (Sauer et al., 1995). Finalmente, se ha demostrado que GDNF necesita de la presencia de TGF- β para ejercer su efecto neuroprotector y/o neuroregenerador (Krieglstein et al., 1998), sugiriendo que las dos moléculas carecen de actividad neurotrófica por separado pero que se vuelven neurotróficas juntas. Todo esto sugiere un rol potencial de TGF- β 1 en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, por lo cual la falta de inducción de esta molécula en la SNpc en degeneración podría contribuir a la muerte neuronal. Sin

embargo esto es sólo una hipótesis que debe ser evaluada experimentalmente (notar que sólo se han estudiado TGF- β 2 y 3 en el modelo utilizado en esta tesis).

II.4.4.2. *El TNF α*

No fue posible detectar los ARNm para TNF α o estos se encontraban muy cerca del límite de detección en las dos regiones estudiadas, independientemente del tratamiento. Esta falta de inducción de los ARNm para TNF α , y la ausencia de las proteínas IL-1 α e IL-1 β , no parecen correlacionar con lo observado en muestras *post-mortem* de pacientes con la enfermedad de Parkinson (Mogi et al., 1994; Nagatsu, 2002). Sin embargo, el tiempo de análisis de los dos enfoques es muy distinto: las muestras *post-mortem* reflejan los episodios finales de la enfermedad de Parkinson, mientras que en este estudio se analizó la progresión de la neurodegeneración. Además los animales son mantenidos en ambientes libres de patógenos y los pacientes no. De hecho, la mayoría de los pacientes con la enfermedad de Parkinson mueren de infecciones, por lo que los análisis de muestras *post-mortem* pueden estar influidos por otras patologías (Beyer et al., 2001, y citas allí). De esta manera, nuestros estudios no excluyen la posibilidad de que citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 α , IL-1 β y TNF α puedan estar funcionalmente involucradas en las últimas etapas de la enfermedad en humanos.

La expresión de TNF α también ha sido detectada 4 semanas después de la inyección de 6OHDA en el estriado de rata (Mogi et al., 1999; Mogi et al., 2000). La técnica de ELISA utilizada en ese trabajo parece superar en sensibilidad a la RT-PCR utilizada en esta tesis, ya que los autores detectan la expresión de TNF α en los hemisferios contralaterales a la lesión, en la corteza prefrontal y en el cerebro de animales tratados con la droga inmunosupresora FK506. Sin embargo, en esos trabajos no queda claro cuál es exactamente el sitio de inyección y cuánta la degeneración lograda a las 4 semanas, por lo cual se puede deducir una inducción de esta citoquina a tiempos tardíos pero no se puede evaluar su rol en la neurodegeneración.

II.4.5. **Patrón de expresión del sistema IL-1 en la *substantia nigra*.**

El patrón de expresión del sistema IL-1 en la SN mostró un comportamiento atípico interesante. Los niveles de ARNm para IL-1 α no mostraron cambios frente a la neurodegeneración, mientras que los de los agonistas (IL-1 α e IL-1 β) se vieron inducidos 30

días después de la inyección de 6OHDA. La inducción de ARNm para IL-1 β fue mayor que la de IL-1 α (16 vs. 2 veces), de manera similar a lo observado en las células del sistema inmune ante diferentes estímulos (Dinarello, 1996). Sin embargo, estos aumentos en los ARNm para IL-1 α e IL-1 β no fueron acompañados por incrementos en los niveles de las respectivas proteínas. En cambio, un estímulo clásico de la respuesta inflamatoria aguda (la inyección de lipopolisacáridos) sí es capaz de inducir la expresión de IL-1 α e IL-1 β tanto a nivel de ARNm como de proteína. Es más, la inyección de PBS (vehículo de los lipopolisacáridos) en la SN induce la expresión del ARNm para IL-1 β a niveles similares a los inducidos 30 días después de la inyección de 6OHDA. Sin embargo, la proteína IL-1 β es detectada en el primer caso pero no en el modelo de la enfermedad de Parkinson, mostrando que el daño físico agudo es un estímulo inflamatorio más potente que la neurodegeneración crónica causada por la inyección de 6OHDA.

Estos resultados muestran que la falta de detección de la proteína IL-1 β en los animales lesionados con 6OHDA no se debe a la falta de sensibilidad del método utilizado sino a un verdadero control post-transcripcional, traduccional y/o post-traduccional. Estos datos sugieren que la expresión de IL-1 α e IL-1 β está sujeta a un riguroso control en la SN durante la neurodegeneración. En la periferia se ha observado este tipo de control en distintas células (por ej., monocitos y queratinocitos) luego de diversos estímulos (por ej., ionóforos de calcio, adhesión, exposición a C5a) (Dinarello, 1996; Schindler et al., 1990). A las células capaces de transcribir la IL-1 pero no de sintetizar la proteína se las considera "cebadas" ("primed") y estímulos que en otras condiciones serían inocuos son capaces de disparar rápidamente la traducción, resultando en una producción rápida de IL-1 (Dinarello, 1996). Además, aún cuando estas inducciones de IL-1 α e IL-1 β se tradujeran a proteína, no tendrían un rol funcional en el desarrollo de la neurodegeneración en este modelo ya que son diferencialmente expresadas a los 30 días, cuando el 60% de las neuronas de la SNpc ya han degenerado (Sauer and Oertel, 1994).

Cabe mencionar aquí, que un trabajo reciente ha demostrado que existe activación de microglia acompañada por expresión de IL-1 β , TNF α e iNOS (tanto a nivel de ARNm como de proteína) en ratones intoxicados con MPTP (Delgado and Ganea, 2003). Esto sugiere que en el modelo murino de intoxicación con MPTP la activación de la microglia sí está acompañada por expresión de citoquinas pro-inflamatorias.

II.4.6. Activación de la microglia y expresión atípica de citoquinas en la *substantia nigra*.

La activación de la microglia ha estado siempre asociada con la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, aunque en general estos estudios son *in vitro* (Hanisch, 2002). Nuestros resultados muestran que no es éste el caso en el modelo animal de la enfermedad de Parkinson utilizado.

Nuestras observaciones correlacionan con la biología del modelo de neurodegeneración crónica utilizado: la muerte neuronal en la SNpc luego de la inyección de 6OHDA es por apoptosis (He et al., 2000), la cual por definición no causa inflamación. Además se ha demostrado que los macrófagos activados de la periferia no expresan citoquinas pro-inflamatorias durante la fagocitosis de una célula apoptótica (Fadok et al., 1998). Sin embargo, los resultados presentados aquí sugieren que la regulación de la inflamación durante la apoptosis en el cerebro sigue un mecanismo diferente al observado en la periferia. La inoculación de células en apoptosis disminuye la respuesta inflamatoria mediante la inducción de TGF β 1 y su consecuente efecto anti-inflamatorio (Fadok et al., 1998; Huynh et al., 2002), mientras que en las SN en degeneración no se observaron cambios en los niveles de ARNm para TGF- β 1. Además, en la periferia la regulación de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias puede verse tanto a nivel de proteínas como de ARNm. Nosotros mostramos que en el SNC también existen mecanismos transcripcionales (TNF α) y post-transcripcionales (IL-1 α y β) de regulación de la expresión de citoquinas.

Por otro lado, en otro modelo se ha observado activación microglial sin citoquinas pro-inflamatorias. En un modelo en ratón de la enfermedad causada por priones se ha demostrado una activación microglial sin producción de citoquinas pro-inflamatorias (Betmouni et al., 1996; Walsh et al., 2001; revisado en Perry et al., 2002). Por otro lado, luego de la oclusión de la arteria cerebral media en ratones la producción de citoquinas en la lesión dura un corto período de tiempo, mientras que la activación microglial dura varias semanas (Andersson et al., 1991; Gregersen et al., 2000) y lo mismo ocurre con la inducción de ARNm para citoquinas y la respuesta glial que siguen a la inyección de la proteína hrIL-1 β (ver Capítulo I). Por todo esto, los resultados presentados aquí se suman a los trabajos citados para destacar la falsedad de la asunción de que la activación microglial conlleva la producción de IL-1 α , IL-1 β y/o TNF α (Perry et al., 2002).

El cerebro preserva un ambiente anti-inflamatorio por diferentes mecanismos. Por ejemplo, aumenta la producción de citoquinas anti-inflamatorias o restringe la entrada de proteínas plasmáticas y de células del sistema inmune mediante la barrera hemato-encefálica (Aloisi, 2001; Perry et al., 1993). El control de la expresión de IL-1 α , IL-1 β y TNF α a distintos niveles, demostrado en esta tesis, sugiere un mecanismo adicional para preservar el ambiente anti-inflamatorio en el cerebro.

Como se mencionó antes, en un modelo de enfermedad por priones se ha observado la presencia de microglia activada en la región en neurodegeneración con ausencia de producción de IL-1 u otras citoquinas pro-inflamatorias (Walsh et al., 2001). En ese modelo (a diferencia de lo observado en el trabajo de esta tesis), la falta de citoquinas pro-inflamatorias está acompañada con un aumento de los niveles de ARNm y de la proteína TGF β 1 (Cunningham et al., 2002). Esos resultados y los presentados aquí llevan al concepto de taquifilaxis en enfermedades neurodegenerativas crónicas (Perry et al., 2003). La taquifilaxis es la respuesta adaptativa atenuada frente a una estimulación repetida y fue descrita originalmente en animales inyectados con LPS (ver Ziegler-Hietbrock, 1995).

Como ya se describió en la introducción, las infecciones o la administración de inductores de citoquinas en la periferia pueden inducir la expresión de citoquinas en el cerebro y una gran variedad de efectos centrales, como por ejemplo el "sickness behavior" (Besedovsky, 1996; Kongsman et al., 2002; Pitossi et al., 1997; Rothwell and Hopkins, 1995). De manera interesante, la administración central o periférica de endotoxina durante el curso del modelo de la enfermedad por prion causa una producción aumentada de IL-1 β y un comportamiento exacerbado de enfermedad ("sickness behavior") (Combrinck et al., 2002). Así, se ha postulado que en ese modelo existe una gliosis atípica (sin expresión de citoquinas pro-inflamatorias) y que esas células gliales podrían ser inducidas a secretar citoquinas por un segundo estímulo (por ejemplo, una infección periférica). De esa forma estas citoquinas exacerbarían o acelerarían el proceso neurodegenerativo (Perry et al., 2003).

Como se mencionó anteriormente, una importante proporción de los pacientes con la enfermedad de Parkinson mueren de neumonía y de infecciones del tracto urinario (Beyer et al., 2001), pero también se ha observado esta tendencia en pacientes con la enfermedad de Alzheimer y con esclerosis múltiple (revisado en Perry et al., 2003). Además se ha comprobado que si bien las concentraciones de citoquinas (IL-1 β y TNF α) circulantes no son diferentes en pacientes con enfermedades neurodegenerativas y en controles, luego de la

estimulación *in vitro* con LPS las células sanguíneas de pacientes con las enfermedades de Alzheimer o de Parkinson expresan niveles mucho mayores de IL-1 β , TNF α , IL-6 e IL-10 (Lombardi et al., 1999). Esto sugiere que las células del sistema inmune también están cebadas y que en estos pacientes cualquier infección puede tener efectos exacerbados sobre la salud. Por todo esto, y a raíz de los resultados obtenidos en este trabajo, resultaría interesante evaluar directamente (en modelos animales apropiados) cuál es la contribución de las infecciones periféricas y de la producción central de citoquinas en la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

II.4.7. Nuevas evidencias en trabajos publicados recientemente.

Mientras este trabajo estaba en revisión (Depino et al., 2003b), un análisis similar fue publicado (Sugama et al., 2003). En ese trabajo, utilizando el modelo de lesión de la SNpc mediante la inyección de 6OHDA en el haz medial del cerebro anterior (MFB) observaron activación de microglia sin expresión de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, en ese trabajo no detectaron cambios a nivel ARNm de IL-1 β en la SN, tal vez por una menor sensibilidad de la técnica utilizada (ensayo de protección a la ARNasa). En conclusión, nuestros resultados fueron corroborados en otro modelo en rata de la enfermedad de Parkinson.

Como se mencionó antes, los resultados de esta parte de la tesis y de trabajos publicados con anterioridad, sugieren que la microglia cebada puede ser inducida a secretar citoquinas y otras moléculas nocivas para las neuronas dopaminérgicas mediante distintos estímulos pro-inflamatorios. Es más, propusimos que este fenómeno podría ser clave en las fases terminales de la enfermedad humana. En este sentido se está trabajando en el laboratorio para evaluar si un segundo estímulo inflamatorio puede exacerbar la muerte neuronal causada por la toxina 6OHDA.

Sin embargo, recientemente apareció un trabajo que parece en principio mostrar resultados opuestos a los observados (Saura et al., 2003). Inyectando 20ng de hrIL-1 β (el doble de lo utilizado en el Capítulo I) 5 días antes de la lesión con 6OHDA, los autores reportan una protección de las neuronas dopaminérgicas contra la toxina. Es de notar que los autores muestran la activación de astrocitos en la SN, mucho más extendida que la observada en el Capítulo I, probablemente debida a la dosis utilizada. Sin embargo, estos efectos protectivos de la IL-1 β inyectada antes de la lesión no significan que la misma no pueda

exacerbar la lesión cuando es inyectada después. Por ejemplo, una isquemia corta induce IL-1 β y protege contra la neurodegeneración causada por isquemia (Wang et al., 2000), mientras que aplicada *a posteriori* la IL-1 β exacerba la lesión (Touzani et al., 2002). Esta línea de pensamiento está en concordancia con los efectos diferentes sobre la viabilidad neuronal en el hipocampo causados por la administración aguda o crónica (por medio de un vector adenoviral) de la IL-1 (Capítulo I).

Por todo esto el rol de la IL-1 β en la enfermedad de Parkinson debe ser evaluado en modelos animales pertinentes a la enfermedad, ya que la protección obtenida a través de la glia, si bien aporta a nuestro conocimiento acerca de las interrelaciones entre la glia y la neurodegeneración, no brinda información acerca de posibles terapias y entra en contradicción con resultados de la clínica que sugieren que historias de traumas cerebrales previos correlacionan con una mayor incidencia de la enfermedad de Parkinson (ver Introducción, sección 2.2.3.2.).

Capítulo III.
Análisis de la neurogénesis en
el mesencéfalo y estudio del
rol de IL-1 β en ese proceso.

"No wonder, then, that in the early stages of the development of any science different men confronting the same range of phenomena, but not usually the same particular phenomena, describe and interpret them in different ways."

Thomas S. Kuhn
"The structure of scientific revolutions"

III.1. Punto de partida

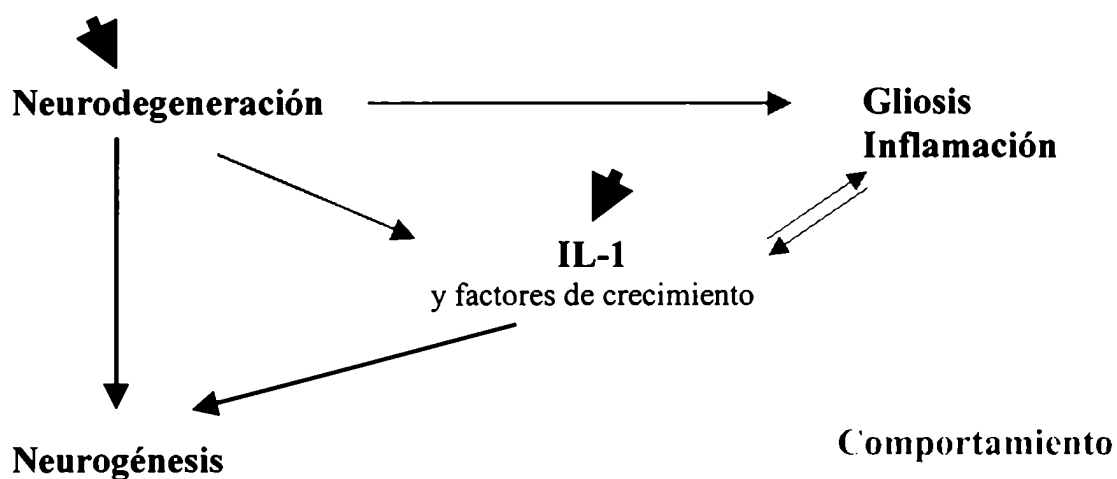
La mayoría de las neuronas son generadas antes o alrededor del nacimiento. Las primeras evidencias de que existe neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos aparecieron hace unas décadas, pero fueron firmemente establecidas recién en los últimos años (revisado en Gross, 2000). Se ha estimado que se agregan aproximadamente 10.000 neuronas nuevas diariamente al giro dentado de ratón y la tasa de neurogénesis en el bulbo olfatorio se supone aún mayor. En retrospectiva, es bastante notable que un proceso de esta magnitud haya pasado inadvertido por tanto tiempo y permite preguntarse si niveles más bajos de neurogénesis pueden haber pasado inadvertidos en otras regiones.

De hecho se ha mostrado la generación de nuevas neuronas en otras partes del hipocampo y en la corteza (Gould et al., 1999; Rietze et al., 2000), aunque la neurogénesis en la corteza sigue siendo un tema controvertido (Kornack and Rakic, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que varias regiones aparentemente quiescentes en animales naïve presentan neurogénesis como respuesta al daño (Arvidsson et al., 2002; Magavi et al., 2000), o luego de la estimulación combinada mediante una lesión y la administración de factores de crecimiento (Nakatomi et al., 2002).

En base a la evidencia previa, nos preguntamos si se generaban nuevas neuronas en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) del mesencéfalo, la región donde se pierden neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson. Para ello estudiamos la existencia de neurogénesis en animales naïve y evaluamos si podíamos estimular el proceso mediante una lesión específica de las neuronas dopaminérgicas (inyección de 6OHDA en el estriado). Además se ha demostrado que el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento de epidermis (EGF) son factores de proliferación de células progenitoras y que la IL-1 β es una de las moléculas necesarias para inducir la diferenciación de células progenitoras a neuronas dopaminérgicas (Ling et al., 1998). En base a esto, evaluamos también si la administración de cada uno de estos factores por separado o en combinación era capaz de inducir neurogénesis de células dopaminérgicas en el mesencéfalo.

III.2. Objetivos

El objetivo particular de este capítulo es determinar si se generan nuevas neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo de ratas adultas. En particular quisimos determinar si el fenómeno ocurre fisiológicamente, pero también si la neurodegeneración o la administración de factores de crecimiento y/o de la IL-1 β podían afectar al mismo.



III.1. Esquema de los objetivos del Capítulo III en el marco de los objetivos generales de la tesis. Utilizando animales naïve, un modelo de neurodegeneración y la inyección de IL-1 y otros factores de crecimiento se evaluará la neurogénesis en el mesencéfalo. Las flechas en gris indican mecanismos indirectos que pueden afectar el fenómeno en estudio. Las cabezas de flecha indican la variable modificada en este capítulo.

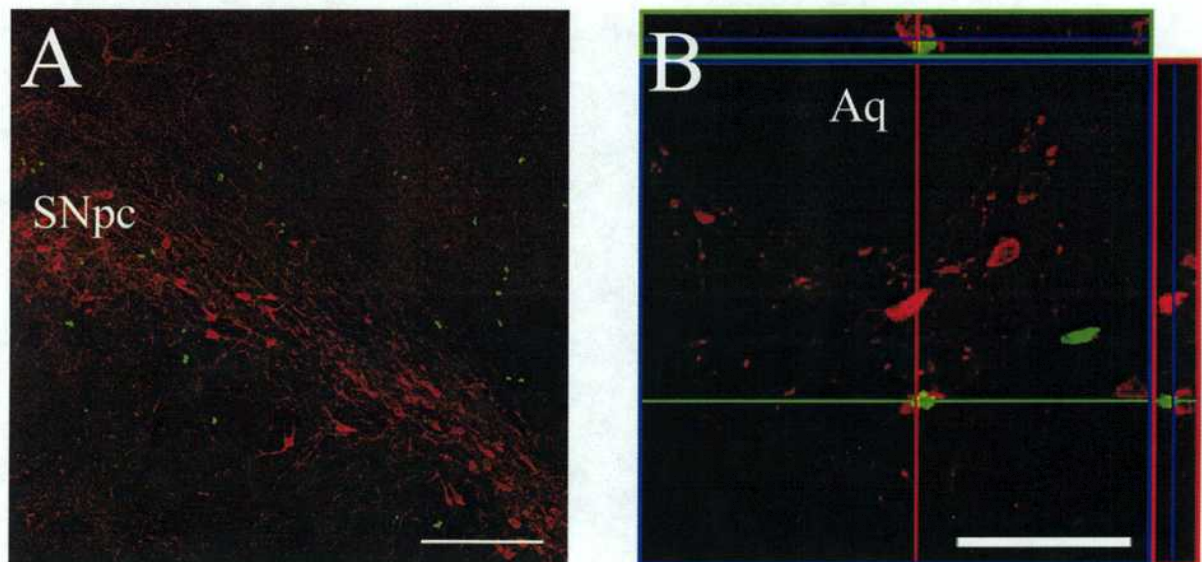
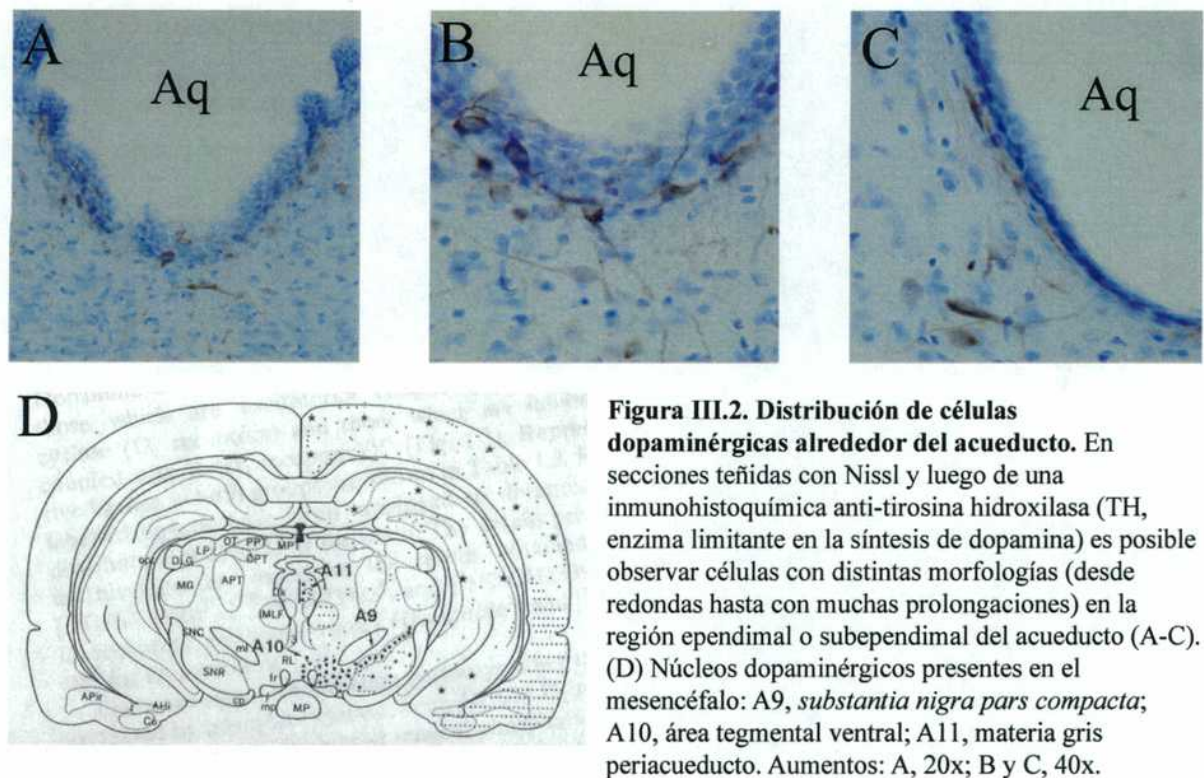
III.3. Resultados

Para estudiar si se generan nuevas neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo, administramos distintas dosis del análogo de nucleótido BrdU (que es incorporado al ADN en el proceso de división celular) a ratas tratadas de distintas maneras y analizamos luego sus cerebros mediante doble inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-BrdU y anti-tirosina hidroxilasa (TH, enzima limitante en la síntesis de dopamina). Así, establecimos como criterio de neurona dopaminérgica nueva que haya incorporado al marcador de proliferación BrdU y que exprese la enzima TH.

