



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular (FBMC)

Estudio de la inflamación como factor de riesgo en la progresión de la Enfermedad de Parkinson y como blanco terapéutico

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

María Clara Pott Godoy

Director de tesis: Dr. Fernando Juan Pitossi

Director Asistente: Dra. Carina Cintia Ferrari

Consejero de Estudios: Dr. Mario Galigniana

Lugar de trabajo: Lab. de Neuroinmunomodulación y Terapia génica
Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 2008

Resumen

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una de las enfermedades neurodegenerativas de mayor incidencia en personas mayores de 65 años. Es de progresión lenta y su rasgo distintivo es la degeneración neuronal en la región de la sustancia nigra pars compacta (SN).

Un hallazgo pato-fisiológico uniformemente observado tanto en modelos animales como en pacientes con EP es que la muerte de las neuronas de la SN se encuentra acompañada por activación de la microglía. Numerosa evidencia apunta a un efecto neurodegenerativo de la microglía activada, sin embargo, también se ha observado que la microglía podría tener efectos neuroprotectores por ejemplo a través de la secreción de factores neurotróficos. Por lo tanto, el rol funcional de esta activación es aún un tema de amplio debate.

En esta tesis, hemos evaluado la hipótesis de que la inflamación pueda exacerbar la neurodegeneración en un modelo animal de EP (inyección de 6OHDA en el cuerpo estriado) con la consiguiente progresión de la enfermedad. Para ello, se procedió a la inyección de un estímulo pro-inflamatorio central (dosis sub-tóxica de endotoxina o lipopolisacárido – LPS) en la SN de animales previamente denervados con la neurotoxina. El estímulo pro-inflamatorio fue capaz de exacerbar la neurodegeneración en progreso en la SN, acelerando y agravando los síntomas motores. Los efectos exacerbantes del LPS fueron asociados con un aumento en la activación microglial y expresión de MHC clase II en superficie así como con una inducción de IL-1 β en la SN. Los efectos producidos por la exacerbación fueron exitosamente revertidos por diferentes tratamientos anti-inflamatorios (glucocorticoides e ibuprofeno) y también

inhibiendo la acción de la IL-1 a través del uso de un adenovector que expresa IL-1ra. Estos resultados indican que la IL-1 tendría un papel relevante en la exacerbación observada.

Por otro lado, utilizamos otra estrategia experimental para evaluar en forma directa los posibles efectos tóxicos de la IL-1 sobre la SN. Este modelo consistió en la expresión crónica de IL-1 humana en el cuerpo estriado a través del uso de un adenovector. Este tratamiento indujo la expresión de IL-1 endógena (rIL-1 β) en la vía nigroestriatal produciendo neurodegeneración y activación de la microglía en la SN. Este tratamiento también ocasionó la aparición de síntomas motores en estos animales. Por último, un estímulo inflamatorio periférico en este modelo produjo la exacerbación de la neurodegeneración y de la activación de la microglía en la SN, aumentando el impacto clínico de estos hallazgos.

Esta tesis provee evidencia de los efectos perjudiciales de la inflamación en la progresión de la EP. Además, propone que las infecciones o inflamaciones podrían ser consideradas como un factor de riesgo en la exacerbación de la neurodegeneración en la EP. Así también, sugiere una asociación entre la activación de la microglía y los efectos neurotóxicos observados en la SN. Finalmente, identifica a la IL-1 β como la principal candidata a mediar estos efectos y provee evidencia de tratamientos posibles para disminuir la exacerbación de la enfermedad producida por la inflamación.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, activación microglial, IL-1 β , síntomas motores, inflamación, tratamiento anti-inflamatorio.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease with a major incidence in people over 65 years old. PD progression is slow and its distinctive trait is the neurodegeneration of the substantia nigra pars compacta (SN).

A patho-physiological hallmark observed in animal models of PD and in PD patients is the neuronal death of the SN with activation of microglial cells. Growing evidence points out a neurodegenerative effect of activated microglia. However, it has been observed that microglia could have protective effects like production of neurotrophic factors. Consequently, the functional role of activated microglia is an issue of great debate.

In the present study, we have tested the hypothesis that inflammation can exacerbate the neurodegeneration in an animal model of PD (injection of 6OHDA in the striatum). A central pro-inflammatory stimulus (lipopolysaccharide - sub-toxic dose of LPS), was injected in the SN of denervated animals. The central stimulus was able to exacerbate the on-going neurodegeneration in the substantia nigra (SN), accelerating and aggravating motor symptoms. The exacerbating effects of LPS were associated with an increased response of microglial activation and MHC class II expression and increased IL-1 β secretion. These effects were reverted not only by different anti-inflammatory treatments (glucocorticoid and non steroidal anti-inflammatory drug -NSAID) but also by specific IL-1 inhibition using recombinant adenovector expressing IL-1ra. These data indicate a key role of IL-1 β in the exacerbation effects observed.

In addition, another experimental strategy was generated in order to evaluate the effects of IL-1 in the SN in a direct way. This strategy consisted in the striatal injection of an adenoviral vector expressing human IL-1. This treatment produced endogenous IL-1beta expression (rat IL-1 β) in the nigrostriatal pathway causing neurodegeneration and microglial activation in the SN. Moreover, this treatment was also able to cause motor symptoms in these animals. Furthermore, a peripheral stimulus in this model, could also exacerbate neurodegeneration and microglia activation in the SN, extending the clinical relevance of these findings.

This work provides evidence of the detrimental effects of inflammation on PD progression. In addition, it suggests that inflammation could be considered as a risk factor in the exacerbation of the on-going neurodegeneration in PD. Furthermore, it indicates a univocal association of a subset of activated microglial cells with deleterious effects in the SN. Moreover, it identifies IL-1 β as a major candidate to mediate these effects and provides evidence of possible treatments to ameliorate disease progression.

Key words: Parkinson's disease, microglial activation, IL-1 β , motor symptoms, inflammation, anti-inflammatory therapy.

Agradecimientos

A Fernando, por tener confianza en mí antes de que yo misma la tuviera, por enseñarme que uno mismo es quien hace que las cosas sucedan, por la oportunidad de seguir haciendo ciencia y por el doctorado paralelo.

A Carina, por guiar mis pasos en la ruta de Ramón y Cajal, por tu amistad, por la fuerza que siempre supiste transmitirme y por nuestro hobby, el telar de 2 y 4 cuadros.

A Luis Mayorga, por haberme iniciado en el camino de la ciencia, por tu sinceridad, por tus oportunos consejos y por tu inmenso cariño.

A Osvaldo Podhajcer, por tu apoyo e interés constante tanto en lo laboral como en lo personal, por nuestras charlas de pasillo y por los buenos varietales mendocinos.

A Vero López, por la generosidad con la que compartís día a día tus conocimientos, y por nuestros momentos de recreación pero principalmente por nuestra amistad.

A Rodolfo, porque fuiste mi compañero de ruta en tu Buenos Aires querido y uno de mis primeros amigos en esta ciudad, mi co-equiper en los días bioteriles, en el lab y fuera de él.

A Gracie, por los buenos momentos que disfrutamos, por tus palabras de aliento, por los cursos de verano y porque a pesar de nuestro comienzo creció una amistad.

A Battista, por la alegría de los días compartidos, por las discusiones de trabajo y por los buenos varietales mendocinos donde se forjó la frase “que no decaiga...”

A Isa, por tu apoyo incondicional, por tus enseñanzas con el crióstato y por el glamour de tu bijou.

A Debbie, Mariela, Ana, Patricia y Amaicha, por los días compartidos..., a Murta, por compartir la angustia de los deadlines y de los ELISAs.

A los 107, Fede, Andrea, Edgardo, Diego, Flor, Cecilia y Cynthia, por haberme acompañado en estos años, por los buenos momentos..., a Caffè por nuestras charlas en cultivo del fondo, a Romi y Lore porque juntas se hizo más fácil disfrutar esta etapa.

A Fabio, porque tu excelente desempeño en el bioterio facilitó nuestro trabajo, por tus enseñanzas y sugerencias bioteriles.

A Dora, porque es lindo entrar a la FIL y encontrar un rostro sonriente y amigable como el tuyo.

A la FIL, porque hacer el doctorado en esta institución fue un placer.

A la Fundación YPF, por haberme dado la oportunidad de continuar mi doctorado con su programa de becas de postgrado José A. Estensoro.

A Lauri Perez, por compartir las vivencias de nuestra querida Mendoza, por la inmunología y por aprender a disfrutar Buenos Aires.

A Zuni y Juan Carlos, por su apoyo y cariño en esta etapa de mi vida.

A Verito, por tu invaluable comprensión, porque compartimos alegrías y sinsabores, éxitos y fracasos y por nuestra sólida amistad.

A Lauri, Marcelo, Chiquita y Pedro, porque siempre me alentaron en mis momentos de dudas, por el enorme cariño y porque somos una gran familia.

A mi querida familia, a mis padres, a mis hermanos, Juan y Patricio y a mi tío Guilo, quienes siempre estuvieron a mi lado apoyándome en todos mis pasos y alegrándose de mis proyectos, porque son mi pilar fundamental.

A Dios, que siempre iluminó mi camino.

Recuerdo de Mendoza

El último tramo de la vida de San Martín transcurrió en la serena ciudad de Boulogne-sur-Mer:

"Vivo en una casa a tres cuadras de la ciudad. Ocupo mis mañanas en la cultura de un pequeño jardín y en mi pequeño taller de carpintería; por la tarde salgo a paseo, y en las noches, en la lectura de algunos libros y papeles públicos; he aquí mi vida.

Usted dirá que soy feliz; sí, mi amigo, verdaderamente lo soy. A pesar de esto ¿creerá usted si le aseguro que mi alma encuentra un vacío que existe en la misma felicidad?

Y, ¿sabe usted cuál es? **El no estar en Mendoza.** Prefiero la vida que hacía en mi chacra a todas las ventajas que presenta la culta Europa."

*A mi querida Madre,
símbolo de abnegación y apoyo
incondicional, sin cuya ayuda ningún
proyecto hubiera sido posible de concretar.*

Trabajos en publicación que conforman esta tesis

- Central and peripheral IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease (manuscrito en revisión). *Brain*, Noviembre 2007.

María Clara Pott Godoy#, Rodolfo Tarelli#, Carina Cintia Ferrari, Maria Inés Sarchi y Fernando Juan Pitossi.

Ambos autores colaboraron igualmente en la realización de este trabajo.

- Exacerbation of neurodegeneration triggered by peripheral inflammation in an inflammatory model of Parkinson's disease (manuscrito en preparación).

María Clara Pott Godoy, Carina Cintia Ferrari y Fernando Juan Pitossi.

Otros trabajos publicados durante la realización de esta tesis

- Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra. *Neurobiol Dis.* 2006 Oct; 24(1):183-93

Ferrari C, **Pott Godoy MC**, Tarelli R, Chertoff M, Depino A, Pitossi FJ.

- Differential effects of interleukin-1beta on neurotoxicity, cytokine induction and glial reaction in specific brain regions. *J Neuroimmunol.* 2005 Nov; 168(1-2):96-110.

Depino A, Ferrari C, **Pott Godoy MC**, Tarelli R, Pitossi FJ.

Indice

Introducción general	20
1. Enfermedad de Parkinson y Parkinsonismos	21
1.1 Definición y clasificación	21
1.2 Enfermedad de Parkinson	21
1.2.1 Etiología	22
1.2.2 Fisiopatología y Anatomía patológica	23
1.2.3 Tratamiento	24
1.3 Modelos de Enfermedad de Parkinson	26
1.3.1 MPTP (1-metil-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina)	26
1.3.2 Rotenona	27
1.3.3 6-hidroxidopamina (6OHDA)	27
2. Inflamación en el SNC	31
2.1 La microglía	32
2.1.1 La microglía y la Enfermedad de Parkinson	35
2.2 Citoquinas	36
2.2.1 Interleuquina 1	37
2.3 Compuestos anti-inflamatorios	40
2.3.1 Anti-inflamatorios esteroideos: Glucocorticoides	40
2.3.2 Anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs)	42
3. Resultados previos	45
Objetivo General	48
Materiales y métodos	51
1. Animales	52
2. Procedimientos quirúrgicos	52
2.1. Inyecciones centrales	52
2.1.1. Inyección de 6 hidroxidopamina (6OHDA) o vehículo en el cuerpo estriado y de LPS o vehículo en la SN.	52
2.1.2. Inyección de AdIL-1ra en el fascículo mesencefálico anterior (MFB) de animales tratados con 6OHDA o vehículo en el cuerpo estriado y LPS o vehículo en la SN.	53
2.1.3. Inyección de vectores adenovirales en el cuerpo estriado	54
2.2. Inyecciones periféricas	54
2.2.1. Inyección de vectores adenovirales en la vena de la cola	54
3. Tratamiento con drogas anti-inflamatorias	55
3.1. Inyección de dexametasona (DXM) intraperitoneal	55
3.2. Administración de Ibuprofeno en el agua.	55
4. Perfusión de los animales y procesamiento del cerebro	55

5. Vectores adenovirales	56
6. ELISA para detección de citoquinas proinflamatorias	59
7. Estudios comportamentales	60
7.1. Ensayo de pasos de ajuste (stepping)	60
7.2. Ensayo del cilindro	61
8. Análisis histológicos	61
8.1 Tinción de Nissl	61
8.2 Reacción de x-gal	62
8.3. Tinción de rojo neutro	62
8.4. Inmunohistoquímica	63
8.4.1. Detección de Tirosina hidroxilasa (TH)	63
8.5 Inmunofluorescencia	63
8.5.1 Inmunofluorescencia doble para neuronas dopaminérgicas y microglía.	64
8.5.2 Inmunofluorescencia doble para neuronas dopaminérgicas y células MHCII positivas.	64
8.5.3 Inmunofluorescencia doble para neuronas dopaminérgicas y macrófagos (ED1).	65
8.5.4. Inmunofluorescencia doble para interleuquina 1 beta de rata (rIL-1 β) o interleuquina 1 beta humana (hIL-1 β) y células MHCII positivas.	66
8.5.5. Inmunofluorescencia para caracterizar la población linfocitaria	66
9. Microscopía	67
10. Análisis estadístico	67
Capítulo I	69
I.1 Objetivo 1	70
I.2 Resultados	71
I.2.1 Efectos de la administración central de 0,09 μ g de LPS sobre la neurodegeneración mediada por la 6OHDA	72
I.2.1.1 Inyección de LPS a los 12 días post-6OHDA	72
I.2.1.2 Inyección de LPS a los 3 días post-6OHDA	75
I.2.2 Efectos de la administración central de 0,09 μ g de LPS el día 12 sobre el comportamiento motor	77
I.2.2.1 Ensayo del cilindro	78
I.2.2.2 Ensayo de pasos de ajuste (stepping)	79
I.2.3 Efectos de la administración central de 0,09 μ g de LPS sobre la inflamación de la SN	82
I.2.3.1 Inyección de LPS a los 12 días post-6OHDA	82

I.2.3.2 Inyección de LPS a los 3 días post-6OHDA	88
I.2.4 Efectos de la administración central de 0,09µg de LPS en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en la SN	89
I.2.4.1 Inyección de LPS a los 12 días post-6OHDA	89
I.2.4.2 Inyección de LPS a los 3 días post-6OHDA	91
I.3 Conclusión	94
Capítulo II	96
II.1 Objetivo 2	97
II.2 Tratamiento con dexametasona (DXM)	98
II.2.1 Efectos de la administración de dexametasona sobre la exacerbación de la neurodegeneración	99
II.2.2 Efectos de la administración de dexametasona sobre el comportamiento motor	102
II.2.3 Efectos de la administración de dexametasona sobre la inflamación en la SN	105
II.2.4 Efectos de la administración de dexametasona sobre la expresión de rIL-1β en la SN	111
II.3 Tratamiento con Ibuprofeno	114
II.3.1 Efectos de la administración de ibuprofeno sobre la exacerbación de la Neurodegeneración	115
II.3.2 Efectos de la administración de ibuprofeno sobre los síntomas motores	117
II.3.3 Efectos de la administración de ibuprofeno sobre la inflamación	119
II.3.4 Efectos de la administración de ibuprofenos sobre la expresión de IL-1β endógena en la SN	123
II.4 Conclusión	126
Capítulo III	128
III.1 Objetivo 3	129
III.2 Bloqueo de la acción de la IL-1 a través de la inyección de IL-1ra	130
III.2.1 Efectos de la inhibición de IL-1 sobre la exacerbación de la neurodegeneración	132
III.2.2 Efectos de la inhibición de la IL-1 sobre la activación de la microglía en la SN	134
III.3 Sobre-expresión de la IL-1β en la vía nigroestriatal	138
III.3.1 Efectos de la administración de 5.10 ⁷ partículas infectivas de AdIL-1 en el cuerpo estriado sobre la expresión de IL-1β en la vía nigroestriatal	140
III.3.2 Efectos de la administración de 5.10 ⁷ partículas infectivas de AdIL-1 en el cuerpo estriado sobre la neurodegeneración en la SN	143

III.3.3 Efectos de la administración de $5 \cdot 10^7$ partículas infectivas de AdIL-1 en el cuerpo estriado sobre el comportamiento motor	145
III.3.4 Efectos de la administración de $5 \cdot 10^7$ partículas infectivas de AdIL-1 en el cuerpo estriado sobre la inflamación de la SN	147
III.4 Tratamiento con dexametasona (DXM)	152
III.4.1 Efectos de la administración de dexametasona sobre la expresión de rIL-1 β en la vía nigroestriatal	152
III.4.2 Efectos de la administración de dexametasona sobre la neurodegeneración en la SN	155
III.4.3 Efectos de la administración de dexametasona sobre el comportamiento motor	156
III.4.4 Efectos de la administración de dexametasona sobre la activación de la microglía	158
III.5 Efectos de la administración de un estímulo pro-inflamatorio periférico sobre la neurodegeneración mediada por la inyección de AdIL-1 en el cuerpo estriado.	161
III.5.1 Efectos de la inyección periférica de AdIL-1 sobre la neurodegeneración en la SN	163
III.5.2 Efectos de la inflamación periférica sobre la inflamación de la SN	164
III.6 Conclusión	171
Discusión final	174
Bibliografía	190

Abreviaturas

- **Ad:** vector adenoviral
- **AINEs:** anti-inflamatorios no esteroideos
- **βgal:** beta-galactosidasa
- **6OHDA:** 6-hidroxidopamina
- **BHE:** barrera hematoencefálica
- **DXM:** dexametasona
- **IBU:** ibuprofeno
- **IL-1:** interleuquina 1
- **IL-1α:** interleuquina 1 alfa
- **IL-1β:** interleuquina 1 beta
- **hIL-1β:** interleuquina 1 beta humana
- **rIL-1β:** interleuquina 1 beta de rata (endógena)
- **IL-1ra:** antagonista del receptor de interleuquina 1
- **IL-6:** interleuquina 6
- **i.p.:** intraperitoneal
- **i.v.:** intravenoso
- **LPS:** lipopolisacárido
- **MHCII:** complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II
- **MPTP:** 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina
- **SN:** *substantia nigra*
- **SNC:** sistema nervioso central
- **SNP:** sistema nervioso periférico

- **SNpc:** *substantia nigra pars compacta*
- **SNpr:** *substantia nigra pars reticulata*
- **TNF:** factor de necrosis tumoral

Introducción General

1. Enfermedad de Parkinson y Parkinsonismos

1.1 Definición y clasificación: El síndrome de Parkinson es una entidad clínica caracterizada por temblor, rigidez muscular, lentitud de movimientos (bradiquinesia) y alteración de la marcha y de los reflejos posturales (Farreras Valentí and Rozman, 2000). Este cuadro clínico puede ser producido por factores etiológicos diversos y hasta mutaciones, pero en la mayoría de los casos la causa es desconocida. El Síndrome de Parkinson idiopático o primario fue descrito por primera vez por James Parkinson en 1817 y también es llamado Enfermedad de Parkinson (EP) (Parkinson, 1817). Los síntomas aparecen de manera insidiosa y el curso es progresivo. Actualmente se reconocen otros parkinsonismos de etiología conocida. Éstos resultan como efecto secundario de distintos fármacos como los antipsicóticos o están asociados a otros síntomas de disfunción neurológica, llamados en este caso, parkinsonismo plus (Farreras Valentí and Rozman, 2000).

1.2 Enfermedad de Parkinson

La EP es una enfermedad neurodegenerativa lenta y progresiva que afecta al 3% de la población mayor de 60 años de edad y al 4-5% de la población mayor de 85 años de edad (Whitton, 2007). Actualmente se reconoce a la EP como la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer, con una prevalencia del 0.1% en la población mundial (de Rijk, Launer et al., 2000; Elbaz, Bower et al., 2002; Nutt and Wooten, 2005). La característica principal de la EP es la pérdida progresiva de las neuronas

dopaminérgicas de la substantia nigra pars compacta (SN) (Lozano, Lang et al., 1998).

James Parkinson describió con gran detalle esta enfermedad en su monografía “An essay on the Shaking Palsy” (Parkinson, 1817). A finales del siglo XIX, Jean Marie Charcot refinó esta descripción e identificó los signos cardinales de la EP incluyendo el temblor, la rigidez, la lentitud de movimientos y la alteración de la marcha (Goetz, 2002). (Figura 1)



Figura 1: Enfermedad de Parkinson. Obsérvese la falta de expresión facial, la postura anómala y la desviación lateral del cuello y tronco. El pie izquierdo mantiene una postura distónica en flexión y rotación interna. Adaptado de Ferreras, 2000.

1.2.1 Etiología: La causa de la EP es desconocida en el 90% de los pacientes. Estudios epidemiológicos demostraron que el 10% de los pacientes presentan una forma familiar de la EP (Lim, Dawson et al., 2002; Dawson and Dawson, 2003). Este tipo de EP ha sido relacionado con mutaciones en diferentes genes como la parkina, α -sinucleína, LRRK2, DJ-1 y PINK-1 (Gwinn-Hardy, 2002).

A pesar de que la etiología de la forma esporádica no familiar de la EP se desconoce, actualmente existen numerosas teorías que tratan de describir los

posibles factores que producen la degeneración de las neuronas de la sustancia nigra (SN). Estas teorías incluyen a toxinas ambientales como pesticidas o insecticidas, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, entre otras (Schapira, 1994; Youdim, Ben-Shachar et al., 1994; Hoehn and Yahr, 1998; Rosenberg, 2002). La correlación positiva entre la pandemia de influenza en 1918 y la mayor incidencia de parkinsonismo en esta época, condujo a la idea de que una infección viral pudiera ser la causa de la EP, aunque la búsqueda de partículas virales en el cerebro de estos pacientes no fue exitosa (Isgreen, Chutorian et al., 1976; Marttila and Rinne, 1976; Ravenholt and Foege, 1982; Takahashi and Yamada, 1999; Jellinger, 2001).

1.2.2 Fisiopatología y Anatomía patológica: La primera clave de la patología de esta enfermedad la dio Brissaud, quien especuló que el daño en la SN podría llevar al padecimiento de la EP (Brissaud, 1895). Más tarde se reconocieron inclusiones eosinofílicas (cuerpos de Lewy) en la SN de pacientes con EP como una característica patognomónica de esta enfermedad (Greenfield and Bosanquet, 1953). Estas inclusiones aparecen también en otros núcleos pigmentados y no pigmentados del Sistema Nervioso Central (SNC), entre los que se destacan los siguientes: núcleo dopaminérgico hipotalámico, sistema noradrenérgico (neuronas ceruleocorticolímbicas), sistema serotoninérgico (proyección ascendente de los núcleos del rafe) y sistema colinérgico (neuronas septohipocámpicas). El mayor avance en la comprensión de la EP llegó cuando se descubrió la deficiencia de dopamina en el cuerpo estriado y en la SN de estos pacientes (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Estudios posteriores

demonstraron la conexión existente entre la SN y el cuerpo estriado sugiriendo que la pérdida neuronal en la SN producía directamente la deficiencia dopaminérgica en el cuerpo estriado (Poirier and Sourkes, 1965). Los síntomas de la EP aparecen cuando desaparecen al menos el 50% de la población de neuronas dopaminérgicas en la SN y se reduce en un 80% los niveles de dopamina en el cuerpo estriado (Lang and Lozano, 1998; Deumens, Blokland et al., 2002).

Uno de los hallazgos característicos en las muestras post-mortem de pacientes con EP es la activación de las células de la glía, en particular de la microglía acompañada de la presencia de mediadores inflamatorios como por ejemplo, citoquinas pro-inflamatorias. (McGeer, Itagaki et al., 1988; Mogi and Nagatsu, 1999; McGeer and McGeer, 2004; Nagatsu and Sawada, 2005; Sawada, Imamura et al., 2006; McGeer and McGeer, 2007).

1.2.3 Tratamiento: El conocimiento de que la EP era una enfermedad producida por la disminución del contenido de dopamina llevó al desarrollo de terapias correctoras de esta deficiencia (Carlsson A, 1957). Después de algunos intentos, el precursor de la dopamina (levodopa) mostró ser un buen tratamiento para la EP (Cotzias, Papavasiliou et al., 1969). Avances posteriores en la terapia de la EP decidieron combinar a la levodopa con un inhibidor de la descarboxilasa periférica como la carbidopa o la benserazida (Rinne and Sonninen, 1973). Esta combinación redujo notoriamente las náuseas y los vómitos asociados a la terapia con levodopa y permitió que una mayor proporción de levodopa pueda llegar al cerebro (Rinne and Sonninen, 1973). A

pesar de los avances en el tratamiento de los síntomas de la EP, la habilidad de estos tratamientos de proveer una aceptable calidad de vida disminuye con el tiempo. Esto se debe al desarrollo de complicaciones motoras como efecto secundario del tratamiento con levodopa, entre ellas las disquinesias (Olanow, Perl et al., 2004). La terapia sintomática no puede atenuar los síntomas como así tampoco disminuir la neurodegeneración del sistema nigroestriatal. Actualmente existe otro tipo de terapia que consiste en la estimulación cerebral profunda (Kern and Kumar, 2007). Es un procedimiento quirúrgico usado para tratar los síntomas debilitantes de la EP, tales como el temblor, la rigidez y la lentitud de movimientos. La estimulación cerebral profunda usa un dispositivo similar a un marcapasos que es implantado en regiones del cerebro involucradas en el control motor como el núcleo subtalámico o el globo pálido (Kern and Kumar, 2007). Este tipo de terapia se usa solamente en pacientes cuyos síntomas no pueden ser controlados adecuadamente con el tratamiento farmacológico.

Dos grandes vacíos del conocimiento impiden el desarrollo de nuevas terapias efectivas contra la forma esporádica de la EP: el desconocimiento de la etiología y la incompleta caracterización de su fisiopatología. Por esta razón, un gran esfuerzo en el campo de la investigación de la EP está enfocada a encontrar la causa de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas así como también a las terapias protectoras y/o terapias de reemplazo.

1.3 Modelos de Enfermedad de Parkinson

La pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SN junto con la disminución del contenido de dopamina en el estriado representan las alteraciones histológicas y neuroquímicas más importantes de la EP. Por lo tanto, en el modelo ideal debería observarse una pérdida gradual y progresiva de las neuronas dopaminérgicas en el individuo adulto así como la detección de alteraciones motoras y la aparición de los cuerpos de Lewy. Los modelos existentes han sido de gran utilidad para el estudio del funcionamiento de la vía nigroestriatal, el estudio de los mecanismos implicados en la muerte de las neuronas dopaminérgicas y la eficacia de nuevos tratamientos.

Los modelos más usados de EP se basan en la utilización de 3 sustancias: MPTP (1-metil-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina), rotenona y 6-hidroxidopamina (6OHDA).

1.3.1 MPTP: Es un contaminante de la heroína sintética. Su descubrimiento ocurrió en 1982 cuando un grupo de adictos en California desarrollaron severos parkinsonismos. La identificación de la toxina MPTP como causante de parkinsonismos en humanos, llevó al desarrollo de modelos de la enfermedad en primates y ratones. El MPTP es altamente lipofílico, cruza rápidamente la barrera hematoencefálica (BHE) y es convertido en su metabolito activo MPP⁺ por la monoamina oxidasa B presente en las células gliales. El MPP⁺ es tomado por el transportador de dopamina y se acumula en las neuronas dopaminérgicas. En las mitocondrias, inhibe el complejo I de transporte de electrones, reduce la generación de ATP y genera estrés oxidativo por aumento

de la concentración de radicales libres de oxígeno (Beal, 2001). Una única inyección de MPTP causa degeneración de la SN en 1-2 semanas, por lo que se lo considera un modelo agudo de neurodegeneración (Beal, 2001).

También existen variaciones de este modelo que consisten en inoculaciones crónicas o inyecciones seriadas de MPTP a través del tiempo convirtiéndolo en un modelo crónico que replica mejor la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la EP (Diosque, Padilla et al., 2004; Yazdani, German et al., 2006).

1.3.2 Rotenona: Es un insecticida y pesticida de amplio espectro. Es un inhibidor de alta afinidad del complejo I de la cadena de fosforilación oxidativa de la mitocondria. Se sugirió su uso como modelo de EP por los estudios epidemiológicos que indicaban que los pesticidas y toxinas ambientales estaban involucrados en la patogénesis de la EP (Beal, 2001). Este modelo se asemeja al modelo ideal, ya que los animales desarrollan una progresiva degeneración de la vía nigroestriatal y las neuronas dopaminérgicas de la SN presentan inclusiones citoplasmáticas. Dichas inclusiones presentan un centro denso rodeado de elementos fibrilares que se asemejan a los cuerpos de Lewy descritos anteriormente (Beal, 2001). Sin embargo, este modelo sufre la grave desventaja de la variabilidad en la susceptibilidad interindividuo a la toxina, obteniéndose por ejemplo, sólo 12 animales con las lesiones de la EP de un total de 25 animales tratados con rotenona (Beal, 2001).

1.3.3 6OHDA: Es un análogo hidroxilado de la dopamina. Esta neurotoxina es ampliamente utilizada en el desarrollo de modelos experimentales de EP en

roedores. Ungerstedt en 1968 describió por primera vez que la inyección estereotáxica de 6OHDA en la vía nigroestriatal inducía una lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SN (Ungerstedt, 1968). La neurotoxicidad de la 6OHDA está basada en su efecto inhibitorio de la cadena de fosforilación oxidativa, inhibiendo los complejos I y IV específicamente (Beal, 2001).

El modelado de la EP se puede lograr inyectando la 6OHDA en tres estructuras blanco: el cuerpo estriado, la SN o el fascículo mesencefálico anterior (MFB). Esto resulta en la captación de la 6OHDA por las neuronas dopaminérgicas de la SN donde causa estrés oxidativo y degeneración (Blum, Torch et al., 2001; Deumens, Blokland et al., 2002). La administración de la 6OHDA en la SN o en el MFB induce una degeneración rápida y casi completa de las neuronas dopaminérgicas de la SN. Esta degeneración difiere sustancialmente de la que ocurre en la EP en la que la pérdida neuronal es lenta y progresiva (Deumens, Blokland et al., 2002). Por ello, en los últimos años se está usando como modelo de neurodegeneración a la inyección de la 6OHDA en el cuerpo estriado (Sauer and Oertel, 1994; Deumens, Blokland et al., 2002). En este caso la degeneración neuronal no parece ser debida a un transporte axonal retrógrado de la neurotoxina desde el estriado hacia la SN, sino que corresponde a una degeneración neuronal retrógrada secundaria a la lesión de los terminales dopaminérgicos estriatales (Sauer and Oertel, 1994). La toxina causaría una rápida degeneración de los terminales comenzando 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 (Figura 2 B).

El modelo animal de EP utilizado en esta tesis fue descrito por Sauer y Oertel en 1994 (Sauer and Oertel, 1994). Este modelo utiliza una única inyección de 20 μ g de 6OHDA en el cuerpo estriado produciendo una atrofia y degeneración lenta y progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. La sobrevida neuronal es de 83%, 39%, 44%, 34% y 52% a 1, 2, 4, 8 y 16 semanas post inyección, respectivamente (Figura 2 A y 2 B).

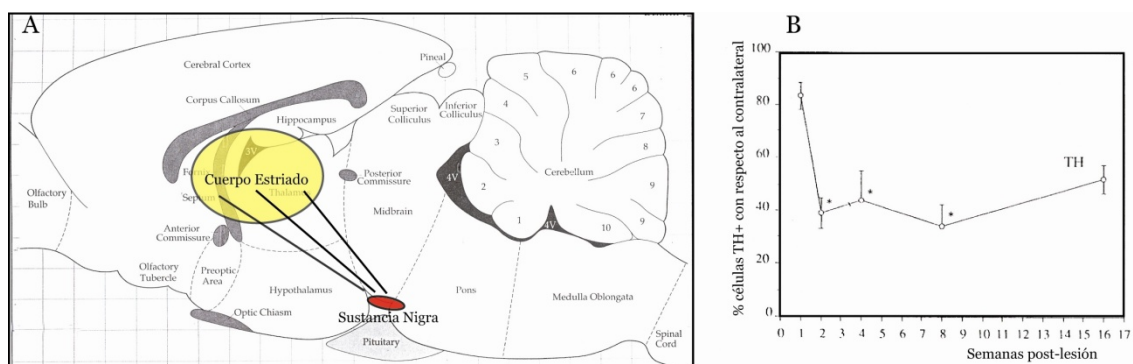


Figura 2: A) Esquema representativo de la vía nigroestriatal. Adaptado de Paxinos, 1986. B) Recuento de células tirosina hidroxilasa (TH) positivas en la SN medido a distintos tiempos post-inyección de 6OHDA en el cuerpo estriado. Número de células con respecto al hemisferio contralateral. Adaptado de Sauer y Oertel, 1994.

Este modelo resulta muy interesante ya que reúne las características requeridas de parcialidad y gradualidad para estudiar tanto la exacerbación de la neurodegeneración como el efecto protector de ciertas sustancias. Como mencionamos anteriormente, la inyección de la 6OHDA directamente en la SN o en el MFB produce una degeneración rápida y casi completa de las neuronas de la SN (Deumens, Blokland et al., 2002). El modelo de toxicidad con MPTP (1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6- tetrahidropiridina) produce la pérdida neuronal como consecuencia de un proceso agudo o subagudo y se requieren sucesivas inoculaciones para obtener un modelo crónico. Y el modelo de inyección de

rotenona tiene la gran desventaja de la variabilidad interindividuo que hace muy difícil el análisis posterior (Beal, 2001).

2. Inflamación en el SNC

La inflamación es una respuesta estereotipada no específica. Consiste en un complejo dinámico de reacciones citológicas e histológicas que se producen en los vasos sanguíneos afectados y tejidos adyacentes (Webster, Tonelli et al., 2002). Forma parte de la respuesta inmune innata y produce la liberación de mediadores inflamatorios con efectos agudos principalmente sobre la vasculatura. La vasodilatación localizada, el aumento de la permeabilidad vascular, la extravasación de proteínas plasmáticas y la migración de leucocitos en el tejido afectado producen los clásicos signos de la inflamación, a saber: calor, dolor, rubor e induración (Webster, Tonelli et al., 2002). Existe un mecanismo de retroalimentación positivo que aumenta la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los leucocitos infiltrantes activados. Así también, se ponen en marcha mecanismos anti-inflamatorios destinados a restablecer la homeostasis del tejido. El eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) y los glucocorticoides en particular, son esenciales para limitar el proceso inflamatorio y permitir su resolución favorable (Besedovsky and del Rey, 1991). La inflamación en el cerebro está altamente regulada ya que si ésta persiste puede exacerbar el daño inicial. Además recordemos que el cerebro está contenido por el cráneo que no permite una excesiva distensión como consecuencia de la extravasación de líquido y células (Yang, Min et al., 2007). Por lo tanto, una respuesta inflamatoria con las características mencionadas anteriormente podría ser catastrófica en el cerebro.

El término inflamación en el SNC es utilizado de manera confusa. A veces este término se refiere al reclutamiento de leucocitos en el cerebro y otras veces a la

respuesta de las células de la glía. A los efectos de esta tesis, vamos a definir inflamación como la respuesta de las células de la glía, principalmente la microglía, y la presencia de infiltrado inflamatorio en el cerebro.

2.1 La microglía

Del Río Hortega fue quien describió inicialmente estas células como una población celular con una morfología diferente al resto de las células de la glía como los astrocitos y los oligodendrocitos (Del Río Hortega, 1919). Las células microgliales son células inmunocompetentes y con capacidad fagocítica que pueden mediar la respuesta inmune innata y de este modo, ejercer un rol crítico en la defensa del SNC (Kim and de Vellis, 2005). Podríamos decir que, las células microgliales son los macrófagos residentes del SNC (Kreutzberg, 1996).

La microglía representa alrededor del 10% de la población celular del cerebro (Perry and Gordon, 1988) y exhibe un fenotipo en reposo o “resting” en el cerebro normal (Kreutzberg, 1996). Esta microglía en reposo es altamente sensible a diferentes formas de alteraciones del microambiente del cerebro y puede rápidamente activarse ante sucesos patológicos como infecciones o inflamaciones, cambiando su morfología (activación morfológica) (Banati, Gehrman et al., 1993; Kreutzberg, 1996; Kim and de Vellis, 2005; McGeer and McGeer, 2007b). La activación moderada de la microglía juega un rol importante en la homeostasis del cerebro, removiendo neurotoxinas, células muertas y debris celulares (Nakamura, 2002; Kim and de Vellis, 2005), así como también promoviendo el crecimiento de procesos neuronales a través de la liberación de factores tróficos como por ejemplo: BDNF (factor neurotrófico

derivado del cerebro) o GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía) (Aloisi, 1999; Piehl and Lidman, 2001; Streit, 2002; McGeer and McGeer, 2004a; Hald and Lotharius, 2005; McGeer and McGeer, 2007b).

A medida que la microglía comienza su proceso de activación, sufre transformaciones del citoesqueleto, incrementa su cuerpo celular, reduce sus procesos y es capaz de mostrar una apariencia tipo macrófago en su estadio morfológico de mayor activación (Banati, Gehrman et al., 1993; Ling and Wong, 1993; Kreutzberg, 1996; Raivich, Bohatschek et al., 1999). En este estadio morfológico, la microglía es capaz de liberar diferentes mediadores inflamatorios así como también expresar marcadores de superficie como por ejemplo el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I y II (MHCI y MHCII) (Kreutzberg, 1996; O'Keefe, Nguyen et al., 2002; Perry, Cunningham et al., 2007). Así también, este tipo celular puede expresar moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 y CD86 una vez activada (Aloisi, 2001; O'Keefe, Nguyen et al., 2002). Por lo tanto, podría ser considerada como una célula presentadora de antígenos. Se sabe que, las moléculas MHCI y MHCII son importantes para iniciar y propagar la respuesta inmune a través de la presentación antigénica a los linfocitos CD8⁺ y CD4⁺ respectivamente (Neumann, 2001; O'Keefe, Nguyen et al., 2002; Imamura, Hishikawa et al., 2003).

Si bien numerosa evidencia apunta a un efecto neurodegenerativo de la microglía activada y los productos por ella secretados, también se ha observado que la microglía podría tener efectos neuroprotectores como mencionamos anteriormente. Por lo tanto, podríamos concluir que, la microglía activada

podría tener efectos duales dependiendo de su activación y de los factores liberados al nicho neuronal (McGeer and McGeer, 2007b; Perry, Cunningham et al., 2007).

Clasificaremos los estadios de activación de la microglía adaptando la clasificación de Kreutzberg (Kreutzberg, 1996) (Ver Figura 3).

- Estadio 1: Microglía en reposo: células con cuerpo en forma de cono y procesos finos y ramificados.
- Estadio 2: Microglía activa ramificada: cuerpo celular alargado con procesos largos y gruesos.
- Estadio 3: Microglía ameboide: cuerpo celular redondo con procesos cortos y escasos.
- Estadio 4: Células fagocíticas: cuerpo celular redondo con citoplasma vacuolado en las que no se pueden observar procesos en el microscopio óptico.

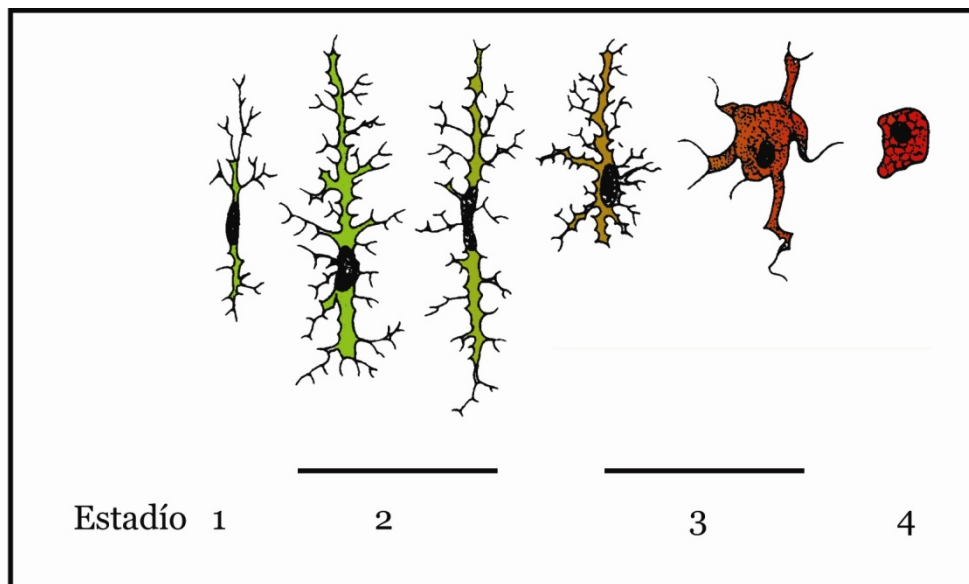


Figura 3: Estadios morfológicos de activación de la microglía modificado de Kreutzberg 1996.

Consideraremos microglía activada a todos los estadios con excepción de los denominados “en reposo”. Todos estos tipos morfológicos son capaces de unirse a la lectina GSA1B:4. Como mencionamos anteriormente, a lo largo de la activación morfológica de la microglía, ésta va experimentando cambios de forma y adquisición de diferentes marcadores, entre ellos MHCII. Por lo tanto algunos de estos estadios de activación puede ser también MHCII+. Así también, el estadio 4 se lo puede caracterizar como positivo para el marcador de actividad fagocítica ED-1.

2.1.1 La microglía y la Enfermedad de Parkinson

La presencia de microglía activada junto con la expresión de moléculas MHC II+ en estas células en muestras de pacientes con EP fue inicialmente descrita por Mc Geer en 1988 (McGeer, Itagaki et al., 1988b). Así también, se describió un aumento de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en la microglía activada de la SN de pacientes con EP pero no en controles normales (Knott, Stern et al., 2000). Estos hallazgos sugieren que la activación microglial podría ser una consecuencia de la muerte neuronal existente en la SN o podría estar involucrada en la evolución de la enfermedad (McGeer and McGeer, 2007b). Si bien la microglía se halla distribuída a lo largo de todo el SNC, la mayor concentración de la misma se encuentra en la SN (Lawson, Perry et al., 1990). Esta característica especial de la SN podría contribuir a la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas a diferentes injurias.

Estudios realizados en diferentes modelos animales de EP también han demostrado la presencia de microglía activada en la SN (Hunot, Dugas et al., 1999; Langston, Forno et al., 1999; Mirza, Hadberg et al., 2000; Vila, Jackson-Lewis et al., 2001; Depino, Earl et al., 2003; Hirsch, Breidert et al., 2003; Ferrari, Pott Godoy et al., 2006; Sawada, Imamura et al., 2006). En dichos modelos, la activación microglial fue observada mientras que el proceso neurodegenerativo estaba activo, sugiriendo de algún modo que la microglía es capaz de estar activa por largos períodos. Así también Langston en 1999 encontró en muestras post-mortem de pacientes expuestos al MPTP (producto contaminante de la heroína que causó parkinsonismo en los adictos), que la microglía estaba activada aún 16 años después de la intoxicación, indicando de esta manera una respuesta prolongada por parte de este tipo celular (Langston, Forno et al., 1999).

A pesar del esfuerzo realizado en este campo de la EP, todavía se desconoce el rol funcional de esta activación en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SN.

