

Tesis Doctoral

# Estudio de efectos de estímulos inflamatorios periféricos sobre un modelo de enfermedad de Parkinson

Tarelli, Rodolfo

2013

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Tarelli, Rodolfo. (2013). Estudio de efectos de estímulos inflamatorios periféricos sobre un modelo de enfermedad de Parkinson. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Tarelli, Rodolfo. "Estudio de efectos de estímulos inflamatorios periféricos sobre un modelo de enfermedad de Parkinson". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



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

# **Estudio de efectos de estímulos inflamatorios periféricos sobre un modelo de enfermedad de Parkinson**

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

**Rodolfo Tarelli**

Director de tesis: Dr. Fernando Juan Pitossi  
Director Asistente: Dra. Carina Cintia Ferrari  
Consejero de Estudios: Dr. Mario Galigniana

Lugar de trabajo: Lab. de Terapias regenerativas y protectoras del sistema nervioso  
Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 2013

## **Estudio de efectos de estímulos inflamatorios periféricos sobre un modelo de enfermedad de Parkinson**

### **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 publicaciones previas de nuestro laboratorio hemos descrito una activación microglial atípica en la que la misma se encuentra parcialmente activada o “cebada” como consecuencia de la degeneración neuronal (Depino, Earl et al. 2003). En este estadio de activación atípica, las células son capaces de transcribir citoquinas pro-inflamatorias pero no de sintetizar la proteína en sí. Este concepto sugiere que una célula en estado cebado requeriría de un segundo estímulo menor al que requeriría una célula en reposo hasta quedar clásicamente activada.

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 endovenosa de un estímulo pro-inflamatorio periférico (Adenovector productor de interleuquina 1) a animales previamente denervados con la neurotoxina 6OHDA. El estímulo pro-inflamatorio fue capaz de exacerbar la neurodegeneración en progreso en la SN. Los efectos exacerbantes del estímulo inflamatorio fueron asociados con un aumento en la activación morfológica microglial y expresión de MHC clase II en superficie.

Debido a que la patología se presenta en pacientes añosos y a que los cerebros de personas ancianas presentan microglía cebada (Cunningham, Konsman et al. 2002)

realizamos el mismo diseño experimental en ratas ancianas. En este modelo, también, el estímulo pro-inflamatorio fue capaz de exacerbar la neurodegeneración presentando la microglía activación morfológica aumentada.

Por otro lado, se estudiaron los mecanismos moleculares de la exacerbación de la neurodegeneración sobre un modelo de aumento de la inflamación con un estímulo pro inflamatorio en SN. Mediante la técnica de microarrays buscamos los genes candidatos a ser los responsables de estar participando en la exacerbación de muerte neuronal. Se encontraron genes diferencialmente expresados, cuatro de los cuales fueron validados técnicamente por RT-PCR en tiempo real.

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, propone candidatos a mediar estos efectos.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, activación microglial, IL-1 $\beta$ , inflamación, neurodegeneración, genómica funcional.

## **Study of the effects of peripheral inflammatory stimuli on a model of Parkinson's disease**

### **Abstract**

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease in people over 65. It's progression is slow and one of its distinctive features is the degeneration of neurons in the substantia nigra pars compacta (SN). A pathophysiological finding uniformly observed in both animal models and in patients with PD is that the death of SN neurons is accompanied by activation of microglia. Numerous evidence suggests a neurodegenerative role for activated microglia; however, microglia has also been shown to have neuroprotective effects. This may be through the secretion of neurotrophic factors. Therefore, the functional role of this activation is still a matter of intense debate.

Previous publications from our laboratory have described an atypical microglial activation in which it is partially activated or "primed" as a result of neuronal degeneration (Depino, Earl et al. 2003). At this stage of atypical activation atypical cells are capable of pro-inflammatory cytokine transcription but not synthesis of the protein itself. This concept suggests that a primed microglial cell would require a smaller second stimulus to become classically activated when compared to the stimulus required for a resting microglial cell to achieve this same state.

In this thesis, we evaluated the hypothesis that inflammation might exacerbate neurodegeneration in an animal model of PD (6OHDA injection into the striatum) with subsequent disease progression. To achieve this, we proceeded to the intravenous injection of a peripheral pro-inflammatory stimulus (interleukin 1 producing adenoviral vector) to previously denervated animals (with 6OHDA neurotoxin). The pro-inflammatory stimulus was able to exacerbate ongoing neurodegeneration in the SN. The inflammatory stimulus exacerbating effects were associated with an increased morphological microglial activation and surface expression of MHC class II.

As PD is a disease in aging patients, and primed microglia is known to be present in the elderly brain (Cunningham, Konsman et al. 2002), the same experimental design was carried out in aged rats. In this model, the pro-inflammatory

stimulus was able to exacerbate neurodegeneration and morphological microglia activation also increased.

In addition, we studied the molecular mechanisms of exacerbation of neurodegeneration on a model of augmented inflammation with a pro-inflammatory stimuli in the SN. Using microarray technology we looked for genes that might be candidates for being involved in the exacerbation of neuronal death. Differentially expressed genes were found, four of which were validated technically by RT-PCR in real time.

This thesis provides evidence of the harmful effects of inflammation in the progression of PD. It also proposes that infections or inflammations could be considered as a risk factor in the exacerbation of neurodegeneration in PD. It also, suggests an association between the activation of microglia and the neurotoxic effects observed in the SN. Finally, it proposes candidates to mediate these effects.

Keywords: Parkinson's disease, microglial activation, IL-1 $\beta$ , inflammation, neurodegeneration, functional genomics.

## Publicaciones

### Trabajos publicados que conforman esta tesis

Central and peripheral IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. *Brain*, Julio 2008.131 (pt7) :1880-94

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.

### Otros trabajos publicados durante la realización de esta tesis

Notch signaling proteins HES-1 and Hey-1 bind to insulin degrading enzyme (IDE) proximal promoter and repress its transcription and activity: implications for cellular A $\beta$  metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Feb;1823(2):227-35

Leal MC, Surace EI, Holgado MP, Ferrari CC, **Tarelli R**, Pitossi F, Wisniewski T, Castaño EM, Morelli L.

Parkinson's disease and systemic inflammation. *Parkinsons Dis*. 2011 Feb 22; 2011  
Ferrari CC, **Tarelli R**.

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.

**Índice**

Resumen.....	2
Abstract .....	4
Publicaciones.....	6
Índice.....	7
Abreviaturas.....	11
Introducción General .....	13
1- Enfermedad de Parkinson.....	13
1.1 Epidemiología.....	13
1.2 Etiología.....	13
1.3 Anatomía patológica .....	14
1.4 Tratamiento.....	14
1.5 Modelos Animales.....	15
2- Inflamación.....	18
2.1 Inflamación en el Sistema Nervioso Central (SNC).....	19
2.1.1 La Microglía .....	19
2.1.2 Citoquinas.....	23
2.1.2.1 Interleuquina.....	23
2.1.2.2 Factor de Necrosis Tumoral Alfa .....	24
2.2 Comunicación entre la inflamación periférica y la neuroinflamación .....	25
2.3 Modelos de EP basados en inflamación.....	26
2.3.1 Lipopolisacárido de la pared bacteriana (LPS) como modelo de EP .....	26
2.3.2 Interleuquina 1 (IL-1) como modelo de EP.....	27
3 - EP y envejecimiento .....	28
Objetivo general.....	31
Hipótesis.....	31
Objetivos específicos.....	31

Materiales y Métodos .....	34
1. Animales .....	34
2. Procedimientos quirúrgicos .....	34
2.1 Anestesia .....	34
2.2 Inyecciones .....	34
3. Estudio comportamental.....	37
4. Vectores Adenovirales.....	37
4.1 Producción y Controles de los stocks .....	37
5. Procesamiento de las muestras para el análisis histológico .....	39
6. Análisis histológicos.....	40
6.1 Tinción de Nissl.....	40
6.2 Inmunohistoquímica .....	40
6.3 Inmunofluorescencia.....	41
6.4 Visualización de las inmunomarcaciones - Microscopía .....	43
6.5 Cuantificación de neuronas dopaminérgicas en SN .....	44
7. Estudio de <i>microarrays</i> .....	44
7.1 Obtención de muestras, calidad del ARN.....	44
7.2 Técnica de <i>microarrays</i> .....	45
7.3 Análisis de datos.....	46
8. PCR en tiempo real.....	47
8.1 Transcripción reversa .....	47
8.2 Genes de referencia (housekeeping) .....	47
9. Estadística.....	52
9.1 Análisis estadísticos RT-PCR .....	52
Capítulo 1 .....	55
1 Objetivo .....	55
2 Modelo Animal .....	55
3 Resultados .....	55
A- Efectos de la inflamación periférica sobre la neurodegeneración por 6OHDA en ratas adultas.....	55
3.1 Efecto del estímulo inflamatorio periférico sobre la neurodegeneración en el modelo animal de EP en ratas adultas. ....	58

3.2 Efecto del estímulo inflamatorio periférico sobre la inflamación en la SN de ratas adultas.....	60
3.3 Conclusión ratas adultas .....	66
B- Caracterización del modelo de exacerbación periférica en ratas ancianas.....	66
3.4 Efecto del estímulo inflamatorio periférico sobre la neurodegeneración en el modelo animal de EP en ratas ancianas. ....	67
3.5 Efecto del estímulo inflamatorio periférico sobre la inflamación en la SN.....	69
3.6 Conclusión ratas ancianas .....	74
4 Conclusión General .....	74
Capítulo 2 .....	76
1 Objetivo .....	76
2 Resultados .....	76
2.1 Anestesia .....	78
2.2 Cepa de ratas.....	80
2.3 Variación de dosis empleada.....	81
2.4 Coordenadas del sitio de inyección.....	83
3 Conclusión general .....	88
Capítulo 3 .....	90
1 - Objetivo.....	90
2 - Resultados .....	90
A - Caracterización del modelo de exacerbación central.....	90
2.1 Efecto del estímulo inflamatorio central sobre la neurodegeneración en el modelo animal de EP.....	91
2.2 Efecto del estímulo inflamatorio central sobre la inflamación en SN.....	93
Conclusiones de la caracterización del modelo de exacerbación central.....	98
3 - Microarrays .....	98
3.1 Diseño experimental .....	98
3.2 Calidad del ARN .....	100
3.3 Identificación de genes candidatos .....	101
3.4 Análisis de la imagen .....	102
3.5 Análisis de los datos .....	103
3.6 Análisis estadístico .....	105
4 - Genómica funcional .....	106

4.1 Validación por RT-PCR en tiempo real. ....	107
5 - Genes Candidatos .....	114
5.1 Bak1 .....	114
5.2 Crhr1.....	114
5.3 Enpp1.....	115
5.4 Gpr139.....	115
6 - Conclusión .....	115
Discusión .....	117
1 - Modelo de exacerbación periférica de la neurodegeneración en SN.....	117
1.1 El rol de la microglía y la astrogliá .....	119
1.2 El rol de las citoquinas.....	120
1.3 Otras infecciones periféricas .....	123
2 - Relevancia clínica del modelo de exacerbación periférica de la neurodegeneración en la SN .....	124
3 - La inflamación crónica como factor de riesgo en EP. ....	126
4 – Mecanismo de exacerbación de la neurodegeneración por inflamación .....	127
5- Conclusiones finales.....	129
Anexo .....	132
Lista de Genes diferenciales provenientes del análisis de microarrays .....	132
Bibliografía .....	143

## Abreviaturas

- **Ad:** vector adenoviral
- **ARN:** ácido ribonucleico
- **βgal:** beta-galactosidasa
- **6OHDA:** 6-hidroxidopamina
- **BHE:** barrera hematoencefálica
- **EP:** Enfermedad de Parkinson
- **GFAP:** proteína ácida fibrilar glial
- **GSA:** lectina Griffonia Simplicifolia
- **IL-1:** interleuquina 1
- **IL-1β:** interleuquina 1 beta
- **LPS:** Lipopolisacárido
- **MFB:** fascículo prosencefálico medial
- **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
- **SNpc:** *substantia nigra pars compacta*
- **SNpr:** *substantia nigra pars reticulata*
- **TH:** tirosina hidroxilasa

## Introducción General

## **Introducción General**

### **1- Enfermedad de Parkinson**

El conjunto de signos y síntomas conocidos como Síndrome de Parkinson fueron descritos por primera vez en 1817 en la monografía “An essay on shaking Palsy” por James Parkinson (Parkinson 1817) . A fines del siglo XIX, Jean Marie Charcot refinó esta descripción e identificó los signos cardinales de la enfermedad de Parkinson. La EP es una entidad clínica que se caracteriza por temblor, rigidez muscular, lentitud de movimientos (bradiquinesia) y alteración de la marcha y reflejos posturales (Farreras and Rozman 1995). Estos síntomas aparecen de manera insidiosa y son de curso progresivo.

#### **1.1 Epidemiología**

La EP es una enfermedad neurodegenerativa lenta y progresiva que afecta a más del 1/ de la población mayor de 65 años de edad y más del 4/ de la población mayor de 85 años de edad (Bekris, Mata et al. 2010). Es el segundo desorden neurodegenerativo en frecuencia luego del mal de Alzheimer.

En un 5-10/ de los casos, se la diagnostica más precozmente, entre los 20 y los 50 años de edad. Este comienzo temprano, suele estar asociado con las formas heredables o familiares de la patología.

#### **1.2 Etiología**

En el 90/ de los pacientes la causa de la EP es desconocida. Aproximadamente el 10/ de los pacientes presenta una forma familiar de la EP (Lim, Dawson et al. 2002; Dawson and Dawson 2003). La forma familiar de la EP ha sido relacionada con mutaciones autosómicas dominantes en genes como LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2), SNCA (Alpha-synuclein), y mutaciones autosómicas recesivas para PRKN (Parkin), DJ1, PINK1 (PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog)-induced putative kinase 1) y ATP13A2 (Schulz 2008; Bekris, Mata et al. 2010). El conjunto de todas estas mutaciones, con la notable excepción de LRRK2, es responsable de una muy pequeña cantidad de pacientes enfermos. La mutación en LRRK2, es la causa genética más

común de EP familiar. Esta mutación se encuentra con una frecuencia de 5 a 7 / en pacientes con historia familiar de Parkinson. Este gen codifica para una proteína llamada dardarina (derivada de una palabra de origen vasco que significa temblor) (Davie 2008).

### **1.3 Anatomía patológica**

Los ganglios basales, inervados por el sistema dopaminérgico, son las áreas del cerebro más afectadas en la EP. Los ganglios basales están conformados por: el cuerpo estriado, el globo pálido, la sustancia nigra (SN) y el núcleo subtalámico. La principal característica anatomopatológica de la enfermedad es la muerte neuronal progresiva en la SN pars compacta que puede alcanzar entre el 50-70/ al tiempo de la muerte (Davie 2008). Estas neuronas tienen sus somas en la SN y extienden sus prolongaciones hasta el cuerpo estriado donde hacen sinapsis con las neuronas estriatales. La histopatología de la SN de los pacientes evidencia muerte neuronal con la presencia característica de inclusiones eosinofílicas en algunas de las neuronas remanentes. Estas inclusiones, llamadas cuerpos de Lewy son patognomónicas de la enfermedad (Greenfield and Bosanquet 1953). Otro de los hallazgos característicos en las muestras post-mortem de pacientes con EP es la activación de las células de la glía, en particular la microglía. Esta activación microglial se ve acompañada de la presencia de mediadores inflamatorios, como por ejemplo, citoquinas pro-inflamatorias (Nagatsu and Sawada 2005; Sawada, Imamura et al. 2006; McGeer and McGeer 2007).

### **1.4 Tratamiento**

En la actualidad la EP no tiene cura. Los pacientes son tratados mediante terapias de reemplazo. La enfermedad avanza irremediablemente no existiendo terapias que detengan su curso.

El tratamiento farmacológico para la sintomatología consiste en una terapia de reemplazo dopaminérgico utilizando fundamentalmente levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina)(Cotzias, Papavasiliou et al. 1969) asociada a un inhibidor de decarboxilasas periférico o agonistas dopaminérgicos, en la mayoría de los casos. El tratamiento a largo plazo con Levodopa conlleva la aparición de efectos secundarios

en la forma de disquinesias que se pueden tornar incapacitantes. Estos efectos aparecen a una tasa promedio de 10/ anual luego del comienzo del tratamiento con levodopa (Schrag and Quinn 2000; Poewe 2006). Este porcentaje es mayor en pacientes con aparición temprana de síntomas (Davie 2008).

El tratamiento quirúrgico en EP se originó en los años 50. A los pacientes que presentaban temblor severo ocasionalmente se les indicaba cirugía ablativa del tálamo contralateral al temblor. Con el advenimiento del tratamiento con levodopa los procedimientos quirúrgicos fueron dejados de lado por unos años (Davie 2008). La aparición de las complicaciones causadas por el tratamiento a largo plazo con levodopa, llevó a que se estudiaron nuevas técnicas quirúrgicas con la intención de tratar las mismas. Las cirugías en esta etapa se concentraron en la palidotomía por lesión quirúrgica, particularmente efectiva para el tratamiento de las disquinesias inducidas por levodopa. Un nuevo desarrollo tecnológico hizo su aparición con la estimulación cerebral profunda (DBS por sus siglas en inglés) en que, la estimulación de alta frecuencia de áreas discretas del cerebro producen una inhibición funcional reversible del área blanco. El procedimiento más comúnmente empleado para reducir la bradiquinesia, el temblor y la rigidez y que también reduce las complicaciones motoras de causa farmacológica es la estimulación subtalámica bilateral. La intervención es altamente compleja y se emplea solamente en casos avanzados de la patología (Kern and Kumar 2007; Davie 2008).

### **1.5 Modelos Animales**

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. En un modelo animal ideal de la enfermedad se debería observar 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 (Blesa, Phani et al. 2012).

Los modelos que existen en la actualidad pueden ser clasificados en dos grandes grupos; los modelos que emplean neurotoxinas ambientales o sintéticas y los

modelos genéticos que emplean la expresión in vivo de mutaciones relacionadas con la EP.

Los modelos **neurotóxicos** de EP más empleados se basan en la utilización de 4 sustancias: Rotenona, 1-metil-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP), Paraquat y 6-hidroxidopamina (6OHDA).

### **1.5.1 Rotenona**

La Rotenona es un insecticida y pesticida de amplio espectro extraído originalmente de las semillas de varias plantas leguminosas tropicales (Liu, Gao et al. 2003). 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 (Betarbet, Sherer et al. 2000; 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 aproximadamente un 50% de animales con lesiones compatibles a la EP al exponer a los animales al modelo con rotenona (Beal 2001).

### **1.5.2 MPTP**

El MPTP es una neurotoxina precursora del MPP+ que causa destrucción de las neuronas dopaminérgicas en la SN. Aunque el MPTP no tiene efectos psicoactivos se lo puede producir accidentalmente en la síntesis de análogos de la meperidina. Su descubrimiento ocurrió en 1982 cuando un grupo de adictos a “heroína sintética” en California desarrollaron severos parkinsonismos debido a una contaminación con MPTP (Langston, Ballard et al. 1983). 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<sup>+</sup> 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; Blesa, Phani et al. 2012). 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 (Yazdani, German et al. 2006). Este modelo se emplea mayormente en ratones, pero también se ha empleado en monos, perros y gatos. Por razones aún desconocidas las ratas son resistentes a la acción del MPTP y la eficacia del modelo es variable en ratones dependiendo de la cepa que se emplee (Chiueh, Markey et al. 1984).

### **1.5.3 Paraquat**

El paraquat (PQ) es un herbicida empleado en agricultura cuya estructura es semejante a la del MPP<sup>+</sup>. Como se ha descrito anteriormente, reportes epidemiológicos han relacionado el uso de herbicidas con la EP. En el caso de Paraquat existe evidencia de 95 casos de EP ligados a la toxicidad del mismo (Berry, La Vecchia et al. 2010). El PQ en altas dosis emplea el transportador de cationes orgánicos (OCT-3) y el transportador de dopamina (DAT) y es tóxico para las neuronas dopaminérgicas de la SN (Rappold, Cui et al. 2011). La importancia del PQ para la EP es la habilidad de inducir aumentos en  $\alpha$ -sinucleína en neuronas dopaminérgicas de la SN y su capacidad de inducir estructuras similares a los cuerpos de Lewy en las mismas (Manning-Bog, McCormack et al. 2002). Este modelo se ve limitado habitualmente solo al estudio de la formación de los cuerpos de Lewy y al rol de la  $\alpha$ -sinucleína en la EP.

### **1.5.4 6OHDA**

La 6OHDA es un análogo hidroxilado de la dopamina. En 1968 Ungerstedt 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 inhibitor de la cadena de fosforilación oxidativa, inhibiendo los complejos I y IV específicamente (Beal 2001; Blum, Torch et al. 2001).

La 6OHDA no cruza barrera BHE, razón por la cual debe ser inyectada de manera estereotáxica en el cerebro. El modelado de la EP se puede lograr inyectando la 6OHDA en tres estructuras blanco: el cuerpo estriado, la SN o el fascículo prosencefálico medial (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 parece ser debida a una degeneración neuronal retrógrada secundaria a la lesión de los terminales dopaminérgicos estriatales y no al transporte axonal retrógrado de la neurotoxina desde el estriado hacia la SN (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 progresivamente a partir de ese momento. Este modelo resulta muy interesante ya que reúne las características requeridas de neurodegeneración parcial y gradual.

## **2- Inflamación**

Las primeras descripciones de inflamación datan de hace 2000 años y se atribuyen al romano Celso. Él fue quien documentó los cuatro signos cardinales de la inflamación; Rubor (enrojecimiento), Tumor (endurecimiento), Calor y Dolor. En el siglo 19 Virchow agregó a estos signos, la pérdida de función (Scott, Khan et al. 2004). De esta manera quedó constituida la clásicamente definida inflamación. La inflamación 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 causan la aparición de los signos clásicamente descritos (Webster, Tonelli et al. 2002).

## **2.1 Inflamación en el Sistema Nervioso Central (SNC)**

La inflamación en el SNC, específicamente en el cerebro, está altamente regulada. Al estar el cerebro contenido dentro del cráneo, una distensión excesiva debido a una extravasación de líquido y células podría causar daño inespecífico de graves consecuencias funcionales (Yang, Min et al. 2007).

El término inflamación en el SNC se presta a confusión debido a las diversas maneras en las que se lo emplea. 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 periférico.

El SNC ha sido considerado como inmunológicamente privilegiado por poseer una BHE (Davson 1976; Mrass and Weninger 2006) ya que la misma afecta el libre pasaje de agentes patógenos y células inmunes al parénquima cerebral. La BHE posee selectividad sobre el pasaje de moléculas a y desde el SNC. Últimamente se postula una comunicación más fluida entre el SNC y el resto del organismo sin dejar de perder vigencia lo originalmente descrito (Zlokovic 2008).

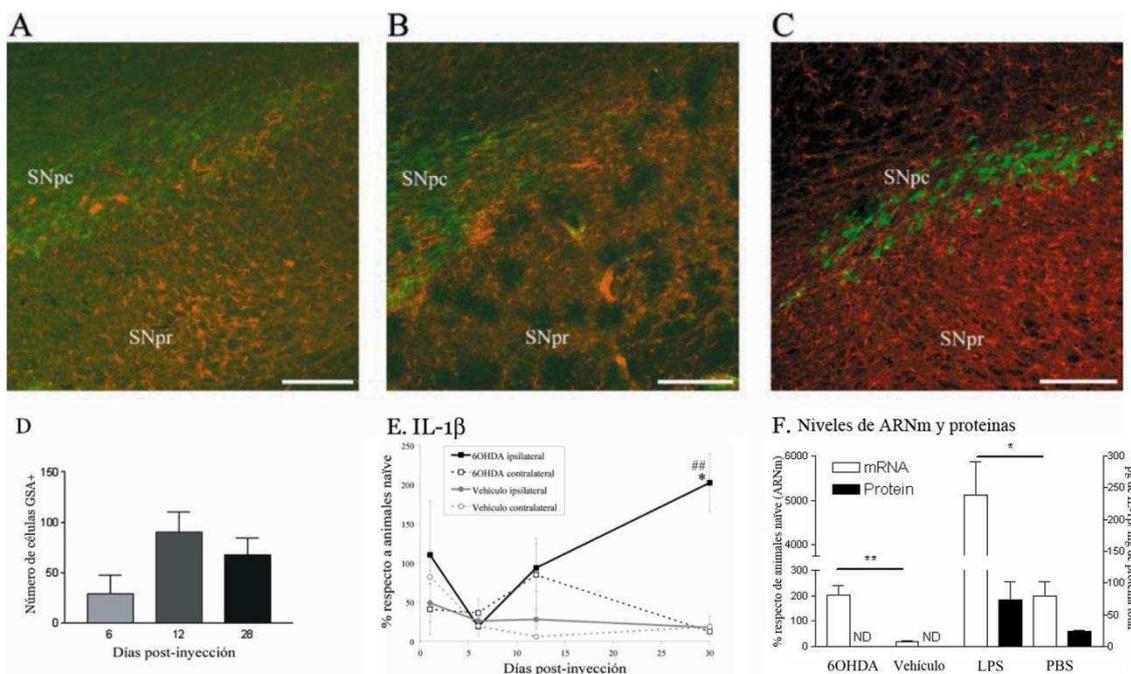
### **2.1.1 La Microglía**

La microglía es una célula con un rol fundamental en la neuroinflamación. Originalmente fueron reconocidas por Nissl y descritas como células con núcleo en forma de cetro en 1899 (Barron 2003). Fue del Rio Ortega quien las describió como un tipo celular específico con su tinción en plata en 1919, diferenciándolas de esta manera de células como los astrocitos y oligodendrocitos, otras células gliales (Rio-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). La microglía es el macrófago residente del SNC (Kreutzberg 1996). La microglía representa

aproximadamente el 10% de las células del cerebro (Perry 1988) y normalmente exhibe un fenotipo morfológico en reposo o “resting” (Kreutzberg 1996). Esta presentación en reposo es altamente sensible y puede cambiar su morfología en respuesta a diferentes alteraciones del microambiente cerebral o a procesos patológicos como infecciones o inflamaciones. Esto se conoce como activación morfológica (Banati, Gehrmann et al. 1993; Kreutzberg 1996; Kim and de Vellis 2005; McGeer and McGeer 2007). La activación microglial moderada cumple un rol homeostático en el cerebro, removiendo toxinas, células muertas y restos celulares (Nakamura 2002; Kim and de Vellis 2005). También es responsable de promover el crecimiento de procesos neuronales mediante la liberación de factores tróficos como el GDNF (factor neurotrófico derivado de una línea celular glial) y el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) (Aloisi 1999; Piehl and Lidman 2001; Streit 2002; McGeer and McGeer 2004; Hald and Lotharius 2005; McGeer and McGeer 2007).

Existe además una activación microglial atípica, en la que la microglía se encuentra parcialmente activada o “cebada”. Esta activación se ha descrito como consecuencia de la degeneración neuronal, la edad avanzada o la injuria entre otros (Perry 2004). En este estadio de activación atípica, las células son capaces de transcribir citoquinas pro-inflamatorias pero no de sintetizar la proteína en sí. Este concepto sugiere que una célula en estado cebado requeriría de un segundo estímulo menor al que requeriría una célula en reposo hasta quedar clásicamente activada. La respuesta de la microglía a un estímulo dado, depende de su estado de activación o cebado al momento del estímulo (Perry 2004). Los cerebros de personas ancianas y los pacientes que sufren Alzheimer presentan microglía cebada (Cunningham, Kongsman et al. 2002; Perry 2004; Cunningham, Wilcockson et al. 2005). Trabajos previos de nuestro laboratorio describen este fenómeno en la SN del modelo animal de EP basado en la inyección intraestriatal de 6OHDA (Depino, Earl et al. 2003) (Ver Figura i-1). En dicho trabajo se estudió el curso temporal de la activación de la microglía en la SN durante la neurodegeneración. 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 i-1 A-D). También se estudió el perfil de inducción de citoquinas en el cuerpo estriado y en la SN. Los niveles

de ácido ribonucleico (ARN) mensajero de interleuquina 1 beta (IL-1  $\beta$ ) se vieron inducidos en la SN ipsilateral a la inyección de la neurotoxina en el estriado (Figura i-1E). Dicha inducción comenzó a los 12 días post-inyección de 6OHDA y se mantuvo hasta los 30 días. Estos aumentos en los ARNm para IL-1  $\beta$  no fueron acompañados por incrementos a nivel proteico, medidos por ELISA (Figura i-1F). 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  $\beta$  tanto a nivel de ARNm como de proteína. Por lo tanto, la falta de detección de las proteínas en la SN ipsilateral, en neurodegeneración, se atribuyó a un control post-transcripcional, traduccional y/o post-traduccional. En resumen, estos datos sugieren que la expresión de IL-1  $\beta$ , está sujeta a un estricto control en la SN durante la neurodegeneración.



**Figura i-1** Caracterización de la respuesta microglial en la SN en degeneración. 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 $\mu$ 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) Análisis de la expresión de IL-1 $\beta$  por RT-PCR semicuantitativa en la SN ipsilateral a la inyección intraestriatal de la neurotoxina. Obsérvese el aumento en los niveles de ARNm de IL-1  $\beta$  en la SN a los 12 y 30 días post-inyección intraestriatal de 6OHDA. F) Comparación de los niveles de ARNm y proteína para IL-1  $\beta$  en la SN luego de 30 días de la inyección de 6OHDA o vehículo o 4 horas post inyección de Lipopolisacrido o PBS en la SN. Adaptado de Depino et al, 2003.

Como parte del proceso de activación, la microglía 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, Gehrmann et al. 1993; Ling and Wong 1993; Kreutzberg 1996; Raivich, Bohatschek et al. 1999). La microglía activada 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 (Kim and de Vellis 2005).

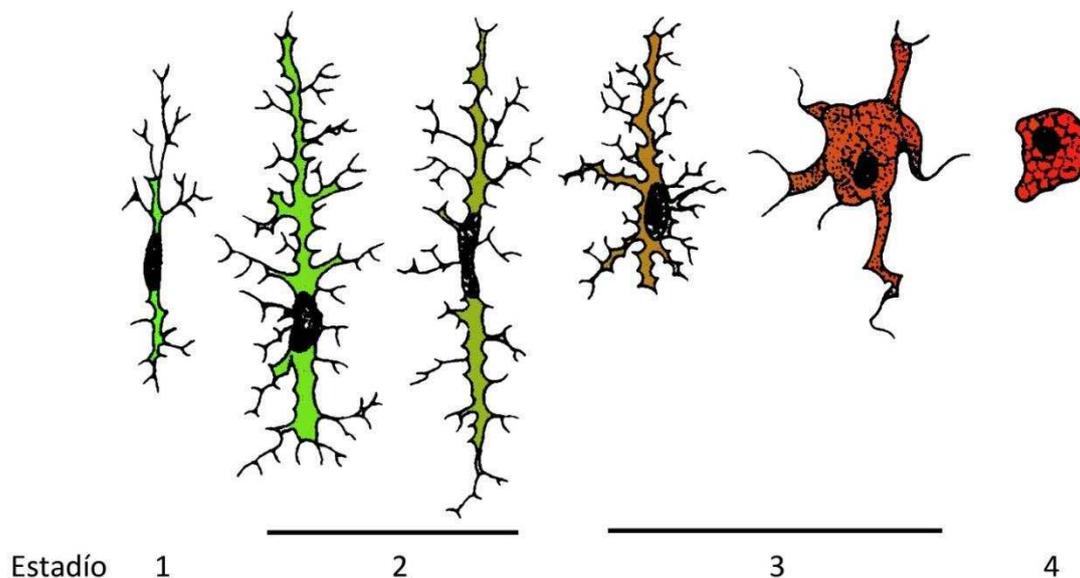
Los estadios de activación morfológica de la microglía se pueden estadiar adaptando la clasificación de Kreutzberg (Kreutzberg 1996)(Ver Figura i-2).

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 i-2** Estadios morfológicos de activación de la microglía modificado de Kreutzberg, 1996.