III.3.1. Neurogénesis en animales naïve.

El análisis de animales naïve mediante inmunohistoquímica muestra células positivas para TH en la vecindad del acueducto, las cuales tienen pocas prolongaciones y algunas parecen estar en contacto con la luz del ventrículo (Figura III.2.A-C). Esto nos sugirió que el acueducto podía ser fuente de precursores neuronales para el mesencéfalo, como los ventrículos laterales lo son del bulbo olfatorio. Es de notar que existen dos regiones de neuronas dopaminérgicas que se encuentran cerca del acueducto: la A10 o área tegmental ventral, y la A11 o materia gris periacueducto (Figura III.2.D). Algunas de las células que se observan podrían pertenecer a este último grupo, aunque la morfología no es la típica de neuronas maduras por la falta de prolongaciones.

Como primer intento de identificar nuevas neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo utilizamos ratas jóvenes ($43,3 \pm 3,4$ g al empezar el experimento). Las ratas recibieron una inyección diaria de BrdU durante 3 o 17 días, luego sus mesencéfalos fueron analizados mediante doble inmunofluorescencia para BrdU y TH. En estos animales observamos una fuerte marca para BrdU en la zona subventricular de los ventrículos laterales y en el giro dentado, así como de células dispersas por el mesencéfalo (Figura III.3.A). Sin embargo no observamos células doblemente marcadas (Figura III.3.B).



La marcación con BrdU tiene el problema de que el análogo de nucleótido debe estar presente en el organismo en el momento en que la célula se está dividiendo. De esta manera, si las células tienen una baja tasa de división posiblemente escapen a la marcación con BrdU. Como un método alternativo que permitiría detectar nuevas neuronas, inyectamos 10^9 DICT50 del vector adenoviral que expresa el gen reportero *lacZ* (Ad β gal) en un ventrículo lateral (Figura III.4.A). El vector se distribuyó a través del líquido céfalo-raquídeo transduciendo todas las células en contacto con el mismo. Los animales fueron sacrificados a 13, 19 y 25 días después de la inyección del Ad β gal y se analizaron mediante doble inmunofluorescencia contra β -galactosidasa (β gal) y TH (2 animales por tiempo). A los 13 días de la inyección del vector, observamos la expresión de β gal tanto en la pared de los ventrículos laterales (Figura III.4.B) como en el acueducto (Figura III.4.C). Sin embargo, no se observaron células transducidas lejos del ventrículo ni células doblemente positivas β gal/TH. Además, vale la pena recalcar que a los 25 días la expresión del transgén disminuye considerablemente, por lo cual este método no puede utilizarse para tiempos largos.

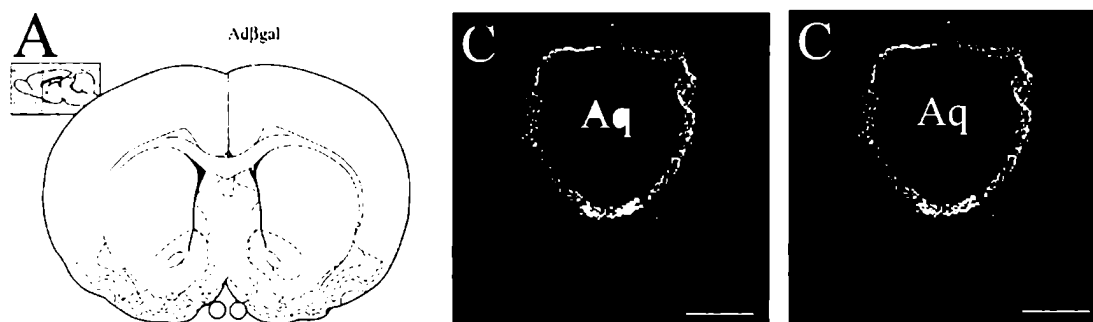


Figura III.4. Marcación de células endodimales mediante la inoculación i.c.v. del vector Ad β gal. (A) El vector adenoviral Ad β gal fue inyectado estereotáxicamente en el ventrículo lateral izquierdo. Mediante inmunofluorescencia anti- β gal se observan células endodimales en el ventrículo lateral derecho (B) y en el acueducto (C). Sin embargo no se observan células alejadas del acueducto en el mesencéfalo. Ad β gal, vector adenoviral que expresa β galactosidasa; V, ventrículo lateral; Aq, acueducto. Barras de escala: B, 500 μ m; C, 200 μ m.

III.3.2. Neurogénesis en animales lesionados con 6OHDA.

Dado que en animales naïve no pudimos observar neurogénesis en el mesencéfalo, nos preguntamos si el fenómeno podía ser inducido por una lesión específica del tipo celular que estábamos buscando. Para poner a prueba esta hipótesis

lesionamos animales con 6OHDA y los inyectamos con BrdU según lo descripto en Materiales y Métodos, sección 3.1., sacrificándolos a 12 y 28 días post-lesión.

En un total de 8 animales lesionados y otros tantos controles analizados, sólo observamos 3 células doblemente marcadas en el mesencéfalo (Figura III.5). Las mismas fueron detectadas en animales lesionados. En un animal sacrificado 12 días después de la lesión detectamos dos células marcadas con BrdU y que expresan la enzima TH, en las inmediaciones del acueducto (Figura III.5.A-C). En un animal sacrificado a los 28 días post-lesión encontramos una neurona doblemente marcada en la SNpc (Figura III.5.D-G). En el resto de los animales no se observaron células doblemente marcadas. Sin embargo, en los animales lesionados se observaron una gran cantidad de células en proliferación en la SNpc, las cuales resultaron ser microglia (ver Capítulo II, Figura II.4).

De estos resultados concluimos que la lesión de la SNpc no induce neurogénesis en la zona, al menos no a niveles fisiológica y/o terapéuticamente relevantes.

III.3.3. Neurogénesis en animales tratados con factores de crecimiento.

Finalmente evaluamos si podíamos inducir neurogénesis mediante la aplicación de conocidos factores de proliferación de progenitores neurales (bFGF y EGF), y/o la IL-1 β , que ha sido postulada como un factor de diferenciación a neuronas dopaminérgicas. Los factores fueron inyectados en el acueducto (ver Materiales y Métodos, sección 2.4.) de forma que puedan influir sobre los putativos progenitores, pero también con la intención de disminuir la respuesta glial a la inyección. Los animales fueron operados por la mañana y el mismo día recibieron la primera inyección de BrdU (a las 19 hs). Los tres días siguientes fueron inyectados con BrdU dos veces por día (a las 9 y a las 18 hs) y el cuarto día por la mañana fueron sacrificados.

En todos los casos, la inyección de cualquiera de los factores de crecimiento conllevó un aumento en el número de células positivas para BrdU en las inmediaciones del acueducto, cuando se los comparó con los animales inyectados con PBS (Figura III.6.A-E cuando se compara con F). Sin embargo, en ninguno de los animales fue posible observar células doblemente marcadas (BrdU y TH positivas).

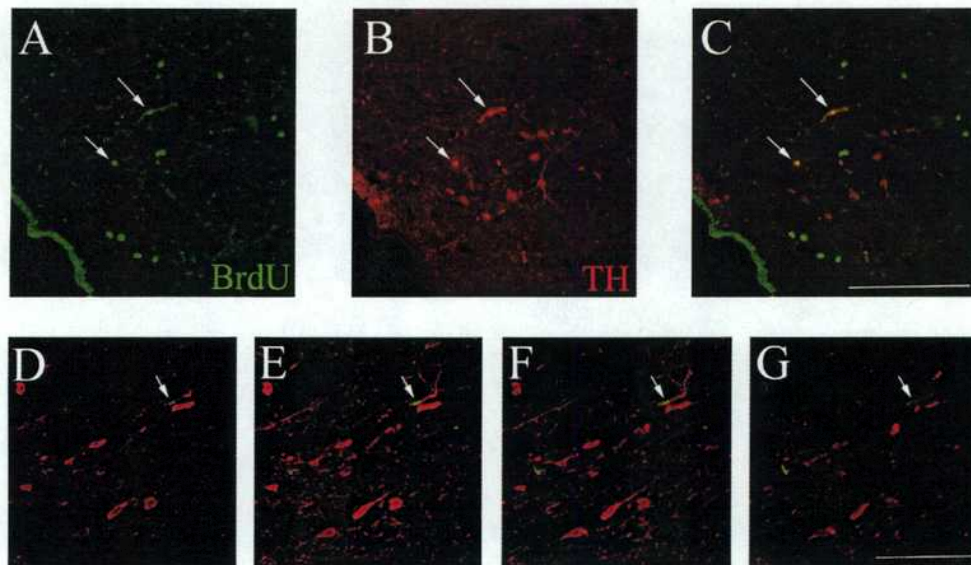


Figura III.5. Doble inmunofluorescencia anti-BrdU y TH de animales lesionados con 6OHDA. (A-C) Dorsalmente al acueducto de un animal lesionado con 6OHDA 12 días antes, detectamos dos células marcadas tanto para BrdU (A) como para TH (B) (flechas). Una presenta morfología redonda y la otra sólo dos prolongaciones. (D-G) En la SNpc de un animal lesionado 28 días antes detectamos una célula doblemente marcada con morfología neuronal (flecha). Serie de fotos en el eje z, separadas por 1,6 μ m. Barras de escala: A-C, 200 μ m; D-G, 400 μ m.

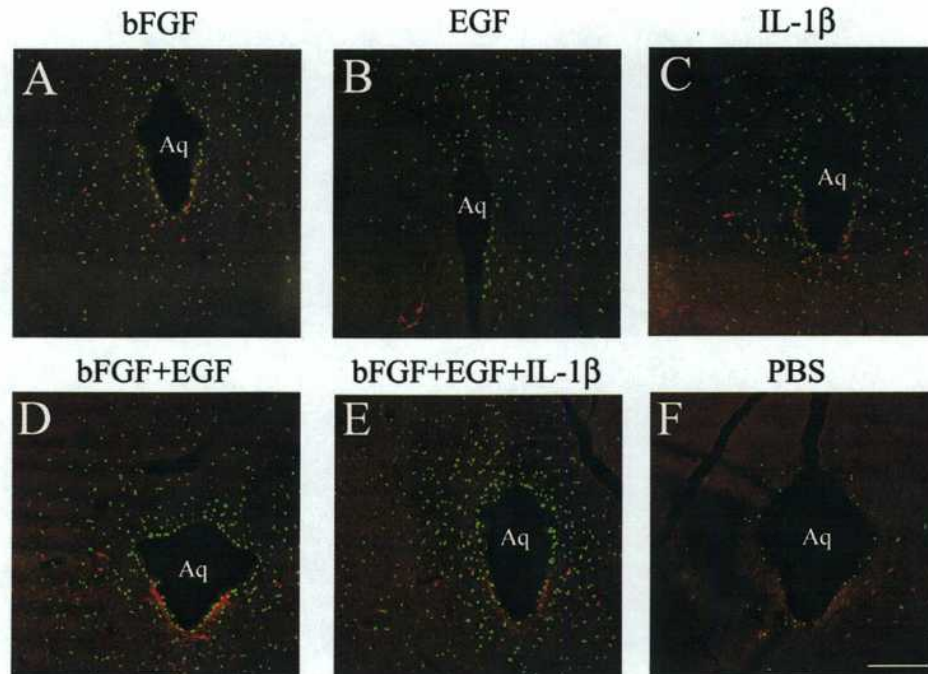


Figura III.6. Distribución de células BrdU+ (verde) y TH+ (rojo) en el mesencéfalo luego de la administración de factores tróficos en el acueducto. Administración de (A) 200 ng de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), (B) 200 ng de factor de crecimiento de epidermis (EGF), (C) 200 ng de IL-1 β , (D) 100 ng de bFGF + 100 ng de EGF, (E) 100 ng de bFGF + 100 ng de EGF + 100 ng de IL-1 β , (F) PBS. Aq, acueducto. Barra de escala: 200 μ m.

III.4. Discusión

De los resultados obtenidos en esta parte de la tesis podemos concluir que no existe neurogénesis en el mesencéfalo de ratas adultas, al menos en niveles que sean relevantes fisiológicamente. Es más, utilizando modelos experimentales que han demostrado ser efectivos en la estimulación de la proliferación y diferenciación en zonas neurogénicas y no neurogénicas tampoco pudimos observar el fenómeno en el mesencéfalo.

III.4.1. Neurogénesis en el cerebro adulto.

En los primeros reportes de neurogénesis en el cerebro adulto se utilizó timidina tritiada para detectar nuevas neuronas en el giro dentado de cobayos (Altman and Das, 1967) y en el bulbo olfatorio de la rata (Kaplan and Hinds, 1977). Pero estos trabajos pasaron mayormente inadvertidos hasta los años '90, cuando el desarrollo de la marcación con BrdU y su posterior detección mediante inmunohistoquímica dispararon la investigación en el campo. Desde entonces se ha caracterizado en gran detalle la neurogénesis en el giro dentado (por ejemplo, Eriksson et al., 1998; van Praag et al., 2002) y en el bulbo olfatorio (por ejemplo, Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002; Lois and Alvarez-Buylla, 1994), y se la ha buscado en otras regiones. Hoy existe consenso de que el giro dentado y la zona subventricular son regiones de activa neurogénesis en el cerebro mamífero adulto. Otros trabajos han reportado la existencia de neurogénesis en la corteza (Gould et al., 1999), pero estos trabajos siguen siendo motivo de discusión en cada congreso, ya que otros grupos no han podido repetir los resultados.

Debido principalmente a estas discusiones, varios investigadores han dedicado cierto esfuerzo a caracterizar la marcación con BrdU y la posterior detección mediante inmunofluorescencia (ver por ejemplo, Cooper-Kuhn and Kuhn, 2001). Esto ha llamado la atención sobre ciertas variables que han de tenerse en cuenta a la hora de usar este marcador: la toxicidad de las dosis inyectadas, las barreras a la difusión, la generación de imágenes confocales que permitan distinguir entre neuronas doblemente marcadas y células muy cercanas, etc. Por otro lado se ha planteado la necesidad de otras técnicas para marcar células en proliferación en el cerebro: retrovirus y tinturas como DiI (Walsh,

1999), y anticuerpos como el que reconoce al antígeno nuclear de proliferación celular, PCNA (Rakic, 2002).

En este trabajo buscamos nuevas neuronas dopaminérgicas por distintas metodologías (marcación con BrdU y con el vector adenoviral que expresa β -galactosidasa) pero no fuimos capaces de detectar nuevas neuronas en el mesencéfalo naïve. Cabe recalcar que en el microscopio común se observaron células que parecían doblemente marcadas pero las cuales, al ser analizadas en el microscopio confocal, aparecieron como dos células distintas aunque en íntimo contacto (ver por ejemplo Figura III.3.B). De hecho, las tres células doblemente marcadas fueron analizadas mediante disección óptica en el eje z ajustando el "pinhole" del confocal de forma de obtener imágenes de 1,6 μ m de grosor (ver Figura III.5.D-G).

Finalmente, en regiones donde no fue posible detectar nuevas células en condiciones fisiológicas (como la región CA1 del hipocampo y el estriado), fue posible estimular la neurogénesis luego de una lesión y de la administración de factores de crecimiento (Fallon et al., 2000; Nakatomi et al., 2002). Entre los factores más estudiados y caracterizados se encuentran bFGF (Palmer et al., 1999) y EGF (Kuhn et al., 1997), los cuales son necesarios o favorecen la proliferación de células stem en cultivo, pero también *in vivo* (Alonso, 1999; Nakatomi et al., 2002). Por otro lado, la IL-1 β ha sido identificada como uno de los factores necesarios para la diferenciación *in vitro* de células progenitoras mesencefálicas embrionarias a neuronas dopaminérgicas (Ling et al., 1998). Esto nos sugirió probar si podíamos inducir la generación de nuevas neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo de ratas lesionadas con 6OHDA o tratadas con factores que inducen proliferación (bFGF y EGF) y diferenciación (IL-1 β). Sin embargo, en ratas lesionadas sólo pudimos detectar unas pocas células doblemente marcadas y en ratas tratadas con trofinas ninguna. Esto nos sugiere fuertemente que el mesencéfalo y/o la *substantia nigra* es una región refractaria a la generación de nuevas neuronas dopaminérgicas en las condiciones estudiadas.

III.4.2. Evidencias y contra-evidencias de la existencia de neurogénesis en el mesencéfalo.

El primer trabajo que ha reportado la generación de nuevas neuronas en el acueducto (Alonso, 1999), ha sido por alguna razón poco citado. En ese trabajo se

utilizaron ratas adultas tratadas con bFGF, EGF o la combinación y se analizaron los distintos ventrículos en secciones de 200-300µm de grosor. En estas condiciones es posible observar células positivas para BrdU y la molécula de adhesión polisialinada (PSA-NCAM) en la proximidad del acueducto. Posiblemente la utilización de rodajas tan gruesas que le permiten analizar todo el animal favorezca la detección de estas células que se encuentran en muy bajo número. Por otro lado, el autor no ha analizado si las mismas se diferencian a neuronas dopaminérgicas, razón por la cual no entra en contradicción con el trabajo realizado en esta parte de la tesis.

El segundo trabajo que intenta detectar nuevas neuronas en la *substantia nigra* proviene del laboratorio donde se ha desarrollado gran parte del trabajo con BrdU (Chichung Lie et al., 2002). Los autores reportaron la proliferación celular luego de la lesión con 6OHDA (algo que nosotros vimos que se trata de microglia, ver Capítulo II), y determinaron que esas células no expresan la enzima TH. Sin embargo detectaron algunas células positivas para BrdU que expresan nestina (un marcador de células stem), por lo cual los autores se abocaron a estudiar el potencial neurogénico de las células progenitoras de la *substantia nigra in vitro*. En esas condiciones los autores pudieron comprobar la existencia de células progenitoras en la región, las cuales son capaces de proliferar y diferenciarse *in vitro*. Sin embargo, al trasplantarlas otra vez a la SNpc no generaron nuevas neuronas, mientras que cuando las trasplantaron en el giro dentado sí. Todo esto llevó a los autores a proponer que si bien existen progenitores en el mesencéfalo, el ambiente impediría la proliferación y diferenciación de los mismos.

El tercer trabajo que estudió la neurogénesis en la SNpc utilizó animales naïve y lesionados con MPTP (Zhao et al., 2003) y dos vías de administración de la BrdU: intraperitoneal (i.p.) e intra-cerebro-ventricular (i.c.v.). En ratones naïve los autores reportan $0,8 \pm 0,5$ y $5,3 \pm 1,3$ neuronas por animal luego de la inyección i.p. o i.c.v., respectivamente. En animales lesionados los números rondan la 8 células por animal. Con estos resultados, los autores concluyen que existe neurogénesis en la SNpc. Este trabajo presenta ciertos problemas técnicos derivados de las grandes cantidades de BrdU utilizadas y de su posible toxicidad. Pero aunque este no sea el caso, los resultados no difieren tanto de los obtenidos en esta tesis y considero que muestran que la neurogénesis no es un fenómeno que aporte a la fisiología de la SNpc.

En resumen, los resultados obtenidos en esta parte de la tesis fueron corroborados mientras la misma finalizaba, sugiriendo que la neurogénesis es un fenómeno muy raro

en la SNpc de mamíferos adultos, si bien en uno de los trabajos se concluye otra cosa. Además, los resultados obtenidos por Chichung Lie et al. (2002) sugieren que esta limitación no se debe a la ausencia de células progenitoras en la región, sino a factores presentes en el ambiente que impiden la proliferación y diferenciación de las mismas. Esto no sólo impide que exista neurogénesis endógena, sino que debe tenerse en consideración a la hora de realizar trasplantes (ver próxima sección). Por otro lado, al no poder evidenciar el fenómeno no pudimos evaluar el rol de la IL-1 β en el mismo.

III.4.3. Perspectivas de una terapia de reemplazo para la enfermedad de Parkinson.

Debido a la falta de neurogénesis en el mesencéfalo adulto y a que las células progenitoras obtenidas del mismo no pueden diferenciarse e integrarse cuando son transplantadas, deben buscarse otros métodos de reemplazo celular si se quiere desarrollar una terapia para la enfermedad de Parkinson.

En este sentido se han obtenido resultados promisorios utilizando células stem embrionarias que se trasplantan en el estriado lesionado (Björklund et al., 2002; Kim et al., 2002; Sawamoto et al., 2001). En estos trabajos los autores demuestran la integración del trasplante al tejido y la recuperación funcional de los animales. Sin embargo, esto mismo ha sido observado con otros tipos celulares que secretan dopamina, por lo cual la recuperación se debe a la administración del neurotransmisor y no al reestablecimiento de la vía nigro-estriatal. El hecho de que estas células no estén reguladas por las aferencias de la SNpc puede potencialmente generar problemas similares a los observados con L-DOPA.

Por otro lado, la utilización de células stem embrionarias humanas sigue siendo un motivo de discusión ética en la sociedad, lo cual pone fuertes limitaciones a su utilización en terapia. En este sentido la utilización de progenitores obtenidos de adultos se presenta como la mejor solución, aunque los mismos han sido menos caracterizados y se sabe menos de su biología (por ejemplo, los factores que son efectivos en la inducción de proliferación y diferenciación de células stem embrionarias pueden no ser efectivos en progenitores adultos, y el ambiente puede afectar de manera diferencial a unos y a otros). Es más, si se busca el auto-trasplante de forma de evitar el rechazo deberían estudiarse

las características que tienen los progenitores de cerebros probablemente viejos y enfermos.

Finalmente se desconocen cuáles son los factores que impiden que las células progenitoras de la *substantia nigra* proliferen y se diferencien. Un enfoque alternativo podría ser la identificación de estos factores y su manipulación de manera de convertir una región resistente a la neurogénesis en una que la favorezca. En otras regiones esto se ha logrado con lesiones y con la administración de factores de crecimiento (Fallon et al., 2000; Nakatomi et al., 2002). Podrían identificarse cuáles son los tratamientos que logran esto en la *substantia nigra*.