2.2 Citoquinas

Las citoquinas son un grupo diverso de polipéptidos que están asociados a la inflamación, activación inmunológica, diferenciación y/o muerte celular. Incluye interleuquinas (IL), interferones (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF), quemoquinas y factores de crecimiento. Tienen diferentes acciones y son rápidamente inducidas en respuesta a daños o infecciones. Han sido clasificadas en pro-inflamatorias o anti-inflamatorias dependiendo del balance de su efecto

sobre el sistema inmune (Hopkins and Rothwell, 1995; Rothwell and Hopkins, 1995; Szelenyi, 2001).

Sin embargo, las citoquinas no sólo están ligadas a la respuesta inmune sino que también están involucradas en procesos fisiológicos y patológicos del SNC (Sternberg, 1997; Szelenyi, 2001). Las interacciones neuroinmunes son bidireccionales, por ejemplo las citoquinas pueden modular la acción, diferenciación y supervivencia de las neuronas mientras que los neurotransmisores y neuropéptidos liberados por las neuronas pueden influenciar a la respuesta inmune (Sternberg, 1997; Szelenyi, 2001).

Las citoquinas pueden ejercer sus efectos directa o indirectamente en el cerebro. Los efectos directos son los producidos por las citoquinas que se encuentran en el cerebro o en el microambiente neuronal mientras que los efectos indirectos son el resultado de la acción de las citoquinas sobre otras estructuras blanco cuyos mediadores luego impactan en el SNC (Sternberg, 1997; Szelenyi, 2001).

2.2.1 Interleuquina 1 (IL-1)

La IL-1 fue la primera citoquina identificada con acción en el cerebro y fue llamada “pirógeno endógeno” (molécula que causa fiebre) (Dinarello, 1991).

La IL-1 es el prototipo de una citoquina multifuncional, afecta a casi todos los tipos celulares, es una de las principales citoquinas pro-inflamatorias y el límite entre sus efectos clínicos beneficiosos o tóxicos es muy estrecho (Dinarello, 1996). El término IL-1 describe una familia de dos proteínas altamente relacionadas, la IL-1 α y la IL-1 β que comparten escasa homología de secuencias pero acciones biológicas similares. Existe una tercera proteína, el receptor

antagonista de IL-1 (IL-1ra), que ha sido identificada como un antagonista altamente selectivo y competitivo que bloquea las acciones de la IL-1 por unión al receptor de tipo I (IL-1RI). Las tres moléculas se sintetizan como precursores, pero mientras los precursores de IL-1 α y IL-1ra son biológicamente activos, el precursor de IL-1 β es inactivo y debe ser clivado por la enzima caspasa 1 (IL-1 converting enzyme - ICE) para tener actividad biológica (Dinarello, 1991; Rothwell, 2003).

Actualmente se han descrito numerosas acciones de la IL-1 en el cerebro incluyendo la supresión del apetito con la consiguiente pérdida de peso, modulación del sueño, cambios comportamentales, acción sobre los sistemas endócrino, inmune y nervioso, así como también influenciando la plasticidad sináptica, la transmisión neuronal y la muerte celular (Dinarello, 1991; Rothwell, 2003).

Numerosa evidencia relaciona la contribución de la IL-1 al daño neuronal. Tanto la IL-1 α como la IL-1 β son expresadas en bajos niveles en el cerebro normal de humanos y roedores, mientras que existe una alta expresión constitutiva de IL-1ra (Rothwell, 2003). La expresión de IL-1 α , pero principalmente de IL-1 β , es inducida rápidamente en respuesta a daños en el cerebro, encontrándose por ejemplo el ARN mensajero dentro de los 15 minutos y la proteína correspondiente dentro de los 60 minutos post-daño. Las principales células responsables de la expresión temprana de IL-1 parecerían ser la microglía y los macrófagos perivasculares. Sin embargo, los astrocitos, las células endoteliales y las células infiltrantes del sistema inmune también son capaces de expresar IL-1 y algunos estudios sugieren que las neuronas también pueden expresarla

(Rothwell, 2003). La expresión de IL-1ra también es inducida luego de estos daños pero ligeramente más tarde que la IL-1 α y β (Dinarello, 1991; Rothwell, 2003).

La IL-1 β es considerada uno de los mediadores más importantes en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas y agudas, tanto en la periferia como en el sistema nervioso central (SNC) (Dinarello, 2002; Patel, Boutin et al., 2003; Basu, Krady et al., 2004). Existe evidencia que sugiere un vínculo estrecho entre las enfermedades neurodegenerativas y la IL-1 β pero aún se desconoce el mecanismo por el cual IL-1 exacerba las lesiones focales en el SNC (Rothwell and Hopkins, 1995; Anthony, Bolton et al., 1997). Esta exacerbación podría deberse a la acción citotóxica directa de IL-1 β sobre las células residentes en el SNC, o ser el resultado de un efecto secundario a la entrada de leucocitos al SNC. Se conoce que los principales efectos de la inyección de IL-1 β en el parénquima cerebral tienen que ver con la activación de las células de la glía (Allan, Tyrrell et al., 2005) y citas allí).

Sin embargo, se ha descrito un rol dual para esta citoquina. Por ejemplo, se observó que la inyección de IL-1 previamente a la administración intraestriatal de 6OHDA, disminuye la neurodegeneración en ese modelo animal (Saura, Pares et al., 2003). Por lo tanto, esta citoquina jugaría un papel importante en la plasticidad y regeneración del sistema nervioso diferenciándose de su función asociada al daño neuronal.

Por lo expuesto anteriormente, el mecanismo de acción de la IL-1 β en la neurodegeneración parecería ser complejo y podría involucrar diferentes

respuestas que podrían contribuir o limitar el daño neuronal (Rothwell and Luheshi, 2000).

2.3 Compuestos anti-inflamatorios

Los compuestos anti-inflamatorios se dividen en compuestos esteroideos que poseen en su estructura química el ciclo pentanoperhidrofenantreno y los compuestos no esteroideos (AINEs - Anti-inflamatorios no esteroideos) que son un grupo heterogéneo de compuestos que no poseen este ciclo dentro de su estructura química.

2.3.1 Anti-inflamatorios esteroideos: Glucocorticoides.

Este grupo de compuestos ejercen una plétora de acciones entre las que se encuentran efectos sobre el metabolismo lipídico, metabolismo oxidativo, balance electrolítico y regulación del metabolismo de los hidratos de carbono, entre otros. A los efectos de esta tesis, profundizaremos sólo algunos de los efectos de los glucocorticoides (GC), en especial aquellos que están íntimamente relacionados con su acción anti-inflamatoria. La eficacia de los glucocorticoides en disminuir la inflamación proviene de los efectos pleiotrópicos del receptor de glucocorticoides en diferentes vías de señalización. Los glucocorticoides pueden controlar la inflamación inhibiendo el proceso inflamatorio a través del aumento de la transcripción de genes anti-inflamatorios (por ejemplo lipocortina 1 e IL-1ra) y disminuyendo la transcripción de genes inflamatorios (citoquinas pro-inflamatorias, quemoquinas, ciclooxigenasa 2, moléculas de

adhesión, iNOS, fosfolipasa A2, entre los principales) (Rhen and Cidlowski, 2005).

Los glucocorticoides aumentan la síntesis de lipocortina 1 que tiene un efecto inhibitorio de la fosfolipasa A2, inhibiendo así la producción de mediadores lipídicos. Así también, aumentan la síntesis de IL-1ra impidiendo la unión de IL-1 a su receptor, contrarrestando de esta manera la acción inflamatoria de una de las principales citoquinas pro-inflamatorias, la IL-1 (Rhen and Cidlowski, 2005).

Por otro lado, inhiben las funciones del factor de transcripción NF- κ B manteniéndolo unido a la proteína inhibitoria I κ B. Existe evidencia que los glucocorticoides inducen un efecto antagonista del factor NF- κ B aumentando la síntesis de I κ B (Rhen T, 2004; Bladh, Liden et al., 2005). A través de esta vía se estaría regulando negativamente la síntesis de mediadores inflamatorios, entre ellos de citoquinas pro-inflamatorias (McKay and Cidlowski, 1999) (Figura 4).

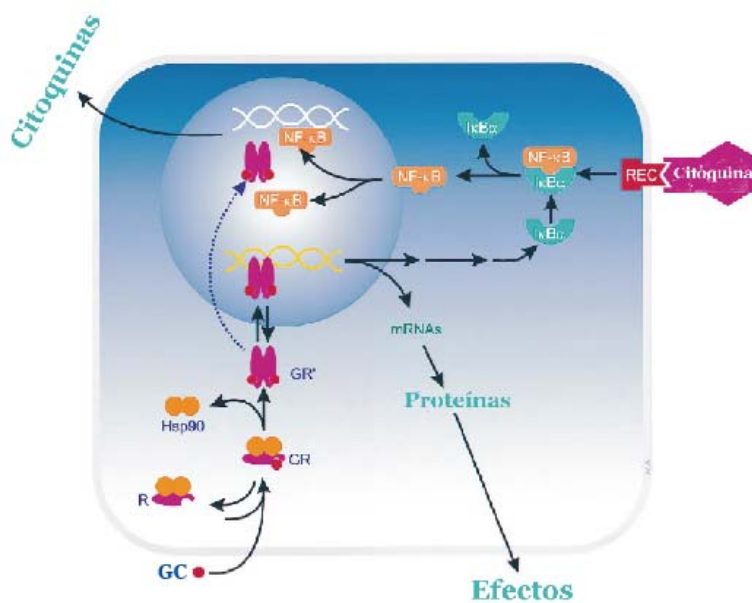


Figura 4: Mecanismo molecular de los efectos de los glucocorticoides sobre la producción de citoquinas. Esquema de la unión de los GC al receptor de GC (GR), su translocación al núcleo y las interacciones con factores de transcripción. Los GC se unen a su receptor, el complejo GC-GR se dimeriza y se trasloca al núcleo donde se une a los elementos respondedores de los GC en el DNA, e induce o inhibe la síntesis del gen al que se unió. Los GC también pueden regular la transcripción modulando la unión del factor de transcripción NF- κ B al DNA o induciendo la síntesis del inhibidor de NF- κ B, I κ B. Flechas llenas representan

vías estimulatorias y flechas punteadas representan vías inhibitorias. Adaptado de Sternberg 1997.

Existe otra vía de señalización a través de receptores asociados a membranas y segundos mensajeros también llamada vía no genómica (Cato, Nestl et al., 2002). Existe evidencia que la inhibición de la inflamación se realiza por las tres vías, siendo las dos primeras denominadas “vías clásicas” pero lentas (30-60 minutos) mientras que la tercera vía es de acción rápida y ejercería su acción en minutos (Cato, Nestl et al., 2002).

Limitaciones en el uso de glucocorticoides: A pesar de que los beneficios de la terapia con glucocorticoides derivan de los cambios vasculares de escaso tiempo de duración, de la leve inmunosupresión y del ambiente anti-inflamatorio; las terapias de largo plazo o con altas dosis de glucocorticoides tienen efectos secundarios variados (Schacke, Docke et al., 2002). Entre ellos podemos mencionar hipertensión, osteoporosis, riesgo aumentado de fracturas y lentitud en la cicatrización de heridas, entre otros (Schacke, Docke et al., 2002). Estos efectos secundarios hacen de los glucocorticoides una herramienta de uso limitado en distintas patologías crónicas.

2.3.2 Anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs).

Son un grupo heterogéneo de compuestos con acción analgésica, antipirética y anti-inflamatoria. Sus miembros más destacados son la aspirina y el ibuprofeno. El mecanismo de acción clásico de estas drogas es a través de la inhibición de las enzimas ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1 y COX-2) que catalizan la formación de tromboxanos y prostaglandinas siendo estas últimas consideradas mediadores de la inflamación. El descubrimiento de este mecanismo de acción le valió el Premio Nobel a Sir John Vane en 1982.

Actualmente se ha observado que los AINEs (aspirina, ácido mefenámico, indometacina, ketoprofeno e ibuprofeno, entre otros) también tendrían efectos sobre la inhibición del sistema generador del radical de oxido nítrico (NO•)(Asanuma, Nishibayashi-Asanuma et al., 2001). Además se ha demostrado que algunos de estos compuestos anti-inflamatorios (aspirina, indometacina, ibuprofeno) modularían los efectos de factores de transcripción como el NF-κB, factor de transcripción clave en el proceso inflamatorio, disminuyendo de esta manera la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias. (Landreth and Heneka, 2001; Kielian and Drew, 2003).

A pesar de que todos los AINEs tienen actividad inhibitoria de la COX-1 y 2, los efectos neuroprotectores de cada AINE dependen de su perfil farmacológico en las otras vías mencionadas (Figura 5).

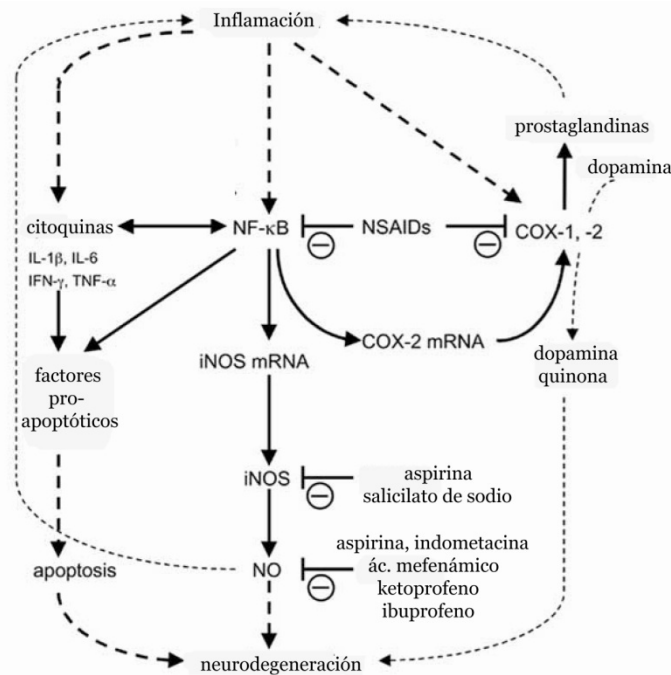


Figura 5: Efectos farmacológicos de los AINEs en los eventos moleculares inducidos por la inflamación y su relación con la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Adaptado de Asanuma 2004.

Un estudio epidemiológico reciente sugiere que el uso de anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) retrasaría o reduciría el riesgo de padecer EP (Chen, Zhang et al., 2003). En este estudio se analizó la aparición de por lo menos dos signos cardinales de EP en una población de 147.948 individuos en EEUU con características de consumidores crónicos de analgésicos/anti-inflamatorios. Los usuarios de analgésicos/anti-inflamatorios fueron clasificados según el número de grageas que consumían por semana. Dicho estudio arrojó un riesgo relativo de 0.65 para los consumidores de ibuprofeno, lo que indica un menor riesgo de padecer EP. No se encontró asociación del riesgo de padecer EP con los otros analgésicos/anti-inflamatorios usados como aspirina u otros AINE.

3. Resultados previos

En esta tesis utilizamos el modelo experimental de EP que consiste en la inyección unilateral en el cuerpo estriado de 6 hidroxidopamina (6OHDA), un análogo hidroxilado del neurotransmisor natural dopamina. Es un modelo de muerte neuronal gradual que ha sido muy bien caracterizado en el laboratorio (Depino, Earl et al., 2003) (Figura 6). Además, en este trabajo también se estudió el curso temporal de la activación de la microglía en la SN durante su degeneración. Dicha activación se hizo visible en la SN a los 6 días post-inyección de 6OHDA, presentando un pico a los 12 días post-inyección para luego comenzar a disminuir el día 28 post-inyección de 6OHDA (Figura 6 D). Los estadios de activación morfológica observados en este trabajo correspondieron a los estadios tempranos de activación (estadios 2-3, Figura 6 A, B y C). Así también, se estudió el perfil de inducción de citoquinas en el cuerpo estriado y en la SN. El patrón de expresión del sistema IL-1 en la SN mostró un comportamiento atípico interesante. Los niveles de ARNm para IL-1ra no mostraron cambios frente a la neurodegeneración, mientras que los niveles de ARNm de los agonistas (IL-1 α e IL-1 β) se vieron inducidos en la SN ipsilateral a la inyección de la neurotoxina en el estriado (Figura 6 E y F). Dicha inducción comenzó a los 12 días post-inyección de 6OHDA y se mantuvo hasta los 30 días, último día estudiado en este trabajo. La inducción de ARNm para IL-1 β fue mayor que la de IL-1 α (16 veces vs. 2 veces respectivamente, Figura 6 E y F). 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 medido por ELISA. En cambio, un estímulo pro-inflamatorio clásico como la

inyección de LPS en la SN, sí fue capaz de inducir la expresión de IL-1 α e IL-1 β tanto a nivel de ARNm como de proteína. Por lo tanto, la falta de detección de las proteínas en la SN ipsilateral se atribuyó a un control post-transcripcional, traduccional y/o post-traduccional. En resumen, estos datos sugieren que la expresión de estas proteínas (IL-1 α e IL-1 β), está sujeta a un estricto control en la SN durante la neurodegeneración.

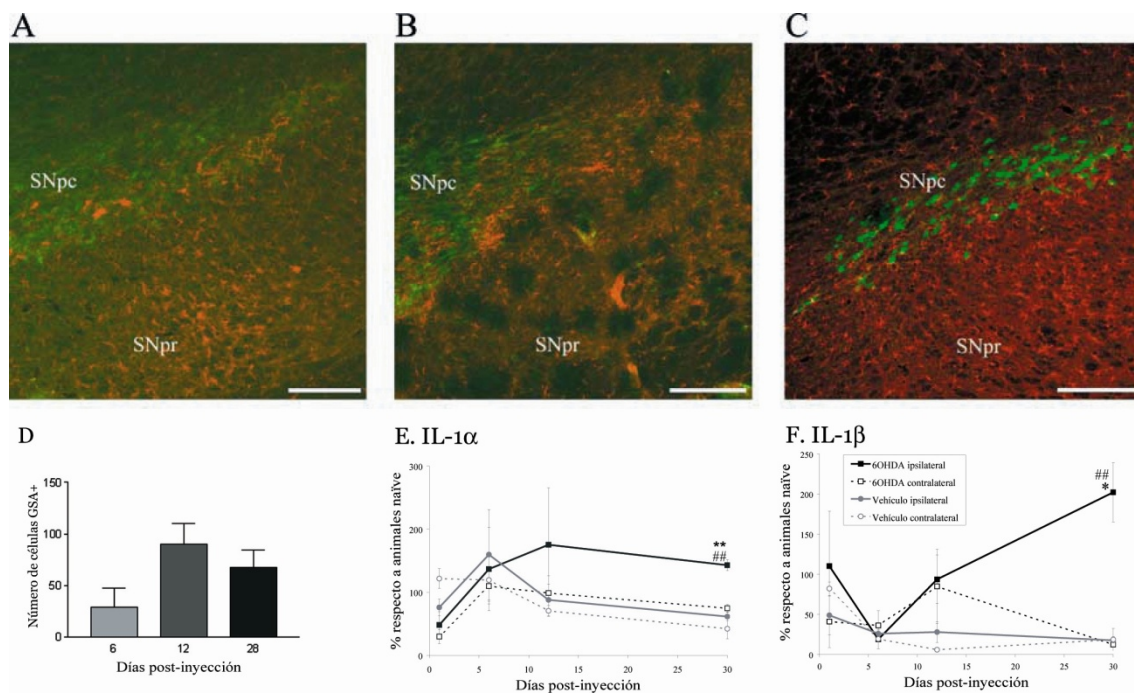


Figura 6: A-D) Activación de la microglía en la SN luego de la inyección de 6OHDA en el cuerpo estriado. Análisis de los estadios de activación mediante la unión a la lectina GSA: 1B4 (rojo) e inmunofluorescencia para células tirosina hidroxilasa positivas (TH+ verde). Análisis de la SN ipsilateral a los 6 (A), 12 (B) y 28 (C) días post-inyección de 6OHDA. Barra de escala: 200 μ m. D) Cuantificación de la microglía activada (estadios 2-3) a los 6, 12 y 28 días en la SN ipsilateral a la inyección intraestriatal de 6OHDA. E-F) Análisis de la expresión de citoquinas por RT-PCR semicuantitativa en la SN ipsilateral a la inyección intraestriatal de la neurotoxina. Patrones de expresión de IL-1 α (E) e IL-1 β (F). Obsérvese los niveles de ARNm de IL-1 α y de IL-1 β (principalmente) en la SN a los 12 y 30 días post-inyección intraestriatal de 6OHDA. Adaptado de Depino et al, 2003.

Las células capaces de transcribir citoquinas pro-inflamatorias pero no de sintetizar la proteína se las denomina “cebadas” o “primed”. Estas células tienen la capacidad de disparar rápidamente la traducción de la proteína ante estímulos que en otras condiciones serían inocuos, resultando en una producción rápida de IL-1 (Dinarello, 1996; Perry, Cunningham et al., 2002). La célula candidata a liberar diferentes mediadores inflamatorios en el SNC es la microglía (Banati, Gehrmann et al., 1993; Lee, Nagai et al., 2002; Kim and de Vellis, 2005; Kim and Joh, 2006). Por lo tanto, podríamos postular que la presencia de los estadios de activación tempranos de la microglía observados en el trabajo de Depino (Depino, Earl et al., 2003) junto con la presencia de mensajeros de citoquinas pro-inflamatorias sugieren que la microglía se encontraría “cebada” o “primed” en la SN en este modelo experimental de EP.

Objetivo General

Un desafío importante en la investigación neurológica en estos tiempos es la conexión emergente entre la inflamación y las enfermedades neurodegenerativas. Numerosa evidencia indica la presencia de signos de inflamación en cerebros post-mortem de pacientes con EP incluyendo los hallazgos de Langston en 1999 que encontró activación de la microglía en pacientes con EP, 16 años después de la intoxicación con MPTP (McGeer, Itagaki et al., 1988b; Mogi, Harada et al., 1994; Mogi, Harada et al., 1996; Langston, Forno et al., 1999; Mogi, Togari et al., 1999). Por otro lado, se ha observado que las infecciones periféricas están asociadas a estadios avanzados de EP y son causas frecuentes del deceso de los pacientes con EP (Nakashima, Maeda et al., 1997; Beyer, Herlofson et al., 2001). Además, existen datos recientes que relacionan la EP con infecciones bacterianas periféricas. Estos estudios asocian el aumento de los síntomas de la EP con la infección por *Helicobacter pylori* (Bjarnason, Charlett et al., 2005; Dobbs, Dobbs et al., 2005). Como mencionamos en la introducción, existe una correlación positiva entre la incidencia de parkinsonismos y la pandemia de influenza que ocurrió en 1918 (Takahashi and Yamada, 1999). Por lo tanto, estos estudios sugieren de alguna manera, una relación entre la EP y la inflamación.

Estudios recientes en otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de prion, muestran que la microglía una vez “cebada” podría modular la progresión de la enfermedad al reactivarse por otros estímulos proinflamatorios (Perry, Cunningham et al., 2002; Cunningham, Wilcockson et

al., 2005). Estos resultados nos llevan a especular que la inflamación tendría un rol tóxico exacerbando la neurodegeneración en curso en un modelo de EP.

Por lo expuesto anteriormente, podemos hipotetizar que un estímulo inflamatorio podría impactar negativamente sobre la SN en degeneración, produciendo una activación de la microglía a estadios avanzados, exacerbando la neurodegeneración existente y los síntomas motores de la enfermedad.

El objetivo general de esta tesis es evaluar la hipótesis de que la inflamación central o periférica pueda exacerbar la neurodegeneración en la SN investigando los mecanismos celulares y moleculares de dicha exacerbación.

Para desarrollar este objetivo general nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar si la exacerbación de la inflamación central puede aumentar la neurodegeneración, la neuroinflamación y los síntomas motores en el modelo animal de EP (Capítulo I).
2. Analizar si el tratamiento con agentes anti-inflamatorios produce la inhibición de la exacerbación central disminuyendo así el progreso de la EP (Capítulo II).
3. Estudiar si la inhibición o la sobre-expresión de la IL-1, una de las principales citoquinas proinflamatorias, puede modular la neurodegeneración de la SN (Capítulo III).

Materiales y Métodos

1. Animales

En esta tesis se utilizaron ratas Wistar macho adultas de 200 a 250g de peso provenientes de INAME (Instituto Nacional de Medicamentos). Los animales estuvieron de a uno o en grupos de 4–5 animales, según el caso, en jaulas plásticas o metálicas en un ambiente de temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$). Los animales estuvieron sometidos a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con agua y comida *ad libitum*. Los animales fueron aclimatados a la colonia durante una semana antes de cualquier procedimiento.

2. Procedimientos quirúrgicos

2.1 Inyecciones centrales

Todas las operaciones centrales se realizaron a la mañana para evitar variaciones causadas por el ritmo circadiano. Los animales fueron anestesiados con clorhidrato de ketamina (80mg/Kg) y xilazina (8mg/Kg). Luego de ubicar el bregma, se utilizaron las coordenadas determinadas según el atlas de cerebro de rata (Paxinos and Watson, 1986) para inyectar en la región deseada.

2.1.1. Inyección de 6 hidroxidopamina (6OHDA) o vehículo en el cuerpo estriado y de LPS o vehículo en la SN.

Se inyectaron 20 μg de 6OHDA (Sigma) disueltos en 4 μl de solución salina adicionada con 2% de ácido ascórbico a fin de estabilizar la 6OHDA y reducir su oxidación. Las coordenadas elegidas para la inyección en el cuerpo estriado fueron, en milímetros desde el bregma:

+1,0 mm anteroposterior, +3,0 mm lateral y -4,5 mm de profundidad medidos desde la corteza. Para las inyecciones se utilizaron jeringas Hamilton con agujas 26G biseladas. La inyección se realizó con un flujo de 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. y la aguja se retiró en dos etapas dejando un minuto en cada etapa para evitar el reflujo.

Tres o doce días posteriores a la inyección estereotáxica de 6OHDA, se inyectaron 2 μl de LPS (cepa 0111:B4 Sigma, USA) de una concentración de 0,0045 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ lo que hizo un total de 0,09 μg de LPS como estímulo pro inflamatorio. Las coordenadas elegidas para la inyección en la SN fueron, en mm desde el bregma: -5,3 mm anteroposterior, +2,0 mm lateral y -7,2 mm de profundidad medidos desde corteza. Para las inyecciones se utilizaron capilares ultra finos fabricados en el laboratorio a partir de capilares graduados (Drummond Scientific Company, Pennsylvania, USA) cuyo extremo fue afinado con un puller de capilares (Modelo PC-10, Narishige). El diámetro de la punta del capilar es de 50 μm por lo que causa una lesión mecánica mínima al tejido nervioso donde es introducida. El flujo de administración fue de 0,25 $\mu\text{l}/\text{min}$ y la remoción del capilar se realizó en dos etapas.

2.1.2. Inyección de AdIL-1ra en el fascículo mesencefálico anterior (MFB) de animales tratados con 6OHDA o vehículo en el cuerpo estriado y LPS o vehículo en la SN.

Tres días antes de la inyección de 6OHDA en el cuerpo estriado, se inyectaron 1.10^9 partículas infectivas de AdIL-1ra o su control (Ad βgal) disueltas en 1 μl de buffer para adenovectores (TrisClH 10mM pH=7.8,

Cl₂Mg 1mM). Las coordenadas elegidas para la inyección en el MFB fueron, en milímetros desde el bregma: -3,6 mm anteroposterior, +2,0 mm lateral y -8,4 mm de profundidad medidos desde la corteza. Para la inyección se utilizaron los mismos capilares ultra finos mencionados anteriormente. El flujo de administración fue de 0,25µl/min y la remoción del capilar se realizó en dos etapas.

2.1.3 Inyección de vectores adenovirales en el cuerpo estriado

Se inyectaron $5 \cdot 10^7$ partículas infectivas disueltas en 1µl de buffer para adenovectores en las mismas coordenadas mencionadas anteriormente para la 6OHDA. Esto se realizó para lograr la expresión del transgén en la SN debido al transporte retrógrado de los adenovectores. Se utilizaron los mismos capilares ultra finos mencionados. El flujo de administración fue de 0,25µl/min y nuevamente la remoción del capilar se realizó en dos etapas.

2.2. Inyecciones periféricas

2.2.1. Inyección de vectores adenovirales en la vena de la cola

Se inyectaron $1,36 \cdot 10^9$ partículas virales disueltos en 300 µl de buffer para adenovectores en la vena lateral izquierda de la cola de los animales. Seguidamente se inyectaron 300 µl de solución fisiológica en el mismo lugar para asegurar la entrada del virus al torrente sanguíneo.

3. Tratamiento con drogas anti-inflamatorias

3.1. Inyección de dexametasona (DXM) intraperitoneal

Se administró un potente anti-inflamatorio, dexametasona (DXM), en una concentración de 10^{-8} M por animal a partir del día 12 post inyección estereotáxica de 6OHDA. Se realizaron inyecciones diarias y matinales según el protocolo diseñado en los grupos experimentales descritos en el capítulo II y III. Los grupos que no recibieron el tratamiento con DXM no fueron repetidos.

3.2. Administración de Ibuprofeno en el agua.

Se administró una dosis de 8mg/rata/día de ibuprofeno disuelta en el agua de la mamadera en forma diaria y matinal a partir del día 12 post inyección de 6OHDA a ratas pertenecientes a los siguientes grupos experimentales: 6OHDA/LPS y Veh/LPS. Se reemplazó el ibuprofeno de las mamaderas diariamente.

4. Perfusión de los animales y procesamiento del cerebro

Los animales fueron anestesiados con ketamina y xilazina y perfundidos transcardíacamente con 50 ml de solución fisiológica heparinizada (2.5 U por ml) seguido de 300 ml de una solución fría y fresca de paraformaldehído 4% en buffer fosfato (PB, 0,1 M, pH=7,4). Las perfusiones se realizaron con una bomba peristáltica (Masterflex, Cole Palmer Instrument Co., IL, USA) con un flujo constante de 15 ml/min. Los cerebros fueron removidos y postfijados durante 24 horas en la misma solución fijadora a 4°C. Los mismos fueron crioprotegidos en una

solución de sacarosa al 30% en PB y luego congelados con isopentano (J.T.Baker, NJ, USA) en un baño con etanol y hielo seco. Se guardaron a -20°C. Se realizaron cortes seriados de a 6 de 40 μm de grosor en un crióstato (Leica). Las secciones fueron conservadas en solución criopreservadora (3 vol glicerol, 3 vol de etilenglicol y 4 vol de PB) a -20°C hasta ser utilizadas.

5. Vectores adenovirales

En esta tesis se usaron los siguientes vectores virales: adenovector que expresa el gen de la β -galactosidasa (Ad β gal) adenovector que expresa la interleuquina 1 β humana (AdIL-1 β) y adenovector que expresa el receptor antagonista de IL-1 (AdIL-1ra).

Los stocks adenovirales fueron generados en el laboratorio de la siguiente manera:

-Preparación de la semilla: Se realizó la infección de una placa p100 en un 80% de confluencia de células 293 en DMEM alta glucosa con 10% de suero fetal bovino (FBS, natocor). Para ésto, se agregó 2-3 μl del stock correspondiente en 7 ml del medio de cultivo. Se dejó 2 horas, con agitación cada 20 minutos. Luego se cambió el medio por DMEM alta glucosa con 2% FBS. Se dejó la placa toda la noche en estufa a 37°C y al día siguiente se evaluó el efecto citopático (células redondeadas formando redes, no muy levantadas). Al llegar al punto de mayor efecto citopático y menor muerte celular, se levantó la placa sin tripsina (dejar la placa a temperatura ambiente por 10 minutos para que las células se

despeguen solas). Se trasvasó a un tubo falcon de 50 ml y se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 ml de PBS. Se realizaron 3 ciclos de congelado y descongelado (N₂ líquido y baño húmedo a 37°C con el fin de liberar las partículas adenovirales que se encuentran dentro de las células. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos para obtener el virus libre de desechos celulares en el sobrenadante. Se diluyeron 6 ml de este sobrenadante en 250 ml de DMEM alta glucosa con 10% FBS para realizar el stock.

-Preparación del stock adenoviral propiamente dicho: Se infectaron 30 placas p150 a 70-80% de confluencia de células 293 crecidas en medio DMEM alta glucosa con 10% FBS con 7 ml de la dilución del sobrenadante obtenido en la preparación de la semilla. Se agitaron las placas cada 20 minutos por el lapso de 2 horas en la estufa a 37°C. Luego se cambio el medio por 15 ml de DMEM alta glucosa con 2% FBS y se dejaron las placas toda la noche en la estufa a 37°C. Se esperó 24 a 48 horas hasta observar el efecto citopático homogéneo en todas las placas. Se levantaron las células de la misma manera que en el apartado anterior (preparación de la semilla). Se resuspendió el precipitado en 24 ml de PBS y se realizaron 3 ciclos de congelado y descongelado (N₂ líquido y baño húmedo a 37°C). Se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos para precipitar los desechos celulares y conservar el sobrenadante rico en partículas virales.

-Purificación del stock viral: Se prepararon los gradientes de cloruro de cesio (2,5 ml de densidad 1,6 y 2,5 ml de densidad 1,3) en 4 tubos de polyallomer y se agregó en la parte superior y sin disturbar el gradiente, 6 ml del sobrenadante obtenido en el paso anterior (preparación del stock adenoviral). Se agregó aceite mineral hasta la boca del tubo. Se ajustó el peso a una diferencia menor a 0,1 g. Luego se ultra centrifugó a 35000 rpm a 20°C por 90 minutos. Se extrajo la banda inferior correspondiente al adenovirus en cada uno de los 4 tubos. Lo extraído de los 4 tubos se ultra centrifugó nuevamente en un tubo de polyallomer que contiene una solución de cloruro de cesio de densidad 1,34 por 18 horas a 35000 rpm a 20°C. Se extrajo la banda de interés y se la purificó en una columna de sephadex. Se separaron 12 alícuotas de 0,5 ml cada una y a cada alícuota se le agregó 10% de glicerol. Se realizó una dilución 1:10 de cada alícuota en una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) y Tris-ClH pH 7,4. Luego de 30 minutos se midió la densidad óptica (OD) a 260/280 nm en un espectrofotómetro (Ultrospec 3000, Amersham). Se calcularon las partículas totales por ml del stock generado multiplicando la OD por $1 \cdot 10^{12}$ partículas/ml. Se eligieron las fracciones de OD más alto y el stock se alicuotó de a 10 μ l en tubos de 0,5 ml. Se almacenó a -80°C.

Los stocks fueron cuantificados además por la dosis infectiva 50 (DICT50/ml)

Los títulos de los stocks generados fueron:

- $1,39 \cdot 10^{12}$ para el AdIL-1 β
- $1,25 \cdot 10^{12}$ para el Ad β gal

- $1,75 \cdot 10^{12}$ para el AdIL-1ra

6. ELISA para detección de citoquinas proinflamatorias

Los animales fueron decapitados y el cerebro fue disectado en menos de 6 minutos colocando cada región (estriado o SN) en tubos eppendorf rotulados a tal fin. Las muestras se sumergieron en nitrógeno líquido hasta su almacenamiento en el freezer de -80°C .

Para su procesamiento, los tejidos fueron homogeneizados en $400\mu\text{l}$ de TBS (Tris-ClH 50mM $\text{pH}=7,3$, ClNa 150mM) con $0,1\%$ de Tween 20 y una mezcla de inhibidores de proteasas ($10\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, $5\mu\text{g}/\text{ml}$ de peptastina, $5\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina y 1mM PMSF). Luego se los centrifugó a $1000g$ a 4°C por 10 minutos y el sobrenadante fue ultra centrifugado a 40000 rpm por 2 horas. Las muestras fueron alicuotadas y guardadas a -80°C hasta su utilización. La cantidad de proteína total fue determinada con la técnica de Bradford. Se utilizaron kits comerciales para medir las concentraciones de las siguientes citoquinas pro inflamatorias IL- 1β , IL-6 y TNF α (ELISA kits, R&D Systems, Minneapolis, MN). Se analizaron 5 muestras como mínimo por grupo y cada muestra se realizó por duplicado.

7. Estudios comportamentales

La integridad y funcionalidad de la vía nigroestriatal se estudió con dos test comportamentales no farmacológicos. Los ensayos realizados fueron: ensayo de pasos de ajuste (Olsson, 1995) y el ensayo del cilindro (Schallert and Jones, 1993).

7.1. Ensayo de pasos de ajuste (stepping)

Este ensayo fue realizado según lo descrito por Olsson et al, 1995. Este test consiste en tomar los cuartos traseros de la rata con una mano y con la otra mano se sostiene una de las patas delanteras que no será evaluada. Luego se mueve a la rata lateralmente sobre una mesa de 90cm en 10 segundos aproximadamente, primero en dirección derecha-izquierda (D-I) y después izquierda-derecha (I-D) para cada una de las patas delanteras. Se cuentan los pasos de ajuste que realiza la rata con cada una de las patas anteriores y en ambas direcciones (Figura 7). Los animales deben ser ambientados durante una semana al manejo del experimentador y a la posición del test. Antes de la primera cirugía se realiza el ensayo basal.



Figura 7: Ensayo de pasos de ajuste (stepping).

La foto muestra la posición de la rata durante la evaluación del ensayo.

7.2. Ensayo del cilindro

Este ensayo fue realizado según lo descrito por Schallert et al, 1993. Consiste en ubicar a la rata dentro de un cilindro de acrílico de 30 cm de alto por 20 cm de diámetro. Se cuentan los toques que realiza la rata sobre las paredes del cilindro, cada vez que se levanta con cada una de las patas anteriores por el lapso de 5 minutos (Figura 8).



Figura 8: Ensayo del cilindro.

La foto muestra el momento en que la rata está tocando las paredes del cilindro con su pata delantera izquierda.

8. Análisis histológicos

8.1. Tinción de Nissl (colorante básico), tiñe los cuerpos de Nissl o gránulos de Nissl, que son acumulaciones basófilas que se encuentran en el citoplasma de células nerviosas. Estos gránulos son retículo endoplasmático rugoso (con ribosomas) y son sitios de síntesis de proteínas. Los cuerpos de Nissl se encuentran en el pericarion y en la primera porción de las dendritas, faltan en el axón y en el cono de inicio del axón. Por lo tanto, proporciona información acerca de la distribución, tamaño y morfología de los cuerpos celulares.

Los cortes levantados sobre portaobjetos gelatinizados se dejaron secar para que el tejido se adhiriera al vidrio. Los cortes fueron rehidratados mediante pasajes por alcohol 96% y 70% (aproximadamente 2 minutos por pasaje) y luego fueron teñidos con una solución de violeta de cresilo

(0,1g en 100ml de acetato de sodio 0,2M pH=3,8 filtrada) por el termino de tres minutos aproximadamente según la coloración deseada. Los cortes se diferenciaron con alcohol 96% y luego fueron deshidratados con sucesivos pasajes de alcohol absoluto (tres pasajes) y finalmente tres pasajes en xilol. Los cortes se montaron con Bálsamo sintético.

8.2. Reacción de x-gal

Para estudiar la distribución del Ad β gal en el cerebro, se analizó la expresión de la enzima β -galactosidasa utilizando un sustrato de la enzima (x-gal) que da como resultado un color azul. x-Gal es un sustrato cromogénico inerte. La enzima β -galactosidasa hidroliza el x-gal produciendo galactosa (incolora) y 4-cloro-3-bromo-índigo que forma un precipitado azul intenso.



Por muestra se mezcló: 0.1ml PBS 10x, 1,3 μ l Cl₂Mg 1M, 60 μ l Fe(CN)₆K₃ y 60 μ l Fe(CN)₆K₄, 50 μ l de sustrato x-gal y 730 μ l de agua. Las muestras se incubaron 4 horas en baño húmedo y luego fueron levantadas en portaobjetos.

8.3. Tinción de rojo neutro

Se utilizó como tinción de contraste para visualizar mejor los cortes sometidos a la reacción de x-gal. Luego de hidratar las secciones, se las tiñó de 2 a 4 minutos con una solución 1% (p/v) de rojo neutro en agua con una gota de ácido acético. El exceso de colorante fue removido con agua y se hicieron sucesivos pasajes con alcohol 70%, 96% y 100%. Una

vez que los cortes estaban deshidratados se los pasó por 3 soluciones de xilol puro y luego fueron montados con Bálsamo sintético.

8.4. 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 la 3,3'-diaminobenzidina (DAB, 0,5mg/ml en 0,1M buffer fosfato, filtrado). Las secciones se levantaron en portaobjetos gelatinizados, se deshidrataron y luego se montaron con Bálsamo sintético.

8.4.1. Detección de Tirosina hidroxilasa

Para analizar la degeneración de las neuronas de la SN se utilizó un anticuerpo que reconoce específicamente las neuronas dopaminérgicas. Se analizó la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH) que es la enzima limitante de la síntesis de dopamina. Se utilizó un anticuerpo primario anti TH generado en conejo (dilución 1:1000, Chemicon, Temecula, CA, USA) y el anticuerpo secundario fue un anti Fc de conejo generado en burro y biotinilado (dilución 1:200, Jackson Laboratorios, West Grove, PA, USA)

8.5. Inmunofluorescencia

Todas las inmunofluorescencias fueron realizadas en cortes en flotación (free floating) de 40µm de grosor. Luego de incubar con los anticuerpos primarios y secundarios, los cortes fueron lavados en PB y levantados en portaobjetos gelatinizados. Luego de secarse, los cortes fueron

rehidratados en PB y montados con gelvatol (Mowiol 4-88, Calbiochem, Glicerina en 0,2M de Tris pH= 8,5).

8.5.1. Inmunofluorescencia doble para detectar neuronas dopaminérgicas y microglía.

Para visualizar los estadios de activación de la microglía en la SN, se lavaron los cortes con PBS-Tx (2 lavados de 10 minutos cada uno) y se los bloqueó por 40 minutos en una solución de PBS-TX con 1% suero de burro. Los cortes se incubaron toda la noche a 4°C en la solución de bloqueo conteniendo la isolectina B4 biotinilada de Griffonia simplicifolia (GSA1-B4, diluida 1:100, Vector) y el anticuerpo anti TH. La lectina GSA se une a los residuos α -D-galactosa de la membrana plasmática y ha demostrado su especificidad por la microglía en todos sus estadios de activación y por los macrófagos. Luego de lavarlos con PB, los cortes fueron incubados con estreptavidina Cy3 (dilución 1:200 en PB) y con anti Fc de conejo conjugado con Cy2 (dilución 1:200 en PB) por 2 horas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

Se analizó la activación de la microglía en la SNpc donde la inmunofluorescencia para TH dio positiva, a diferencia de la SN pars reticulata (SNpr) donde la presencia de microglía es abundante pero no existen neuronas dopaminérgicas.

8.5.2 Inmunofluorescencia doble para detectar neuronas dopaminérgicas y células MHCII positivas.

Se lavaron los cortes con PBS-Tritón (2 lavados de 10 minutos cada uno) y se los bloqueó por 40 minutos en una solución de PBS-Tritón con 1%

suero de burro. Los cortes se incubaron por 48 horas a 4°C en la solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo primario anti MHCII generado en ratón (dilución 1:200, Serotec) y el anticuerpo anti TH. Luego de lavarlos con PB, los cortes fueron incubados con anti Fc de ratón conjugado con el fluoróforo Cy3 (dilución 1:200 en PB) y con anti Fc de conejo conjugado con Cy2 (dilución 1:200 en PB) por 2 horas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

Para la cuantificación de la microglía activada estadio 4 MHCII positiva, se contaron las células presentes en la SNpc en un microscopio de fluorescencia. Para la identificación de la SNpc se tuvo el mismo criterio que el mencionado anteriormente.

8.5.3. Inmunofluorescencia doble para detectar neuronas dopaminérgicas y actividad fagocítica (ED1).

Para detectar los macrófagos en la SN, se lavaron los cortes con PBS-Tritón (2 lavados de 10 minutos cada uno) y se los bloqueó por 40 minutos en una solución de PBS-Tritón con 1% suero de burro. Los cortes se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en la solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo primario anti ED1 generado en ratón (dilución 1:200, Serotec) y el anticuerpo anti TH. El anticuerpo anti ED1 tiene especificidad por la membrana lisosomal. El antígeno es expresado por la mayoría de los macrófagos titulares y por los granulocitos de la sangre periférica más débilmente. Luego de lavarlos con PB, los cortes fueron incubados con anti Fc de ratón conjugado con el fluoróforo Cy3 (dilución 1:200 en PB) y con anti Fc de conejo conjugado con Cy2

(dilución 1:200 en PB) por 2 horas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

8.5.4. Inmunofluorescencia doble para detectar interleuquina 1 beta de rata (rIL-1 β) o interleuquina 1 beta humana (hIL-1 β) y células MHCII positivas.