Consideraremos microglía activada a todos los estadios con excepción del denominado “en reposo” (estadio 1). 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 expresión de diferentes marcadores, entre ellos MHC-II. Por lo tanto, algunos de estos estadios de activación pueden ser también identificados por la presencia o ausencia de MHC-II+. En particular, el estadio 4 se lo puede caracterizar por positividad para el marcador de actividad fagocítica ED-1.

Existe numerosa evidencia que apunta a que la microglía activada y sus productos tienen un efecto neurodegenerativo. Sin embargo, también se ha observado, que la microglía tendría efectos neuroprotectores. Por lo tanto, podríamos concluir que, la microglía tendría efectos duales dependiendo de su activación y de los factores liberados al nicho neuronal (Perry, Cunningham et al. 2007; McGeer and McGeer 2008)

### **2.1.2 Citoquinas**

Las citoquinas son mediadores clave de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa. Los mediadores pro-inflamatorios más relevantes en esta respuesta son la interleuquina 1 y el factor de necrosis tumoral.

#### **2.1.2.1 Interleuquina 1 (IL-1)**

La historia de la IL-1 comienza con los estudios sobre la patogénesis de la fiebre. Estos estudios fueron realizados para estudiar las propiedades productoras de fiebre de proteínas llamadas “pirógenos endógenos”. Casi todos los microbios y sus productos inducen la producción de IL-1 (Dinarello 2002).

El término IL-1 describe una familia de dos proteínas altamente relacionadas, la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  que comparten escasa homología de secuencias pero acciones biológicas similares. Ambas moléculas se sintetizan como precursores, pero mientras el precursor de IL-1  $\alpha$  es biológicamente activo, el de IL-1  $\beta$  es inactivo y debe ser clivado por la enzima caspasa 1 (IL-1 converting enzyme - ICE) para tener actividad biológica (Dinarello 1991; Rothwell 2003).

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). La inyección sistémica de IL-1 produce fiebre, anorexia e hipotensión. Todos signos relacionados con el comportamiento asociado a enfermedad. Los genes para tres enzimas importantes son inducidos por IL-1; iNOS (enzima sintetizadora de óxido nítrico inducible), COX-2 (ciclooxigenasa 2) y fosfolipasa 2. Sus productos, el óxido nítrico, las prostaglandinas, leucotrienos y el factor activador de plaquetas son potentes mediadores pro-inflamatorios (Dinarello 1996).

#### **2.1.2.2 Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF)**

En 1975 Carswell identificó una citoquina que se liberaba en respuesta a la presencia de LPS y que se denominó TNF. Esta molécula era capaz de producir necrosis en tumores trasplantados en ratones y tenía un efecto citotóxico sobre líneas celulares tumorales (Carswell, Old et al. 1975). Con el tiempo se sumaron otros miembros a esta familia de citoquinas, que se conoce como la superfamilia de TNF, y de la que TNF- $\alpha$  se considera el miembro prototípico (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003).

TNF- $\alpha$  es sintetizado como una proteína que se inserta en la membrana formando homotrímeros (mTNF- $\alpha$ ). La enzima convertidora de TNF- $\alpha$  (TACE, del inglés TNF- $\alpha$  converting enzyme), que es una metaloproteasa, cliva la forma unida a membrana para dar lugar a la forma soluble de TNF- $\alpha$  (sTNF- $\alpha$ ). Tanto la forma trimérica unida a membrana como el trímero soluble son biológicamente activos.

TNF- $\alpha$  es una citoquina pro-inflamatoria prototípica, a la que se la considera un mediador clave en la respuesta inflamatoria, con la capacidad adicional de inducir apoptosis (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). Esta citoquina, expresada en forma sistémica en altas concentraciones, juega un rol importante en el desarrollo del shock séptico. Por otro lado, bajas concentraciones de TNF- $\alpha$  en forma prolongada puede producir caquexia (un estado de extrema debilidad, fatiga, anorexia y desnutrición) (Dvorkin and Cardinali 2003; Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). En modelos animales de esclerosis múltiple se describió que los ratones *knock-out* para TNF- $\alpha$  mostraban una reducción en la proliferación de progenitores de oligodendrocitos (Arnett, Mason et al.

2001) y retraso en la remielinización, como así también una falla en la regresión de la actividad de linfocitos T contra la mielina (Kassiotis and Kollias 2001).

TNF- $\alpha$  es capaz de inducir la síntesis de una gran variedad de moléculas, entre ellas se encuentran la óxido nítrico sintasa (NOS) y la ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2) y sus productos (el óxido nítrico y las prostaglandinas) que pueden ejercer efectos tóxicos sobre las neuronas.

## **2.2 Comunicación entre la inflamación periférica y la neuroinflamación**

El SNC y la periferia se comunican activamente mediante varias vías, en particular la humoral y la neural. La **vía neural** involucra la señalización de la respuesta inflamatoria proveniente de la cavidad tóraco-abdominal que puede realizarse vía aferentes vagales que terminan en el núcleo del tracto solitario, que a su vez señala a la porción del cerebro responsable del humor y la motivación entre otras (Konsman, Parnet et al. 2002; Dantzer, O'Connor et al. 2008). Desde el cerebro, la respuesta eferente es también mediada por el vago, que secreta acetilcolina que actúa sobre los receptores nicotínicos alfa 7 en los macrófagos llevando a la disminución de la secreción de las citoquinas inflamatorias en los mismos (Pavlov and Tracey 2005).

Es bien sabido que mediadores inflamatorios sistémicos pueden inducir la síntesis de citoquinas dentro del cerebro (Besedovsky and del Rey 1996; Pitossi, del Rey et al. 1997). La **vía humoral** es mediada por citoquinas que circulan por sangre y señalizan al SNC a través de varias vías. Los mecanismos relacionados con esta vía tienen relación con la integridad de la BHE. Las señales pueden pasar a través de los órganos circumventriculares, que poseen una BHE más permeable (Lacroix, Feinstein et al. 1998). Ciertas moléculas pueden atravesar la BHE mediante el uso de transportadores específicos. Algunas señales periféricas pueden activar a las células endoteliales en sí, induciendo de esta manera la síntesis de moléculas dentro del SNC. (Ek, Engblom et al. 2001). La permeabilidad de la BHE puede verse afectada por moléculas provenientes de la periferia causando daño en la misma, permitiendo de esta manera la entrada de granulocitos desde la periferia al cerebro (Bohatschek, Werner et al. 2001). La presencia de múltiples vías redundantes desde el sistema

inmune periférico hacia el cerebro resalta la importancia de este proceso de señalización (Perry 2010; Perry, Nicoll et al. 2010).

La ruptura de la BHE se ha descrito en EP tanto en modelos animales como en pacientes (Yan, Castillo-Melendez et al. 2004; Barcia, Bautista et al. 2005; Carvey, Zhao et al. 2005; Kortekaas, Leenders et al. 2005; Chen, O'Reilly et al. 2008). La disrupción de la BHE permite la extravasación de citoquinas proinflamatorias y células del sistema inmune que pueden activar a la microglía en la SN y de esta manera inducir neurodegeneración.

Desde la observación en pacientes de algunas infecciones se puede inferir el posible efecto de las mismas sobre el SNC. Se ha observado que las infecciones periféricas están asociadas a estadios avanzados de EP y son causa frecuente de deceso en los mismos (Nakashima, Maeda et al. 1997; Beyer, Herlofson et al. 2001). Además existen publicaciones que relacionan aumento de la sintomatología de la EP con infecciones bacterianas periféricas por *Helicobacter pylori* (Bjarnason, Charlett et al. 2005; Dobbs, Dobbs et al. 2005). A su vez, se ha reportado una correlación positiva entre la incidencia de parkinsonismos y la pandemia de influenza ocurrida en 1918 (Takahashi and Yamada 1999). Estos estudios sugieren en forma indirecta que puede existir una relación funcional entre la EP y la inflamación sistémica.

### **2.3 Modelos de EP basados en inflamación**

En nuestro laboratorio trabajamos bajo la hipótesis que la inflamación posee un rol funcional en la EP. A continuación se describe como dos moléculas proinflamatorias pueden emplearse para modelar la enfermedad.

#### **2.3.1 Lipopolisacárido de la pared bacteriana (LPS) como modelo de EP**

El LPS, un componente de la pared celular de las bacterias gram-negativas, es un potente inductor de la inflamación y presenta diversos efectos sobre las células del sistema inmune (Burrell 1990). La inyección intracerebral de LPS activa las células gliales in vivo (Bourdiol, Toulmond et al. 1991; Andersson, Perry et al. 1992; Montero-Menei, Sindji et al. 1994; Montero-Menei, Sindji et al. 1996; Szczepanik, Fishkin et al. 1996) y estudios in vitro (Bronstein, Perez-Otano et al. 1995) describen que las

neuronas dopaminérgicas fueron dos veces más sensibles a los efectos tóxicos de LPS al compararlas con neuronas TH negativas. Castaño y colaboradores han realizado un estudio en el cual mediante la inyección 2µg de LPS (de E. Coli serotipo O26:B6) en la SN de ratas adultas se observó activación de la microglía sostenida desde el día 2 post inyección hasta por lo menos el día 21. Esta activación se acompañó de un descenso de dopamina en cuerpo estriado y SN junto con disminución de las neuronas TH+ que perduró al menos hasta el final del experimento (día 21). Se concluyó, que según su estudio, el daño causado por la inyección del LPS no fue mediado por el óxido nítrico. Sugirieron que el mismo fue causado por los eventos inflamatorios dependientes del LPS e implicaron a estos procesos inflamatorios como posibles causantes de la EP (Castano, Herrera et al. 1998). Por estas razones consideramos que la inyección de LPS ofrece un modelo interesante para estudiar la respuesta del sistema dopaminérgico a un estímulo inflamatorio.

### **2.3.2 Interleuquina 1 (IL-1) como modelo de EP**

Con la intención de evaluar el efecto de la exposición crónica de IL-1 sobre la vitalidad neuronal, en el laboratorio se desarrolló un modelo de EP basado en la inyección de un adenovector expresando IL-1 en el SN (Ferrari, Pott Godoy et al. 2006). La expresión crónica de IL-1 por 60 días indujo la muerte de neuronas dopaminérgicas en la SN afectada acompañada de acinesia unilateral comenzando a los 21 días de la inyección. Estos dos efectos fueron acompañados de activación microglial e infiltrado inflamatorio. La expresión crónica de solamente una citoquina proinflamatoria logró provocar la mayoría de las características de la EP como por ejemplo muerte neuronal progresiva, compromiso motor y activación glial.

Otro modelo del laboratorio en el que se inyectó el adenovector expresando IL-1 en el cuerpo estriado produjo también muerte neuronal progresiva en la SN nigra acompañada de compromiso motor y activación microglial (Pott Godoy, Ferrari et al. 2010). Todos estos efectos se vieron atenuados con la administración de dexametasona, un tratamiento antiinflamatorio. Estos datos dan mayor importancia a la relevancia funcional de esta citoquina en la EP.

### 3 - EP y envejecimiento

La EP es una patología que afecta generalmente a personas mayores de 65 años (Bekris, Mata et al. 2010). Por ello es de suma relevancia estudiar la biología de la neuroinflamación en cerebros de individuos ancianos.

Los cambios asociados al proceso de envejecimiento normal pueden inducir cebado de la microglía (Perry 2004; Godbout, Chen et al. 2005; Chen, Buchanan et al. 2008; Dilger and Johnson 2008; Godbout, Moreau et al. 2008; Frank, Barrientos et al. 2010). La respuesta a estímulos inflamatorios se encuentra exagerada en ratones de edad avanzada (Godbout, Chen et al. 2005). En ratas de edad avanzada, la microglía expresa antígenos que normalmente están ausentes en ratas juveniles (Perry, Matyszak et al. 1993). Más específicamente, se ha visto que en ratones de edad avanzada aumenta la inmunorreactividad para las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 2, un marcador para microglía activada (Godbout, Chen et al. 2005).

La administración de LPS intraperitoneal en ratas envejecidas, resulta en la respuesta exagerada de citoquinas inflamatorias en el cerebro (Godbout, Chen et al. 2005; Chen, Buchanan et al. 2008; Henry, Huang et al. 2009). Se han reportado hallazgos similares en ratas inoculadas con *Escherichia Coli* (Barrientos, Higgins et al. 2006).

Inyecciones de LPS intracerebroventricular en ratones evidenciaron la misma respuesta diferencial en animales ancianos al compararlos con grupos de jóvenes (Huang, Henry et al. 2008). Esto sugiere que la respuesta diferencial en animales ancianos es independiente de señales inmunes provenientes de la periferia. Consistente con este hecho, se ha observado que ratones ancianos manifiestan severa anorexia, comportamiento similar a depresión y déficits de aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo ante inyecciones de LPS intraperitoneal al compararlos con grupos de animales jóvenes (Godbout, Moreau et al. 2008).

Estas observaciones en roedores son de suma importancia debido a que es común en pacientes ancianos observar impedimento agudo de las capacidades cognitivas asociadas a infecciones periféricas. Una respuesta inmune iniciada durante

un proceso infeccioso, que normalmente sería adaptativa, podría provocar severos déficits cognitivos en ancianos llevando en última instancia a una complicación mayor de la patología de base (Holmes, El-Okel et al. 2003).

## Objetivos

## **Objetivo general**

Al modelar la EP en ratas con la inyección en la SN de 6OHDA observamos la aparición de microglía cebada. En este estadio de activación, como describimos anteriormente, hay aumento de ARNm de IL-1 sin la detección de la proteína en sí. De esta manera, un estímulo pro-inflamatorio posterior podría activar la microglía a estadios avanzados, provocar la traducción de IL-1 y desplazar el equilibrio hacia un estado proinflamatorio neto. En esta situación, el estímulo pro-inflamatorio posterior a la neurodegeneración tendría un efecto unívocamente neurodegenerativo

En otras palabras, consideramos 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.

## **Hipótesis**

Nuestra hipótesis de trabajo es que un estímulo inflamatorio central o periférico que impacta en la SN en degeneración de un modelo animal de EP causa exacerbación de dicha neurodegeneración.

## **Objetivos específicos**

En base a esta hipótesis planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de un estímulo pro-inflamatorio periférico sobre la neurodegeneración en el modelo animal de EP para animales adultos y para animales ancianos y los mecanismos celulares asociados a estos efectos. (Capítulo I).
2. Desarrollar un modelo robusto de neurodegeneración parcial de las neuronas dopaminérgicas de la SN. Para lograr este objetivo es indispensable analizar las variables involucradas en la variación de la eficacia de la neurotoxina empleada (Capítulo II).

3. Analizar los mecanismos moleculares de los efectos de la inflamación sobre la neurodegeneración por medio de microarrays. (Capítulo III).

# Materiales y Métodos

## **Materiales y Métodos**

### **1. Animales**

En el desarrollo de esta tesis se emplearon ratas Wistar macho adultas provenientes del INAME (Instituto Nacional de Medicamentos), del Bioterio de la Fundación Instituto Leloir y ratas Wistar Hokkaido provenientes del Bioterio de la Universidad de la Plata. Las mismas pesaron de 250 a 300 gramos al comienzo de los experimentos. Los animales adultos empleados tenían entre 2 y 3 meses de vida al comienzo de los experimentos. Los experimentos con animales envejecidos comenzaron a los 18 meses de vida.

Los animales se mantuvieron en grupos de a 3-4 animales por jaula (plásticas o metálicas) en ambientes con temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y 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.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las normativas para el uso de animales del National Institute of Health (NIH), USA, y fueron aprobados por el comité de ética del Instituto Leloir (CICUAL).

### **2. Procedimientos quirúrgicos**

#### **2.1 Anestesia**

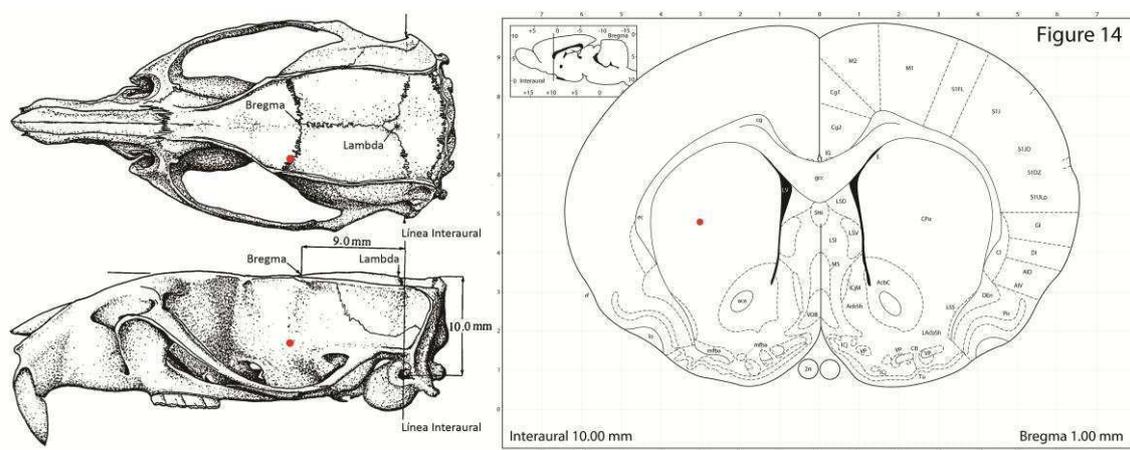
Los animales fueron anestesiados con una asociación de clorhidrato de ketamina (80mg/Kg) y xilazina (8mg/Kg) intramuscular o mediante inhalación de isoflurano al 3-5% de saturación en aire comprimido bajo un caudal de 1 litro por minuto.

#### **2.2 Inyecciones**

Las operaciones en el sistema nervioso central se realizaron durante la mañana para evitar variaciones causadas por el ritmo circadiano. Las coordenadas de inyección de la región deseada fueron determinadas según el atlas de cerebro de rata (Paxinos y Watson, 1986). Todas las inyecciones se realizaron en marcos estereotáxicos para animales pequeños de Stoelting.

### 2.2.1 Inyección de 6OHDA o vehículo en el cuerpo estriado.

Para las operaciones del Capítulo 1 (en ratas adultas y ancianas) se inyectaron 20ug de 6OHDA disueltos en 4  $\mu$ l del vehículo. El vehículo consistió en una solución de ácido ascórbico al 2% en solución salina y tiene el fin de estabilizar la 6OHDA y reducir su oxidación. Las coordenadas determinadas para la inyección en cuerpo estriado, desde el bregma, fueron +1 mm anteroposterior, +3 mm lateral izquierdo y -4.5 mm de profundidad medidos desde la corteza (Ver Figura 1).



**Figura 1** – Esquema mostrando el sitio de inyección en rojo, sobre el cráneo de la rata y en las coordenadas estereotáxicas seleccionadas para cuerpo estriado. En el esquema de perfil del cráneo de rata se esquematiza la profundidad de la inyección, también en rojo. Modificado del atlas de cerebro de rata de Paxinos (Paxinos and Watson 1986).

Las operaciones del Capítulo 2 se detallan dentro del mismo, por ser las operaciones en sí una de las variables analizadas en el desarrollo del mismo.

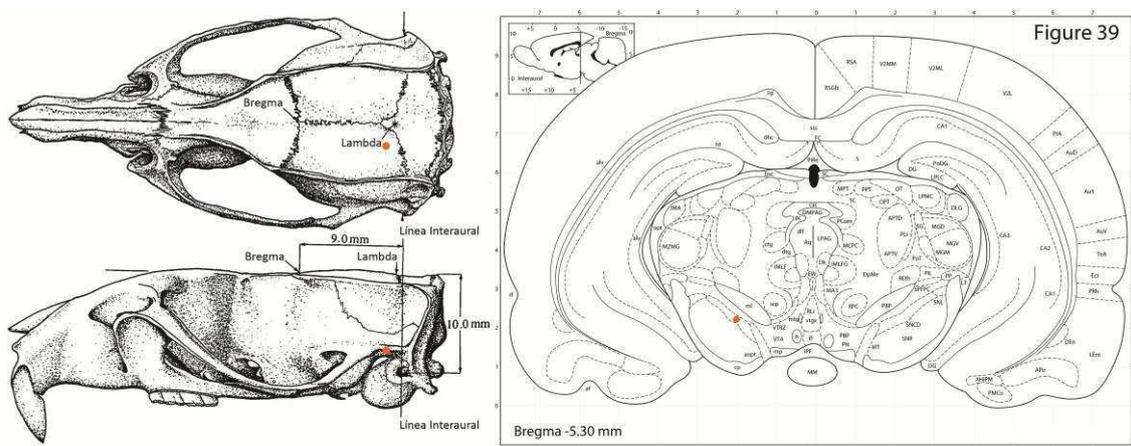
Para las operaciones del Capítulo 3, se procedió de la misma manera que en el capítulo 1, inyectando esta vez 65ug de 6OHDA y empleando anestesia gaseosa en lugar de intramuscular.

Para las inyecciones se emplearon jeringas Hamilton con agujas 26G biseladas. La inyección se realizó con un flujo de 0,5  $\mu$ l/minuto, la aguja se retiró en dos etapas dejando un minuto en cada etapa para evitar el reflujo.

### 2.2.2 Estímulo inflamatorio central - Inyección de LPS o vehículo en la SN

Doce días luego de la inyección estereotáxica de 6OHDA en el cuerpo estriado se inyectaron 0.3  $\mu$ g del LPS disueltos en 2  $\mu$ l de PB. (cepa 0111:B4 Sigma, USA). Las

coordenadas determinadas para la inyección en sustancia nigra, desde el bregma, fueron -5.3 mm anteroposterior, +2 mm lateral izquierdo y -7.2 mm de profundidad medidos desde la corteza (Ver Figura 2).



**Figura 2** – Esquema mostrando el sitio de inyección en naranja, sobre el cráneo de la rata y en las coordenadas estereotáxicas seleccionadas para SN. En el esquema de perfil del cráneo de rata se esquematiza la profundidad de la inyección, también en naranja. Modificado de Paxinos (Paxinos and Watson 1986).

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  $\mu$ l por lo que causa una lesión mecánica mínima al tejido nervioso donde es introducida. El flujo de administración fue de 0,25  $\mu$ l/min y la remoción del capilar se realizó en dos etapas separadas por un minuto de reposo en que no se movía el capilar.

### **2.2.3 Estímulo inflamatorio periférico - Inyección periférica de Adenovector (Ad) productor de IL-1 (AdIL-1) o Ad productor de $\beta$ galactosidasa (Ad $\beta$ gal) como control.**

Siete días después de la inyección estereotáxica de 6OHDA se inyectaron de manera intravenosa,  $1.36 \times 10^9$  partículas infectivas de AdIL-1 o su control Ad $\beta$ Gal en la vena de la cola de las ratas. El mismo se disolvió en 300  $\mu$ l de buffer para adenovectores (Tris-Cl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, pH 7.8). Luego de la inyección de los adenovirus se inyectaron 300  $\mu$ l de solución fisiológica estéril sin remover la aguja de

su sitio de inyección. El procedimiento se realizó con los animales bajo anestesia. Los controles de inyección (recuentos leucocitarios y fórmula leucocitaria) son descriptos junto con cada uno de los resultados de los experimentos.

### **3. Estudio comportamental**

La integridad y funcionalidad de la vía nigroestriatal se estudió con un test comportamental no farmacológico.

Se realizó el **ensayo del cilindro** descrito por Schallert (Schallert and Jones 1993). En este test se evalúa el uso de los miembros delanteros de los animales al posarse sobre un cilindro de acrílico. Para realizar este test, se pone individualmente a cada animal en un cilindro transparente de acrílico de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura. Se cuentan las veces que el animal posa su peso sobre la pared del cilindro, en un lapso de 5 minutos, con cada una de las patas delanteras diferenciando derecha de izquierda. En un animal sano los toques deberían ser aproximadamente iguales con cada una de las patas. Los animales lesionados apoyan más veces la pata ipsilateral a la lesión ya que las vías de inervación motora se cruzan.

### **4. Vectores Adenovirales**

En el desarrollo de esta tesis se emplearon los siguientes vectores virales; el adenovector que expresa el gen de la  $\beta$ -galactosidasa y el adenovector que expresa la interleuquina 1 $\beta$  humana.

#### **4.1 Producción y Controles de los stocks**

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 esto, se agregó 2-3  $\mu$ l del stock viral correspondiente en 7 ml del medio de cultivo. Se agitó cada 20 minutos durante 2 horas. Luego se cambió el medio por Dulbecco's Modified Eagle Medium (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, definido como células redondeadas formando redes, no muy levantadas. Al llegar al punto de mayor efecto citopático y menor lisis celular, se levantó la placa sin tripsina (se dejó 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 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 detritos celulares en el sobrenadante. Se diluyeron 6 ml de este sobrenadante en 250 ml de DMEM alta glucosa con 10% suero fetal bovino (FBS por sus siglas en inglés) 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 8 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 cambió 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 hasta observar el efecto citopático homogéneo en todas las placas (unas 24 horas).

Se levantaron las células por acción mecánica luego de dejar las placas 10 minutos a temperatura ambiente para facilitar el despegado de las células. Se trasvasó el medio con células a varios tubos falcon de 50 ml y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Luego se descartó el sobrenadante, 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 detritos celulares y conservar el sobrenadante rico en partículas virales.

Purificación del stock viral: Se prepararon dos gradientes de cloruro de cesio (2,5 ml de densidad 1,6 y 2,5 ml de densidad 1,3) en 4 tubos de polialómero y se agregó sobre el mismo, sin malograr el gradiente, la cuarta parte 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 ultracentrifugó a 35000 rpm a 20°C por 90 minutos. Se extrajo, mediante una punción con aguja del tubo de polialómero, la banda inferior correspondiente al adenovirus en cada uno de los 4 tubos. Lo extraído de los 4 tubos se unificó. Se pasó a

otro tubo de polialómero conteniendo una solución de cloruro de cesio de densidad 1,34 con cuidado de no mezclar ambas fases. Se ultracentrifugó nuevamente 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 por sus siglas en ingles) y Tris-ClH pH 7,4 y 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  $1 \times 10^{12}$  partículas/ml. Se seleccionaron y juntaron las fracciones de OD más alto y el stock se alicuotó de a 10  $\mu$ l en tubos de 0,5 ml. Se almacenó a -80°C hasta su uso.

Como controles de calidad de los stocks, se caracterizaron los vectores por mapeo de los patrones de restricción. Para asegurar que los adenovectores no hubieran incorporado la región E1 por recombinación con el genoma de las células 293, se verificó la ausencia de virus replicativos por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para esta región (Bett, Haddara et al. 1994; Kolb, Margetts et al. 2001). A su vez se determinó que los stocks no estuvieran contaminados con LPS mediante el test Pyrotell (Pyrolab) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los stocks fueron cuantificados además por la dosis infectiva en cultivo de tejidos 50 (DICT50/ml).

Los títulos de los stocks generados fueron:

$1,39 \times 10^{12}$  para el AdIL-1

$1,25 \times 10^{12}$  para el Ad $\beta$ gal

## 5. Procesamiento de las muestras para el análisis histológico

Los animales destinados a estudios histológicos fueron anestesiados con ketamina y xilazina y perfundidos transcardíacamente con 50 ml de solución fisiológica heparinizada (2 U por ml) seguido de 300 ml de una solución fría de paraformaldehído 4% (preparada dentro de las 24 hs antes de su uso) en buffer fosfato (PB) (para 1 litro de PB 0,1M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.3gr,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  18.93gr, llevar a volumen con agua destilada estéril, pH=7,4). Las perfusiones se realizaron con una bomba peristáltica (Masterflex, Cole Palmer Instrument Co., IL, USA) con un flujo constante de 10 ml/min.

Los cerebros fueron removidos y postfijados durante 24 horas en la misma solución fijadora en frío (4-8°C). Los mismos fueron criopreservados 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 almacenaron a - 20°C hasta el momento de ser cortados. Se realizaron cortes de 40 µm de grosor en series de 6 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.

## **6. Análisis histológicos**

### **6.1 Tinción de Nissl**

Este colorante básico tiñe los cuerpos o gránulos de Nissl, que son acumulaciones basófilas que se encuentran en el citoplasma de las células nerviosas. Estos gránulos son retículo endoplásmico rugoso. Los cuerpos de Nissl se encuentran en el soma 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 filtrada de Violeta de Cresilo (0,1g en 100ml de acetato de sodio 0,2M pH=3,8) 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.

### **6.2 Inmunohistoquímica**

Las reacciones inmunohistoquímicas se realizaron en 1 de cada 6 cortes seriados de 40 µm de espesor en solución, sin montar en portaobjetos (*free-floating*). 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 PB 0,1M, filtrado). Todos los lavados de los cortes se realizaron con buffer fosfato salina (PBS) (Para 1 litro de PBS 1X; NaCl 8gr, KCl 0.2gr, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44gr, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24gr. Llevar a volumen con agua destilada estéril). Las secciones se levantaron en portaobjetos gelatinizados, se deshidrataron y luego se montaron con Bálsamo sintético.

### **6.2.1 Detección de neuronas dopaminérgicas (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 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 conejo generado en burro y biotinilado (dilución 1:200, Jackson Laboratorios, West Grove, PA, USA).

## **6.3 Inmunofluorescencia**

Todas las inmunofluorescencias fueron realizadas en cortes en flotación (*free-floating*) de 40 µm 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).

### **6.3.1 Marcación doble para microglía (GSA) y neuronas dopaminérgicas (TH).**

Para visualizar todos los estadios de activación de la microglía en la SN se realizó una tinción doble con la isolectina B4 de Griffonia Simplicifolia biotinilada (GSA), que es un marcador de microglía, y un anticuerpo anti TH, para delimitar la región. Se lavaron los cortes con PBS-Tritón (PBS-TX) 0.01% (2 lavados de 10 minutos cada uno) y se los bloqueó por 45 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, Burlingame, CA, USA) y el anticuerpo anti TH. La lectina GSA se une a los residuos a-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 Cy2 (dilución 1:200 en PB, Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA) y el anticuerpo secundario fue anti conejo conjugado con Cy3 (dilución 1:200 en PB, Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA) por 2 horas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Se analizó la activación de la microglía en el área de la SN delimitada por el anticuerpo para neuronas dopaminérgicas (TH).

### **6.3.2 Marcación doble para el Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (MHC-II) y neuronas dopaminérgicas (TH).**

Para visualizar específicamente la microglía activada se realizó una tinción doble con un anticuerpo para MHC-II, que es un marcador de microglía activada, y un anticuerpo anti TH, para delimitar la región de la SN.

Se lavaron los cortes con PBS-TX (2 lavados de 10 minutos cada uno) y se los bloqueó por 45 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 MHC-II generado en ratón (dilución 1:200, Serotec) y el anticuerpo anti TH. Luego de lavarlos con PB, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario anti ratón conjugado con el fluoróforo Cy3 (dilución 1:200 en PB) y con el anticuerpo secundario anti conejo conjugado con Cy2 (dilución 1:200 en PB) por 2 horas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Se cuantificó la microglía activada en la SN delimitada por el área marcada con el anticuerpo para neuronas dopaminérgicas (TH).

### **6.3.3 Marcación doble para microglía con actividad fagocítica (ED1) y neuronas dopaminérgicas (TH).**

Para detectar la microglía con actividad fagocítica en la SN se utilizó ED1. El anticuerpo anti ED1 tiene especificidad por la membrana lisosomal. El antígeno es expresado por la mayoría de los macrófagos tisulares y más débilmente por los granulocitos de la sangre periférica. Se lavaron los cortes con PBS-TX (2 lavados de 10

minutos cada uno) y se los bloqueó por 45 minutos en una solución de PBS-TX 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. Luego de lavarlos con PB, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario anti ratón conjugado con el fluoróforo Cy3 (dilución 1:200 en PB) y con el anticuerpo secundario anti conejo conjugado con Cy2 (dilución 1:200 en PB) por 2 horas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Se analizaron los macrófagos en la SN delimitada por el anticuerpo para neuronas dopaminérgicas (TH).