En conclusión, pudimos demostrar que la estimulación de la neurogénesis endógena por estímulos tradicionales (lesión y factores de crecimiento) y por una citoquina pro-inflamatoria no es un fenómeno que se presente como alternativa directa para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo este fenómeno puede ser explotado mediante variantes como los trasplantes, la identificación de factores que aumenten la supervivencia y función de las neuronas que quedan en la SNpc, etc.

Capítulo IV.

Modulación del aprendizaje mediada por la IL-1 endógena hipocampal.

Parece que si la actividad psíquica es el resultado de la actividad fisiológica de una cierta masa cerebral, basta emprender el estudio desde el punto de vista fisiológico para que su exploración tenga el mismo éxito que el análisis funcional de los otros órganos. Sin embargo, no fue así durante mucho tiempo."

Iván Pavlov
"El reflejo condicionado"

IV.1. Punto de partida

Todos los ligandos y receptores de la IL-1 han sido detectados en el hipocampo, no sólo en condiciones patológicas, sino también fisiológicas (Hopkins and Rothwell, 1995; Pitossi et al., 1997; Vitkovic et al., 2000). Además, la IL-1 β aplicada de manera exógena puede modular la actividad neuronal inhibiendo la entrada de calcio (Murray et al., 1997; Plata-Salamán and French-Mullen, 1994) o a la quinasa de proteínas C, PKC (Murray et al., 1997), o inhibiendo la liberación de acetilcolina (Rada et al., 1991) o de glutamato (Murray et al., 1997) en el hipocampo normal (revisado en Vitkovic et al., 2000). Además, la IL-1 β modula procesos relacionados al aprendizaje, como la potenciación a largo plazo (LTP) (Bellinger et al., 1993; Cunningham et al., 1996; Katsuki et al., 1990; Murray and Lynch, 1998; Schneider et al., 1998). Sin embargo, en este modelo los niveles fisiológicos de la IL-1 tienen efectos opuestos a los observados cuando grandes cantidades de la citoquina son inducidos o aplicados exógenamente.

Aunque reportes previos demostraron que la IL-1 β puede jugar un rol en los procesos de aprendizaje y memoria patofisiológicos (Oitzl et al., 1993; Pugh et al., 1998; Pugh et al., 1999; revisado en Pugh et al., 2001), estos trabajos no han evaluado si la IL-1 endógena hipocampal modula la adquisición o consolidación de la memoria durante situaciones no patológicas.

Para evaluar el rol la participación del sistema IL-1 en el aprendizaje, cuantificamos la expresión de los ligandos (IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra) durante la consolidación de una memoria motivada por miedo que es dependiente del hipocampo y que es adquirido en una sola y breve sesión de entrenamiento (Gold, 1986; Lorenzini et al., 1996; Taubenfeld et al., 1999; Thompson, 1977; Winocur and Bindra, 1976). Una gran cantidad de estudios han demostrado la habilidad del antagonista IL-1ra para bloquear la actividad tanto de IL-1 α como de IL-1 β , tanto *in vivo* como *in vitro* (revisado en Dinarello and Thompson, 1991). En este contexto logramos la expresión constante del IL-1ra en el hipocampo dorsal, a través de la administración de un vector adenoviral (AdIL-1ra), y evaluamos a los animales así tratados en su capacidad para aprender en un paradigma aversivo y/o a habituarse a un ambiente novedoso.

IV.2. Objetivos

El objetivo de esta parte de la tesis es evaluar si la IL-1 endógena hipocampal está involucrada en la adquisición, la consolidación y/o la evocación de memoria.

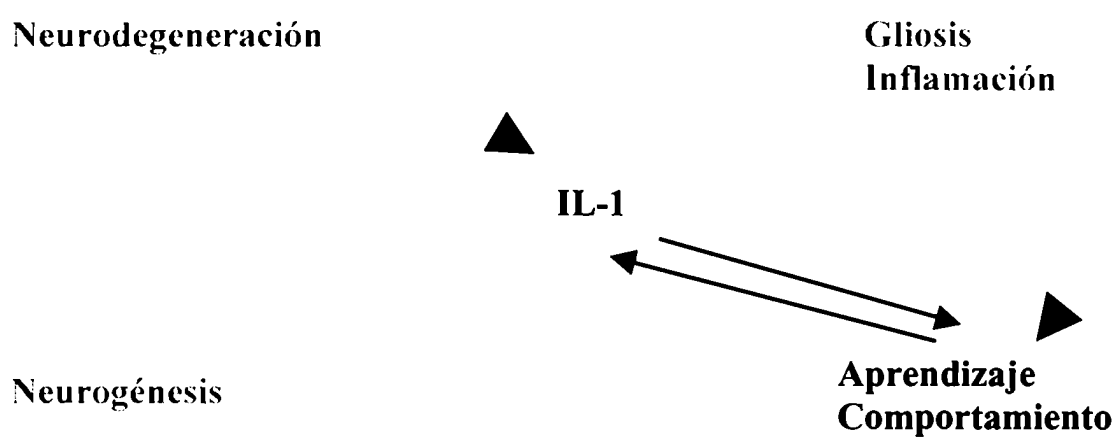


Figura IV.1. Esquema de los objetivos del Capítulo IV en el marco de los objetivos generales de la tesis. Utilizando un modelo de aprendizaje, se evaluará la expresión de los ligandos de IL-1. Por otro lado, se modificará la señalización de IL-1 y se evaluará su efecto sobre el aprendizaje y el comportamiento. Las cabezas de flecha indican las variables alteradas en este capítulo.

IV.3. Resultados

IV.3.1. Expresión de los ligandos de IL-1 en el hipocampo luego del entrenamiento aversivo.

Para estudiar el rol del sistema de IL-1 hipocampal en el aprendizaje y la memoria, evaluamos si el entrenamiento en la tarea de evitación pasiva se encuentra asociada con la inducción de la expresión de IL-1 α , IL-1 β y/o IL-1ra. Este aprendizaje motivado por el miedo es adquirido en un único ensayo breve (Gold, 1986; Taubenfeld et al., 1999), constituyendo un modelo ideal para investigar eventos que ocurren durante el procesamiento de la memoria.

En tres experimentos independientes, ratas Wistar macho (n=57, 200-260g) fueron divididos al azar en tres grupos. Una parte de los animales fue entrenada en un paradigma de aprendizaje aversivo y fueron sacrificados 1, 4, 6 y 9 horas después del entrenamiento (n=5-7 por tiempo). Como control, se ubicaron animales directamente sobre la grilla de la caja de evitación pasiva (ver Materiales y Métodos, sección 6.2.) y se les aplicó el mismo shock eléctrico que reciben los animales entrenados. Estos animales fueron sacrificados a los mismos tiempos post-shock que los animales entrenados (n=5-7 por tiempo). Finalmente se sacrificaron animales naïve a los mismos tiempos, de forma de controlar variaciones circadianas de la expresión de los genes de interés. Ver un esquema del diseño experimental en la Figura IV.2.

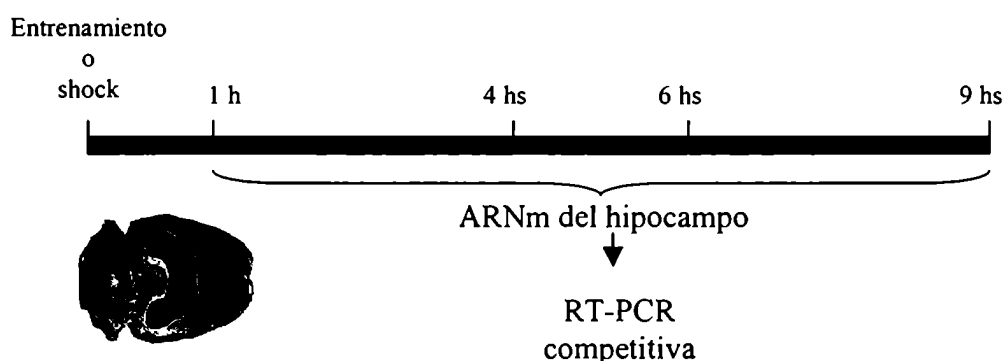


Figura IV.2. Diseño experimental para el análisis de la expresión de IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra durante la consolidación de una memoria aversiva. Los animales son sacrificados a 1, 4, 6 o 9 horas luego del tratamiento, el hipocampo es disectado y procesado para extraer el ARN total. Luego se determinan los niveles de los ligandos del receptor de IL-1 mediante RT-PCR competitiva semi-cuantitativa. Inserto: localización del hipocampo en el cerebro de rata.

Los animales fueron sacrificados por decapitación, el hipocampo disecado inmediatamente y congelado en hielo seco. Los tejidos fueron guardados a -70°C hasta su procesamiento. Se extrajo el ARNm y se determinaron los niveles de IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra mediante RT-PCR competitiva semi-cuantitativa (ver Materiales y Métodos, sección 4.).

Encontramos que los niveles hipocampales de los ARNm para IL-1 α se encuentran aumentados 4 horas luego del entrenamiento aversivo respecto a los animales que sólo recibieron el shock eléctrico (E4 vs S4, $p < 0,01$ en una comparación de Newman-Keuls luego de ANOVA de una vía, $n = 5-7$ por grupo) (Figura IV.3.A). No se observaron aumentos en los animales que recibieron el shock (ubicados directamente sobre el piso electrificado) a este o a los otros tiempos analizados (1, 6 y 9 horas) cuando se compararon con animales naïve. Esto muestra que la inducción de los ARNm para IL-1 α está relacionada con la adquisición de la asociación entre el bajar de la plataforma y recibir el shock y que no puede ser explicada por el estrés causado por el shock mismo. Es importante remarcar aquí que los animales sometidos a shock suaves (como el utilizado en este experimento) no exhiben condicionamiento contextual de miedo (Alonso et al., 2000), o sea que la exposición al shock no es suficiente para adquirir la asociación entre el bajar de la plataforma y recibir el shock.

Por otro lado, los niveles de los ARNm para IL-1 β (Figura IV.3.B) e IL-1ra (Figura IV.3.C) no presentan diferencias significativas entre los grupos a ninguno de los tiempos analizados. Cabe notar también que no se evidenciaron variaciones circadianas en los niveles de las tres moléculas analizadas en los hipocampos de animales naïve.

Resumiendo, el entrenamiento que resulta en evitación pasiva correlaciona con un aumento de los niveles de ARNm para IL-1 α en el hipocampo 4 horas después del entrenamiento.

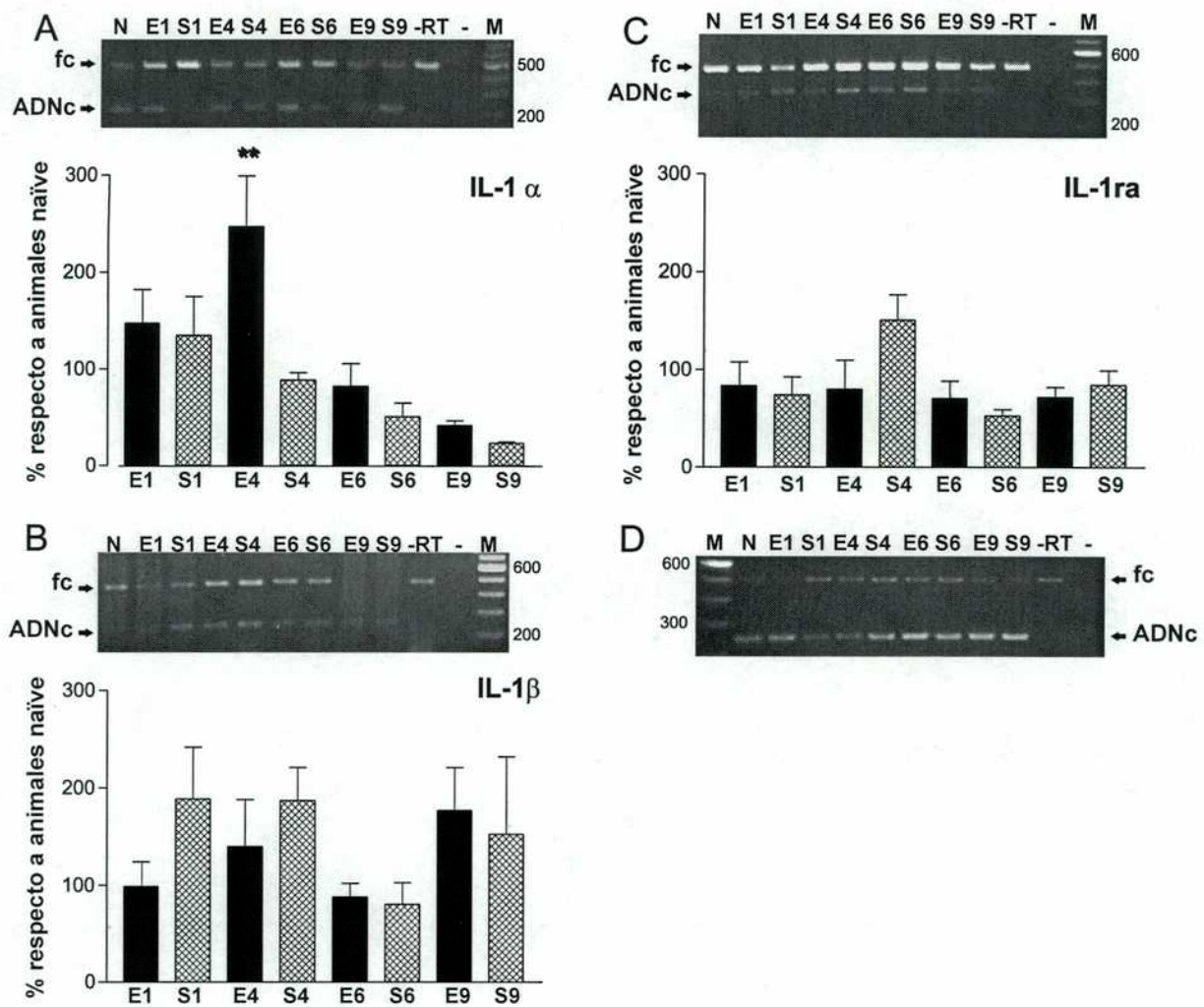


Figura IV.3. Análisis de la expresión de las citoquinas IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra en el hipocampo luego del entrenamiento aversivo, estimadas por RT-PCR competitiva semicuantitativa. Se muestran geles representativos y los análisis densitométricos para IL-1 α (A), IL-1 β (B) e IL-1ra (C) normalizados por los niveles de expresión de β 2-microglobulina (D). Se expresan los datos de los animales entrenados (barras negras) y de los que sólo reciben el shock (barras cuadriculadas) a diferentes tiempos post-entrenamiento, como porcentaje de los animales naïve, para facilitar su visualización. Se graficaron las medias + error estándar de la media; $n=5-8$, $**p<0,01$ con respecto al grupo que sólo recibió el shock, en una prueba de Newman-Keuls. M, marcador de peso molecular; N, naïve; E1, entrenados a 1 hora; S1, shockeados a 1 hora; E4, entrenados a 4 horas; S4, shockeados a 4 horas; E6, entrenados a 6 horas; S6, shockeados a 6 horas; E9, entrenados a 9 horas; S9, shockeados a 9 horas; -RT, control sin transcriptasa reversa; -, control negativo; fc, fragmento de competición.

IV.3.2. La IL-1 hipocampal modula el aprendizaje motivado por miedo tanto a corto como a largo plazo.

Para determinar si la actividad biológica endógena hipocampal de IL-1 α y/o IL-1 β modula un aprendizaje motivado por miedo, utilizamos un vector adenoviral que expresa al antagonista IL-1ra de rata (AdIL-1ra). Este adenovector nos permitió analizar el rol de la IL-1 en situaciones no patológicas, ya que el IL-1ra bloquea la unión de los ligandos endógenos sin ejercer acciones agonistas (Dinarello and Thompson, 1991).

En tres experimentos independientes se inyectaron ratas Wistar macho (160-260g) en la región CA1 del hipocampo (bilateralmente) con los vectores adenovirales expresando IL-1ra o β -galactosidasa (Figura IV.4.). Para minimizar la lesión causada por la cirugía, los vectores adenovirales fueron inyectados utilizando capilares ultrafinos (50 μ m de diámetro) y un flujo lento (0,2 μ l/min). El capilar es dejado durante 2 minutos adicionales antes de su remoción. Se inocularon 10^7 partículas del adenovector que expresa el antagonista (AdIL-1ra) o de uno que expresa el gen reportero lacZ (Ad β gal), en un volumen de 1 μ l de PBS por hemisferio (bilateralmente).

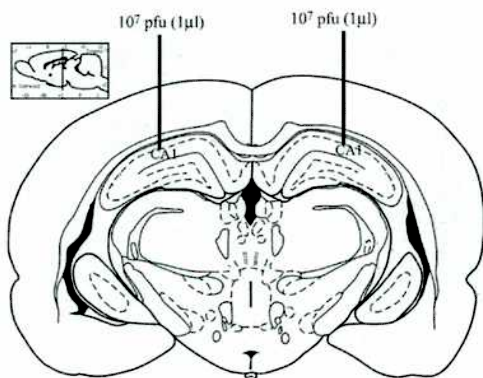


Figura IV.4. Sitio de inyección de los vectores AdIL-1ra y Ad β gal en la región CA1 del hipocampo. Las coordenadas para la inyección en la región CA1 fueron obtenidas del atlas del cerebro de rata (Paxinos and Watson, 1986).

Se procuró detectar la proteína IL-1ra de rata por inmunohistoquímica a los 15 días post-transducción (que corresponde al pico de expresión), pero sólo se obtuvieron señales esfumadas, aún utilizando técnicas de alta amplificación como la que emplea tiramida (Catalysed Signal Amplification System, DAKO, CA, USA). Debido a que no existen mejores anticuerpos y que con esta señal difusa no era posible estudiar la distribución de los vectores adenovirales, se realizó inmunohistoquímica de la proteína β -galactosidasa en los animales inyectados con Ad β gal. Como ambos vectores (AdIL-1ra y Ad β gal) comparten la

cápside se espera que tengan la misma distribución y tropismo. Mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra el marcador neural NeuN y otro anti- β galactosidasa (ver Materiales y Métodos, sección 7.4.8.), se observaron tanto neuronas (células positivas para NeuN, Figuras IV.5.A y B) y células gliales (células negativas para NeuN y con morfología glial, Figuras IV.5.A y C) que expresan el transgén (positivas para β -galactosidasa). Esto indica que ambos tipos celulares son transducidos por los vectores utilizados.

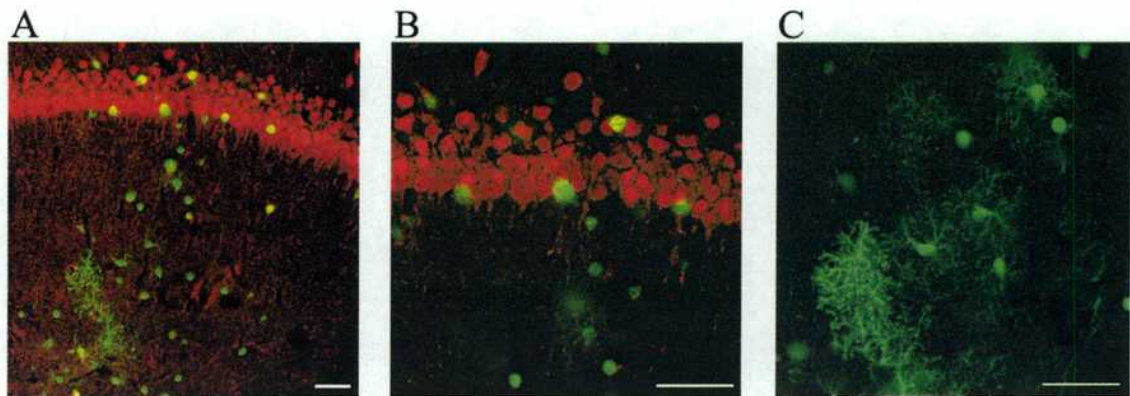


Figura IV.5. Los vectores adenovirales transducen tanto neuronas como células gliales de la región CA1 del hipocampo. (A) Doble immuno-fluorescencia contra NeuN (rojo) y β -galactosidasa (verde), mostrando la expresión del transgén tanto en neuronas (flecha) como en glia (cabeza de flecha) de la región CA1. (B) Amplificación de A, mostrando la expresión neuronal de la β -galactosidasa (flecha). (C) Amplificación de A, mostrando células negativas para NeuN que expresan el transgén y presentan una morfología típica de células de la glia. Barra de escala: 50 μ m.

Además, cabe mencionar que la expresión del transgén fue observada únicamente en el hipocampo dorsal, tanto en la región CA1 como en el giro dentado (DG), 1 mm anterior y posterior al sitio de inyección, donde su expresión es máxima (Figura IV.6). Es importante recalcar que, independientemente de que el sitio de inyección sea la región CA1, la mayoría de las células positivas para β -galactosidasa se encontraron siempre en el DG y en la fisura hipocampal (Figura IV.6), distribución que ya había sido observada previamente (Le Gal La Salle et al., 1993).