Con el fin de detectar la expresión de IL-1 β y la expresión en superficie del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II, se lavaron los cortes con PBS-Tx (2 lavados de 10 minutos cada uno) y se los bloqueó por 40 minutos en una solución de PBS-TX con 1% suero de burro. Los cortes se incubaron por tres días a 4°C en la solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo primario anti MHCII generado en ratón (dilución 1:200, Serotec) y el anticuerpo anti IL-1 β de rata generado en conejo (dilución 1:300) o el anticuerpo anti IL-1 β humana generado en ratón (dilución 1:200, Peprotech). Luego de lavarlos con PB, los cortes fueron incubados con anti Fc de ratón conjugado con el fluoróforo Cy3 (dilución 1:200 en PB) y con anti Fc de conejo conjugado con Cy2 (dilución 1:200 en PB) por 2 horas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

8.5.5. Inmunofluorescencia para población linfocitaria (CD4, CD8, CD19, CD25)

Se lavaron los cortes con PBS-Tx (2 lavados de 10 minutos cada uno) y se los bloqueó por 40 minutos en una solución de PBS-TX con 1% suero de burro. Los cortes se incubaron toda la noche 4°C en la solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo primario anti CD4, anti CD8, anti CD19 (células B) o anti CD25 (linfocitos T activados) (dilución 1:100, Serotec). Luego de lavarlos con PB, los cortes fueron incubados con anti

Fc de ratón conjugado con el fluoróforo Cy2 (dilución 1:200 en PB) por 2 horas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

9. Microscopía

Todas las inmunohistoquímicas fueron visualizadas con un microscopio Olympus con luz transmitida a 5x, 10x, 40x y 100x de aumento.

Todas las inmunofluorescencias fueron analizadas con un microscopio de fluorescencia Nikon y las fotos fueron sacadas utilizando un microscopio confocal Zeiss Pascal equipado con láser de argón y de He/Ne.

10. Análisis estadístico

Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media.

El test estadístico utilizado en cada diseño experimental es aclarado en cada capítulo (test *t de Student*, ANOVA de uno, dos o tres factores, tres factores con medidas repetidas en el factor tiempo). La significación de las diferencias se analizó con el test de Fisher Protegido - Mínima Diferencia Significativa (Fisher MDS) como test a posteriori. En todos los casos se comprobaron los supuestos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de las varianzas (Levene) antes de aplicar la estadística paramétrica. En caso de no cumplirse estos supuestos, los datos fueron transformados.

El análisis estadístico de los datos fue realizado con diferentes programas estadísticos según el diseño experimental: Prisma versión 4.0, Infostat y SPSS.

En todos los casos las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si la probabilidad fue menor que 0,05.

Capítulo I

I.1 Objetivo 1

El objetivo específico de este capítulo es estudiar los efectos de un estímulo proinflamatorio central sobre la neurodegeneración, el comportamiento motor y la inflamación de la SN en un modelo de Enfermedad de Parkinson (EP).

I.2 Resultados

Para evaluar la hipótesis de que la inflamación pueda exacerbar la neurodegeneración existente en la SN, ratas Wistar macho adultas fueron inyectadas con 6OHDA o su vehículo en el cuerpo estriado (Sauer and Oertel, 1994) y 3 ó 12 días más tarde, los mismos animales fueron inyectados con el lipopolisacárido bacteriano (LPS - un inflamógeno de la pared de las bacterias Gram negativas) o su vehículo en la SN (Figura I.1). Estos días fueron elegidos teniendo en cuenta datos previos del laboratorio que indicaban que en el día 12 existe una neurodegeneración detectable y que la microglía presenta signos de activación a este tiempo. En cambio, la degeneración es incipiente y la microglía no evidencia activación morfológica alguna el día 3 (Depino, Earl et al., 2003). De esta manera, estaríamos evaluando los efectos producidos por la llegada del estímulo pro-inflamatorio cuando la microglía se encuentra en reposo o “resting” (día 3) o cuando está cebada o “primed” (día 12).

Se generaron así 4 grupos experimentales que fueron divididos en: ratas inyectadas con 6OHDA en el cuerpo estriado y con LPS (6OHDA/LPS) o vehículo (6OHDA/Veh) en la SN y ratas inyectadas con vehículo en el cuerpo estriado y con LPS (Veh/LPS) o vehículo (Veh/Veh) en la SN (Figura I.1).

Para la elección de la dosis de LPS a inyectar, se realizaron inyecciones de distintas concentraciones de LPS a animales que tenían inyectado en el cuerpo estriado la neurotoxina o su vehículo. Se determinó la dosis de LPS a usar como aquella dosis que *per se* sea capaz de producir inflamación sin provocar necrosis del tejido y que principalmente, no produzca neurodegeneración estadísticamente diferenciable del grupo control (Veh/LPS vs Veh/Veh). El

rango de dosis evaluado fue de 0.06 μ g a 2 μ g, observándose que una dosis de 0.09 μ g cumplía con estos requisitos.

Se evaluaron el porcentaje de neuronas dopaminérgicas remanentes, el comportamiento motor y la inflamación a nivel celular y molecular en cada grupo experimental a los tiempos mencionados.

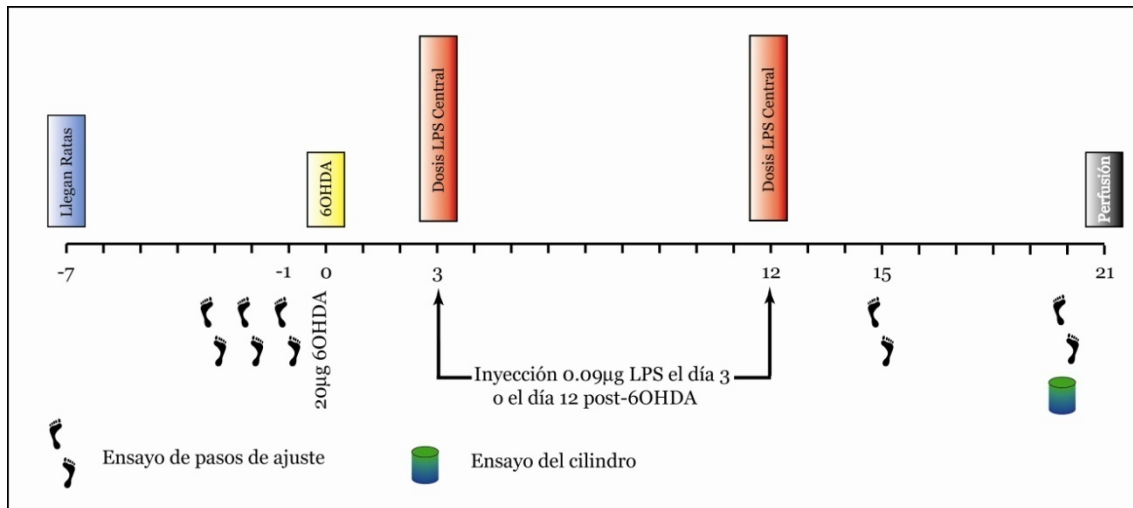


Figura I.1: Protocolo de trabajo que muestra los días de inyección estereotáxica de 6OHDA o vehículo en el cuerpo estriado y LPS o vehículo en la SN. También se muestran los días en que se realizaron los test comportamentales.

Los grupos experimentales se dividieron en:

- Ratas inyectadas con 6OHDA en el estriado y con LPS (6OHDA/LPS) o vehículo (6OHDA/Veh) en la SN.
- Ratas inyectadas con Vehículo en el estriado y con LPS (Veh/LPS) o Vehículo (Veh/Veh) en la SN.

I.2.1 Efectos de la administración central de 0,09 μ g de LPS sobre la neurodegeneración mediada por 6OHDA.

I.2.1.1 Inyección de LPS a los 12 días post-6OHDA.

La inyección de una dosis subtóxica de LPS en la SN de animales tratados 12 días antes con la neurotoxina causó exacerbación de la neurodegeneración de las células dopaminérgicas en la SN ipsilateral.

Con el fin de analizar si la inyección de esta dosis sub-tóxica es capaz de exacerbar la neurodegeneración mediada por la neurotoxina (6OHDA), se realizó el recuento de las células dopaminérgicas (tirosina hidroxilasa positivas – TH+) en la SN de los animales correspondientes a los distintos grupos experimentales (Figura I.2).

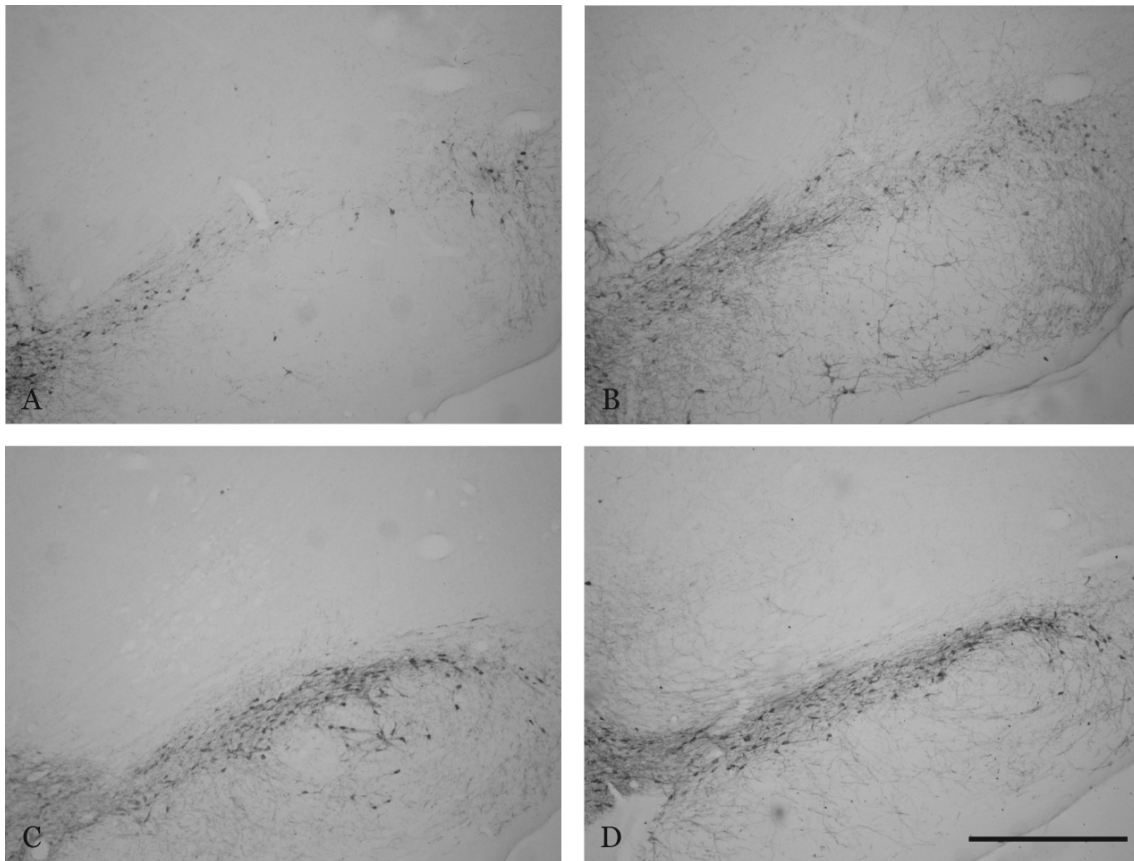


Figura I.2: Fotos representativas de una inmunohistoquímica de la SN contra tirosina hidroxilasa en los animales correspondientes a los cuatro grupos experimentales. Se muestra el hemisferio ipsilateral de animales tratados con 6OHDA/LPS (A), 6OHDA/Veh (B), Veh/LPS (C) y Veh/Veh (D). Obsérvese la diferencia en el número de células TH+ en los animales inyectados con 6OHDA en el cuerpo estriado, con o sin la inyección de LPS en la SN (A vs B). Obsérvese el número similar de células TH+ en los grupos controles (Veh/LPS vs Veh/Veh) (C vs D). Barra de escala: 500 μ m.

Como se espera en este modelo, los animales tratados con 6OHDA/Veh presentaron una disminución del recuento de células TH+ en la SN ipsilateral a

los 21 días. Dicha disminución alcanzó una media de 68.33% de células TH+ remanentes en la SN ipsilateral con respecto a la SN contralateral (Figura I.3). Recordemos que el modelo utilizado en esta tesis produce hemiparkinsonismo, es decir que se ve afectada sólo la SN ipsilateral a la inyección intraestriatal de 6OHDA. Por otro lado, se observó una disminución significativa en el número de células TH+ en la SN de los animales tratados con 6OHDA/LPS en comparación con los otros grupos (6OHDA/Veh, Veh/LPS y Veh/Veh) ($p < 0.001$, Figura I.3). No se encontraron diferencias significativas al comparar los animales correspondientes al grupo Veh/LPS con respecto al grupo control (Veh/Veh) indicando que esta dosis de LPS no es capaz de producir neurodegeneración *per se* pero es suficiente para exacerbar la neurodegeneración mediada por la 6OHDA (Figura I.3). Fue particularmente interesante observar que, la combinación de los dos tratamientos (neurodegenerativo y pro-inflamatorio) en el grupo 6OHDA/LPS produjo mayor neurodegeneración (54.43%) que la sumatoria de los efectos del tratamiento neurodegenerativo (6OHDA/Veh) (31.67%) y el tratamiento pro-inflamatorio por separado (Veh/LPS) (13.75%). Este resultado indica que esta dosis sub-tóxica de LPS es capaz de exacerbar la neurodegeneración de la SN resaltando la existencia de una interacción entre estos dos factores y no un efecto aditivo entre ellos.

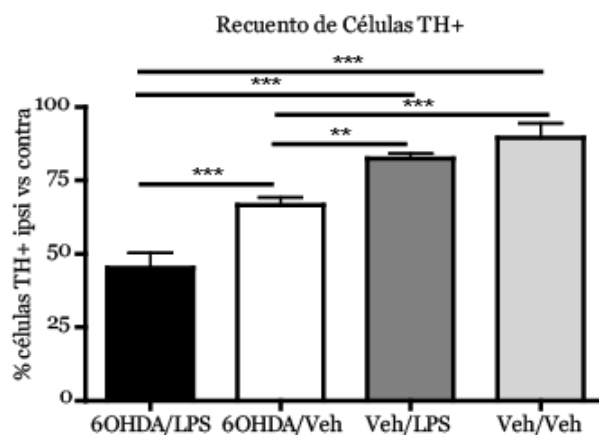


Figura I.3: Recuento de neuronas TH positivas en la SN de los distintos grupos experimentales.

Cuantificación de las células TH positivas como porcentaje de células del hemisferio ipsilateral versus el hemisferio contralateral a los 21 días post 6OHDA en cada uno de los tratamientos. Se realizó ANOVA de dos factores (estriado - SN) obteniéndose la interacción doble significativa ($p < 0,05$). Las comparaciones a posteriori se realizaron con el test de Fisher MDS. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. N=5-9 por grupo

I.2.1.2 Inyección de LPS a los 3 días post-6OHDA.

La inyección de una dosis subtóxica de LPS en la SN de animales tratados 3 días antes con la neurotoxina no causó exacerbación de la neurodegeneración de las células dopaminérgicas en la SN ipsilateral.

Como mencionamos anteriormente, y según este modelo, se observa activación morfológica de la microglía recién a partir de los 6 días post inyección de 6OHDA (Depino, Earl et al., 2003), no encontrándose activación morfológica de la misma ni una neurodegeneración evidente el día 3 post-inyección de la neurotoxina.

Se observó un mayor recuento de células TH+ en el grupo 6OHDA/LPS inyectado con LPS el día 3 (6OHDA/LPS D3) comparado con el mismo grupo

inyectado con LPS el día 12 (6OHDA/LPS D12) que alcanzó significancia estadística ($p < 0.01$, Figura I.4). No se observaron diferencias en el recuento de células TH+ en el grupo inyectado con LPS el día 3 (6OHDA/LPS D3) con respecto al grupo inyectado con Veh (6OHDA/Veh D3) a este mismo tiempo (Figura I.4).

Este resultado podría explicarse debido a que la microglía no se hallaba cebada el día 3 como para reactivarse en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio subsecuente y que la SN recibió dos estímulos independientes (LPS el día 3 y comienzo de la pérdida neuronal producida por la 6OHDA a partir del día 6).

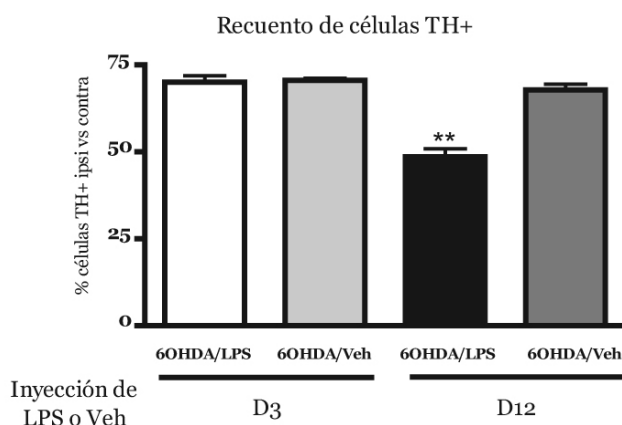


Figura I.4: Recuento de neuronas TH positivas en la SN de los distintos grupos experimentales.

Cuantificación de las células TH positivas como porcentaje de células del hemisferio ipsilateral versus el hemisferio contralateral a los 21 días post 6OHDA en cada uno de los tratamientos. Nótese la mayor sobrevida de las neuronas en el grupo que recibió el LPS a los 3 días post inyección de 6OHDA con respecto al grupo que recibió el estímulo pro-inflamatorio el día 12 post-inyección de 6OHDA. Se realizó ANOVA de dos factores (SN – día) obteniéndose la interacción doble significativa ($p < 0.001$). La significación de las diferencias se realizó con el test de Fisher MDS. ** $p = 0,01$ diferencia significativa entre el grupo inyectado con 6OHDA/LPS D12 con respecto al grupo inyectado con 6OHDA/LPS D3. N= 4 - 9 por grupo.

I.2.2 Efectos de la administración central de 0,09 µg de LPS el día 12 sobre el comportamiento motor.

La inyección de una dosis subtóxica de LPS en la SN de animales tratados 12 días antes con la neurotoxina, causó la exacerbación de los síntomas motores y la detección más temprana de los mismos.

Con el fin de evaluar el comportamiento motor y la funcionalidad de la vía nigroestriatal, se realizaron dos ensayos comportamentales no farmacológicos: el ensayo del cilindro y el ensayo de pasos de ajuste (stepping). Los ensayos comportamentales farmacológicos como la rotación inducida por anfetamina o apomorfina, no se pueden realizar debido a que se requiere una pérdida de más del 50% de las neuronas dopaminérgicas de la SN y más del 80% de las fibras dopaminérgicas estriatales para generar diferencias en las rotaciones realizadas luego de la inyección de estos fármacos (Deumens, Blokland et al., 2002). Además, la utilización de fármacos agrega una variable más al análisis que deseábamos realizar sobre la respuesta glial 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. Por otro lado, el sitio de inyección de la neurotoxina, el estriado ventrolateral, está asociado principalmente con la coordinación motora y el inicio de los movimientos. Es de destacar que el estriado ventrolateral corresponde en el humano al putamen, que es la región que presenta la mayor depleción de dopamina en el cerebro de los pacientes con EP.

I.2.2.1 Ensayo del cilindro: Este ensayo fue realizado según lo descrito en Materiales y Métodos, sección 7.2.

Este ensayo pone de manifiesto la asimetría en el uso de los miembros delanteros en los animales tratados con la neurotoxina unilateralmente (cuerpo estriado izquierdo en nuestro caso) (Johnson, Schallert et al., 1999; Schallert, Fleming et al., 2000). Esta preferencia en el uso de los miembros, se hace evidente durante el desarrollo del ensayo. Este ensayo comportamental posee la ventaja de no requerir entrenamiento previo a las condiciones del ensayo (Johnson, Schallert et al., 1999; Schallert, Fleming et al., 2000).

Se observó una dificultad para tocar las paredes del cilindro con la pata contralateral a la lesión en los animales tratados con la neurotoxina 6OHDA independientemente del tratamiento recibido en la SN (Figura I.5). Por lo tanto, los animales tratados con 6OHDA/LPS o 6OHDA/Veh presentaron una asimetría en el uso de los miembros delanteros estadísticamente significativa ($p < 0.001$ comparando la pata derecha e izquierda del grupo 6OHDA/LPS y $p < 0.01$ al comparar la pata derecha e izquierda del grupo 6OHDA/Veh). En cambio, los animales que fueron inyectados con vehículo en el cuerpo estriado no presentaron diferencias en el uso de los miembros delanteros sin importar el tratamiento recibido en la SN (Veh/LPS y Veh/Veh) (Figura I.5).

De esta manera observamos que el ensayo del cilindro es sensible a los efectos de la 6OHDA, no pudiendo observarse diferencias entre los grupos experimentales inyectados con esta neurotoxina.

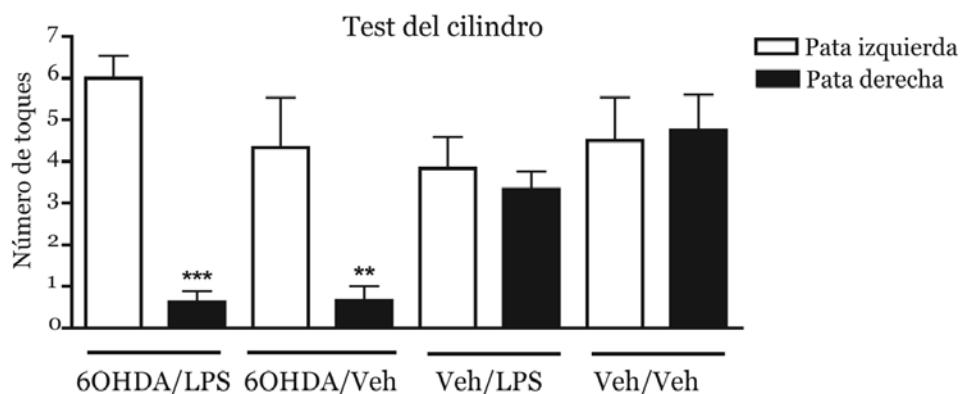


Figura 1.5: Ensayo del cilindro realizado 20 días posteriores a cada uno de los tratamientos.

Cuantificación de los toques realizados sobre las paredes del cilindro por cada una de las patas de los animales correspondientes a los distintos grupos experimentales. Se realizó un ANOVA de tres factores (estriado - SN - pata) y la interacción triple resultó no significativa. Se observó que la única interacción doble positiva fue estriado - pata ($p < 0,001$). La significación de las diferencias se realizó con el test de Fisher MDS. *** $p < 0,001$ diferencia significativa entre ambas patas del grupo 6OHDA/LPS; ** $p < 0,01$ diferencia significativa entre ambas patas del grupo 6OHDA/Veh. N= 5-8 por grupo

I.2.2.2 Ensayo de pasos de ajuste (stepping): Este ensayo fue realizado según lo descrito en Materiales y Métodos, sección 7.1.

Este ensayo comportamental permite evaluar los impedimentos motores causados por el diferente grado de pérdida de los terminales dopaminérgicos en el cuerpo estriado (Deumens, Blokland et al., 2002). A diferencia del ensayo del cilindro, este ensayo requiere la interacción directa del experimentador con el animal. Por esta razón, es esencial que los animales sean habituados a la posición del ensayo y estén familiarizados con el manejo del experimentador durante el entrenamiento y antes de realizar el ensayo definitivo (Olsson, 1995).

Se observó una diferencia significativa en el número de pasos de ajuste realizados con la pata derecha (contralateral a la lesión) entre el grupo

6OHDA/LPS y los otros grupos ($^{\circ}p < 0.01$ comparando el grupo 6OHDA/LPS con el ensayo pre-lesión y $^{**}p < 0.01$ comparando el grupo 6OHDA/LPS y los grupos 6OHDA/Veh, Veh/LPS y Veh/Veh) a los 15 y 20 días post inyección de 6OHDA (Figura I.6).

A los 15 días post-inyección de 6OHDA, el grupo 6OHDA/LPS fue el único grupo experimental que presentó aquinesia o dificultad para realizar los pasos de ajuste con la pata derecha (contralateral a la lesión) en ambas direcciones que alcanzó significancia estadística ($^{**}p < 0.01$, Figura I.6). Así también, este mismo grupo (6OHDA/LPS) presentó dificultades mayores para la realización del test a los 20 días post-6OHDA en comparación con el grupo 6OHDA/Veh ($^{**}p < 0.01$, Figura I.6). Este resultado sugiere que la dosis sub-tóxica de LPS inyectada provocó la detección más temprana de los síntomas motores y la exacerbación de los mismos coincidiendo con la mayor neurodegeneración observada en este grupo (Figura I.3). Los animales correspondientes a los grupos control (Veh/LPS y Veh/Veh) no presentaron dificultades en la ejecución del ensayo. Este resultado está en línea con el recuento de células TH+ en estos grupos experimentales (Figura I.3). Es de destacar que los grupos control (Veh/LPS y Veh/Veh) mostraron una disminución en el número de pasos realizados (2 ó 3 pasos) que está contemplada en el ensayo como habituación (Olsson, 1995). Los animales pertenecientes a los distintos grupos experimentales no mostraron anomalías en la ejecución del ensayo con la pata izquierda (ipsilateral a la lesión) (datos no mostrados).

En conclusión, este ensayo nos permitió detectar dificultades motoras de los distintos grupos experimentales haciendo perceptible la exacerbación de los

síntomas motores en el grupo 6OHDA/LPS. Así también, estos resultados proveen evidencia funcional de que una dosis sub-tóxica de LPS es capaz de exacerbar los síntomas motores en este modelo de EP.

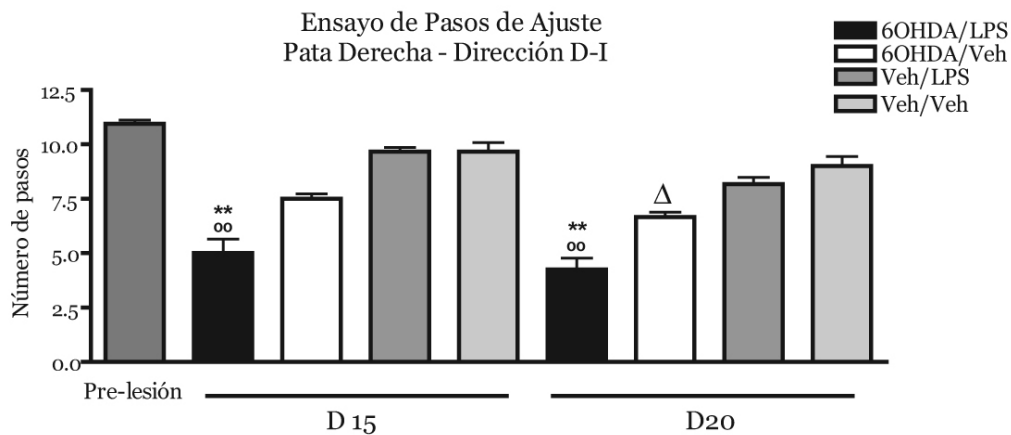


Figura I.6: Ensayo de pasos de ajuste realizado a los 15 y 20 días post inyección de 6OHDA o vehículo en el cuerpo estriado en los distintos grupos experimentales.

Cuantificación de los pasos realizados con la pata afectada (contralateral a la lesión) en la dirección derecha-izquierda en los animales correspondientes a los distintos grupos experimentales. Obsérvese la disminución en el número de pasos de ajuste realizados por los animales inyectados con 6OHDA/LPS. Se realizó un ANOVA de tres factores (estriado – SN – tiempo) con medidas repetidas en el factor tiempo. La interacción triple resultó significativa ($p < 0,05$). La significación de las diferencias se realizó con el test de Fisher MDS. $^{\circ\circ}p < 0,01$ diferencia significativa comparado con el ensayo pre-lesión. $^{**}p < 0,01$ diferencia significativa comparando el grupo 6OHDA/LPS con el resto de los grupos a cada tiempo. $\Delta p < 0,05$ diferencia significativa entre el grupo 6OHDA/Veh y los grupos controles (Veh/LPS y Veh/Veh) a los 20 días. N=7-12 por grupo. D= Derecha. I= Izquierda.

I.2.3 Efectos de la administración central de 0,09 µg de LPS sobre la inflamación de la SN.

I.2.3.1 Inyección de LPS a los 12 días post-6OHDA.

La inyección de LPS en la SN de animales inyectados 12 días antes con la neurotoxina, produjo un moderado infiltrado inflamatorio y la detección del estadio 4 de activación morfológica de la microglía a lo largo de toda la SN.

- Presencia de infiltrado inflamatorio.

Se analizó la presencia de infiltrado inflamatorio con la tinción de Nissl en cortes histológicos correspondientes a cada grupo experimental.

Los animales inyectados con 6OHDA/LPS presentaron un infiltrado inflamatorio mixto en toda la SN (Figura I.7 A). El infiltrado inflamatorio consistió principalmente en linfocitos, macrófagos y también se observaron algunos neutrófilos (Figura I.7 B). En el grupo Veh/LPS sólo se observó infiltrado inflamatorio en el sitio de inyección pero no en el resto de la SN (Figura I.7 D). No se observó infiltrado inflamatorio en los animales tratados con 6OHDA/Veh (Figura I.7 C) ni en los animales control (Veh/Veh).

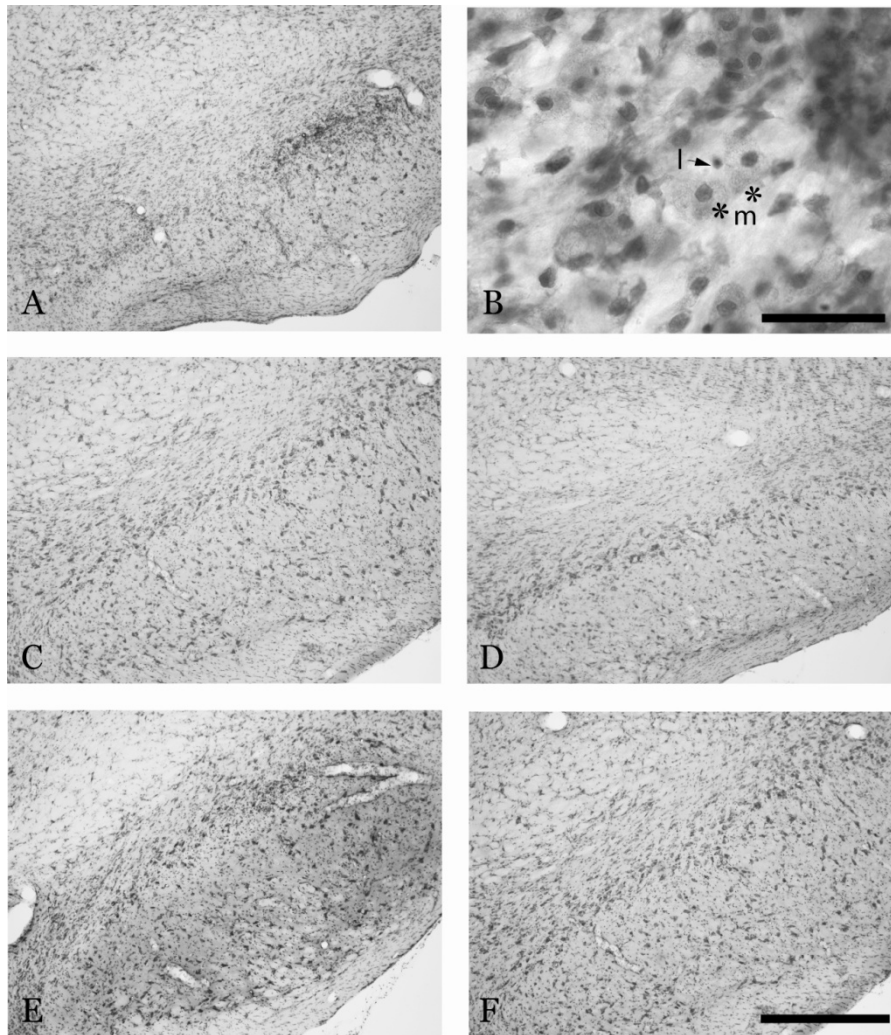


Figura I.7: Análisis del infiltrado inflamatorio en la SN de los animales inyectados con 6OHDA o vehículo en el cuerpo estriado y LPS o vehículo 3 ó 12 días más tarde en la SN, observado con la tinción de Nissl.

A-B) Animales inyectados con 6OHDA en el cuerpo estriado y LPS en la SN (6OHDA/LPS). Se observó un infiltrado inflamatorio mixto constituido principalmente por monocitos/macrófagos (m-asteriscos) y por linfocitos (l-flecha). B. Visión aumentada de A que muestra detalles del infiltrado inflamatorio. Barra de escala B: 50 μ m

C. Animales inyectados con 6OHDA en el cuerpo estriado y vehículo en la SN (6OHDA/Veh). No se observó infiltrado inflamatorio en este grupo experimental D. Animales inyectados con vehículo en el cuerpo estriado y LPS en la SN (Veh/LPS). Este grupo no presentó infiltrado inflamatorio a lo largo de la SN, únicamente evidenció un leve infiltrado inflamatorio en el sitio de inyección (foto no mostrada).

E. Animales inyectados con 6OHDA en el cuerpo estriado y LPS 3 días después en la SN (6OHDA/LPS D3). Este grupo no presentó infiltrado inflamatorio a lo largo de la SN, evidenciándose un leve infiltrado inflamatorio sólo en el sitio de inyección. F. Animales inyectados con 6OHDA en el cuerpo estriado y vehículo 3 días después en la SN (6OHDA/Veh D3). No se observó infiltrado inflamatorio en este grupo experimental. Barra de escala (A, C, D, E y F): 500 μ m

Al analizar el infiltrado inflamatorio en la SN de los animales inyectados con 6OHDA y LPS, se evidenció la presencia de linfocitos en el tejido. Se realizó la caracterización de los mismos con marcadores linfocitarios (CD4, CD8, CD25 y CD19 – células B), evidenciando la presencia de linfocitos T CD4 positivos en la SN del grupo tratado con 6OHDA/LPS. Además se observó la presencia de células CD25 positivas (marcador de activación tardía de los linfocitos T) en este mismo grupo experimental (Figura I.8 A y B).

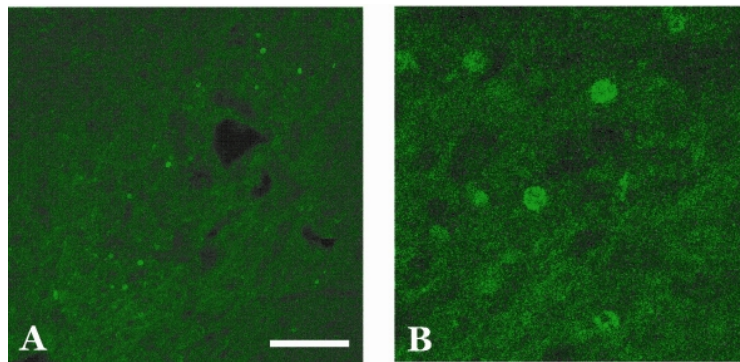


Figura I.8: Inmunofluorescencia CD25 (verde) en la SN de los animales inyectados con 6OHDA en el cuerpo estriado y LPS en la SN.

A-B) A. Se observa la presencia de linfocitos T activados en la SN de los animales correspondientes al grupo 6OHDA/LPS. Barra de escala: 100 μ m B. Visión aumentada de A que muestra en detalle los linfocitos T CD25 positivos.

- Activación de la microglía y de la astrogliá.

Se analizó la activación de la microglía con la inmunofluorescencia contra ED-1 y MHCII. Los estadios morfológicos de activación se analizaron por la unión a la lectina GSA1-B4 en la SN de cortes histológicos de cada grupo experimental. La activación de la astrogliá se analizó con la inmunofluorescencia contra GFAP. La clasificación de la activación microglial se hizo según lo descrito en la Introducción (Figura 3).

Los animales correspondientes al grupo 6OHDA/LPS, presentaron activación de la microglía hasta estadio 4 a lo largo de toda la SN (Figura I.9 A). En este grupo se detectaron principalmente células con cuerpo celular redondo y procesos no visibles correspondientes al estadio 4 de activación morfológica siendo las mismas ED-1+ (Figura I.9 F). En este mismo grupo (6OHDA/LPS) se evidenció la presencia de células MHCII+ que mostraron la misma morfología y patrón de distribución que las células GSA+ (Figura I.9 K). En este grupo también se observaron algunas células correspondientes a los estadios 2 y 3 de activación morfológica, pero no se visualizaron células en reposo (estadio 1) (Figura I.9 A y K). En los animales tratados con 6OHDA/Veh se observó activación de la microglía casi exclusivamente a estadios tempranos (2-3) como se describió anteriormente (Depino, Earl et al., 2003). En este grupo se detectaron desde células en reposo hasta células con procesos cortos y gruesos que son características del estadio 3 de activación morfológica (Figura I.9 B). En este mismo grupo (6OHDA/Veh) se observaron algunas células ramificadas ED-1+ y MHCII+ alrededor del sitio de inyección (Figura I.9 G y L). El grupo tratado con Veh/LPS presentó una activación moderada a lo largo de toda la SN (estadios 2 y 3) mientras que se evidenciaron células ameboides (estadio 4) solamente en el sitio de inyección donde también se evidenciaron células ED-1+ y MHCII+ (Figura I.9 C, H y M). De esta manera, la dosis sub-tóxica de LPS sólo produjo la activación de la microglía a estadio 4 en el sitio de inyección (menos de 240µm en sentido rostrocaudal dentro de la SN). Sin embargo, la misma dosis de LPS inyectada en ratas previamente tratadas con la neurotoxina 6OHDA, produjo una activación de la microglía a estadio 4 a lo largo de toda la

SN (abarcando por lo menos 1920 μ m a través de la SN). Por último, los animales correspondientes al grupo Veh/Veh presentaron una leve activación sólo en el tracto de inyección como consecuencia de la respuesta del tejido a la cirugía. Esta activación no fue evidente en el resto de la SN (datos no mostrados).

Los animales correspondientes a los grupos 6OHDA/LPS, 6OHDA/Veh y Veh/LPS no presentaron activación de la astrogliía en la SN *pars compacta* a los tiempos estudiados (Figura I.9’).

En resumen, la dosis sub-tóxica de LPS inyectada provocó un cambio en la activación morfológica de la microglía hacia un fenotipo de activación avanzado definido por la presencia de células estadio 4, ED-1+ y MHCII+ solamente en la SN con un proceso neurodegenerativo activo.

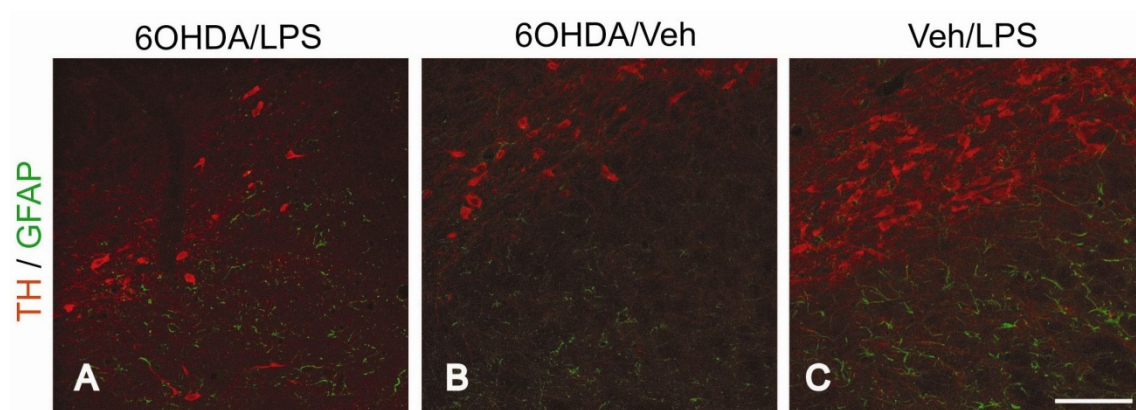
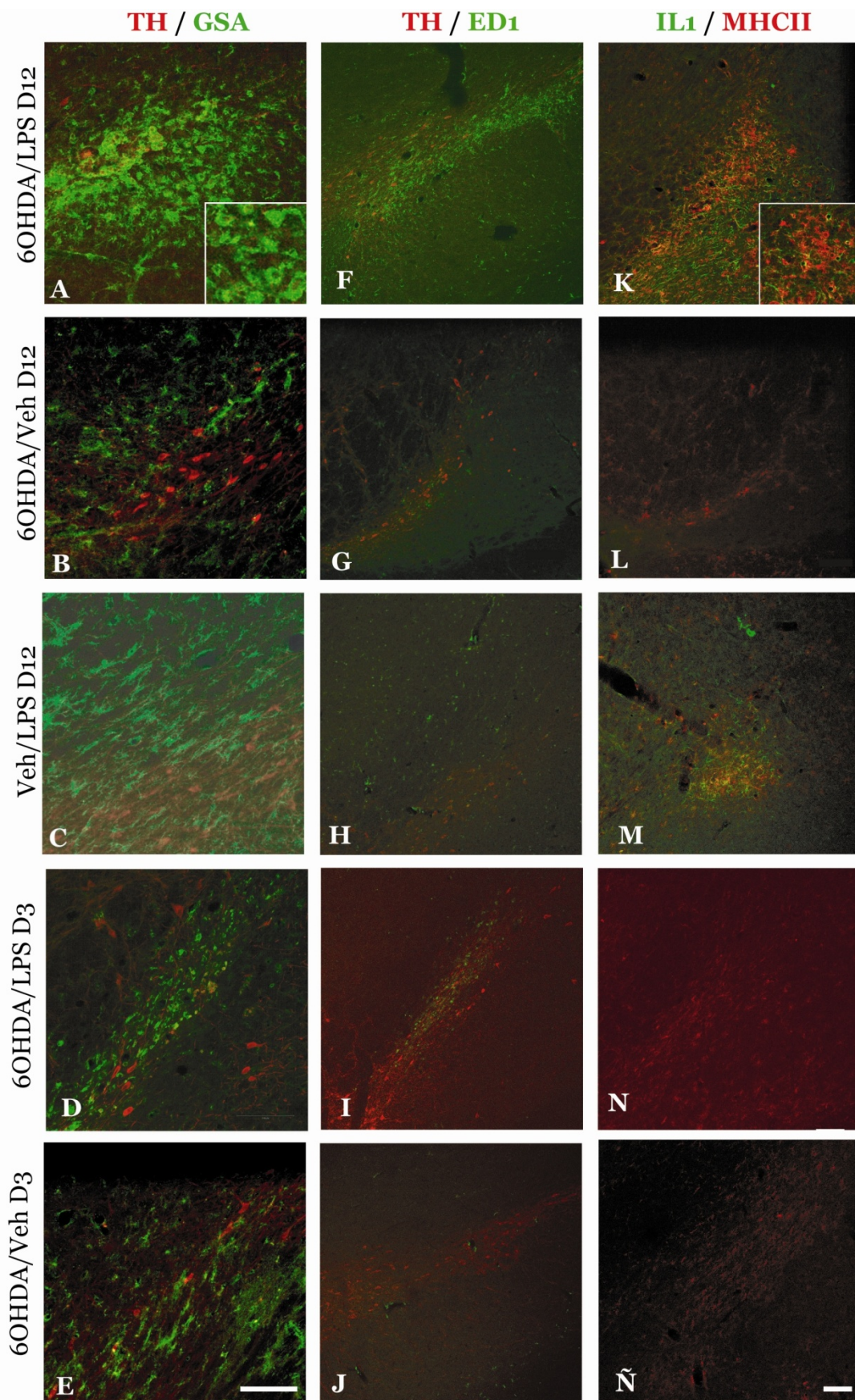


Figura I.9’: Activación de la astrogliía en la SN a los 21 días luego de cada uno de los tratamientos (inyección de 6OHDA o vehículo en el estriado y de LPS o vehículo en la SN 12 días más tarde).