#### **6.3.4 Marcación doble para astrocitos (GFAP) y para neuronas dopaminérgicas (TH).**

Para detectar los astrocitos en la SN se utilizó GFAP. El anticuerpo anti GFAP tiene especificidad por la proteína ácida fibrilar glial (GFAP por sus siglas en inglés) un filamento intermedio fuertemente expresado en astrocitos. Se lavaron los cortes con PBS-TX (2 lavados de 10 minutos cada uno) y se los bloqueó por 45 minutos en una solución de PBS-TX 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 GFAP generado en vaca (dilución 1:700, DAKO) y el anticuerpo anti TH. Luego de lavarlos con PB, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario anti ratón conjugado con el fluoróforo Cy3 (dilución 1:200 en PB) y con el anticuerpo secundario conjugado con Cy2 (dilución 1:200 en PB) por 2 horas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Se analizaron los astrocitos en la SN delimitada por el anticuerpo para neuronas dopaminérgicas (TH).

#### **6.4 Visualización de las inmunomarcaciones - Microscopía**

Todas las inmunohistoquímicas fueron visualizadas con un microscopio Nikon Eclipse E600 con luz transmitida a 4x, 10x, 20x y 40x de aumento.

Todas las inmunofluorescencias fueron analizadas con un microscopio de fluorescencia Olympus y las fotos fueron sacadas utilizando el mismo un microscopio.

## 6.5 Cuantificación de neuronas dopaminérgicas en SN

Para identificar las neuronas dopaminérgicas de la SN, realizamos una inmunohistoquímica para detectar TH. Los cuerpos celulares de las neuronas TH positivas fueron contados en forma manual en uno de cada seis cortes seriados de 40  $\mu\text{m}$  en toda la sustancia nigra pars compacta de ambos hemisferios, definida por la marca de TH y por las referencias anatómicas del atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson 1997). El conteo se realizó a ciego, bajo un objetivo 10X de un microscopio Nikon Elipse E600. Los resultados fueron expresados como porcentaje de neuronas remanentes en la sustancia nigra ipsilateral a la inyección con respecto a la contralateral.

## 7. Estudio de *microarrays*

### 7.1 Obtención de muestras, calidad del ARN

Los animales fueron decapitados y el cerebro fue disecado bajo lupa en menos de 6 minutos colocando cada región (SN *izquierda, ipsilateral* a la operación y *derecha, contralateral* al hemisferio operado) en tubos eppendorf rotulados a tal fin. Las muestras se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

El ARN total se extrajo utilizando TRI-Reagent según las instrucciones del fabricante (Sigma), y se cuantificó midiendo absorbancia (A) a 260 nm utilizando un espectrofotómetro Nanodrop. Para determinar la calidad del ARN extraído se midió la absorbancia a 280 nm y 230 nm, y se corrieron las muestras en un gel de agarosa. Una relación  $A_{260}/A_{280}$  óptima debe ser superior a 1.8 para que el ARN pueda ser analizado por *microarrays*, y una disminución en la misma refleja contaminación con proteínas. Por su lado, los contaminantes orgánicos (como fenol, trizol y otros agentes utilizados en la extracción de ARN) absorben luz a una longitud de onda de 230 nm. Las muestras con una relación baja de  $A_{260}/A_{230}$  (por debajo de aproximadamente 1.8) tienen presencia de estos contaminantes. Si las muestra denotaban presencia de contaminantes se procedió a hacer una limpieza del ARN mediante las columnas (en su función de limpieza) del RNeasy Minikit (Qiagen) según las instrucciones de fabricante.

Solo se analizaron estas muestras por microarrays si su relación A260/A230 era superior a 1.8. Por otro lado, con el objetivo de corroborar la integridad del ARN y de evaluar si estaba contaminado con ADN genómico, se corrieron las muestras en un gel de 1% de agarosa. El ADN genómico se observaría como una banda de alto peso molecular, que migraría cerca del sitio de siembra o un chorreado. La integridad del ARN se evalúa a través de las bandas correspondientes a los ARN ribosomales (ARNr) 28S y 18S, que deben observarse como dos bandas nítidas, siendo la primera aproximadamente el doble de intensa que la segunda. Otro signo de degradación del ARN es la aparición de un chorreado por debajo de las bandas de ARNr.

## 7.2 Técnica de microarrays

Las muestras de ARN de SN de los 4 grupos de animales inyectados junto con el ARN de referencia de rata (Agilent, GE), se amplificaron y marcaron usando el kit SuperScript Indirect RNA Amplification System (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sintetizó la primera cadena de ADNc usando la retrotranscriptasa SuperScript III y un primer oligo(dT), que está acoplado a un promotor T7. Luego de la síntesis de la segunda cadena, y de una purificación, el ADNc se utilizó como molde para una transcripción in vitro usando la T7 ADN polimerasa. En este paso se amplificó el ARN, generando el ARN antisentido (ARNa), complementario al ARNm original, y se incorporó al ARNa un nucleótido modificado (el aminoallyl UTP). Luego de purificar el ARNa, se lo cuantificó midiendo absorbancia a 260 nm. A continuación, se marcaron 5 µg de aminoallyl ARNa, utilizando los fluoróforos Alexa Flúor, los cuales poseen un grupo éster que se une covalentemente a los nucleótidos modificados del ARNa. El ARN de referencia se marcó con el fluoróforo Alexa Flúor 555 (Verde) y los ARNs de las muestras se marcaron con Alexa Flúor 647 (Rojo). Luego de la marcación indirecta del ARNa, y de un paso de purificación para eliminar los fluoróforos no incorporados al ARNa, se cuantificó por absorbancia la cantidad de ARNa recuperado y la cantidad de fluoróforo incorporado al mismo. Los microarrays se pre-hibridaron incubándolos en Solución Citrato Salina (SSC) 5X, SDS 0.1% y BSA 0.1% durante 45 minutos a 42°C. (Para 1 litro de SSC 5X: NaCl 43,82gr, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 22.05gr llevar a pH7 y cantidad suficiente de agua destilada estéril para llegar a volumen).

Luego de dos lavados con agua milliQ durante 5 minutos, se co-hibridó en cada vidrio 60 pmoles de fluoróforo incorporado al ARNa de las muestras junto con 60 pmoles de fluoróforo incorporado al ARNa de referencia, en buffer de hibridación (SSC 2X, formamida 50/ , ADN de esperma de salmón 1 ug/ul). La hibridación se realizó durante toda la noche a 42°C en cámaras de hibridación. A continuación se hicieron tres lavados sucesivos de 5 minutos cada uno (en estaciones de lavado), utilizando tres buffers diferentes (buffer 1: SSC 2X, SDS 0.1/ , buffer 2: SSC 0.1X, SDS 0.1/ , buffer 3: SSC 0.1X) Finalmente, los microarrays fueron escaneados en un escáner GenePix 4000B.

### 7.3 Análisis de datos

El análisis de los datos de los experimentos de *microarrays* fue llevado a cabo por el Dr. Elmer Fernandez y el Bioing. Cristobal Fresno del Grupo de Minería de Datos en Bio-Ciencias de la Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Para el análisis de expresión diferencial se utilizó el software estadístico R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org), R Development Core Team et al. 2009) con la librería "limma" disponible en Bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org), Gentleman et al. 2009). Se aplicó para cada gen el siguiente modelo:

$$\text{Log}(\text{Crojo}/\text{Cverde})_{ij} = \mu + A_i + B_j + A * B_{ij} + E_{ij}$$

donde  $i = \text{"6OHDA" "Asc"}$  y  $j = \text{"LPS" "Veh"}$

Donde  $\mu$  es la expresión media del gen; A y B los efectos principales; A\*B la interacción de los mismos y se asume que el error cumple con  $E_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$ . Dichos modelos se ajustaron mediante la técnica de mínimos cuadrados con homogeneización bayesiana de la varianza (Smyth 2004).

A partir del modelo ajustado, se plantea el contraste de interés biológico (existencia de interacción), donde se le pregunta al modelo por aquellos genes que presentan interacción significativa a un nivel de  $p < 0.05$  y  $|\log_2(\text{Fold-Change})| > 0.65$ , es decir, aquellos genes que varían diferencialmente cuando comparamos la diferencia

de intensidad de ratas 6OHDA/LPS contra 6OHDA/Veh (efecto de LPS sobre 6OHDA) versus Asc/LPS contra Asc/Veh (efecto de LPS sobre ratas control). Se obtienen de este análisis 472 genes que se encontraban diferencialmente expresados al contrastar el efecto de LPS sobre 6OHDA con el efecto de LPS sobre ratas control.

Finalmente, con estos candidatos se realizó un análisis de enriquecimiento de ontologías (Set Enrichment Analysis) basado principalmente en Gene Ontology. El proyecto de ontología génica, es una iniciativa de la bioinformática cuyo principal objetivo es proveer un sistema de clasificación con el cual poder anotar genes y sus productos a nivel funcional y estructural a través de las distintas especies y bases de datos (Ashburner, Ball et al. 2000). Para ello se empleó el método de contrastes de múltiples referencias, MRCM por sus siglas en inglés (Fresno, Llera et al. 2012). Posteriormente se exploraron en forma detallada las ontologías teniendo en cuenta el proceso biológico en que los genes diferenciales estaban involucrados.

## **8. PCR en tiempo real**

### **8.1 Transcripción reversa**

La transcripción reversa, en la que se sintetiza el ADN complementario (ADNc), se llevó a cabo utilizando el ARN obtenido para microarrays, primers oligo(dT)(Invitrogen) y la retrotranscriptasa (RT) SuperScript II (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En paralelo, se incluyeron reacciones sin RT, para evaluar cualquier posible contaminación con ADN genómico. Las muestras no fueron tratadas con ADNasas, ya que este tratamiento suele implicar una pérdida importante en la cantidad de ARN. Alternativamente, diseñamos los primers de modo tal que no amplifiquen ADN genómico o que sean capaces de diferenciar los productos de amplificación del ARNm de los del ADN genómico. Así, se pueden diferenciar estos dos productos en un gel de agarosa, y es posible confirmar que no hay contaminación con ADN genómico si no se observa la banda correspondiente.

### **8.2 Genes de referencia (housekeeping)**

Luego de la retrotranscripción se realizó una PCR en tiempo real (RT-PCR) para cuantificar la cantidad de un dado ARNm en las muestras. En la técnica de PCR en tiempo real se usa una molécula fluorescente reportera para monitorear el progreso de la reacción de amplificación. Nosotros utilizamos el fluoróforo SYBR Green I, que tiene una baja fluorescencia en solución, pero al intercalarse en la doble hebra de ADN la misma aumenta más de 1000 veces. Por lo tanto, con cada ciclo de amplificación la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentración de ADN de doble cadena. Es posible graficar fluorescencia vs. el número de ciclo (curvas de amplificación) y determinar un nivel umbral de detección de fluorescencia por arriba del background. El número de ciclo en el cual la fluorescencia de una muestra cruza ese umbral se denomina ciclo umbral o “cycle threshold” (Ct). El valor de Ct es inversamente proporcional a la concentración inicial del ADN de interés: cuanto menor es el Ct mayor es la cantidad inicial de ADN molde presente en la muestra, pues se requiere una menor amplificación para su detección.

En todas las RT-PCR en tiempo real las muestras se corrieron por triplicado, incluyendo también el control sin RT y un control sin molde (donde se puso agua en lugar de muestra). Como fluoróforo de referencia utilizamos ROX, cuya fluorescencia no está ligada a la amplificación, y por lo tanto permite la calibración por la fluorescencia inicial en cada tubo (para corregir, por ejemplo, errores de pipeteo). Al final de la reacción de amplificación se realizó una curva de disociación (o curva de melting), en la que se aumenta la temperatura, produciendo la desnaturalización del ADN. La temperatura en la que cada molécula de ADN se desnaturaliza depende de su tamaño y secuencia. Por lo tanto, un único pico en la curva de disociación (fluorescencia vs. temperatura) indica la ausencia de productos inespecíficos. Los artefactos como dímeros de primers tienen una temperatura de disociación menor que los amplicones debido a su tamaño pequeño.

Las secuencias para los *primers* de los genes de referencia fueron;

**Tata Binding Protein** (amplicón 114pb)

TBP forward ACCGTGAATCTTGGCTGTAA

TBP reverse CCGTGGCTCTCTTATTCTCA

**B2microglobulina** (amplicón 242pb)

Rat B2 microg A TCTTTCTGGTGCTTGTCTC

B2antisense AGTGTGAGCCAGGATGTAG

**GAPDH** (amplicón 136pb)

R-GAPDH 6F ACAACTCCCTCAAGATTGTCAGCA

R-GAPDH 7R TTCTGAGTGGCAGTGATGGCAT

Programa de ciclado: El programa de ciclado consistió en un ciclo inicial de 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de 45 segundos a 95°C, 1 minuto a 62°C (durante el cual se recolectó la información para las curvas de amplificación) y 1 minuto a 72°C, y finalmente un ciclo de 1 minuto a 95°C, un ciclo de 30 segundos a 55°C y un ciclo de 30 segundos a 95°C (entre los cuales se recolectó la información para las curvas de disociación).

**8.2.1 Análisis de la expresión de los genes de referencia**

Al comparar los niveles de expresión de los genes de referencia en los diferentes grupos experimentales se verificó que la expresión de los mismos se mantuviera constante entre grupos. Se asume que si el valor de expresión entre los grupos permanece constante es porque dichos genes se expresan en forma estable.

**8.2.2 Genes de interés**

Las secuencias empleadas para los *primers* de los genes de interés fueron;

**Cmklr1** chemokine-like receptor 1 (376pb)

Cmklr1\_F GGGCATCACAGCCCCGATGG

Cmklr1\_R AGCTTCCCCCACCCTGACT

**Il17c** interleukin 17C (313pb)

IL17c\_F TGCCACTGTGATGTGTCTCTCTGC

IL17c\_R GCGCTCGTGGGTGTCAGCTT

**Kcnh5** potassium voltage-gated channel, H5 (203pb)

Kcnh5\_F GCGCAGAGCGACCCTGAGAG

Kcnh5\_R GGCTCAGCACACCATTGGGC

**Enpp1** ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (162pb)

Enpp1\_F CCAGTGACCTCGGCTGCACAT

Enpp1\_R GGAGCAGACAGACGCGGTGC

**Rufy3** RUN and FYVE domain containing 3 (285pb)

Rufy3\_F TTGCTGGCCTCCTGGTCGGT

Rufy3\_R TGGCGACGGCAAGTTCCTCTG

**Grm6** glutamate receptor, metabotropic 6 (285pb)

Grm6\_F GTGGTGGAGGCATGTGGAGGG

Grm6\_R GCACCGTGGGAAACCGGGAA

**Gpr44** G protein-coupled receptor 44 (393pb)

Gpr44\_F AGGACAGGCCGTTTCGTGCG

Gpr44\_R AGCGAGCGCCTCAGCTTGTG

**Gpr139** G protein-coupled receptor 139 (331pb)

Gpr139\_F TTGTGCCTCGGGTTACCAGCAAAT

Gpr139\_R TCCGGGTCCTGGCTGGGTAG

**Crhr1** corticotropin releasing hormone receptor 1 (172pb)

Crhr1\_F GCTGGGCAGCCCGTGTGAAT

Crhr1\_R CACCGGATGCTCCTGAGCCG

**Lat** linker for activation of T cells (203pb)

Lat\_F TGCCGTGAGTTGCCAGCCTC

Lat\_R ATCCGATGGGAGCCCCGAG

**Ptger3** prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3) (172pb)

Ptger3\_F GCCTGCAACCTGGCGACCAT  
Ptger3\_R TGGTTCAGCGAAGCCAGGCG

**Cdkn2aip** CDKN2A interacting protein (242pb)

Cdkn2aip\_F AGCAGCTCCCAGAGCAGTGGAT  
Cdkn2aip\_R ACTGCTACCAACTTCCACGCCAC

**Ip6k2** inositol hexakisphosphate kinase 2 (196pb)

Ip6k2\_F GTGTGGCATGCAGGTGTACCAGG  
Ip6k2\_R CTGTCGCTCCAACACGGCCT

**Cth** cystathionase (cystathionine gamma-lyase) (265pb)

Cth\_F ATGGGATGGCAGTGGCCCGT  
Cth\_R GGCACGGAGGCATGGGTCAT

**Rrm2b** ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible) (368pb)

Rrm2b\_F GATGGGCGACCCGAAAGGC  
Rrm2b\_R AGCAGCGAGCCTCTGGAACCT

**Brca2** breast cancer 2 (274pb)

Brca2\_F ACAGCTGCCGTTTCCAGTGAG  
Brca2\_R CCGCCACTGGAGGTTGCTCG

**Aldh1a3** aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3 (251pb)

Aldh1a3\_F AACGGGGCCGTGGAAAACGG  
Aldh1a3\_R CACGGGGAGCCCCTCTGGAA

**Niacr1** niacin receptor 1 (162pb)

Niacr1\_F GTTCGGGAGCATCCCCTGCC  
Niacr1\_R GAGATGATGGCCCGCTCCG

**Brca1** breast cancer 1 (204pb)

Brca1\_F        CCGTGACACAGGTGCTCATCC

Brca1\_R        GCTCGCTACCATCACGGCCA

**Bak1** BCL2-antagonist/killer 1 (286pb)

Bak1\_F        TCGGCGCTACGACACGGAGT

Bak1\_R        CAGGGCTGCCACCCAACCAC

Programa de ciclado: El programa de ciclado consistió en un ciclo inicial de 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de 45 segundos a 95°C, 1 minuto a 62°C (durante el cual se recolectó la información para las curvas de amplificación) y 1 minuto a 72°C, y finalmente un ciclo de 1 minuto a 95°C, un ciclo de 30 segundos a 55°C y un ciclo de 30 segundos a 95°C (entre los cuales se recolectó la información para las curvas de disociación).

**9. Estadística.**

Todos 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, Kruskal Wallis). La significación de las diferencias se analizó con el test de Fisher Protegido – Mínima Diferencia Significativa (Fisher MDS) o Test de Bonferroni 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.

**9.1 Análisis estadísticos RT-PCR**

El análisis de los datos provenientes de las RT-PCRs fue llevado a cabo por el Dr. E. Fernández. Para el análisis de los genes evaluados por PCR se tomó como

parámetro de expresión el cociente entre el Ct medido para el gen y el Ct medido para el gen de referencia (Housekeeping). Luego sobre dicha proporción (ratio) se aplicó un modelo lineal generalizado. El modelo lineal generalizado permite incorporar efectos de heterocedasticidad, es decir varianzas específicas para algún agrupamiento particular de los datos.

En todos los casos el modelo en su parte fija planteado fue;

$$\text{Ratio (Ct gen/Ct hk)} = \mu + A+B+A*B$$

donde A: "6OHDA" "Asc" y B: "LPS" "Veh"

Donde  $\mu$  es la expresión media del gen; A y B los efectos principales; A\*B la interacción de los mismos. Luego se plantean modelos donde  $E \sim N(0, I \sigma^2)$  o  $E \sim N(0, K)$  donde E error, I identidad, K matriz diagonal con sigmas por grupo.

Para elegir el método que mejor ajusta a los datos se utilizó el test de cocientes de máxima verosimilitud y tomando el modelo más parsimonioso (de menor cantidad de parámetros). Luego sobre el modelo elegido se aplicó análisis de la varianza sobre los parámetros del modelo para evaluar si el término A\*B es significativo a  $p < 0.05$ . Si es significativo entonces se analizan las diferencias de medias entre cada combinación de niveles de los términos de la interacción.

# Capítulo 1

## Capítulo 1

### 1 Objetivo

El objetivo específico de este capítulo es estudiar los efectos de un estímulo proinflamatorio periférico sobre la neurodegeneración y la neuroinflamación en un modelo de EP en ratas adultas y ancianas.

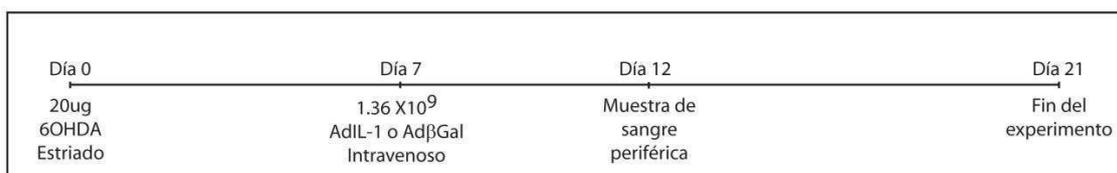
### 2 Modelo Animal

Hemos elegido el modelo de inyección estereotáxica de 6OHDA en el cuerpo estriado porque es el que mejor replica las características patológicas de la enfermedad que nos interesa modelar. Estos factores, de neurodegeneración parcial y progresiva, relativamente baja variabilidad biológica y alta reproducibilidad, junto con la experiencia previa del modelo en el laboratorio, nos llevaron a seleccionar este modelo para nuestros experimentos.

### 3 Resultados

#### A- Efectos de la inflamación periférica sobre la neurodegeneración por 6OHDA en ratas adultas.

En esta parte de la tesis hemos puesto a prueba la hipótesis que un estímulo inflamatorio proveniente de la periferia exacerba la neurodegeneración en la SN de ratas adultas. Para ésto se inyectó 6OHDA o su vehículo en el cuerpo estriado de ratas Wistar adultas (Ver Materiales y Métodos 2.2.1) y luego de 7 días se las inyectó con AdIL-1 o Ad $\beta$ Gal en forma intravenosa (Ver Materiales y Métodos 2.2.3). (Ver Figura 1.1)



**Figura 1.1** Esquema temporal del experimento de estimulación periférica. Se muestran las dosis empleadas y días en que se realizaron las inyecciones y la toma de muestras para análisis.

La selección de los días de inyección de los vectores adenovirales se basó en información previa del laboratorio donde se evidencia que al inyectar 6OHDA en el cuerpo estriado se verifica neurodegeneración y activación microglial en la SN a partir del día 12 (Ver Introducción – Figura i-1). Asimismo, a partir del día 12 post 6OHDA, se comienza a hacer detectable el ARNm para la IL-1 sin producción de su proteína (Depino, Earl et al. 2003). La presencia de estadios tempranos de activación de la microglía junto con la presencia de mensajeros de citoquinas pro-inflamatorias sugieren que la microglía se encuentra “cebada” en la SN de este modelo experimental de EP. Consideramos a su vez, que según Gauldie (Margetts, Kolb et al. 2002) la expresión sistémica de un transgén a partir de la inyección intraperitoneal de un adenovector manifiesta un pico de expresión entre los días 4 y 7 post inyección, estando aun presente al día 14. Es por esto que los adenovirus se inyectan al día 7, para obtener un pico de expresión entre los días 11 y 14. Estos dos efectos (neurodegeneración e inflamación) deben coincidir temporalmente en la SN.

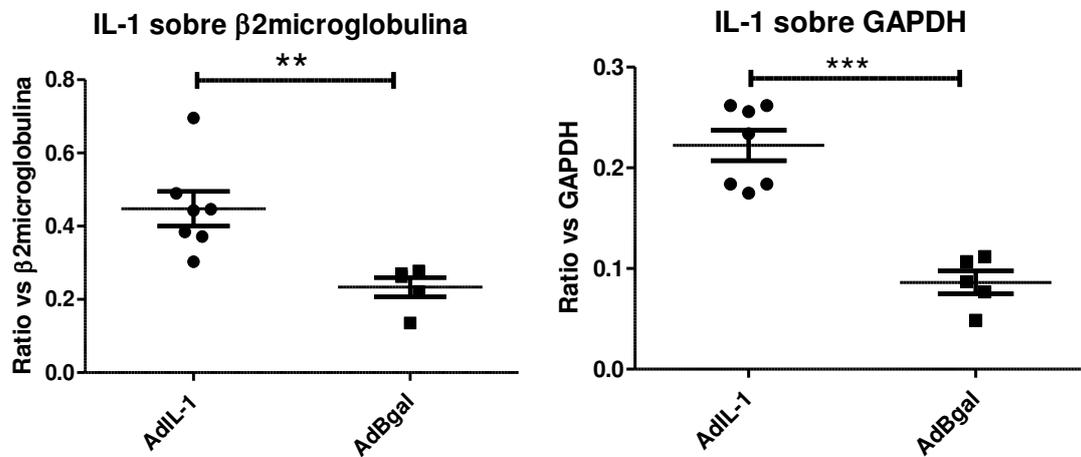
De esta manera se generaron 4 grupos experimentales; ratas inyectadas con 6OHDA en el cuerpo estriado y con AdIL-1 en forma endovenosa (6OHDA/AdIL-1) o su control (6OHDA/Ad $\beta$ gal) y ratas inyectadas con vehículo en el cuerpo estriado y con AdIL-1 en forma endovenosa (Veh/AdIL-1) o su control (Veh/Ad $\beta$ gal). El experimento se realizó con ratas Wistar macho adultas de 8 a 12 semanas de vida.

#### **Controles:**

##### **3.a Control molecular del estímulo proinflamatorio periférico en ratas adultas.**

La mayor parte del Adenovector intravenoso se acumula en hígado (Vrancken Peeters, Perkins et al. 1996), por ello, con la intención de controlar el efecto de la inyección periférica de AdIL-1 como estímulo periférico obtuvimos muestras de *hígado* de animales inyectados previamente con AdIL-1 o Ad $\beta$ gal en la vena de la cola. Se extrajo el ARN del tejido y se realizó la retrotranscripción del ARNm. Se determinaron como genes de referencia para este tejido  $\beta$ 2microglobulina y GAPDH. Se analizaron los niveles de expresión de ARNm para IL-1 al día 4 post inyección del estímulo o su

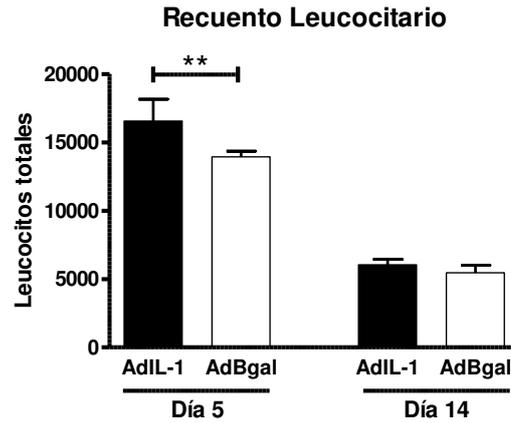
control. Se verificó un aumento estadísticamente significativo de IL-1 en los animales tratados con el estímulo periférico (Ver Figura 1.2).



**Figura 1.2** Expresión de ARNm para IL-1 en comparación con dos genes de referencia en animales inyectados con  $1.36 \times 10^9$  partículas infectivas de adenovector endovenoso por RT-PCR en tiempo real. Nótese el aumento significativo de expresión de IL-1 en los animales inyectados con AdIL-1 al compararlos con los animales inyectados con AdBgal. \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  T Test.

### 3.b Control celular del estímulo inflamatorio periférico en ratas adultas.

Para verificar el efecto del estímulo proinflamatorio sobre la fórmula leucocitaria se analizaron muestras de sangre periférica obtenidas 5 y 14 días post inyección del estímulo ( $1.36 \times 10^9$  partículas infectivas de AdIL-1 endovenoso) o su control (misma cantidad de partículas de Adβ-gal). Las muestras se analizaron mediante un recuento leucocitario en cámara de Neubauer. Al comparar los recuentos se evidenció un aumento significativo en el número de leucocitos en los animales inyectados con AdIL-1 iv al compararlos con los que recibieron Adβ-gal al día 5 y la desaparición de esta diferencia en sangre a la finalización del experimento (Día 14) (Ver Figura 1.3).

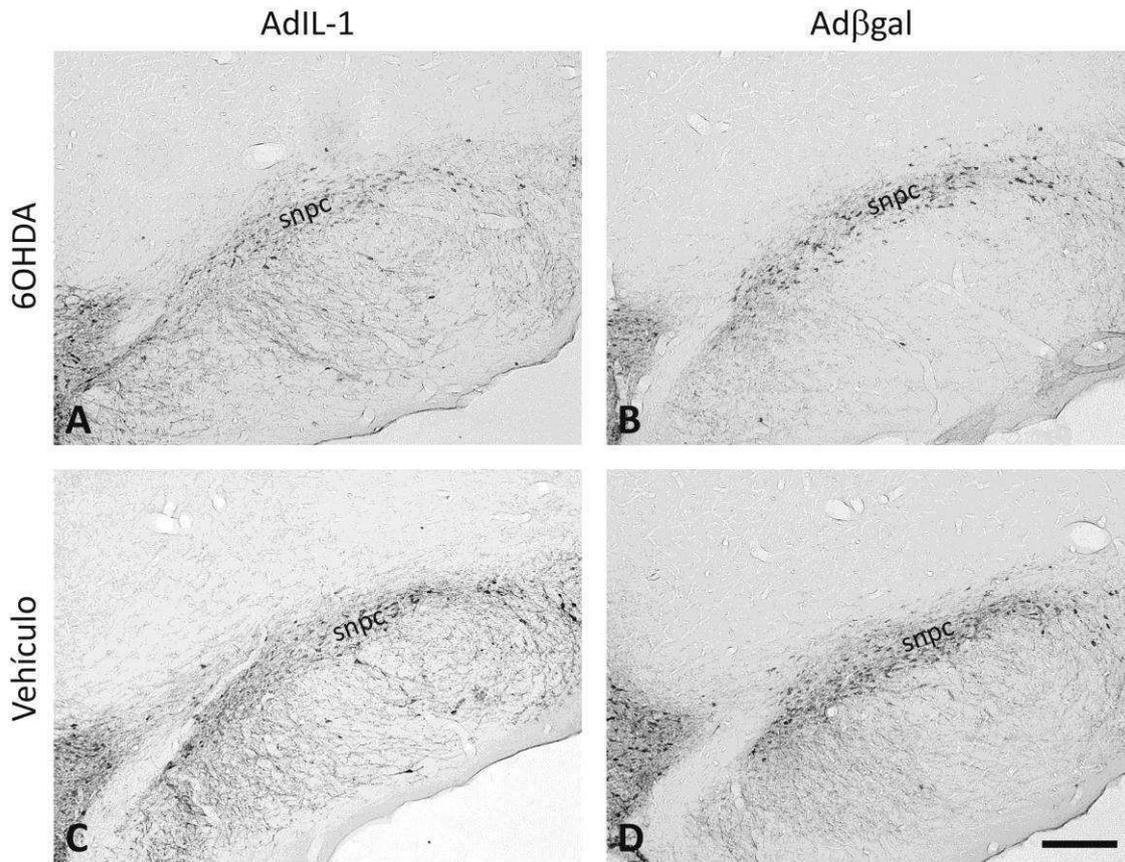


**Figura 1.3** Número de leucocitos en sangre a los días 5 y 14 post inyección del estímulo periférico, nótese la diferencia estadísticamente significativa al día 5 post inyección. \*\*  $p=0.0054$  T Test.

### 3.1 Efecto del estímulo inflamatorio periférico sobre la neurodegeneración en el modelo animal de EP en ratas adultas.

*Hipótesis - La inyección endovenosa de AdIL-1 en animales adultos previamente inyectados con 6OHDA causa exacerbación de la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la SN.*

Cualitativamente, para analizar si la inyección del estímulo pro-inflamatorio sistémico es capaz de exacerbar la neurodegeneración en animales previamente inyectados con 6OHDA, se procedió a contar las neuronas dopaminérgicas remanentes en SN en los diferentes grupos experimentales descritos anteriormente. Estas neuronas se identifican por la expresión de tirosina hidroxilasa, la cual se detecta por inmunohistoquímica. Se observó menor cantidad de neuronas dopaminérgicas (TH+) en los animales tratados con 6OHDA al compararlos con los controles (Fig 1.4 A y B). Los grupos inyectados en SN con vehículo no manifiestan cambios sin importar cuál fue el estímulo endovenoso. (Figura 1.4 Fig C y D).