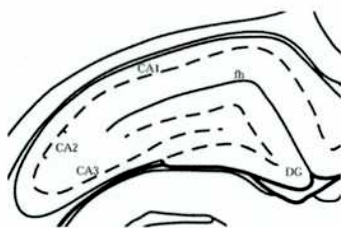
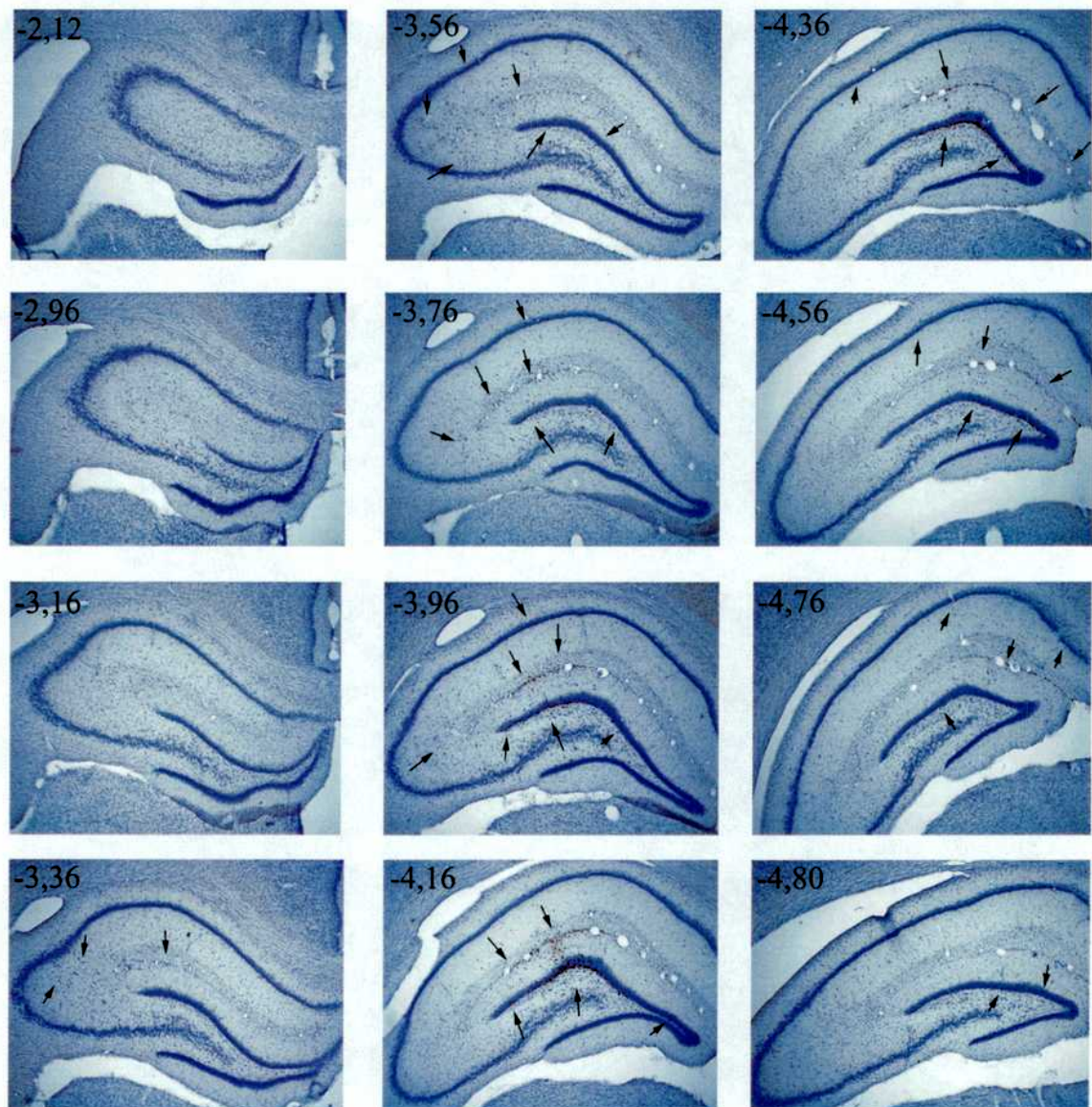


Figura IV.6. Distribución antero-posterior de la expresión de β -galactosidasa en el hipocampo dorsal, dos semanas después de la inyección del Ad β gal. Los números en la esquina superior-izquierda representan la posición antero-posterior en milímetros respecto al bregma (según Paxinos and Watson, 1986). Se observa la máxima expresión en el sitio de inyección (-4,16mm), pero una distribución extendida hacia adelante (-3,36mm) y hacia atrás (-4,76mm). Las flechas indican ejemplos de células que expresan β gal, para hacer notar la distribución. Barra de escala: 500 μ m. Esquema mostrando las distintas estructuras dentro de la formación hipocampal: DG, giro dentado; fh, fisura hipocampal; líneas puntadas, neuronas.

Los animales inyectados no presentaron signos de comportamiento de enfermedad ("sickness behavior") durante el experimento. Luego de una semana de recuperación de la cirugía, los animales inyectados fueron entrenados junto con animales naïve en el paradigma de aprendizaje aversivo (ver Materiales y Métodos, sección 6.2.), ver el diseño experimental en la Figura IV.7. Trabajos previos (Coogan et al., 1999) habían demostrado que la IL-1 tiene efecto sobre la plasticidad sináptica tanto a corto como a largo plazo. Por ello, evaluamos el efecto de la expresión estable de IL-1ra en el hipocampo tanto sobre la memoria de corto plazo (STM) como sobre la de largo plazo (LTM), luego del entrenamiento aversivo. La memoria fue determinada como el aumento en el tiempo de latencia a bajar de la plataforma 1,5 o 24 horas después del entrenamiento (Izquierdo et al., 1998).

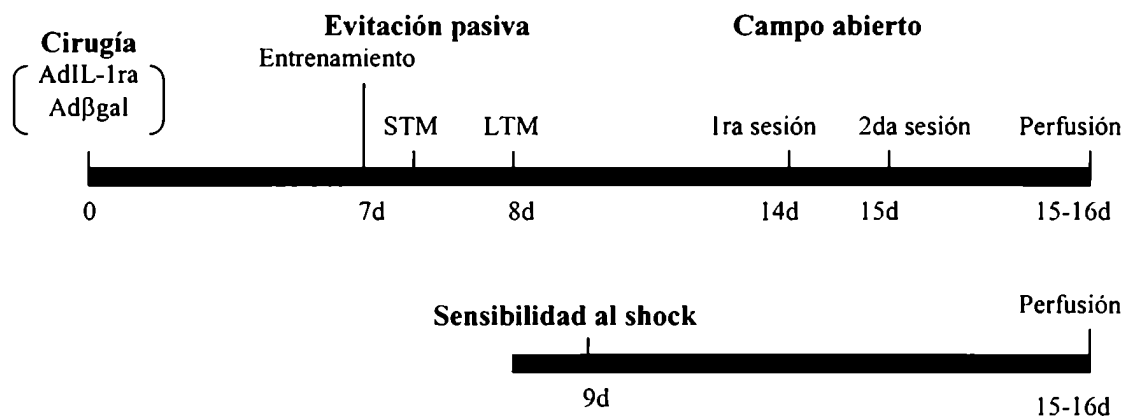


Figura IV.7. Análisis de los efectos de la inoculación del AdIL-1ra en la adquisición de dos tipos de memoria dependientes del hipocampo. Se evaluó tanto la memoria a corto como a largo plazo en una tarea de evitación pasiva y la habituación a un ambiente novedoso. Asimismo se evaluó la sensibilidad a un shock eléctrico de los distintos grupos experimentales.

Los animales inyectados con el AdIL-1ra mostraron facilitación tanto a corto como a largo plazo cuando se compararon con el grupo control inyectado con el Adβgal (STM, $p=0,0061$ y LTM, $p=0,0471$; Figura IV.8.). Cabe mencionar que no se observaron diferencias entre las latencias de los animales inyectados con el Adβgal o los animales naïve, demostrando que la cirugía y la infusión del vector no modifican *per se* la retención 1,5 y 24 horas después del entrenamiento (STM, $p=0,7702$ y LTM, $p=0,5854$). Además, no se observaron diferencias entre los grupos en las latencias del entrenamiento (Figura IV.9.), mostrando que la facilitación de la memoria no puede ser atribuida a un efecto más general

que está afectando el entrenamiento. Este control era importante ya que debido al diseño experimental los animales se encuentran bajo la influencia de la proteína IL-1ra desde antes del entrenamiento.

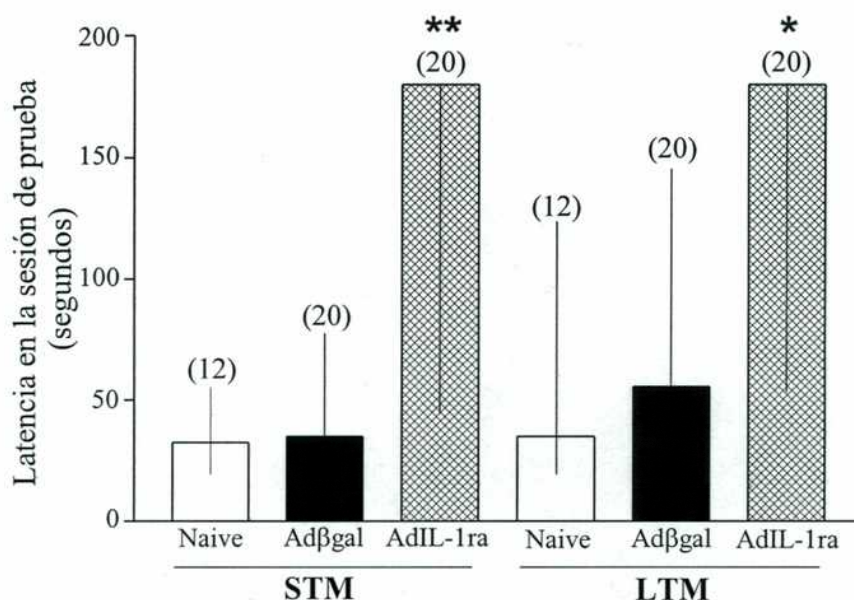


Figura IV.8. La IL-1 hipocampal modula el aprendizaje motivado por el miedo tanto a corto como a largo plazo. Los animales inyectados con el vector adenoviral que expresa el antagonista de la IL-1 (AdIL-1ra, barras cuadrículadas) muestran una facilitación tanto de la memoria de corto como de largo plazo en la tarea de evitación inhibitoria, cuando se los compara con los animales inyectados con el vector control (Adβgal, barras negras) o los naïve (barras blancas). Debido a la imposición de un techo de 180 segundos a la latencia los datos son analizados en pruebas estadísticas no paramétricas (ver Materiales y Métodos, sección 6.2.). Por ello, se expresan los datos como mediana $\pm$ rango intercuartilo de la latencia a bajar de la plataforma en la caja de evitación inhibitoria, a corto (1,5h) y a largo plazo (24hs). ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ versus grupo Adβgal, prueba *U* de Mann-Whitney. Los números entre paréntesis representan el n de cada grupo.

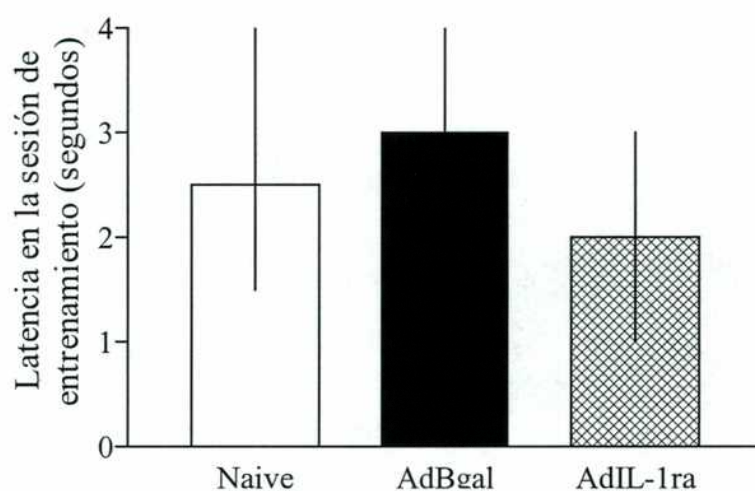


Figura IV.9. Latencias en la sesión de entrenamiento de los tres grupos experimentales. No se observaron diferencias entre los grupos naïve (barras blancas), Adβgal (barras negras) y AdIL-1ra (barras cuadrículadas). Los datos se expresan como mediana $\pm$ intervalo intercuartilo de la latencia a bajar de la plataforma en la caja de evitación inhibitoria durante el entrenamiento.

Diversos factores inespecíficos que afectan los procesos sensoriales y motores pueden influir sobre la retención de tareas de evitación pasiva (Izquierdo and Medina, 1997). Para evaluar si la facilitación observada en los animales inyectados con el AdIL-1ra se debía a una diferente sensibilidad al shock eléctrico inducida por el transgén, en uno de los experimentos se compararon las latencias de los tres grupos a vocalizar y a saltar frente a intensidades crecientes de shock eléctricos leves (Pittenger et al., 2002; Shimizu et al., 2000) (ver diseño en Figura IV.7.). No se observaron diferencias entre el grupo AdIL-1ra y los grupos Ad β gal o naïve en las latencias a vocalizar ($p=0,7140$, $n=8-10$, ANOVA, Figura IV.10.A) o saltar ($p=0,1843$, $n=8-10$, ANOVA, Figura IV.10.B). Es más, todos los grupos mostraron umbrales de sensibilidad al shock inferiores a la corriente utilizado en el entrenamiento (0,4 mA frente a medias inferiores a $0,27\pm0,02$ y $0,33\pm0,01$ mA para vocalización y saltos, respectivamente). De esta manera concluimos que los animales tienen sensibilidades al shock similares durante el entrenamiento y que por ello los resultados obtenidos no pueden ser adjudicados a una hiperalgesia en los animales inyectados con el AdIL-1ra.

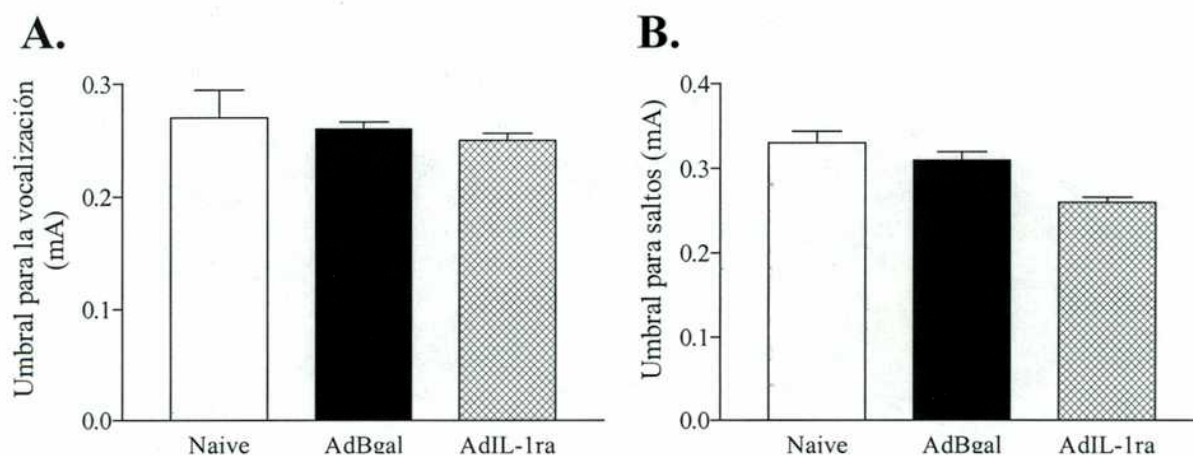


Figura IV.10. Análisis de la sensibilidad al shock eléctrico en las patas, en los tres grupos experimentales. Se aplicaron intensidades crecientes de corriente (ver Materiales y Métodos, sección 6.4.) y se determinó la mínima corriente necesaria para provocar una vocalización (A) o un salto (B) en cada animal. Se grafica la media del umbral + el error estándar de la media para los animales naïve (barras blancas), Ad β gal (barras negras) y AdIL-1ra (barras cuadriculadas). No se observaron diferencias en los umbrales.

Por otro lado, nos preguntamos si el aumento en la latencia a bajar de la plataforma no se debía a una disminución en la actividad locomotora del grupo AdIL-1ra. Este no parece ser el caso, por al menos dos razones. Primero, como ya se remarcó anteriormente, los grupos no presentan diferencias en las latencias a bajar de la plataforma en la sesión de entrenamiento

(Figura IV.9.). Segundo, observamos que la infusión de AdIL-1ra o Ad β gal no producen cambios en la actividad locomotora desarrollada durante 5 minutos de exploración libre en un campo abierto, tanto cuando se evalúa el número de cruces ($p=0,1577$, $n=4-14$, ANOVA, Figura IV.11.A) como cuando se contabilizan el número de rearings ($p=0,6171$, $n=4-14$, ANOVA, Figura IV.11.B).

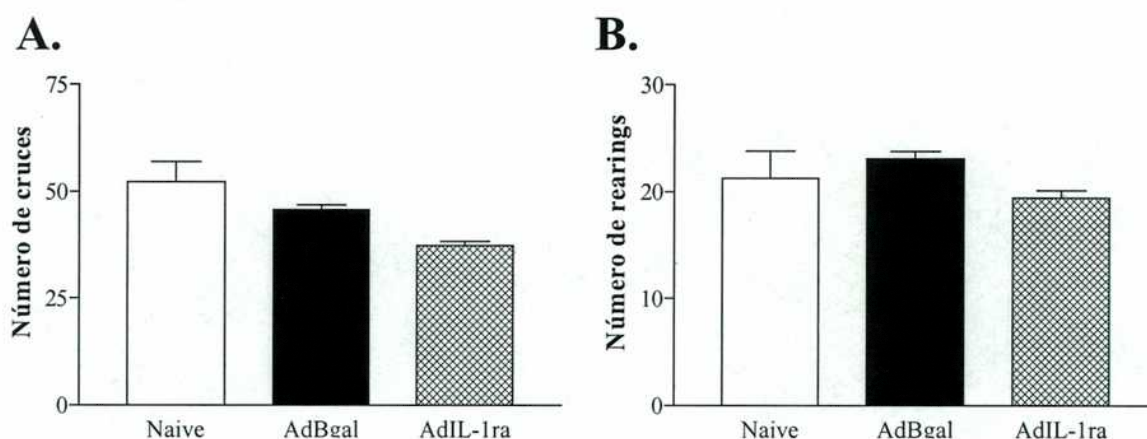


Figura IV.11. Análisis de la actividad locomotora durante 5 minutos de exploración libre en un campo abierto. Se determinó el número de cruces (A) y de veces que se pararon en dos patas (rearings, B) de animales naïve (barras blancas), Ad β gal (barras negras) y AdIL-1ra (barras cuadriculadas), durante 5 minutos en un campo abierto (ver Materiales y Métodos, sección 6.3.). Se graficó la media + error estándar de la media.

Todos estos datos indican que el bloqueo de los receptores de IL-1 hipocampales produce un aumento en la retención que no puede ser explicado por efectos inespecíficos sobre la latencia a bajar de la plataforma.

IV.3.3. La IL-1 endógena hipocampal no modula la habituación de largo plazo a un ambiente novedoso

Finalmente, quisimos determinar si el AdIL-1ra que facilita la consolidación de una memoria aversiva también modula la habituación a un ambiente novedoso, que también es una tarea dependiente del hipocampo pero que se diferencia de la evitación pasiva en no ser asociativa (ver diseño en Figura IV.7.). Observamos que tanto el grupo AdIL-1ra como el Ad β gal muestran habituación a largo plazo en la sesión de prueba realizada 24 horas después de la primera exposición al ambiente novedoso (Figura IV.12.). No se encontraron diferencias entre los grupos cuando se evaluaron el número de cruces ($p=0,3563$, prueba t de Student no

pareada) o el número de rearings ($p=0,1482$, prueba t de Student no pareada) en la sesión de prueba. Esto indica que la IL-1 endógena hipocampal no modula la habituación a largo plazo a un ambiente novedoso.

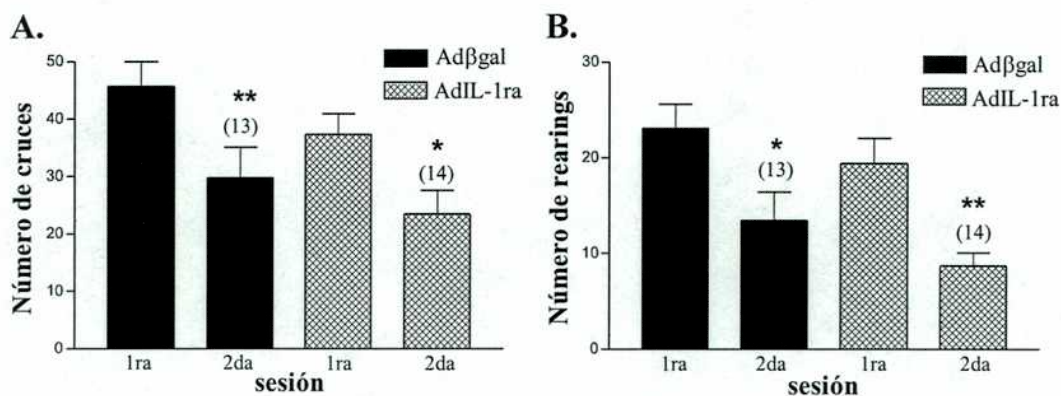


Figura IV.12. La IL-1 hipocampal no modula la habituación a largo plazo a un ambiente novedoso. Se evaluó el número de cruces (A) y de rearings (B) en 5 minutos de exploración libre de animales inyectados con el vector control (Adβgal, barras negras) y con el que expresa el antagonista (AdIL-1ra, barras cuadrículadas). Los datos representan la media + error estándar de la media en la sesión de entrenamiento (1ra) y 24 horas después (2da). Los números entre paréntesis indican el n de cada grupo. Las diferencias entre la primera y la segunda sesión son significativas en ambos grupos y para los dos parámetros analizados, lo cual indica que en los dos grupos tiene lugar la habituación (** $p<0,01$, * $p<0,05$ en pruebas t de Student pareadas).

IV.4. Discusión

En esta parte de la tesis hemos demostrado por primera vez que la IL-1 α endógena modula el aprendizaje en ratas, en condiciones no patológicas (Depino et al., 2003a). Si bien otros trabajos evaluaron el rol de la IL-1 en el aprendizaje y la memoria, la mayoría de los mismos fueron realizados en condiciones que inducen un comportamiento patológico ("sickness behavior", ver Dantzer, 2001) o estudiando el efecto de la inoculación de nanogramos de la citoquina en el cerebro (ver una revisión en Pugh et al., 2001). Muy por el contrario, nuestro diseño experimental permitió evaluar el rol de la actividad biológica de la IL-1 que está presente de manera constitutiva y/o fisiológica en el hipocampo durante el aprendizaje.

IV.4.1. Rol de la IL-1 α en el aprendizaje.

La mayoría de los estudios sobre el rol de citoquinas pro-inflamatorias en el aprendizaje y la memoria se han concentrado en la IL-1 β , porque su expresión en el cerebro está muy bien documentada en condiciones normales y patológicas (revisado en Hopkins and Rothwell, 1995) y es la forma secretada mayoritaria (Rothwell and Luheshi, 1994). Trabajos previos han mostrado que la administración central de la IL-1 β bloquea memorias que dependen de la integridad del hipocampo (revisado en Pugh et al., 2001). Pero inyecciones i.c.v. de cantidades farmacológicas de esta proteína pueden afectar también otras áreas del cerebro (Konsman et al., 2000) y causar alteraciones más generales del comportamiento (Nelson et al., 1999). En un modelo celular de memoria (la potenciación a largo plazo, LTP) se han demostrado efectos diferentes, dependiendo de la concentración de IL-1 evaluada. Así, concentraciones farmacológicas de la IL-1 β tienen efectos negativos sobre la formación de la LTP (Bellinger et al., 1993; Cunningham et al., 1996; Katsuki et al., 1990; Murray and Lynch, 1998), mientras que la IL-1 β endógena es necesaria para el mantenimiento de la LTP (Schneider et al., 1998). En resumen, aunque la IL-1 β ha sido la citoquina pro-inflamatoria más estudiada en la modulación de la memoria, su rol exacto sigue siendo controvertido.

En cambio, este trabajo muestra por primera vez un rol de la IL-1 α en el aprendizaje, y no de la IL-1 β . De hecho, la IL-1 α ha sido muy poco estudiada en el cerebro y no se han descripto otros roles fisiológicos en la actividad neuronal. Sin embargo, las formas de estimular la expresión de IL-1 β (por ej., el aislamiento social, la inyección i.c.v. de proteínas

virales, la inyección i.p. de LPS, etc.; ver Pugh et al., 2001) por lo general también inducen la expresión de IL-1 α (ver Capítulo II, Figura II.13). En el mismo sentido, cuando se utiliza el IL-1ra no sólo se bloquea la acción de la IL-1 β sino que también se impide la unión de la IL-1 α a su receptor (Burger and Dayer, 2000). Por todo esto, considero que los resultados de esta tesis no entran en contradicción con resultados previos, sino que apuntan a la necesidad de evaluar si se trata de una función compartida entre la IL-1 α y la IL-1 β o si se deben en realidad a una acción de la IL-1 α .