Análisis de la SN ipsilateral a las inyecciones mediante inmunofluorescencia contra GFAP (verde). Los grupos tratados con 6OHDA/LPS (A), 6OHDA/Veh (B) y Veh/LPS (C) no mostraron activación de la astrogliía en la SN *pars compacta* (rojo). Barra de escala: 100 μ m.

Figura I.9: Activación de la microglía en la SN a los 21 días luego de cada uno de los tratamientos (inyección de 6OHDA o vehículo en el estriado y de LPS o vehículo en la SN 3 ó 12 días más tarde).

Análisis de la SN ipsilateral a las inyecciones mediante inmunofluorescencia contra células ED-1+, MHCII+ e IL-1 β + y por la unión a la lectina GSA. A-F-K) El grupo tratado con 6OHDA/LPS D12 mostró activación de la microglía (estadios 2 y 3 y principalmente 4) a lo largo de toda la SN (A). Células ameboides ED-1+ y MHCII+ se vieron a lo largo de toda la SN (F-K) mientras que células ramificadas ED-1+ y MHCII+ se observaron en los bordes de la lesión (F-K). Células ramificadas IL-1 β + se observaron en la lesión (K). Detalle A y K: Se aprecia el estadio 4 de activación morfológica de la microglía. B-G-L) Los animales correspondientes al grupo 6OHDA/Veh D12 presentaron una leve activación de la microglía (estadio 2 y a veces 3) en la SN (B). Se observaron algunas células ramificadas ED-1+ y MHCII+ en el sitio de inyección (G-L). No se evidenciaron células IL-1 β + (L). C-H-M) El grupo Veh/LPS D12 presentó una moderada activación de la microglía (estadios 2 y 3) en la SN (C). Sólo se observaron células ameboides (estadio 4) ED-1+ y MHCII+ en el sitio de inyección donde también se evidenciaron células ramificadas IL-1 β + (H-M). D-I-N) Los animales correspondientes al grupo 6OHDA/LPS D3 presentaron un activación leve de la microglía (estadios 2, 3 y a veces estadio 4) en la SN (D). Se observaron células ramificadas ED-1+ y MHCII+ (I-N). No se observaron células rIL-1 β +(N). E-J-Ñ) Los animales correspondientes al grupo 6OHDA/Veh D3 presentaron una muy leve activación de la microglía (estadios 1, 2 y a veces 3) en la SN (E). Se observaron algunas células ED-1+ y MHCII+ en la SN (J-Ñ). No se evidenciaron células rIL-1 β + en este grupo experimental (Ñ). Barra de escala (A-E): 100 μ m. Barra de escala (F-Ñ): 100 μ m.



I.2.3.2 Inyección de LPS a los 3 días post-6OHDA.

La inyección de LPS el día 3 en la SN de animales previamente tratados con la neurotoxina, no produjo infiltrado inflamatorio ni activación de la microglía comparable con la inflamación observada cuando la inyección de LPS se realizó el día 12 post-6OHDA.

- Presencia de infiltrado inflamatorio.

Los animales inyectados con 6OHDA en el cuerpo estriado y 3 días más tarde con LPS en la SN presentaron infiltrado inflamatorio sólo en el sitio de inyección pero no en el resto de la SN (Figura I.7 E). La distribución y calidad del infiltrado fue similar al observado en el grupo inyectado con vehículo en el cuerpo estriado y LPS en la SN 12 días más tarde (Veh/LPS D12). Los animales correspondientes al grupo control (6OHDA/Veh D3) no presentaron infiltrado inflamatorio en la SN (Figura I.7 F) como era de esperar debido a la falta de inflamación observada en este grupo cuando el vehículo se inyectó 12 días post-6OHDA (6OHDA/Veh D12) (Figura I.7 C).

- Activación de la microglía.

Con el fin de caracterizar la activación de la microglía, se analizaron los estadios morfológicos por la unión a la lectina GSA1-B4 y la expresión de marcadores (ED-1 y MHCII) en la SN.

Los animales inyectados con 6OHDA y con LPS 3 días más tarde (6OHDA/LPS D3), presentaron células con distinta morfología y con procesos más cortos y gruesos correspondientes a los estadios 2 y 3 de activación en la SN (Figura I.9

D). También se observaron células ramificadas ED-1+ y MHCII+ (Figura I.9 I y N). Solamente fue posible observar células ameboides (estadio 4) en el sitio de inyección donde también se evidenciaron células ED-1+ y MHCII+. A diferencia de lo observado con la inyección de la dosis sub-tóxica de LPS 12 días post-6OHDA, las células estadio 4 no fueron las células mayoritariamente detectadas en la SN (comparar Figura I.9 A vs D). Los animales inyectados con 6OHDA y con Veh 3 días más tarde (6OHDA/Veh D3), presentaron desde células en reposo hasta células con procesos más cortos características del estadio 2-3 de activación morfológica (Figura I.9 E). En este mismo grupo (6OHDA/Veh D3) se observaron algunas células ramificadas ED-1+ y MHCII+ alrededor del sitio de inyección (Figura I.9 J-Ñ).

En resumen, la inyección de la dosis sub-tóxica de LPS el día 3 post-inyección de la neurotoxina, no reprodujo el aumento en la activación morfológica de la microglía que se observó cuando el estímulo pro-inflamatorio se inyectó el día 12 post-6OHDA. Estos resultados señalan que la microglía no se encontraba cebada al momento de recibir la dosis sub-tóxica de LPS y que la SN recibió dos estímulos independientes (LPS el día 3 y comienzo de la pérdida neuronal por 6OHDA a partir del día 6).

I.2.4 Efectos de la administración central de 0,09 µg de LPS en la expresión de citoquinas proinflamatorias en la SN.

I.2.4.1 Inyección de LPS a los 12 días post-6OHDA.

La inyección de la dosis sub-tóxica de LPS en la SN de animales tratados 12 días antes con la neurotoxina, produjo una expresión diferencial de IL-1 β en la SN de estos animales.

Se investigó el perfil de expresión de las principales citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF α e IL-6) en la SN de animales correspondientes a cada uno de los grupos experimentales a los 21 días post-inyección de 6OHDA o vehículo por ELISA.

Se observó una inducción de la expresión de IL-1 β en los animales tratados con 6OHDA/LPS en comparación con los otros grupos (6OHDA/Veh, Veh/LPS, Veh/Veh) que alcanzó significancia estadística ($p < 0.001$, Figura I.10). No se observaron diferencias entre los grupos 6OHDA/Veh, Veh/LPS y Veh/Veh (Figura I.10). El análisis inmunohistoquímico confirmó la presencia de células ramificadas IL-1 β positivas de rata (rIL-1 β) en toda la SN de los animales correspondientes al grupo 6OHDA/LPS (Figura I.9 K). Por el contrario, sólo se encontraron escasas células rIL-1 β + en el sitio de inyección en el grupo Veh/LPS (Figura I.9 M).

No se encontró un perfil de expresión diferencial en los niveles de TNF α e IL-6 entre los distintos grupos. La expresión de estas dos citoquinas estuvo en el umbral de detección en la SN de los animales correspondientes al grupo 6OHDA/LPS y en los controles (6OHDA/Veh, Veh/LPS y Veh/Veh). Por lo tanto, ninguna de estas dos citoquinas (TNF α e IL-6) estarían involucradas en los efectos exacerbantes observados en el grupo 6OHDA/LPS.

Estos resultados sugieren a la IL-1 β como una citoquina pro-inflamatoria clave involucrada en la exacerbación de la neurodegeneración producida por el LPS.

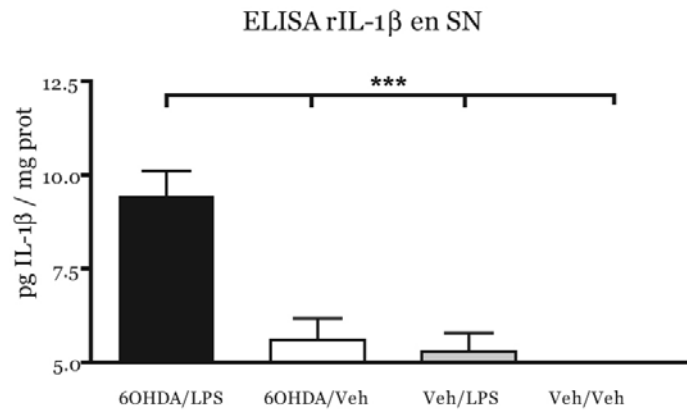


Figura I.10: Análisis de la expresión de la IL-1 β en la SN en los distintos grupos experimentales por ELISA.

Comparación de los niveles de IL-1 β en la SN a los 21 días después de cada uno de los tratamientos. Se realizó un ANOVA de dos factores (estriado – SN) resultando la interacción doble significativa ($p < 0,05$). La significación de las diferencias se analizó con el test de Fisher MDS como test a posteriori. *** $p < 0,001$ comparando el grupo 6OHDA/LPS con los grupos control (6OHDA/Veh, Veh/LPS y Veh/Veh). N=7-10 por grupo. Graficado a partir de 5pg/mg (límite de detección del kit).

I.2.4.2 Inyección de LPS a los 3 días post-6OHDA.

La inyección de LPS en la SN de animales inyectados tres días antes con la neurotoxina, no produjo una inducción de rIL-1 β en la SN de estos animales.

Debido a la detección de una inducción específica de rIL-1 β en la SN de los animales tratados con 6OHDA y LPS 12 días después, quisimos estudiar el impacto del estímulo proinflamatorio inyectado el día 3 post-6OHDA (cuando la microglía no se encuentra todavía cebada) sobre la inducción de rIL-1 β en la SN.

Los niveles de IL-1 β detectados en estos animales fueron menores que los niveles observados cuando los animales fueron inyectados el día 12 post 6OHDA

(Figura I.10 vs Figura I.11). Esto sugiere que no habría inducción de rIL-1 β a largo plazo cuando el estímulo proinflamatorio llega antes de que la microglía se encuentre cebada. Recordemos que las células de la microglía son consideradas la principal fuente de liberación de citoquinas proinflamatorias cuando se activan (Kreutzberg, 1996). Asimismo, Depino et al (2003) sugirió un estricto control post transcripcional de la expresión de IL-1 β en este modelo de EP. Por lo tanto, sería necesario que la SN estuviera cebada o “primed” para producir la inducción a largo plazo de rIL-1 β frente a la llegada de un estímulo proinflamatorio subtóxico.

Finalmente, no se encontraron cambios significativos en los niveles de rIL-1 β en los otros grupos experimentales (6OHDA/Veh, Veh/LPS y Veh/Veh) (Figura I.11).

En el análisis inmunohistoquímico no se observaron células IL-1 β positivas (rIL-1 β) en la SN de los animales correspondientes al grupo 6OHDA/LPS D3 (Figura I.9 N) ni en los animales correspondientes al grupo control (6OHDA/Veh D3) (Figura 1.9 Ñ).

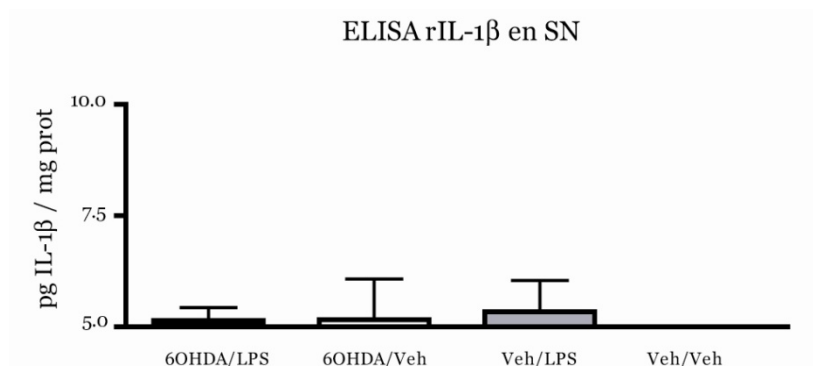


Figura I.11: Análisis de la expresión de la IL-1β en la SN de los distintos grupos experimentales por ELISA.

Comparación por ELISA de los niveles de IL-1β en la SN a los 21 días en los animales que recibieron el estímulo pro-inflamatorio o su vehículo 3 días posteriores a la inyección de 6OHDA o su vehículo en el cuerpo estriado. Sólo se muestra el hemisferio ipsilateral a la inyección. N=4-7 por grupo.

I.3 Conclusión

En este capítulo demostramos que un leve estímulo pro-inflamatorio (dosis sub-tóxica de LPS) inyectado en la SN en degeneración exacerbó el daño neuronal, produjo la activación morfológica de las células microgliales, así como también la detección más temprana y exacerbación de los síntomas motores y la inducción de rIL-1 β en la SN.

De singular interés fue observar que la exacerbación de la neurodegeneración y de los síntomas motores observada tuvo una correlación positiva con la producción de rIL-1 β y con la presencia de un fenotipo de activación microglial avanzado caracterizado por células estadio 4, MHCII+ y ED-1+. No fue posible recapitular este escenario cuando la inyección del estímulo pro-inflamatorio se produjo antes de que la microglía se encontrara cebada o “primed” y que la neurodegeneración se hiciera visible (inyección de LPS a los 3 días post-6OHDA). En este protocolo experimental, tampoco se observó la exacerbación de la neurodegeneración ni la inducción de rIL-1 β en la SN. En cuanto a la activación morfológica de la microglía, ésta evidenció solamente estadios tempranos de activación, no detectándose el fenotipo microglial de activación avanzado.

Los resultados presentados en este capítulo demuestran que el balance entre los posibles efectos de la microglía (neurotróficos o neurotóxicos) se puede volcar hacia un neto efecto neurodegenerativo si a la neurodegeneración reinante se le suma un estímulo pro-inflamatorio sub-tóxico. De esta manera, estaríamos sentando las bases para entender el mecanismo de la exacerbación de la neurodegeneración gatillado por la inflamación. Este concepto podría ser

relevante en la clínica de la EP considerando que la llegada de un estímulo proinflamatorio al SNC podría iniciar una cascada de eventos que lleven a la exacerbación de la neurodegeneración existente con el consiguiente agravamiento de los síntomas. Los resultados observados en este capítulo sugieren que la inflamación sería un factor de riesgo en la progresión de la EP.

Capítulo II

II.1 Objetivo 2

El objetivo específico de este capítulo es estudiar los efectos de la terapia con anti-inflamatorios sobre la exacerbación de la neurodegeneración, comportamiento motor e inflamación de la SN en un modelo de Enfermedad de Parkinson (EP).

Considerando que, según nuestros resultados, un estímulo proinflamatorio es capaz de activar la microglía que se encuentra “cebada” exacerbando de esta manera el proceso neurodegenerativo, nos propusimos ver si la inhibición de la inflamación podría ser una terapia neuroprotectora promisoriosa que incremente la supervivencia neuronal.

Para ello se eligieron distintos tipos de agentes anti-inflamatorios para ser administrados a los distintos grupos experimentales.

II.2 Tratamiento con Dexametasona

El primer anti-inflamatorio elegido fue la dexametasona, un potente anti-inflamatorio perteneciente al grupo de los glucocorticoides.

El protocolo experimental consistió en la inyección de una dosis intraperitoneal (ip) de 10^{-8} M de dexametasona (DXM) a todos los grupos (6OHDA/LPS, 6OHDA/Veh, Veh/LPS y Veh/Veh) en forma diaria y matinal a partir del día 12 post-inyección estereotáxica de 6OHDA (Figura II.1). Se determinó la dosis a inyectar de DXM como aquella dosis que fuera bien tolerada por los animales y no produjera severas disminuciones de peso en los mismos (Kurkowska-Jastrzebska, Litwin et al., 2004). Luego de evaluar diferentes dosis 10^{-6} M, 10^{-7} M y 10^{-8} M, elegimos ésta última ya que cumplía con los requisitos anteriormente mencionados. Decidimos comenzar a inyectar la DXM el mismo día de la administración del estímulo pro-inflamatorio (dosis sub-tóxica de LPS) para tener un control funcional de los efectos exacerbantes del LPS desde el momento de su inoculación (Figura II.1).

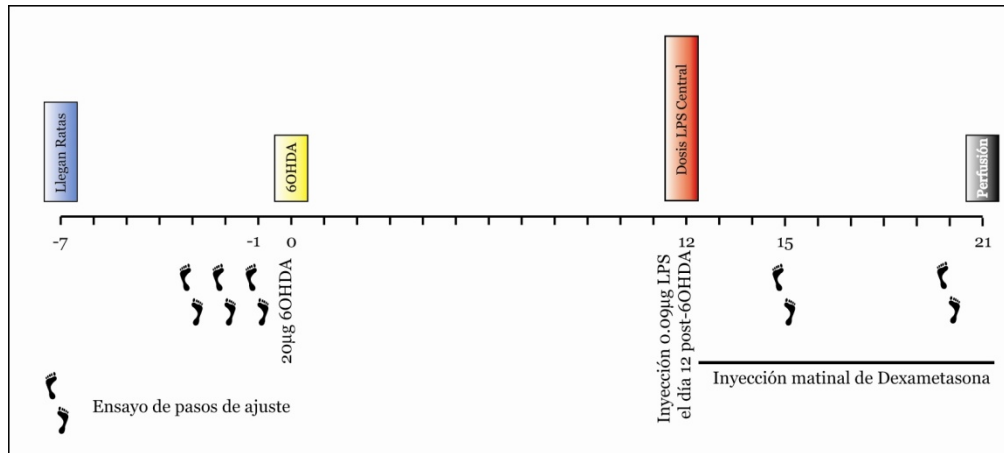


Figura II.1 : Protocolo de trabajo que muestra los días de inyección estereotáxica de 6OHDA o Vehículo en el estriado y LPS o Vehículo en la SN. Así también, se muestran los días de administración de dexametasona y los días de la realización del ensayo de pasos de ajuste (stepping).

Los grupos experimentales se dividen en:

- Ratas inyectadas con 6OHDA en el estriado y con LPS (6OHDA/LPS) o vehículo (6OHDA/Veh) en la SN. Ambos grupos recibieron diariamente DXM ip.
- Ratas inyectadas con vehículo en el estriado y con LPS (Veh/LPS) o vehículo (Veh/Veh) en la SN. Ambos grupos recibieron diariamente DXM ip.

II.2.1 Efectos de la administración de dexametasona sobre la exacerbación de la neurodegeneración.

La administración de DXM previno la exacerbación de la neurodegeneración provocada por la inyección de una dosis subtóxica de LPS en la SN.

Para evaluar si la administración de dexametasona disminuye la exacerbación de la neurodegeneración, se realizó el recuento de neuronas dopaminérgicas evidenciadas como células tirosina hidroxilasa positivas (TH+) en toda la SN de los distintos grupos experimentales.

Los animales tratados con 6OHDA/LPS+DXM evidenciaron un incremento en el recuento de células TH+ alcanzando los valores obtenidos en los animales

tratados con 6OHDA/Veh ($p < 0.001$ comparando el grupo 6OHDA/LPS+DXM vs el grupo 6OHDA/LPS-DXM, Figura II.2). No se observaron diferencias en el recuento de células TH+ en el grupo tratado con 6OHDA/Veh, sugiriendo de esta manera que la DXM no tiene efectos sobre la neurodegeneración mediada por la 6OHDA (Figura II.2). Este resultado era esperable debido a la falta del componente inflamatorio observado en los animales tratados con 6OHDA/Veh (ver Figura I.7 C). Los animales pertenecientes al grupo Veh/LPS experimentaron un sutil incremento en el recuento de células TH+ luego del tratamiento con DXM ($p < 0.05$ comparando Veh/LPS+DXM vs Veh/LPS-DXM, Figura II.2). Creemos que la variación en el recuento de células TH+ en este grupo (Veh/LPS+DXM) se debió a la disminución de la neurodegeneración en el sitio de inyección del LPS. Recordemos que este grupo evidenció la presencia de infiltrado inflamatorio sólo en el sitio de inyección del LPS (ver Figura I.7 D). Por último, no se observaron diferencias en el recuento de células TH+ en el grupo control (Veh/Veh) (Figura II.2).

Estos resultados demuestran que el tratamiento con DXM previno la disminución del recuento de células TH+ a través de la inhibición de la acción del LPS. Podemos concluir que, el tratamiento con DXM fue efectivo en la protección de los efectos exacerbantes del LPS sobre la neurodegeneración en la SN.

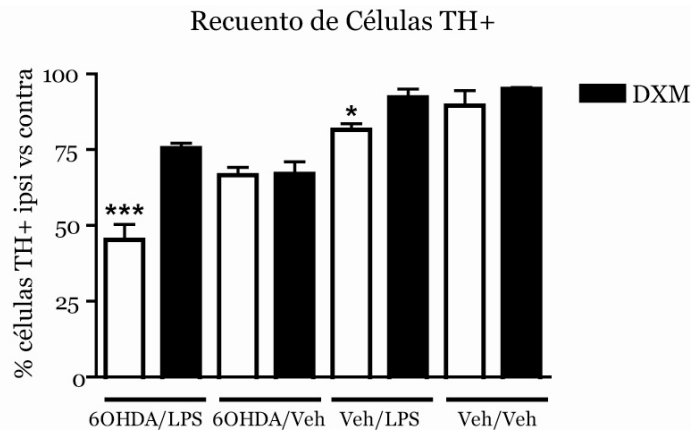


Figura II.2: Recuento de neuronas TH positivas en la SN luego de cada uno de los tratamientos.

Cuantificación de las células TH positivas como porcentaje de células del hemisferio ipsilateral versus el contralateral a los 21 días en cada uno de los tratamientos. Se realizó un ANOVA de tres factores resultando la interacción triple (estriado – SN - dexametasona) significativa ($p < 0,01$). La significación de las diferencias se analizó con el test de Fisher MDS. *** $p < 0,001$ comparando 6OHDA/LPS + DXM vs 6OHDA/LPS - DXM; * $p < 0,05$ comparando Veh/LPS + DXM vs Veh/LPS - DXM. N= 5-7 por grupo.

Con el fin de determinar si el efecto protector de la DXM sobre la exacerbación de la neurodegeneración observada depende del momento de la inhibición de la acción del LPS, se procedió a realizar otro protocolo de inyección de DXM. Este protocolo consistió en la inyección matinal de DXM a partir del día 15 o del día 18 post-inyección de la neurotoxina. Se observó una disminución de la neurodegeneración dependiendo de los días de inyección de DXM. El recuento de células TH+ fue mayor cuando la DXM se administró a partir del día 12 y menor cuando se administró a partir del día 18 acercándose a los valores correspondientes al grupo 6OHDA/LPS sin DXM (Figura II.3).

Podemos concluir que el tratamiento con DXM fue altamente efectivo cuando se lo administró a partir del día de la llegada del estímulo pro-inflamatorio (Día 12). Observándose que la DXM no es capaz de revertir la neurodegeneración ya

existente y sólo es capaz de prevenir la exacerbación de la neurodegeneración producida por la inyección del LPS. Por lo tanto, la administración de DXM a partir de los días 15 ó 18 sólo estaría protegiendo las neuronas aún no degeneradas.

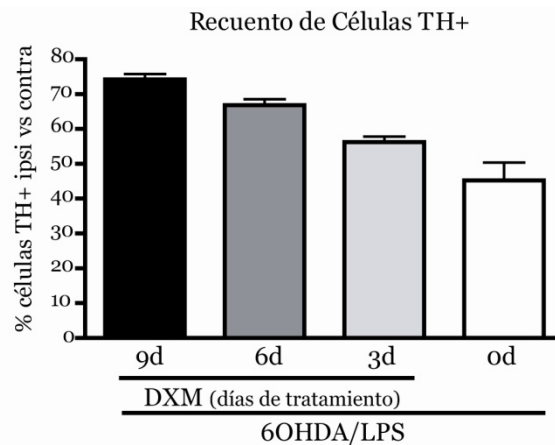


Figura II.3: Recuento de neuronas TH positivas en la SN luego de cada uno de los tratamientos a los 21 días.

Cuantificación de las células TH positivas como porcentaje de células del hemisferio ipsilateral versus el contralateral a los 21 días en cada uno de los tratamientos. Se observa una disminución en el recuento de células TH+ durante menos días de tratamiento de DXM. N= 4-9 por grupo

II.2.2 Efectos de la administración de dexametasona sobre el comportamiento motor.

La administración de DXM previno los síntomas motores correspondientes a la exacerbación de la neurodegeneración producida por la inyección de la dosis sub-tóxica de LPS en la SN en neurodegeneración.

Como mencionamos en el capítulo I, el ensayo del cilindro es sensible a los efectos de la 6OHDA y no permite ver diferencias en el número de toques realizados por los animales correspondientes a los grupos 6OHDA/LPS y

6OHDA/Veh (ver Figura I.5). Por lo tanto, decidimos evaluar el comportamiento motor, en esta parte de la tesis, solamente con el ensayo de pasos de ajuste (stepping).

Ensayo de pasos de ajuste: Este ensayo fue realizado según lo descrito en Materiales y Métodos, sección 7.1.

Como mencionamos en el capítulo I, este ensayo permite evaluar los impedimentos motores causados por la pérdida de los terminales dopaminérgicos en el cuerpo estriado (Olsson, 1995).

Se observó un incremento en el número de pasos de ajuste de los animales pertenecientes al grupo 6OHDA/LPS+DXM alcanzando los valores obtenidos por los animales correspondientes al grupo control (6OHDA/Veh+DXM) indicando de esta manera, una prevención de la exacerbación de los síntomas motores ($p < 0.05$ comparando el grupo 6OHDA/LPS+DXM vs el grupo 6OHDA/LPS-DXM, Figura II.4). Esta disminución en la exacerbación de los síntomas motores se hizo visible tanto el día 15 como el día 20 post-6OHDA (Figura II.4). Estos resultados están en línea con el aumento en el recuento de células TH+ observado en este grupo (ver Figura II.2). Los animales inyectados con 6OHDA/Veh+DXM o Veh/LPS+DXM no mostraron diferencias en el número de pasos de ajuste realizados. Estos resultados eran esperables debido a que no se observaron diferencias en el recuento de células TH+ en el grupo 6OHDA/Veh+DXM con respecto a su control (6OHDA/Veh-DXM) (Figura II.2). Con respecto al grupo Veh/LPS, si bien se observó un sutil aumento en el recuento de células TH+ luego del tratamiento con DXM, este aumento no se vio

reflejado en un aumento significativo en el número de pasos de ajuste realizados por este grupo (Figura II.4). Finalmente, ninguno de los grupos experimentales experimentó anomalías en la ejecución del ensayo con la pata izquierda (ipsilateral a la lesión) (datos no mostrados).

Estos resultados evidencian que el tratamiento con DXM es capaz de prevenir la exacerbación de los síntomas motores producida por la dosis sub-tóxica de LPS inyectada en la SN en neurodegeneración. En conclusión, el tratamiento con DXM fue efectivo en la protección de los efectos exacerbantes del LPS sobre el comportamiento motor.

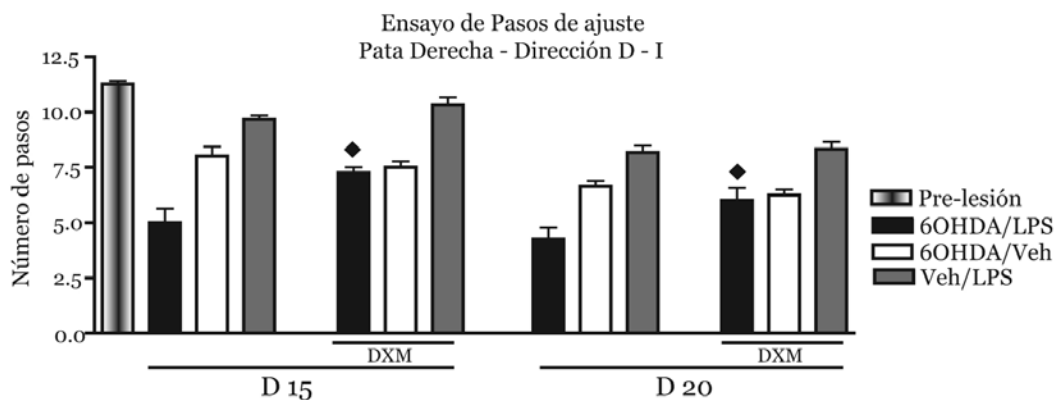


Figura II.4: Ensayo de pasos de ajuste realizado en cada uno de los tratamientos luego de la inyección ip de DXM.

Cuantificación del número de pasos realizados con la pata afectada (contralateral a la lesión) en la dirección derecha-izquierda donde se evidencia un aumento en el número de pasos de ajuste realizados por el grupo 6OHDA/LPS luego del tratamiento con DXM. Se realizó un ANOVA de dos factores (DXM – tiempo) con medidas repetidas en el factor tiempo, resultando la interacción doble no significativa ($p > 0.05$). La significación de las diferencias se realizó con el test de Fisher MDS. ♦ $p < 0.05$ comparando el grupo 6OHDA/LPS+DXM vs el grupo 6OHDA/LPS-DXM a los 15 y 20 días. D= Derecha. I= Izquierda

II.2.3 Efectos de la administración de dexametasona sobre la inflamación de la SN.

La administración de DXM no produjo variaciones en el infiltrado inflamatorio ni en la activación de la microglía evidenciado como células GSA+ o ED-1+ pero sí disminuyó el número de células MHCII+ en la SN.

- Presencia de infiltrado inflamatorio.

Se analizó la presencia de infiltrado inflamatorio con la tinción de Nissl en cortes histológicos de la SN correspondiente a cada grupo experimental.

El grupo 6OHDA/LPS+DXM no presentó diferencias en la cantidad y calidad del infiltrado inflamatorio al compararlo con su control (6OHDA/LPS-DXM) (Figura II.5 A vs Figura I.7 A). La composición del infiltrado inflamatorio fue similar al descrito en el capítulo I, compuesto principalmente por linfocitos, monocitos/macrófagos y algunos neutrófilos (Figura II.5 B). Como describimos anteriormente, los animales inyectados con Veh/LPS evidenciaron un leve infiltrado inflamatorio sólo en el sitio de inyección (ver Cap. I). Esta observación se repitió nuevamente en el grupo Veh/LPS+DXM donde el infiltrado inflamatorio se observó restringido al sitio de inyección (Figura II.5 D). Los animales correspondientes al grupo 6OHDA/Veh+DXM no presentaron infiltrado inflamatorio en la SN (Figura II.5 C) como era de esperar debido a la ausencia de inflamación observada en este grupo sin el tratamiento con DXM (6OHDA/Veh, Figura I.7 C).

La caracterización de los linfocitos presentes en la SN de los animales pertenecientes al grupo 6OHDA/LPS+DXM reveló que los mismos no se encontraban activados (linfocitos T CD25-) (Figura II.5 E) a diferencia de lo observado en el grupo inyectado con 6OHDA/LPS-DXM (Figura I.8).

Estos resultados indican que, si bien la DXM no produjo cambios en la calidad y cantidad del infiltrado inflamatorio observado, sí produjo modificaciones en la activación de las células T.

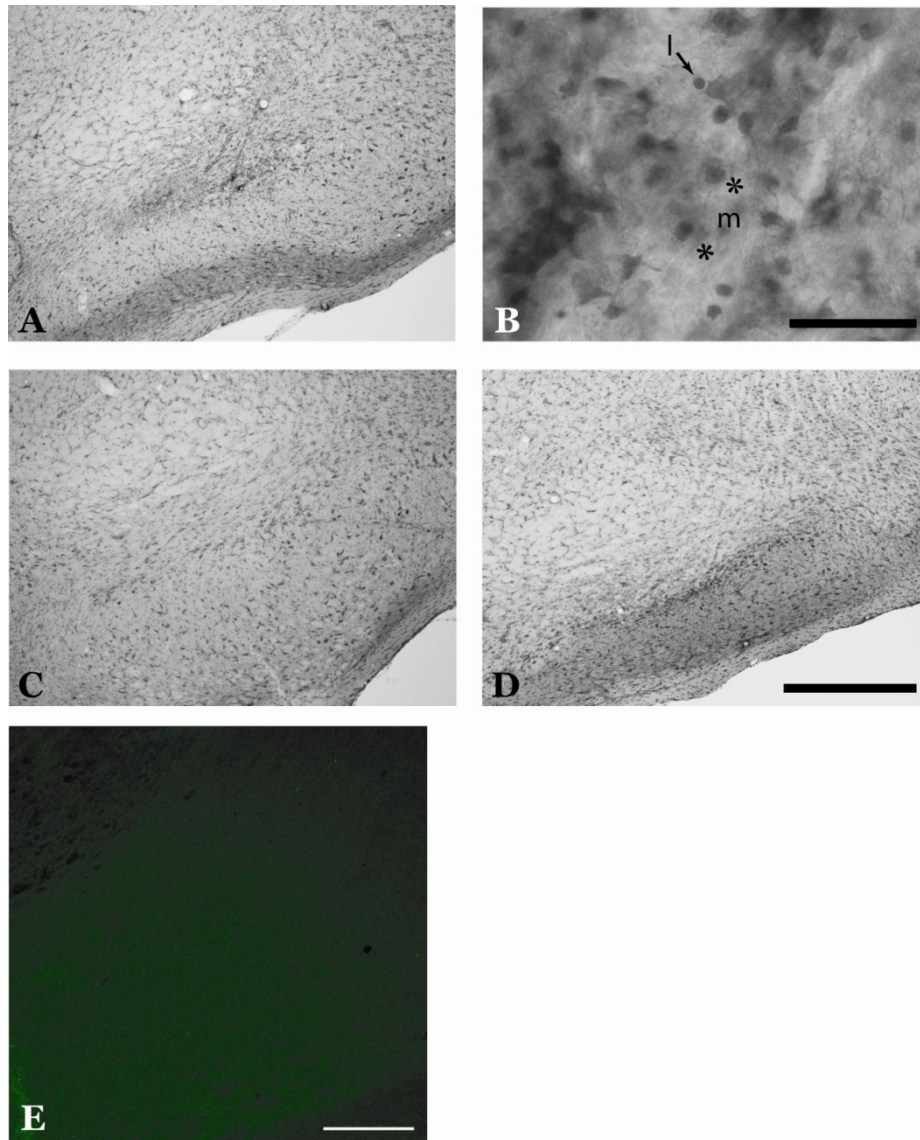


Figura II.5: Análisis del infiltrado inflamatorio en la SN de los animales inyectados con 6OHDA o vehículo en el cuerpo estriado, LPS o vehículo 12 días más tarde en la SN y que recibieron el tratamiento con DXM. Observado con la tinción de Nissl. Inmunofluorescencia CD25 (verde) contra linfocitos T activados.

A-B) Animales inyectados con 6OHDA en el cuerpo estriado y LPS en la SN (6OHDA/LPS). Se observó un infiltrado inflamatorio mixto constituido principalmente por monocitos/macrófagos (m-asteriscos) y por linfocitos (l-flecha). Barra de escala: 500 μm . B. Visión aumentada de A que muestra detalles del infiltrado inflamatorio. Barra de escala B: 50 μm

C. Animales inyectados con 6OHDA en el cuerpo estriado y vehículo en la SN (6OHDA/Veh). No se observó infiltrado inflamatorio en este grupo experimental. D. Animales inyectados con vehículo en el cuerpo estriado y LPS en la SN (Veh/LPS). Este grupo no presentó infiltrado inflamatorio a lo largo de la SN, únicamente evidenció un leve infiltrado inflamatorio en el sitio de inyección. Barra de escala: 500 μm

E. Animales inyectados con 6OHDA en el cuerpo estriado, LPS en la SN y que recibieron el tratamiento con DXM. No se observó la presencia de linfocitos T activados en la SN. Barra de escala: 100 μm

- Activación de la microglía.

Se analizaron los estadios morfológicos de activación de la microglía por la unión a la lectina GSA1-B4 y la presencia de marcadores de activación con la inmunomarcación contra ED-1 y MHCII.

Como vimos en el capítulo I, la dosis sub-tóxica de LPS inyectada produjo la adquisición de un fenotipo microglial caracterizado por estadio de activación 4, ED-1+ y MHCII+ en toda la SN de los animales correspondientes al grupo 6OHDA/LPS. Este fenotipo no se observó en los animales tratados con 6OHDA/Veh mientras que el grupo inyectado con Veh/LPS evidenció la presencia de este fenotipo sólo en el sitio de inyección en la SN (ver Cap I).

Evaluamos los estadios morfológicos de activación de la microglía en estos mismos grupos experimentales luego de recibir el tratamiento con DXM (6OHDA/LPS+DXM, 6OHDA/Veh+DXM y Veh/LPS+DXM). No se observaron cambios en los estadios de activación de la microglía así como tampoco en la expresión de ED-1 por parte de estas células (comparar Figura II.6 A, B, C, D, E y F vs Figura I.9 A, B, C, F, G y H). Se observó una disminución de la expresión de MHCII en la SN de los animales correspondientes a los grupos 6OHDA/LPS y Veh/LPS por el tratamiento con DXM (Figura II.6 G e I vs Figura 1.9 K y M). No se observaron diferencias en la expresión de MHCII en la SN de los animales inyectados con 6OHDA/Veh que recibieron o no el tratamiento con DXM (Figura II.6 H vs Figura I.9 L). Recordemos la escasa expresión de este marcador en este grupo experimental (6OHDA/Veh – Figura I.9 L).

Por lo tanto, se cuantificó la expresión de MHCII en los grupos tratados con DXM que evidenciaron una reducción de su expresión (Figura II.6 G e I). Se

observó una notoria disminución de la expresión de MHCII en el grupo tratado con 6OHDA/LPS luego del tratamiento con dexametasona (Figura II.6 G comparar con Figura I.9 K). Se contaron las células MHCII positivas estadio 4 observándose una disminución significativa (más del 50%) de dichas células luego del tratamiento con dexametasona ($p < 0.01$ al comparar el grupo 6OHDA/LPS+DXM vs el grupo 6OHDA/LPS-DXM, Figura II.7). El grupo Veh/LPS no presentó diferencias significativas en la expresión de MHCII en las células estadio 4 luego del tratamiento con DXM (Figura II.7). Recordemos que las células MHCII+ estadio 4 sólo se evidenciaron en el sitio de inyección de este grupo experimental (Veh/LPS) (ver Figura I.9 M) a diferencia de lo observado en el grupo 6OHDA/LPS (ver Figura I.9 K).

Estos resultados identifican una población distintiva de microglía MHCII+ correspondientes al estadio 4 de activación morfológica, que se correlaciona con los niveles de neurodegeneración y síntomas motores encontrados en el grupo 6OHDA/LPS antes y después del tratamiento con DXM. En base a estos resultados, podríamos sugerir un rol funcional de esta población distintiva de células microgliales en la exacerbación de la neurodegeneración y de los síntomas motores producida por la dosis sub-tóxica de LPS inyectada en la SN.

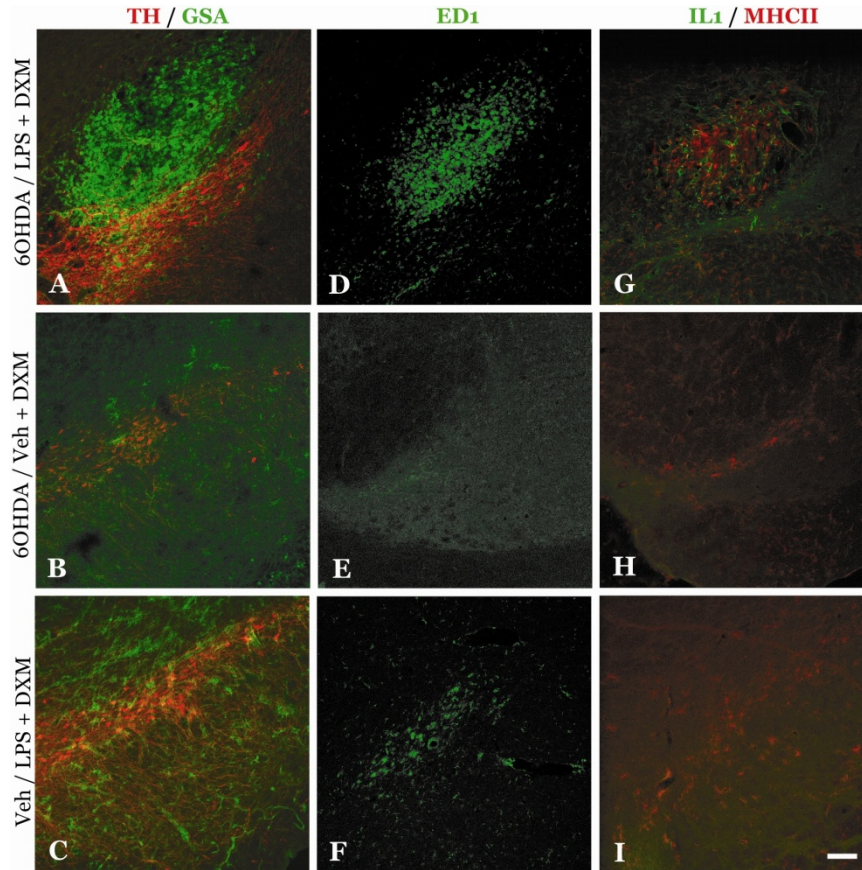


Figura II.6: Activación de la microglía en la SN luego de la inyección de 6OHDA o vehículo en el estriado, de LPS o Vehículo en la SN y del tratamiento con DXM.

Análisis de la SN ipsilateral a las inyecciones mediante la unión a la lectina GSA e inmunofluorescencia contra células ED-1+, MHCII+ y rIL-1 β +. A-C) Activación de la microglía evidenciado con GSA (verde) en la SN marcada con TH (rojo). A. Los animales inyectados con 6OHDA/LPS y tratados con DXM presentaron células GSA+ estadio 4 en toda la SN. B. Los animales correspondientes al grupo 6OHDA/Veh tratados con DXM evidenciaron una leve activación de la microglía (estadio 2 y a veces 3) en la SN. C. Los animales correspondientes al grupo Veh/LPS tratados con DXM exhibieron células estadio 2-3 en la SN. D-F) Microglía activada con características macrofágicas evidenciada con ED-1 (verde). D. Se observaron células ED-1+ estadio 4 en la SN de los animales inyectados con 6OHDA/LPS y tratados con DXM. En este grupo también se observaron células estadio 2-3 alrededor de la SN. E. Los animales inyectados con 6OHDA/Veh y tratados con DXM presentaron algunas células ramificadas ED-1+ en la SN. F. El grupo inyectado con Veh/LPS y tratado con DXM, presentó células ED-1+ estadio 2-3 en la SN, aunque algunas células estadio 4 también pudieron observarse. G-I) Expresión de MHCII (rojo) y de rIL-1 β (verde) en la SN. G. Los animales tratados con 6OHDA/LPS y DXM presentaron una disminución de la expresión de MHCII en la SN comparado con los animales no tratados con DXM (ver Figura I.9 K). Se observaron algunas células estadio 4 pero la mayoría de ellas eran estadio 2-3. En este grupo también se observaron células ramificadas rIL-1 β + dentro de la SN. H. Los animales inyectados con 6OHDA/Veh y tratados con DXM evidenciaron escasas células ramificadas MHCII+ en la SN. No se observaron células rIL-1 β + en este grupo. I. Se observaron células estadio 2-3 en la SN de los animales inyectados con Veh/LPS y tratados con DXM. No se observaron células rIL-1 β + en este grupo. Barra de escala: 100 μ m.

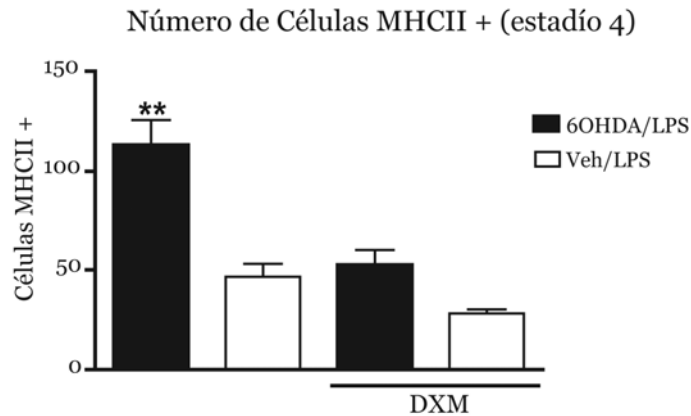


Figura II.7: Recuento de células MHCII positivas correspondientes al estadio 4 de activación en la SN de cada grupo experimental.