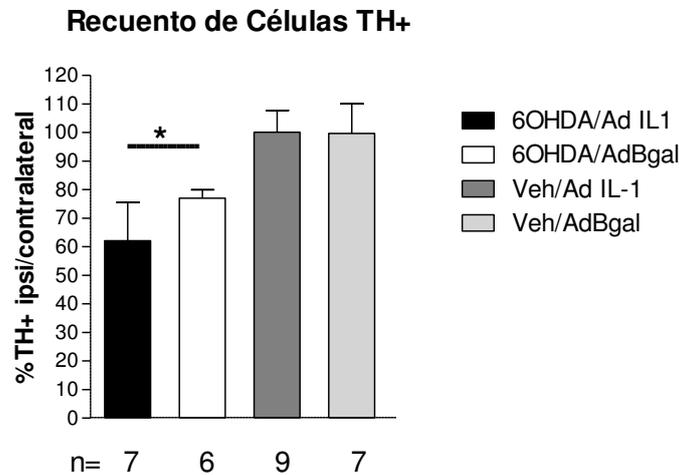


**Figura 1.4** Detección de Tirosina Hidroxilasa por inmunohistoquímica correspondiente a la SN ipsilateral a la inyección en los 4 grupos experimentales (A,B,C y D) en ratas adultas. Snpc = SN pars compacta. Barra 250 micrones.

El conteo de neuronas TH+ demostró ausencia de neurodegeneración en los animales inyectados con vehículo (grupos Veh/Adβgal y Veh/AdIL-1), presentando 99,72 / y 100,1/ respectivamente de neuronas TH+ al compararlas con el lado contralateral a la inyección (Ver Figura 1.5). La ausencia de neurodegeneración en los animales del grupo Veh/AdIL-1, similar a la del grupo Veh/Adβgal, evidencia que la administración de los adenovectores no causa neurodegeneración por sí misma.

Al estudiar los grupos 6OHDA/AdIL-1 y 6OHDA/Adβgal notamos una neurodegeneración, con un promedio de neuronas TH+ remanentes de 62.1/ y 76.97/ , respectivamente (Ver Figura 1.5). Es importante destacar que en el grupo en que se combinan el modelo de EP y el estímulo proinflamatorio periférico (6OHDA/AdIL-1), la neurodegeneración es máxima (37.9/ ). Este efecto, exacerbante de la neurodegeneración, es estadísticamente significativo al comparar los grupos 6OHDA/AdIL-1 con 6OHDA/Adβgal. Se verifica interacción entre los factores

(neurodegenerativo y proinflamatorio) siendo este efecto mayor que la suma de sus componentes (6OHDA/Ad $\beta$ gal 23.03/ y Veh/AdIL-1 sin efecto por si solo). Por lo tanto, se concluye que el estímulo inflamatorio periférico exagera la neurodegeneración.



**Figura 1.5** Cuantificación de neuronas TH+ en la SN de los distintos grupos experimentales en ratas adultas. Recuento de células TH+ expresadas como porcentaje del hemisferio ipsilateral con respecto al contralateral a los 21 días de la inyección de 6OHDA en cada uno de los grupos. Los animales del grupo 6OHDA/AdIL-1 presentan una neurodegeneración significativamente mayor a los animales del grupo 6OHDA/Ad $\beta$ gal. Se utilizó ANOVA de dos factores evidenciando interacción doble significativa ( $p < 0.05$ ). Post Hoc test de Fisher MDS  $*p < 0.05$

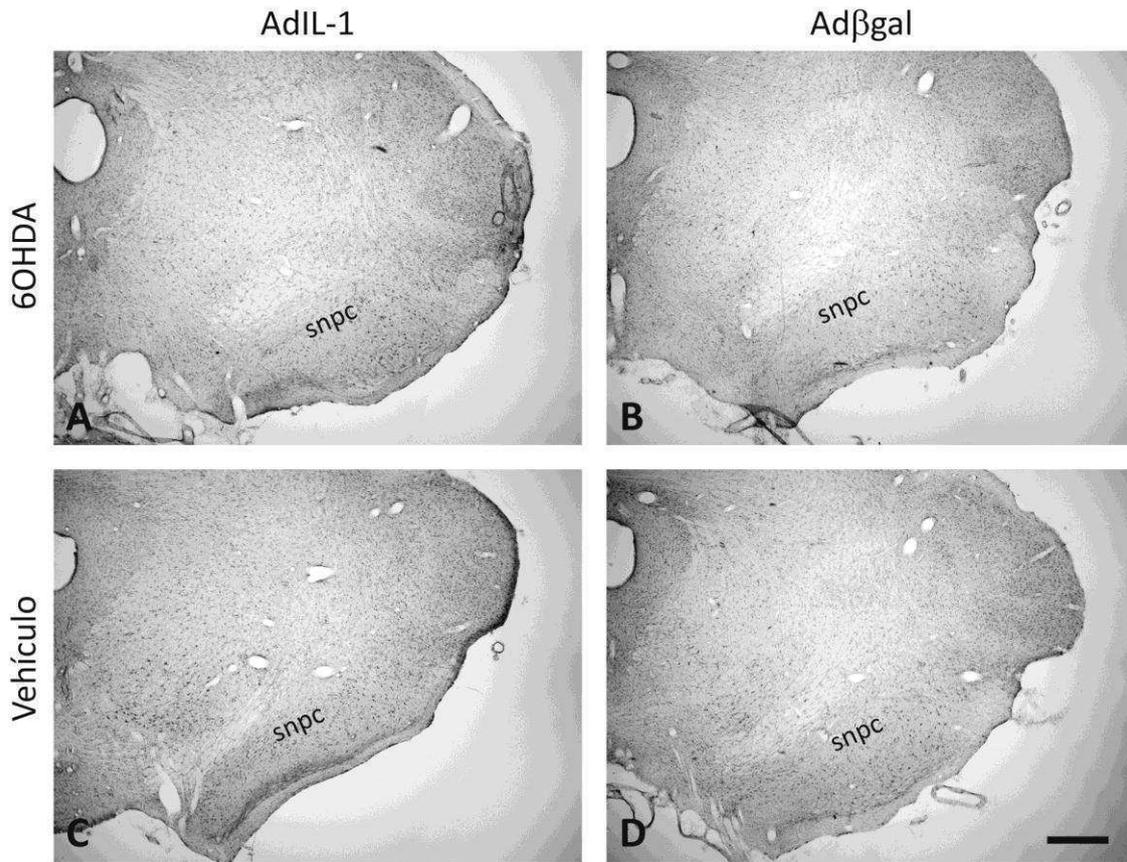
### 3.2 Efecto del estímulo inflamatorio periférico sobre la inflamación en la SN de ratas adultas.

*Hipótesis - La inyección endovenosa de AdIL-1 en animales adultos previamente inyectados con 6OHDA causa infiltrado inflamatorio acompañado de un aumento de microgliosis y astrogliosis en la SN ipsilateral a la inyección central.*

Para evaluar este efecto se analizó la presencia de infiltrado inflamatorio junto con la activación de microglía y astrogliá.

#### 3.2.1 Análisis histológico del infiltrado inflamatorio

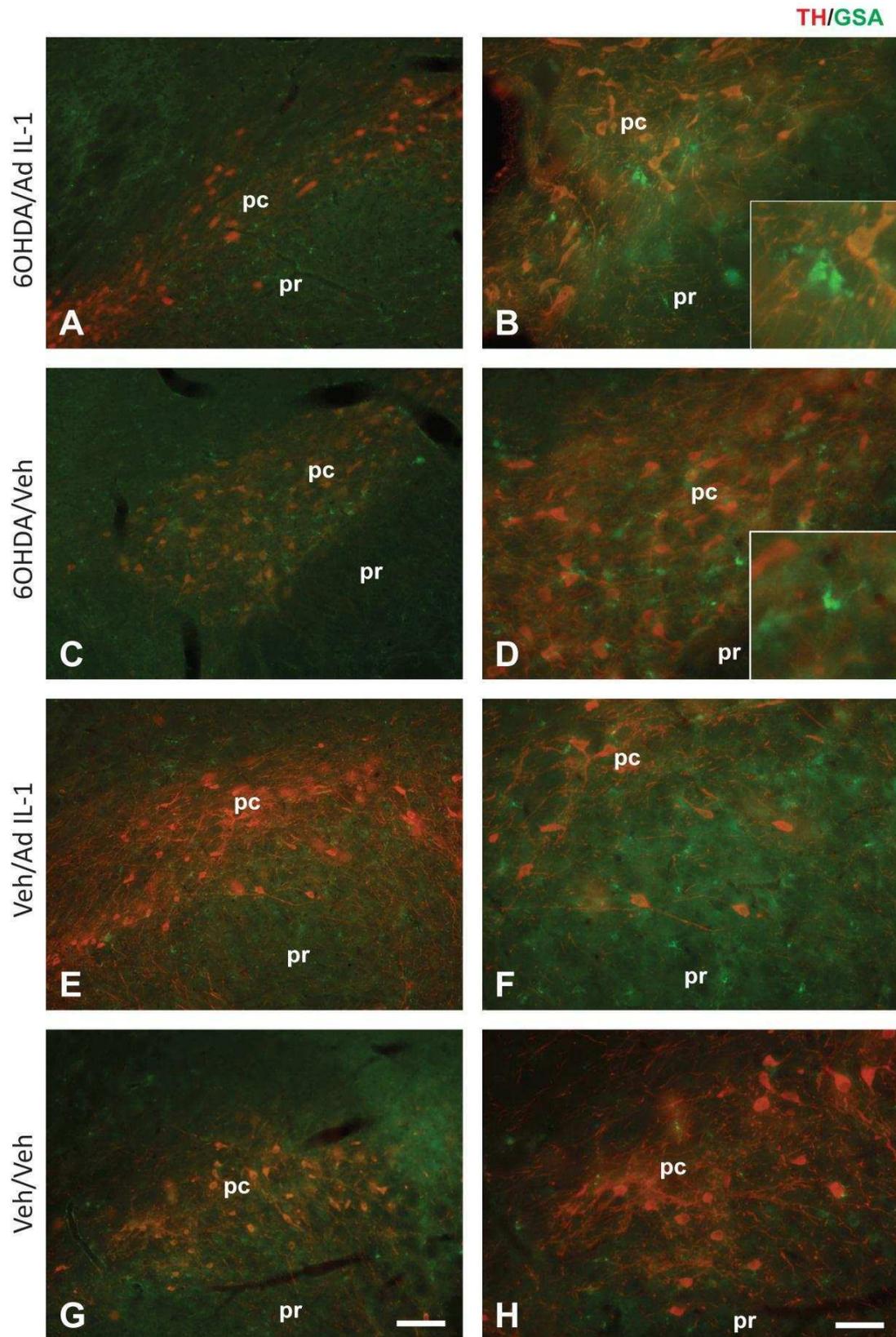
La presencia de infiltrado inflamatorio se analizó en cortes histológicos de cada uno de los grupos experimentales mediante la tinción de Nissl. No hay presencia de neutrófilos, linfocitos o macrófagos en la SN de ninguno de los grupos analizados mediante esta técnica (Ver Figura 1.6).



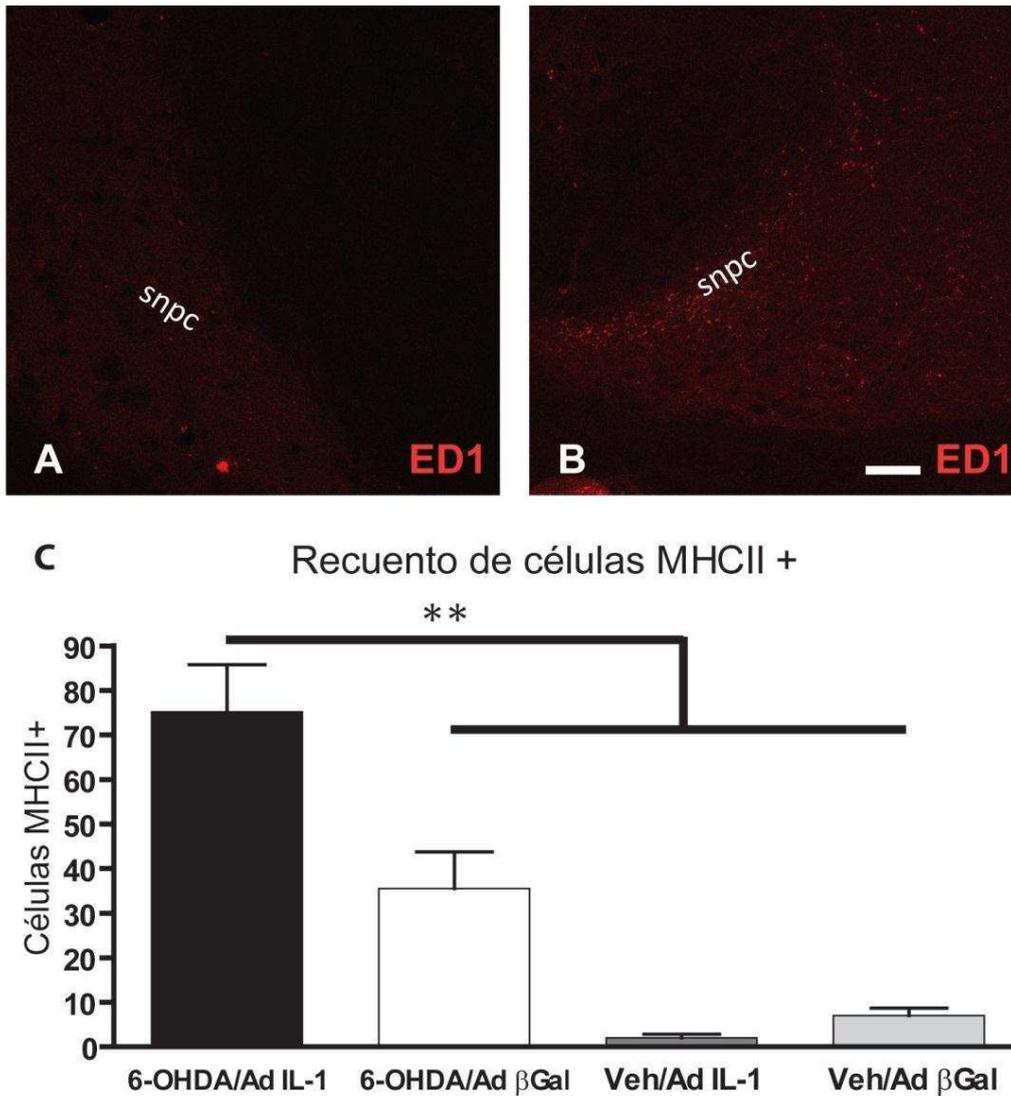
**Figura 1.6** Análisis del infiltrado inflamatorio correspondiente al lado ipsilateral a la inyección con 6OHDA o vehículo en los 4 grupos experimentales (A,B,C y D) en ratas adultas por tinción de Nissl. No se observa infiltrado inflamatorio en ningún grupo experimental. Barra 500 micrones.

### 3.2.2 Análisis de la microglía y la astrogliá.

Se analizó el estado de activación de la microglía mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo ED1 (Macrófagos – capacidad fagocítica) y un anticuerpo contra MHC-II (marcador de microglía activada). Los estadios morfológicos de activación microglial se evidenciaron mediante la unión a la lectina GSA1-B4. La activación astrogliá se estudió con inmunofluorescencia para GFAP.



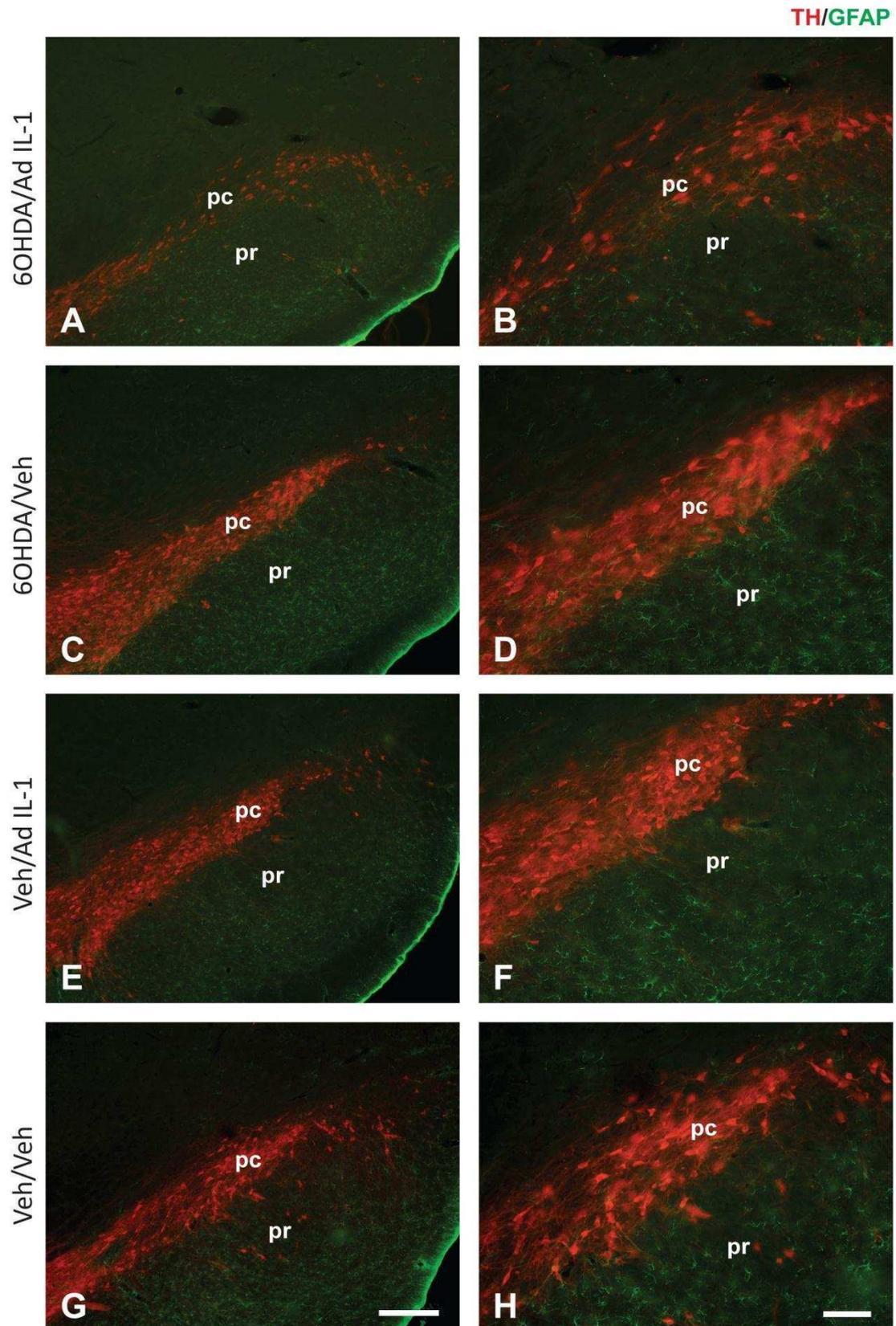
**Figura 1.7** Activación microglial en la SN de ratas adultas. Inmunohistoquímica contra GSA (Verde)/ TH (Rojo). **A-B** grupo 60HDA/AdIL-1 mostrando células GSA+ en estadio 3-4 de activación en la SNpc. **B** Recuadro mostrando microglía estadio 3-4 **C-D** grupo 60HDA/Veh, células GSA+ en estadio 2-3 de activación. **D** Recuadro mostrando microglía estadio 2-3. **E-F** grupo Veh/AdIL-1, se observan células GSA+ en reposo (estadio 1). **G-H** grupo Veh/Veh en que solo se observan células GSA+ en el primer estadio morfológico descrito por Kreutzberg. A,C,E y G Barra 25 micrones. B, D, F y H Barra 50 micrones. pc *pars compacta*, pr *pars reticulata*.



**Figura 1.8** Detección de capacidad fagocítica por inmunohistoquímica para ED-1 y MHC-II. **A-B** grupo de animales 6OHDA/AdIL-1. **A-B** Se observan células ED1+ en la SN del lado Ipsilateral (**B**) pero no del contralateral (**A**) a la inyección. SN pars compacta snpc. A y B Barra 50 micrones. **C** Recuento de células MHC-II+ en la SN de los diferentes grupos experimentales. Obsérvese que el grupo 6OHDA/AdIL-1 presenta un aumento significativo de células MHCII+ al compararlo con el resto de los grupos. ANOVA de 2 factores seguido del post hoc test de MSD de Fischer. \*\*p<0.01.

Al analizar el estado de la microglía en los diferentes grupos experimentales observamos que solamente en los animales inyectados con 6OHDA y luego inyectados periféricamente con Ad IL-1, la microglía alcanza el estadio 4 de activación en la SN (Ver introducción figura i-2) (Ver Figura 1.7). Este mismo grupo experimental es el único que evidencia inmunoreactividad positiva a ED1 (microglía con capacidad fagocítica) a lo largo de toda la SN ipsilateral a la inyección pero no en su lado contralateral (Ver Figura 1.8 A-B). Al analizar el recuento de células MHC-II+ (marcador

de microglía activada) se evidencia un aumento estadísticamente significativo en el grupo de animales tratados con 6OHDA/AdIL-1 respecto de todos los otros grupos (Ver Figura 1.8 C). No se encuentran diferencias entre los grupos al analizar la expresión de GFAP, como indicador de la activación de astrocitos, en SN (Ver Figura 1.9).



**Figura 1.9** Activación astrogliar en la SN de ratas adultas. Inmunohistoquímica para GFAP (Verde)/ TH (Rojo). **A-B** grupo 6OHDA/AdIL-1 **C-D** grupo 6OHDA/Veh. **E-F** grupo Veh/AdIL-1. **G-H** grupo Veh/Veh. No se aprecian diferencias en la astrogliar en los diferentes grupos experimentales. A, C, E y G Barra 250 micrones. B, D, F y H Barra 25 micrones. pc *pars compacta*, pr *pars reticulata*.

### **3.3 Conclusión ratas adultas**

Los datos obtenidos indican que la expresión crónica de IL-1 periférica exacerba la neurodegeneración mediada por 6OHDA llevando a la microglía al estadio 4 de activación con capacidad fagocítica y morfología macrofágica. No se observa efecto sobre astrocitos. No se observan diferencias en el análisis del infiltrado inflamatorio entre los diferentes grupos.

Por lo tanto, concluimos que hemos generado un modelo original de exacerbación de la neurodegeneración central por un estímulo inflamatorio crónico desde la periferia.

### **B- Caracterización del modelo de exacerbación periférica en ratas ancianas.**

En esta parte de la tesis hemos evaluado el efecto del estímulo inflamatorio periférico sobre el modelo de EP en ratas ancianas. Con este experimento intentamos acercar nuestro modelo inflamatorio en ratas adultas a lo que sucede en la patología en humanos, en la que la gran mayoría de los pacientes supera los 60 años. Realizamos el experimento con animales considerados ancianos (que alcanzaron los 18 meses de vida). Evaluamos el efecto del estímulo inflamatorio periférico sobre el modelo de EP siguiendo el mismo esquema temporal que para las ratas adultas (Ver Fig 1.1).

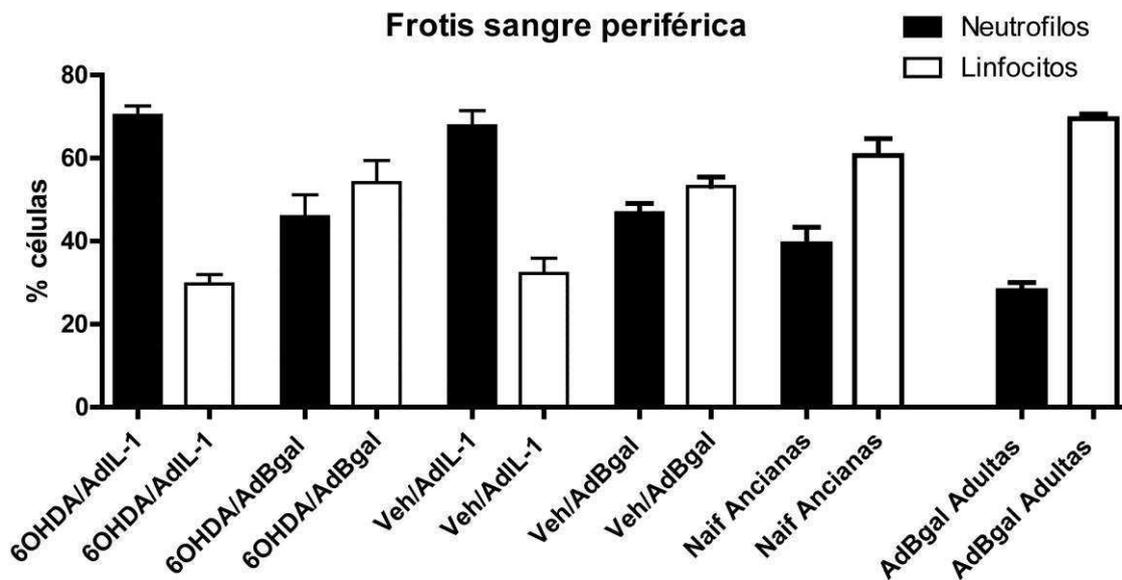
*Hipótesis - La inyección intravenosa de AdIL-1 en animales ancianos previamente inyectados con 6OHDA causa exacerbación de la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas en la SN*

#### **Control:**

#### **3.c Control de inyección del estímulo periférico en ratas ancianas.**

Para verificar el efecto *in vivo* del estímulo proinflamatorio se analizaron muestras de sangre periférica obtenida 4 días post inyección del estímulo (inyección endovenosa de  $1,36 \times 10^9$  partículas infectivas de AdIL-1) o su control (misma cantidad de partículas de AdBgal). Las muestras se analizaron mediante un recuento de neutrófilos y linfocitos en un frotis de sangre periférica (Ver Figura 1.10). Las muestras de sangre de ratas ancianas inyectadas con el estímulo inflamatorio periférico

corroboran, como es de esperarse, una marcada neutrofilia independiente del estímulo central (6OHDA o Veh). Los animales inyectados con el adenovector control evidencian un leve aumento de la neutrofilia al compararlos con los animales ancianos naive. Nótese que aun los animales naive *ancianos* presentan mayor neutrofilia que los animales *adultos* inyectados con vector control.



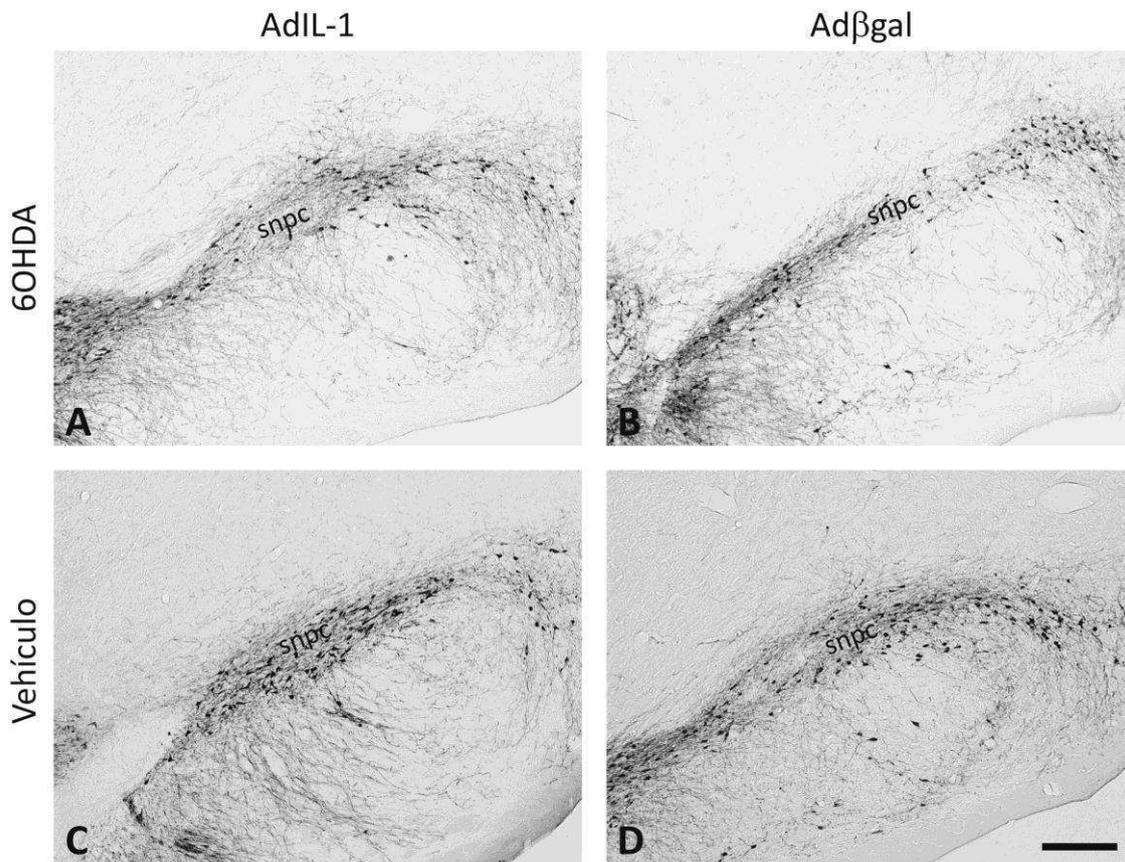
**Figura 1.10** Frotis de sangre periférica en ratas ancianas. Obtención de muestras a los 4 días post inyección del estímulo periférico. Nótese la marcada neutrofilia en los animales inyectados periféricamente con AdIL-1. Los grupos de animales inyectados en forma endovenosa con AdBgal presentan un leve aumento de neutrófilos al compararlos con las ratas ancianas naive. Se observa, a su vez un aumento de la cantidad de neutrófilos, en el grupo Veh/AdBgal al compararlo con el grupo control de ratas adultas con el mismo tratamiento periférico.

### 3.4 Efecto del estímulo inflamatorio periférico sobre la neurodegeneración en el modelo animal de EP en ratas ancianas.

Al igual que como se llevó a cabo en ratas adultas, se evaluaron las neuronas dopaminérgicas remanentes en la SN de los diferentes grupos experimentales. (Ver Figura 1.11).

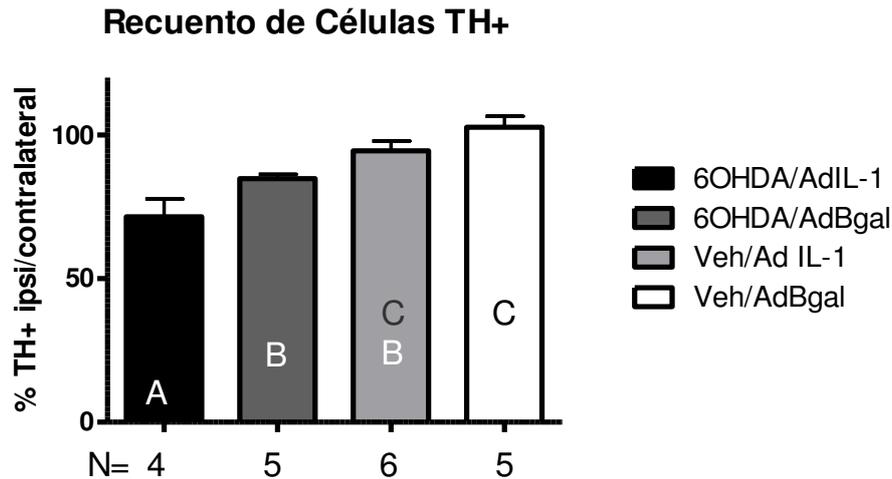
Los animales inyectados con Veh/Ad $\beta$ gal (102.7%) no presentan neurodegeneración en la SN, al compararlos con el lado contralateral a la inyección. Se observa una leve neurodegeneración en las ratas inyectadas con Veh/AdIL-1 (94.59%), pero no estadísticamente diferente al control (Ver figura 1.12). Al igual que lo

observado en ratas adultas, esta evidencia sugiere que el Adenovector empleado en forma periférica no causa neurodegeneración en el modelo de ratas ancianas.