Es de remarcar también que la inducción de la IL-1 α 4 horas después del entrenamiento es específica al aprendizaje y no está relacionada con el estrés producido por el procedimiento. Esta afirmación es posible gracias a haber utilizado como controles a animales que fueron sometidos al mismo shock eléctrico y manipulación. Estos animales reciben un estrés muy similar pero se diferencian en que no establecen la asociación entre el bajar de la plataforma y recibir el shock eléctrico. Esto sugiere que la inducción de la IL-1 α no se debe al estrés sino al aprendizaje.

Curiosamente, la IL-1 β es inducida en el hipocampo y el hipotálamo 2 hs después de someter a los animales a estrés por shock eléctrico en la cola, pero esta inducción sólo puede ser detectada cuando los animales son adrenalectomizados (Nguyen et al., 1998). Ese trabajo sugiere que los niveles de corticoides inducidos por el estrés modulan la IL-1 central. De esta manera es importante recalcar aquí que la expresión de la IL-1 α en nuestros experimentos sería refractaria a la acción inhibitoria del estrés a través de los glucocorticoides, adquiriendo así más fuerza la conclusión de que la producción *de novo* de esta citoquina tiene un rol específico en el aprendizaje.

IV.4.2. El aumento en la latencia no se debe a efectos inespecíficos del AdIL-1ra.

Utilizando un vector adenoviral que expresa el antagonista natural del receptor de IL-1 (IL-1ra), bloqueamos específicamente la acción de la IL-1 en el hipocampo dorsal y mostramos que este bloqueo facilita tanto la memoria a corto como a largo plazo en un paradigma de aprendizaje aversivo. Asimismo, demostramos que los resultados obtenidos no se deben a efectos inespecíficos que afecten la sensibilidad al shock eléctrico o la actividad locomotora.

La IL-1 exógena es capaz de modular los umbrales de nocicepción térmica, tanto aumentándolos (a través de la modulación de hormona liberadora de corticotropina, CRH, y de adrenoreceptores) como disminuyéndolos (a través de prostaglandinas y hormona estimuladora de melanocitos-alfa, α -MSH) (revisado en Bianchi et al., 1998). Este efecto bifásico de la IL-1 depende de la dosis: dosis bajas causan hiperalgesia, mientras que dosis altas son analgésicas. Por otro lado, se ha demostrado que la IL-1 central media la analgesia a corto plazo inducida por un shock eléctrico en la planta de las patas (Zou et al., 2001). Asimismo la inoculación i.c.v. del IL-1ra bloquea la respuesta de hipertensión inducida por un estímulo condicionado de miedo. Todos estos antecedentes marcaron la necesidad de evaluar si la expresión crónica del IL-1ra en el hipocampo no estaba modulando la nocicepción en nuestros experimentos. Sin embargo, el análisis de los umbrales de sensibilidad al shock eléctrico no mostró diferencias entre los grupos experimentales, exhibiendo respuestas comportamentales (saltos y vocalización) a intensidades de corrientes similares (Pittenger et al., 2002; Shimizu et al., 2000). Esto demuestra que los resultados obtenidos en cuanto al aumento de la latencia a bajar de la plataforma no se deben a una mayor sensibilidad al shock eléctrico en el entrenamiento, causada por la inyección del AdIL-1ra.

Por otro lado, la administración central (i.c.v.) de IL-1 β disminuye en un 54% la actividad locomotora de ratones adultos (Nelson et al., 1999). Es más, la inyección central de IL-1 β causa un comportamiento de enfermedad ("sickness behavior") que está caracterizado por varios parámetros, entre los que se encuentran la disminución de la exploración y de la actividad locomotora (revisado en Dantzer, 2001). Esto nos llevó a evaluar si la locomoción estaba alterada en los animales inyectados con el vector adenoviral AdIL-1ra. Los animales operados no mostraron diferencias con respecto a los naïve, ni en la latencia a bajar de la plataforma en la sesión de entrenamiento del paradigma de evitación inhibitoria ni en la exploración libre de un ambiente novedoso. Es más, los animales inyectados con el AdIL-1ra mostraron niveles similares de actividad locomotora a los animales inoculados con el Ad β gal. También vale la pena destacar que los animales que no bajaron de la plataforma mostraron una intensa actividad exploratoria sobre la misma. De esta manera, las latencias mayores observadas en los animales tratados con el AdIL-1ra no pueden adjudicarse a una disminución inespecífica de la actividad locomotora.

Finalmente, se ha descrito que la inyección de un vector adenoviral en el parénquima de rata induce la expresión de la IL-1 (Cartmell et al., 1999). Sin embargo, la inyección de 10^7

partículas de un AdIL-1ra causa una respuesta inflamatoria y glial mínima, aunque se use una jeringa Hamilton con aguja 26G y se inculen 3µl de solución (Stone et al., 2003). En cambio, en el laboratorio utilizamos capilares ultra-finos para la inyección estereotáxica y un volumen de solución de 1µl. En estas condiciones no hemos detectado un aumento en los niveles de ARNm que codifican para IL-1 α e IL-1 β a partir de los 4 días post-inyección (Chertoff, 2002). De todas maneras, en este trabajo consideramos importante evaluar si la operación *per se* no estaba causando una gliosis y/o inflamación que pudiera ser responsable de los resultados obtenidos. Encontramos que tanto la inyección del AdIL-1ra como la del Ad β gal generan el mismo tipo de astrocitosis y activación de la microglia: leve y limitada al tracto de inyección. Como el grupo Ad β gal no muestra diferencias con respecto a los animales naïve en la memoria de corto ni en la de largo plazo, consideramos que la cirugía y la subsiguiente gliosis no afectan los parámetros comportamentales medidos en estos experimentos.

IV.4.3. ¿Qué etapa del procesamiento de la memoria está modulando la IL-1 endógena?

Es importante recalcar aquí que, debido a que los animales son entrenados y evaluados bajo la influencia del AdIL-1ra, no nos fue posible elucidar si la IL-1 endógena está involucrada en la adquisición, consolidación y/o evocación de una memoria aversiva. Para determinar cuál o cuáles etapas del procesamiento hipocampal de la memoria es modulado por la IL-1, podría administrarse la proteína IL-1ra en el hipocampo de ratas canuladas en distintos momentos del aprendizaje (hemos utilizado este tipo de bloqueo para una neurotrofina en Alonso et al., 2002). Sin embargo, los agonistas del receptor de IL-1 tienen una muy alta afinidad por el receptor, ya que 3 moléculas son capaces de iniciar una respuesta celular (Dinarello, 1996). Esto determina la necesidad de concentraciones altas y homogéneas del antagonista en todo el hipocampo para bloquear la acción de las IL-1 α e IL-1 β endógenas, distribución difícil de lograr mediante inyecciones de IL-1ra en el parénquima hipocampal.

Si bien no hemos demostrado en qué etapa de la formación de una memoria la IL-1 está actuando, el aumento de los niveles de ARNm para IL-1 α durante la ventana de consolidación de la memoria aversiva (Alonso et al., 2002) sugiere que al menos en esta etapa la IL-1 endógena hipocampal tendría un rol modulador.

IV.4.4. La modulación de distintos tipos de memoria.

Una característica de varias formas de aprendizaje en vertebrados es que la práctica determina si el material aprendido será recordado u olvidado, y si la información retenida es precisa o vaga. Es más, la mayor parte de la información que es almacenada luego del aprendizaje se va disipando gradualmente con el tiempo, a menos que sea evocada regularmente y re-consolidada (Sara, 2000). Así, la llamada "hipótesis de la consolidación" ha sido confirmada mediante tratamientos amnésicos post-entrenamiento, encontrándose que distintas manipulaciones durante la "ventana temporal de consolidación" inducen amnesia. Por otro lado, otro grupo de tratamientos son "recordatorios" efectivos, mostrando un efecto facilitador sobre la memoria (Sara, 2000).

Se han descripto varios de estos sistemas moduladores centrales que alteran la formación de memorias durante el periodo inmediato posterior al entrenamiento: la β -endorfina cerebral, los receptores colinérgicos del tipo nicotínicos, la serotonina, la adenocorticotrofina periférica, la vasopresina, la oxitocina, los glucocorticoides, la epinefrina, la norepinefrina y la glucosa (revisado en McGaugh, 2000). De hecho, la mayoría de estas sustancias son liberadas en el cerebro o fuera de éste durante diversas formas de entrenamiento comportamental.

Varios trabajos sugieren la existencia de supresores moleculares endógenos que controlan negativamente la eficacia de la transmisión neuronal y de la formación de memoria (Abel et al., 1998). Por ejemplo, las β -endorfinas que son liberadas luego del entrenamiento ejercen un efecto amnésico generalizado (para una revisión del tema ver Izquierdo and Medina, 1997). Además, se ha demostrado que varias fosfatasas de proteínas bloquean el aprendizaje, el almacenamiento de memoria y/o la evocación. Estas enzimas, en combinación con las quinasas, regulan varios procesos celulares mediante la fosforilación / defosforilación reversible de substratos específicos (Sweatt, 2001). Así, se demostró que la calcineurina (una fosfatasa de proteínas dependiente de Ca^{2+} /calmodulina, PP2B) bloquea el aprendizaje, el almacenamiento de memoria y la evocación (Malleret et al., 2001). También la fosfatasa de proteína 1 (PP1) determina la eficacia del aprendizaje, limitando la adquisición y favoreciendo la declinación de la memoria (Genoux et al., 2002).

A partir de nuestros resultados, la IL-1 α endógena hipocampal puede ser incluida en este heterogéneo grupo de moduladores que limitan de manera fisiológica la formación y/o la evocación de la memoria. Es más, debido a que la IL-1 está elevada en el hipocampo de

animales viejos (Murray and Lynch, 1998), esta citoquina podría tener un rol en la declinación de la memoria en los ancianos, algo que fue sugerido para otro modulador negativo, la PP1 (Genoux et al., 2002). De hecho, se ha demostrado que modificando la dieta se pueden disminuir los niveles hipocampales de IL-1 β de ratas viejas a los de ratas jóvenes, y que esto correlaciona con una reversión de la disminución del LTP en las ratas viejas (McGahon et al., 1999).

Sin embargo, los datos obtenidos no eliminan la posibilidad de que diferentes formas de memoria puedan ser moduladas de manera diferente por la IL-1 o por distintos niveles de IL-1, de manera de que la IL-1 endógena pueda facilitar otras tareas de aprendizaje. De hecho, nosotros encontramos que dos tipos de memoria dependientes del hipocampo tienen una sensibilidad diferente a la IL-1. Si bien el bloqueo de la IL-1 facilita una tarea asociativa, no afecta otra que no lo es (la habituación a un ambiente novedoso).

En los mamíferos existen algunas formas de aprendizaje asociativo y no asociativo que involucran la participación del hipocampo (Eichenbaum, 1999; Izquierdo and Medina, 1997; McGaugh, 2000; Thiel et al., 1998; Zhu et al., 1997). Los eventos moleculares que tienen lugar en el hipocampo y que son necesarios para la formación de una memoria de largo plazo han sido estudiados en numerosas tareas de aprendizaje asociativo, incluyendo el condicionamiento contextual de miedo y la evitación inhibitoria (Atkins et al., 1998; Bernabeu et al., 1997; Impey et al., 1998; Izquierdo and Medina, 1997; McGaugh, 2000; Taubenfeld et al., 1999). Pero mucho menos se sabe acerca de los sustratos moleculares hipocampales que son necesarios para la formación de una memoria no asociativa (Acquas et al., 1996; Thiel et al., 1998; Vianna et al., 2000). En este sentido, nosotros demostramos que el IL-1 α facilita una tarea de evitación pasiva pero que no tiene efecto sobre la habituación a un ambiente novedoso. Esto sugiere nuevamente que ambos tipos de aprendizaje, si bien requieren de la misma estructura del cerebro, utilizan sustratos moleculares y/o celulares diferentes, sensibles a distintos mecanismos de modulación.

Finalmente, una molécula secretada por los astrocitos y que modula el LTP hipocampal, la proteína neurotrófica que une Ca²⁺ S100B, ha mostrado una especificidad en el tipo de aprendizaje que modula de manera similar a la mostrada por la IL-1. Así, la inoculación de S100B luego del entrenamiento no afecta la habituación a largo plazo pero aumenta la latencia en un paradigma de evitación inhibitoria (Mello e Souza et al., 2000). Si bien el efecto es el opuesto al de la IL-1 (la S100B es facilitatoria, mientras que el bloqueo de la señal de IL-1 es el que facilita), los dos regulan específicamente el aprendizaje aversivo y

no la habituación. Esta regulación específica aunque opuesta lograda por dos moléculas distintas brinda evidencia empírica al concepto de que estos dos tipos de aprendizaje son modulados de manera diferente.

IV.4.5. Trabajos publicados recientemente.

Mientras este trabajo estaba en revisión y luego en prensa (Depino et al., 2003a), aparecieron publicados un trabajo que muestra resultados que apoyan los obtenidos por nosotros (Barrientos et al., 2002) y otros tres trabajos que muestran resultados en principio contradictorios a los nuestros (Avital et al., 2003; Loscher et al., 2003; Yirmiya et al., 2002).

Realizando inyecciones en el hipocampo dorsal (en lugar de i.c.v.) de 1ng de IL-1 β (10 veces menos que en los trabajos previos Pugh et al., 2001), el grupo de la Universidad de Colorado, USA, estudió si el hipocampo estaba relacionado con la adquisición de un condicionamiento de miedo al contexto (Barrientos et al., 2002). Así, encontraron que la IL-1 β inoculada en el hipocampo bloquea el condicionamiento al contexto de una forma independiente a la inducción de la hormona corticosterona en la periferia. Es más, demostraron mediante inyecciones de la proteína a distintos tiempos post-entrenamiento que la IL-1 β afecta la consolidación de esta memoria, tanto inmediatamente como 3 o 24 horas después del entrenamiento, demostrando un efecto de amplio rango de esta citoquina en el proceso. Si bien en este trabajo no han analizado exhaustivamente los efectos de la inoculación de la proteína IL-1 β (tener en cuenta los resultados obtenidos en el Capítulo I de esta tesis, donde la inoculación de 10ng de la proteína causa la apoptosis de las neuronas granulares del giro dentado), los resultados obtenidos apuntan hacia la misma función de la IL-1 descrita en este capítulo.

Por otro lado, utilizando inyecciones i.c.v de cantidades similares a las utilizadas por el grupo de la Universidad de Colorado (10ng, Pugh et al., 2001), otro grupo mostró un efecto facilitador de la IL-1 β y uno inhibidor del IL-1ra en un paradigma de evitación pasiva (Yirmiya et al., 2002). Asimismo, mostraron un efecto inhibidor del IL-1ra en la versión espacial del laberinto de agua de Morris. Aunque llega a resultados contrarios a los obtenidos por otros grupos (Oitzl et al., 1993; Pugh et al., 2001), está aquejado por la misma limitación experimental en las conclusiones: si bien analizan paradigmas de aprendizaje que dependen de la funcionalidad del hipocampo, la inyección i.c.v. distribuye las proteínas a distintas regiones del cerebro, con fuerte efecto sobre las paredes de los ventrículos (Konsman et al.,

2000). Entre los efectos generalizados sobre el comportamiento, los autores reportan efectos leves que incluyen anorexia. Sin embargo, la influencia que estos efectos inespecíficos puede tener en el aprendizaje no han sido evaluados. Así, el trabajo desarrollado en esta tesis sigue siendo el primero en demostrar un rol de la IL-1 endógena hipocampal en un aprendizaje, sin la contaminación con efectos inespecíficos.

Utilizando ratones nulos para el gen que codifica para el receptor tipo I de la IL-1, IL-1rKO (Labow et al., 1997), otro grupo mostró que esos ratones tienen deficiencias en el aprendizaje (Avital et al., 2003). Sin embargo, estos animales carecen del receptor en todas sus células y tanto durante el desarrollo como en la vida adulta. De esta manera, los resultados obtenidos pueden deberse a efectos inespecíficos que alteren el aprendizaje en los ratones IL-1rKO. De hecho, estos animales presentan una menor sensibilidad al dolor en diversos ensayos (Wolf et al., 2003). Es más, evidencia previa muestra que ciertos retrasos mentales están asociados a mutaciones en un gen que codifica para una proteína homóloga a la proteína accesoria del receptor de IL-1, sugiriendo que alteraciones en la señalización por la IL-1 afectan el desarrollo normal del cerebro (Carrie et al., 1999). De hecho, en ese trabajo prueban que los animales sin el receptor tipo I para la IL-1 presentan una excitabilidad basal aumentada (el "population spike" basal es significativamente mayor en un rango de intensidades de estímulo) y los IL-1rKO presentan un aumento en la inhibición por pulso pareado y una disminución en la facilitación. Asimismo, en los animales IL-1rKO no pudieron producir LTP en el DG *in vivo* ni en la región CA1 *in vitro*. Todo esto sugiere que la falta del receptor tipo I para la IL-1 causa alteraciones en el hipocampo que no sólo reflejan un efecto sobre la plasticidad hipocampal sino que evidencian cambios que probablemente ocurran durante el desarrollo y que alteran los circuitos neuronales.

De esta forma, al evaluar a los animales IL-1rKO en diversos paradigmas de aprendizaje, se debe tener en cuenta que estos animales no son iguales a los silvestres al iniciar el tratamiento. En este sentido, los autores informan que los IL-1rKO tienen una velocidad de nado significativamente menor, que sugiere que tienen impedimentos motores. Así, el aumento en la latencia a encontrar la plataforma en el laberinto de Morris no puede adjudicarse de manera rigurosa a un efecto de la IL-1 sobre el aprendizaje, ya que otros parámetros inespecíficos están alterados. También en los ensayos de condicionamiento de miedo al contexto, deben tenerse en cuenta efectos generales de la falta del receptor. En el trabajo mencionado no se ha medido la sensibilidad al shock en los animales nulos respecto a los silvestres, ni la capacidad de reconocimiento espacial, ni parámetros que indiquen

comportamientos de tipo depresivo, ni actividad exploratoria (estos animales no exploran libremente en campo abierto, comunicación personal), ni alteraciones en comportamientos sociales y sexuales. Cualquiera de estos parámetros podría justificar los resultados obtenidos. Es más, el hecho de que los circuitos hipocampales estén alterados *a priori*, hace imposible cualquier análisis acerca de los mecanismos involucrados en los resultados obtenidos. En conclusión, considero que los animales IL-1rKO deben ser estudiados de manera más exhaustiva en sus comportamientos innatos, antes de poder utilizarlos como modelo para estudiar efectos específicos de la IL-1 en el aprendizaje.

Finalmente, en el año 2003 apareció el primer trabajo que cuestiona miles de trabajos previos y reclama un rol agonista del IL-1ra en el hipocampo (Loscher et al., 2003). En ese trabajo muestran que el IL-1ra imita los efectos de la IL-1 β en sinaptosomas *in vitro*, de manera que ambas moléculas disminuyen la liberación de glutamato y aumentan la fosforilación del factor de transcripción JNK. De manera similar, tanto IL-1 β como IL-1ra inhiben la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo. Sin embargo, la combinación de la IL-1 β con el IL-1ra inhibe el efecto (de cada una por separado) en todos los modelos analizados. Es más, utilizando ratones que no expresan el receptor tipo I para la IL-1, ven los mismos efectos, lo cual sugiere que la acción agonista del IL-1ra no es a través de ese receptor. Debido al bloqueo del efecto de cada una de las proteínas por separado cuando las aplican combinadas, los autores sugieren que el IL-1ra actuarían como antagonista de la IL-1 β en los receptores tipo I y que la IL-1 β haría lo propio antagonizando los efectos del IL-1ra sobre algún receptor todavía no descrito. Considero que deberán estudiarse en detalle los efectos del IL-1ra y los posibles mecanismos, pero que los resultados presentados en el trabajo mencionado siguen siendo preliminares.

Conclusiones finales

"Esta pretensión tan vana de comprenderlo todo no puede nacer más que de no haber entendido nada nunca, porque cualquiera que hubiese experimentado una sola vez el entender perfectamente una sola cosa, y hubiese degustado realmente cómo es saber, sabría que no entiende ninguna de la infinidad de las conclusiones restantes."

Galileo Galilei, "Diálogo sobre los dos máximos sistemas del mundo ptolomaico y copernicano"

A lo largo de esta tesis hemos recopilado evidencia experimental acerca del rol de la interleuquina-1 (IL-1) en diversos fenómenos fisiológicos y patológicos que involucran a las células del sistema nervioso central (SNC). Además de los aportes concretos en los distintos temas (Depino et al., 2003a y 2003b), creemos haber adquirido una visión al mismo tiempo profunda y global del funcionamiento de esta molécula en el SNC, que nos permite una lectura crítica de los datos publicados recientemente en el campo de la neuroinmunología.

Hay tres áreas específicas en las que consideramos que los resultados obtenidos en esta tesis afectan de manera general a la investigación en el campo: (1) el estudio de moléculas inflamatorias en modelos de aprendizaje; (2) la descripción de la gliosis como un fenómeno complejo; y (3) la relevancia del contexto en todo fenómeno que tiene lugar en el SNC.

1. Moléculas inflamatorias y aprendizaje.

La alta expresión de los receptores de IL-1 en el hipocampo atrajo la atención de los especialistas en aprendizaje sobre esta molécula, ya que el hipocampo es considerado la región donde se almacena la memoria. En los últimos años algunos grupos especializados en el estudio del comportamiento animal se han abocado a evaluar si la IL-1 está involucrada en el aprendizaje. Estos grupos han encarado sus trabajos estudiando a la IL-1 como un neuromodulador, pero descuidando los efectos pro-inflamatorios propios de una citoquina administrada a concentraciones farmacológicas, que funciona como mediadora dentro del sistema inmune. Así, en prácticamente ningún trabajo se ha evaluado si la administración de la citoquina causa gliosis y/o inflamación y muchas veces ni siquiera se han verificado sus posibles efectos sobre la viabilidad neuronal.

En esta tesis nosotros mostramos que una misma molécula, presente en una misma región, puede estar involucrada en procesos fisiológicos como el aprendizaje pero también en fenómenos patológicos como la neurodegeneración. No es de extrañar que una citoquina tenga un efecto doble, hasta opuesto, dependiente de la concentración. Son numerosos los ejemplos en los cuales niveles fisiológicos de una molécula ejercen un efecto sobre un sistema y niveles farmacológicos provocan la aparición de fenómenos no previstos. La farmacología es muchas veces muy útil a la comprensión de mecanismos biológicos, pero debe ser contrastada con evidencia acerca de su rol fisiológico si se desea comprender la biología de un organismo o de un órgano.

Por otra parte, resulta muy interesante ver, a partir de la evidencia acumulada en esta tesis, que a niveles altos la IL-1 funcionaría más como una molécula mediadora de funciones relacionadas con el sistema inmune, y a niveles no inflamatorios como mediadora de funciones fisiológicas del SNC. Esto lleva a pensar no sólo en la acción de las citoquinas cerebrales como interacciones locales entre el sistema inmune y el SNC (Besedovsky, 1996), sino que amplía la idea de un “lenguaje” común entre los dos sistemas.