Se contaron las células MHCII+ (estadio 4) a lo largo de toda la SN a los 21 días después de los distintos tratamientos. Se realizó un ANOVA de dos factores (estriado-DXM) hallándose la interacción doble significativa ($p < 0.05$). La significación de las diferencias se realizó con el test de Fisher MDS. ** $p < 0.01$ diferencia significativa entre el grupo 6OHDA/LPS con y sin tratamiento con DXM. N= 3-4 por grupo

II.2.4 Efectos de la administración de dexametasona sobre la expresión de rIL-1 β en la SN.

La expresión de rIL-1 β disminuyó notoriamente en el grupo 6OHDA/LPS luego del tratamiento con DXM en comparación con el mismo grupo sin el tratamiento anti-inflamatorio.

Dentro de las citoquinas proinflamatorias estudiadas, la única citoquina de expresión diferencial que se encontró en nuestro modelo fue rIL-1 β . Este resultado sugiere que la rIL-1 β podría estar involucrada en los efectos exacerbantes observados con el estímulo pro-inflamatorio administrado (dosis sub-tóxica de LPS). Diferentes estudios muestran que el tratamiento con DXM

reduce la producción de citoquinas proinflamatorias, entre ellas, la IL-1 β (De Bosscher, Vanden Berghe et al., 2003; Allan, Tyrrell et al., 2005). Por lo tanto, se investigó el perfil de expresión de esta citoquina en la SN de animales tratados con DXM con la técnica de ELISA.

Se observó una marcada disminución de la expresión de rIL-1 β en el grupo 6OHDA/LPS+DXM con respecto al mismo grupo sin DXM que alcanzó significancia estadística ($p < 0.05$, Figura II.8). Los niveles de rIL-1 β encontrados en este grupo fueron comparables a los niveles de rIL-1 β del grupo control (Veh/LPS+DXM). El tratamiento con DXM no produjo cambios en el perfil de expresión de rIL-1 β del grupo control (Veh/LPS+DXM vs Veh/LPS-DXM, Figura II.8).

En resumen, el tratamiento con DXM fue capaz de inhibir la inducción de rIL-1 β en la SN de los animales pertenecientes al grupo 6OHDA/LPS, único grupo donde se observó inducción anteriormente (ver Figura I.10).

Estos resultados señalan nuevamente a la IL-1 β como una citoquina candidata a mediar los efectos exacerbantes producidos por la inyección de una dosis sub-tóxica de LPS en la SN en degeneración como se observó en el capítulo I.

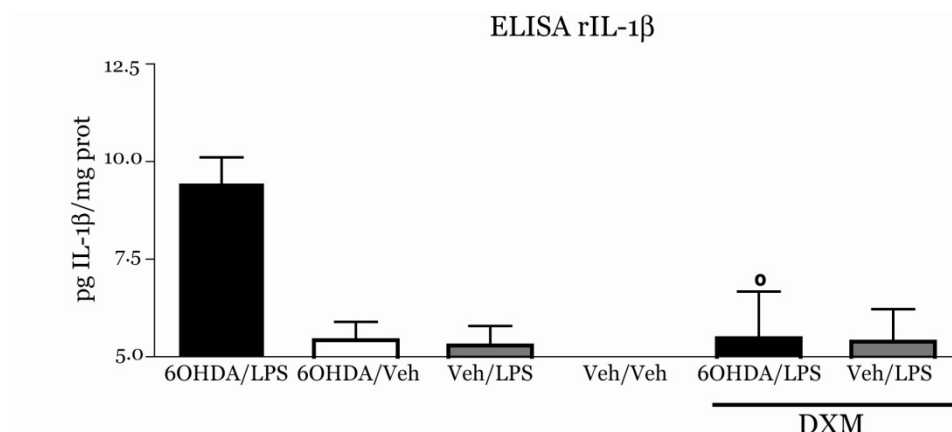


Figura II.8: Perfil de expresión de rIL-1β en la SN de los distintos grupos experimentales por ELISA.

Comparación de los niveles de rIL-1β 21 días después de los diferentes tratamientos por ELISA. Se realizó un ANOVA de dos factores (estriado – DXM), resultando la interacción doble significativa ($p < 0.05$). La significación de las diferencias se analizó con el test de Fisher MDS como test a posteriori. $^{\circ}p < 0.01$ diferencia significativa entre el grupo 6OHDA/LPS+DXM vs el grupo 6OHDA/LPS-DXM. N= 6-10 por grupo.

II.3 Tratamiento con Ibuprofeno

Estudiamos el efecto protector de otro agente anti-inflamatorio, ibuprofeno, con el fin de evaluar otra terapia anti-inflamatoria con una droga ampliamente usada, con diferente blanco de acción y con menores efectos secundarios debido al uso crónico.

En este diseño experimental también se evaluaron la neurodegeneración de las células dopaminérgicas, la activación de la microglía y la inducción de rIL-1 β en la SN de los distintos grupos experimentales.

El protocolo experimental consistió en la administración de una dosis de 8mg/rata/día de ibuprofeno (IBU) en el agua de la mamadera en forma diaria y matinal a partir del día 12 post inyección de 6OHDA a animales pertenecientes a los siguientes grupos experimentales: 6OHDA/LPS y Veh/LPS (Figura II.9). La dosis de ibuprofeno administrada corresponde al 0.02% de la dosis letal 50 (DL50) y no presenta efectos gastrointestinales adversos (Melton, Keith et al., 2003; Browne, Iwata et al., 2006). Es necesario aclarar en este momento una particularidad del tratamiento con ibuprofeno. Dado que los animales tienen que beber agua para recibir la dosis de ibuprofeno disuelta en ella, que el momento de mayor actividad de estos animales es durante la noche y que los animales deben ser anestesiados para ser operados, comenzamos el tratamiento con ibuprofeno la noche anterior a la inyección del estímulo pro-inflamatorio. De esta forma, nos aseguramos la presencia de ibuprofeno en los animales en el momento de la llegada de la dosis sub-tóxica de LPS. De otra manera, se retrasaría la acción del anti-inflamatorio hasta que los animales se recuperen de la cirugía y sientan la necesidad de ingerir agua.

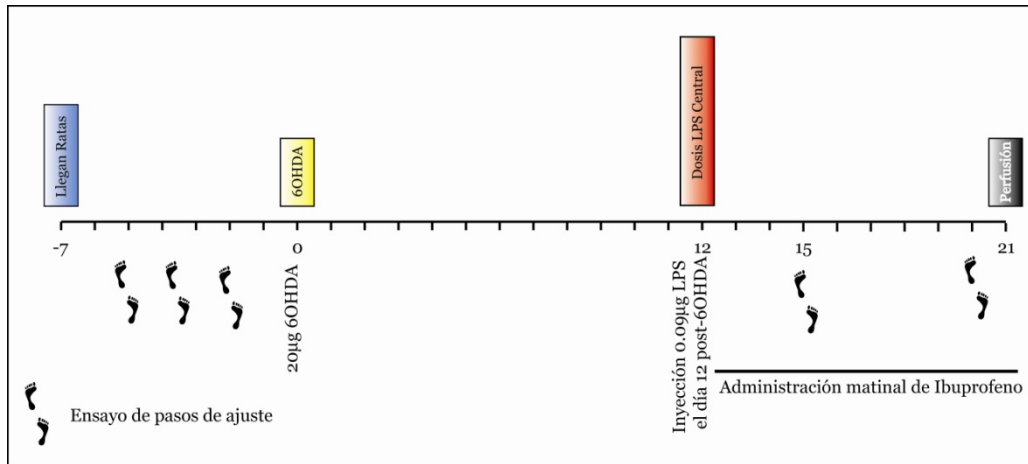


Figura II.9: Protocolo de trabajo que muestra los días de inyección estereotáxica de 6OHDA o Vehículo en el cuerpo estriado y LPS en la SN. Así también, se muestran los días de administración de ibuprofeno y los días de la realización del ensayo de pasos de ajuste (stepping).

Los grupos experimentales se dividen en:

- Ratas inyectadas con 6OHDA en el estriado, con LPS en la SN y que recibieron el tratamiento con ibuprofeno (6OHDA/LPS+IBU)
- Ratas inyectadas con Vehículo en el estriado, con LPS en la SN y que recibieron el tratamiento con ibuprofeno (Veh/LPS+IBU).

II.3.1 Efectos de la administración de ibuprofeno sobre la exacerbación de la neurodegeneración.

La administración de ibuprofeno previno la exacerbación de la neurodegeneración provocada por la inyección de una dosis sub-tóxica de LPS en la SN.

Se realizó el recuento de neuronas dopaminérgicas evidenciadas como células TH+ en la SN de los distintos grupos experimentales (Figura II.10).

Los animales tratados con 6OHDA/LPS+IBU evidenciaron un incremento significativo en el recuento de células TH+ (72.13% de células TH+ remanentes)

alcanzando los valores obtenidos en los animales control (68.33% de células TH+ remanentes, correspondientes al grupo 6OHDA/Veh - ver Figura I.3) ($p < 0.001$ comparando 6OHDA/LPS+IBU vs 6OHDA/LPS-IBU, Figura II.10). Este resultado es similar al recuento observado luego del tratamiento con DXM en el grupo 6OHDA/LPS (ver Figura II.2). El grupo Veh/LPS+IBU presentó un sutil incremento en el recuento de células TH+ luego del tratamiento con este AINE ($p < 0.05$ comparando Veh/LPS+IBU vs Veh/LPS-IBU, Figura II.10). Este incremento también fue observado en este mismo grupo luego del tratamiento con DXM (Veh/LPS+DXM, ver Figura II.2). Recordemos que la dosis sub-tóxica de LPS elegida sólo produce neurodegeneración en el sitio de inyección, con lo cual el ibuprofeno estaría disminuyendo la neurodegeneración en esta zona.

Estos resultados demuestran que el tratamiento con ibuprofeno es capaz de prevenir la exacerbación de la neurodegeneración producida por la dosis sub-tóxica de LPS inyectada en la SN en neurodegeneración.

Podemos concluir que el tratamiento con ibuprofeno fue efectivo en la inhibición de la acción del LPS sugiriendo un rol protector de este AINE frente a los efectos exacerbantes del LPS.

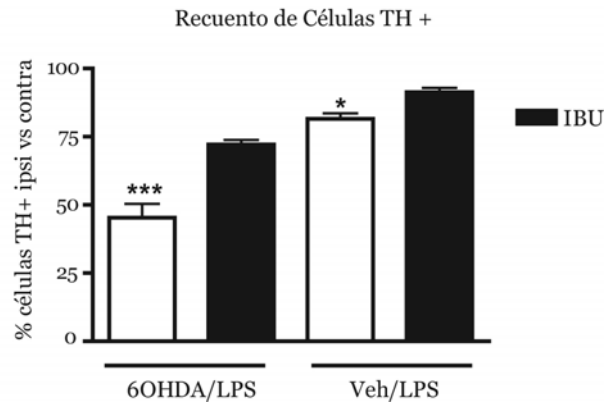


Figura II.10: Recuento de neuronas TH positivas en la SN de los distintos grupos experimentales.

Cuantificación de las células TH positivas como porcentaje de células del hemisferio ipsilateral versus el contralateral a los 21 días en cada uno de los tratamientos. Se realizó un ANOVA de dos factores resultando la interacción doble (estriado – IBU) significativa ($p < 0,01$). La significación de las diferencias se realizó con el test de Fisher DMS. $**p < 0.001$ comparando 6OHDA/LPS+IBU vs 6OHDA/LPS+IBU; $*p < 0.05$ comparando Veh/LPS+IBU vs Veh/LPS+IBU. N=5-9 por grupo

II.3.2 Efectos de la administración de ibuprofeno sobre los síntomas motores.

La administración de IBU previno los síntomas motores correspondientes a la exacerbación de la neurodegeneración producida por la inyección de la dosis sub-tóxica de LPS en la SN en neurodegeneración.

Se observó un incremento en el número de pasos de ajuste de los animales pertenecientes al grupo 6OHDA/LPS+IBU con respecto a los animales que no recibieron este tratamiento anti-inflamatorio ($p < 0.05$ comparando el grupo 6OHDA/LPS+IBU vs el grupo 6OHDA/LPS-IBU, Figura II.11). Esta disminución en la exacerbación de los síntomas motores se hizo visible tanto el día 15 como el día 20 post-6OHDA (Figura II.11). Estos resultados están en línea

con el aumento en el recuento de células TH+ observado en este grupo (ver Figura II.10). La disminución de los síntomas motores observada fue similar a la obtenida luego del tratamiento con dexametasona, indicando que ambos tratamientos fueron capaces de prevenir la exacerbación de los síntomas motores en este grupo experimental (6OHDA/LPS). Los animales inyectados con Veh/LPS+IBU no mostraron diferencias significativas en el número de pasos de ajuste realizados. Si bien se observó un sutil aumento en el recuento de células TH+ luego del tratamiento con IBU (Figura II.10), este aumento no se vio reflejado en un aumento significativo en el número de pasos de ajuste realizados por este grupo (Figura II.11). Por último, ninguno de los grupos experimentales experimentó anormalidades en la ejecución del ensayo con la pata izquierda (ipsilateral a la lesión) (datos no mostrados).

Estos resultados evidencian que el tratamiento con ibuprofeno es capaz de prevenir la exacerbación de los síntomas motores producida por la dosis sub-tóxica de LPS inyectada en la SN en neurodegeneración.

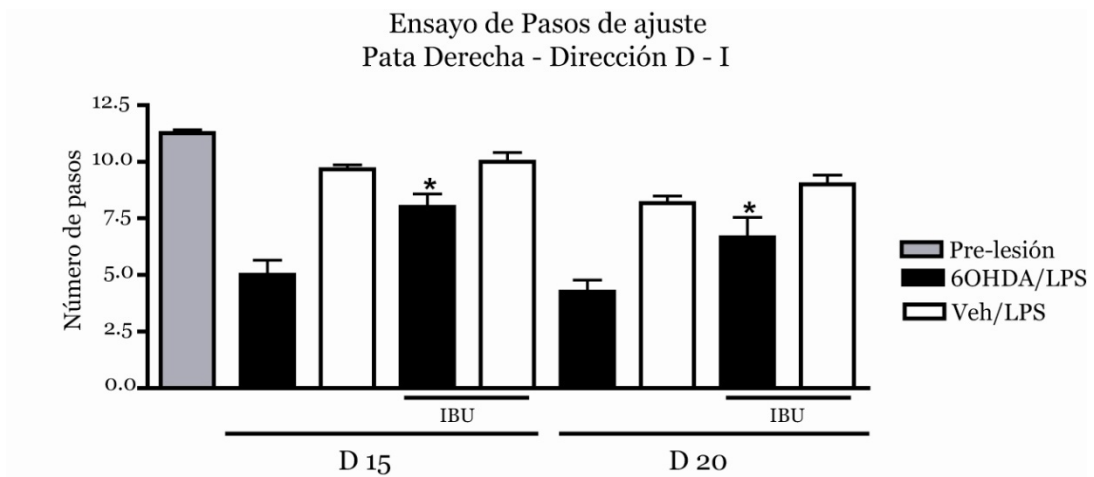


Figura II.11: Ensayo de pasos de ajuste realizado a los 15 y 20 días en cada uno de los grupos experimentales luego del tratamiento con IBU.

Cuantificación del número de pasos realizados con la pata afectada (contralateral a la lesión) en la dirección derecha-izquierda donde se evidencia un aumento en el número de pasos de ajuste realizados por el grupo 6OHDA/LPS luego del tratamiento con IBU. Se realizó un ANOVA de dos factores (IBU – tiempo) con medidas repetidas en el factor tiempo. La significación de las diferencias se analizó con el test de Fisher DMS. * $p < 0.05$ comparando el grupo 6OHDA/LPS+IBU vs el grupo 6OHDA/LPS-IBU a los 15 y 20 días.

II.3.3 Efectos de la administración de ibuprofeno sobre la inflamación.

La administración de ibuprofeno produjo una disminución en la magnitud del infiltrado inflamatorio observado, así como también, una menor activación morfológica de la microglía en la SN de los animales pertenecientes al grupo 6OHDA/LPS.

- Presencia de infiltrado inflamatorio.

Se analizó la presencia de infiltrado inflamatorio con la tinción de Nissl en cortes histológicos correspondientes a los distintos grupos experimentales.

Los animales inyectados con 6OHDA/LPS+IBU presentaron un infiltrado inflamatorio de composición similar al observado sin el tratamiento anti-inflamatorio pero más restringido en superficie y sin abarcar toda la SN (Figura

II.12). La composición del infiltrado inflamatorio fue similar al observado luego del tratamiento con DXM aunque más restringido en superficie (6OHDA/LPS+DXM vs 6OHDA/LPS+IBU). El grupo Veh/LPS evidenció un escaso infiltrado inflamatorio observado únicamente en el sitio de inyección, similar a lo observado en este grupo luego del tratamiento con DXM (Veh/LPS+DXM, Figura II.5 D).

La caracterización de los linfocitos observados en la SN de los animales correspondientes al grupo 6OHDA/LPS+IBU, reveló que los mismos no se encontraban activados (linfocitos T CD25-) (Figura II.12 C) a diferencia de lo observado en el grupo inyectado con 6OHDA/LPS (Figura I.8 – Cap I).

Estos resultados indican que el ibuprofeno fue capaz de restringir la magnitud del infiltrado inflamatorio así como también la activación de los linfocitos T.

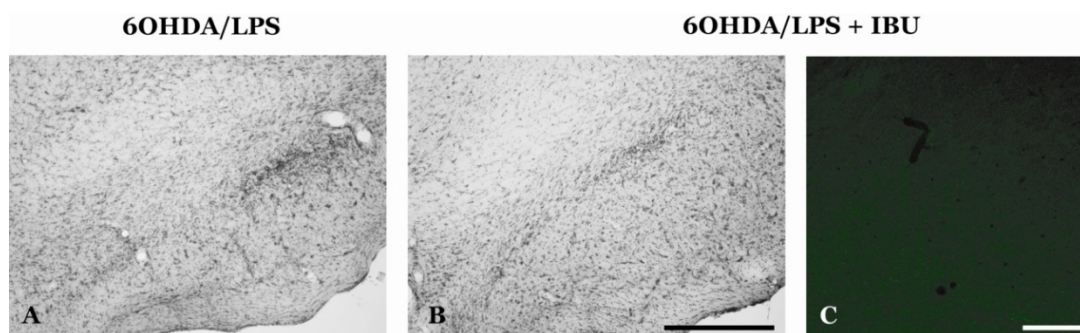


Figura II.12: Análisis del infiltrado inflamatorio observado con la tinción de Nissl e inmunofluorescencia contra linfocitos CD25+ en la SN de los animales correspondientes al grupo 6OHDA/LPS

A) Animales inyectados con 6OHDA en el cuerpo estriado y LPS en la SN (6OHDA/LPS). Se observó un infiltrado inflamatorio mixto constituido principalmente por monocitos/macrófagos y algunos linfocitos. B-C) Animales inyectados con 6OHDA en el cuerpo estriado, LPS en la SN (6OHDA/LPS) y que recibieron el tratamiento con IBU. Se observa un infiltrado inflamatorio más restringido en este grupo (B). La composición del infiltrado es similar al infiltrado observado sin el tratamiento anti-inflamatorio. No se observaron linfocitos CD25+ en este grupo experimental (C). Barra de escala (A-B): 500µm. Barra de escala (C): 100µm.

- Activación de la microglía.

Se analizaron los estadios morfológicos de activación de la microglía por la unión a la lectina GSA1-B4 y la presencia de marcadores de activación con la inmunomarcación contra ED-1 y MHCII.

Los animales correspondientes al grupo 6OHDA/LPS+IBU, presentaron activación de la microglía estadio 4 en el sitio de inyección mientras que en el resto de la SN presentaron una activación moderada correspondiente a estadios 2-3 (Figura II.13 A). En este grupo se detectaron principalmente células con procesos cortos y gruesos que son características del estadio 3 de activación morfológica siendo las mismas ED-1-. Las células MHCII+ mostraron la misma morfología y patrón de distribución que las células GSA+(Figura II.13 C), observándose el estadio 4 MHCII+ sólo en el sitio de inyección. No realizamos el recuento de las células estadio 4 MHCII+ debido a que las mismas se encontraban en escasa cantidad y solamente restringidas al sitio de inyección. El grupo tratado con Veh/LPS+IBU presentó escasa activación de la microglía a lo largo de toda la SN (estadios 1 y 2) mientras que se evidenciaron algunas células ameboides con procesos cortos y gruesos (estadio 3-4) solamente en el sitio de inyección (Figura II.13 B). Se evidenciaron algunas células MHCII+ en la SN correspondientes a estadio 1-2 mientras que no se evidenciaron células ED-1+ (Figura II.13 D).

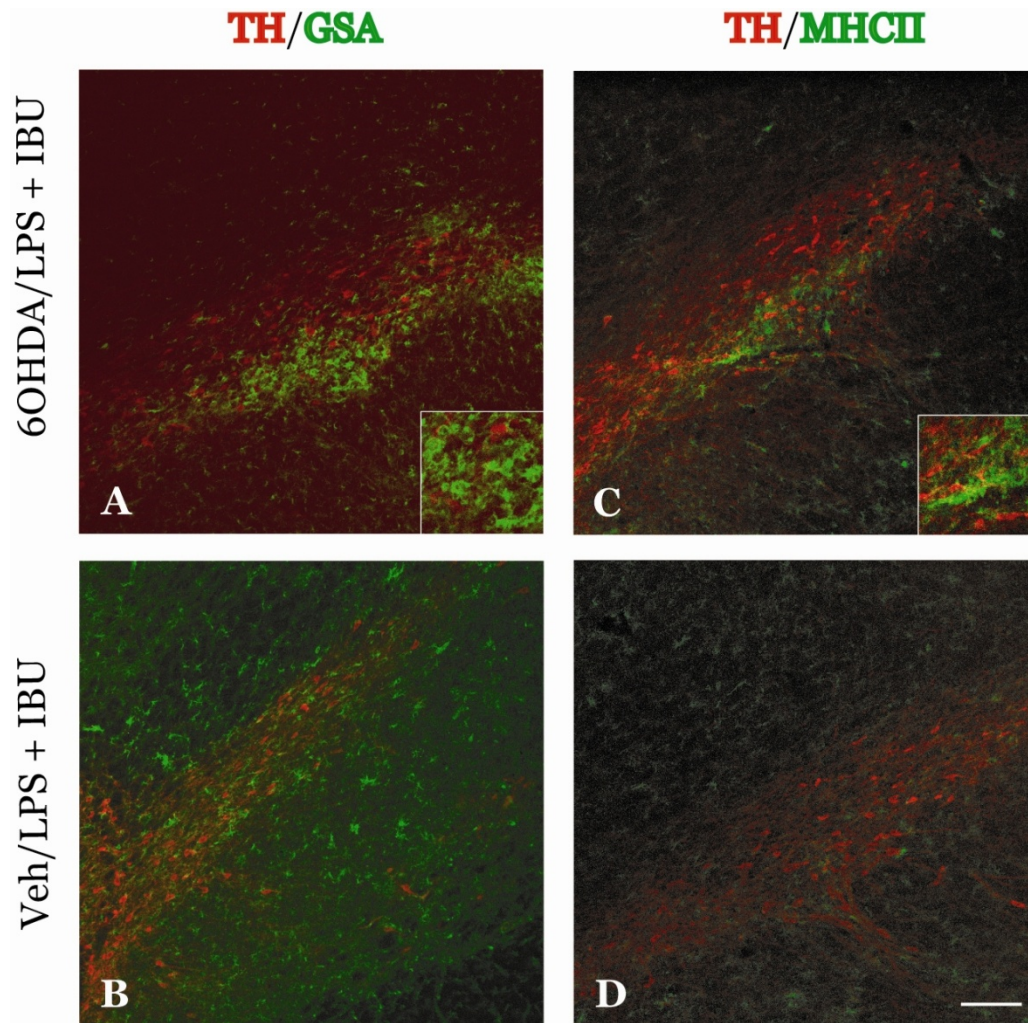


Figura II.13: Activación de la microglía en la SN luego de la inyección de 6OHDA o vehículo en el estriado, de LPS en la SN y del tratamiento con IBU.

Análisis de la SN ipsilateral a las inyecciones por la unión a la lectina GSA y por inmunofluorescencia contra células MHCII+ A-B) Activación de la microglía evidenciado con GSA (verde) en la SN marcada con TH (rojo). A. Los animales inyectados con 6OHDA/LPS y tratados con IBU presentaron células GSA+ estadio 2-3 en la SN. Detalle: Imagen aumentada de los estadios 2-3 de la microglía en este grupo experimental. B. Los animales correspondientes al grupo Veh/LPS tratados con IBU exhibieron células estadio 1-2 en la SN. C-D) Expresión de MHCII (verde) y de TH (rojo) en la SN. C. Los animales tratados con 6OHDA/LPS + IBU presentaron el mismo patrón de expresión que GSA. La mayoría de las células presentaron estadio 2-3. Detalle: Imagen aumentada de la activación morfológica de la microglía donde se observan en detalle los estadios 2-3 de activación. D. Se observaron escasas células estadio 1-2 en la SN de los animales inyectados con Veh/LPS y tratados con IBU. Barra de escala: 100µm.

Estos resultados identifican un efecto del ibuprofeno sobre la activación de la microglía, acción que hasta el momento no se le atribuía a este AINE. Se sabe que los AINEs actúan a través de la inhibición de la COX 1 y 2 y alguno de ellos modulan la actividad de la iNOS, generación de NO^{*} y antagonizan las acciones del factor de transcripción NF- κ B. Podemos decir que, la presencia de escasas células estadio 4 MHCII⁺ en el grupo 6OHDA/LPS indican un efecto directo del ibuprofeno sobre la microglía o un efecto indirecto del mismo sobre el nicho o entorno.

En conclusión, la presencia reducida de células microgliales estadio 4 MHCII⁺ junto con la disminución de la exacerbación de la neurodegeneración observada en el grupo 6OHDA/LPS, podría indicar un rol funcional de este fenotipo (estadio 4 MHCII⁺) en la exacerbación de la neurodegeneración producida por la dosis sub-tóxica de LPS inyectada en la SN en neurodegeneración como se observó en los experimentos con DXM.

II.3.4 Efectos de la administración de ibuprofeno sobre la expresión de IL-1 β endógena en la SN.

La expresión de rIL-1 β disminuyó notoriamente en el grupo 6OHDA/LPS luego del tratamiento con ibuprofeno en comparación con el mismo grupo que no recibió este tratamiento anti-inflamatorio.

Como ya mencionamos anteriormente, la única citoquina de expresión diferencial que se encontró en nuestro modelo fue rIL-1 β , encontrándose una reducción de su expresión luego del tratamiento con DXM. Estudios recientes

sobre los efectos de los AINE demuestran que éstos no sólo actuarían a través de la inhibición de las enzimas COX 1 y 2 sino que tendrían otros efectos anti-inflamatorios como la inhibición de la síntesis de citoquinas proinflamatorias a través de la inhibición de NF- κ B (Asanuma, Miyazaki et al., 2004) y citas allí). Por lo tanto, se investigó el perfil de expresión de rIL-1 β en la SN de animales tratados con ibuprofeno.

Se observó una disminución de la expresión de rIL-1 β en el grupo 6OHDA/LPS+IBU con respecto al mismo grupo sin ibuprofeno que alcanzó significancia estadística ($p < 0.05$ comparando 6OHDA/LPS+IBU vs 6OHDA/LPS-IBU, Figura II.14). Los niveles de rIL-1 β encontrados en este grupo fueron comparables a los niveles de rIL-1 β del grupo 6OHDA/LPS+DXM (ver Figura II.8). El tratamiento con ibuprofeno no produjo cambios en el perfil de expresión de rIL-1 β en el grupo Veh/LPS (Figura II.14). Estos resultados eran esperables debido el leve infiltrado inflamatorio y la escasa activación de la microglía observados en este grupo. Los niveles de rIL-1 β hallados en este grupo también fueron semejantes a los observados luego del tratamiento con DXM (ver Figura II.8).

En resumen, el tratamiento con ibuprofeno fue capaz de inhibir la inducción de rIL-1 β en la SN de los animales del grupo 6OHDA/LPS. Recordemos que este grupo fue el único que evidenció inducción de esta citoquina pro-inflamatoria (ver Figura I.10).

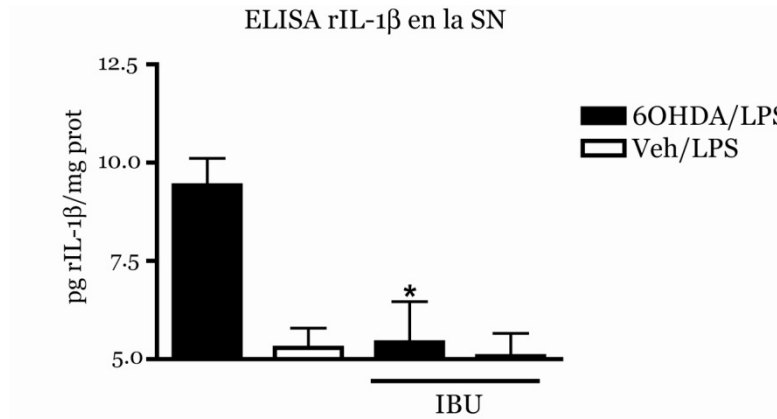


Figura II.14: Perfil de expresión de rIL-1β en la SN de los distintos grupos experimentales por ELISA.

Comparación de los niveles de rIL-1β 21 días después de los diferentes tratamientos por ELISA. Se realizó un ANOVA de dos factores (estriado – IBU), resultando la interacción doble significativa ($p < 0.05$). La significación de las diferencias se analizó con el test de Fisher DMS. * $p < 0.05$ diferencia significativa del grupo 6OHDA/LPS+IBU vs el grupo 6OHDA/LPS-IBU. N= 6-10 por grupo.

Estos resultados señalan nuevamente a la IL-1β como una citoquina clave para mediar los efectos exacerbantes producidos por la inyección de una dosis sub-tóxica de LPS en la SN en degeneración.

II.4 Conclusión

En este capítulo mostramos los efectos ejercidos por distintos compuestos anti-inflamatorios sobre la exacerbación de la neurodegeneración en el modelo de EP que analizamos en detalle en el capítulo I.

La terapia con anti-inflamatorios (DXM e IBU) inhibió exitosamente la exacerbación de la neurodegeneración producida por la combinación de 6OHDA y LPS. Así también, estos tratamientos redujeron la expresión del receptor de superficie MHCII en las células de la microglía. Además el ibuprofeno mostró tener efectos sobre los estadios de activación morfológica de la microglía produciendo una disminución de la activación de la misma. En el capítulo I presentamos evidencia de la adquisición de un fenotipo microglial avanzado caracterizado por la presencia de células estadio 4 MHCII+ que se correlacionó positivamente con la exacerbación de la neurodegeneración. En este capítulo mostramos que, la presencia de este fenotipo microglial disminuyó luego de la terapia con anti-inflamatorios. En resumen, las drogas anti-inflamatorias evaluadas fueron neuroprotectoras y modularon la activación de la microglía y la expresión de marcadores de activación como el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHCII).

También demostramos que dos agentes anti-inflamatorios ampliamente usados en la clínica, la dexametasona y el ibuprofeno, fueron capaces de prevenir la inducción de rIL-1 β en la SN. Esta falta de inducción se correlacionó con la disminución de la neurodegeneración y señala nuevamente a la IL-1 β como una de las principales citoquinas que puede mediar los efectos exacerbantes del LPS en la SN en neurodegeneración.

De singular interés fue observar que el tratamiento con DXM e IBU mostraron ser efectivos en la protección de la exacerbación de los síntomas motores. Este hecho es de gran relevancia en la clínica de la EP ya que los síntomas aparecen cuando se han perdido entre un 50-70% de las neuronas de la SN (Lang and Lozano, 1998; Deumens, Blokland et al., 2002). Tanto el uso de DXM como de IBU demostraron ser agentes capaces de disminuir la exacerbación de la neurodegeneración y en consecuencia mitigar la sintomatología de la EP.

En conclusión, nuestros resultados muestran por primera vez que la inflamación es perjudicial para el progreso de la EP y que los mediadores inflamatorios, como la IL-1 β , podrían inducir o exacerbar la toxicidad neuronal convirtiéndose en un círculo vicioso de perpetuación de la neurodegeneración. Además, identificamos tratamientos anti-inflamatorios efectivos para la disminución de la progresión de EP en nuestro modelo.

Capítulo III

III.1 Objetivo 3

El objetivo específico de este capítulo es estudiar si la inhibición o la sobre-expresión de IL-1 β , puede modular la neurodegeneración de la SN. Con este objetivo nos proponemos dilucidar el rol de una de las citoquinas claves del proceso inflamatorio sobre la vía nigroestriatal.

Dado que la rIL-1 β fue la única citoquina que encontramos elevada en nuestro modelo dentro de las citoquinas proinflamatorias estudiadas, quisimos evaluar la participación de la misma en la exacerbación de la neurodegeneración. Para ello, decidimos abordar dos estrategias experimentales, inhibir la acción de la IL-1 β a través de la expresión de IL-1ra y por otro lado, sobre-expresar la IL-1 en la vía nigroestriatal, con el fin de evaluar el rol de la misma en el proceso neurodegenerativo.

III.2 Bloqueo de la acción de la IL-1 a través de la inyección de IL-1ra (antagonista natural de IL-1).

Para evaluar el rol funcional de la rIL-1 β , se realizó la inyección de 1.10^9 partículas de un adenovector que expresa el receptor antagonista de IL-1 (AdIL-1ra) en el fascículo mesencefálico anterior (MFB), una estructura anterior a la sustancia nigra y que se conecta con la misma, 3 días antes de la inyección de la neurotoxina en el cuerpo estriado. La elección del MFB como vía de inyección se debió a la necesidad de no lesionar la SN con dos cirugías estereotáxicas (Figura III.1). Recordemos que la SN es una región altamente susceptible a cualquier tipo de daño (Lawson, Perry et al., 1990). Estudios previos del laboratorio demostraron que este vector puede inhibir eficientemente la actividad de la IL-1 (Depino, Alonso et al., 2004).

Decidimos inyectar el AdIL-1ra 3 días antes de la 6OHDA porque según resultados previos del laboratorio, no observamos inflamación debida a los vectores virales luego de la semana de ser inoculados (Ferrari, Pott Godoy et al., 2006). Este tratamiento resultaría en la expresión del antagonista de IL-1 en la

SN y el consiguiente bloqueo de la actividad biológica de IL-1 en la misma región. De esta manera, la SN no presentaría inflamación evidente al momento de la llegada del estímulo pro-inflamatorio sub-tóxico (LPS) pero sí expresaría IL-1ra.

Como control se inyectaron animales con la misma cantidad de partículas de un adenovector control que expresa el gen de la beta-galactosidasa (Ad β gal) (Figura III.1).

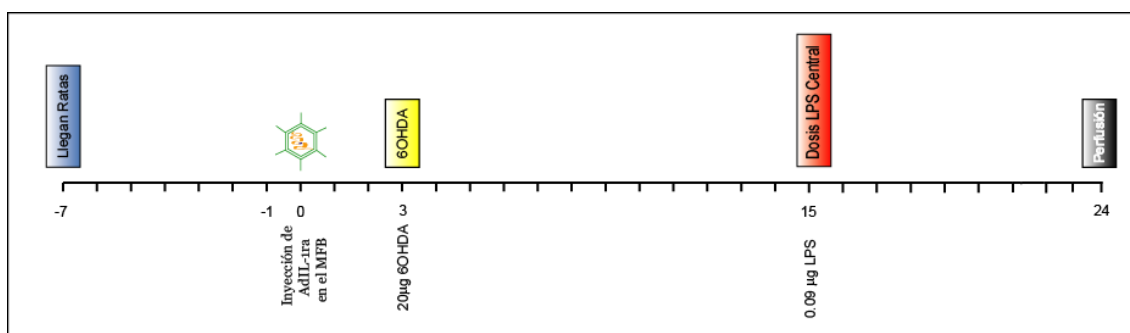


Figura III.1: Protocolo de trabajo que muestra los días de inyección estereotáxica de AdIL-1ra o Ad β gal en el MFB, 6OHDA o vehículo en el cuerpo estriado y LPS o vehículo en la SN.

Los grupos experimentales se dividen en:

- Ratas inyectadas con AdIL-1ra en el MFB, con 6OHDA en el estriado y con LPS (AdIL-1ra/6OHDA/LPS) o Salina (AdIL-1ra/6OHDA/Veh) en la SN.
- Ratas inyectadas con Ad β gal en el MFB, con 6OHDA en el estriado y con LPS (Ad β gal/6OHDA/LPS) o Salina (Ad β gal/6OHDA/Veh) en la SN.
- Ratas inyectadas con AdIL-1ra en el MFB, con Vehículo en el estriado y con LPS en la SN (AdIL-1ra/Veh/LPS).
- Ratas inyectadas con Ad β gal en el MFB, con Vehículo en el estriado y con LPS en la SN. (Ad β gal/Veh/LPS)

Para estudiar la distribución de los vectores adenovirales, se realizó la reacción enzimática de la β -galactosidasa utilizando un sustrato de la enzima (x-gal) que da como resultado un color azul (ver Materiales y Métodos, sección 8.2). Como ambos vectores (AdIL-1ra y Ad β gal) comparten la cápside viral, se espera que

tengan la misma distribución y tropismo (Figura III.2). Resultados previos de inyecciones en esta zona (MFB) con el adenovector control demostraron que, la eficiencia de transducción alcanzó un 30-35% de las células TH+ en la SN.

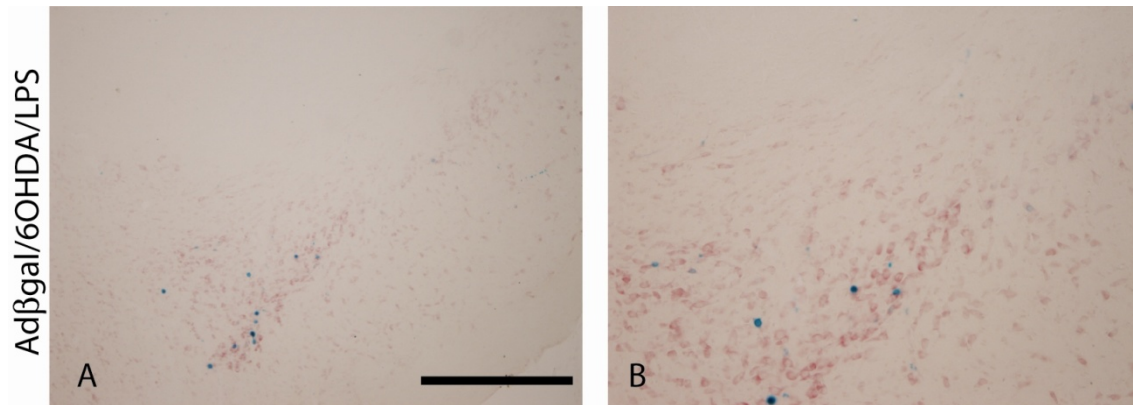


Figura III.2: Análisis de la expresión del transgén de la β galactosidasa en la SN.

- A. Reacción de x-gal en la SN de animales inyectados con Ad β gal en el MFB, 6OHDA en el cuerpo estriado y LPS en la SN. Foto representativa de la reacción de x-gal. Se observa en azul el resultado de la reacción de color. Contratación: rojo neutro. Barra de escala: 500 μ m.
- B. Visión aumentada de A que muestra en detalle el precipitado azul intenso en la SN.

III.2.1 Efectos de la inhibición de IL-1 sobre la exacerbación de la neurodegeneración.

La IL-1 β endógena (rIL-1 β) está implicada en la exacerbación de la neurodegeneración mediada por la dosis sub-tóxica de LPS inyectada.

Para evaluar si la inhibición de la acción de IL-1 disminuyó la exacerbación de la neurodegeneración, se realizó el recuento de neuronas dopaminérgicas evidenciadas como células TH+ en toda la SN de los distintos grupos experimentales.

Los animales tratados con 6OHDA/LPS y AdIL-1ra evidenciaron un incremento significativo en el recuento de células TH⁺ con respecto a los animales correspondientes al mismo grupo pero inyectados con el adenovector control (Adβgal/6OHDA/LPS) ($p < 0.003$, Figura III.3). Estos resultados señalan una prevención de la exacerbación de la neurodegeneración luego de inhibir la acción de la IL-1. No se observaron cambios en el recuento de células TH⁺ en el grupo 6OHDA/Veh inyectado previamente con el AdIL-1ra o con el adenovector control (Figura III.3) como era de esperar debido a la falta de inducción de rIL-1β en este grupo (Figura I.10). Así también, no se observaron diferencias en el número de células TH⁺ en el grupo Veh/LPS tratado con el AdIL-1ra o con el Adβgal (Figura III.3) ya que este grupo tampoco presentó inducción de rIL-1β en la SN (Figura I.10).

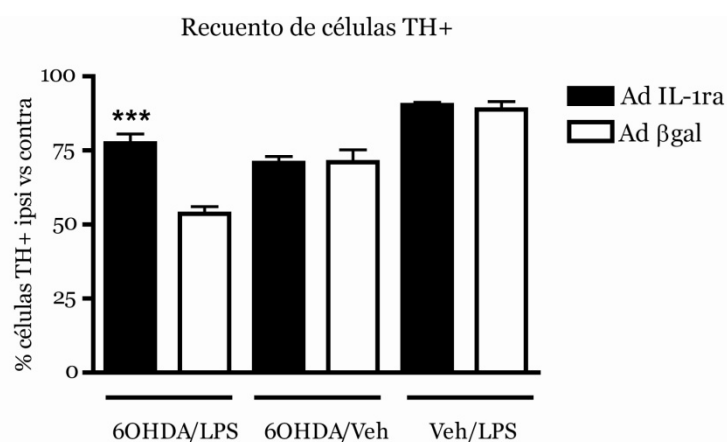


Figura III.3: Recuento de neuronas TH positivas en la SN de los distintos grupos experimentales.

Cuantificación de las células TH positivas como porcentaje de células del hemisferio ipsilateral versus el hemisferio contralateral a los 24 días en cada uno de los tratamientos. Se realizó un test de Student de diferencia de medias para muestras independientes *** $p = 0,003$ comparando el grupo AdIL-1ra/6OHDA/LPS y el grupo inyectado con el adenovector control (Adβgal/6OHDA/LPS). N= 4 - 5 por grupo

Estos resultados indican un rol funcional de la IL-1 β en la exacerbación de la neurodegeneración mediada por la dosis sub-tóxica de LPS inyectada en la SN en degeneración.

III.2.2 Efectos de la inhibición de la IL-1 sobre la activación de la microglía en la SN.

La inhibición de la IL-1 no produjo variaciones en la activación de la microglía evidenciado como células GSA+, ED-1+ o MHCII+ en la SN.