**Figura 1.11** Detección de Tirosina Hidroxilasa por inmunohistoquímica correspondiente a la SN ipsilateral a la inyección en los 4 grupos experimentales (A,B,C y D) en ratas ancianas. Obsérvese la marcada neurodegeneración en los animales del grupo A tratado con 6OHDA/AdIL-1. SN pars compacta snpc. Barra 250 micrones.

Al estudiar la neurodegeneración en los grupos 6OHDA/AdIL-1 y 6OHDA/Ad $\beta$ gal notamos que las neuronas TH+ remanentes son 71.56/ y 84.86/ respectivamente. Es importante destacar que en el grupo en que se combinan el modelo de EP y el estímulo proinflamatorio periférico (6OHDA/AdIL-1), la neurodegeneración es mayor a la de cualquier otro grupo (28.44/ ) (Ver Figura 1.12). Este efecto es estadísticamente significativo en ratas ancianas, verificándose interacción entre los factores (neurodegenerativo y proinflamatorio) siendo el mismo, mayor que la suma de sus componentes (6OHDA/Ad $\beta$ gal 15.14/ y Veh/AdIL-1 5.41/ para un total de 20.55/ ).



**Figura 1.12** Cuantificación de neuronas TH+ en la SN de los distintos grupos experimentales en ratas ancianas. Recuento de células TH+ expresadas como porcentaje del hemisferio ipsilateral con respecto al contralateral a los 21 días de la inyección de 6OHDA en cada uno de los grupos. ANOVA de dos factores evidenciando interacción doble significativa ( $p < 0.05$ ). Post Hoc test de Fisher MDS Diferentes letras evidencian diferencias estadísticas de  $p < 0.05$  entre los grupos que no comparten la misma letra.

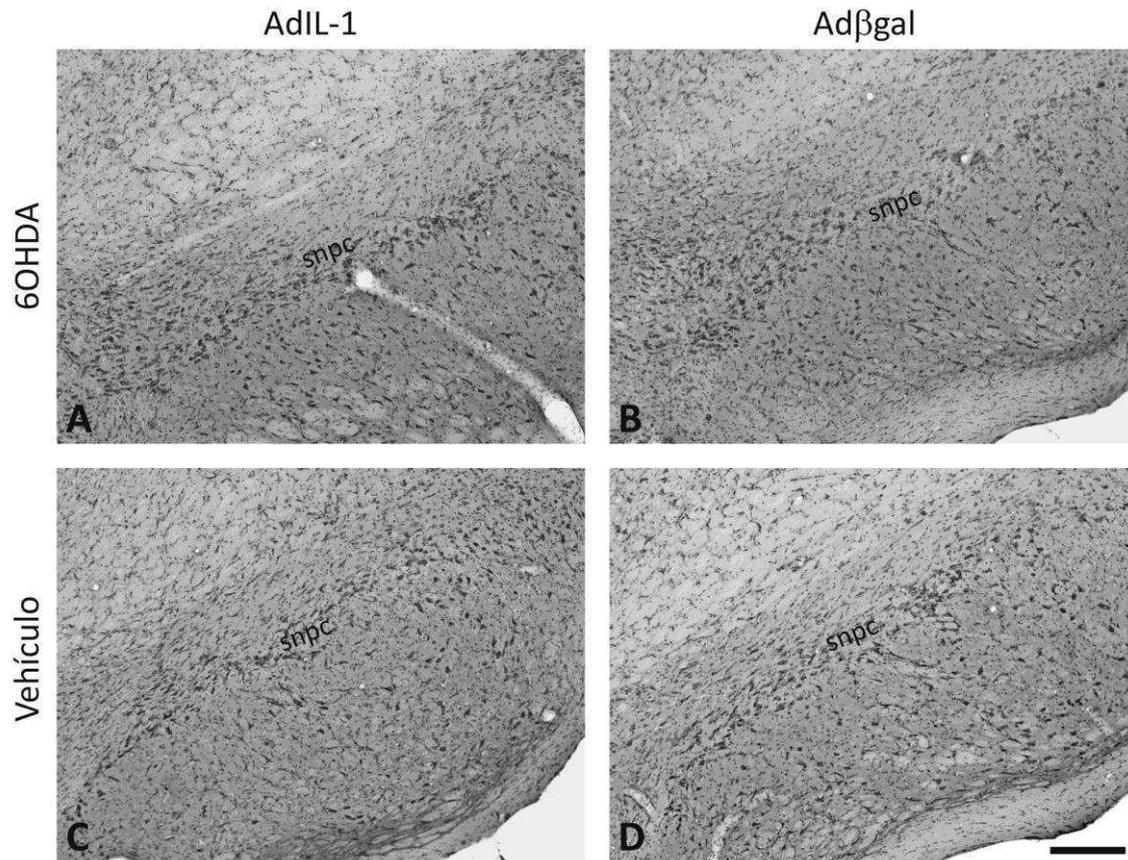
### 3.5 Efecto del estímulo inflamatorio periférico sobre la inflamación en la SN.

*Hipótesis - La inyección intravenosa de AdIL-1 en animales ancianos previamente inyectados con 6OHDA causa infiltrado inflamatorio acompañado de un aumento de microgliosis y astrogliosis en la SN ipsilateral a la inyección central.*

Para evaluar este efecto, en esta sección hemos estudiado la presencia de infiltrado inflamatorio junto con la activación de microglía y astrogliá.

#### 3.5.1 Análisis histológico del infiltrado inflamatorio.

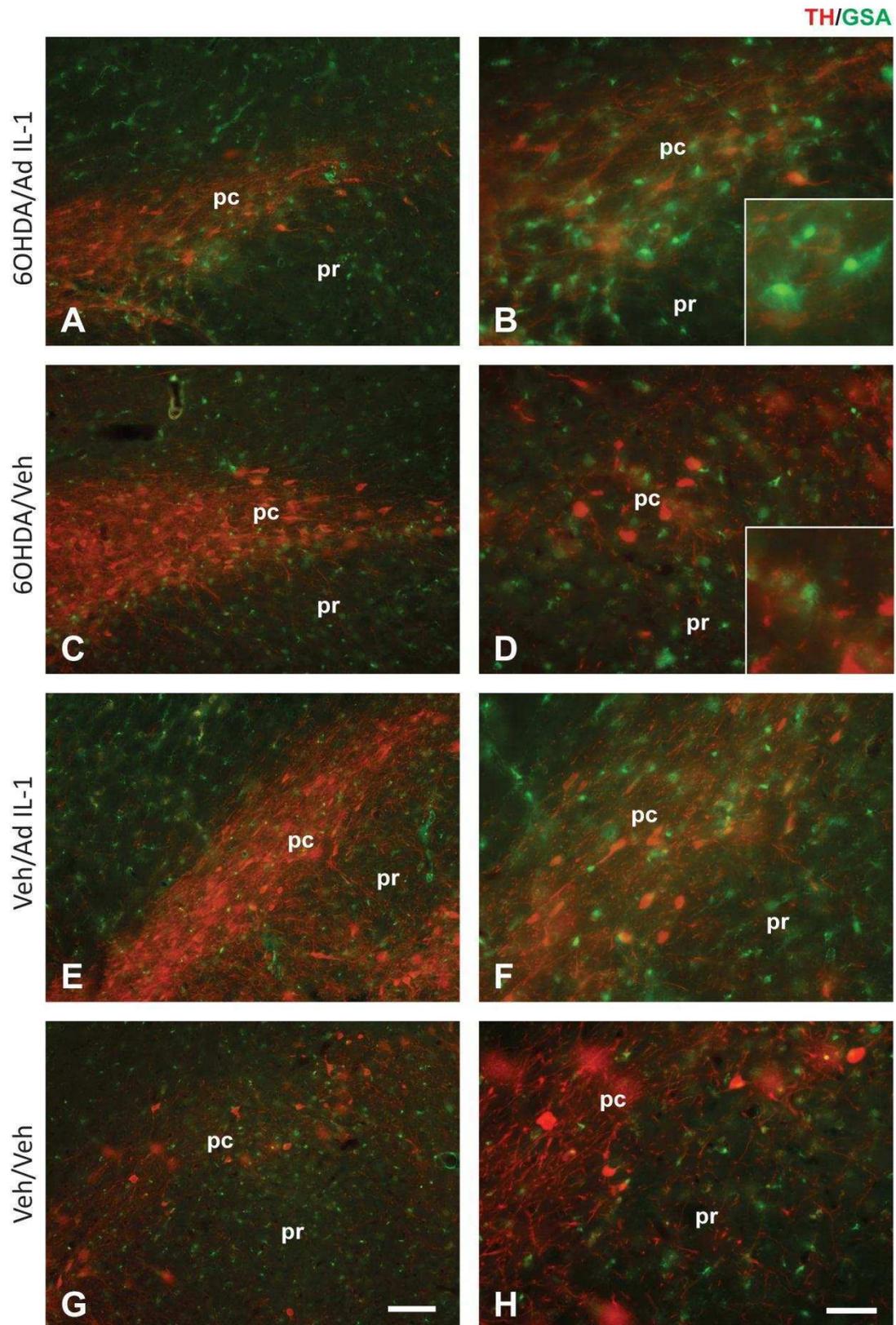
Se analizó la presencia de infiltrado inflamatorio en cortes histológicos de cada uno de los grupos experimentales mediante la tinción de Nissl. No se observó presencia de neutrófilos, linfocitos o macrófagos en la SN de ninguno de los grupos analizados (Ver Figura 1.13).



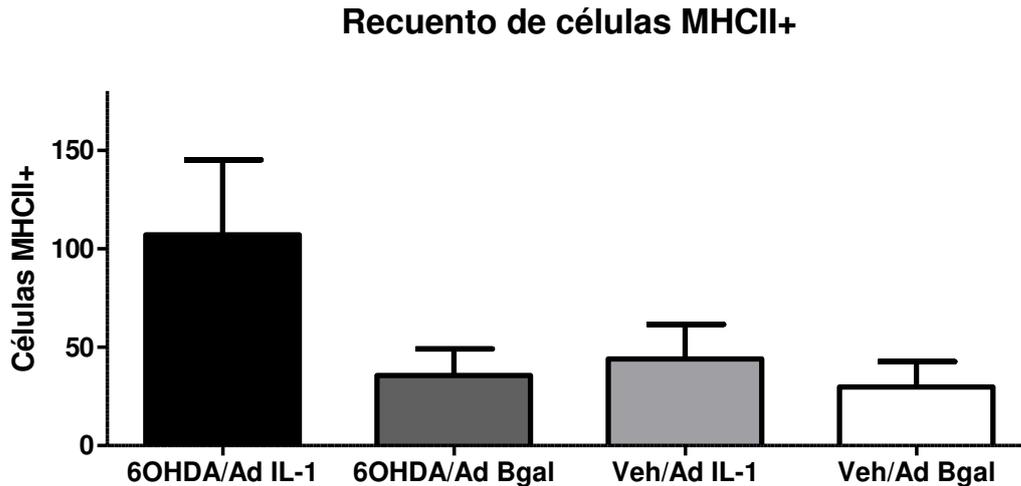
**Figura 1.13** Análisis del infiltrado inflamatorio correspondiente a la SN ipsilateral a la inyección con 6OHDA o vehículo en los 4 grupos experimentales (A,B,C y D) en ratas ancianas. Tinción de Nissl. No se observa infiltrado inflamatorio. snpc = SN pars compacta. Barra 250 micrones.

### 3.5.2 Análisis de la microglía y astroglia.

La microglía presenta diferentes estados de activación en los diferentes grupos experimentales. Observamos que solamente en la SN de los animales inyectados con 6OHDA y luego inyectados periféricamente con Ad IL-1 la microglía alcanza el estadio 4 de activación (Ver Figura 1.14).



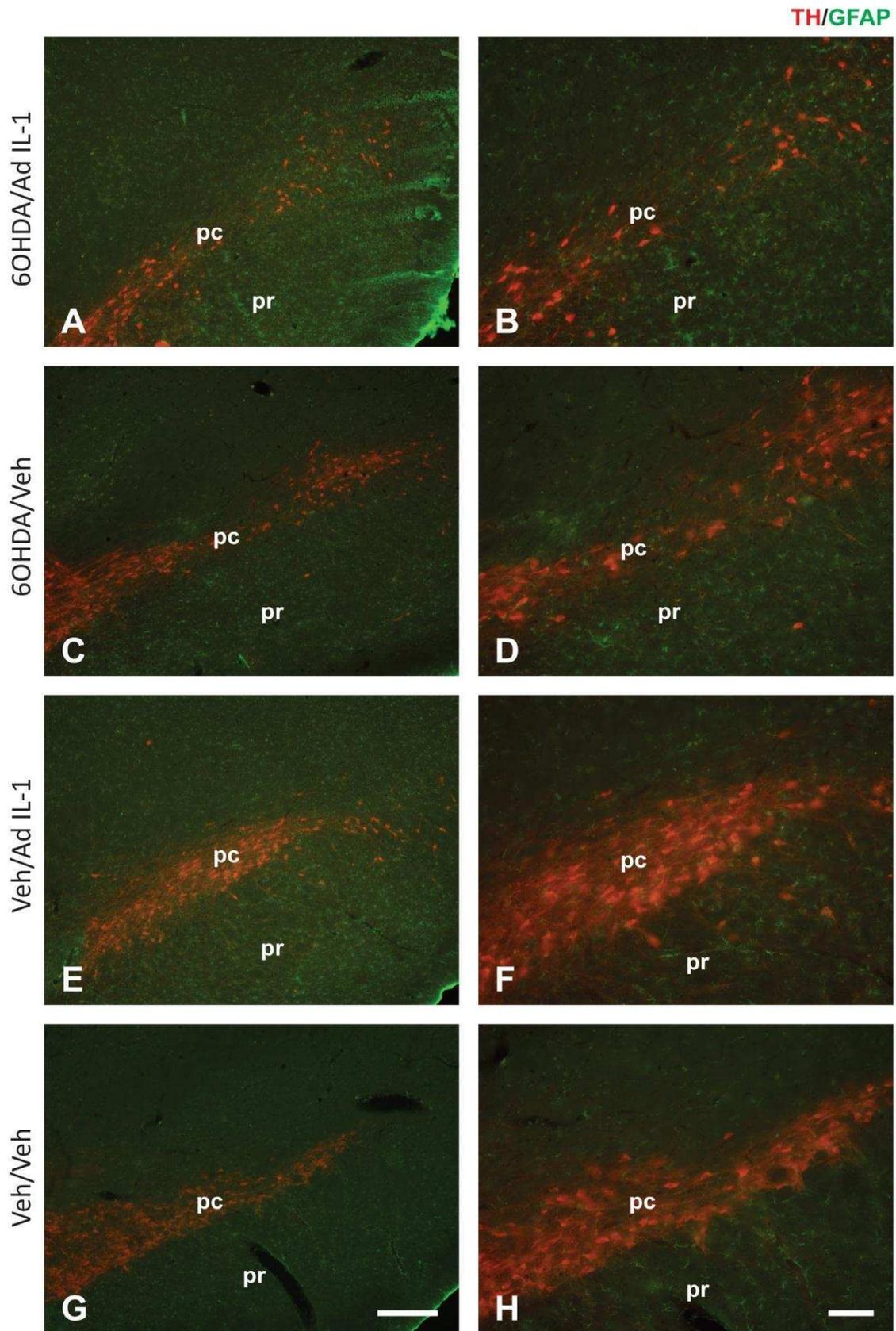
**Figura 1.14** Activación microglial en la SN de ratas ancianas. Inmunohistoquímica para GSA (Verde)/ TH (Rojo). **A-B** grupo 6OHDA/AdIL-1 mostrando células GSA+ en estadio 3-4 de activación en la SNpc. **B** Recuadro mostrando microglía estadio 3-4. **C-D** grupo 6OHDA/Veh, células GSA+ en estadio 2-3 de activación. **D** Recuadro mostrando microglía estadio 2-3. **E-F** grupo Veh/AdIL-1, se observan células GSA+ en reposo (estadio 1). **G-H** grupo Veh/Veh en que solo se ven células GSA+ en el primer estadio morfológico descrito por Kreutzberg. A,C,E y G Barra 25 micrones. B, D, F y H Barra 50 micrones. pc *pars compacta*, pr *pars reticulata*..



**Figura 1.15** Activación microglial en ratas ancianas. Recuento de células MHC-II+ en la SN de los diferentes grupos experimentales. Si bien hay una clara tendencia a un mayor número de células MHC-II+ en el grupo 6OHDA/AdIL-1 esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Al analizar el recuento de células MHCII+ (marcador de microglía activada) se observó un aumento no significativo en el número de células activadas, en el grupo de animales tratados con 6OHDA/AdIL-1 (Ver Figura 1.15). Esto puede deberse en parte a la alta variabilidad observada en el grupo 6OHDA/AdIL-1.

Al analizar la activación de la astrogliá en SN mediante GFAP no se encontraron diferencias entre los grupos (Ver Figura 1.16).



**Figura 1.16** Activación astrogliar en la SN de ratas ancianas. Inmunohistoquímica para GFAP (Verde)/ TH (Rojo). **A-B** grupo 6OHDA/AdIL-1 **C-D** grupo 6OHDA/Veh. **E-F** grupo Veh/AdIL-1. **G-H** grupo Veh/Veh. No se aprecian diferencias en la astrogliía en los diferentes grupos experimentales. A, C, E y G Barra 250 micrones. B, D, F y H Barra 25 micrones. pc *pars compacta*, pr *pars reticulata*.

### **3.6 Conclusión ratas ancianas**

La expresión crónica de IL-1 periférica exacerba la neurodegeneración mediada por 6OHDA llevando a la microglía al estadio 4 de activación con morfología macrofágica.

No se observa efecto sobre astrocitos. No se observan diferencias en el análisis del infiltrado inflamatorio entre los diferentes grupos.

## **4 Conclusión General**

Por primera vez se ha demostrado que un estímulo crónico proveniente de la periferia logra exacerbar la neurodegeneración en un modelo de enfermedad de Parkinson. Este efecto se manifiesta no solo en ratas adultas sino también en ratas ancianas, dándole así, mayor relevancia clínica. La exacerbación de la neurodegeneración se acompaña de un mayor grado de activación morfológica de la microglía. Podemos concluir que los datos obtenidos sugieren que la inflamación crónica periférica sería un factor de riesgo de exacerbación de la EP.

## Capítulo 2

## Capítulo 2

Para poder estudiar el mecanismo de exacerbación de la neurodegeneración por inflamación es imprescindible la reducción de la variabilidad biológica de ambos estímulos. En este capítulo se describen los experimentos que se realizaron para lograr un modelo de neurodegeneración en la SN con variabilidad biológica reducida y reproducible y a partir de los cuales se identificaron las variables importantes para mantener dicha reproducibilidad.

### 1 Objetivo

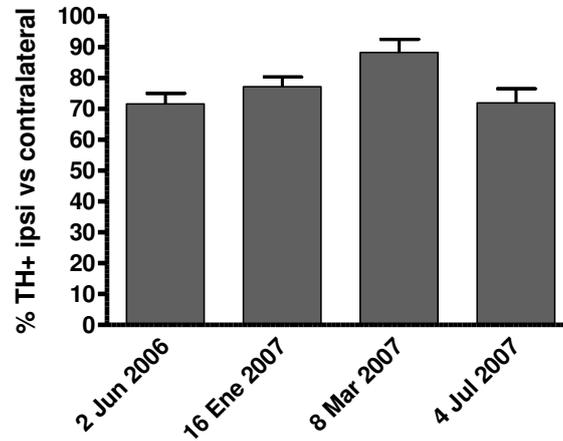
El objetivo específico de este capítulo es estudiar las variables involucradas en la variación de la eficacia de la 6OHDA para lograr un modelo robusto de neurodegeneración parcial de las neuronas dopaminérgicas de la SN que permita el estudio del mecanismo subyacente a la exacerbación de la neurodegeneración por un estímulo inflamatorio.

### 2 Resultados

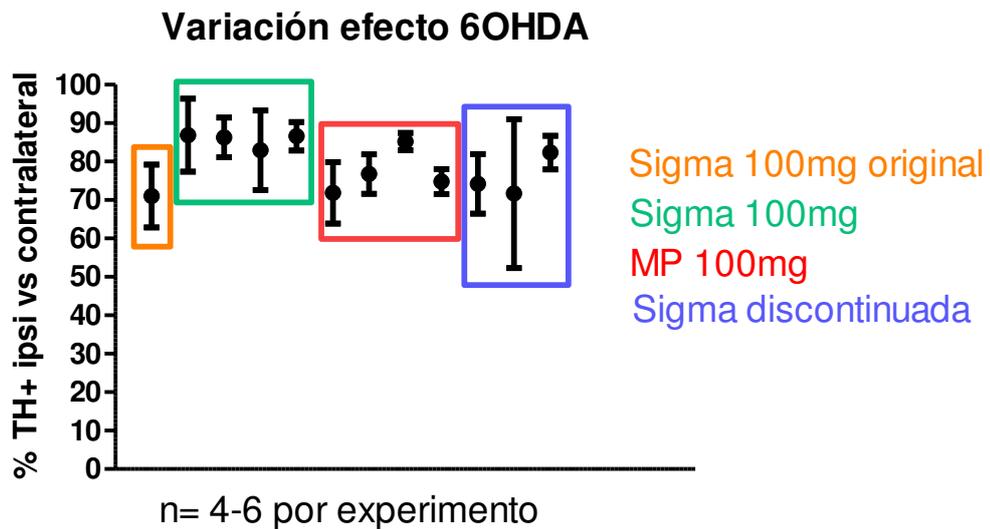
Durante el desarrollo del modelo observamos que a lo largo del tiempo los niveles de neurodegeneración obtenidos en diferentes experimentos en el modelo animal con la misma dosis de 6OHDA fluctuaban (Ver Figura 2.1). Según la experiencia del laboratorio, un rango de neurodegeneración de entre el 30% y el 40% de las neuronas de la SN refleja adecuadamente una SN en proceso de neurodegeneración. Este es un nivel de neurodegeneración deseable para modelar la patología en estudio.

Es importante resaltar que en nuestro modelo de estudio, en que a un animal en proceso de neurodegeneración le inyectamos un estímulo inflamatorio, el estado de la neurodegeneración al momento de inyectar el estímulo inflamatorio, es vital para modelar la patología. Un animal en el que apenas esté comenzando un proceso de neurodegeneración no es comparable a uno en que el proceso esté más avanzado ni similar al animal en que ya neurodegeneraron casi todas sus neuronas. Por lo tanto, es importante lograr un nivel de neurodegeneración consistente para poder sacar

conclusiones correctas de los estudios del mecanismo subyacente al someter a los animales al estímulo inflamatorio posterior.



**Figura 2.1** Cuantificación de neuronas tirosina hidroxilasa positivas (TH+) en la SN. Se grafican diferentes grupos de animales operados con el mismo reactivo a lo largo del tiempo. Recuento de células TH+ expresadas como porcentaje del hemisferio ipsilateral con respecto al contralateral a los 21 días de la inyección de 6OHDA. Nótese la variación de la eficacia de la 6OHDA a los diferentes tiempos. La media de neuronas remanentes es de 71.62/ , 77.19/ , 88.28/ y 71.97 para cada uno de los grupos (n=3-6 por columna).



**Figura 2.2** Cuantificación de neuronas TH+ en la SN. Se grafican diferentes grupos de animales operados con las diferentes presentaciones de 6OHDA de los dos fabricantes disponibles. Cada punto representa un experimento. Recuento de células TH+ expresadas como porcentaje del hemisferio ipsilateral con respecto al contralateral a los 21 días de la inyección de 6OHDA. Nótese la variación de la eficacia de la 6OHDA de cada fabricante (Sigma y MP) y cada presentación en los diferentes grupos experimentales.

Durante el desarrollo de los diferentes experimentos notamos un comportamiento errático en el funcionamiento de la 6OHDA (Ver Figura 2.2). Así, consultamos con otros grupos de experimentación que emplean la toxina y verificamos que la mayoría de los grupos había experimentado problemas similares.

Para esclarecer la causa de la fluctuación sometimos a estudio las diferentes variables que suponíamos podían ser responsables de la misma. Diseñamos los siguientes experimentos para evaluar las variables presuntamente responsables de la fluctuación observada.

Como primera medida se decidió tomar recaudos extremos al manipular la droga. Se empleó solamente una nueva 6OHDA fabricada por Sigma, la cual se provee previamente estabilizada con ácido ascórbico y envasada de a 5mg. La toxina solo se emplea dentro de las 3 horas de disuelta y cada frasco se disuelve en su totalidad en cada uso. Se emplearon solo dos números de lote para todos los experimentos

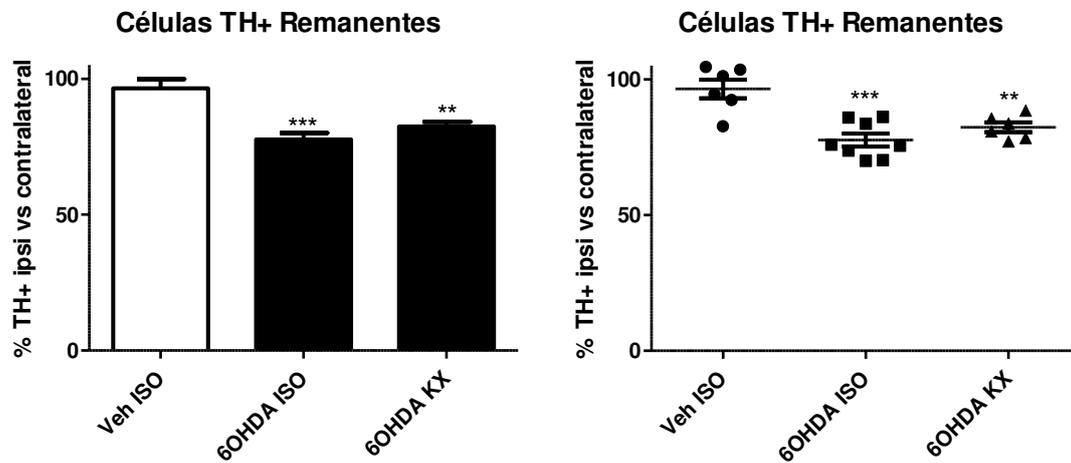
Las variables estudiadas fueron; anestesia, cepa de ratas, dosis empleada y coordenadas estereotáxicas de inyección.

## **2.1 Anestesia**

La hipótesis de que el método anestésico empleado pudiera interferir con la neurotoxicidad inducida por 6OHDA fue propuesta por Datla y col. (Datla, Zbarsky et al. 2006; Ferro, Angelucci et al. 2007). De acuerdo a estas publicaciones la combinación anestésica Ketamina/Xilazina (**KX**), sería neuroprotectora en modelo de neurodegeneración por 6OHDA. Otros anestésicos empleados (Isoflurano, Tiopental, Fentanilo/medetomidina, Etorfina/metotrimeprazina) no evidenciaron este efecto. Para evaluar dicha hipótesis se llevó a cabo el siguiente experimento.

Ratas Wistar macho adultas se inyectaron en el cuerpo estriado izquierdo (Ver Materiales y Métodos 2.2.1) con 20 µg de 6OHDA recién disuelta en 4 µl de una solución 0.2mg/ml de ácido ascórbico (vehículo). Se anestesió a los animales con Ketamina (80mg/kg) / Xilazina (8mg/kg) intramuscular o con isoflurano (**ISO**) 3/ gaseoso. Se operó un grupo de animales solo con el vehículo y anestesia gaseosa.

Para evaluar la cantidad de neuronas dopaminérgicas remanentes luego de la administración de 6OHDA se realizó un recuento de neuronas TH+ en la SN de los animales en los diferentes grupos.



**Figura 2.3** Cuantificación de neuronas TH+ remanentes en SN. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . ANOVA de un factor seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. N=6 a 8 por grupo.

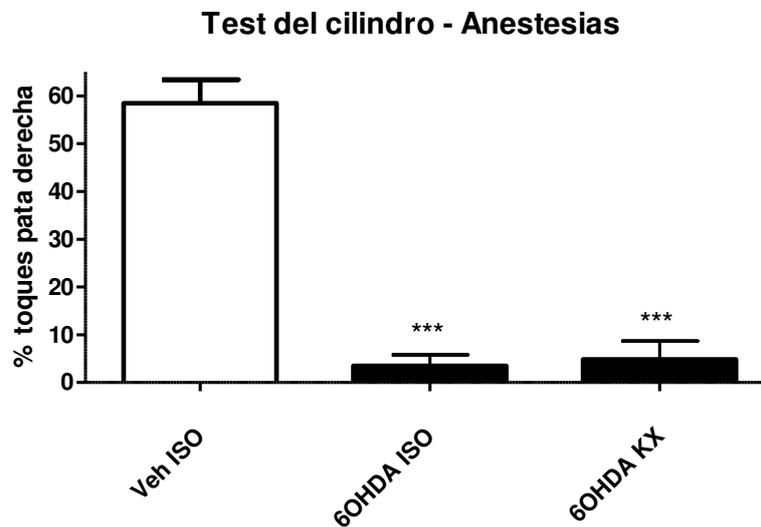
El promedio de neuronas dopaminérgicas remanentes con ISO fue de 77.64/ ( $\pm 6.66/$ ) y de 82.36/ ( $\pm 4.38/$ ) para KX (Ver Figura 2.3). No se observaron diferencias significativas entre los grupos con diferentes anestésicos.

### 2.1.1 Estudio comportamental motor.

Para evaluar la posible influencia de la anestesia sobre la acinesia de los miembros delanteros, contralaterales a la inyección, que se observa en los modelos unilaterales de EP, se realizó el **test del cilindro** (Schallert and Jones 1993). En este test se evalúa el uso de los miembros delanteros de los animales al posarse sobre un cilindro. Para realizar este test, se pone individualmente a cada animal en un cilindro transparente de acrílico de 20cm de diámetro y 30 cm de altura. Se cuentan las veces que el animal posa su peso sobre la pared del cilindro con cada una



de las patas delanteras diferenciando derecha de izquierda. En un animal sano, los toques deberían ser aproximadamente iguales con cada una de las patas. Los animales lesionados apoyan más veces la pata ipsilateral a la lesión ya que las vías de inervación motora se cruzan. El test se realizó al día 20 post administración de 6OHDA.



**Figura 2.4** Test del cilindro. Ambos grupos lesionados presentan compromiso motor significativo al compararlos con el grupo control (Veh/ISO) \*\*\*  $p < 0.001$ . ANOVA de un factor seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. N=6 a 8 por grupo.

Se verificó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos inyectados con 6OHDA y el veh/ISO. No se observaron diferencias entre los grupos inyectados con la toxina. Se verificó la acinesia de la pata contralateral a la inyección (Ver Figura 2.4).

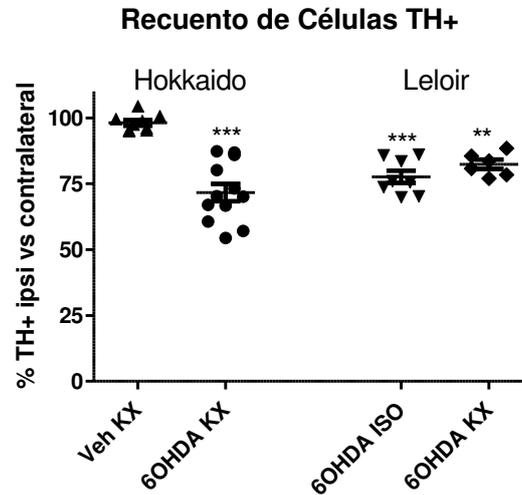
### 2.1.2 Conclusión

La inyección central de 6OHDA logra una neurodegeneración estadísticamente significativa al compararla con el grupo Veh/ISO sin ser de relevancia el anestésico empleado. El compromiso motor es también similar con ambos anestésicos como lo demuestra el test del cilindro.

## 2.2 Cepa de ratas

Con el objetivo de evaluar la susceptibilidad a la 6OHDA en una cepa de ratas diferente a las Wistar Jackson/Leloir se operó un grupo de ratas Wistar Hokkaido. Se

inyectaron en el cuerpo estriado izquierdo (Ver Materiales y Métodos 2.2.1) con 20 $\mu$ g de 6OHDA recién disuelta en 4  $\mu$ l de una solución 0.2mg/ml de ácido ascórbico (vehículo).