En este contexto no nos sorprendieron los resultados que mostraban que la IL-1 estaba regulada en el hipocampo durante el aprendizaje y aquellos que demostraron que la administración aguda de la citoquina en la misma estructura causaba neurodegeneración. Se trata de dos concentraciones muy distintas de la molécula, que han de estimular de manera diferente los mecanismos de señalización intra-celulares y por ello afectar de distinta manera a las células sobre las que actúan. Es más, no podemos descartar que estén afectando a diferentes células: durante el aprendizaje la IL-1 puede ser secretada en las sinapsis, afectando sólo a las neuronas involucradas, mientras que luego de la inyección aguda la citoquina puede actuar sobre distintas células distribuidas en el hipocampo, incluídas las de la glia. Esto refuerza el concepto de que generalizar sobre las funciones de las citoquinas cerebrales como se viene haciendo es por lo menos tendencioso, y probablemente falso.

Así, creemos que ciertas moléculas pueden tener funciones diferentes en distintos tipos celulares, algo que se ha demostrado para las neurotrofinas en los sistemas nervioso e inmune, y que hemos demostrado aquí para la IL-1. Sin embargo, los sistemas conforman un organismo como un todo y las divisiones entre ellos no los convierten en sistemas aislados. En este sentido, cuando se trabaja *in vivo* deben tenerse en consideración los efectos que el diseño experimental puede tener sobre el resto del organismo, de forma de tener ciertas evidencias de que todo lo que no se mide entra dentro de la fórmula *ceteris paribus*, y que no hay interacciones con otras células o sistemas que puedan explicar los resultados obtenidos.

En resumen, este trabajo debiera llamar la atención sobre la inoculación de citoquinas pro-inflamatorias (y tal vez de cualquier molécula) para estudiar fenómenos como el aprendizaje, resaltando la importancia de que los mismos estén acompañados por estudios histológicos que evalúen la existencia de efectos más generales sobre la región en estudio, en particular la activación de la glia y la existencia de neurodegeneración.

2. La presencia de glia activada no siempre implica la expresión de citoquinas.

No son pocos los trabajos publicados en los cuales se observa activación de la glia y se presupone la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, la mayoría de las veces para explicar los efectos observados sobre las neuronas. Nosotros identificamos tres situaciones en las cuales la presencia de gliosis no está acompañada por expresión de citoquinas: la gliosis presente 6 días después de la inoculación de IL-1 β en todas las regiones estudiadas (Capítulo I), la gliosis presente en el hipocampo luego de la degeneración aguda de las neuronas granulares del giro dentado (Capítulo I) y la microglia activada presente luego de la degeneración crónica de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* (Capítulo II).

Esta regulación a distintos niveles de la expresión de citoquinas posiblemente representa un mecanismo anti-inflamatorio del SNC, el cual ha de sumarse a la presencia de la barrera hemato-encefálica (BBB) y a la expresión de moléculas anti-inflamatorias. En general se ha aceptado que el cerebro es un órgano inmunoprivilegiado y con ambiente inmunosupresor, en el cual las respuestas de defensa están atenuadas y fuertemente reguladas. Es más, se ha propuesto que las respuestas gliales están tan cuidadosamente reguladas porque son perjudiciales para las neuronas. En este sentido nuestros resultados agregan un nuevo mecanismo de regulación de la respuesta glial, donde la expresión de citoquinas por la glia activada puede estar regulada tanto a nivel de la transcripción como post-transcripcionalmente. Esto representa un resultado importante en el campo, ya que demuestra que no siempre la presencia de células gliales activadas conlleva la expresión de citoquinas.

Por otro lado, esto también es relevante en el marco general de la comprensión de los efectos de la gliosis y de las citoquinas en el SNC: la gliosis puede tener efectos diferentes sobre la neurodegeneración dependientes de las moléculas que se están expresando, explicando los resultados que *a priori* resultaban contradictorios y que se enfocaban sólo en la activación de la glia. Es decir, la glia puede tener efectos neurotóxicos o favorecer la supervivencia neuronal, dependiendo, por ejemplo, de si secretan o no citoquinas pro-inflamatorias, o si son responsables de la eliminación de toxinas del tejido lesionado.

3. El ambiente neuronal.

En esta tesis hemos dado un énfasis particular al ambiente neuronal, razón por la cual todos los trabajos han sido realizados *in vivo*. Es más, ningún otro órgano del cuerpo posee

diferencias regionales tan extremas como el SNC, representadas en parte por los fenotipos neuronales y las funciones que tienen. Pero también existe una distribución heterogénea de la glia dentro del cerebro, la cual podría representar un rol modulador adicional. Sin embargo, se ha estudiado poco la influencia de la glia en la composición y la funcionalidad de cada región, aunque esto parece estar cambiando (ver la sección "*New roles for astrocytes*" en los últimos números de la revista *Trends in Neuroscience*, 26 (10 y 11): 520-542 y 597-617).

En este trabajo comprobamos diferencias regionales en la respuesta a un estímulo específico como la inyección de la proteína IL-1 β , verificando efectos diferenciales sobre la activación de la glia, la inflamación y la neurodegeneración. Los resultados obtenidos tienen implicancias que superan los límites de esta tesis y que sugieren una conclusión más general que afecta la investigación en el área: la extrapolación al resto del cerebro de resultados obtenidos en una sola región corre serios riesgos de ser falsa, debido a la distribución heterogénea de la glia en el SNC y a las diferencias fenotípicas entre los distintos tipos de neuronas.

Por otro lado, observamos efectos distales luego de la administración de la IL-1 β en el SNC. Estos efectos se evidenciaron tanto como alteraciones en la expresión de citoquinas como en la presencia de células inflamatorias. Por ejemplo, al inyectar la IL-1 β en el estriado vimos la inducción de la citoquina en la corteza acompañada por el reclutamiento de neutrófilos. Y lo mismo fue observado al inyectar en la corteza y estudiar el estriado. Estos resultados muestran que el ambiente neuronal no sólo depende de lo que sucede en la región en particular, sino que sucesos en regiones distales pueden afectar a las neuronas que se están estudiando. Esto también puede tener una implicancia clínica que debe ser evaluada: lesiones traumáticas o accidentes vasculares en una región pueden tener efectos en otras estructuras, aparentemente intactas. Por ejemplo, podría explicar las alteraciones cognitivas, la demencia y la depresión observadas en pacientes con la enfermedad de Parkinson, a pesar de que la neurodegeneración está en gran medida limitada a ciertos sistemas motores. Sin embargo, esto es una especulación que debe ser evaluada, ya que pueden existir alteraciones en otros sistemas que hayan pasado inadvertidas hasta ahora.

Finalmente, pudimos comprobar que el ambiente es importante en la regulación de fenómenos como la neurogénesis. En este sentido mostramos que no se generan nuevas neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo, aún cuando se utilizan estímulos que son eficientes en otras regiones y a pesar de que es posible aislar, a partir de mesencéfalos de ratas adultas, células stem *in vitro* (Chichung Lie et al., 2002). El hecho de que las células

purificadas pueden sobrevivir y diferenciarse cuando son inyectadas en el hipocampo, pero no cuando son inoculadas en el mesencéfalo también sugiere un rol importante del ambiente en este proceso. Es más, en otras regiones se ha demostrado que la administración de bFGF y EGF es suficiente para inducir la proliferación de progenitores neurales, mientras que en el mesencéfalo no hemos podido lograrlo. Si bien no hemos evaluado qué componentes del entorno limitan este proceso, se ha postulado recientemente que los astrocitos determinan un "nicho neurogénico" (Horner and Palmer, 2003). En este sentido, podemos postular que la falta de neurogénesis observada en el mesencéfalo puede deberse a que ésta es una región pobre en astrocitos, y rica en microglia.

En resumen, podemos concluir que el ambiente neuronal (o sea, las células que rodean a las neuronas y que expresan determinadas moléculas según su especialización) influye tanto en la génesis como en la vida y la muerte de las neuronas. En este sentido, el estudio de las diferencias regionales en la distribución y la función glial aparece como una tarea fundamental para la comprensión de la fisiología del SNC.

Trabajos publicados

Trabajos que conforman esta tesis

- **Depino AM**, Earl C, Besedovsky H, del Rey A, Pitossi F, Oertel WH. "Microglial activation with atypical pro-inflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease". **European Journal of Neuroscience**, en prensa (2003).
- **Depino AM***, Alonso M, Ferrari C, del Rey A, Anthony D, Besedovsky H, Medina JH, Pitossi F. "Learning modulation by endogenous hippocampal IL-1: blockade of endogenous IL-1 facilitates memory formation". **Hippocampus**, en prensa (2003).
*autor correspondiente.

Otros trabajos

- Alonso M, Vianna MRM, **Depino AM**, Szapiro G, Viola H, Pitossi F, Izquierdo I, Medina JH. "Role of hippocampal BDNF during short and long-term memory formation". **Hippocampus** 12:551-560 (2002).
- Alvarez MJ, **Depino AM**, Podhajcer OL, Pitossi FJ. "Bias in estimations of DNA content by competitive polymerase chain reaction". **Analytical Biochemistry** 287(1):87-94 (2000).

Bibliografía



Abel, T., Martin, K., Bartsch, D., and Kandel, E. (1998). Memory suppressor genes: Inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science* 279, 338-341.

Acquas, E., Wilson, C., and Fibiger, H. (1996). Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: Effects of novelty, habituation, and fear. *The Journal of Neuroscience* 16, 3089-3096.

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.

Akiyama, H., and McGeer, P. (1989). Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. *Brain Research* 489, 247-253.

Alexi, T., Borlongan, C., Faull, R., Williams, C., Clark, R., Gluckman, P., and Hughes, P. (2000). Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Progress in Neurobiology* 60, 409-470.

Allan, S. (2002). Varied actions of proinflammatory cytokines on excitotoxic cell death in the rat central nervous system. *Journal of Neuroscience Research* 67, 428-434.

Allan, S., Harrison, D., Read, S., Collins, B., Parsons, A., Philpott, K., and Rothwell, N. (2001). Selective increases in cytokine expression in the rat brain in response to striatal injection of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate and interleukin-1. *Molecular Brain Research* 93, 180-189.

Allan, S., Parker, L., Collins, B., Davies, R., Luheshi, G., and Rothwell, N. (2000). Cortical cell death induced by IL-1 is mediated via actions in the hypothalamus of the rat. *Proceedings of National Academy of Sciences* 97, 5580-5585.

Allan, S., and Rothwell, N. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 734-744.

Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia* 36, 165-179.

Alonso, G. (1999). Neuronal progenitor-like cells expressing polysialylated neural cells adhesion molecule are present on the ventricular surface of the adult rat brain and spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology* 414, 149-166.

Alonso, M., Vianna, M. R. M., Depino, A. M., Mello e Souza, T., Pereira, P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F., Izquierdo, I., and Medina, J. H. (2002). BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus* 12, 551-560.

Alonso, M., Viola, H., Izquierdo, I., and Medina, J. (2000). Aversive experiences are associated with a rapid transient activation of ERKs in the rat hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory* 77, 119-124.

- Altman, J., and Das, G. (1967). Postnatal neurogenesis in the Guinea-pig. *Nature* 214, 1098-1101.
- Alvarez, M., Depino, A., Pdhajcer, O., and Pitossi, F. (2000). Bias in estimations of DNA content by competitive polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 287, 87-94.
- Alvarez-Buylla, A., and Garcia-Verdugo, J. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of Neuroscience* 22, 629-634.
- Andersson, P., Perry, V., and Gordon, S. (1992). The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues. *Neuroscience* 48, 169-186.
- Andersson, P., Perry, V., and Gordon, S. (1991). The CNS acute inflammatory response to excitotoxic neuronal cell death. *Immunology Letters* 30, 117.
- Andersson, P., Perry, V., and Gordon, S. (1992). Intracerebral injection of proinflammatory cytokines or leukocyte chemotaxins induces minimal myelomonocytic cell recruitment to the parenchyma of the central nervous system. *Journal of Experimental Medicine* 176, 255-259.
- Anisman, H., Kokkinidis, L., and Merali, Z. (2002). Further evidence for the depressive effects of cytokines: Anhedonia and neurochemical changes. *Brain, Behavior, and Immunity* 16, 544-556.
- Anisman, H., and Merali, Z. (2002). Cytokines, stress, and depressive illness. *Brain, Behavior, and Immunity* 16, 513-524.
- Anthony, D., Bolton, S., Fearn, S., and Perry, V. (1997). Age-related effects of interleukin-1 β on polymorphonuclear neutrophil-dependent increases in blood-brain barrier permeability in rats. *Brain* 120, 435-444.
- 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.
- Arend, W. P., Malysak, M., Guthridge, C. J., and Gabay, C. (1998). Interleukin-1 receptor antagonist: Role in biology. *Annu Rev Immunol* 16, 27-55.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., and Lidvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature Medicine* 8, 963-970.
- Atkins, C., Selcher, J., Petraitis, J., Trzaskos, J., and Sweatt, J. (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nature Neuroscience* 1, 602-609.
- Aubert, A., Vega, C., Dantzer, R., and Goodall, G. (1995). Pyrogens specifically disrupt the acquisition of a task involving cognitive processing in the rat. *Brain, Behavior, and Immunity* 9, 129-148.

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

Avital, A., Goshen, I., Kamsler, A., Segal, M., Iverfeldt, K., Richter-Levin, G., and Yirmiya, R. (2003). Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus* 13.

Ban, E., Milon, G., Prudhomme, N., Fillion, G., and Haour, F. (1991). Receptors for interleukin-1 (α and β) in mouse brain: Mapping and neuronal localization in hippocampus. *Neuroscience* 43, 21-30.

Banati, R., Gehrmann, J., Schubert, P., and Kreutzberg, G. (1993). Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7, 111-118.

Banks, W., Farr, S., La Scola, M., and Morley, J. (2001). Intravenous human interleukin-1 α impairs memory processing in mice: Dependence on blood-brain barrier transport into posterior division of the septum. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299, 536-541.

Barrientos, R., Higgins, E., Sprunger, D., Watkins, L., Rudy, J., and Maier, S. (2002). Memory for context is impaired by a post context exposure injection of interleukin-1 beta into dorsal hippocampus. *Behavioural Brain Research* 134, 291-298.

Basarsky, T., Duffy, S., Andrew, R., and MacVicar, B. (1998). Imaging spreading depression and associated intracellular calcium waves in brain slices. *The Journal of Neuroscience* 18, 7189-7199.

Basu, A., Krady, H., O'Malley, M., Styren, S., DeKosky, S., and Levison, S. (2002). The type 1 interleukin-1 receptor is essential for the efficient activation of microglia and the induction of multiple proinflammatory mediators in response to brain injury. *The Journal of Neuroscience* 22, 6071-6082.

Batchelor, P., Liberatore, G., Porritt, M., Donnan, G., and Howells, D. (2000). Inhibition of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor expression reduces dopaminergic sprouting in the injured striatum. *European Journal of Neuroscience* 12, 3462-3468.

Batchelor, P., Liberatore, G., Wong, J., Porritt, M., Frerichs, F., Donnan, G., and Howells, D. (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.

Beal, M. (2001). Experimental models of Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 325-332.

Bellinger, F., Madamba, S., and Siggins, G. (1993). Interleukin-1 β inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus. *Brain Research* 628, 227-234.

- Benisty, S., Boissiere, F., Faucheux, B., Agid, Y., and Hirsch, E. (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., Kwon, J., Chung, W., 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. (1998). Cytokines actions in the central nervous system. *Cytokine&Growth Factor Reviews* 9, 259-275.
- Bernabeu, R., Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., Izquierdo, I., and Medina, J. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of National Academy of Sciences* 94, 7041-7046.
- Besedovsky, H. (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: Facts and Hypotheses. *Endocrine Reviews* 17, 64-102.
- Betmouni, S., Perry, V.H., Gordon, J.L. (1996) Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience* 74, 1-5.
- Beyer, M., Herlofson, K., Arslan, D., and Larsen, J. (2001). Causes of death in a community-based study of Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica* 103, 7-11.
- Bianchi, M., Dib, B., and Panerai, A. (1998). Interleukin-1 and nociception in the rat. *Journal of Neuroscience Research* 53, 645-650.
- Björklund, L., Sánchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I., McNaught, K., Brownell, A.-L., Jenkins, B., Wahlestedt, C., Kim, K.-S., and Isacson, O. (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proceedings of National Academy of Sciences* 99, 2344-2349.
- Bliss, T., and Collingridge, G. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
- Bliss, T., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology (London)* 232, 331-356.
- Blond, D., Campbell, S., Butchart, A., Perry, V., and Anthony, D. (2002). Differential induction of interleukin-1b and tumor necrosis factor-a may account for specific patterns of leukocyte recruitment in the brain. *Brain Research* 958, 89-99.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M.-F., Benabid, A.-L., Sadoul, R., and Verna, J.-M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 65, 135-172.

- Boutin, H., LeFeuvre, R., Horai, R., Asano, M., Iwakura, Y., and Rothwell, N. (2001). Role of IL-1 α and IL-1 β in ischemic brain damage. *The Journal of Neuroscience* 21, 5528-5534.
- Broderick, P. (2002). Interleukin 1 α alters hippocampal serotonin and norepinephrine release during open-field behavior in Sprague-Dawley animals: differences from the Fawn-Hooded animal model of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 26, 1355-1372.
- Brucoleri, A., Brown, H., and Harry, G. (1998). Cellular localization and temporal elevation of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and transforming growth factor- β 1 mRNA in hippocampal injury response induced by trimethyltin. *Journal of Neurochemistry* 71, 1577-1587.
- 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.
- Burck, H. (1969). Coloración de Nissl. In *Técnica Histológica*, P. Montalvo, ed. (Madrid, pp. 129-130).
- Burger, D., and Dayer, J.-M. (2000). IL-1Ra. In *Cytokine Reference*, O. J. a. F. M, ed. (Orlando, FL: Academic Press), pp. 319-336.
- Bush, T., Puvanachandra, N., Horner, C., Polito, A., Ostensfeld, T., Svendsen, C., Mucke, L., Johnson, M., and Sofroniew, M. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23, 297-308.
- Campbell, S., Hughes, P., Iredale, J., Wilcockson, D., Waters, S., Docagne, F., Perry, V., and Anthony, D. (2003). CINC-1 is an acute-phase protein induced by focal brain injury causing leukocyte mobilization and liver injury. *FASEB Journal* 10.1096, fj.02-0757fje.
- Capuron, L., Hauser, P., Hinze-Selch, D., Miller, A., and Neveu, P. (2002). Treatment of cytokine-induced depression. *Brain, Behavior, and Immunity* 16, 575-580.
- Carrie, A., Jun, L., Bienvenu, T., Vinet, M., McDonnell, N., Couvert, P., Zemni, R., Cardona, A., Van Buggenhout, G., Frints, S., Hamel, B., Moraine, C., Ropers, H., Strom, T., Howell, G., Whittaker, A., Ross, M., Kahn, A., Fryns, J., Beldjord, C., Marynen, P., and Chelly, J. (1999). A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation. *Nature Genetics* 23, 25-31.
- Cartmell, T., Luheshi, G., and Rothwell, N. (1999). Brain sites of action of endogenous interleukin-1 in the febrile response to localized inflammation in the rat. *Journal of Physiology* 518, 585-594.
- Cartmell, T., Southgat, T., Rees, G., Castro, M., Lowenstein, P., and Luheshi, G. (1999). Interleukin-1 mediates a rapid inflammatory response after injection of adenoviral vectors into the brain. *The Journal of Neuroscience* 19, 1517-1523.

- Castanon, N., Leonard, B., Neveu, P., and Yirmiya, R. (2002). Effects of antidepressants on cytokine production and actions. *Brain, Behavior, and Immunity* 16, 569-574.
- Castañó, A., Herrera, A., Cano, J., and Machado, A. (2002). The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF- α , IL-1 β and IFN- γ . *Journal of Neurochemistry* 81, 150-157.
- Castañó, A., Herrera, A., Cano, J., and Machado, A. (1998). Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *Journal of Neurochemistry* 70, 1584-1592.
- Chertoff, M. (2002). Perfil de expresión de citoquinas en el sistema nervioso central inducido por la expresión crónica de IL-1 β mediante la inyección de un adenovirus recombinante. Tesis de Licenciatura, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires.
- Chichung Lie, D., Dziewczapolski, G., Willhoite, A., Kaspar, B., Shults, C., and Gage, F. (2002). The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *The Journal of Neuroscience* 22, 6639-6649.
- Choi, S.-H., Joe, E., Kim, S., and Jin, B. (2003). Thrombin-induced microglial activation produces degeneration of nigral dopaminergic neurons *in vivo*. *The Journal of Neuroscience* 23, 5877-5886.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159.
- Cicchetti, F., Brownell, A., Williams, K., Chen, Y., Livni, E., and Isacson, O. (2002). Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *European Journal of Neuroscience* 15, 991-998.
- Clarke, G., Collins, R., Leavitt, B., Andrews, D., Hayden, M., Lumsden, C., and McInnes, R. (2000). A one-hit model of cell death in inherited neuronal degenerations. *Nature* 406, 195-199.
- Clayton, D., and George, J. (1998). The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends in Neuroscience* 21, 249-254.
- Combrinck, M., Perry, V., and Cunningham, C. (2002). Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience* 112, 7-11.
- 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.

- Constantini, L., Cole, D., Chaturvedi, P., and Isacson, O. (2001). Immunophilin ligands can prevent progressive dopaminergic degeneration in animal models of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience* 13, 1085-1092.
- Coogan, A., O'Neill, L., and O'Connor, J. (1999). The p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 antagonizes the inhibitory effects of interleukin-1 β on long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuroscience* 93, 57-69.
- Cooper-Kuhn, C., and Kuhn, H. (2001). Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Developmental Brain Research* 134, 13-21.
- Cunningham, A., Murray, C., O'Neill, L., Lynch, M., and O'Connor, J. (1996). Interleukin-1 β (IL-1 β) and tumour necrosis factor (TNF) inhibit long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuroscience Letters* 203, 17-20.
- Cunningham, C., Boche, D., and Perry, V. (2002). Transforming growth factor β 1, the dominant cytokine in murine prion disease: influence on inflammatory cytokine synthesis and alteration of vascular extracellular matrix. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 28, 107-119.
- Dantzer, R. (2001). Cytokine-induced sickness behavior: Mechanisms and implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 933, 222-234.
- 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.
- Dauer, W., Kholodilov, N., Vila, M., Trillat, A.-C., Goodchild, R., Larsen, K., Staal, R., Tieu, K., Schmitz, Y., Yuan, C., Rocha, M., Jackson-Lewis, V., Hersch, S., Sulzer, D., Przedborski, S., Burke, R., and Hen, R. (2002). Resistance of α -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proceedings of National Academy of Sciences* 99, 14524-14529.
- Davie, C., Pirtosek, Z., Barker, G., Kingsley, D., Miller, P., and Lees, A. (1995). Magnetic resonance spectroscopic study of parkinsonism related to boxing. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 58, 688-691.
- Dawson, T., Mandir, A., and Lee, M. (2002). Animal models of PD: Pieces of the same puzzle? *Neuron* 35, 219-222.
- 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.
- del Rio Hortega, P. (1932). Microglia. In *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, W. Penfield, ed. (New York: Hoeber), pp. 482-534.
- Delgado, M., and Ganea, D. (2003). Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *The FASEB Journal* 17, 944-946.