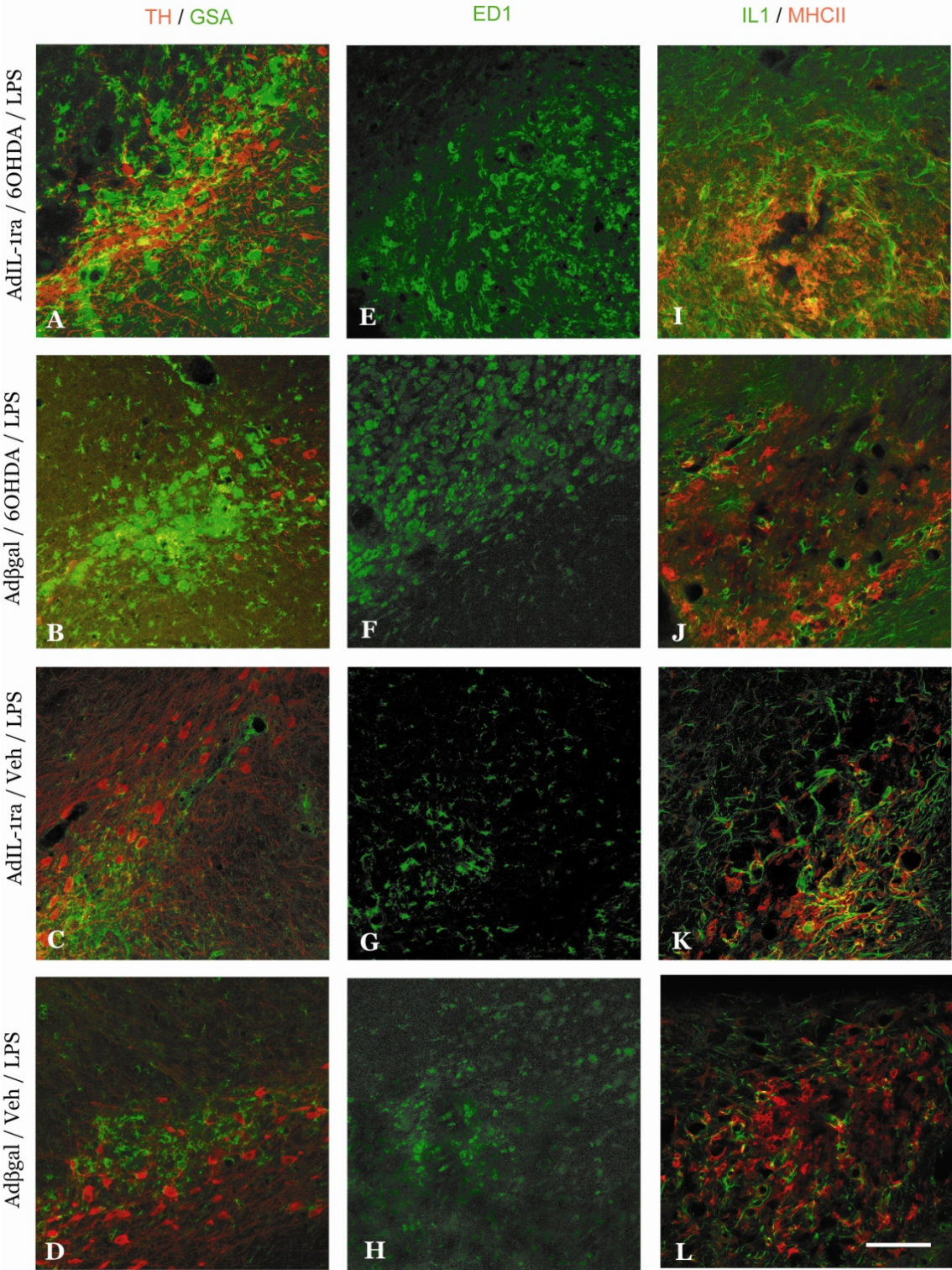
Se analizó la activación de la microglía por la unión a la lectina GSA y la expresión de marcadores ED-1 y MHCII en la SN de los distintos grupos experimentales.

La inhibición de la IL-1 no mostró tener efectos sobre los estadios morfológicos de la microglía. No se observaron diferencias en la morfología de la microglía (Figura III.4 A) ni en la expresión de marcadores (Figura III.4 E e I) en la SN de los animales tratados con AdIL-1ra/6OHDA/LPS con respecto a los animales inyectados con el adenovector control (Ad β gal/6OHDA/LPS) (Figura III.4 B, F y J). De la misma manera, no se evidenciaron cambios en el grupo tratado con AdIL-1ra/Veh/LPS (Figura III.4 C, G y K) en cuanto a la activación de la microglía y expresión de marcadores cuando se lo comparó con el grupo inyectado con el adenovector control (Ad β gal/Veh/LPS) (Figura III.4 D, H y L).

Figura III.4: Análisis de la activación de la microglía luego de la inyección de AdIL-1ra o el adenovector control en el MFB en los distintos grupos experimentales.

A-D) Inmunofluorescencia contra TH (rojo) y GSA (verde) para observar los estadios de activación morfológica de la microglía a los 24 días en la SN. A-B) Se observan células GSA+ (estadios 2, 3 y principalmente 4) a lo largo de toda la SN en el grupo inyectado con 6OHDA/LPS y AdIL-1ra o Adβgal (AdIL-1ra/6OHDA/LPS y Adβgal/6OHDA/LPS). Mientras que se observan células GSA+ (estadios 2 y 3) en el grupo tratado con AdIL-1ra/Veh/LPS (C) y con Adβgal/Veh/LPS (D). E-H) Inmunofluorescencia para ED-1 (verde) para visualizar la microglía activada con características macrofágicas. Se observan células ameboides ED-1+ a lo largo de toda la SN en el grupo tratado con AdIL-1ra/6OHDA/LPS (E) y Adβgal/6OHDA/LPS (F), mientras que los animales correspondientes a los grupos AdIL-1ra/Veh/LPS y Adβgal/Veh/LPS sólo se observan células ameboides ED-1+ en el sitio de inyección (G-H). En estos grupos también se observan células ED-1+ con prolongaciones que correspondería a estadios de activación 2-3 (G-H).

I - L) Inmunofluorescencia para rIL-1β (verde) y MHCII (rojo). Los animales correspondientes a los grupos AdIL-1ra/6OHDA/LPS y Adβgal/6OHDA/LPS presentaron células estadio 4 MHCII+ y expresión de rIL-1β a lo largo de toda la SN (I-J). Los animales tratados con AdIL-1ra/Veh/LPS y Adβgal/Veh/LPS presentaron células MHCII+ y expresión de rIL-1β en el sitio de inyección (K-L). Barra de escala: 100μm.



Además, se realizó el recuento de células MHCII positivas estadio 4 de activación en los distintos grupos experimentales con el fin de evaluar diferencias en la expresión de este marcador.

No se observaron diferencias en el número de células MHCII+ estadio 4 en los diferentes grupos estudiados (Figura III.5).

Estos resultados sugieren que la expresión de rIL-1 β es un evento que se encuentra río abajo de la activación de la microglía.

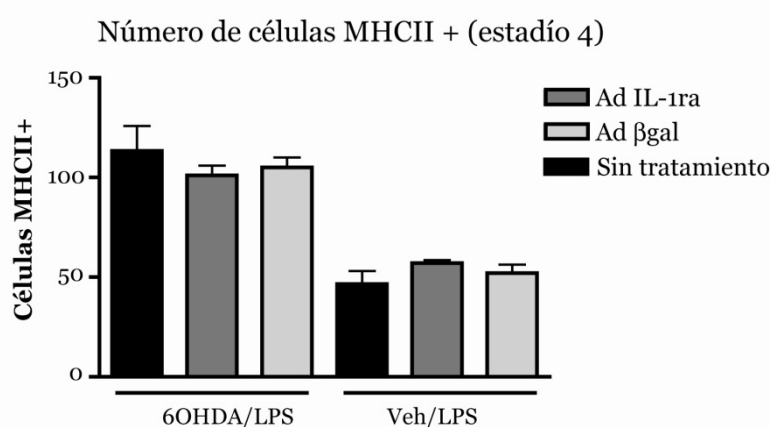


Figura III.5: Cuantificación de las células MHCII positivas correspondientes al estadio 4 de activación a lo largo de la SN en los distintos grupos experimentales.

Se contaron las células MHCII+ (estadio 4) a lo largo de toda la SN a los 24 días luego de los distintos tratamientos. N=3-4 por grupo.

III.3 Sobre-expresión de la IL-1 β en la vía nigroestriatal.

Diferentes trabajos han estudiado el efecto de una única inyección de IL-1 β en la SN, encontrando que la inyección aguda de esta citoquina no produce muerte neuronal (Castaño, Herrera et al., 2002; Depino, Ferrari et al., 2005). Sin embargo, resultados de nuestro laboratorio demostraron que la inyección en la SN de un adenovector que expresa IL-1 β humana durante tiempos prolongados produce un aumento de la neurodegeneración en esta misma región (Ferrari, Pott Godoy et al., 2006). En dicho estudio la inyección del adenovector que expresa IL-1 se realizó directamente en la SN, zona muy sensible a los estímulos proinflamatorios por su alta densidad en microglía (Lawson, Perry et al., 1990). Por lo tanto, no podemos descartar que la cirugía en la SN haya provocado un efecto inflamatorio aditivo a la expresión de IL-1 β en esta misma región.

Diversos estudios han demostrado que los adenovectores producen la expresión retrógrada de su transgén desde las terminales axónicas hacia el soma neuronal (Ridoux, Robert et al., 1994; Peltekian, Garcia et al., 2002; Tsukamoto, Yamamoto et al., 2003). Esta herramienta es de gran valor para expresar la IL-1 selectivamente en la SN sin afectar esta zona con cirugías y de esta manera, poder evaluar el rol directo de esta citoquina en el proceso neurodegenerativo de la SN.

Hipotetizamos que la inyección del adenovector que expresa IL-1 β humana (hIL-1 β) en el estriado ventrolateral (región inervada principalmente por la SN) resultaría en la expresión retrógrada de IL-1 en la SN y de esta manera, podríamos estudiar su efecto sobre las neuronas dopaminérgicas de la SN sin

involucrar en este fenómeno a la acción mecánica producida por la cirugía en esta región.

Para evaluar esta hipótesis, ratas Wistar macho adultas fueron inyectadas con $5 \cdot 10^7$ partículas de AdIL-1 en la región del cuerpo estriado inervado por las neuronas de la SN (Figura III.6). Como control se inyectaron animales con la misma cantidad de partículas del adenovector control que expresa el gen de la beta-galactosidasa (Ad β gal) (Figura III.6).

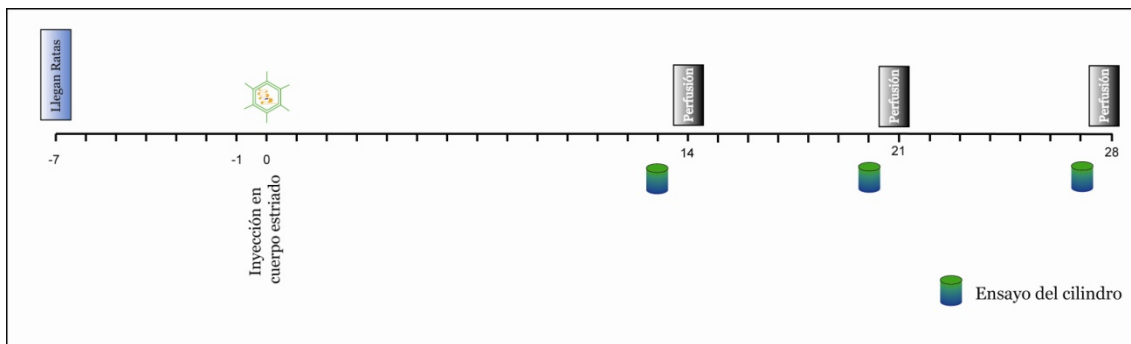


Figura III.6: Protocolo de trabajo que muestra los días de inyección estereotáxica de AdIL-1 o Ad β gal en el cuerpo estriado y los días de perfusión de los animales. Así también, se muestran los días de realización del ensayo del cilindro.

Los grupos experimentales se dividieron en:

- Ratas inyectadas con el AdIL-1 en el estriado y perfundidas a los 14, 21 ó 28 días post-inyección.
- Ratas inyectadas con el Ad β gal en el estriado y perfundidas a los 14, 21 ó 28 días post-inyección.

Como mostramos anteriormente, se estudió la distribución de los vectores adenovirales con la reacción enzimática de la β -galactosidasa utilizando un sustrato de la enzima (x-gal) que da como resultado un color azul (ver Materiales y Métodos, sección 8.2). Como ambos vectores (AdIL-1 y Ad β gal) comparten la cápside viral, se espera que tengan la misma distribución y

tropismo. La expresión del transgén control fue observada 1.72mm a lo largo de la SN (Figura III.7).

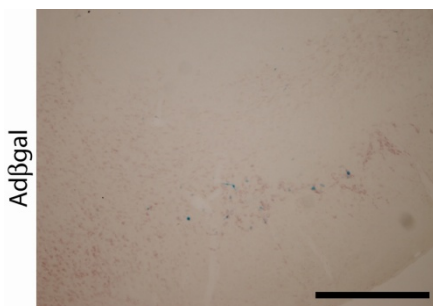


Figura III.7: Análisis de la expresión del transgén de la β galactosidasa en la SN.

Reacción de x-gal en la SN de animales inyectados con Ad β gal en el cuerpo estriado. Foto representativa de la reacción de x-gal. Se observa en azul el resultado de la reacción de color. Contraintinción: rojo neutro

Barra de escala: 500 μ m

Se evaluaron el porcentaje de neuronas dopaminérgicas remanentes, el comportamiento motor y la inflamación en cada grupo experimental.

III.3.1 Efectos de la administración de 5.10^7 partículas infectivas de AdIL-1 en el cuerpo estriado sobre la expresión de IL-1 β en la vía nigroestriatal.

La inyección de AdIL-1 en el cuerpo estriado indujo una expresión endógena de IL-1 β (rIL-1 β) tanto en el cuerpo estriado como en la SN.

Con el fin de detectar la presencia de IL-1 β endógena (rIL-1 β) en la vía nigroestriatal, se realizó la detección de la misma con la técnica de ELISA. La inyección del AdIL-1 en el cuerpo estriado produjo una expresión endógena de IL-1 β (rIL-1 β) en el sistema nigroestriatal. La expresión de rIL-1 β en el estriado presentó un pico de expresión significativo a los 21 días post-inyección (125 pg rIL-1 β /mg prot) que luego disminuyó a 68.49 pg rIL-1 β /mg prot a los 28 días

post-inyección ($p < 0.05$ comparando AdIL-1 vs Ad β gal el día 21, Figura III.8). El perfil de expresión de rIL-1 β fue similar en la SN, encontrándose también un pico de expresión significativo a los 21 días (78.04 pg rIL-1 β /mg prot) que disminuyó hacia el día 28 post-inyección a 35.57 pg rIL-1 β /mg prot ($p < 0.05$ comparando AdIL-1 vs Ad β gal el día 21, Figura III.8).

Los animales inyectados con el adenovector control (Ad β gal) evidenciaron una expresión basal de rIL-1 β tanto en el estriado como en la SN a los tiempos estudiados (Figura III.8).

En resumen, este tratamiento resultó en la expresión endógena de rIL-1 β en la SN sin afectar la zona con ninguna cirugía esterotáxica.

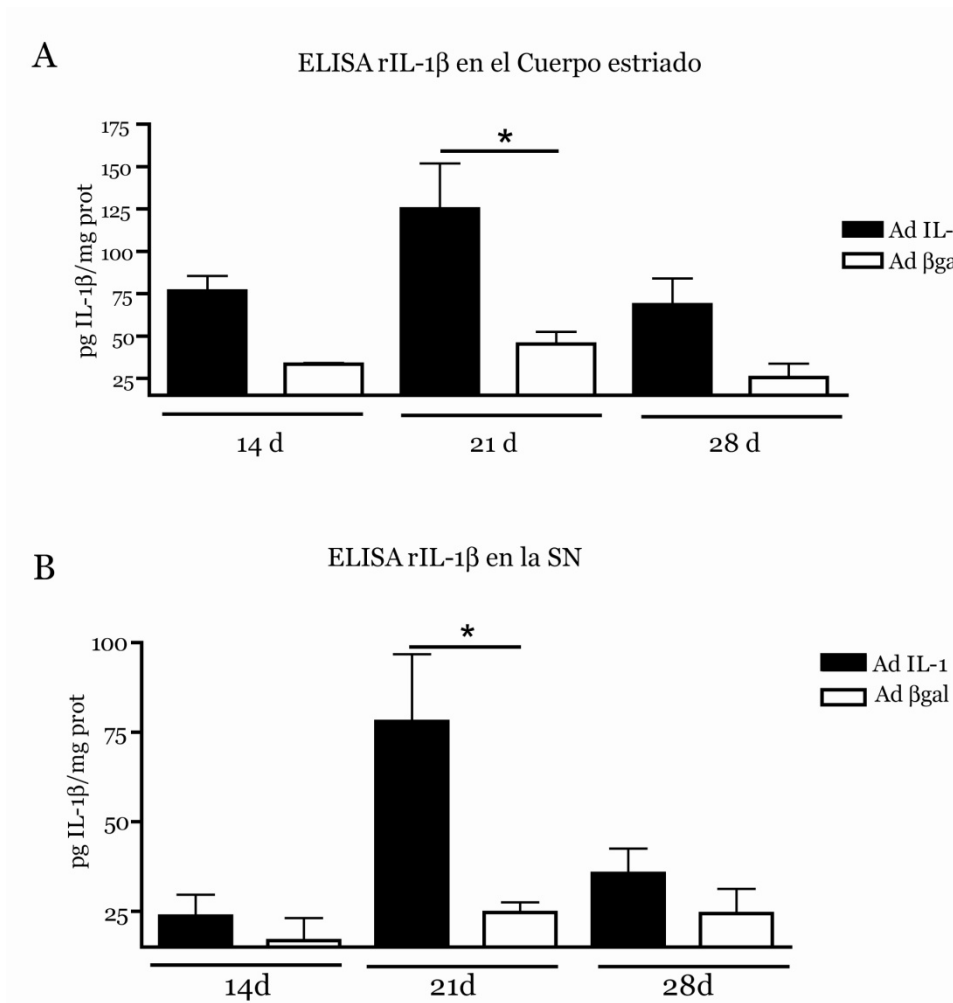


Figura III.8: Análisis de la expresión de IL-1 β en la vía nigroestriatal en lo distintos grupos experimentales por ELISA.

A) Perfil de expresión de los niveles de rIL-1 β en el cuerpo estriado a los 14, 21 y 28 días después de la inyección de AdIL-1 o su control (Ad β gal) por ELISA. Se realizó un ANOVA de dos factores (tratamiento – tiempo) resultando la interacción doble no significativa ($p > 0.05$). Se encontró el factor tratamiento significativo ($p < 0.05$). Se realizó el test Fisher DMS como test a posteriori. * $p < 0.05$ comparando AdIL-1 vs Ad β gal 21 días post-inyección. B) Perfil de expresión de los niveles de IL-1 β en la SN a los 14, 21 y 28 días después de la inyección de AdIL-1 o su control (Ad β gal) por ELISA. Se realizó un ANOVA de dos factores (tratamiento – tiempo) resultando la interacción doble no significativa, encontrándose el factor tratamiento significativo ($p < 0.05$). Se realizó el test Fisher DMS como test a posteriori. * $p < 0.05$ comparando AdIL-1 vs Ad β gal 21 días post-inyección. N= 5-6 por grupo.

El análisis inmunohistoquímico confirmó la presencia de células rIL-1 β (IL-1 β endógena de rata) positivas ramificadas en la SN sólo a los 21 días post-inyección del AdIL-1 en el cuerpo estriado (Figura III.9 A). Además, se observaron células hIL-1 β (IL-1 β humana – transgén del adenovector inyectado) positivas en la SN a los 14 y 21 días post-inyección del AdIL-1 indicando la expresión del transgén en la SN (Figura III.9 B y C).

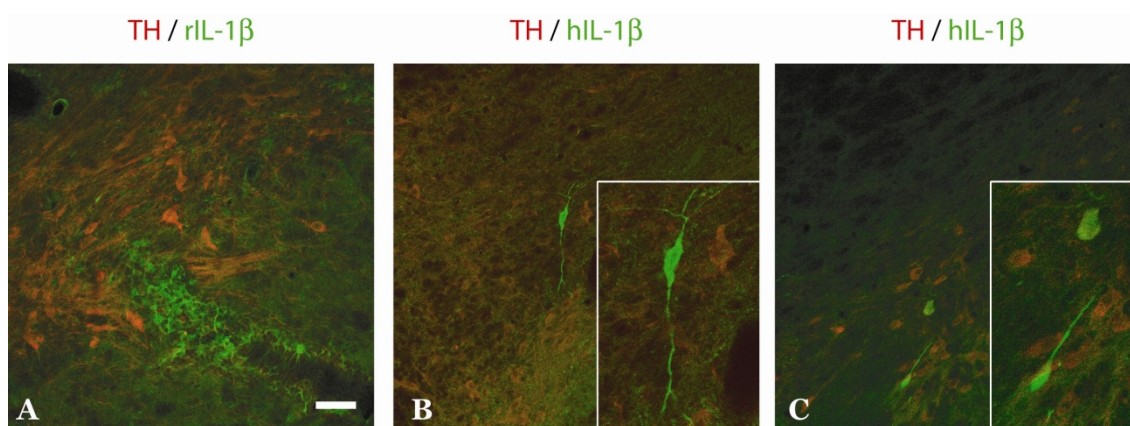


Figura III.9: Inmunofluorescencia contra células rIL-1 β + o hIL-1 β + (verde) / células dopaminérgicas (rojo) en la SN.

Se analizaron los cortes de la SN de los animales inyectados con AdIL-1 en el cuerpo estriado a los 14 y 21 días post-inyección. A. Se observan células ramificadas y numerosos procesos rIL-1 β positivos en la SN a los 21 días post-inyección. B-C) Se observan células hIL-1 β + en la SN a los 14 y 21 días post-inyección. Barra de escala: 50 μ m

III.3.2 Efectos de la administración de $5 \cdot 10^7$ partículas infectivas de AdIL-1 en el cuerpo estriado sobre la neurodegeneración en la SN.

La inyección de AdIL-1 en el cuerpo estriado causó neurodegeneración de las células dopaminérgicas en la SN a los 21 días y se mantuvo hasta los 28 días post-inyección.

La expresión de rIL-1 β en la vía nigroestriatal indujo una pérdida progresiva de células dopaminérgicas TH+ en la SN en comparación con los animales inyectados con el adenovector control (Ad β gal) (Figura III.10).

No se detectaron diferencias significativas en el número de neuronas TH+ en los animales tratados con AdIL-1 con respecto a los animales control a los 14 días post-inyección. Por el contrario, se observó una disminución en el número de células TH+ en la SN de los animales tratados con AdIL-1 con respecto a los animales inyectados con el adenovector control (Ad β gal) a los 21 días y a los 28 días que alcanzó significancia estadística ($p < 0.001$ comparando AdIL-1 vs Ad β gal a los 21 y 28 días respectivamente, Figura III.10).

En resumen, la expresión endógena de rIL-1 β fue capaz de inducir la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SN. Este resultado demuestra que la expresión crónica de rIL-1 β *per se* es suficiente para producir la neurodegeneración de la SN.

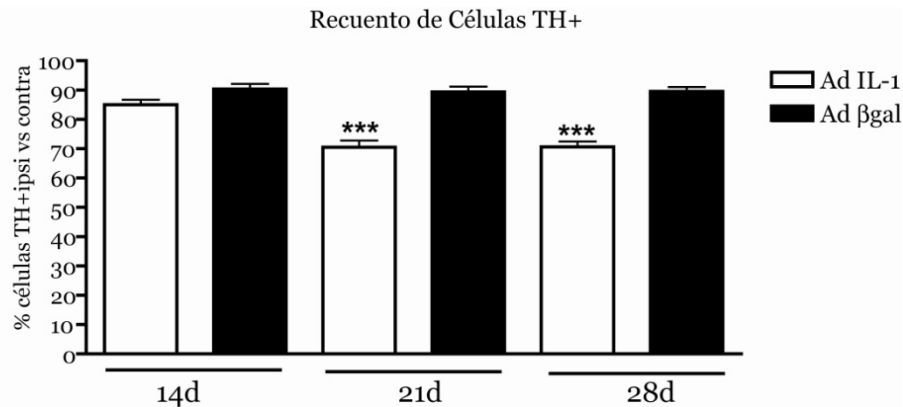


Figura III.10: Recuento de neuronas TH positivas en la SN de los distintos grupos experimentales.

Cuantificación de las células TH positivas como porcentaje de células del hemisferio ipsilateral versus el hemisferio contralateral a los 14, 21 y 28 días post inyección de AdIL-1 o Adβgal en el cuerpo estriado. Se realizó ANOVA de dos factores (estriado - tiempo) obteniéndose la interacción doble significativa ($p < 0,01$). La significación de las diferencias se analizó con el test de Fisher DMS. *** $p < 0,001$ diferencia significativa entre el grupo tratado con AdIL-1 y el grupo control (Adβgal) a los 21 y 28 días. N=3-5 por grupo

III.3.3 Efectos de la administración de $5 \cdot 10^7$ partículas infectivas de AdIL-1 en el cuerpo estriado sobre el comportamiento motor.

La inyección de AdIL-1 en el cuerpo estriado causó la detección de síntomas motores en ese grupo experimental a los 21 y 28 días post-inyección.

Con el fin de evaluar el comportamiento motor y la integridad de la vía nigroestriatal, se realizó el ensayo del cilindro (ver Materiales y métodos, sección 7.2).

Como mencionamos en el capítulo I, este ensayo evalúa la asimetría en el uso de los miembros delanteros que se pone de manifiesto en animales con hemiparkinsonismo (Johnson, Schallert et al., 1999).

Se observó una dificultad para tocar las paredes del cilindro con la pata contralateral a la lesión en los animales tratados con el AdIL-1 a los 21 y 28 días

post-inyección que alcanzó significancia estadística ($p < 0.01$ comparando ambas patas en el grupo inyectado con el AdIL-1 a los 21 y 28 días, Figura III.11). No se observaron diferencias significativas a los 14 días post-inyección (Figura III.11). Los animales que fueron inyectados con el adenovector control (Ad β gal) en el cuerpo estriado no presentaron diferencias en el uso de los miembros delanteros (Figura III.11). En resumen, los animales tratados con AdIL-1 presentaron asimetría en el uso de los miembros delanteros (Figura III.11).

En conclusión, este ensayo nos permitió detectar las dificultades motoras de los distintos grupos experimentales haciendo perceptible la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SN en el grupo tratado con el AdIL-1.

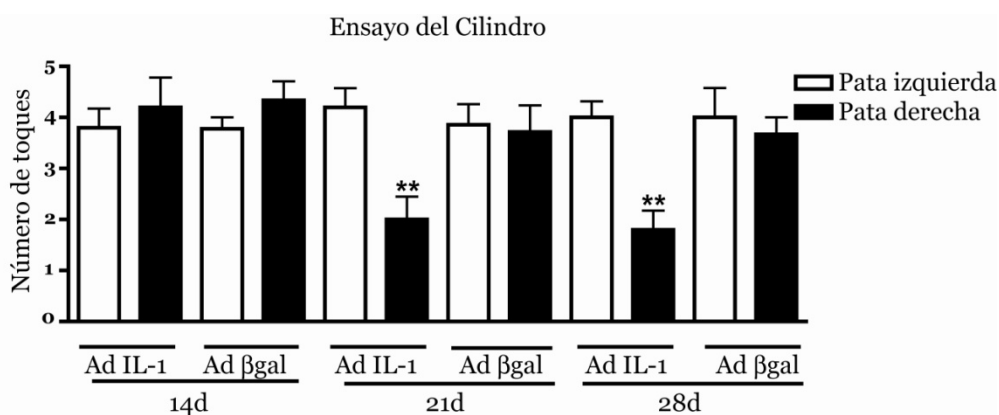


Figura III.11: Ensayo del cilindro realizado a los 14, 21 y 28 días posteriores a la inyección de AdIL-1 o su control (Ad β gal) en el cuerpo estriado.

Se cuantificaron los toques realizados sobre las paredes del cilindro para cada una de las patas de los animales correspondientes a los distintos grupos experimentales. Se realizó un ANOVA de tres factores (estriado- tiempo –pata) y la interacción triple resultó significativa ($p < 0.05$). La significación de las diferencias se analizó con el test de Fisher MDS. ** $p < 0,01$ diferencia significativa entre ambas patas del grupo inyectado con AdIL-1 a los 21 y 28 días. N=6-9 por grupo.

III.3.4 Efectos de la administración de $5 \cdot 10^7$ partículas infectivas de AdIL-1 en el cuerpo estriado sobre la inflamación de la SN.

La inyección de AdIL-1 en el cuerpo estriado produjo un moderado infiltrado inflamatorio y la observación de estadios avanzados de activación de la microglía en la SN.

- Presencia de infiltrado inflamatorio.

Se analizó la presencia de infiltrado inflamatorio con la tinción de Nissl en cortes histológicos correspondientes a cada grupo experimental.

Los animales inyectados con AdIL-1 presentaron infiltrado inflamatorio localizado exclusivamente en la SN (Figura III.12 A y B). Algunos animales evidenciaron vasodilatación y presencia de macrófagos en el área tegmental ventral (VTA). Se observó escaso infiltrado inflamatorio en la SN 14 días post-inyección del AdIL-1 mientras que a los 21 días post-inyección se evidenció un área de inflamación mayor en la misma región (Figura III.12 C). El infiltrado inflamatorio consistió principalmente en macrófagos pero también se observaron algunos neutrófilos (Figura III.12 E, F, G y H). El infiltrado se observó tanto en el parénquima como en los vasos sanguíneos (Figura III.12 F, G y H). Estos últimos se encontraban dilatados y llenos de macrófagos marginales y escasos neutrófilos (Figura III.12 C, E, G y H). A los 28 días post-inyección, se observó un escaso infiltrado inflamatorio junto con una leve vasodilatación indicando un principio de resolución de la inflamación en la SN (Figura III.12 D).

No se observó infiltrado inflamatorio en los animales tratados con el adenovector control (Ad β gal) a los tiempos estudiados (Figura III.12 A y B).

En resumen, la expresión endógena de rIL-1 β produjo el reclutamiento de monocitos/macrófagos y de neutrófilos en la SN ipsilateral.

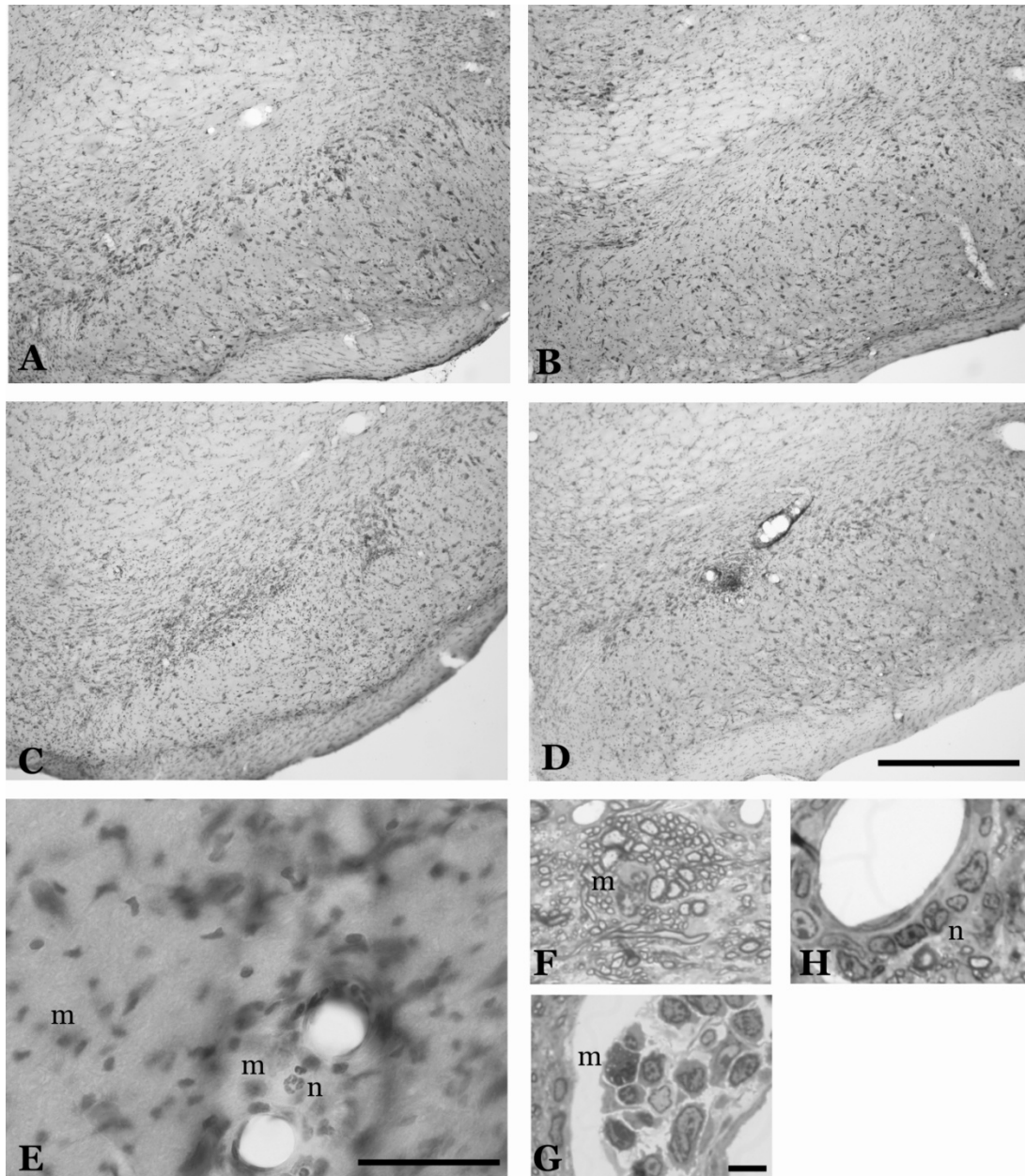


Figura III.12: Análisis del infiltrado inflamatorio en la SN de los animales inyectados con el AdIL-1 o con el adenovector control (Ad β gal) a los 21 ó 28 días post-inyección, observado con la tinción de Nissl y cortes semifinos

A-B) Animales inyectados con Ad β gal en el cuerpo estriado a los 21 y 28 días respectivamente. No se observó infiltrado inflamatorio en estos grupos experimentales.

C y E) Animales inyectados con AdIL-1 en el cuerpo estriado a los 21 días. Se observó infiltrado inflamatorio en todas las secciones, constituido principalmente por monocitos/macrófagos (m) y por algunos neutrófilos (n). F, G y H) Corte semifino de la SN ipsilateral de un animal representativo del grupo inyectado con el AdIL-1 en el cuerpo estriado a los 21 días. Se observa la presencia de un macrófago (m) en el parénquima (F) y de numerosos macrófagos (m) y algunos neutrófilos (n) en los vasos sanguíneos (G-H).

D) Animales inyectados con AdIL-1 en el cuerpo estriado a los 28 días. El infiltrado inflamatorio se evidencia sólo en algunas secciones. Barra de escala A-E: 500 μ m. Barra de escala F-H: 50 μ m.

- Activación de la microglía y de la astrogliá.

Se analizó la activación de la microglía y de la astrogliá con la inmunofluorescencia contra células MHCII+ y GFAP+. Los estadios morfológicos de activación de la microglía se analizaron por la unión a la lectina GSA1-B4 en la SN de cortes histológicos de cada grupo experimental.

Se observó activación de la microglía en la SN desde el día 14 hasta el día 28 post-inyección del AdIL-1 en el cuerpo estriado. Se observaron principalmente células GSA+ estadio 2 y 3 a los 14 días. Sin embargo, a los 21 días post-inyección se observaron células GSA+ estadio 4 en la SN alrededor de las células TH+ (Figura III.13 B). También se observaron células estadio 2 y 3 en la SN a este tiempo (Figura III.13 B). La activación de la microglía disminuyó a los 28 días post-inyección ya que a este tiempo sólo se evidenciaron células GSA+ estadio 2 y 3 en la SN. No se evidenciaron células estadio 4 en esta región a los 28 días (Figura III.13 C).

Los animales inyectados con el adenovector control (Ad β gal) evidenciaron una escasa activación de la microglía, sólo se observaron células GSA+ estadio 2-3 en una o dos secciones de la SN, especialmente a los 14 y 21 días post-inyección (Figura III.13 A).

La expresión de MHCII en la SN se evidenció a los 21 días post-inyección de AdIL-1 en el cuerpo estriado. La mayoría de las células MHCII+ pertenecían al estadio 4, sin embargo, también se observaron células estadio 2-3 (Figura III.13 E). La expresión de MHCII disminuyó a los 28 días post-inyección donde sólo se evidenciaron algunas células estadio 2-3 en la SN (Figura III.13 F). Por el

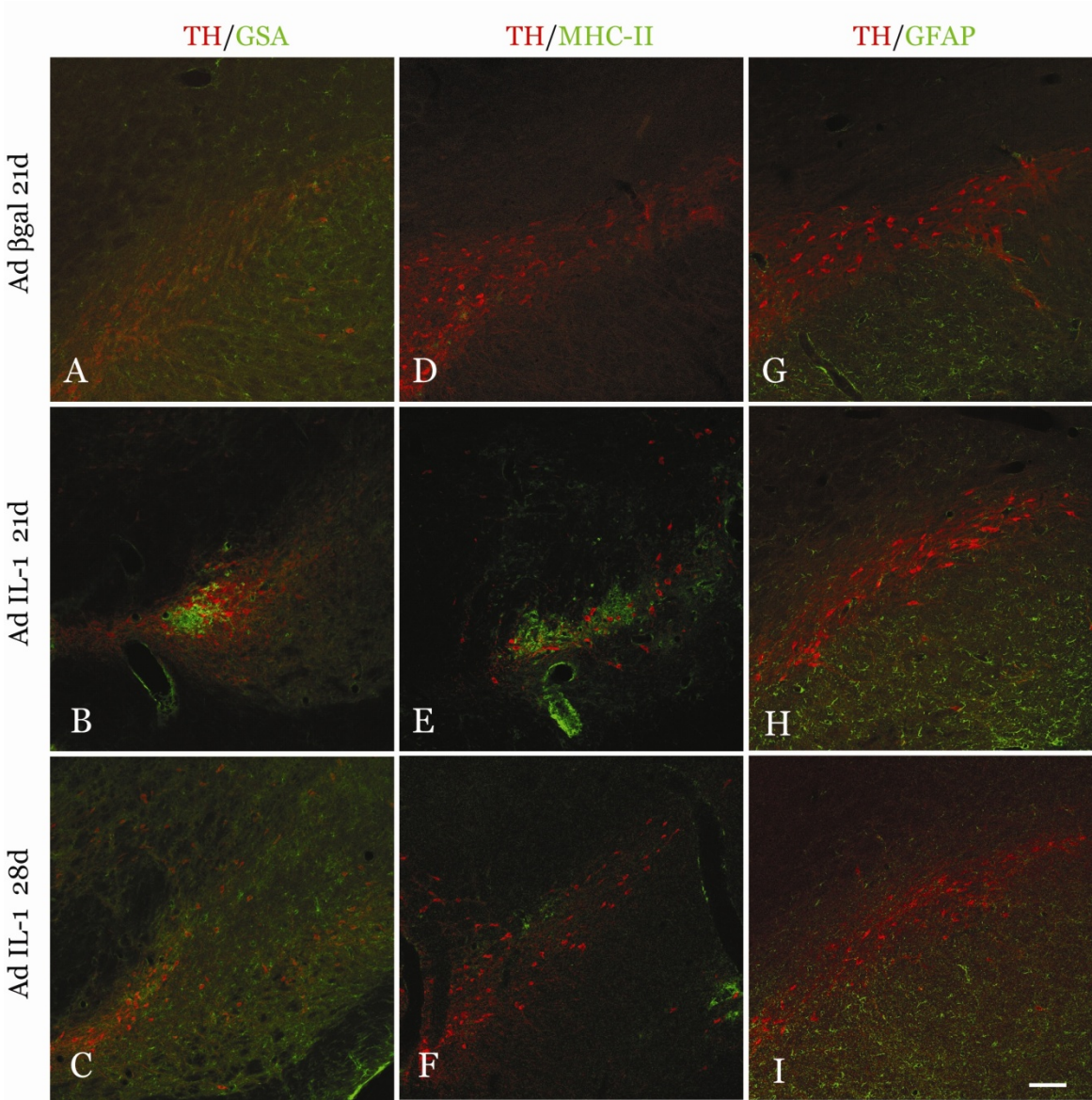
contrario, no se observaron células MHCII positivas en el grupo control (Ad β gal) a los tiempos estudiados (Figura III.13 D).

También se analizó la activación de la astrogliía a los tiempos estudiados. A los 21 días post-inyección de AdIL-1 en el cuerpo estriado se observaron células GFAP+ principalmente en las SN *pars reticulata* aunque también se evidenciaron escasas células GFAP+ en la SN *pars compacta* (Figura III.13 H). A los 28 días post-inyección de AdIL-1 se observaron células GFAP+ casi exclusivamente en la SN *pars reticulata* (Figura III.13 I). Los animales tratados con el adenovector control (Ad β gal) evidenciaron escasas células GFAP+ en la SN *pars reticulata* a los tiempos estudiados (Figura III.13 G).

En conclusión, se observó una marcada activación de la microglía (estadio 4 MHCII+) en la SN ipsilateral que coincidió temporalmente con el pico de expresión de rIL-1 β y con el inicio de la detección de la neurodegeneración y de los síntomas motores en el grupo inyectado con AdIL-1 en el cuerpo estriado.

Figura III.13: Activación de la microglía y astroglia en la SN luego de la inyección de AdIL-1 o su control (Adβgal) en el cuerpo estriado.

Análisis de la SN ipsilateral a las inyecciones mediante inmunofluorescencia contra células MHCII+ y GFAP+. Los estadios morfológicos de activación de la microglía se analizaron por la unión a la lectina GSA1-B4. A) Los animales inyectados con Adβgal no presentaron células GSA+ en la SN a los 21 días post-inyección. B) A los 21 días post-inyección del AdIL-1 se observaron células GSA+, principalmente estadio 4 en la SN (evidenciado por células TH+). C) Sólo se observaron células GSA+ estadio 2-3 en la SN a los 28 días post-inyección indicando una disminución de la activación de la microglía a este tiempo. D-F) Análisis de la expresión de MHCII (verde) en la SN identificada por las células TH+ (rojo). D) Los animales inyectados con el Adβgal no presentaron células MHCII+ a los 21 días post-inyección. E) Se observaron numerosas células MHCII + en la SN de los animales inyectados con el AdIL-1 en el cuerpo estriado a los 21 días. Se observaron principalmente células estadio 4, aunque células estadio 2-3 también se observaron en esta misma región. F) La expresión de MHCII disminuyó en la SN a los 28 días post-inyección. A este tiempo sólo se observaron células estadio 2-3. G-I) Activación de la astroglia en la SN. G) Se observaron células GFAP+ en la SN *pars reticulata* (pr) en los animales inyectados con el adenovector control a los 21 días post-inyección. H-I) Se evidenciaron células GFAP+ en la SN pr tanto a los 21 días como a los 28 días post-inyección. A los 21 días post-inyección se observó una leve marca GFAP+ en la SN *pars compacta* (pc). Barra de escala 100µm.



III.4 Tratamiento con Dexametasona (DXM).

El tratamiento con DXM consistió en la inyección de una dosis intraperitoneal (ip) de $10^{-8}M$ a todos los grupos experimentales (AdIL-1 y Ad β gal) en forma diaria y matinal a partir del día de la inyección estereotáxica en el cuerpo estriado (Figura III.14).

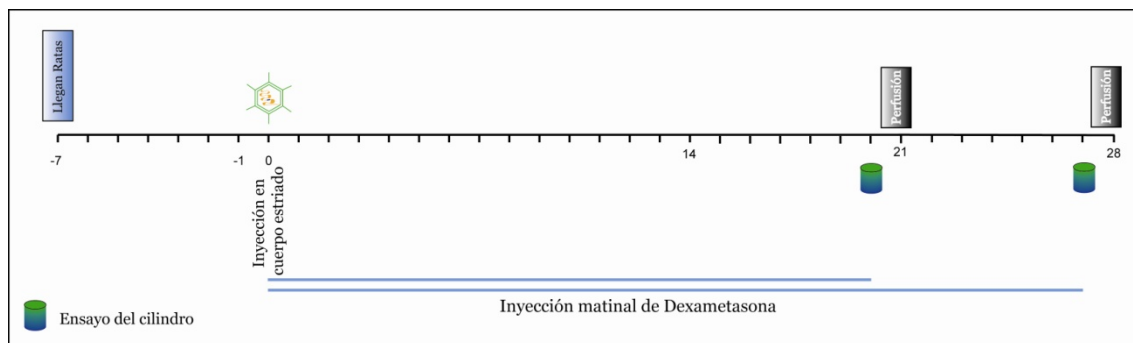


Figura III.14: Protocolo de trabajo que muestra los días de inyección estereotáxica de AdIL-1 o Ad β gal (control) en el cuerpo estriado. Así también, se muestran los días de administración de dexametasona en los diferentes grupos experimentales.