**Figura 2.5** Cuantificación de neuronas TH+ en la SN de ratas Wistar Hokkaido y Wistar Leloir. Recuento de células TH+ expresadas como porcentaje del hemisferio ipsilateral con respecto al contralateral a los 21 días de la inyección de 6OHDA. Se verifica una neurodegeneración significativa en los animales lesionados al compararlos con el vehículo. Los grupos de animales 6OHDA no presentan diferencias entre ellos. \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  ANOVA de un factor seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. N=6 a 12 por grupo.

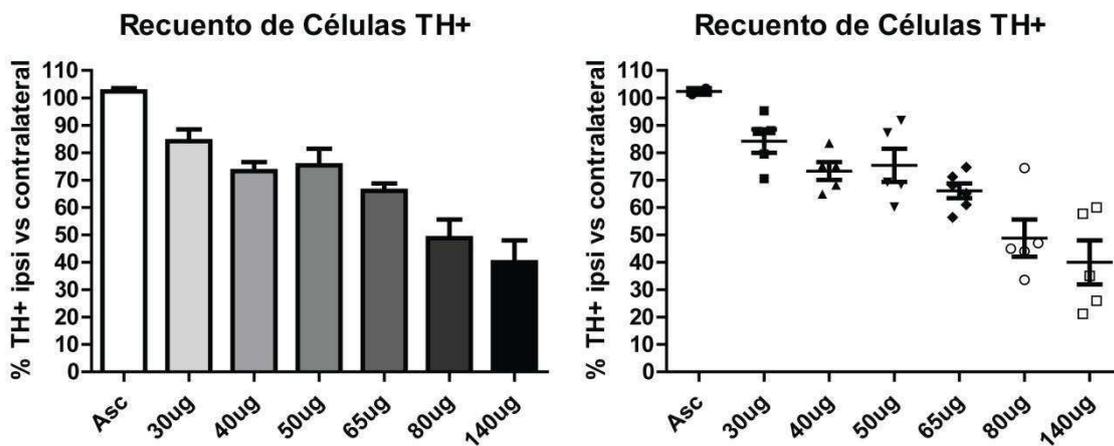
### 2.2.1 Conclusión

La inyección central de 6OHDA en ratas Wistar/Hokkaido neurodegenera con significancia estadística las neuronas dopaminérgicas de la SN (71.63/  $\pm$ 11.43/ de neuronas dopaminérgicas remanentes) al compararlas con las ratas inyectadas con vehículo (98.09/  $\pm$  3.13/ de neuronas remanentes). Los niveles de neurodegeneración alcanzados en las ratas Wistar/Hokkaido son similares a los obtenidos con la cepa Wistar/Leloir (Ver Figura 2.5). Estos datos nos llevan a concluir que la diferencia en cepas no es responsable de la fluctuación en la eficacia de la 6OHDA.

### 2.3 Variación de dosis empleada

Debido a que la dosis empleada tradicionalmente de 6OHDA generaba niveles fluctuantes de neurodegeneración respecto a los que se habían obtenido con

anterioridad en el laboratorio (Ver Figura 2.1), diseñamos experimentos con diferentes dosis de la toxina para evaluar esta variable. La dosis publicada (Pott Godoy, Tarelli et al. 2008) para los experimentos con 6OHDA fue de 20  $\mu\text{g}$ , disueltos de la misma manera en que lo publicaron Sauer y Oertel (Sauer and Oertel 1994). Para estudiar la influencia de la dosis en la neurodegeneración se inyectaron ratas con 30, 40, 50, 65, 80 y 140  $\mu\text{g}$  de 6OHDA recién disuelta en 4  $\mu\text{l}$  de una solución 0.2mg/ml de ácido ascórbico (vehículo) en el cuerpo estriado izquierdo. Se anestesió a los animales con KX (80/8mg/kg) intramuscular.



**Figura 2.6** Cuantificación de neuronas TH+ en la SN. Se grafican dosis crecientes de 6OHDA. Recuento de células TH+ expresadas como porcentaje del hemisferio ipsilateral con respecto al contralateral a los 21 días de la inyección de 6OHDA. Nótese el aumento progresivo de la neurodegeneración con el aumento de las dosis de 6OHDA y la alta variabilidad en las dosis mayores.

Al estudiar el número de neuronas dopaminérgicas remanentes en cada una de las dosis se verifica un aumento de neurodegeneración con las crecientes dosis de 6OHDA (Ver Figura 2.6). El porcentaje de neuronas remanentes al compararlo con el lado contralateral a la inyección es para 30  $\mu\text{g}$  de 84.24/ ( $\pm 9.47$ /), para 40  $\mu\text{g}$  de 73.33/ ( $\pm 7.24$ /), para 50  $\mu\text{g}$  de 75.40/ ( $\pm 13.51$ /) y para 80  $\mu\text{g}$  de 48.8/ ( $\pm 15.225$ /). La dosis de 140  $\mu\text{g}$  de 6OHDA logra 39.99/ de neuronas remanentes ( $\pm 17.94$ /) y se acompaña de daño masivo en el cuerpo estriado inyectado (evidenciado como un área de necrosis masiva que ocupa las dos terceras partes del cuerpo estriado correspondiente al lado inyectado – datos no mostrados). La dosis de 65  $\mu\text{g}$  muestra la

menor dispersión ( $\pm 6.7\%$ ) y logra una neurodegeneración promedio apropiada ( $66.08\%$ ) para futuros experimentos.

### **2.3.1 Conclusión**

Se selecciona la dosis de 65ug de 6OHDA para futuros experimentos por ser la de menor variabilidad y de un adecuado nivel de neurodegeneración.

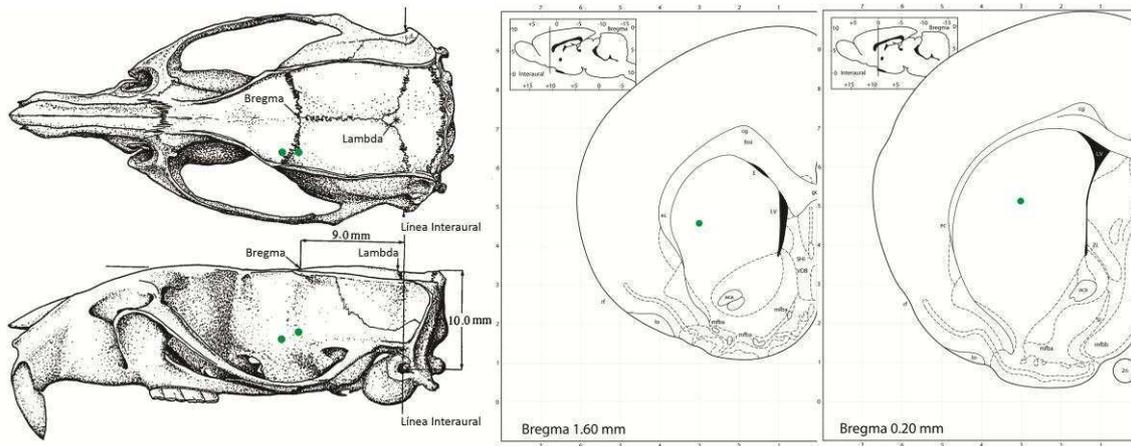
## **2.4 Coordenadas del sitio de inyección**

Con la intención de evaluar diferentes coordenadas de inyección se operaron animales con dos sitios de inyección en el estriado o con una única inyección en el fascículo prosencefálico medial (MFB).

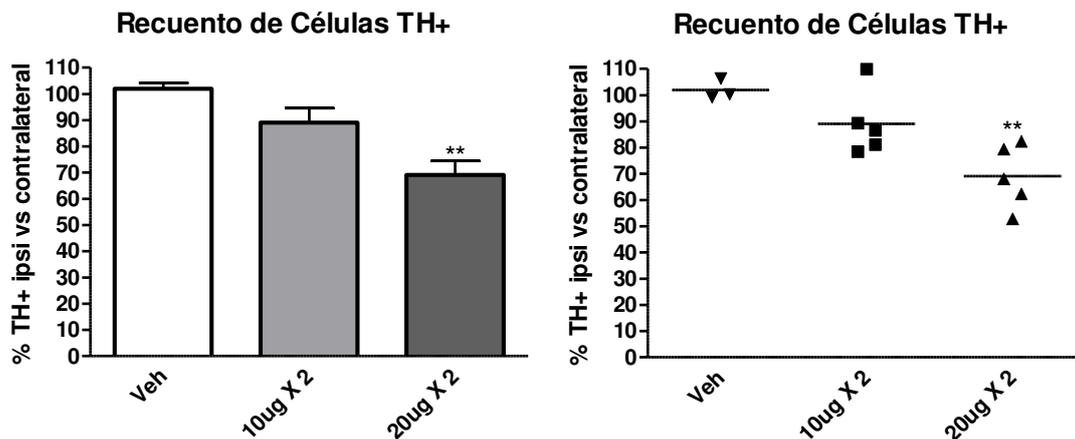
### **2.4.1 Dos sitios de inyección en el cuerpo estriado**

Para evaluar la posibilidad de que aumentando la distribución de la toxina a lo largo del cuerpo estriado, lograríamos una mayor neurodegeneración y menos variable, operamos animales desdoblado la dosis en dos sitios de inyección dentro del cuerpo estriado. Estos experimentos se realizaron al mismo tiempo que se realizaban los estudios de dosis crecientes de 6OHDA, por esta razón probamos también una dosis aumentada de la toxina.

Se inyectaron en el cuerpo estriado izquierdo en dos coordenadas (Paxinos and Watson 1986) con  $2 \times 10\mu\text{g}$  o  $2 \times 20\mu\text{g}$  de 6OHDA recién disuelta en  $4\mu\text{l}$  de una solución  $0.2\text{mg/ml}$  de ácido ascórbico (vehículo). Las coordenadas empleadas para el primer sitio de inyección fueron: Anteroposterior **+0.16** Lateral izquierdo **+0.3** Profundidad desde corteza **-0.45**. Para el segundo sitio de inyección fueron: Anteroposterior **+0.02** Lateral izquierdo **+0.3** Profundidad desde corteza **-0.45** (Ver Figura 2.7). Se empleó la combinación anestésica Ketamina/Xilacina.



**Figura 2.7** Esquema mostrando los sitios de inyección en verde, sobre el cráneo de la rata y en las coordenadas estereotáxicas seleccionadas para ambos sitios de inyección en cuerpo estriado. En el esquema de perfil del cráneo de rata se esquematiza la profundidad de las inyecciones también en verde. Modificado de Paxinos (Paxinos and Watson 1986).



**Figura 2.8** Cuantificación de neuronas TH+ en la SN. Se grafican la dosis habitual de 6OHDA desdoblada en dos sitios de inyección y el doble de la dosis habitual desdoblada de la misma manera. Recuento de células TH+ expresadas como porcentaje del hemisferio ipsilateral con respecto al contralateral a los 21 días de la inyección de 6OHDA. Nótese el aumento progresivo de la neurodegeneración con el aumento de las dosis de 6OHDA. \*\*  $p < 0.01$  AVOVA de 1 factor seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Se analizó la cantidad de neuronas dopaminérgicas remanentes en la SN al día 21 post operación. Las neuronas dopaminérgicas remanentes, con la dosis habitual de la toxina desdoblada en dos sitios de inyección, es de 89.03/ ( $\pm 12.43$ /) al compararla con el lado contralateral a la inyección. El nivel de neurodegeneración es menor al alcanzado con la toxina inyectada en un solo sitio. Al inyectar el doble de la dosis desdoblada en dos sitios, la neuronas remanentes alcanzan el 69.03/ ( $\pm 12.18$ /) (Ver Figura 2.8). Este nivel de neurodegeneración es similar al alcanzado con una dosis

única de 40µg de toxina inyectada en un solo sitio, como se ve en el experimento de variación de dosis, con 73.33/ (±7.24/ ) de neuronas dopaminérgicas remanentes. Nótese el aumento de desvío estándar de 7.24/ con un único sitio de inyección a 12.18/ al desdoblar en dos sitios de inyección.

#### **2.4.1.1 Conclusión**

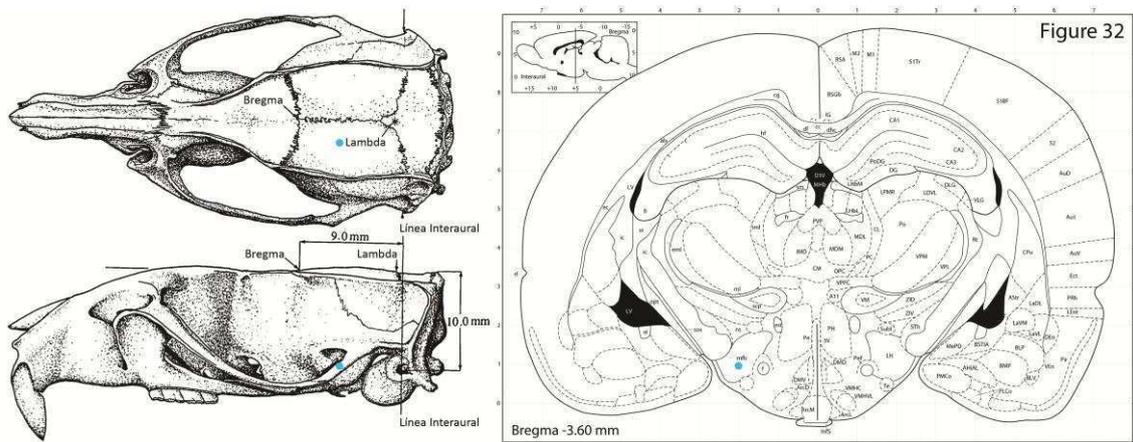
La operación en la que se desdobra la dosis en dos sitios de inyección (2 X 10µg) no alcanza los niveles de neurodegeneración previamente publicados. Al duplicar y desdoblar la dosis en dos sitios de inyección (2 X 20µg) se alcanzan niveles adecuados de neurodegeneración aunque similares a los logrados con la misma dosis en un solo sitio de inyección pero con mayor desvío estándar. No se justifica este procedimiento, en el que se expone a los animales a un mayor riesgo operatorio (mayor tiempo de operación y anestesia junto con dos sitios de inyección) sin un claro beneficio.

#### **2.4.2 Operación en el MFB**

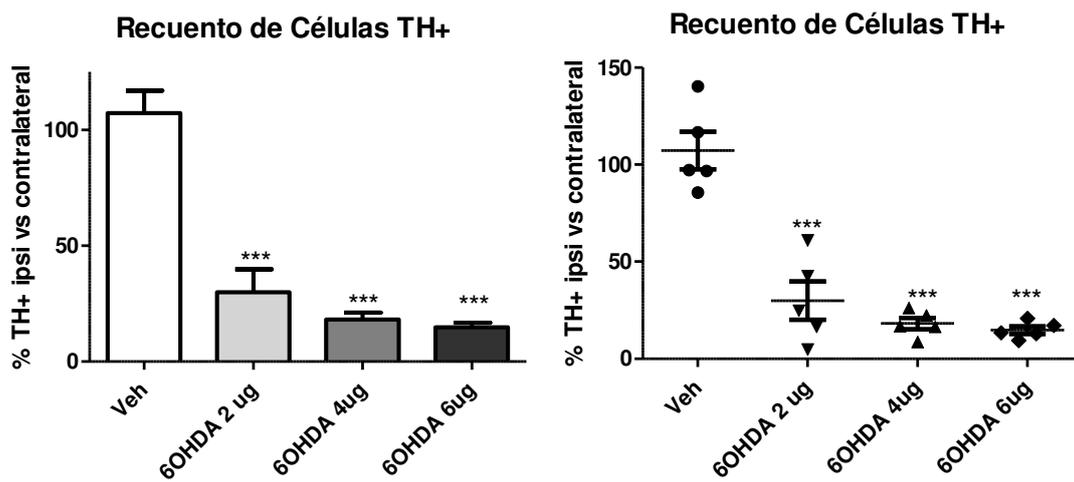
El fascículo prosencefálico medial (MFB) es un haz de axones de la vía dopaminérgica que comunica los núcleos neuronales que se encuentran en la SN con el cuerpo estriado en su parte dorsal (Deumens, Blokland et al. 2002).

La denervación selectiva de neuronas dopaminérgicas en el modelo de 6OHDA se puede lograr inyectando la toxina en tres estructuras blanco. El cuerpo estriado, la SN y el MFB. La inyección en SN o MFB induce una degeneración rápida y casi completa de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Para evaluar la posibilidad de que dosis bajas de 6OHDA inyectadas más próximas anatómicamente a la SN produjeran niveles de neurodegeneración menores y menos variables se operaron animales con coordenadas en el MFB.

Se inyectaron 5 animales por grupo según las coordenadas seleccionadas del atlas de cerebro de rata (Paxinos and Watson 1986) con 2, 4 o 6 µg de 6OHDA recién disuelta en 2µl de una solución 0.1mg/ml de ácido ascórbico (vehículo). Se inyectó también un grupo de animales control solo con vehículo. Las coordenadas empleadas fueron: Anteroposterior -0.36 Lateral izquierdo +0.2 Profundidad desde corteza -0.84 (Ver Figura 2.9). Se empleó la combinación anestésica Ketamina/Xilacina. Se analizó la cantidad de neuronas dopaminérgicas remanentes en la SN al día 21 post operación.



**Figura 2.9** Esquema mostrando los sitios de inyección en celeste, sobre el cráneo de la rata y en las coordenadas estereotáxicas seleccionadas para el MFB. En el esquema de perfil del cráneo de rata se esquematiza la profundidad de las inyecciones. Modificado de Paxinos (Paxinos and Watson 1986).



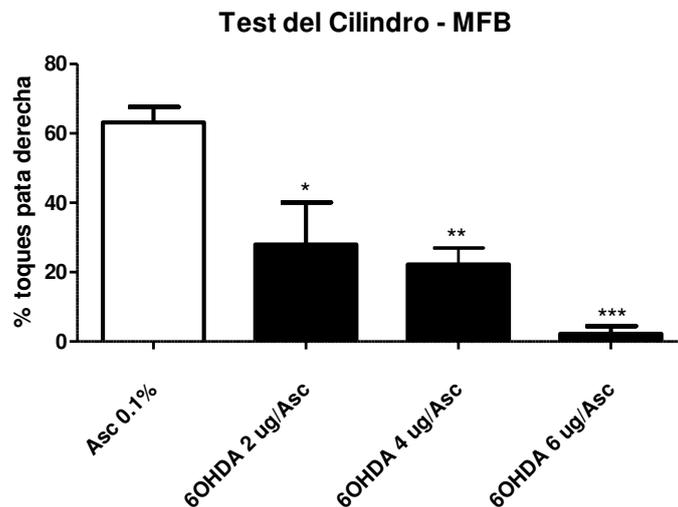
**Figura 2.10** Cuantificación de neuronas TH+ en la SN. Se grafican las diferentes dosis de 6OHDA inyectada en el MFB. Recuento de células TH+ expresadas como porcentaje del hemisferio ipsilateral con respecto al contralateral a los 21 días de la inyección de 6OHDA. Nótese el bajo porcentaje de neuronas TH+ remanentes a pesar de las bajas dosis de 6OHDA empleadas. \*\*\* p<0.001 AVOVA de 1 factor seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. n= 5 por grupo.

Las neuronas dopaminérgicas remanentes promedio para cada uno de los grupos fue de 29.96/ (±22.17/ ) para el grupo de 2µg, de 18.13/ (±6.64/ ) para el de 4µg y de 14.76/ (±4.33/ ) para el de 6µg. El grupo control inyectado solamente con vehículo dio un promedio de 107.3/ (±21.64/ ) (Ver Figura 2.10). Nótese la alta variabilidad del grupo control y del inyectado con la menor dosis de 6OHDA. En todos

los grupos inyectados con toxina en el MFB los niveles de neurodegeneración son demasiado elevados como para adoptar este método como modelo de neurodegeneración parcial. En promedio, más del 70% de las neuronas fueron afectadas.

#### 2.4.2.1 Correlato motor, test del cilindro

En los tres grupos lesionados se verifica un déficit motor significativo al compararlos con el grupo control (Ver Figura 2.11). Estos elevados niveles de neurodegeneración provocan una respuesta motora consistente.



**Figura 2.11** Test del cilindro. Los grupos lesionados presentan compromiso motor significativo al compararlos con el grupo control (Asc) \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$ . ANOVA de un factor seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. N=4 a 5 por grupo.

#### 2.4.2.2 Conclusión

Estos grupos de animales no logran modelar el proceso progresivo de neurodegeneración en la SN ya que la misma es casi total. El comportamiento motor acompaña los elevados niveles de neurodegeneración. En estas condiciones el modelo de inyección en MFB no es útil para nuestros estudios.

### **3 Conclusión general**

Para estudiar el mecanismo de la exacerbación de la neurodegeneración por inflamación se decidió operar ratas Wistar macho con 65 µg de 6OHDA esperando que los niveles de neurodegeneración estén entre el 30 y el 40%. El anestésico empleado será indistintamente Isoflurano gaseoso o la combinación anestésica de ketamina/xilacina intramuscular. Se empleará la misma anestesia para todos los animales de un mismo experimento.

## Capítulo 3

## Capítulo 3

### 1 - Objetivo

El objetivo específico de este capítulo es estudiar los mecanismos moleculares de la exacerbación de la neurodegeneración mediante la técnica de microarrays. Estudiaremos específicamente el modelo de exacerbación de la neurodegeneración por inyección de un estímulo pro-inflamatorio en la sustancia nigra.

### 2 - Resultados

Para dilucidar los mecanismos moleculares responsables de la exacerbación de la neurodegeneración se utilizará el modelo desarrollado en Pott, Tarelli y colaboradores 2008 (exacerbación central). El modelo de exacerbación central consiste en inyectar un estímulo proinflamatorio secundario en la SN de los animales previamente inyectados con 6OHDA en el cuerpo estriado. Se decidió el uso de este modelo porque las variables son más controlables que en el modelo de la exacerbación de la neurodegeneración por inflamación periférica. Se utilizó para este modelo la dosis de 6OHDA con menor variación biológica ya definida en el capítulo 2

#### A - Caracterización del modelo de exacerbación central.

En este experimento, se emplean animales en los que se ha modelado la EP mediante la inyección de 6OHDA y 12 días después se inyecta a los mismos un estímulo pro-inflamatorio localmente en la SN (Ver figura 3.1). El estímulo pro-inflamatorio empleado es lipopolisacárido de la pared de bacterias Gram negativas (Ver Materiales y métodos 2.2.2).

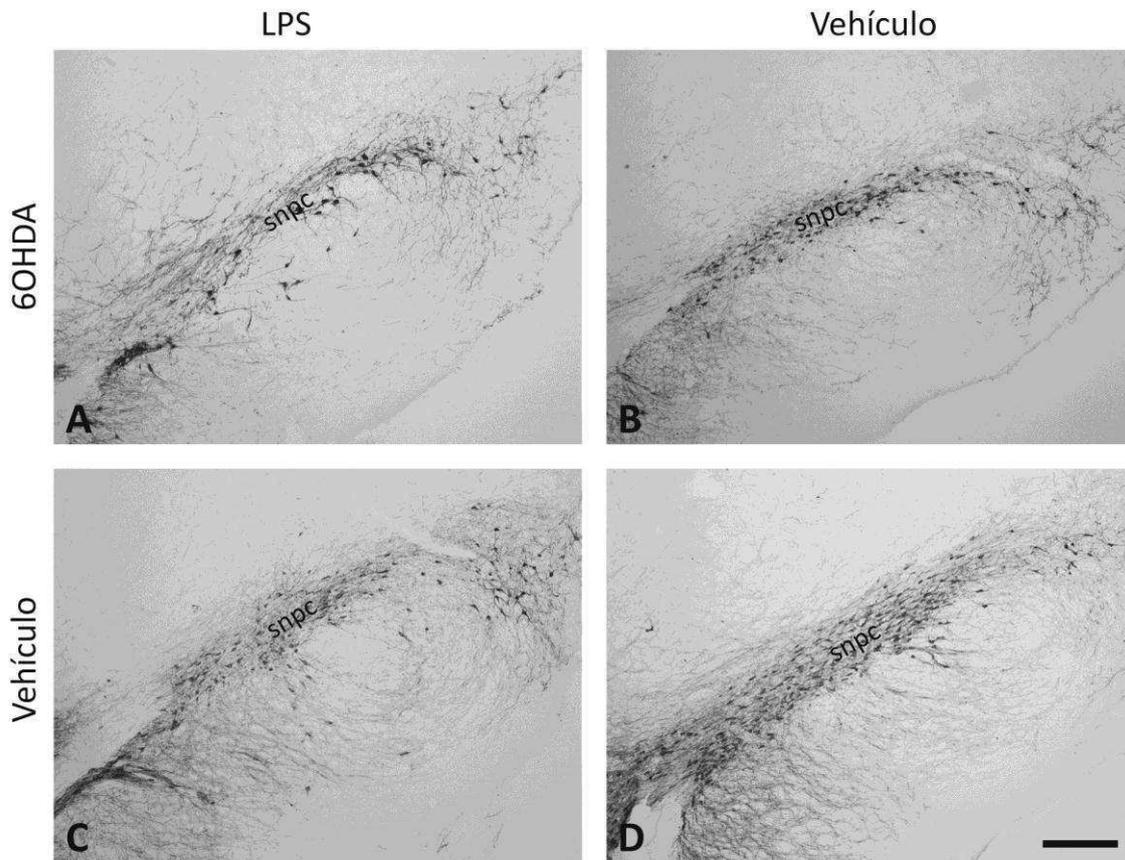


**Figura 3.1** Esquema temporal del experimento.

En este experimento generamos 4 grupos experimentales; 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. En la generación de este modelo se emplearon 65 $\mu$ g de 6OHDA, a partir de los resultados descriptos en el capítulo 2.

Sobre este modelo, se estudió la cantidad de neuronas dopaminérgicas remanentes mediante conteo de células detectadas por inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (Ver Figura 3.2). Asimismo, se evaluaron el infiltrado inflamatorio mediante la técnica de Nissl y el estado de activación de la microglía mediante inmunofluorescencia para TH/GSA.

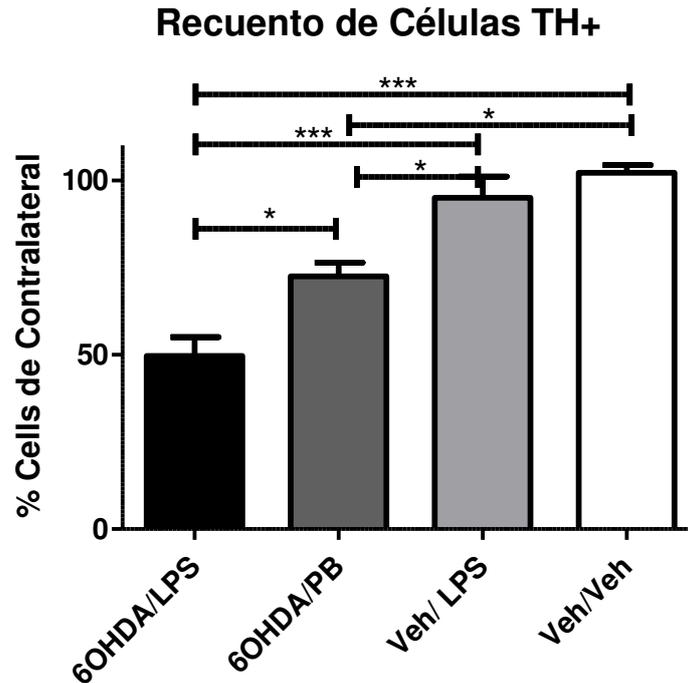
### 2.1 Efecto del estímulo inflamatorio central sobre la neurodegeneración en el modelo animal de EP.



**Figura 3.2** Detección de Tirosina Hidroxilasa por inmunohistoquímica correspondiente a la SN correspondiente al lado ipsilateral a la inyección en los 4 grupos experimentales (**A, B, C y D**). snpc = SN pars compacta. Barra 250 micrones.

Los animales inyectados con Veh/Veh (102.7%) no presentan neurodegeneración al compararlas con el lado contralateral a la inyección (Ver figura 3.2 D y 3.3). Las ratas inyectadas con Veh/LPS (94.98%) presentan una leve neurodegeneración no estadísticamente diferente al control (Ver figuras 3.2 C y 3.3). Esta evidencia indica que la dosis de LPS empleada es un estímulo sub-tóxico ya que no es suficiente para causar neurodegeneración por sí misma en este modelo experimental.

Los grupos 6OHDA/LPS y 6OHDA/Veh presentan 49.6% y 72.4% de neuronas TH+ remanentes, respectivamente (Ver figuras 3.2 A y B y 3.3). Es importante destacar que en el grupo en que se combinan el modelo de EP y el estímulo proinflamatorio periférico (6OHDA/LPS), la neurodegeneración es máxima (50.4%) (Ver figura 3.3). Este efecto es estadísticamente significativo, verificándose interacción entre los factores (neurodegenerativo y proinflamatorio) (ANOVA de dos factores con doble interacción significativa  $p < 0.05$  post hoc test de Bonferroni  $*p < 0.05$ ). El efecto combinado es mayor que la suma de sus componentes. Así, sumando el efecto de 6OHDA/PB (27.6%) y Veh/LPS (5.02%) dan un total de 32.62% versus 50.4% que es la neurodegeneración alcanzada en el grupo 6OHDA/LPS. Concluimos que se verifica exacerbación de la neurodegeneración en el modelo de exacerbación central.



**Figura 3.3** Cuantificación de neuronas TH+ en la SN de los distintos grupos experimentales. Recuento de células TH+ expresadas como porcentaje de células del hemisferio ipsilateral con respecto al contralateral a los 21 días de la inyección de 6OHDA en cada uno de los grupos. ANOVA de dos factores evidenciando interacción doble significativa ( $p < 0.05$ ). Post Hoc test de comparaciones múltiples de Bonferroni \* $p < 0.05$  \*\*\* $p < 0.0001$ .