- Denis-Donini, S., Glowinski, J., and Prochiantz, A. (1984). Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones. *Nature* 307, 641-643.
- Depino, A. (1999). Análisis de la expresión de factores neurotróficos en un modelo animal del síndrome de Parkinson. Tesis de Licenciatura, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires).
- Depino, A., Alonso, M., Ferrari, C., del Rey, A., Anthony, D., Besedovsky, H., Medina, J., and Pitossi, F. (2003a). Learning modulation by endogenous hippocampal IL-1: Blockade of endogenous IL-1 facilitates memory formation. *Hippocampus* *in press*.
- Depino, A., Earl, C., Kaczmarczyk, E., Besedovsky, H., del Rey, A., Pitossi, F., and Oertel, W. (2003b). Microglial activation with atypical pro-inflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience* 18, *in press*.
- Deumens, R., Blokland, A., and Prickaerts, J. (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Experimental Neurology* 175, 303-317.
- Dinarello, C. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-2147.
- Dinarello, C. (1991). Interleukin-1 and Interleukin-1 antagonism. *Blood* 77, 1627-1652.
- Dinarello, C., and Thompson, R. (1991). Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunology Today* 12, 404-410.
- Dodel, R., Lohmüller, F., Du, Y., Eastwood, B., Gocke, P., Oertel, W., and Gasser, T. (2001). A polymorphism on the intronic region of the IL-1 α gene and the risk for Parkinson's disease. *Neurology* 56, 982-983.
- Dong, Y., and Benveniste, E. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 180-190.
- Dunnet, S., and Björklund, A. (1999). Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 399, A32-A39.
- Eichenbaum, H. (1999). The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behavioural Brain Research* 103, 123-133.
- Eikelenboom, P., Bate, C., van Gool, W., Hoozemans, J., Rozemuller, J., Veerhuis, R., and Williams, A. (2002). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia* 40, 232-239.
- Erickson, J., Brosenitsch, T., and Katz, D. (2001). Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons *in vivo*. *The Journal of Neuroscience* 21, 581-589.

- Ericsson, A., Kovács, K., and Sawchenko, P. (1994). A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *The Journal of Neuroscience* 12, 897-913.
- Eriksson, C., Van Dam, A.-M., Lucassen, P., Bol, J., Winblad, B., and Schultzberg, M. (1999). Immunohistochemical localization of interleukin-1 β , interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 β converting enzyme/caspase-1 in the rat brain after peripheral administration of kainic acid. *Neuroscience* 93, 915-930.
- Eriksson, P., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A., Nordborg, C., Peterson, D., and Gage, F. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 4, 1313-1317.
- Fadok, V., Bratton, D., Konowal, A., Freed, P., Westcott, J., and Henson, P. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2, and PAF. *The Journal of Clinical Investigation* 101, 890-898.
- Fagan, A., and Gage, F. (1990). Cholinergic sprouting in the hippocampus: A proposed role for IL-1. *Experimental Neurology* 110, 105-120.
- Fallon, J., Reid, S., Kinyamu, R., Opole, I., Opole, R., Bartta, J., Korc, M., Endo, T., Duong, A., Nguyen, G., Karkehabadhi, M., Twardzik, D., and Loughlin, S. (2000). In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proceedings of National Academy of Sciences* 97, 14686-14691.
- Fassbender, K., Schneider, S., Bertsch, T., Schlueter, D., Fatar, M., Ragoschke, A., Kühl, S., Kischka, U., and Hennerici, M. (2000). Temporal profile of release of interleukin-1 β in neurotrauma. *Neuroscience Letters* 284, 135-138.
- Fawcett, J., and Asher, R. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Research Bulletin* 49, 377-391.
- Fernandez Espejo, E., Gonzalez-Albo, M., Moraes, J.-P., El Banoua, F., Flores, J., and Caraballo, I. (2001). Functional regeneration in a rat Parkinson's model after intrastriatal grafts of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor β 1-expressing extra-adrenal chromaffin cells of the Zuckerkandl's organ. *The Journal of Neuroscience* 21, 9888-9895.
- Fiedorowicz, A., Figiel, I., Kaminska, B., Zaremba, M., Wilk, S., and Oderfeld-Nowak, B. (2001). Dentate granule neuron apoptosis and glia activation in murine hippocampus induced by trimethyltin exposure. *Brain Research* 912, 116-127.
- Finkelstein, D., Stanic, D., Parish, C., Tomas, D., Dickson, K., and Home, M. (2000). Axonal sprouting following lesions of the rat substantia nigra. *Neuroscience* 97, 99-112.
- Flanders, K., Ren, R., and Lippa, C. (1998). Transforming growth factor- β s in neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology* 54, 71-85.

- Friedlander, R., Gagliardini, V., Hara, H., Fink, K., Li, W., MacDonald, G., Fishman, M., Greenberg, A., Moskowitz, M., and Yuan, J. (1997). Expression of a dominant negative mutant of interleukin-1 β converting enzyme in transgenic mice prevents neuronal cell death induced by trophic factor withdrawal and ischemic brain injury. *Journal of Experimental Medicine* 185, 933-940.
- Gabellec, M., Crumeyrolle-Arias, M., Le Saux, F., Auriou, N., Jacque, C., and Haour, F. (1999). Expression of interleukin-1 genes and interleukin-1 receptors in the mouse brain after hippocampal injury. *Neuroscience Research* 33, 251-260.
- Gahtan, E., and Overmier, J. (1999). Inflammatory pathogenesis in Alzheimer's disease: biological mechanisms and cognitive sequeli. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23, 615-633.
- Gao, H.-M., Hong, J.-S., Zhang, W., and Liu, B. (2003). Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: Relevance to the etiology of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience* 23, 1228-1236.
- Garcia, J., and Koelling, R. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomet Sci* 4, 123-124.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., and Kreutzberg, G. (1995). Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Research Reviews* 20, 269-287.
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D., and Mansuy, I. (2002). Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* 418, 970-975.
- Gibertini, M., Newton, C., Friedman, H., and Klein, T. (1995). Spatial learning impairment in mice infected with *Legionella pneumophila* or administered exogenous interleukin-1- β . *Brain, Behavior, and Immunity* 9, 113-128.
- Giulian, D., and Lachman, L. (1985). Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science* 228, 497-499.
- Giulian, D., Woodward, J., Young, D., Krebs, J., and Lachman, L. (1988). Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *The Journal of Neuroscience* 8, 2485-2490.
- Golbe, L. I. (1998). Parkinson's disease: nature meets nurture. *The Lancet* 352, 1328-1329.
- Gold, P. (1986). The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behav Neural Biol* 46, 87-98.
- Gould, E., Reeves, A., Graziano, M., and Gross, C. (1999). Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286, 548-552.

- Gregersen, R., Lambertsen, K., and Finsen, B. (2000). Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 20, 53-65.
- Griffin, W., Stanley, L., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L., White III, C., and Araoz, C. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proceedings of National Academy of Sciences* 86, 7611-7615.
- Gross, C. (2000). Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature Reviews Neuroscience* 1, 67-73.
- Grundy, R., Rothwell, N., and Allan, S. (2002). Site-specific actions of interleukin-1 on cytotoxic cell death in the rat striatum. *Brain Research* 926, 142-148.
- 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.
- Hanisch, U.-K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140-155.
- Hara, H., Friedlander, R., Gagliardini, V., Ayata, C., Fink, K., Huang, Z., Shimizu-Sasamata, M., Yuan, J., and Moskowitz, M. (1997). Inhibition of interleukin 1 β converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proceedings of National Academy of Sciences* 94, 2007-2012.
- Hartmann, A., Hunot, S., Michel, P., Muriel, M.-P., Vyas, S., Faucheux, B., Mouatt-Prigent, A., Turmel, H., Srinivasan, A., Ruberg, M., Evan, G., Agid, Y., and Hirsch, E. (2000). Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proceedings of National Academy of Sciences* 97, 2875-2880.
- Hauss-Wegrzyniak, B., Dobrzanski, P., Stoehr, J., and Wenk, G. (1998). Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease. *Brain Research* 780, 294-303.
- Hauss-Wegrzyniak, B., Vannucchi, M., and Wenk, G. (2000). Behavioral and ultrastructural changes induced by chronic neuroinflammation in young rats. *Brain Research* 859, 157-166.
- Hauss-Wegrzyniak, B., Vraniak, P., and Wenk, G. (2000). LPS-induced neuroinflammatory effects do not recover with time. *NeuroReport* 11, 1759-1763.
- He, Y., Appel, S., and Le, W. (2001). Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Research* 909, 187-193.

- He, Y., Le, W.-D., and Appel, S. (2002). Role of Fc γ receptors in nigral cell injury induced by Parkinson disease immunoglobulin injection into mouse substantia nigra. *Experimental Neurology* 176, 322-327.
- He, Y., Lee, T., and Leong, S. (2000). 6-Hydroxydopamine induced apoptosis of dopaminergic cells in the rat substantia nigra. *Brain Research* 858, 163-166.
- Herrera, A., Castaño, A., Venero, J., Cano, J., and Machado, A. (2000). The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiology of Disease* 7, 429-447.
- Hirsch, E., and Hunot, S. (2000). Nitric oxide, glial cells and neuronal degeneration in parkinsonism. *Trends in Pharmacological Sciences* 21, 163-165.
- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *Journal of Molecular Biology* 26, 365-369.
- 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., and Rothwell, N. (1995). Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Trends in Neuroscience* 18, 83-88.
- Horner, P.J., and Palmer, T.D. (2003). New roles for astrocytes: The nightlife of an 'astrocyte'. *La vida loca! Trends in Neuroscience* 26, 597-603.
- Hunot, S., Dugas, N., Faucheux, B., Hartmann, A., Tardieu, M., Debré, P., Agid, Y., Dugas, B., and Hirsch, E. (1999). Fc ϵ R2/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, *in vitro*, production of nitric oxide and tumor necrosis factor- α in glial cells. *The Journal of Neuroscience* 19, 3440-3447.
- Huynh, M., Fadok, V., and Henson, P. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* 109, 41-50.
- 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.
- Impey, S., Smith, D., Obrietan, K., Donahue, R., Wade, C., and Storm, D. (1998). Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nature Neuroscience* 1, 595-601.
- Irwin, M. (2002). Effects of sleep and sleep loss on immunity and cytokines. *Brain, Behavior, and Immunity* 16, 503-512.
- Izquierdo, I., Barros, D., Izquierdo, L., Mello e Souza, T., Souza, M., and Medina, J. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393, 635-636.

- Izquierdo, I., and Medina, J. (1997). The biochemistry of memory formation and its regulation by hormones and neurotransmitters. *Psychobiology* 25, 1-9.
- Izquierdo, I., and Medina, J. (1997). Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory* 68, 285-316.
- Izquierdo, I., Schroeder, N., Netto, C., and Medina, J. (1999). Novelty-causes time-dependent retrograde amnesia for one-trial avoidance in rats through NMDA receptor- and CAMKII-dependent mechanisms in hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 11, 3323-3328.
- Jander, S., Schroeter, M., Peters, O., Witte, O., and Stoll, G. (2001). Cortical spreading depression induces proinflammatory cytokine gene expression in the rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 21, 218-225.
- Jankowsky, J., Derrick, B., and Patterson, P. (2000). Cytokine responses to LTP induction in the rat hippocampus: A comparison of in vitro and in vivo techniques. *Learning & Memory* 7, 400-412.
- Jones, L., Kreutzberg, G., and Raivich, G. (1998). Transforming growth factor β 's 1, 2, and 3 inhibit proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer. *Brain Research* 795, 301-306.
- Kaplan, M., and Hinds, J. (1977). Neurogenesis in the adult rat: Electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197, 1092-1094.
- Kastin, A., Pan, W., Maness, L., and Banks, W. (1999). Peptides crossing the blood-brain barrier: some unusual observations. *Brain Research* 848, 96-100.
- Katsuki, H., Nakai, S., Hirai, Y., Akaji, K., Kiso, Y., and Satoh, M. (1990). Interleukin-1 β inhibits long-term potentiation in the CA3 region of mouse hippocampal slices. *European Journal of Neuroscience* 181, 323-326.
- Kaur, C., and Ling, E. (1991). Study of the transformation of amoeboid microglia cells into microglia labelled with the isolectin Griffonia simplicifolia in postnatal rats. *Acta Anatomica* 142, 118-125.
- Kim, J.-H., Auerbach, J., Rodríguez-Gómez, J., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S.-H., Nguyen, J., Sánchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K., and McKay, R. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418, 50-56.
- Kim, W., Mohny, R., Wilson, B., Jeohn, G.-W., Liu, B., and Hong, J.-S. (2000). Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *The Journal of Neuroscience* 20, 6309-6316.

- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605-608.
- Klevenyi, P., Andreassen, O., Ferrante, R., Schleicher, J., Friedlander, R., and Beal, M. (1999). Transgenic mice expressing a dominant negative mutant interleukin-1 β converting enzyme show resistance to MPTP neurotoxicity. *NeuroReport* 10, 635-638.
- Klüver, H., and Barrera, E. (1953). A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 12, 400-403.
- Knobloch, S., and Faden, A. (2000). Cortical interleukin-1 β elevation after traumatic brain injury in the rat: no effect of two selective antagonists on motor recovery. *Neuroscience Letters* 289, 5-8.
- Kohutnicka, M., Lewandowska, E., Kurkowska-Jastrzebska, I., Czlonkowski, A., and Czlonkowska, A. (1998). Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology* 39, 167-180.
- Kolb, M., Margetts, P., Anthony, D., Pitossi, F., and Gauldie, J. (2001). Transient expression of IL-1 β induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation* 107, 1529-1536.
- Konsman, J., Parnet, P., and Dantzer, R. (2002). Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends in Neurosciences* 25, 154-159.
- Konsman, J., Tridon, V., and Dantzer, R. (2000). Diffusion and action of intracerebroventricularly injected interleukin-1 in the CNS. *Neuroscience* 101, 957-967.
- Kornack, D., and Rakic, P. (2001). Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science* 294, 2127-2130.
- Kreutzberg, G. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences* 19, 312-318.
- 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.
- Kuhn, H., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L., and Gage, F. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *The Journal of Neuroscience* 17, 5820-5829.

- Kurkowska-Jastrzebska, I., Wronska, A., Kohutnicka, M., Czlonkowski, A., and Czlonkowska, A. (1999). The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Experimental Neurology* 156, 50-61.
- Labow, M., Shuster, D., Zetterstorm, M., Nunes, P., Terry, R., Cullinan, E., Bartfei, T., Solorzano, C., Moldawer, L., Chizzonite, R., and McIntyre, K. (1997). Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *The Journal of Immunology* 159, 2452-2461.
- Lachenmayer, L. (2003). Differential diagnosis of parkinsonian syndromes: dynamics of time courses are essential. *Journal of Neurology* 250, I/11-I/14.
- Langston, J., Forno, L., Tetrud, J., Reeves, A., Kaplan, J., and Karluk, D. (1999). Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Annals of Neurology* 46, 598-605.
- 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.
- Lashley, K. (1950). In search of the engram. *Symp Soc Exp Biol* 4, 454-482.
- Lawrence, C., Allan, S., and Rothwell, N. (1998). Interleukin-1 β and the interleukin-1 receptor antagonist act in the striatum to modify excitotoxic brain damage in the rat. *European Journal of Neuroscience* 10, 1188-1195.
- Lawson, L., Perry, V., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151-170.
- Le Gal La Salle, G., Robert, J., Berrard, S., Ridoux, V., Stratford-Perricaudet, L., Perricaudet, M., and Mallet, J. (1993). An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science*.
- Le, W., Rowe, D., Xie, W., Ortiz, I., He, Y., and Appel, S. H. (2001). Microglial activation and dopaminergic cell injury: An *in vitro* model relevant to Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience* 21, 8447-8455.
- Legos, J., Whitmore, R., Erhardt, J., Parsons, A., Tuma, R., and Barone, F. (2000). Quantitative changes in interleukin proteins following focal stroke in the rat. *Neuroscience Letters* 282, 189-192.
- Leong, S.-K., and Ling, E.-A. (1992). Amoeboid and ramified microglia: Their interrelationship and response to brain injury. *Glia* 6, 39-47.
- Levi-Montalcini, R., Skaper, S., Dal Toso, R., Petrelli, L., and Leon, A. (1996). Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokin. *Trends in Neuroscience* 19, 514-520.
- Lewin, G., and Mendell, L. (1993). Nerve growth factor and nociception. *Trends in Neuroscience* 16, 353-359.

- Liberatore, G., Finkelstein, D., Wong, J., Horne, M., Porritt, M., Donnan, G., and Howells, D. (1999). Sprouting of dopaminergic axons after striatal injury: Confirmation by markers not dependent on dopamine metabolism. *Experimental Neurology* 159, 565-573.
- Liberatore, G., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A., Vila, M., McAuliffe, W., Dawson, V., Dawson, T., and Przedborski, S. (1999). Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nature Medicine* 5, 1403-1409.
- Licinio, J., and Wong, M.-L. (1997). Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system. *The Journal of Clinical Investigation* 100, 2941-2947.
- Ling, Z., Potter, E., Lipton, J., and Carvey, P. (1998). Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Experimental Neurology* 149, 411-423.
- Liu, B., Jiang, J.-W., Wilson, B., Du, L., Yang, S.-N., Wang, J.-Y., Wu, G.-C., Cao, X.-D., and Hong, J.-S. (2000). Systemic infusion of naloxone reduces degeneration of rat substantia nigral dopaminergic neurons induced by intranigral injection of lipopolysaccharide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295, 125-132.
- 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., and Lasek, R. (1987). Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway. *Science* 237, 642-645.
- Loddick, S., Liu, C., Takao, T., Hashimoto, K., and De Souza, E. (1997). Interleukin-1 receptors: cloning studies and role in central nervous system disorders. *Brain Research Reviews*, 1-14.
- Loddick, S., MacKenzie, A., and Rothwell, N. (1996). An ICE inhibitor, z-VAD-DCB attenuates ischaemic brain damage in the rat. *NeuroReport* 7, 1465-1468.
- Loddick, S., Wong, M.-L., Bongiorno, P., Gold, P., Licinio, J., and Rothwell, N. (1997). Endogenous interleukin-1 receptor antagonist is neuroprotective. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 234, 211-215.
- Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145-1148.
- Lombardi, V., Garcia, M., Rey, L., and Cacabelos, R. (1999). Characterization of cytokine production, screening of lymphocyte subset patterns and in vitro apoptosis in healthy and Alzheimer's disease (AD) individuals. *Journal of Neuroimmunology* 97, 163-171.

- Lorenzini, C., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., and Tassoni, G. (1996). Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Research* 730, 32-39.
- Loscher, C., Mills, K., and Lynch, M. (2003). Interleukin-1 receptor antagonist exerts agonist activity in the hippocampus independent of the interleukin-1 type I receptor. *Journal of Neuroimmunology* 137, 117-124.
- Lotan, M., and Schwartz, M. (1994). Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. *FASEB Journal* 8, 1026-1033.
- Magavi, S., Leavitt, B., and Macklis, J. (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405, 951-955.
- Malleret, G., Haditsch, U., Genoux, D., Jones, M., Bliss, T., Vanhooose, A., Weitlauf, C., Kandel, E., Winder, D., and Mansuy, I. (2001). Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 104, 675-686.
- Manfridi, A., Brambilla, D., Bianchi, S., Mariotti, M., Opp, M., and Imeri, L. (2003). Interleukin-1 β enhances non-rapid eye movement sleep when microinjected into the dorsal raphe nucleus and inhibits serotonergic neurons *in vitro*. *European Journal of Neuroscience* 18, 1041-1049.
- Maries, E., Dass, B., Collier, T., Kordower, J., and Steece-Collier, K. (2003). The role of α -synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nature Reviews Neuroscience* 4, 727-738.
- 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.
- Mascarucci, P., Perego, C., Terrazzino, S., and De Simoni, M. (1998). Glutamate release in the nucleus tractus solitarius induced by peripheral lipopolysaccharide and interleukin-1 β . *Neuroscience* 86, 1285-1290.
- Mason, J., Suzuki, K., Chaplin, D., and Matsushima, G. (2001). Interleukin-1 β promotes repair of the CNS. *The Journal of Neuroscience* 21, 7046-7052.
- Massagué, J., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1994). The TGF- β family and its composite receptors. *Trends in Cell Biology* 4, 172-178.
- Matsumoto, Y., Yoshida, M., Watanabe, S., and Yamamoto, T. (2001). Involvement of cholinergic and glutamatergic functions in working memory impairment induced by interleukin-1 β in rats. *European Journal of Pharmacology* 430, 283-288.

- 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. Kriegstein, ed., pp. 93-105.
- McGahon, B., Martin, D., Horrobin, D., and Lynch, M. (1999). Age-related changes in LTP and antioxidant defenses are reversed by an α -lipoic acid-enriched diet. *Neurobiology of Aging* 29, 655-664.
- McGaugh, J. (2000). Memory - a century of consolidation. *Science* 287, 248-251.
- McGeer, P., Itagaki, S., Boyes, B., and McGeer, E. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38, 1285-1291.
- McGeer, P., Yasojima, K., and McGeer, E. (2002). Association of interleukin-1 β polymorphisms with idiopathic Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 326, 67-69.
- McLay, R., Kastin, A., and Zadina, J. (2000). Passage of interleukin-1-beta across the blood-brain barrier is reduced in aged mice: A possible mechanism for diminished fever in aging. *Neuroimmunomodulation* 8, 148-153.
- Mello e Souza, T., Rohden, A., Meinhardt, M., Goncalves, C., and Quillfeldt, J. (2000). S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation. *Physiology & Behavior* 71, 29-33.
- Mirza, B., Hadberg, H., Thomsen, P., and Moos, T. (2000). The absence of reactive astrogliosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* 95, 425-432.
- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., and Nagatsu, T. (1994). Interleukin-1 β , interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor- α are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neuroscience Letters* 180, 147-150.
- Mogi, M., Togari, A., Tanaka, K., Ogawa, N., Ichinose, H., and Nagatsu, T. (1999). Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)- α in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF- α induction. *Neuroscience Letters* 268, 101-104.
- Mogi, M., Togari, A., Tanaka, K., Ogawa, N., Ichinose, H., and Nagatsu, T. (2000). Increase in level of tumor necrosis factor- α in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats is suppressed by immunosuppressant FK506. *Neuroscience Letters* 289, 165-168.
- Mormede, C., Castanon, N., Medina, C., and Dantzer, R. (2003). Conditioned place aversion with interleukin-1 β in mice is not associated with activation of the cytokine network. *Brain, Behavior, and Immunity* 17, 110-120.