Los grupos experimentales se dividieron en:

- Ratas inyectadas con el AdIL-1 en el estriado, perfundidas a los 21 ó 28 días post-inyección y que recibieron el tratamiento anti-inflamatorio.
- Ratas inyectadas con el Ad β gal en el estriado, perfundidas a los 21 ó 28 días post-inyección y que recibieron el tratamiento anti-inflamatorio.

III.4.1 Efectos de la administración de dexametasona sobre la expresión de rIL-1 β en la vía nigroestriatal.

La expresión endógena de IL-1 β (rIL-1 β) disminuyó tanto en el cuerpo estriado como en la SN a los 21 y 28 días luego de la administración de DXM.

La inyección de DXM produjo una disminución significativa de la expresión endógena de rIL-1 β en el sistema nigroestriatal cuando se lo comparó con los

animales no tratados. La expresión de rIL-1 β (IL-1 β endógena) en el estriado disminuyó de 125 pg rIL-1 β /mg prot a 42.56 pg rIL-1 β /mg prot a los 21 días post-tratamiento con DXM y de 68.49 pg rIL-1 β /mg prot a 37.43 pg rIL-1 β /mg prot a los 28 días post-tratamiento con DXM ($p < 0.001$ y $p < 0.05$ comparando el grupo tratado con AdIL-1+DXM vs el grupo AdIL-1-DXM a los 21 días y 28 días respectivamente, Figura III.15 A). De manera similar, el contenido endógeno de rIL-1 β en la SN disminuyó significativamente con el tratamiento con DXM de 78.04 ó 35.57 pg rIL-1 β /mg prot a niveles no detectables a los 21 ó 28 días respectivamente ($p < 0.001$ y $p < 0.05$ comparando el grupo tratado con AdIL-1+DXM vs el grupo AdIL-1-DXM a los 21 días y 28 días respectivamente, Figura III.15 B).

Los animales inyectados con el adenovector control (Ad β gal) mostraron niveles no detectables de rIL-1 β tanto en el cuerpo estriado como en la SN luego del tratamiento con DXM (Figura III.15 A y B).

Por lo tanto, podemos concluir que el tratamiento con DXM produjo una disminución en el perfil de expresión de rIL-1 β endógena en el sistema nigroestriatal.

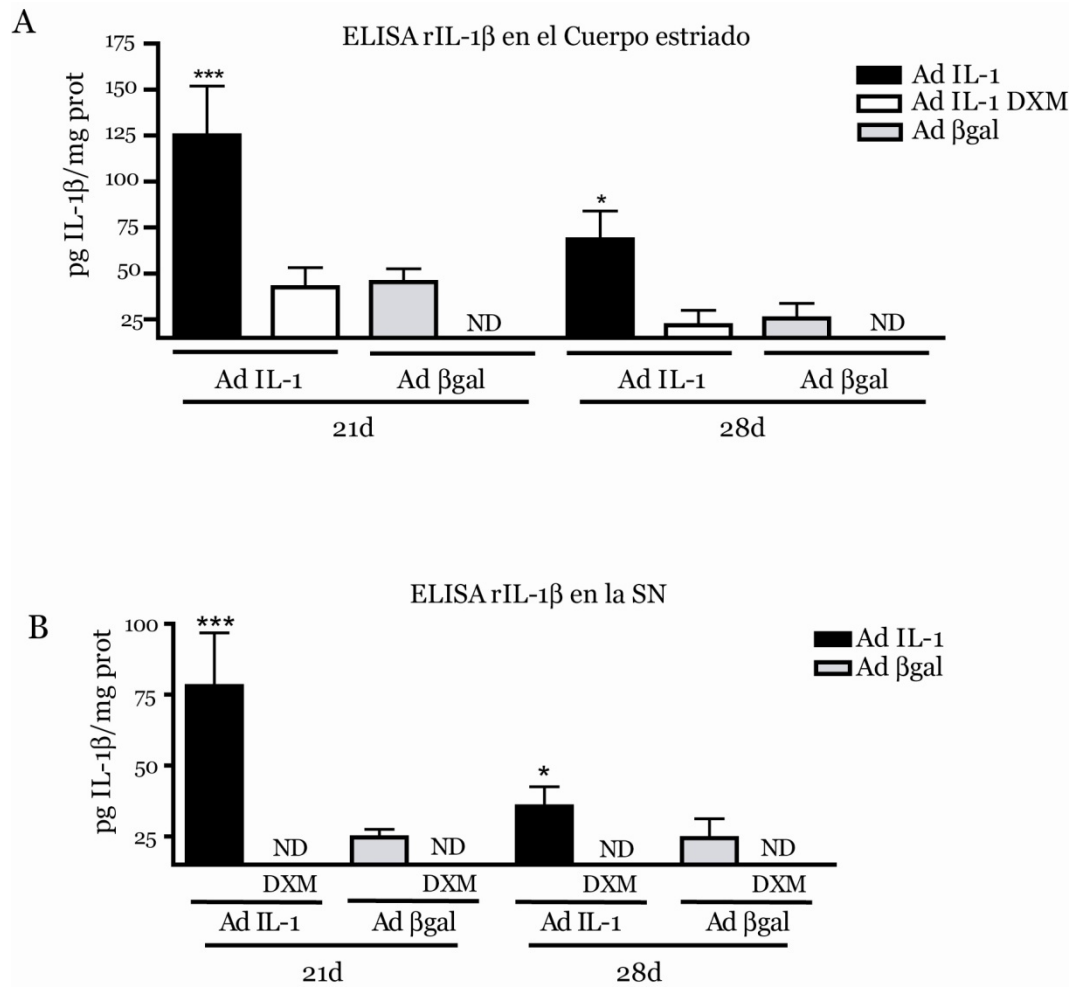


Figura III.15: Análisis de la expresión de la IL-1β en la vía nigroestriatal en los distintos grupos experimentales por ELISA.

A) Perfil de expresión de los niveles de IL-1β en el cuerpo estriado a los 14, 21 y 28 días después de la inyección de AdIL-1 o su control (Adβgal) por ELISA. Se realizó un ANOVA de tres factores (tratamiento – DXM - tiempo) resultando la interacción triple no significativa y encontrándose la interacción doble (tratamiento – DXM) significativa ($p < 0,05$). La significación de las diferencias se analizó con el test de Fisher DMS. *** $p < 0,001$ comparando AdIL-1+DXM vs AdIL-1-DXM a los 21 días post-inyección en el cuerpo estriado; * $p < 0,05$ comparando AdIL-1+DXM vs AdIL-1-DXM a los 28 días post-inyección. B) Perfil de expresión de los niveles de IL-1β en la SN a los 21 y 28 días después de la inyección de AdIL-1 o su control (Adβgal) por ELISA. Se realizó un ANOVA de tres factores (tratamiento – DXM - tiempo) resultando la interacción triple no significativa, encontrándose la interacción doble (tratamiento - DXM) significativa ($p < 0,05$). La significación de las diferencias se analizó con el test de Fisher DMS. *** $p < 0,001$ comparando AdIL-1+DXM vs AdIL-1-DXM a los 21 días post-inyección en el cuerpo estriado; * $p < 0,05$ comparando AdIL-1+DXM vs AdIL-1-DXM a los 28 días post-inyección. N= 5-6 por grupo. ND= no detectable

III.4.2 Efectos de la administración de dexametasona sobre la neurodegeneración en la SN.

La administración de DXM previno la neurodegeneración provocada por la inyección de una dosis de $5 \cdot 10^7$ partículas infectivas de AdIL-1 en el cuerpo estriado.

Los animales inyectados con AdIL-1 en el cuerpo estriado y tratados con DXM durante 21 ó 28 días evidenciaron un incremento significativo en el recuento de células dopaminérgicas TH+ alcanzando los valores obtenidos en los animales inyectados con el adenovector control (Ad β gal) ($p < 0.001$ comparando el grupo AdIL-1+DXM vs el grupo AdIL-1-DXM a los 21 y 28 días, Figura III.16). No se observaron diferencias significativas en el recuento de células TH+ en los animales inyectados con el Ad β gal y tratados con DXM por 21 ó 28 días (Figura III.16).

En conclusión, la administración de DXM provocó una disminución de la expresión endógena de rIL-1 β que se correlaciona con un aumento en el recuento de células TH+ en la SN.

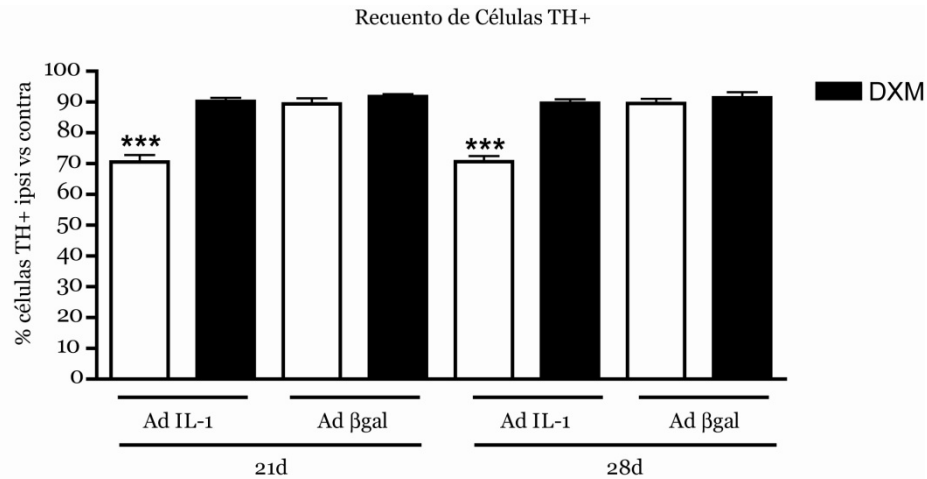


Figura III.16: Recuento de neuronas TH positivas en la SN luego del tratamiento con DXM en cada uno de los grupos experimentales.

Cuantificación de las células TH positivas como porcentaje de células del hemisferio ipsilateral versus el hemisferio contralateral a los 21 y 28 días en cada uno de los tratamientos. Se realizó un ANOVA de tres factores (tratamiento – tiempo - DXM) obteniéndose la interacción doble (tratamiento – DXM) significativa ($p < 0,01$). La significación de las diferencias se analizó con el test de Fisher DMS. *** $p < 0,001$ diferencia significativa entre AdIL-1+DXM vs AdIL-1-DXM en cada tiempo estudiado. N=3-5 por grupo

III.4.3 Efectos de la administración de dexametasona sobre el comportamiento motor.

La administración de DXM disminuyó los síntomas motores observados luego de la inyección de $5 \cdot 10^7$ partículas infectivas de AdIL-1 en el cuerpo estriado a los 21 y 28 días.

Dado que el ensayo del cilindro resultó adecuado para detectar diferencias en los animales correspondientes a los distintos grupos experimentales, decidimos evaluar los síntomas motores luego del tratamiento con DXM con el mismo ensayo comportamental.

Se observó un incremento significativo en el número de toques realizados con la pata contralateral a la lesión en los animales pertenecientes al grupo AdIL-

1+DXM alcanzando los valores obtenidos por los animales correspondientes al grupo control (Adβgal) ($p < 0.01$ comparando ambas patas del grupo tratado con el AdIL-1 tanto a los 21 como a los 28 días, Figura III.17). Los animales inyectados con el adenovector control (Adβgal) no mostraron cambios significativos en el número de pasos de ajuste después del tratamiento con DXM a los 21 ó 28 días post-inyección (Figura III.17).

Estos resultados evidenciaron que el tratamiento con DXM es capaz de prevenir los síntomas motores producidos por la inyección del AdIL-1 en el cuerpo estriado. Este resultado era esperable debido a la disminución de la expresión de rIL-1β en la vía nigroestriatal y al aumento del número de células dopaminérgicas observado en la SN luego del tratamiento con DXM.

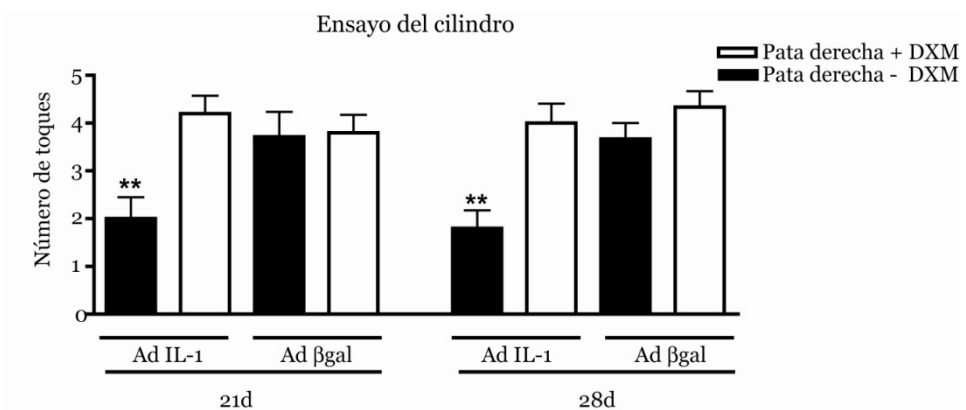


Figura III.17: Ensayo del cilindro realizado a los 21 y 28 días posteriores a la inyección de AdIL-1 o su control (Adβgal) en el cuerpo estriado.

Se cuantificaron los toques realizados sobre las paredes del cilindro con cada una de las patas de los animales correspondientes a los distintos tratamientos luego del tratamiento con DXM. Se realizó un ANOVA de tres factores (tratamiento - tiempo - DXM) resultando la interacción doble (tratamiento - DXM) significativa ($p < 0.05$). La significación de las diferencias se analizó con el test de Fisher DMS. $**p < 0,01$ diferencia significativa entre AdIL-1+DXM y AdIL-1-DXM a los 21 y 28 días post-inyección. N=5-9 por grupo

III.4.4 Efectos de la administración de dexametasona sobre la activación de la microglía.

La administración de DXM disminuyó la activación de la microglía en la SN de los animales inyectados con 5.10^7 partículas infectivas de AdIL-1 en el cuerpo estriado.

Se analizaron los estadios morfológicos de activación de la microglía por la unión a la lectina GSA1-B4 y la expresión de marcadores de superficie con la inmunofluorescencia para detectar células MHCII+ en cortes histológicos de los animales correspondientes a cada grupo experimental.

El tratamiento con DXM redujo notoriamente la activación de la microglía a los 21 días post-inyección del AdIL-1 en el cuerpo estriado. Sólo se observaron células GSA+ estadio 2-3 en la SN, no pudiendo detectarse células GSA+ estadio 4 a este tiempo (Figura III.18 B). A los 28 días post-inyección no se observó activación morfológica de la microglía y sólo se visualizaron células GSA+ estadio 1 (“en reposo”) (Figura III.18 C).

En cuanto a la expresión de MHCII en superficie luego del tratamiento con DXM, se evidenciaron células ramificadas MHCII+ correspondientes a los estadios 1 y 2 a los 21 días post-inyección de AdIL-1 en el cuerpo estriado (Figura III.18 E). No fue posible detectar la expresión de células MHCII+ a los 28 días post-inyección del AdIL-1 en el cuerpo estriado (Figura III.18 F).

Los animales inyectados con el adenovector control (Ad β gal) y tratados con DXM no evidenciaron cambios en los estadios morfológicos de activación ni en la expresión de MHCII en superficie (Figura III.18 A y D).

En conclusión, la ausencia de células microgliales estadio 4 MHCII+ junto con la disminución de la neurodegeneración observada y la reducción de los síntomas motores observados, indicaría un rol funcional de este fenotipo microglial (estadio 4 MHCII+) en la neurodegeneración mediada por la producción endógena de rIL-1 β observada en este modelo.

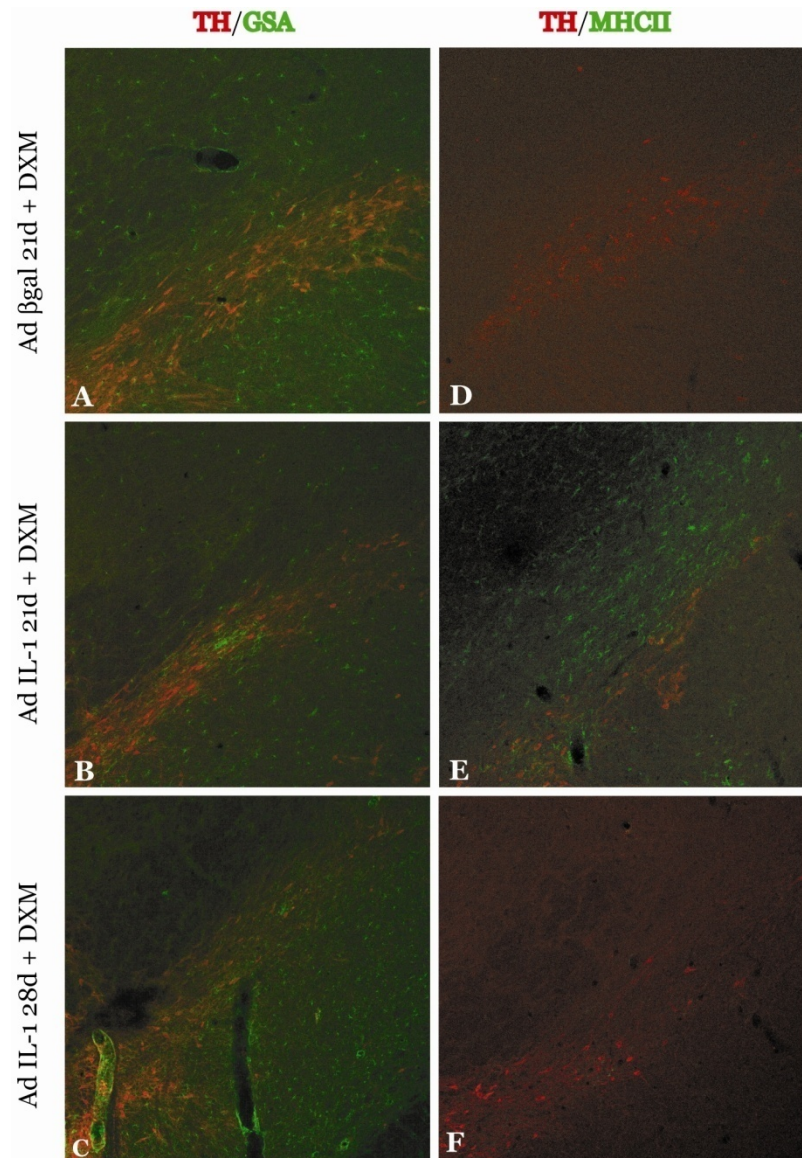


Figura III.18: Activación de la microglía en la SN luego del tratamiento con DXM en los distintos grupos experimentales.

Análisis de la SN ipsilateral a los 21 y 28 días posteriores a las inyecciones mediante inmunofluorescencia contra células MHCII+. Los estadios morfológicos de activación de la microglía se analizaron por la unión a la lectina GSA1-B4. A) Los animales inyectados con Ad β gal no evidenciaron células GSA+ a los 21 días post-inyección. B) A los 21 días post-inyección del AdIL-1 se observaron células GSA+ correspondientes a los estadio 2 y 3 de activación morfológica en la SN (evidenciado por células TH+). C) Sólo se observaron células GSA+ estadio 1 en la SN a los 28 días post-inyección del AdIL-1 en el cuerpo estriado. D-F) Análisis de la expresión de MHCII (verde) en la SN identificada por las células TH+ (rojo). D) Los animales inyectados con el Ad β gal no presentaron células MHCII+ a los 21 días post-inyección. E) Se observaron escasas células ramificadas MHCII+ en la SN de los animales inyectados con el AdIL-1 en el cuerpo estriado a los 21 días. Sólo se observaron células estadio 1-2 en la SN en este tiempo. F) No se observaron células MHCII+ a los 28 días post-inyección del AdIL-1 en el cuerpo estriado. Barra de escala 100 μ m.

III.5 Efectos de la administración de un estímulo pro-inflamatorio periférico sobre la neurodegeneración mediada por la inyección de AdIL-1 en el cuerpo estriado.

Como mencionamos en la introducción, las citoquinas circulantes y los mediadores inflamatorios que se producen en la periferia pueden impactar en el cerebro por diferentes rutas, pueden actuar directamente en el cerebro a través de los órganos circunventriculares (Blatteis, 1992), inducir la síntesis de citoquinas en el cerebro (Besedovsky and del Rey, 1996; Pitossi, del Rey et al., 1997) o actuar sobre el sistema nervioso autónomo a través del nervio vago (Tracey, 2002). Existe evidencia que sugiere que la inflamación periférica contribuye a la progresión de las enfermedades neurodegenerativas como en la enfermedad de prion. El grupo de Perry demostró recientemente, en un modelo de prion, que un estímulo proinflamatorio central o periférico, aumenta la síntesis de IL-1 β en el cerebro y exacerba la neurodegeneración en este modelo (Cunningham, Wilcockson et al., 2005).

Por otro lado, la población con EP sufre infecciones a repetición y finalmente una alta proporción de ellos fallecen como causa de infecciones del tracto urinario y de las vías respiratorias (Beyer, Herlofson et al., 2001).

Debido a estos antecedentes, resulta de gran interés evaluar si la inflamación periférica podría contribuir a la progresión de la neurodegeneración en este modelo inflamatorio de EP.

Para evaluar esta hipótesis, se procedió a la inyección endovenosa (iv) de $3,96 \cdot 10^9$ partículas infectivas del AdIL-1 en una de las venas laterales de la cola

de ratas Wistar macho adultas (Figura III.20). Estudios previos del laboratorio demostraron que esta dosis produce efectos en la periferia evidenciado como un aumento significativo del recuento leucocitario a los 5 días post-inyección endovenosa del AdIL-1 ($p < 0.05$) (Figura III.19).

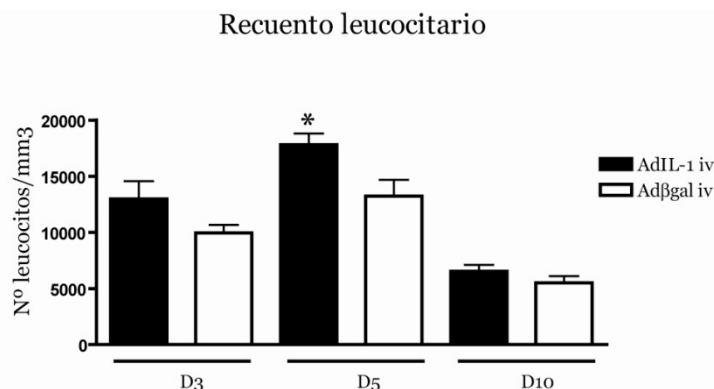


Figura III.19: Recuento leucocitario de sangre periférica a los 3, 5 ó 10 días luego de la inyección intravenosa del AdIL-1 o del adenovector control (Adβgal).

Se observó un aumento significativo en el número de leucocitos en sangre periférica en los animales tratados con AdIL-1 iv con respecto a los animales inyectados con Adβgal a los 5 días post-inyección. Se realizó un ANOVA de dos factores y la significación de las diferencias se analizó con el test de Fisher DMS. * $p < 0.05$ comparando los animales inyectados con AdIL-1 con los animales tratados con Adβgal a los 5 días post-inyección iv. Datos no publicados aportados por Rodolfo Tarelli.

Por lo tanto, se decidió realizar la inyección endovenosa el día 16 post-cirugía estereotáxica para alcanzar el máximo de expresión el día 21, día donde se observó la mayor neurodegeneración en este modelo de EP (Figura III.20).

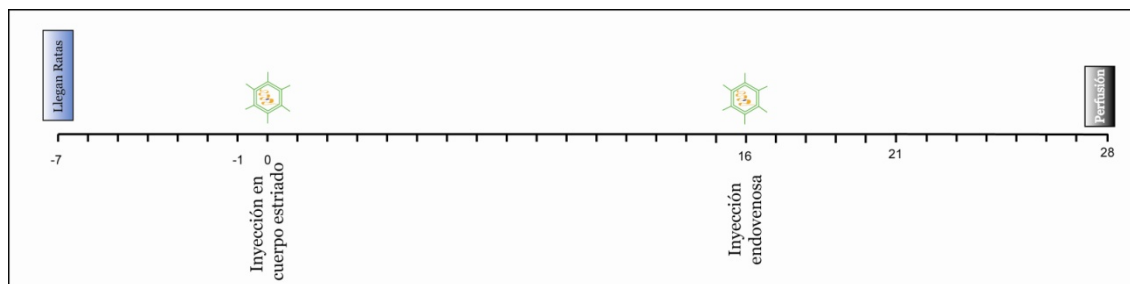


Figura III.20: Protocolo de trabajo que muestra el día de inyección estereotáxica de AdIL-1 en el cuerpo estriado y el día de inyección endovenosa (iv) del AdIL-1 o del adenovector control (Ad β gal).

Los grupos experimentales se dividieron en:

- Ratas inyectadas con AdIL-1 en el estriado y con AdIL-1 iv (AdIL-1/AdIL-1 iv).
- Ratas inyectadas con AdIL-1 en el estriado y con Ad β gal iv (AdIL-1/Ad β gal iv).

III.5.1 Efectos de la inyección periférica de AdIL-1 sobre la neurodegeneración en la SN.

La inyección endovenosa del AdIL-1 en los animales inyectados previamente con el AdIL-1 en el cuerpo estriado causó la exacerbación de la neurodegeneración de las células dopaminérgicas en la SN.

Con el fin de evaluar el grado de neurodegeneración en estos grupos experimentales, se realizó el recuento de células dopaminérgicas TH+ en la SN.

Se observó una disminución en el número de células TH+ en la SN de los animales tratados con AdIL-1/AdIL-1 iv en comparación con los animales inyectados periféricamente con el adenovector control (AdIL-1/Ad β gal iv) que alcanzó significancia estadística ($P < 0.001$ comparando AdIL-1/AdIL-1 iv vs AdIL-1/Ad β gal iv, Figura III.21).

Estos resultados muestran que, el estímulo pro-inflamatorio periférico fue capaz de impactar en la SN en degeneración produciendo la exacerbación de la neurodegeneración.

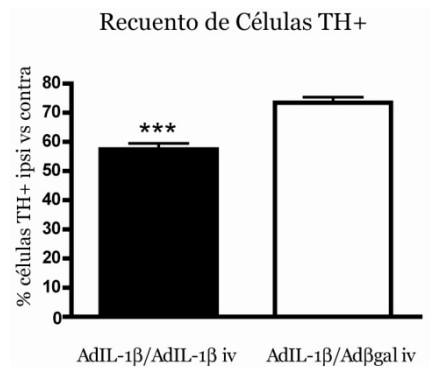


Figura III.21: Recuento de neuronas TH positivas en la SN de los animales correspondientes a los distintos grupos experimentales.

Cuantificación de las células TH positivas como porcentaje de células del hemisferio ipsilateral versus el hemisferio contralateral a los 28 días luego de cada uno de los tratamientos. La significación de las diferencias se analizó con el test de Student de diferencia de medias para muestras independientes. *** $p < 0.001$ comparando AdIL-1/AdIL-1 iv vs AdIL-1/Adβgal iv. N= 6-8 por grupo

III.5.2 Efectos de la inflamación periférica sobre la inflamación de la SN.

La inyección endovenosa del AdIL-1 en animales inyectados previamente con el AdIL-1 en el cuerpo estriado produjo un importante infiltrado inflamatorio y la observación de células pertenecientes al estadio 4 de activación morfológica de la microglía a lo largo de toda la SN.

- Presencia de infiltrado inflamatorio.

Se analizó la presencia de infiltrado inflamatorio con la tinción de Nissl en cortes histológicos correspondientes a cada grupo experimental.

El estímulo pro-inflamatorio periférico inyectado aumentó notoriamente la inflamación en la SN a los 28 días post-inyección central del AdIL-1. Esta respuesta inflamatoria fue mucho mayor que la observada en la SN al mismo tiempo pero sin el estímulo periférico (ver Figura III.12 D). Los animales inyectados con AdIL-1/AdIL-1 iv presentaron un infiltrado inflamatorio compuesto por algunos linfocitos pero principalmente por macrófagos distribuidos a lo largo de toda la SN (Figura III.22 B y C). En este grupo también se hizo evidente la presencia de cuerpos apoptóticos y vasodilatación en la SN (Figura III.22 B y C). Los animales inyectados periféricamente con el Ad β gal presentaron una respuesta inflamatoria similar a los animales inyectados sólo centralmente con el AdIL-1 al mismo tiempo (28 días) (Figura III.22 A). El infiltrado inflamatorio en este grupo experimental se encontró restringido a una o dos secciones de la SN y estaba compuesto por macrófagos y neutrófilos.

En resumen, el estímulo pro-inflamatorio periférico inyectado produjo la exacerbación de la inflamación central en la SN con un proceso de neurodegeneración evidente.

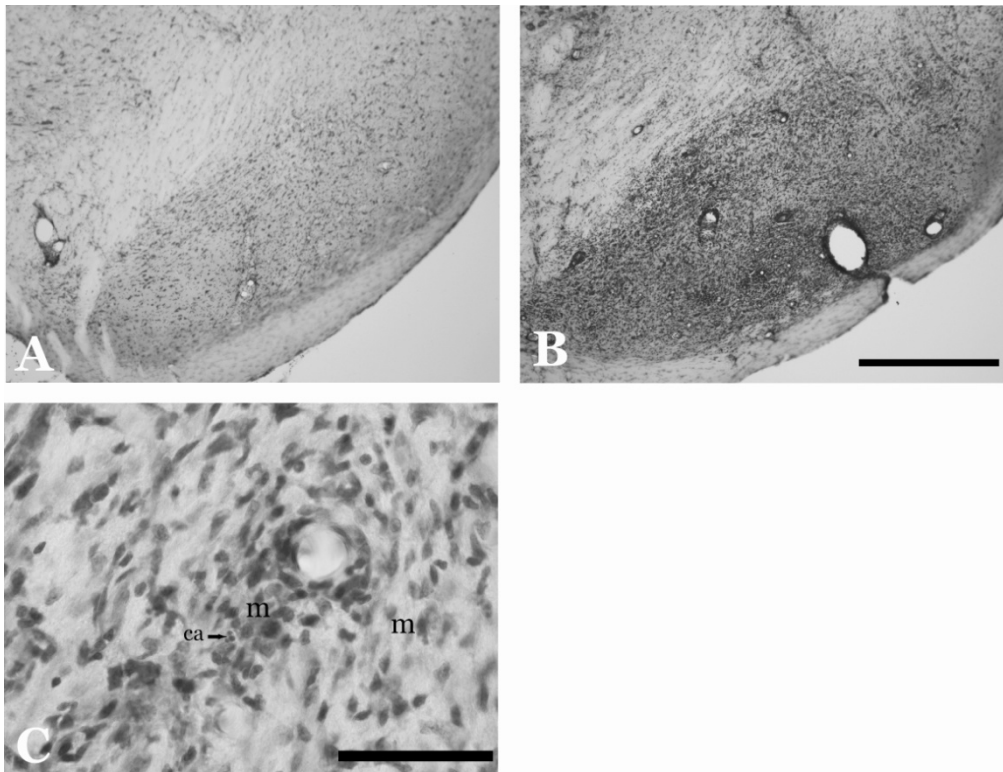


Figura III.22: Análisis del infiltrado inflamatorio en la SN de los animales inyectados con el AdIL-1 en el cuerpo estriado y con el AdIL-1 o su control (Ad β gal) en la vena de la cola.

A) Animales inyectados con AdIL-1 / Ad β gal iv a los 28 días. Se observó un infiltrado inflamatorio sólo en algunas secciones de la SN. B-C) Animales inyectados con AdIL-1 / AdIL-1 iv a los 28 días. El infiltrado inflamatorio se observó en toda la SN y estuvo compuesto principalmente por macrófagos (m). También se observó vasodilatación y cuerpos apoptóticos en este grupo experimental. Barra de escala (A-B): 500 μ m. Barra de escala C: 50 μ m

- Activación de la microglía.

Se analizaron los estadios morfológicos y la activación de la microglía con la inmunofluorescencia contra MHCII y por la unión a la lectina GSA1-B4 en la SN de cortes histológicos de cada grupo experimental.

El estímulo pro-inflamatorio inyectado aumentó notoriamente la activación de la microglía a los 28 días post-inyección del AdIL-1 en el cuerpo estriado. Se observaron numerosas células GSA+ en los animales inyectados con AdIL-

1/AdIL-1 iv. La mayoría de estas células pertenecían al estadio 4 de activación morfológica aunque también se observaron células correspondientes al estadio 2 y 3 en la SN y alrededor de esta región (Figura III.23 B). Los animales inyectados con el adenovector control periféricamente (AdIL-1/Ad β gal iv) también presentaron activación de la microglía en la SN, aunque en menor proporción. Si bien se observaron algunas células estadio 4, la mayoría de las secciones evidenciaron células correspondientes a los estadios 2 y 3 (Figura III.23 A).

En cuanto a la expresión del receptor de superficie MHCII, los animales correspondientes al grupo AdIL-1/AdIL-1 iv, evidenciaron principalmente células estadio 4 MHCII⁺ (Figura III.23 D). Aunque en menor proporción, también se observaron células MHCII⁺ estadio 2-3 alrededor de la SN (Figura III.23 D). Los animales inyectados con AdIL-1/Ad β gal iv evidenciaron escasas células ramificadas MHCII⁺ en la SN (Figura III.23 C).

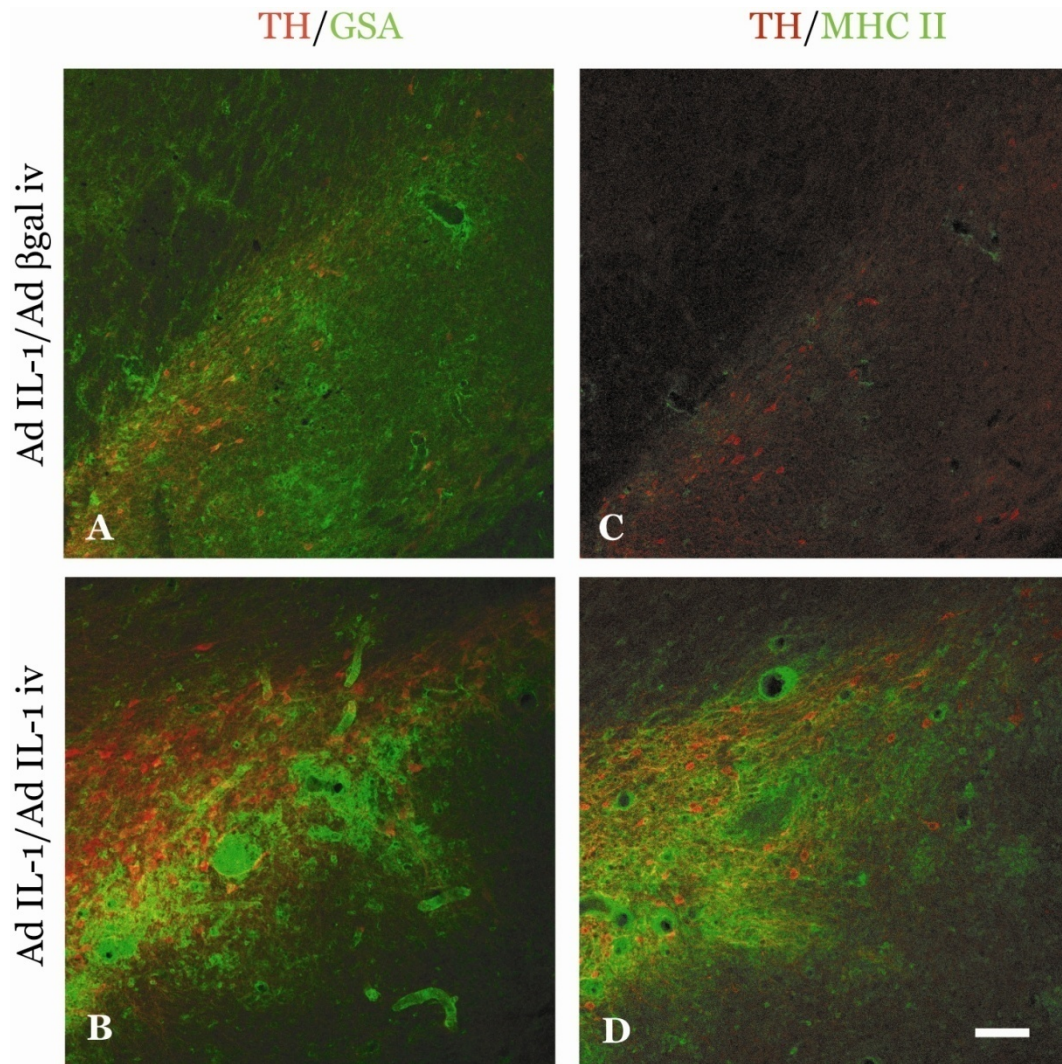


Figura III.23: Activación de la microglía en la SN luego de la inyección periférica del AdIL-1 o su control.

Análisis de la SN ipsilateral a los 28 días luego de cada uno de los tratamientos mediante inmunofluorescencia contra células MHCII+. Los estadios morfológicos de activación de la microglía se analizaron por la unión a la lectina GSA1-B4. A) Los animales inyectados con el Ad β gal como estímulo periférico evidenciaron células GSA+ (verde) estadios 2-3 principalmente. Se observaron también algunas células estadio 4. B) Los animales inyectados periféricamente con el AdIL-1 experimentaron un aumento de la activación de la microglía evidenciado como células GSA+ estadio 4 principalmente. C) Los animales correspondientes al grupo AdIL-1/Ad β gal iv, presentaron escasas células MHCII+ en la SN. D) Los animales inyectados con AdIL-1/AdIL-1 iv evidenciaron una fuerte expresión de células MHCII+, la mayoría de estas células correspondieron al estadio 4 de activación, mientras que células pertenecientes a los estadios 2-3 también fueron observadas alrededor de la SN. Barra de escala 100 μ m.

Finalmente se realizó la medición del volumen MHCII+ en los distintos grupos experimentales con el fin de observar diferencias en la expresión de este marcador.

Se encontró un aumento significativo del volumen MHCII+ en los animales inyectados periféricamente con el AdIL-1 con respecto a aquellos inyectados con el Adβgal iv ($p < 0.01$ comparando AdIL-1/AdIL-1 iv vs AdIL-1/Adβgal iv, Figura III.24).

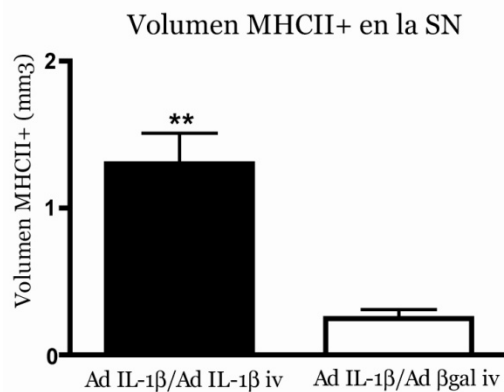


Figura III.24: Cuantificación de las células MHCII positivas a lo largo de la SN en los distintos grupos experimentales.

Se midió el volumen ocupado por las células MHCII+ a lo largo de toda la SN a los 28 días después de cada uno de los tratamientos. La significación de las diferencias se analizó con el test de Student de diferencia de medias para muestras independientes. $**p < 0.01$ comparando AdIL-1/AdIL-1 iv vs AdIL-1/Ad βgal iv. N= 6 por grupo

En conclusión, el estímulo pro-inflamatorio inyectado periféricamente fue capaz de exacerbar la activación de la microglía produciendo la adquisición del fenotipo de activación avanzado (estado 4 MHCII+). La presencia de este fenotipo coincidió con la exacerbación de la neurodegeneración observada en este grupo experimental (AdIL-1/AdIL-1 iv), indicando un posible rol funcional

tóxico de este tipo de activación de la microglía en la progresión de la neurodegeneración de la SN.

III.6 Conclusión

En este capítulo demostramos por dos estrategias distintas (la inhibición y la sobre-expresión) que la presencia de la IL-1 en la vía nigroestriatal está mediando los efectos sobre la neurodegeneración de la SN.

En la primera parte de este capítulo, evaluamos el rol de esta citoquina en el modelo de EP que consiste en la inyección de una neurotoxina (6OHDA) en el cuerpo estriado y de LPS en la SN 12 días más tarde. En este modelo observamos que la IL-1 β fue la única citoquina sobre-expresada, entre las principales citoquinas proinflamatorias estudiadas (Cap. I) y que el tratamiento con drogas anti-inflamatorias produjo la disminución de su expresión (Cap. II). En este capítulo demostramos que al bloquear la actividad biológica de la IL-1 β mediante la expresión de IL-1ra en la SN (inyección de AdIL-1ra en el MFB), obtuvimos un mayor recuento de neuronas dopaminérgicas en la SN. Como mencionamos anteriormente, la acción de la IL-1 β puede ser inhibida por el receptor antagonista de IL-1, IL-1ra, que bloquea la unión de IL-1 α y β al receptor tipo I, previniendo de esta manera la vía de señalización intracelular (Dinarello, 1996). Estos resultados proveen una fuerte evidencia de la participación de la IL-1 β sobre la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas ya que la inhibición de su acción produjo un efecto neuroprotector de dichas células en la SN. Por otro lado, la inhibición de la IL-1 no tuvo efectos sobre la activación de la microglía, sugiriendo de esta manera que la producción de IL-1 en la SN es un evento que ocurre río abajo de la activación de la microglía.

Claramente, el uso de esta estrategia nos permitió demostrar que la producción aumentada de IL-1 es la resultante de la combinación de los efectos de la 6OHDA y del LPS y que tiene un efecto perjudicial para las neuronas de la SN.

Por otro lado, en la segunda parte de este capítulo realizamos el estudio de la sobre-expresión de la IL-1 β , citoquina que encontramos responsable de mediar los efectos exacerbantes del LPS en el modelo anterior de EP. Demostramos que la expresión crónica de IL-1 β en la SN es capaz de inducir la neurodegeneración de las células dopaminérgicas y producir los síntomas motores y la activación de la microglía a estadios avanzados en la SN ipsilateral a la inyección del AdIL-1 intraestriatal. Además demostramos que el tratamiento con DXM fue efectivo en la protección de la neurodegeneración mediada por la IL-1 β . Por último y de gran interés, fue observar que la inflamación periférica fue capaz de exacerbar la neurodegeneración y la activación de la microglía de la SN en degeneración.

Este nuevo modelo nos permitió estudiar los efectos directos de la sobre-expresión de una única citoquina sin afectar la SN con ningún tipo de cirugía estereotáxica en la zona.

Así también, analizamos el perfil de inducción de la rIL-1 β tanto en el cuerpo estriado como en la SN, observando que el pico de inducción de rIL-1 β coincidió con los picos de neurodegeneración, de detección de síntomas motores y de máxima activación de la microglía.

La expresión crónica de rIL-1 β en la SN indujo una fuerte activación de la microglía que se evidenció una semana antes de que la neurodegeneración fuera estadísticamente significativa. El análisis de los estadios morfológicos de la microglía y la expresión de MHCII en superficie en este modelo sugieren que la

expresión crónica de rIL-1 β produjo la adquisición de un fenotipo avanzado de activación en estas células. Como mencionamos anteriormente, el pico de neurodegeneración observado en este modelo coincide con la presencia de este fenotipo por parte de la microglía (estado 4 MHCII+). Una vez más, observamos una correlación positiva entre la mayor neurodegeneración y el aumento de la expresión de MHCII, indicando una asociación de estos dos fenómenos (ver cap I y II).

Así también, observamos que los efectos de la IL-1 β pueden ser inhibidos por la terapia con drogas anti-inflamatorias, en este caso, la dexametasona. Observamos que este anti-inflamatorio fue capaz de reducir la inducción de la rIL-1 β en la vía nigroestriatal, disminuir la neurodegeneración, mitigar los síntomas motores y modular la adquisición del fenotipo avanzado de activación de la microglía (estado 4 MHCII+).