## 2.2 Efecto del estímulo inflamatorio central sobre la inflamación en SN.

### 2.2.1 Análisis histológico del infiltrado inflamatorio.

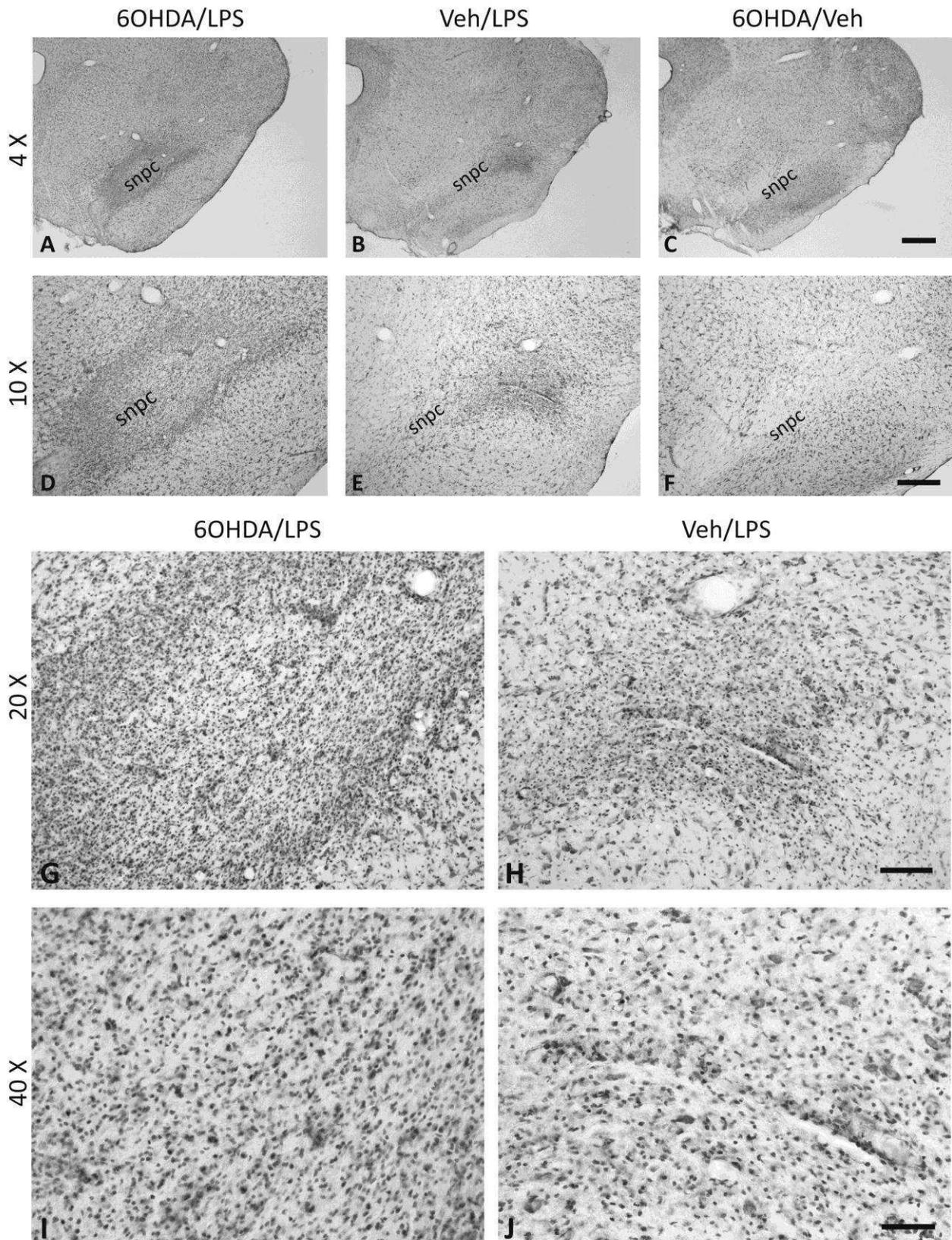
Como parte del análisis de la respuesta inflamatoria en este modelo se analizó la presencia de infiltrado inflamatorio en cada grupo experimental. Los animales inyectados con 6OHDA/LPS presentaron un infiltrado inflamatorio mixto en toda la SN formado por linfocitos, macrófagos y algunos neutrófilos (Ver Figura 3.4). En el grupo Veh/LPS sólo se observó infiltrado inflamatorio en el sitio de inyección pero no en el resto de la SN. No se observó infiltrado inflamatorio en los animales tratados con 6OHDA/Veh ni en los animales Veh/Veh.

### 2.2.2 Análisis de la Microglía y Astroglía

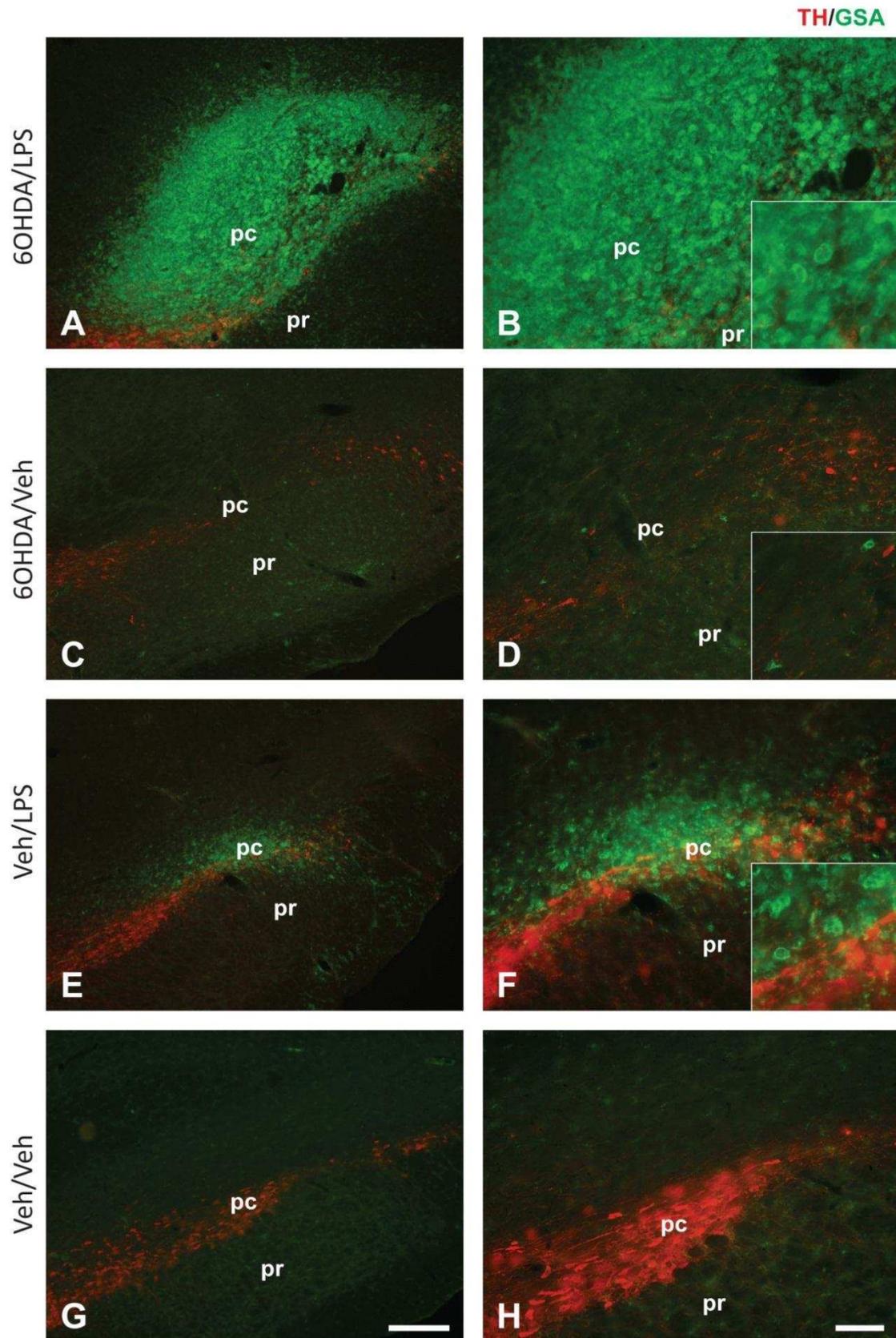
Al analizar el estado de la microglía en los diferentes grupos experimentales (Ver Figura 3.5) observamos que solamente en los animales inyectados con 6OHDA y luego sometidos a LPS la microglía alcanza el estadio máximo de activación a lo largo de toda la SN. En este grupo se detectaron principalmente células GSA+ con el cuerpo

redondeado y sin procesos visibles lo cual corresponde al estadio 4 de activación morfológica (Ver Introducción). Se observaron también algunas células correspondientes a los estadios 2 y 3 de activación morfológica, sin embargo no se visualizaron células en reposo (estadio 1). El grupo 6OHDA/Veh presenta, casi exclusivamente, una morfología compatible con la descripción para estadios 2-3 de activación. Se observaron también células en reposo. El grupo Veh/LPS presenta una activación moderada a lo largo de toda la SN (estadios 2 y 3). El mismo no presenta el estadio de activación tipo 4 fuera del sitio de inyección. Los animales Veh/Veh presentaron mínima activación de la microglía y solo en coincidencia con el tracto de inyección.

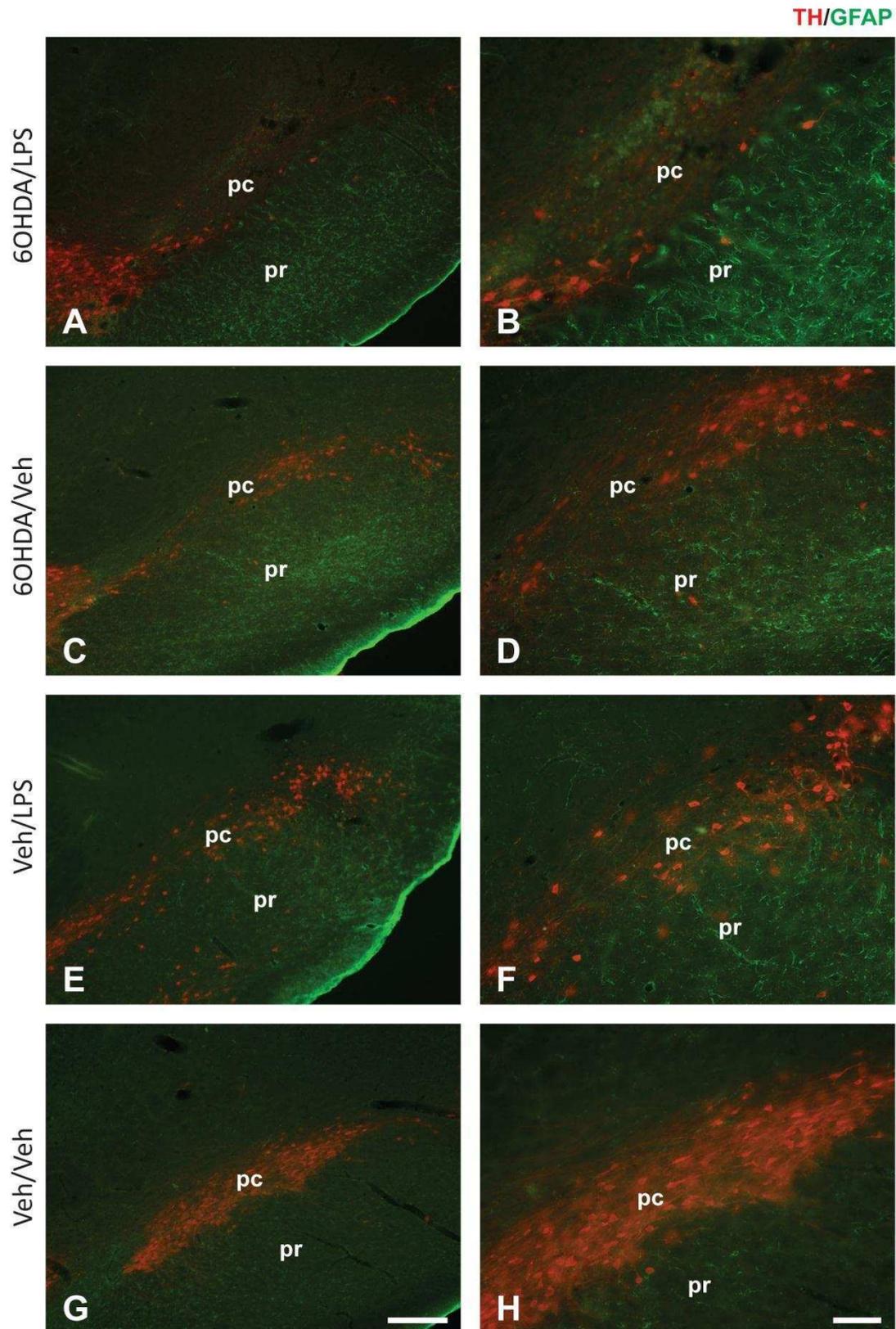
No se observan diferencias entre los grupos al analizar la activación de la astrogía en SNpc mediante GFAP (Ver Figura 3.6).



**Figura 3.4** Análisis del infiltrado inflamatorio correspondiente al lado ipsilateral a la inyección en el modelo central. Se observa infiltrado inflamatorio en los animales inyectados con LPS. El grupo 6OHDA/Veh no evidencia infiltrado inflamatorio (**C** y **F**). Tinción de Nissl. SN pars compacta snpc. A-C Barra 500 micrones, D-F Barra 250 Micrones, G,H Barra 25 micrones e I,J Barra 50 micrones.



**Figura 3.5** Activación microglial en la SN. Inmunohistoquímica para GSA (Verde)/ TH (Rojo). **A-B** grupo 60HDA/LPS mostrando células GSA+ en estadio 4 de activación a lo largo de toda la SNpc. **B** Recuadro mostrando microglía estadio 4 **C-D** grupo 60HDA/Veh, células GSA+ en estadio 2-3 de activación. **D** Recuadro mostrando microglía estadio 2-3 **E-F** grupo Veh/LPS, se ven células GSA+ en estadios 2, 3 y 4 de activación limitados al sitio de inyección. **F** Recuadro mostrando sitio de inyección **G-H** grupo Veh/Veh en que solo se ven células GSA+ en el primer estadio morfológico descrito por Kreutzberg. A, C, E y G Barra 250 micrones. B, D, F y H Barra 25 micrones. pc *pars compacta*, pr *pars reticulata*.



**Figura 3.6** Activación astrogliar en la SN. Inmunohistoquímica para GFAP (Verde)/ TH (Rojo). **A-B** grupo 60HDA/LPS **C-D** grupo 60HDA/Veh. **E-F** grupo Veh/LPS. **G-H** grupo Veh/Veh. No se aprecian diferencias en el estado de activación de la astrogliar en los diferentes grupos experimentales. A,C,E y G Barra 250 micrones. B, D, F y H Barra 25 micrones. pc *pars compacta*, pr *pars reticulata*.

### **Conclusiones de la caracterización del modelo de exacerbación central.**

De esta manera verificamos que en el modelo de exacerbación central un estímulo pro-inflamatorio (dosis sub-tóxica de LPS) inyectado en la SN en degeneración exacerba el daño neuronal y produce la activación al estadio 4 de las células microgliales. Esta activación de la microglía es acompañada a lo largo de toda la extensión de la SNpc de un infiltrado inflamatorio mixto.

Estos datos convalidan resultados similares previamente publicados en este modelo por el grupo (Pott Godoy, Tarelli et al. 2008) y proveen el modelo experimental requerido para el estudio del mecanismo de exacerbación de la neurodegeneración por inflamación.

### **3 - Microarrays**

Con el objetivo de identificar los genes responsables del efecto de exacerbación de la neurodegeneración en nuestro modelo experimental, se estudió el perfil de expresión génica en los diferentes grupos experimentales. Se analizaron muestras resultantes de los experimentos de exacerbación central de la neurodegeneración en la SN por medio de microarrays. Esta tecnología permite identificar genes diferencialmente expresados entre los diferentes grupos que se comparan. Estos genes expresados diferencialmente, serían candidatos a mediar el efecto exacerbante de la neurodegeneración en el modelo de estudio. Para realizar este estudio se emplearon Microarrays comerciales (Microarrays Inc.) que cuentan con más de 34000 oligonucleótidos de ADN de rata de 70 o más pares de bases representando más de 22000 genes (aproximadamente el 60% del genoma de la rata) y 27000 transcritos.

#### **3.1 Diseño experimental**

Para identificar los genes candidatos a ser los mediadores de la exacerbación de la inflamación, se compararon los perfiles de expresión génica de las sustancias nigras de los 4 grupos experimentales.

- Grupo 1 - 6OHDA/LPS
- Grupo 2 - 6OHDA/Veh
- Grupo 3 - Asc/LPS
- Grupo 4 - Asc/Veh

La comparación entre los grupos 1 y 2 describe el efecto de LPS sobre el modelo animal de la enfermedad de Parkinson. La comparación entre los grupos 3 y 4 describe el efecto de LPS sobre ratas control. En este estudio se realiza la comparación entre estas dos comparaciones. Esta comparación entre ambas comparaciones evidencia los genes candidatos a ser los responsables de la exacerbación de la neurodegeneración.

Todas las comparaciones se realizaron a partir de material obtenido de las SN ipsilateral a la operación de los animales de los diferentes grupos experimentales, según se describió previamente en materiales y métodos. Mediante la técnica de microarrays de dos colores se co-hibridaron sobre el array (que tiene impresos los oligonucleótidos que representan el genoma de rata) los ARNs marcados con dos fluoróforos diferentes. Las co-hibridaciones se realizaron contra un ARN comercial de referencia de rata (Agilent, GE), compuesto por el ARN total de 14 líneas celulares de rata representando diferentes tejidos. Se empleó Alexa Fluor 555 (Verde) para la referencia y Alexa Fluor 647 (Rojo) para las muestras.

Sobre cada vidrio se co-hibridizó una muestra experimental contra el ARN de referencia. La principal ventaja de emplear ARN de referencia es que permite la comparación de múltiples grupos experimentales entre sí, sin tener que contrastar experimentalmente los grupos entre ellos. Otra ventaja del uso de ARN de referencia es que al emplear el mismo no es necesario hacer dye swap, que consiste en la marcación cruzada de los ARNs provenientes de los diferentes grupos para descartar el pegado diferencial de los fluoróforos como fuente de las diferencias detectadas. Es decir, se realizan réplicas técnicas, en las que se co-hibrida en primera instancia el ARN correspondiente al tratamiento con un fluoróforo y el control con el otro fluoróforo, y en un segundo experimento se intercambian los fluoróforos. Sin embargo, al ser todas las muestras experimentales (animales tratados y sus controles) marcadas con el mismo fluoróforo y el ARN de referencia siempre con el otro, este control no es necesario.

Debido a que la muestra extraída proviene de una zona anatómicamente pequeña y las operaciones para generar el modelo son de alta complejidad, decidimos amplificar el ARN extraído. Utilizamos el kit SuperScriptIndirect RNA

AmplificationSystem (Invitrogen), que amplifica el ARN mediante una transcripción in vitro, generando así el ARN antisentido (ARNa) que se utiliza como sonda (ver materiales y métodos). Por lo tanto, en cada vidrio se hibridó el ARN proveniente de una única rata con el ARN de referencia. Si no se realizara la amplificación sería necesario juntar el ARN proveniente de al menos cuatro ratas para cada array.

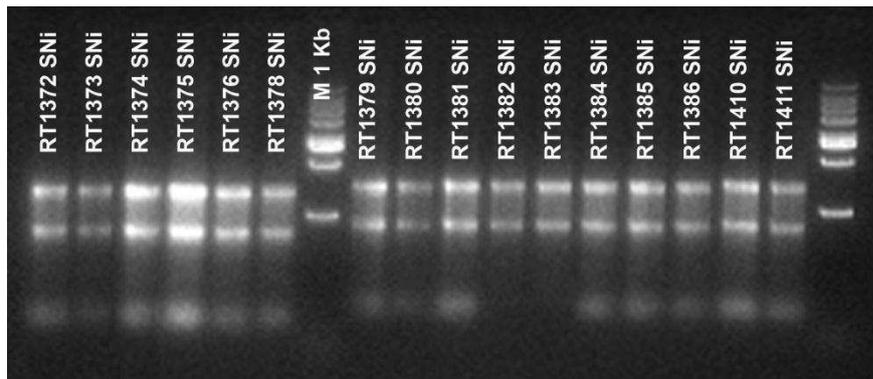
En cuanto a la cantidad de réplicas biológicas, llevamos a cabo cuatro réplicas para cada grupo experimental. En la literatura suelen encontrarse este número de réplicas en trabajos con animales (Marques et al, 2009).

### 3.2 Calidad del ARN

Los animales fueron decapitados al día 21 y se disecó bajo lupa la substancia nigra, que se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. El ARN total se extrajo utilizando TRIZOL y se cuantificó midiendo absorbancia a 260 nm con Nanodrop. Para determinar la calidad del ARN extraído, se midió la absorbancia a 260 nm, 280 nm y 230 nm para evaluar la pureza del ARN. Las muestras empleadas mostraron relaciones A260/A280 (contaminación con proteínas) y A260/A230 (contaminantes orgánicos) superiores a 1.8 compatible con buenos valores de calidad. (Ver tabla 3.1).

Sample ID	ng/ul	Total	A260	A280	260/280	260/230
RT1372 SNI	1176,03	16,46	29,401	14,927	1,97	1,96
RT1373 SNI	757,86	10,61	18,946	9,743	1,94	1,9
RT1374 SNI	1109,56	15,53	27,739	14,15	1,96	2,09
RT1375 SNI	1675,49	23,46	41,887	21,272	1,97	2,11
RT1376 SNI	934,11	13,08	23,353	11,761	1,99	1,8
RT1378 SNI	760,38	10,65	19,009	9,698	1,96	1,98
RT1379 SNI	884,42	12,38	22,11	11,389	1,94	2,13
RT1380 SNI	645,12	9,03	16,128	8,274	1,95	1,93
RT1381 SNI	1065,59	14,92	26,64	13,463	1,98	1,78
RT1382 Sin	215,07	10,54	5,377	2,52	2,13	2,22
RT1383 Sin	254,83	12,49	6,371	3,008	2,12	2,23
RT1384 SNI	1098,75	15,38	27,469	13,955	1,97	1,96
RT1385 SNI	1025,08	14,35	25,627	13,07	1,96	1,92
RT1386 SNI	860,1	12,04	21,502	11,104	1,94	2,07
RT1410 SNI	1137,21	15,92	28,43	14,274	1,99	1,98
RT1411 Sin	832,64	11,66	20,816	10,564	1,97	1,97

**Tabla 3.1** Parámetros de calidad del ARN post extracción. Columnas; nombre de la muestra, concentración, cantidad total, absorbancia a 260, absorbancia a 280, relación 260/280 (evalúa contaminación proteica) y relación 260/230 (evalúa la presencia de contaminantes orgánicos).



**Figura 3.7** Control de calidad de las muestras de ARN destinadas al estudio con microarrays. Muestras de ARN de SN de ratas de los diferentes grupos experimentales se corrieron en un gel de agarosa 1% para corroborar su integridad. M1kb - marcador de peso molecular con incrementos de 1 kilobases.

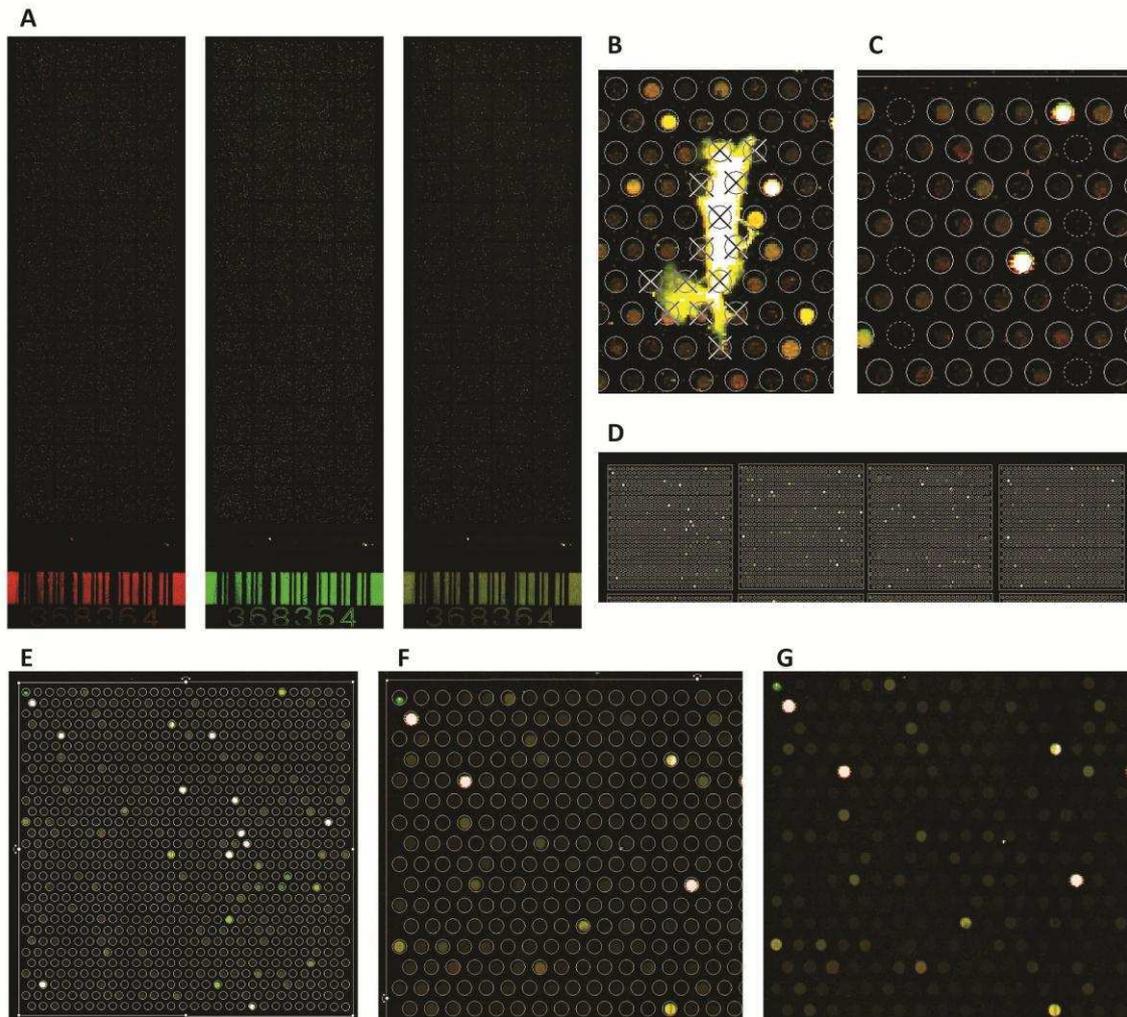
Por otro lado, se corrieron las muestras en un gel de 1% de agarosa para verificar la calidad del mismo. No se observó una banda de alto peso molecular o un chorreado significativo, por lo que puede decirse que no hay contaminación con ADN genómico. No se observa degradación del material obtenido. A su vez, se observaron las dos bandas nítidas correspondientes a los ARN ribosomales (ARNr) 28S y 18S (Ver Figura 3.7).

### 3.3 Identificación de genes candidatos

Los microarrays se pre-hibridaron en una solución de pre hibridación durante 45 minutos a 42°C. Luego de dos lavados con agua milliQ durante 5 minutos, se co-hibridó en cada vidrio 60 pmoles de fluoróforo incorporado al ARNa de las muestras junto con 60 pmoles de fluoróforo incorporado al ARNa de referencia, en buffer de hibridación. La hibridación se realizó durante toda la noche a 42°C en cámaras de hibridación. A continuación se hicieron tres lavados sucesivos de 5 minutos cada uno (en estaciones de lavado), utilizando tres buffers (Ver Materiales y Métodos). Luego de la hibridación de las muestras, los vidrios fueron escaneados con un escáner GenePix 4000B.

### 3.4 Análisis de la imagen

El primer paso para obtener un listado de los genes con su intensidad de señal es analizar la imagen escaneada (Ver Figura 3.8). Este análisis se llevó a cabo utilizando el programa GenePix Pro. Se colocó sobre la imagen escaneada de cada vidrio una grilla delimitando los spots (gridding) provista por el fabricante de los arrays. Manualmente se corrigió la posición de los spots que lo requirieron y se descartaron aquellos spots en los que las imperfecciones no permitió la correcta lectura del mismo (motas de polvo auto fluorescentes, rayas o hebras adheridas al mismo). A continuación, el programa realizó la segmentación de la imagen (se diferenció la señal del background) y finalmente la cuantificación. Esto dio como resultado una tabla de datos crudos, que consistieron en una serie de parámetros como datos de posición e identidad del spot, datos de la intensidad de señal y de la intensidad del background (junto a su media, mediana, desvío estándar y coeficiente de variación), en ambos canales por separado o mostrando la relación entre los dos canales. También se reportaron datos como el porcentaje de pixeles saturados y la relación de señal/ruido para cada spot, que fueron de utilidad para realizar el filtrado de los datos.



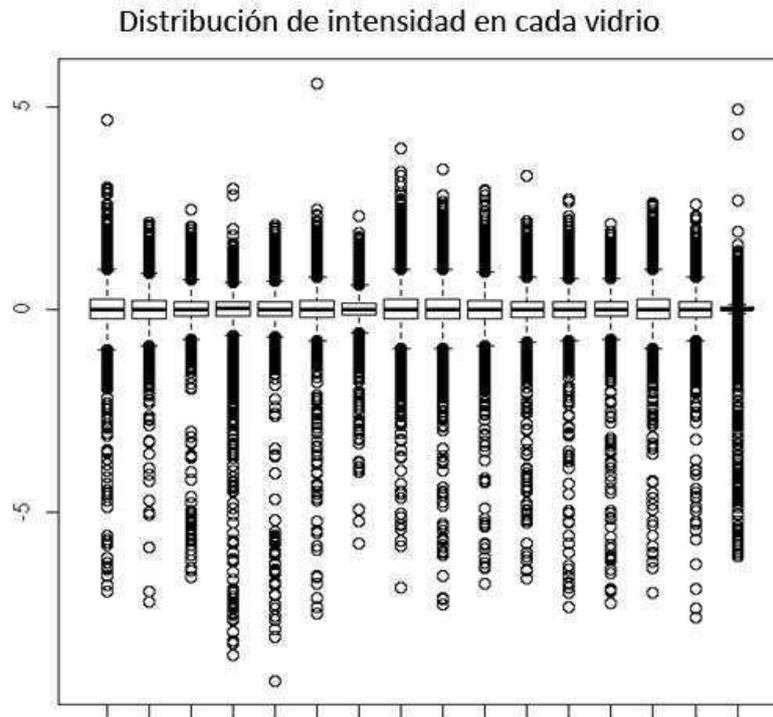
**Figura 3.8** Análisis de la imagen del array. Imagen digital proveniente del escaneo de un array en la que se muestra A) el vidrio completo en cada uno de los fluoróforos y la imagen compuesta B) Spots en los que se ha identificado imperfecciones y fueron descartados manualmente C) Spots ausentes, que no han sido impresos de fábrica, los círculos de la grilla aparece punteados. D) posicionamiento de los primeros 4 bloques de la grilla E) Posicionamiento de un bloque de la grilla F-G) Detalle de un bloque, con (F) y sin (G) grilla.

### 3.5 Análisis de los datos

El análisis de los datos de los experimentos de *microarrays* fue llevado a cabo por el Dr. Elmer Fernandez y el Bioing. Cristobal Fresno del Grupo de Minería de Datos en Bio-Ciencias de la Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Primero, se exploró el comportamiento de la distribución de intensidad de la señal dentro de cada vidrio. Para ello se evaluaron los diagramas de cajas de las intensidades crudas de los vidrios (Ver Figura 3.9). Haciendo uso de los diagramas de cajas se puede comparar la distribución de los datos en una muestra, el diagrama

muestra la distribución por cuartiles, la mediana y los valores máximo y mínimo de la muestra. Se descartó una de las muestras por presentar una distribución diferente a todas las otras. Esta muestra pertenece al grupo de animales control, tratado con Asc/PB.



**Figura 3.9** Variación de la intensidad de cada vidrio mediante diagrama de cajas. Se muestra la mediana (línea) y los percentiles 25 y 75 (caja) para cada muestra. Nótese la distribución de los puntos para cada vidrio. Se excluye del análisis el último vidrio de la derecha por presentar una distribución anómala de la intensidad al compararlo con las otras muestras.

En segundo lugar se realizó la pre-selección de los spots a analizar. Este proceso consiste en filtrar del total de los spots (34.717) los que no poseen anotación en la base de datos de DAVID (14.470) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), es decir solo se emplearon genes que poseen anotación en Gene Ontology (20.247). Asimismo, se descartaron los spots en que la sonda posee hibridación cruzada (4.464), es decir, solo se analizaron los spots que pegan en un único gen (15.783), es decir, poseen una identificación única en Entrez (Gene ID).

Una vez seleccionados los spots que participarán del análisis se procede a normalizar la intensidad dentro de cada vidrio. Se realizó sustracción de background

mediante *normexp*, que provee ajustes basados en modelos matemáticos (Ritchie, Silver et al. 2007) y normalización *print-tip loess*. Este método corrige por desviaciones en la relación de señal en los dos canales debidas a la intensidad y a la posición en el chip (Smyth and Speed 2003) removiendo de esta manera los efectos espaciales locales producto de la hibridación y tendencias en patrones de intensidad no biológicos. Este es uno de los métodos más utilizados y recomendados para la normalización de los datos de microarrays, y asume que la gran mayoría de los genes no están diferencialmente expresados.