- Mullen, R., Buck, C., and Smith, A. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211.
- 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.
- Murray, C., and Lynch, M. (1998). Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 β is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience* 18, 2974-2981.
- Murray, C., McGahon, B., McBennet, S., and Lynch, M. (1997). Interleukin-1 β inhibits glutamate release in hippocampus of young, but not aged, rats. *Neurobiology of Aging* 18, 343-348.
- Nagatsu, T. (2002). Parkinson's disease: changes in apoptosis-related factors suggesting possible gene therapy. *Journal of Neural Transmission* 109, 731-745.
- Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T., and Nakafuku, M. (2002). Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110, 429-441.
- Nelson, K., Marks, N., Hayen, J., and Johnson, R. (1999). Behavior of adult and aged mice before and after central injection of interleukin-1 β . *Physiology & Behaviour* 66, 673-679.
- Neumann, H. (2001). Control of glial immune function by neurons. *Glia* 36, 191-199.
- Nguyen, K., Deak, T., Owens, S., Kohno, T., Fleshner, M., Watkins, L., and Maier, S. (1998). Exposure to acute stress induces brain interleukin-1 β protein in rat. *The Journal of Neuroscience* 18, 2239-2246.
- Nishimura, M., Mizuta, I., Mizuta, E., Yamasaki, S., Ohta, M., and Kuno, S. (2000). Influence of interleukin-1b gene polymorphisms on age-at-onset of sporadic Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 284, 73-76.
- Numan, S., and Seroogy, K. (1997). Increased expression of trkB mRNA in rat caudate-putamen following 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *European Journal of Neuroscience* 9, 489-495.
- Nussbaum, R. L., and Polymeropoulos, M. H. (1997). Genetics of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics* 6, 1687-1691.
- Obeso, J., Olanow, C., and Nutt, J. (2000). Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences* 23, S2-S7.
- Oitzl, M., van Oers, H., Schobitz, B., and de Kloet, E. (1993). Interleukin-1 β but not interleukin-6, impairs spatial navigation learning. *Brain Research* 613, 160-163.

- Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C., and Björklund, A. (1995). Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: Differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *The Journal of Neuroscience* 15, 3863-3875.
- Orr, C., Rowe, D., and Halliday, G. (2002). An inflammatory review of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 68, 325-340.
- Palmer, T., Markakis, E., Willhoite, A., Safar, F., and Gage, F. (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *The Journal of Neuroscience* 19, 8487-8497.
- Parish, C., Finkelstein, D., Drago, J., Borrelli, E., and Horne, M. (2001). The role of dopamine receptors in regulating the size of axonal arbors. *The Journal of Neuroscience* 21, 5147-5157.
- Parish, C., Finkelstein, D., Tripanichkul, W., Satoskar, A., Drago, J., and Horne, M. (2002). The role of interleukin-1, interleukin-6, and glia in inducing growth of neuronal terminal arbors in mice. *The Journal of Neuroscience* 22, 8034-8041.
- Parish, C., Stanic, D., Drago, J., Borrelli, E., Finkelstein, D., and Horne, M. (2002). Effects of long-term treatment with dopamine receptor agonists and antagonists on terminal arbor size. *European Journal of Neuroscience* 16, 787-794.
- Parkinson, J. (1817). *On the Shaking Palsy*. Sherwood, Heely and Jones.
- Paxinos, G., and Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (Orlando, FL: Academic Press).
- Pearson, V., Rothwell, N., and Toulmond, S. (1999). Excitotoxic brain damage in the rat induces interleukin-1 β protein in microglia and astrocytes: Correlation with the progression of cell death. *Glia* 25, 311-323.
- Pekny, M., Johansson, C., Eliasson, C., Stakeberg, J., Wallen, A., Perlmann, T., Lendahl, U., Betsholtz, C., Berthold, C.-H., and Frisen, J. (1999). Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *The Journal of Cell Biology* 145, 503-514.
- Perry, V., Andersson, P.-B., and Gordon, S. (1993). Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends in Neuroscience* 16, 268-273.
- Perry, V., Anthony, D., Bolton, S., and Brown, H. (1997). The blood-brain barrier and the inflammatory response. *Molecular Medicine Today*, 335-341.
- Perry, V., Bell, M., Brown, H., and Matyszak, M. (1995). Inflammation in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 5, 636-641.
- Perry, V., Cunningham, C., and Boche, D. (2002). Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease. *Current Opinion in Neurology* 15, 349-354.

- Perry, V., Newman, T., and Cunningham, C. (2003). The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neuroscience* 4, 103-112.
- 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.
- Pittenger, C., Huang, Y. Y., Paletzki, R. F., Bourtchouladze, R., Scanlin, H., Vronskaya, S., and Kandel, E. R. (2002). Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron* 34, 447-462.
- Plata-Salamán, C., and French-Mullen, J. (1994). Interleukin-1 β inhibits Ca²⁺ channel currents in hippocampal neurons through protein kinase C. *European Journal of Pharmacology* 266, 1-10.
- Plotkin, S., Banks, W., and Kastin, A. (1996). Comparison of saturable transport and extracellular pathways in the passage of interleukin-1 α across the blood-brain barrier. *Journal of Neuroimmunology* 67, 41-47.
- Plotkin, S., Banks, W., Maness, L., and Kastin, A. (2000). Differential transport of rat and human interleukin-1 α across the blood-brain barrier and blood-testis barrier in rats. *Brain Research* 881, 57-61.
- Poo, M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 24-32.
- Poulsen, K., Armanini, A., Klein, R., Hynes, M., Phillips, H., and Rosenthal, A. (1994). TGF- β 2 and TGF- β 3 are potent survival factors for midbrain dopaminergic neurons. *Neuron* 13, 1245-1252.
- Poutiainen, E., Hokkanen, L., Niemi, M., and Farkkila, M. (1994). Reversible cognitive decline during high-dose alpha-interferon treatment. *Pharmacology and Biochemistry of Behavior* 47, 901-905.
- 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.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Yokoyama, R., Shibata, T., Dawson, V., and Dawson, T. (1996). Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proceedings of National Academy of Sciences* 93, 4565-4571.

- Pugh, C., Fleshner, M., Watkins, L., Maier, S., and Rudy, J. (2001). The immune system and memory consolidation: a role for the cytokine IL-1 β . *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25, 29-41.
- Pugh, C., Johnson, J., Martin, D., Rudy, J., Maier, S., and Watkins, L. (2000). Human immunodeficiency virus-1 coat protein gp120 impairs contextual fear conditioning: a potential role in AIDS related learning and memory impairments. *Brain Research* 861, 8-15.
- Pugh, C., Kumagawa, K., Fleshner, M., Watkins, L., Maier, S., and Rudy, J. (1998). Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning. *Brain, Behavior, and Immunity* 12, 212-229.
- Pugh, C., Nguyen, K., Gonyea, J., Fleshner, M., Watkins, L., Maier, S., and Rudy, J. (1999). Role of interleukin-1 beta in impairment of contextual fear conditioning caused by social isolation. *Behavioural Brain Research* 106, 109-118.
- Quan, N., He, L., and Lai, W. (2003). Intraventricular infusions of antagonists of IL-1 and TNF α attenuates neurodegeneration induced by the infection of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Neuroimmunology* 138, 92-98.
- Rada, P., Mark, G., Vitek, M., Manago, R., Blume, A., Beer, B., and Hoebel, B. (1991). Interleukin-1 β decreases acetylcholine measured by microdialysis in the hippocampus of freely moving rats. *Brain Research* 550, 287-290.
- Rakic, P. (2002). Adult neurogenesis in mammals: An identity crisis. *The Journal of Neuroscience* 22, 614-618.
- Reichenberg, A., Yirmiya, R., Schuld, A., Kraus, T., Haack, M., Morag, A., and Pollmacher, T. (2001). Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Archives in Genetic Psychiatry* 58, 445-452.
- Ren, L., Lubrich, B., Biber, K., and Gebicke-Haerter, P. (1999). Differential expression of inflammatory mediators in rat microglia cultured from different brain regions. *Molecular Brain Research* 65, 198-205.
- Revah, F., Horellou, P., Vigne, E., Le Gal La Salle, G., Robert, J., Perricaudet, M., and Mallet, J. (1996). Gene transfer into the central and peripheral nervous system using adenoviral vectors. In *Protocols for gene transfer in neuroscience: towards gene therapy of neurological disorders*, L. PR, ed.: LW John Wiley and Sons).
- Riess, O., Jakes, R., and Krüger, R. (1998). Genetic dissection of familial Parkinson's disease. *Molecular Medicine Today*, 438-444.
- Rietze, R., Poulin, P., and Weiss, S. (2000). Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology* 424, 397-408.

- 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. (2003). Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential. *Brain, Behavior, and Immunity* 17, 152-157.
- Rothwell, N., and Hopkins, S. (1995). Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. *Trends in Neuroscience* 18, 130-136.
- Rothwell, N., and Luheshi, G. (2000). Interleukin I in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends in Neurosciences* 23, 618-625.
- Rothwell, N., and Luheshi, G. (1994). Pharmacology of interleukin-1 actions in the brain. *Advances in Pharmacology* 25, 1-20.
- Rothwell, N., Stroemer, P., Lawrence, C., and Davies, C. (1996). Actions of IL-1 in neurodegeneration. In *Pharmacology of cerebral ischemia*, J. Krieglstein, ed., pp. 125-129.
- Rousselet, E., Callebert, J., Parain, K., Joubert, C., Hunot, S., Hartmann, A., Jacque, C., Perez-Diaz, F., Cohen-Salmon, C., Launay, J.-M., and Horsch, E. (2002). Role of TNF- α receptors in mice intoxicated with the parkinsonian toxin MPTP. *Experimental Neurology* 177, 183-192.
- Ryu, J., Shin, W., Kim, J., Joe, E., Lee, Y., Cho, K., Oh, Y., Kim, S., and Jin, B. (2002). Trisialoganglioside GT1b induces in vivo degeneration of nigral dopaminergic neurons: Role of microglia. *Glia* 38, 15-23.
- Sachs, D., Queiroz Cunha, F., Poole, S., and Ferreira, S. (2002). Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. *Pain* 96, 89-97.
- Sara, S. (2000). Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learning & Memory* 7, 73-84.
- Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J., Le, W.-D., Smidt, M., Cox, J., De Mayo, F., Burbach, J., and Conneely, O. (1998). Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursors neurons. *Proceedings of National Academy of Sciences* 95, 4013-4018.
- 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., Rosenblatt, C., and Björklund, A. (1995). Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor β 3 prevents delayed degeneration of nigral

dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proceedings of National Academy of Science* 92, 8935-8939.

Saura, J., Parés, M., Bové, J., Pezzi, S., Alberch, J., Marin, C., Tolosa, E., and Martí, M. (2003). Intranigral infusion of interleukin-1 β activates astrocytes and protects from subsequent 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry* 85, 651-661.

Sawamoto, K., Nakao, N., Kakishita, K., Ogawa, Y., Toyama, Y., Yamamoto, A., Yamaguchi, M., Mori, K., Goldman, S., Itakura, T., and Okano, H. (2001). Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a *nestin-GFP* transgene. *The Journal of Neuroscience* 21, 3895-3903.

Schindler, R., Clark, B., and Dinarello, C. (1990). Dissociation between interleukin-1 β mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Biological Chemistry* 265, 10232-10237.

Schmued, L., Albertson, C., and Slikker, W. (1997). Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Research* 751, 37-46.

Schmued, L., and Hopkins, K. (2000). Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Research* 874, 123-130.

Schneider, H., Pitossi, F., Balschun, D., Wagner, A., del Rey, A., and Besedovsky, H. (1998). A neuromodulatory role of interleukin-1 β in the hippocampus. *Proceedings of National Academy of Sciences* 95, 7778-7783.

Schöning, B., Elepfandt, P., Lanksch, W., Volk, H.-D., and Woiciechowsky, C. (1999). Continuous infusion of proinflammatory cytokines into the brain to study brain cytokine induced local and systemic immune effects. *Brain Research Protocols* 4, 217-222.

Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D., and Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of National Academy of Sciences* 97, 11307-11312.

Schulte, T., Schöls, L., Müller, T., Woitalla, D., Berger, K., and Krüger, R. (2002). Polymorphisms in the interleukin-1 alpha and beta genes and the risk for Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 326, 70-72.

Shamash, S., Reichert, F., and Rotshenker, S. (2002). The cytokine network of wallerian degeneration: Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β . *The Journal of Neuroscience* 22, 3052-3060.

Shimizu, E., Tang, Y.-P., Rampon, C., and Tsien, J. (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* 290, 1170-1174.

- Shimura, H., Schlossmacher, M., Hattori, N., Frosch, M., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K., and Selkoe, D. (2001). Ubiquitination of a new form of α -synuclein by parkin from human brain: Implications for Parkinson's disease. *Science* 293, 263-269.
- Siegel, G., and Chauhan, N. (2000). Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Research Reviews* 33, 199-227.
- Simon, H., Saueressig, H., Wurst, W., Goulding, M., and O'Leary, D. (2001). Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. *The Journal of Neuroscience* 21, 3126-3134.
- Smidt, M., Asbreuk, C., Cox, J., Chen, H., Johnson, R., and Burbach, P. (2000). A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires *Lmx1b*. *Nature Neuroscience* 3, 337-341.
- 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.
- Song, C. (2002). The effect of thymectomy and IL-1 on memory: Implications for the relationship between immunity and depression. *Brain, Behavior, and Immunity* 16, 557-568.
- Song, C., Xuwen, L., Leonard, B., and Horrobin, D. (2003). Effects of dietary n-3 or n-6 fatty acids on interleukin-1 β -induced anxiety, stress and inflammatory responses in rats. *Journal of Lipid Research*.
- Sotelo, C., Javoy, F., Agid, Y., and Glowinski, J. (1973). Injection of 6-hydroxydopamine in the substantia nigra of the rat. I. Morphological study. *Brain Research* 58, 269-290.
- 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.
- Sriram, K., Matheson, J., Benkovic, S., Miller, D., Luster, M., and O'Callaghan, J. (2002). Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: Implications for Parkinson's disease. *The FASEB Journal*.
- Stern, M. (1991). Head trauma as a risk factor for Parkinson's disease. *Movement Disorders* 6, 95-97.
- Sternberg, E. (1997). Perspectives series: Cytokines and the brain. Neural-immune interactions in health and disease. *The Journal of Clinical Investigation* 100, 2641-2647.
- Stone, D., Xiong, W., Williams, J., David, A., Lowenstein, P., and Castro, M. (2003). Adenovirus expression of IL-1 and NF- κ B inhibitors does not inhibit acute adenoviral-induced brain inflammation, but delays immune system-mediated elimination of transgene expression. *Molecular Therapy* 8, 400-411.

- Streit, W. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40, 133-139.
- Streit, W., and Kreutzberg, G. (1987). Lectin binding by resting and reactive microglia. *Journal of Neurocytology* 16, 149-260.
- Strijbos, P., and Rothwell, N. (1995). Interleukin-1 β attenuates excitatory amino acid-induced neurodegeneration *in vitro*: Involvement of nerve growth factor. *The Journal of Neuroscience* 15, 3468-3474.
- Sugama, S., Cho, B., Degiorgio, L., Shimizu, Y., Kim, S., Kim, Y., Shin, D., Volpe, B., Reis, D., Cho, S., and Joh, T. (2003). Temporal and sequential analysis of microglia in the substantia nigra following medial forbrain bundle axotomy in rat. *Neuroscience* 116, 925-933.
- Sugawara, T., Lewen, A., Noshita, N., Gasche, Y., and Chan, P. (2002). Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial, and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1 subregion in rats. *Journal of Neurotrauma* 19, 85-98.
- 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.
- Sweatt, J. (2001). Memory mechanisms: The yin and yang of protein phosphorylation. *Current Biology* 11, 391-394.
- Swedo, S., Leonard, H., Garvey, M., Mittleman, B., Allen, A., Perlmutter, S., Lougee, L., Dow, S., Zamkoff, J., and Dibbert, B. (1998). Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections: clinical description of the first 50 cases. *American Journal of Psychiatry* 155, 264-271.
- Szelényi, J. (2001). Cytokines and the central nervous system. *Brain Research Bulletin* 54, 329-338.
- Taubenfeld, S., Wiig, K., Bear, M., and Alberini, C. (1999). A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. *Nature Neuroscience* 2, 309-310.
- Thiel, C., Huston, J., and Schwarting, R. (1998). Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience* 85, 1253-1262.
- Thompson, R. (1977). Localization of a "passive avoidance memory system" in the white rat. *Physiol Psychol* 6, 263-274.
- Tikka, T., Fiebich, B., Goldsteins, G., Keinänen, R., and Koistinaho, J. (2001). Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *The Journal of Neuroscience* 21, 2580-2588.
- Tikka, T., and Koistinaho, J. (2001). Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *The Journal of Immunology* 166, 7527-7533.

- 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.
- Touzani, O., Boutin, H., LeFeuvre, R., Parker, L., Miller, A., Luheshi, G., and Rothwell, N. (2002). Interleukin-1 influences ischemic brain damage in the mouse independently of the interleukin-1 type I receptor. *The Journal of Neuroscience* 22, 38-43.
- United Nations, P. D., Department of Economic and Social Affairs (1998). Revision of the World Population Estimates and Projections. .
- Van Dam, A.-M., Poole, S., Schultzberg, M., Zavala, F., and Tilders, F. J. H. (1998). Effects of peripheral administration of LPS on the expression of immunoreactive interleukin-1 α , β , and receptor antagonist in rat brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 840, 128-138.
- van Praag, H., Schinder, A., Christie, B., Toni, N., Palmer, T., and Gage, F. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-1034.
- Vereker, E., O'Donnell, E., Lynch, A., Kelly, A., Nolan, Y., and Lynch, M. (2001). Evidence that interleukin-1 β and reactive oxygen species production play a pivotal role in stress-induced impairment of LTP in the rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience* 14, 1809-1819.
- Vereker, E., O'Donnell, E., and Lynch, M. (2000). The inhibitory effect of interleukin-1 β on long-term potentiation is coupled with increased activity of stress-activated protein kinases. *The Journal of Neuroscience* 20, 6811-6819.
- Vernet-der Garabedian, B., Lemaigre-Dubreuil, Y., and Mariani, J. (2000). Central origin of IL-1 β produced during peripheral inflammation: role of meninges. *Molecular Brain Research*, 259-263.
- Vezzani, A., Conti, M., De Luigi, A., Ravizza, T., Moneta, D., Marchesi, F., and De Simoni, M. (1999). Interleukin-1 β immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: Functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *The Journal of Neuroscience* 19, 5054-5065.
- Vezzani, A., Moneta, D., Conti, M., Richichi, C., Ravizza, T., De Luigi, A., De Simoni, M., Sperk, G., Andell-Jonsson, S., Lundkvist, J., Iverfeldt, K., and Bartfai, T. (2000). Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proceedings of National Academy of Sciences* 97, 11534-11539.
- Vianna, M., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., de Paris, F., Furman, M., Levi de Stein, M., Medina, J., and Izquierdo, I. (2000). Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learning & Memory* 7, 333-340.

Vila, M., Jackson-Lewis, V., Guégan, C., Wu, D., Teismann, P., Choi, D.-K., Tieu, K., and Przedborski, S. (2001). The role of glial cells in Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology* 14, 483-489.

Vitkovic, L., Bockaert, J., and Jacque, C. (2000). "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? *Journal of Neurochemistry* 74, 457-471.

Walsh, C. (1999). Cell lineage analysis in the vertebrate central nervous system. In *Encyclopedia of Neuroscience*, G. a. S. Adelman, B., ed.: Elsevier).

Walsh, D., Betmouni, S., and Perry, V. (2001). Absence of detectable IL-1 β production in murine prion disease: A model of chronic neurodegeneration. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 60, 173-182.

Wang, X., Li, X., Currie, W., Willette, R., Barone, F., and Feuerstein, G. (2000). Application of real-time polymerase chain reaction to quantitate induced expression of interleukin-1 β mRNA in ischemic brain tolerance. *Journal of Neuroscience Research* 59, 238-246.

Warner, S., Auger, K., and Libby, P. (1987). Human interleukin 1 induces interleukin 1 gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Journal of Experimental Medicine* 165, 1316-1331.

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.

Winocur, G., and Bindra, D. (1976). Effects of additional cues on passive avoidance learning and extinction in rats with hippocampal lesions. *Physiology & Behaviour* 17, 915-920.

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.

Wolf, G., Yirmiya, R., Goshen, I., Iverfeldt, K., Holmlund, L., Takeda, K., and Shavit, Y. (2003). Impairment of interleukin-1 (IL-1) signaling reduces basal pain sensitivity in mice: genetic, pharmacological and developmental aspects. *Pain* 104, 471-480.

Woodroffe, M., Sarna, G., Wadhwa, M., Hayes, G., Loughlin, A., Tinker, A., and Cuzner, M. (1991). Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. *Journal of Neuroimmunology* 33, 227-236.

Wu, D., Jackson-Lewis, V., Vila, M., Tieu, K., Teismann, P., Vadseth, C., Choi, D.-K., Ischiropoulos, H., and Przedborski, S. (2002). Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *The Journal of Neuroscience* 22, 1763-1771.

Yabuuchi, K., Nishiyori, A., Minami, M., and Satoh, M. (1996). Biphasic effects of intracerebroventricular interleukin-1 β on mechanical nociception in the rat. *European Journal of Pharmacology* 300, 59-65.

Yan, Q., Zhang, J., Liu, H., Babu-Khan, S., Vassar, R., Biere, A., Citron, M., and Landreth, G. (2003). Anti-inflammatory drug therapy alters β -amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience* 23, 7504-7509.

Yirmiya, R., Winocur, G., and Goshen, I. (2002). Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory* 78, 379-389.

Yrjänheikki, J., Keinänen, R., Pellikka, M., Hökfelt, T., and Koistinaho, J. (1998). Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proceedings of National Academy of Sciences* 95, 15769-15774.

Yrjänheikki, J., Tikka, T., Keinänen, R., Goldsteins, G., Chan, P., and Koistinaho, J. (1999). A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proceedings of National Academy of Sciences* 96, 13496-13500.

Zhao, M., Momma, S., Delfani, K., Carlén, M., Cassidy, R., Johansson, C., Brismar, H., Shupliakov, O., Frisén, J., and Janson, A. (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proceedings of National Academy of Sciences* 100, 7925-7930.

Zhu, X., McCabe, B., Aggleton, J., and Brown, M. (1997). Differential activation of the rat hippocampus and perirhinal cortex by novel visual stimuli and a novel environment. *Neuroscience Letters* 229, 141-143.

Ziegler-Hietbrock, H.W. (1995). Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *Journal of Inflammation* 45, 13-26.

Zietlow, R., Dunnet, S., and Fawcett, J. (1999). The effect of microglia on embryonic dopaminergic neuronal survival *in vitro*: diffusible signals from neurons and glia change microglia from neurotoxic to neuroprotective. *European Journal of Neuroscience* 11, 1657-1667.

Zink, W., Anderson, E., Boyle, J., Hock, L., Rodriguez-Sierra, J., Xiong, H., Gendelman, H., and Persidsky, Y. (2002). Impaired spatial cognition and synaptic potentiation in a murine model of human immunodeficiency virus type 1 encephalitis. *The Journal of Neuroscience* 22, 2096-2105.

Zou, C.-J., Liu, J.-D., and Zhou, Y.-C. (2001). Roles of central interleukin-1 on stress-induced-hypertension and footshock-induced-analgesia in rats. *Neuroscience Letters* 311, 41-44.