De gran relevancia fue demostrar que las inflamaciones periféricas son capaces de impactar en la SN en degeneración exacerbando la neurodegeneración observada en la misma. El estímulo pro-inflamatorio periférico también produjo la exacerbación de la activación microglial evidenciada como células estado 4 MHCII+ a lo largo de toda la SN. En conclusión, el estímulo inflamatorio periférico fue capaz de agravar la progresión de la enfermedad, aumentando el impacto clínico de los resultados obtenidos en este capítulo.

Discusión final

En esta tesis, hemos demostrado por primera vez que un leve estímulo pro-inflamatorio (dosis sub-tóxica de LPS) inyectado en la SN en degeneración es capaz de exacerbar el daño neuronal, producir la activación de la microglía a estadios avanzados, inducir la expresión de IL-1 β y causar la detección más temprana y la exacerbación de los síntomas motores. Además demostramos que los agentes anti-inflamatorios usados, la dexametasona y el ibuprofeno, son capaces de prevenir los efectos exacerbantes del LPS. También demostramos que la principal molécula mediadora de estos efectos exacerbantes es la IL-1 β . Por otro lado, presentamos evidencia que la expresión de la rIL-1 β (IL-1 β endógena) en la vía nigroestriatal fue capaz de inducir la neurodegeneración en la SN intacta reforzando el rol neurotóxico de esta citoquina. Así también, demostramos que los efectos directos de la IL-1 β pueden ser inhibidos con el uso de anti-inflamatorios (DXM Cap. III). Finalmente, comprobamos que la inflamación periférica es capaz de exacerbar la neurodegeneración y la activación de la microglía en la SN del modelo inflamatorio de EP generado (inyección de AdIL-1 en el cuerpo estriado – Cap. III) aumentando el impacto clínico de los resultados obtenidos en esta tesis.

Rol de la inflamación en la exacerbación de la neurodegeneración y de los síntomas motores en la EP.

Si bien no se conoce la etiología de la forma esporádica no hereditaria de la EP, existen diversas teorías que tratan de explicar este fenómeno. Infecciones producidas por el virus de la influenza, el *Helicobacter pylori*, el HIV y hasta la candidiasis junto con la inflamación producida por estos agentes, han sido

propuestas como contribuyentes de la etiología de la EP aunque todavía no ha podido ser demostrado (Whitton, 2007). En este sentido, ha sido muy discutida la correlación encontrada entre la pandemia de influenza de 1918 y el aumento de parkinsonismos en esa época (Isgreen, Chutorian et al., 1976; Marttila and Rinne, 1976; Ravenholt and Foege, 1982; Takahashi and Yamada, 1999). Sin embargo, no fue posible encontrar rastros del virus (RNA) en el cerebro de pacientes de esa época (Jellinger, 2001).

Otra teoría hace mención a la elevada susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SN a los estímulos inflamatorios. Diversos estudios han analizado los efectos del LPS sobre la SN, encontrando que el LPS sería un efector de la neurodegeneración de las células dopaminérgicas (Castaño, Herrera et al., 1998; Herrera, Castaño et al., 2000; Kim, Mohny et al., 2000). Asimismo, y de gran interés fue la descripción de que las neuronas correspondientes a distintas regiones del SNC no son igualmente susceptibles a la degeneración mediada por la inflamación. Dosis similares de LPS fueron inyectadas en la SN y en otras regiones del cerebro como el hipocampo y la corteza, evidenciándose que la SN era la región más sensible a la muerte celular mientras que las otras dos zonas no presentaron signos de neurotoxicidad (Kim, Mohny et al., 2000). Esto nos estaría hablando de una susceptibilidad especial de la SN a la exposición a diferentes agentes infecciosos o tóxicos con características inflamatorias. La susceptibilidad región-específica podría ser atribuida a la abundancia de la microglía en la SN en comparación con otras regiones (Lawson, Perry et al., 1990). Este concepto podría ser relevante en la clínica de la EP considerando que la llegada de un estímulo pro-inflamatorio al

cerebro podría iniciar una cascada de eventos que lleven a la exacerbación de la neurodegeneración existente con el consiguiente agravamiento de los síntomas. Nuestros resultados demuestran que una dosis sub-tóxica de LPS es capaz de exacerbar la neurodegeneración en la SN y producir la detección más temprana y exacerbación de los síntomas motores en nuestro modelo de EP. Resultados similares sobre el daño neuronal y la activación de la microglía se observaron en los animales que recibieron el estímulo pro-inflamatorio periférico (segundo modelo de EP presentado en esta tesis – Cap. III). Estos resultados sugieren fuertemente que, la inflamación central o periférica podría ser considerada como un factor de riesgo para la exacerbación de la EP.

Según nuestros resultados, la inflamación puede acelerar la aparición o detección de los síntomas de la EP, explicando de alguna manera la discrepancia encontrada entre la ausencia del RNA viral en el cerebro y el aumento de parkinsonismos durante la pandemia de 1918. Es posible argumentar que la infección con el virus de la influenza haya exacerbado la neurodegeneración existente en la SN de pacientes asintomáticos, convirtiéndolos en sintomáticos y de esta manera, clínicamente definidos como pacientes con EP. Los síntomas de la EP permanecen ocultos hasta que al menos ha desaparecido entre un 50 y un 70% de las neuronas dopaminérgicas de la SN (Lang and Lozano, 1998; Deumens, Blokland et al., 2002) debido a mecanismos compensatorios. Estos mecanismos compensatorios posibilitarían que la EP fuera sub-diagnosticada en la población general debido a la falta de síntomas motores. Sin embargo, si una pandemia como la de la influenza de 1918, produce una infección masiva de la población, puede exacerbar la neurodegeneración en curso y producir la

detección de los síntomas motores en un número elevado de personas, explicando la alta incidencia de parkinsonismos durante este período.

Mecanismo de exacerbación de la EP mediado por la inflamación.

Anteriormente en el laboratorio, se demostró la presencia de una activación “atípica” de la microglía durante la neurodegeneración de la SN en el modelo de 6OHDA (Depino, Earl et al., 2003). Este tipo de activación incluye transcripción pero no traducción de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 β además de la activación de la microglía a estadios 2-3. Estas observaciones correlacionan con la biología del modelo de neurodegeneración crónica utilizado. Se ha propuesto que la muerte neuronal en la SN 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).

De acuerdo con nuestras observaciones sobre la activación de la microglía y la producción de IL-1 β , la dosis sub-tóxica de LPS inyectada en la SN en neurodegeneración fue capaz de producir el cambio de fenotipo en estas células, de un estado cebado o “primed” a un fenotipo de activación avanzado. Este fenotipo estaría definido por la presencia de células pertenecientes al estadio 4 de activación, que expresan en su superficie el marcador MHCII y por la inducción de IL-1 β en la SN. Recordemos que, las células en estado “cebado” poseen niveles elevados de transcritos de citoquinas sin traducir y la capacidad de disparar rápidamente la traducción de proteínas ante estímulos que en otras

condiciones hubieran sido inocuos. Por lo tanto, sugerimos que el estímulo proinflamatorio sub-tóxico inyectado luego de la inyección intraestriatal de 6OHDA fue capaz de iniciar la traducción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β) por parte de estas células, inclinando el balance entre los posibles efectos de la microglía (neurotóxico o neurotrófico) hacia un neto efecto neurodegenerativo.

Como mencionamos en la Introducción, estudios en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de prion, mostraron que, la microglía se hallaba cebada durante el proceso neurodegenerativo (Perry, Cunningham et al., 2002). En este mismo modelo, un estímulo pro-inflamatorio subsecuente local o sistémico exacerbó la neurodegeneración existente y los síntomas de la enfermedad (Cunningham, Wilcockson et al., 2005). Así también, estudios en la enfermedad de Alzheimer, describieron una activación atípica de la microglía en ratones transgénicos mientras que un estímulo subsecuente periférico produjo la inducción de citoquinas pro-inflamatorias en la región afectada en estos animales (Sly, Krzesicki et al., 2001). De la misma manera, los resultados presentados en esta tesis, sugieren que la microglía que se encontraba cebada por la neurodegeneración mediada por la neurotoxina (6OHDA), podría completar su activación con el segundo estímulo (LPS) y comenzar a secretar citoquinas proinflamatorias y otras moléculas tóxicas para el microambiente neuronal, produciendo de esta manera la exacerbación de la neurodegeneración. Así también, el estímulo pro-inflamatorio periférico (segundo modelo de EP – Cap III) fue capaz de impactar negativamente sobre la SN exacerbando la neurodegeneración de la misma.

Trabajos recientes han evaluado el rol de la microglía en el daño neuronal en las enfermedades neurodegenerativas y han postulado que la sobreactivación y desregulación de la misma puede resultar en la exacerbación de la patología de base (Hald and Lotharius, 2005; Herrera, Tomas-Camardiel et al., 2005; Kim and de Vellis, 2005; Minghetti, 2005; Block, Zecca et al., 2007). Las células de la microglía pueden activarse por dos tipos de señales: por un lado por la estimulación directa de toxinas o de proteínas endógenas del nicho o entorno (rotenona, paraquat, β amiloide, α -sinucleína, LPS) y por otro lado, por la comunicación directa neurona – microglía (liberación de neuromelanina de las neuronas dañadas) (Wilms, Claasen et al., 2003; Block and Hong, 2005; Wu, Block et al., 2005). Dicha activación puede estar acompañada por la liberación de citoquinas pro-inflamatorias o de sustancias neurotóxicas que produzcan daños en el microambiente neuronal (Kreutzberg, 1996; Streit, Mrazek et al., 2004; Hald and Lotharius, 2005; Arai, Furuya et al., 2006). Los resultados presentados en esta tesis muestran claramente que, los estadios avanzados de activación de la microglía (estadio 4, MHCII+) junto con la producción de IL-1 β tiene un efecto unívocamente nocivo para las neuronas de la SN y está asociado con la exacerbación de la neurodegeneración y de los síntomas motores.

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis apoyan la teoría de los dos estímulos sobre la activación de la microglía en la EP (Sawada, Imamura et al., 2006). Esta hipótesis hace referencia a la presencia de microglía cebada debido a un primer estímulo. Se cree que la llegada de un segundo estímulo en este momento produciría un cambio en el fenotipo de la misma, la activación a

estadios morfológicos avanzados y la adquisición de una función neurotóxica por parte de estas células. Como resultado, se produciría la exacerbación de la neurodegeneración promoviendo el progreso de la EP (Sawada, Imamura et al., 2006).

Por otro lado, la terapia con drogas anti-inflamatorias permitió asociar funcionalmente la neurodegeneración con la presencia de estadios de activación avanzado de la microglía (MHCII+). La disminución del receptor de superficie MHCII luego de los diferentes tratamientos (DXM e IBU) podría indicar un rol funcional de esta molécula en la exacerbación de la neurodegeneración. Se cree que la dexametasona podría estar actuando directamente sobre la microglía o indirectamente interfiriendo con las señales del entorno celular, por ejemplo, los astrocitos o las neuronas (Kiefer and Kreutzberg, 1991; Castaño, Herrera et al., 2002; Hald and Lotharius, 2005). Se sabe que tanto las células de la glía como las neuronas tienen receptores específicos para los glucocorticoides pero no se han descrito estos receptores en la microglía (Kiefer and Kreutzberg, 1991). Una posibilidad es que la disminución de la expresión de MHCII en la superficie de las células microgliales se explique por la presencia del receptor de glucocorticoides en esta población específica MHCII+ y posiblemente ausente en otra sub-población de microglía (Kiefer and Kreutzberg, 1991). Otro mecanismo de acción propuesto para los glucocorticoides sería la modulación de las señales del nicho neuronal. Se sabe que los glucocorticoides pueden inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias y quizás ésta inhibición estaría involucrada en la regulación de la expresión de MHCII (Kreutzberg, 1996). Con respecto al ibuprofeno, durante años se pensó que los AINEs ejercían su acción

solamente a través de la inhibición de la COX 1 y 2. Actualmente se sabe que éstos tienen otros blancos farmacológicos como la modulación de factores de transcripción como el NF- κ B, importante para la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (Kopp and Ghosh, 1994; Grilli, Pizzi et al., 1996). Estudios realizados con diferentes AINEs demostraron que el ibuprofeno entre otros, removería los radicales de óxido nítrico sin alterar los niveles de iNOS (Asanuma, Nishibayashi-Asanuma et al., 2001). Nuestros resultados son los primeros en demostrar que el ibuprofeno también ejercería sus propiedades neuroprotectoras actuando sobre la microglía, produciendo una disminución de su activación así como también, una menor expresión de receptores de superficie (MHCII). Con respecto a la molécula MHCII, es de destacar que estas moléculas están presentes en las células presentadoras de antígenos profesionales y que son esenciales para la presentación antigénica a los linfocitos T en la periferia, aunque todavía se desconoce su funcionalidad en las células residentes del sistema nervioso central como la microglía. Los factores que regulan la expresión de MHCII no están claros todavía (Perry, 1998). Se sabe que los bajos niveles de expresión de MHCII se debe a la falta de estímulos inductores o la presencia de estímulos que disminuyen su expresión *in vivo* (Perry, 1998). A pesar de que la microglía no expresa MHCII constitutivamente, se induce la expresión de la misma luego de injurias o patologías del SNC (Perry, 1998). La expresión de MHCII es una condición necesaria pero no suficiente para que sea una célula presentadora de antígeno profesional. Futuros ensayos *in vitro* deberán ser realizados para determinar si la microglía es capaz de iniciar, propagar o modular la respuesta inmune adquirida en el

SNC. Por ejemplo, el ensayo de proliferación de linfocitos o de linfoproliferación *in vitro* en respuesta a un antígeno específico o a un mitógeno, es un método utilizado rutinariamente para evaluar la inmunidad mediada por células y sería muy esclarecedor de la funcionalidad de la molécula MHCII en estas células.

Rol de la IL-1 β : Como mencionamos en la Introducción, la IL-1 β tiene diversas acciones en el cerebro. Se expresa en pequeñas cantidades en el cerebro normal y aumenta su expresión en respuesta a diferentes injurias. Se sabe que tanto las células de la microglía como los astrocitos, oligodendrocitos y hasta las neuronas son capaces de liberar IL-1 en el SNC ante diversos estímulos o injurias (Rothwell and Luheshi, 2000). Se cree que la microglía es la fuente más temprana de IL-1 mientras que los astrocitos son capaces de producirla más tardíamente (Davies, Loddick et al., 1999; Pearson, Rothwell et al., 1999). En esta tesis observamos que, la exacerbación de la neurodegeneración estaba siempre acompañada de activación de la microglía y expresión de receptores de superficie (MHCII) por parte de este tipo celular mientras que no observamos activación de la astrogliá. Estos resultados nos llevan a especular que la microglía sería la principal fuente de IL-1 en nuestro modelo.

Si bien los mecanismos que regulan la expresión de la IL-1 y su acción no se conocen totalmente en el SNC, se sabe que la IL-1 tiene diversos blancos de acción, modula la expresión de alrededor de 100 moléculas (Dinarello, 1991) y se cree que podría actuar como mediador en las respuestas neuroinmunes sobre la neurodegeneración (Rothwell and Luheshi, 2000). En esta tesis vimos que la IL-1 β fue la única citoquina inducida dentro de las principales citoquinas

proinflamatorias estudiadas (IL-1 β , TNF α e IL-6). Como consecuencia, la postulamos como la candidata a mediar los efectos exacerbantes descritos. De gran relevancia fue observar que la expresión de IL-1ra en la SN produjo un notorio efecto neuroprotector sobre la neurodegeneración de la SN, señalando nuevamente a la IL-1 como la principal mediadora de los efectos exacerbantes del LPS. Para darle mayor solidez a esta observación, en el capítulo III evidenciamos que la acción directa de esta citoquina sobre la vía nigroestriatal es capaz de producir la neurodegeneración de las células dopaminérgicas de la SN.

Es de destacar que la respuesta inflamatoria en el SNC frente a la neurodegeneración está altamente regulada (Perry, Cunningham et al., 2007). Este fue el resultado de estudios previos del laboratorio donde se demostró que la inducción de ARNm de IL-1 α y β como consecuencia de la degeneración de la SN no estuvo acompañada por incrementos en los niveles de las respectivas proteínas medido por ELISA (Depino, Earl et al., 2003). En esta tesis observamos que la expresión de IL-1 ocurre solamente luego de la llegada del estímulo pro-inflamatorio. Se podría especular que el estímulo pro-inflamatorio fue capaz de alterar el estado anti-inflamatorio, inducir la síntesis de IL-1 β y como consecuencia exacerbar la progresión de la EP.

A pesar de que los mecanismos de acción de la IL-1 sobre la neurodegeneración son complejos e involucran diferentes vías (Dinarello, 1996), los resultados observados en esta tesis indican que la IL-1 estaría unívocamente implicada en la exacerbación de la neurodegeneración actuando de manera directa sobre el

nicho neuronal y/o indirectamente a través de la expresión de mediadores en el mismo.

La inflamación como blanco terapéutico

A lo largo de esta tesis, hemos presentado evidencia que los tratamientos con compuestos anti-inflamatorios son capaces de prevenir la exacerbación de la pérdida neuronal. Resulta atractivo especular sobre el potencial terapéutico de estos compuestos o postular una terapia anti-IL-1 para tratar la exacerbación de la EP. Debemos ser cautelosos al sugerir el uso de alguna de estas estrategias en la terapia contra la exacerbación de la progresión de la EP. Por ejemplo, el uso de glucocorticoides como terapia de largo plazo tiene muchos efectos secundarios indeseables. Entre ellos podemos mencionar hipertensión, osteoporosis, riesgo aumentado de fracturas y lentitud en la cicatrización de heridas, entre otros (Schacke, Docke et al., 2002). Estos efectos secundarios hacen de los glucocorticoides una herramienta de uso limitado en distintas patologías y entre ellas, en enfermedades con activación microglial crónica como la EP (Schacke, Docke et al., 2002). La idea de utilizar ibuprofeno como terapia en la EP surgió como resultado de un estudio epidemiológico que asoció el consumo crónico de este compuesto con el riesgo reducido de padecer EP (Chen, Zhang et al., 2003). Desde la publicación de este estudio (2003), numerosos trabajos han aparecido comunicando resultados similares. Un estudio realizado sobre 1200 pacientes con EP y 6000 controles sugiere que el uso de AINEs (excepto aspirina), reduce el riesgo de EP en la población masculina (Hernan, Logroscino et al., 2006). Otro estudio, que sólo constó de

196 casos versus 196 controles informó que el consumo de AINEs sólo está asociado a una tendencia de riesgo reducida (Bower 2006). La elección de la población de estudio, el consumo crónico de ibuprofeno y el método de obtención de datos son los principales puntos de debate en estos estudios (Chen, Jacobs et al., 2005; Bower, Maraganore et al., 2006; Hernan, Logroscino et al., 2006; Ton, Heckbert et al., 2006). Deberán realizarse más estudios para confirmar estos resultados antes de poder establecer al ibuprofeno u otro AINE como terapia contra la exacerbación de la progresión en la EP. Este fue el caso de la enfermedad de Alzheimer (EA), donde más de 20 estudios epidemiológicos realizados demostraron un efecto protector significativo de los AINEs contra la EA (McGeer and McGeer, 2007b). Estos estudios contaron con una población muy bien definida y donde el consumo de AINEs fue muy bien documentado.

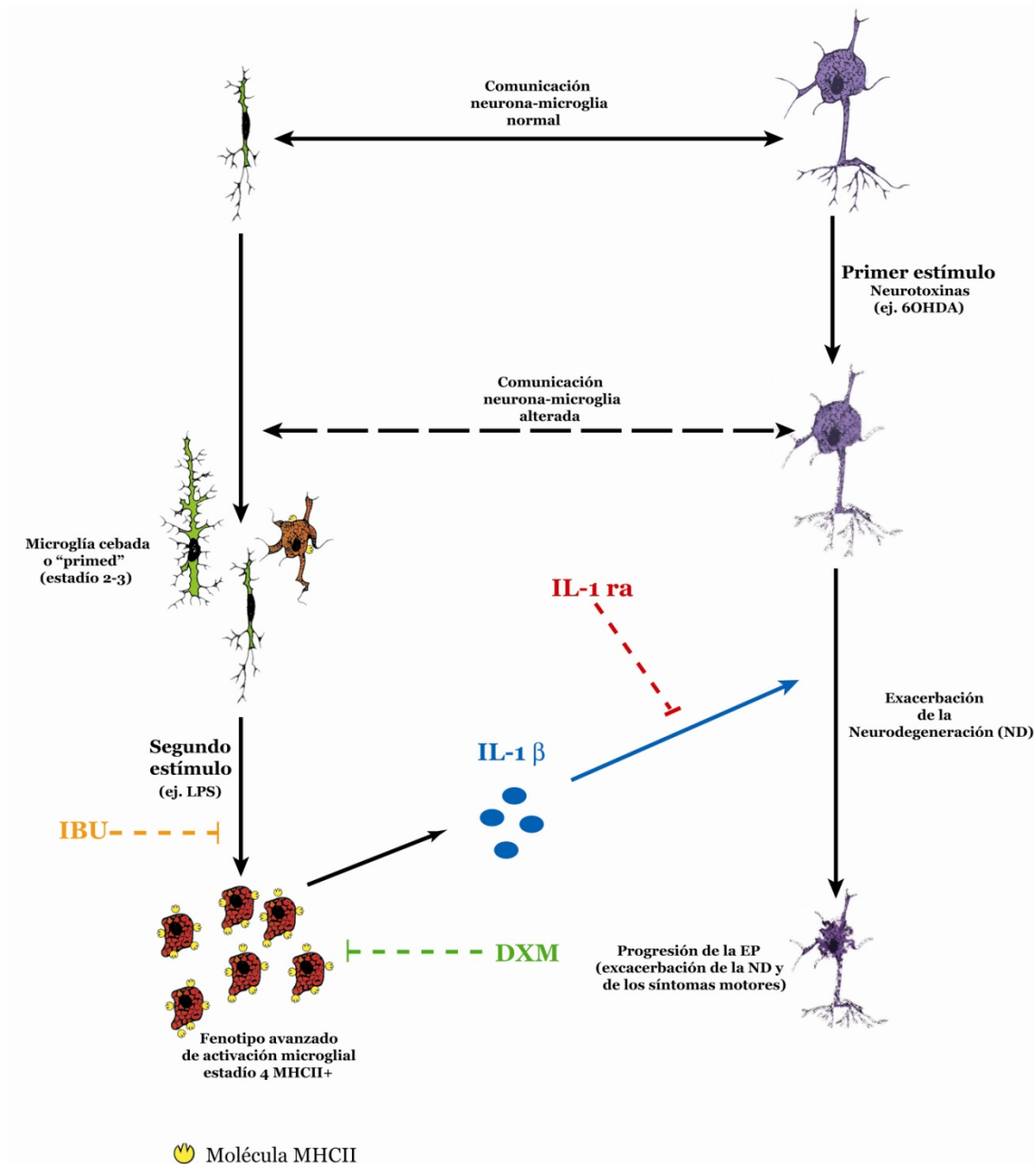
El rol dual de muchos componentes inflamatorios, el balance de sus efectos dependiendo del contexto celular y molecular y los resultados decepcionantes en la terapia anti-citoquinas en la Esclerosis Múltiple (otra enfermedad neurodegenerativa con un componente inflamatorio mejor definido), bregan por la identificación de tratamientos específicos que sean inequívocamente beneficiosos en la terapia de la EP. Por lo tanto, quisiéramos ser muy cuidadosos con la idea de proponer alguno de los tratamientos probados en esta tesis (DXM, IBU, IL-1ra) como terapia confirmada para la controlar la exacerbación de la EP.

Se podría anticipar que un conocimiento más detallado de los mecanismos de la neuroinflamación en la EP podría conducir al descubrimiento de nuevos blancos moleculares y celulares que permitirían diseñar nuevas drogas para el

tratamiento de la EP. Así también, futuros tratamientos podrían involucrar terapias combinadas dirigidas contra los mecanismos inflamatorios y no inflamatorios.

Conclusión final

Los resultados presentados en esta tesis identifican una situación clínica relevante donde la inflamación es unívocamente perjudicial para la SN. La activación de las células de la glía hallada en pacientes y modelos animales de EP, no debería ser considerada como un epifenómeno o como una consecuencia no específica de la degeneración neuronal como se pensó en un principio, si no que debería ser considerada como un factor que puede agravar el curso de la enfermedad. La importancia clínica de estos resultados surge de la interacción encontrada entre la activación de la microglía, la inflamación central y periférica y la neurodegeneración. De esta manera, el posible impacto clínico de esta tesis es la consideración de la inflamación central o periférica como un factor de riesgo para la EP así como la identificación de posibles tratamientos para prevenir o controlar eficientemente la misma y así disminuir la exacerbación de la progresión de la EP. La identificación de otros blancos terapéuticos sería necesaria para definir la mejor estrategia terapéutica para prevenir o inhibir los efectos exacerbantes de la inflamación en los pacientes con EP.



Modelo final postulado en esta tesis: Teoría de los dos estímulos

La viabilidad de las neuronas ha sido comprometido por una injuria, toxina o señal intercelular (primer estímulo). Como consecuencia, la comunicación neurona-microglía resulta alterada y la microglía se activa exhibiendo un fenotipo de activación intermedio (cebada). La llegada de un estímulo pro-inflamatorio (segundo estímulo) al cerebro impactaría sobre la microglía cebada produciendo una activación microglial avanzada (estadio 4 MHCII+) y síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1β) con la consiguiente exacerbación de la neurodegeneración y de los síntomas motores de la EP. Estas interacciones señalan a la inflamación como un factor de riesgo que puede contribuir a la exacerbación y progresión de la EP.

Se muestran los efectos ejercidos por los compuestos anti-inflamatorios evaluados en esta tesis (DXM, IBU, IL-1ra).

Bibliografía

- Aloisi F (1999) The role of microglia and astrocytes in CNS immune surveillance and immunopathology. *Adv Exp Med Biol* 468:123-133.
- Aloisi F (2001) Immune function of microglia. *Glia* 36:165-179.
- Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ (2005) Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol* 5:629-640.
- Anthony DC, Bolton SJ, Fearn S, Perry SW (1997) age-related effects of interleukin-1b on polymorphonuclear neutrophil-dependent increases in BBB permeability in rats.101-110.
- Arai H, Furuya T, Mizuno Y, Mochizuki H (2006) Inflammation and infection in Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 21:673-678.
- Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N (2004) Neuroprotective effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des* 10:695-700.
- Asanuma M, Nishibayashi-Asanuma S, Miyazaki I, Kohno M, Ogawa N (2001) Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. *J Neurochem* 76:1895-1904.
- Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7:111-118.
- Basu A, Krady JK, Levison SW (2004) Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J Neurosci Res* 78:151-156.
- Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2:325-334.
- Besedovsky H, del Rey A (1996) Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews* 17:1-39.

- Besedovsky HO, del Rey A (1991) Feed-back interactions between immunological cells and the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Netherlands Journal of Medicine* 39:274-280.
- Beyer M, Herlofson K, Arslan D, Larsen J (2001) Causes of death in a community-based study of Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica* 103:7-11.
- Bjarnason IT, Charlett A, Dobbs RJ, Dobbs SM, Ibrahim MA, Kerwin RW, Mahler RF, Oxlade NL, Peterson DW, Plant JM, Price AB, Weller C (2005) Role of chronic infection and inflammation in the gastrointestinal tract in the etiology and pathogenesis of idiopathic parkinsonism. Part 2: response of facets of clinical idiopathic parkinsonism to *Helicobacter pylori* eradication. A randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy study. *Helicobacter* 10:276-287.
- Bladh LG, Liden J, Dahlman-Wright K, Reimers M, Nilsson S, Okret S (2005) Identification of endogenous glucocorticoid repressed genes differentially regulated by a glucocorticoid receptor mutant able to separate between nuclear factor-kappaB and activator protein-1 repression. *Mol Pharmacol* 67:815-826.
- Blatteis CM (1992) Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. *Prog Brain Res* 91:409-412.
- Block ML, Hong JS (2005) Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76:77-98.

- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57-69.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M-F, Benabid A-L, Sadoul R, 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.
- Bower JH, Maraganore DM, Peterson BJ, Ahlskog JE, Rocca WA (2006) Immunologic diseases, anti-inflammatory drugs, and Parkinson disease: a case-control study. *Neurology* 67:494-496.
- Brissaud E (1895) Nature et pathogenie de la maladie de Parkinson. In, pp 488-501. Paris.
- Browne KD, Iwata A, Putt ME, Smith DH (2006) Chronic ibuprofen administration worsens cognitive outcome following traumatic brain injury in rats. *Exp Neurol* 201:301-307.
- Carlsson A LM, Magnusson T. (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180:1200.
- Castaño A, Herrera AJ, Cano J, Machado A (1998) Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem* 70:1584-1592.
- Castaño A, Herrera A, Cano J, 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.

- Cato AC, Nestl A, Mink S (2002) Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE* 2002:RE9.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med* 280:337-345.
- Cunningham C, Wilcockson DC, Campion S, Lunnon K, Perry VH (2005) Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *J Neurosci* 25:9275-9284.
- Chen H, Jacobs E, Schwarzschild MA, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Ascherio A (2005) Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 58:963-967.
- Chen H, Zhang SM, Hernan MA, Schwarzschild MA, Willett WC, Colditz GA, Speizer FE, Ascherio A (2003) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 60:1059-1064.
- Davies CA, Loddick SA, Toulmond S, Stroemer RP, Hunt J, Rothwell NJ (1999) The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:87-98.
- Dawson TM, Dawson VL (2003) Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *J Clin Invest* 111:145-151.
- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G (2003) The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* 24:488-522.

- de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A (2000) Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54:S21-23.
- Del Rio Hortega P (1919) El tercer elemento de los centros nerviosos. Poder fagocitario y movilidad de la microglía. *Bol Soc Esp Biol* 9:154 -166.
- Depino A, Ferrari C, Pott Godoy MC, Tarelli R, Pitossi FJ (2005) Differential effects of interleukin-1beta on neurotoxicity, cytokine induction and glial reaction in specific brain regions. *J Neuroimmunol*.
- Depino A, Earl C, Kaczmarczyk E, Ferrari C, Besedovsky H, del Rey A, Pitossi F, Oertel W (2003) Microglial activation with atypical pro-inflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience* 18:2731-2742.
- Depino AM, Alonso M, Ferrari C, del Rey A, Anthony D, Besedovsky H, Medina JH, Pitossi F (2004) Learning modulation by endogenous hippocampal IL-1: blockade of endogenous IL-1 facilitates memory formation. *Hippocampus* 14:526-535.
- Deumens R, Blokland A, 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 (1991) Interleukin-1 and Interleukin-1 antagonism. *Blood* 77:1627-1652.

- Dinarelló CA (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87:2095-2147.
- Dinarelló CA (2002) The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 20:S1-13.
- Diosque P, Padilla AM, Cimino RO, Cardozo RM, Negrette OS, Marco JD, Zacca R, Meza C, Juárez A, Rojo H, Rey R, Corrales RM, Nasser JR, Basombrio MA (2004) Chagas disease in rural areas of Chaco Province, Argentina: epidemiologic survey in humans, reservoirs, and vectors. *Am J Trop Med Hyg* 71:590-593.
- Dobbs RJ, Dobbs SM, Weller C, Bjarnason IT, Oxlade NL, Charlett A, Al-Janabi MA, Kerwin RW, Mahler RF, Price AB (2005) Role of chronic infection and inflammation in the gastrointestinal tract in the etiology and pathogenesis of idiopathic parkinsonism. Part 1: eradication of *Helicobacter* in the cachexia of idiopathic parkinsonism. *Helicobacter* 10:267-275.
- Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system.]. *Klin Wochenschr* 38:1236-1239.
- Elbaz A, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, Schaid DJ, Rocca WA (2002) Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J Clin Epidemiol* 55:25-31.
- Farreras Valentí P, Rozman C (2000) *Medicina Interna, 2000 Edition*. Madrid: Times Mirror International Publishers.

- Ferrari CC, Pott Godoy MC, Tarelli R, Chertoff M, Depino AM, Pitossi FJ (2006) Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra. *Neurobiol Dis* 24:183-193.
- Goetz CG (2002) Jean-Martin Charcot and the aging brain. *Arch Neurol* 59:1821-1824.
- Greenfield JG, Bosanquet FD (1953) The brain-stem lesions in Parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 16:213-226.
- Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P (1996) Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. *Science* 274:1383-1385.
- Gwinn-Hardy K (2002) Genetics of parkinsonism. *Mov Disord* 17:645-656.
- Hald A, Lotharius J (2005) Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol* 193:279-290.
- Hernan MA, Logroscino G, Garcia Rodriguez LA (2006) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of Parkinson disease. *Neurology* 66:1097-1099.
- Herrera A, Castaño A, Venero J, Cano J, 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.
- Herrera AJ, Tomas-Camardiel M, Venero JL, Cano J, Machado A (2005) Inflammatory process as a determinant factor for the degeneration of substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neural Transm* 112:111-119.

- Hirsch EC, Breidert T, Rousselet E, Hunot S, Hartmann A, Michel PP (2003) The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:214-228.
- Hoehn MM, Yahr MD (1998) Parkinsonism: onset, progression, and mortality. 1967. *Neurology* 50:318 and 316 pages following.
- Hopkins SJ, Rothwell NJ (1995) Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci* 18:83-88.
- Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC (1999) FcepsilonR2/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci* 19:3440-3447.
- Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y (2003) Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol (Berl)* 106:518-526.
- Isgreen WP, Chutorian AM, Fahn S (1976) Sequential parkinsonism and chorea following "mild" influenza. *Trans Am Neurol Assoc* 101:56-60.
- Jellinger KA (2001) Influenza RNA not detected in archival brain tissues from acute encephalitis lethargica cases or in postencephalitic Parkinson cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:1121-1122.
- Johnson RE, Schallert T, Becker JB (1999) Akinesia and postural abnormality after unilateral dopamine depletion. *Behav Brain Res* 104:189-196.
- Kern DS, Kumar R (2007) Deep Brain Stimulation. *Neurologist* 13:237-252.

- Kiefer R, Kreutzberg GW (1991) Effects of dexamethasone on microglial activation in vivo: selective downregulation of major histocompatibility complex class II expression in regenerating facial nucleus. *J Neuroimmunol* 34:99-108.
- Kielian T, Drew PD (2003) Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central nervous system inflammation. *J Neurosci Res* 71:315-325.
- Kim SU, de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81:302-313.
- Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS (2000) Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20:6309-6316.
- Kim YS, Joh TH (2006) Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Mol Med* 38:333-347.
- Knott C, Stern G, Wilkin GP (2000) Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci* 16:724-739.
- Kopp E, Ghosh S (1994) Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265:956-959.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
- Kurkowska-Jastrzebska I, Litwin T, Joniec I, Ciesielska A, Przybylkowski A, Czlonkowski A, Czlonkowska A (2004) Dexamethasone protects against

- dopaminergic neurons damage in a mouse model of Parkinson's disease. *Int Immunopharmacol* 4:1307-1318.
- Landreth GE, Heneka MT (2001) Anti-inflammatory actions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22:937-944.
- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's Disease. First of two parts. *The New England Journal Of Medicine* 339:1044-1053.
- Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, 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. *Ann Neurol* 46:598-605.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-170.
- Lee YB, Nagai A, Kim SU (2002) Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res* 69:94-103.
- Lim KL, Dawson VL, Dawson TM (2002) The genetics of Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2:439-446.
- Ling EA, Wong WC (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18.
- Lozano AM, Lang AE, Hutchison WD, Dostrovsky JO (1998) New developments in understanding the etiology of Parkinson's disease and its treatment. *Current Opinion in Neurobiology* 8:783-790.

- Marttila RJ, Rinne UK (1976) Arteriosclerosis, heredity, and some previous infections in the etiology of Parkinson's disease. A case-control study. *Clin Neurol Neurosurg* 79:46-56.
- McGeer P, Itagaki S, Boyes B, McGeer E (1988a) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285-1291.
- McGeer PL, McGeer EG (2004a) Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci* 1035:104-116.
- McGeer PL, McGeer EG (2004b) Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 10 Suppl 1:S3-7.
- McGeer PL, McGeer EG (2007a) Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord*.
- McGeer PL, McGeer EG (2007b) NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging* 28:639-647.
- McGeer PL, Itagaki S, McGeer EG (1988b) Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 76:550-557.
- McKay LI, Cidlowski JA (1999) Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 20:435-459.
- Melton LM, Keith AB, Davis S, Oakley AE, Edwardson JA, Morris CM (2003) Chronic glial activation, neurodegeneration, and APP immunoreactive

- deposits following acute administration of double-stranded RNA. *Glia* 44:1-12.
- Minghetti L (2005) Role of inflammation in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol* 18:315-321.
- Mirza B, Hadberg H, Thomsen P, Moos T (2000) The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* 95:425-432.
- Mogi M, Nagatsu T (1999) Neurotrophins and cytokines in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 80:135-139.
- Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T (1996) Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 211:13-16.
- Mogi M, Togari A, Tanaka K, Ogawa N, Ichinose H, 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, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T (1994) Interleukin 1 beta, Interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor alpha are elevated in the brain from Parkinsonian patients. *Neuroscience Letters* 180:147-150.
- Nagatsu T, Sawada M (2005) Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr Pharm Des* 11:999-1016.

- Nakamura Y (2002) Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* 25:945-953.
- Nakashima K, Maeda M, Tabata M, Adachi Y, Kusumi M, Ohshiro H (1997) Prognosis of Parkinson's disease in Japan. Tottori University Parkinson's Disease Epidemiology (TUPDE) Study Group. *Eur Neurol* 38 Suppl 2:60-63.
- Neumann H (2001) Control of glial immune function by neurons. *Glia* 36:191-199.
- Nutt JG, Wooten GF (2005) Clinical practice. Diagnosis and initial management of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 353:1021-1027.
- O'Keefe GM, Nguyen VT, Benveniste EN (2002) Regulation and function of class II major histocompatibility complex, CD40, and B7 expression in macrophages and microglia: Implications in neurological diseases. *J Neurovirol* 8:496-512.
- Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KS (2004) Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol* 3:496-503.
- Olsson M, Nikkhah, G, Bentlage, C, 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. *J Neurosci* 15:3863-3875.
- Parkinson J (1817) *On the Shaking Palsy*. Sherwood, Heely and Jones.
- Parkinson J (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14:223-236; discussion 222.

- Patel HC, Boutin H, Allan SM (2003) Interleukin-1 in the brain: mechanisms of action in acute neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 992:39-47.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Orlando, FL: Academic Press.
- Pearson V, Rothwell N, 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.
- Peltekian E, Garcia L, Danos O (2002) Neurotropism and retrograde axonal transport of a canine adenoviral vector: a tool for targeting key structures undergoing neurodegenerative processes. *Mol Ther* 5:25-32.
- Perry V, Cunningham C, Boche D (2002) Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease. *Current opinion in neurology* 15:349-354.
- Perry VH (1998) A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol* 90:113-121.
- Perry VH, Gordon S (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11:273-277.
- Perry VH, Cunningham C, Holmes C (2007) Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol* 7:161-167.
- Piehl F, Lidman O (2001) Neuroinflammation in the rat--CNS cells and their role in the regulation of immune reactions. *Immunol Rev* 184:212-225.

- Pitossi F, del Rey A, Kabiersch A, Besedovsky H (1997) Induction of cytokine transcripts in the CNS and pituitary after peripheral administration of endotoxin to mice. *Journal of Neuroscience Research* 48:287-298.
- Poirier LJ, Sourkes TL (1965) Influence of the Substantia Nigra on the Catecholamine Content of the Striatum. *Brain* 88:181-192.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30:77-105.
- Ravenholt RT, Foege WH (1982) 1918 influenza, encephalitis lethargica, parkinsonism. *Lancet* 2:860-864.
- Rhen T, Cidlowski JA (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353:1711-1723.
- Rhen T CJ (2004) Nuclear factor- κ B and glucocorticoid receptors. Boston: Elsevier Academic Press.
- Ridoux V, Robert JJ, Zhang X, Perricaudet M, Mallet J, Le Gal La Salle G (1994) Adenoviral vectors as functional retrograde neuronal tracers. *Brain Res* 648:171-175.
- Rinne UK, Sonninen V (1973) Brain catecholamines and their metabolites in Parkinsonian patients. Treatment with levodopa alone or combined with a decarboxylase inhibitor. *Arch Neurol* 28:107-110.
- Rosenberg RN (2002) Mitochondrial therapy for Parkinson disease. *Arch Neurol* 59:1523.

- Rothwell N (2003) Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential. *Brain Behav Immun* 17:152-157.
- Rothwell N, Luheshi G (2000) Interleukin I in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends in Neurosciences* 23:618-625.
- Rothwell NJ, Hopkins SJ (1995) Cytokines and nervous system: II Actions and mechanisms of action. *Trends in Neurosciences* 18:130-136.
- Sauer H, Oertel WH (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-OH dopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59:401-415.
- Saura J, Pares M, Bove J, Pezzi S, Alberch J, Marin C, Tolosa E, Marti MJ (2003) Intranigral infusion of interleukin-1beta activates astrocytes and protects from subsequent 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neurochem* 85:651-661.
- Sawada M, Imamura K, Nagatsu T (2006) Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*:373-381.
- Schacke H, Docke WD, Asadullah K (2002) Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 96:23-43.
- Schallert T, Jones TA (1993) "Exuberant" neuronal growth after brain damage in adult rats: the essential role of behavioral experience. *J Neural Transplant Plast* 4:193-198.
- Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST (2000) CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral

- rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 39:777-787.
- Schapira AH (1994) Advances in the understanding of the cause of Parkinson's disease. *J R Soc Med* 87:373-375.
- Sly LM, Krzesicki RF, Brashler JR, Buhl AE, McKinley DD, Carter DB, Chin JE (2001) Endogenous brain cytokine mRNA and inflammatory responses to lipopolysaccharide are elevated in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 56:581-588.
- Sternberg E (1997) *Perspectivs series: Cytokines and the brain. Neural-immune interactions in health and disease. The Journal of Clinical Investigation* 100:2641-2647.
- Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40:133-139.
- Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS (2004) Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 1:14.
- Szelenyi J (2001) Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull* 54:329-338.
- Takahashi M, Yamada T (1999) Viral etiology for Parkinson's disease--a possible role of influenza A virus infection. *Jpn J Infect Dis* 52:89-98.
- Ton TG, Heckbert SR, Longstreth WT, Jr., Rossing MA, Kukull WA, Franklin GM, Swanson PD, Smith-Weller T, Checkoway H (2006) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord* 21:964-969.
- Tracey KJ (2002) The inflammatory reflex. *Nature* 420:853-859.

- Tsukamoto Y, Yamamoto T, Okado H, Nibu K, Terashima T (2003) Retrograde labeling of mouse spinal descending tracts by a recombinant adenovirus. *Arch Histol Cytol* 66:209-220.
- Ungerstedt U (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5:107-110.
- Vila M, Jackson-Lewis V, Guégan C, Wu D, Teismann P, Choi D-K, Tieu K, Przedborski S (2001) The role of glial cells in Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology* 14:483-489.
- Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM (2002) Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 20:125-163.
- Whitton PS (2007) Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* 150:963-976.
- Wilms H, Claasen J, Rohl C, Sievers J, Deuschl G, Lucius R (2003) Involvement of benzodiazepine receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases: evidence from activated microglial cells in vitro. *Neurobiol Dis* 14:417-424.
- Wu XF, Block ML, Zhang W, Qin L, Wilson B, Zhang WQ, Veronesi B, Hong JS (2005) The role of microglia in paraquat-induced dopaminergic neurotoxicity. *Antioxid Redox Signal* 7:654-661.
- Yang MS, Min KJ, Joe E (2007) Multiple mechanisms that prevent excessive brain inflammation. *J Neurosci Res* 85:2298-2305.
- Yazdani U, German DC, Liang CL, Manzino L, Sonsalla PK, Zeevalk GD (2006) Rat model of Parkinson's disease: chronic central delivery of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺). *Exp Neurol* 200:172-183.

Youdim MB, Ben-Shachar D, Riederer P (1994) The enigma of neuromelanin in Parkinson's disease substantia nigra. *J Neural Transm Suppl* 43:113-122.

María Clara Pott Godoy
Tesista

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'Fernando', with a horizontal line underneath the letters.

Dr. Fernando Juan Pitossi
Director

Dra. Carina Cintia Ferrari
Director Asistente