Una vez corregidas las intensidades dentro de cada vidrio se normalizó entre los vidrios para que sean comparables las intensidades. En esta oportunidad se utilizó normalización de escala. La normalización de escala (*scale normalization*) consiste precisamente en ajustar la escala de una serie de arrays de modo tal que tengan la misma desviación media (Smyth and Speed 2003).

### 3.6 Análisis estadístico

Para el análisis de expresión diferencial se utilizó el software estadístico R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org), (Smyth 2005) con la librería "limma" disponible en Bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org), (Gentleman, Carey et al. 2004). Se aplicó para cada gen el siguiente modelo:

$$\text{Log}(\text{Crojo}/\text{Cverde})_{ij} = \mu + A_i + B_j + A * B_{ij} + E_{ij}$$

donde  $i = \text{"6OHDA" "Asc"}$  y  $j = \text{"LPS" "Veh"}$

Donde  $\mu$  es la expresión media del gen; A y B los efectos principales; A\*B la interacción de los mismos y se asume que el error cumple con  $E_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$  o sea que el error posee una distribución normal con media cero y la misma varianza a estimar para todos los genes. Dichos modelos se ajustaron mediante la técnica de mínimos cuadrados con homogeneización bayesiana de la varianza (Smyth 2004).

A partir del modelo ajustado, se plantea el contraste de interés biológico (existencia de interacción), donde se le pregunta al modelo por aquellos genes que presentan interacción significativa a un nivel de  $p < 0.05$  y  $|\log_2(\text{Fold-Change})| > 0.65$ , es decir, aquellos genes que varían diferencialmente cuando comparamos la diferencia

de intensidad de ratas 6OHDA/LPS contra 6OHDA/Veh versus Asc/LPS contra Asc/Veh. Se obtienen de este análisis 472 genes (Ver Anexo) que se encontraban diferencialmente expresados al contrastar el efecto de LPS sobre 6OHDA con el efecto de LPS sobre ratas control.

#### 4 - Genómica funcional

La genómica funcional es un campo de la biología molecular que se propone utilizar la vasta acumulación de datos producidos por los proyectos de genómica para describir las funciones e interacciones entre genes (y proteínas). Una característica fundamental de la genómica funcional es el enfoque a gran escala (genoma completo) de estas preguntas, habitualmente empleando métodos de alto rendimiento (como por ejemplo la tecnología de microarrays) en lugar del análisis “gen a gen”. El objetivo final de la genómica funcional es entender la relación que existe entre el genotipo y el fenotipo de cada organismo. Como parte de este esfuerzo nace el proyecto de Ontología Génica (GO por sus siglas en inglés). El mismo busca unificar bajo un vocabulario controlado la descripción de los genes y sus productos en cualquier organismo eucariota. GO consta de tres categorías ontológicas; los procesos biológicos (se refiere al objetivo biológico para el cual el gen contribuye), la función molecular (se refiere a la actividad bioquímica de un producto génico) y el componente celular (se refiere a la localización dentro de la célula en la que el producto génico es activo) (Ashburner, Ball et al. 2000; GO-Consortium 2000).

En la presente tesis doctoral hacemos uso de GO para hacer un análisis de enriquecimiento de ontologías (Set Enrichment Analysis) de los genes candidatos provenientes de los experimentos de microarrays. Para ello empleamos el método de contrastes de múltiples referencias, MRCM por sus siglas en inglés (Fresno, Llera et al. 2012). Posteriormente se exploraron en forma detallada las ontologías teniendo en cuenta el proceso biológico en que los genes diferenciales estaban involucrados.

Los siguientes fueron los nodos de mayor interés dentro de los procesos biológicos estudiados;

Desarrollo de sistemas

Regulación negativa del crecimiento celular  
 Regulación positiva de la muerte celular programada  
 Señalización mediada por segundos mensajeros  
 Homeostasis de calcio  
 Transducción de señales

A partir de los 472 genes diferenciales, teniendo en cuenta estos estudios de contrastes de múltiples referencias MRCM, el proceso implicado para cada uno de estos genes y la experiencia del laboratorio, se generó la siguiente lista de 20 genes candidatos a mediar la exacerbación de la neurodegeneración (Ver Tabla 3.2)

<b>Name</b>	<b>Description</b>
Cmklr1	chemokine-like receptor 1
Il17c	interleukin 17C
Kcnh5	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 5
Enpp1	ectonucleotidepyrophosphatase/phosphodiesterase 1
Rufy3	RUN and FYVE domain containing 3
Grm6	glutamate receptor, metabotropic 6
Gpr44	G protein-coupled receptor 44
Gpr139	G protein-coupled receptor 139
Crhr1	corticotropinreleasing hormone receptor 1
Lat	linker for activation of T cells
Ptger3	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)
Cdkn2aip	CDKN2A interactingprotein
Ip6k2	inositolhexakisphosphatekinase 2
Cth	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)
Rrm2b	ribonucleotidereductase M2 B (TP53 inducible)
Brca2	breastcancer 2
Aldh1a3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3
Niacr1	niacin receptor 1
Brca1	breastcancer 1
Bak1	BCL2-antagonist/killer 1

**Tabla 3.2** genes seleccionados para la validación por PCR en tiempo real.

#### **4.1 Validación por RT-PCR en tiempo real.**

La técnica de *microarrays* se utiliza como un método de *screening* a escala genómica. Los resultados obtenidos deben ser validados por otra técnica, como RT-PCR en tiempo real. Teniendo en cuenta esto, se diseñó un juego de primers para cada uno de los genes candidatos y se pusieron a punto las RT-PCRs de los mismos con la intención de validar técnicamente las diferencias detectadas mediante el estudio de *microarrays*.

#### 4.1.1 Diseño de los Primers

Una vez seleccionados los genes a validar por PCR en tiempo real se empleó el software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - del National Centre for Biotechnology Information de EEUU - NCBI) para verificar que las secuencias impresas en los vidrios se correspondieran con las publicadas en la base de datos para el genoma de rata (*Rattus norvegicus*). Una vez corroborado esto, se diseñaron los primers con el software Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> también del NCBI). Dentro de los parámetros deseados para el diseño de primers se seleccionó, siempre que fuera posible, un amplicón entre 150 y 400 pares de bases, que la temperatura de *melting* fuera entre 59 y 61 grados °C y que en lo posible cada primer estuviera en un exón diferente (exón span). Se logró poner a punto las PCRs para 9 de los 20 genes con los primers diseñados en primera instancia.

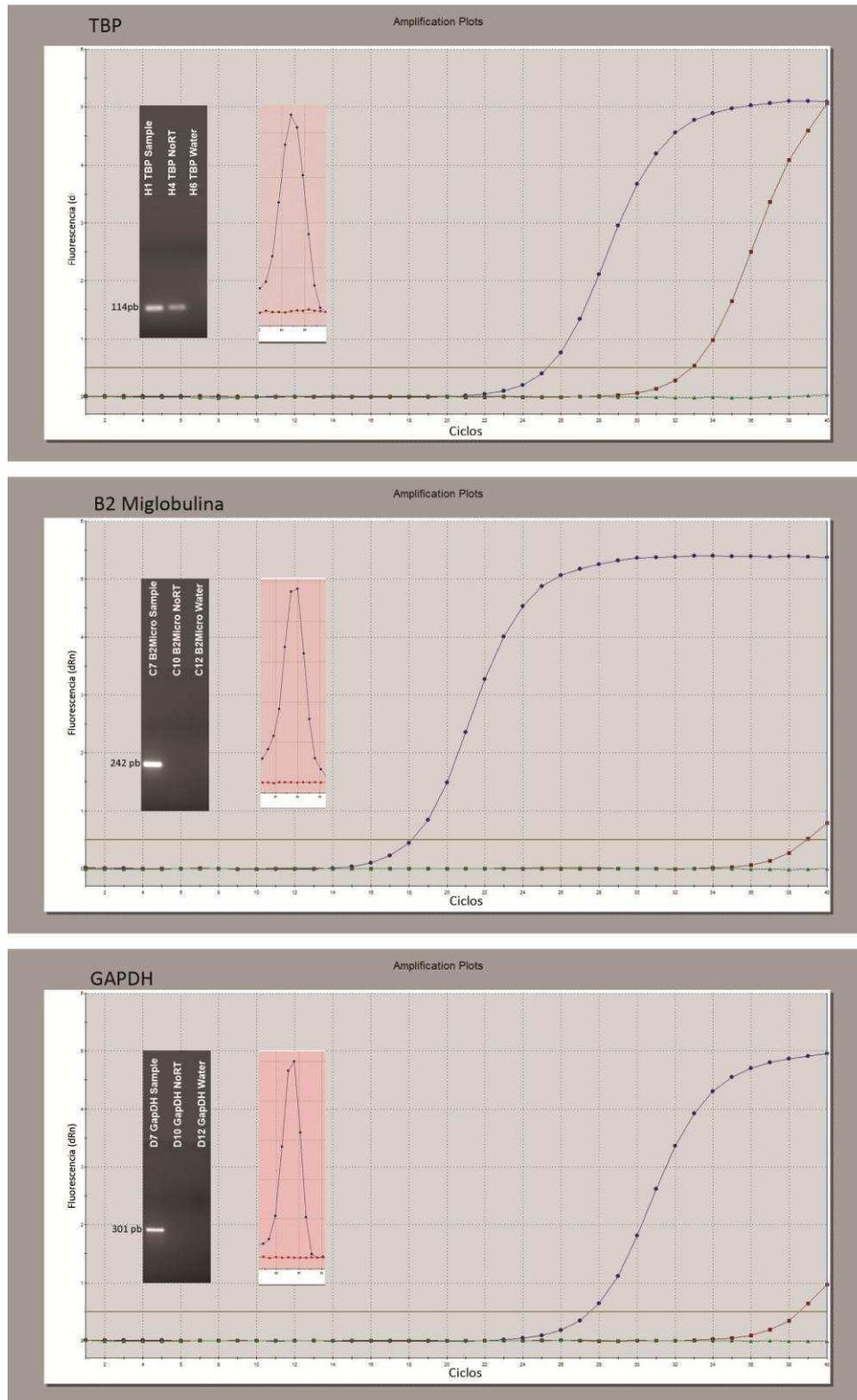
#### 4.1.2 Validación de los genes de referencia (*housekeeping*)

Al realizar los experimentos de RT-PCR en tiempo real, la concentración inicial de ADNc en cada muestra puede variar por factores como la eficiencia de la transcripción reversa o errores de pipeteo. Dado que el objetivo es estudiar la expresión relativa de genes entre muestras, es fundamental normalizar los datos con un gen de referencia de expresión estable (*housekeeping*), que es representativo de la concentración de ADNc en cada muestra. Los genes de referencia son típicamente genes constitutivos requeridos para el mantenimiento básico de la célula y generalmente expresados en todas las células de un organismo. El gen de referencia está sujeto a errores o variaciones simultáneamente a los genes de interés en la preparación del ADNc, lo cual lo hace un excelente control de normalización. Sin embargo, los genes de referencia no se expresan en forma estable en cualquier situación fisiológica. Por lo tanto, es esencial una selección cuidadosa del gen de

referencia (housekeeping) más estable en cada condición experimental particular. En nuestro caso, nos interesa evaluar que los diferentes tratamientos no modifiquen los niveles de los genes que utilizamos como referencia. Por lo tanto, estudiamos en nuestras condiciones experimentales la expresión de tres posibles genes de referencia: la proteína de unión a TATA box (TBP, del inglés TATA box binding protein),  $\beta$ 2-microglobulina y GAPDH (Glyceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa).

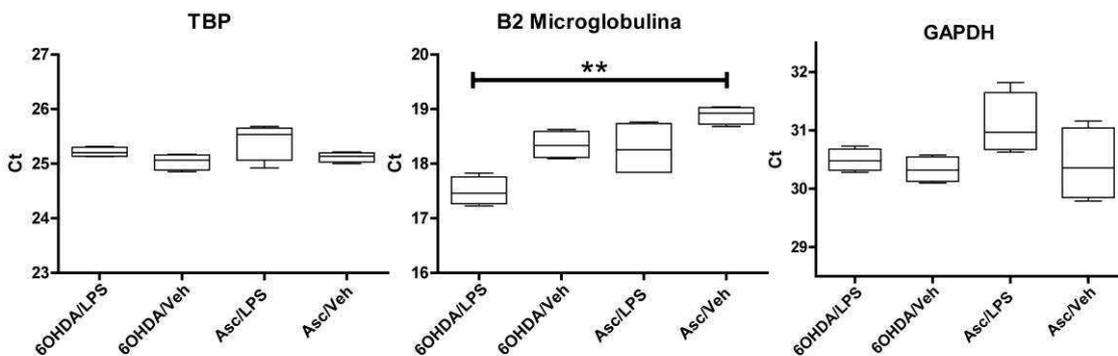
En primer lugar, se pusieron a punto estas tres RT-PCR en tiempo real utilizando como molde una muestra de cDNA de sustancia nigra de ratas naive (Ver figura 3.10). Las curvas de amplificación, así como el análisis de los Ct mostraron una buena reproducibilidad entre triplicados. (Se llama Ct o ciclo umbral al número de ciclo en el cual la fluorescencia de una muestra cruza el umbral de detección de fluorescencia por arriba del background. Cuanto menor el Ct, mayor es la cantidad inicial de ADN para esos primers presente en la muestra). En todos los casos, la diferencia entre los Ct de las muestras y de los controles sin RT, sin polimerasa y sin molde fue igual o mayor a ocho ciclos por lo que puede decirse que hay por lo menos  $2^8=256$  veces menos producto en los controles negativos que en las muestras. Al analizar las curvas de disociación, se observaron picos únicos, lo que sugiere, la ausencia de productos inespecíficos.

Al analizar el gel se observó en todos los carriles una única banda del valor esperado (Ver figura 3.10). En el caso de TBP aparece una banda más tenue en el carril correspondiente al control sin transcripción reversa. Es importante destacar que en el diagrama de curvas de amplificación, la curva correspondiente a este control se hace detectable por lo menos 8 ciclos más tarde poniendo en evidencia la menor concentración de partículas en la muestra original.

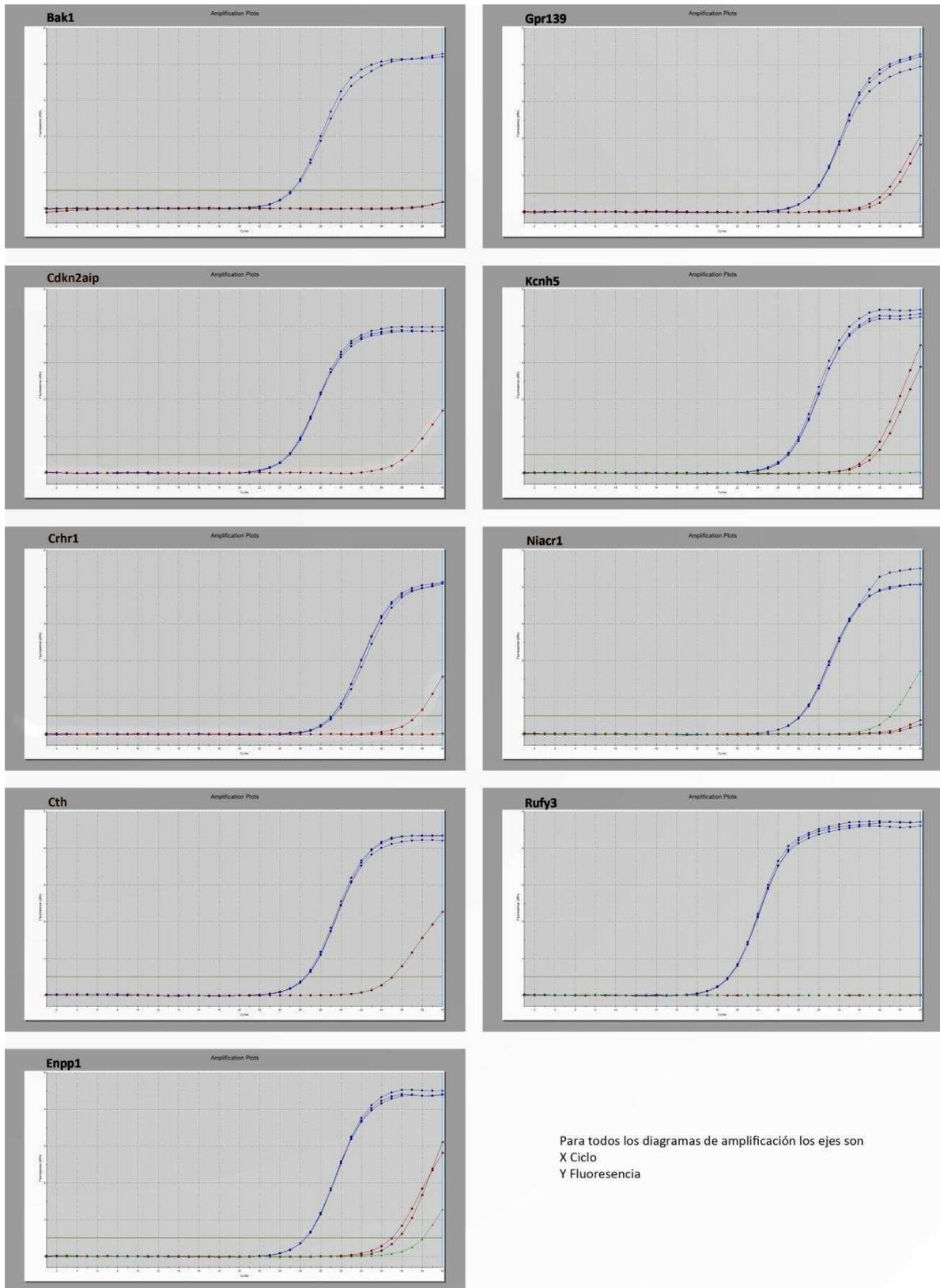


**Figura 3.10** Puesta a punto de los genes de referencia. Curvas de amplificación en que se aprecia el ciclo en que se hacen detectables la muestra (en azul), el control sin RT (en rojo) y la muestra sin templado (en verde). Curvas de disociación, recuadro en rojo, en que se ve (en azul) un único pico correspondiente al producto de la reacción y (en rojo) la curva para la muestra sin templado. El recuadro de fondo negro corresponde a la fotografía del gel de control de calidad para cada uno de los genes de referencia.

Una vez puestas a punto, se llevaron a cabo las RT-PCR en tiempo real para TBP,  $\beta$ 2-microglobulina y GAPDH en todas las muestras de sustancia nigra de los animales. Nuevamente, se observó una buena reproducibilidad entre triplicados, una diferencia de al menos 8 ciclos entre las muestras y los controles negativos, y un único pico en la curva de disociación. Para analizar la estabilidad de la expresión de estos genes de referencia en nuestro sistema se comparó la expresión relativa de los mismos entre los diferentes grupos. Idealmente no debería haber diferencias entre los niveles de expresión de los genes de referencia entre los diferentes tratamientos. Al analizar los niveles de expresión de los genes de referencia se observa que en uno de los mismos,  $\beta$ 2-microglobulina, se verifica una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión entre los grupos experimentales (Figura 3.11). Esto descalifica al mismo como gen de referencia. Por lo tanto, podemos concluir que dos (TBP y GAPDH) de los tres genes seleccionados se expresan en forma estable en nuestro modelo de estudio, y por lo tanto, estos dos genes, pueden ser utilizados como genes de referencia o housekeeping, para normalizar los datos obtenidos en reacciones de RT-PCR en tiempo real para los genes de interés.



**Figura 3.11** Diagrama de Cajas de la validación de los genes de referencia para los ensayos de RT-PCR en tiempo real; se grafican los cuartiles, la mediana y los puntos máximos y mínimos de cada grupo. Se analizó la estabilidad de la expresión de tres genes de referencia candidatos: TBP,  $\beta$ 2-microglobulina, y GAPDH. Diagrama de cajas (box plot), donde se muestra la mediana (línea), los percentilos 25 y 75 (caja), y el mínimo y máximo (brazos o “bigotes”). Se analizaron las 16 muestras de sustancia nigra. Análisis no paramétrico, Kruskal Wallis Test \*\*  $p < 0.01$ . (6OHDA: 6- hidroxidopamina, Asc: Ácido Ascórbico, LPS: Lipopolisacárido, Veh: Vehículo)



**Figura 3.12.** Curvas de amplificación de las RT-PCRs para los 9 genes candidatos que se logró poner a punto. Nótese que en todos los casos hay por lo menos 7 Cts de diferencia entre las muestras naïf y los controles no RT.

#### 4.1.3 Análisis estadístico RT-PCR

El análisis de los datos provenientes de las RT-PCRs fue llevado a cabo por el Dr. E. Fernández. Para el análisis de los genes evaluados por PCR se tomó como parámetro de expresión el cociente entre el Ct medido para el gen y el Ct medido para el gen de referencia (Housekeeping). Luego sobre dicha proporción (ratio) se aplicó un modelo lineal generalizado. El modelo lineal generalizado permite incorporar efectos de heterocedasticidad, es decir varianza específica para algún agrupamiento particular de los datos.

En todos los casos el modelo en su parte fija planteado fue;

$$\text{Ratio (Ct gen/Ct hk)} = \mu + A+B+A*B$$

donde A: "6OHDA" "Asc" y B: "LPS" "Veh"

Donde  $\mu$  es la expresión media del gen; A y B los efectos principales; A\*B la interacción de los mismos. Luego se plantean modelos donde  $E \sim N(0, I \sigma^2)$  o  $E \sim N(0, K)$  donde E error, I identidad, K matriz diagonal con sigmas por grupo.

Para elegir el método que mejor ajusta a los datos se utilizó el test de cocientes de máxima verosimilitud y tomando el modelo más parsimonioso (de menor cantidad de parámetros). Luego sobre el modelo elegido se aplicó análisis de la varianza sobre los parámetros del modelo para evaluar si el término A\*B es significativo a  $p < 0.05$ . Si es significativo entonces se analizan las diferencias de medias entre cada combinación de niveles de los términos de la interacción.

A partir de los 20 genes seleccionados para los que se diseñaron primers, se lograron poner a punto 9 de las RT-PCRs. Las otras reacciones requerían del diseño de nuevos primers y tiempo para ponerlas a punto de manera adecuada. Se decidió seguir adelante con el análisis estadístico de los genes de los que ya habíamos obtenido los resultados experimentales.

Como resultado de estos análisis estadísticos de las RT-PCRs encontramos 4 genes en los que se verificaba interacción diferencial; **Bak1** (BCL2-antagonist/killer 1), **Crhr1** (Corticotropin releasing hormone receptor 1), **Enpp1** (Ectonucleotide pyrophosphatase /phosphodiesterase 1) y **Gpr139** (G protein-coupled receptor 139).

## 5 - Genes Candidatos

Estos 4 genes son los candidatos a ser los responsables de la exacerbación de la neurodegeneración por inflamación. Sus funciones conocidas son las siguientes;

### 5.1 Bak1

BCL2-antagonist/killer 1 – Es un miembro pro-apoptótico de la familia de genes Bcl-2 involucrados en iniciar la apoptosis. La proteína codificada por este gen pertenece a la familia de proteínas BCL2. Esta familia forma oligómeros o heterodímeros y actúa como reguladores anti o pro apoptóticos en una gran variedad de actividades celulares. Esta proteína en particular, se localiza a nivel celular en la mitocondria e induce apoptosis mediante la interacción y aceleración de la apertura de los canales aniónicos voltaje-dependientes mitocondriales con la consecuente pérdida del potencial de membrana y la liberación del citocromo c.

Esta proteína a su vez interactúa con el factor de supresión tumoral P53 luego de la exposición a estrés celular (Rat Genome Database <http://rgd.mcw.edu/wg/home>; NCBI gene database).

### 5.2 Crhr1

Corticotropin releasing hormone receptor 1 – El receptor para la hormona liberadora de corticotrofina se une a la hormona liberadora de corticotrofina, un potente mediador de respuestas endócrinas, autonómicas, comportamentales e inmunes a estrés.

Este gen codifica para un receptor acoplado a proteína G que une neuropéptidos de la familia de la hormona liberadora de corticotrofina, importantes reguladores del eje hipotálamo-pituitario-adrenal. La proteína codificada es esencial para la activación de la cascada de traducción de señales que regula diversos procesos fisiológicos incluyendo; estrés, reproducción, respuesta inmune y obesidad (Rat Genome Database <http://rgd.mcw.edu/wg/home>; NCBI gene database).

### 5.3 Enpp1

Ectonucleotide pyrophosphatase /phosphodiesterase 1 – Este gen pertenece a la familia ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa, ENPP. La proteína codificada es una glicoproteína de transmembrana con dos subunidades idénticas unidas por puente disulfuro. Esta proteína cuenta con una amplia especificidad y cliva una variedad de sustratos incluyendo uniones fosfodiester y uniones pirofosfato. Esta proteína podría tener la capacidad de hidrolizar los nucleosidos trifosfato 5' a sus correspondientes monofosfatos como también podría hidrolizar los polifosfatos de diadenosina.

Mutaciones en este gen han sido asociadas con resistencia a la insulina, osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna vertebral y a trastornos “idiopáticos” de calcificación arterial infantil (Rat Genome Database <http://rgd.mcw.edu/wg/home>; NCBI gene database).

### 5.4 Gpr139

*G protein-coupled receptor 139* – Receptor 139 acoplado a proteína G. Con Función desconocida (Rat Genome Database <http://rgd.mcw.edu/wg/home>; NCBI gene database).

## 6 - Conclusión

Estos 4 genes detectados mediante la técnica de microarrays y luego validados técnicamente mediante PCR en tiempo real son candidatos a ser los responsables de la exacerbación de la neurodegeneración en nuestro modelo de la EP. Para demostrar esta hipótesis resta aún validar funcionalmente a los mismos.

## Discusión

## Discusión

En la presente tesis hemos demostrado que un estímulo inflamatorio crónico periférico exacerba la neurodegeneración en la SN en ratas adultas. Además, hemos demostramos la exacerbación de la neurodegeneración por un estímulo crónico periférico en ratas ancianas. Así, logramos modelar la interacción entre dos efectos biológicos diferentes, la neurodegeneración y la inflamación con variabilidad biológica reducida y de manera reproducible.

Por otro lado, se realizó un screening de genes para hallar los candidatos a ser responsables de la exacerbación de la neurodegeneración inducida por la inflamación por genómica funcional. Estos genes se validaron técnicamente.

Finalmente, se sentaron las bases para estudiar otros genes candidatos detectados mediante la técnica de Microarrays.

### **1 - Modelo de exacerbación periférica de la neurodegeneración en SN**

La neurodegeneración causada por 6OHDA induce un aumento de ARNm de diferentes citoquinas que no se traducen a proteína. En esta tesis hipotetizamos que la presencia de un estímulo inflamatorio podría activar la traducción de los mismos. A su vez, la expresión proteica de estas citoquinas pro-inflamatorias podría cambiar el entorno a un medio pro-inflamatorio, causando un efecto tóxico directa o indirectamente sobre las neuronas. Los datos expuestos en esta tesis validan esta hipótesis. Con nuestros resultados, hemos demostrado en el modelo animal de EP descrito que un estímulo pro-inflamatorio crónico periférico exacerba la neurodegeneración en la SN. Esto va acompañado de una activación de la microglía a un estadio morfológicamente macrofágico y funcionalmente con capacidad fagocítica.

En particular, nuestros resultados demuestran que la expresión sistémica crónica de IL-1 exacerba la neurodegeneración y la activación microglial en la SN. Este efecto se manifiesta no solo en ratas adultas sino en también animales ancianos. Resultados similares a los obtenidos con el modelo de exacerbación periférica, han

sido demostrados con datos previos de nuestro grupo en los cuales la inflamación central aumenta/exacerba la neurodegeneración, en este caso por un estímulo pro-inflamatorio local en la SN (Pott Godoy, Tarelli et al. 2008) y han sido revalidados en el Capítulo 3 de esta tesis.

Resultados similares a los expuestos en estas tesis, en que la inflamación periférica exagera la neurodegeneración, han sido descritos en modelos animales de prion y Alzheimer, ambas enfermedades neurodegenerativas crónicas con presencia de activación microglial atípica (Cunningham, Wilcockson et al. 2005; Perry, Cunningham et al. 2007; Perry 2010). En el modelo animal de prion, se ha observado que un estímulo único de LPS sistémico (emulando algunos aspectos de la infección bacteriana) lleva a la exacerbación de comportamiento de enfermedad (*sickness behaviour*). Estos síntomas no solo son de mayor magnitud sino que perduran más en el tiempo (Cunningham, Campion et al. 2009). Estos mismos resultados se han visto en la estimulación por poly I:C (emulador de algunos componentes de una infección viral) (Cunningham, Campion et al. 2007; Field, Campion et al. 2010). La exacerbación de los componentes agudos del comportamiento de enfermedad (pérdida de peso, menor locomoción y aumento de la temperatura corporal) se ven acompañados por deterioro cognitivo evidenciado por déficits transientes de la memoria de trabajo evaluada mediante tareas de laberinto T (Murray, Sanderson et al. 2012). Se ha propuesto que estos cambios agudos de comportamiento remedan los déficits sufridos por delirio en pacientes ancianos (Murray, Sanderson et al. 2012). Otro estudio ha reportado que en pacientes con Enfermedad de Alzheimer con presencia elevada de IL-1 en suero, el decaimiento cognitivo (evaluado mediante el examen mini-mental) se acelera significativamente en los dos meses subsiguientes al compararlo con pacientes libres de IL-1 en suero (Mini mental con decaimiento de -2.2 vs +0.4  $p = 0.03$ ). En este mismo estudio, los pacientes que habían reportado evidencia de infección sistémica demostraron mayor decaimiento cognitivo en la evaluación de seguimiento a los dos meses (Mini mental con decaimiento de -1.6 vs +0.2  $p = 0.02$ ) (Holmes, El-Okli et al. 2003).

### 1.1 El rol de la microglía y la astrogía

Los datos obtenidos en esta tesis apuntan a un rol neurodegenerativo de la microglía activada y los productos por ella secretados en la exacerbación de la neurodegeneración inducida por inflamación, los cuales se suman a la evidencia disponible para otras dos enfermedades neurodegenerativas tradicionalmente no consideradas neuroinflamatorias.

Sin embargo, es lógico pensar que dada la complejidad de la respuesta inflamatoria, no todos los efectos de la microglía tengan resultados netamente tóxicos para la neuroinflamación en EP. La microglía, en otros paradigmas fisiológicos o patológicos podría tener a su vez efectos neuroprotectores mediante la secreción de factores neurotróficos como por ejemplo GDNF, FGF-2 y BDNF (Hunot, Dugas et al. 1999; Siegel and Chauhan 2000; Piehl and Lidman 2001; Vila, Jackson-Lewis et al. 2001; Orr, Rowe et al. 2002; McGeer and McGeer 2004; Hald and Lotharius 2005).

La función de la microglía sobre la protección o exacerbación de la pérdida neuronal en la SN ha sido objeto de intensos debates (Vila, Jackson-Lewis et al. 2001; Nagatsu 2002; Hirsch, Breidert et al. 2003; Block and Hong 2005; Hald and Lotharius 2005; Hirsch, Hunot et al. 2005; Kim and de Vellis 2005). La microglía se puede activar a diferentes estadios morfológicos, sin embargo, la transformación morfológica no implica un efecto funcional de la microglía sobre la muerte neuronal (Perry, Cunningham et al. 2007). En nuestro estudio, la microglía estadio 4 junto con la expresión de MHC II y la presencia de ED1 se asoció con exacerbación de la neurodegeneración. Si esta correlación es única de nuestro modelo o no, merece mayor investigación. Se confirmó la observación de la activación microglial “atípica” durante la neurodegeneración en la SN en el modelo de 6OHDA (Depino, Earl et al. 2003). Estas observaciones se correlacionan bien con la biología del modelo neurodegenerativo crónico utilizado: la muerte de células neuronales en la SNpc se supone que es apoptótica (He, Lee et al. 2000), que por definición no causa inflamación. Además, los macrófagos activados en la periferia no expresan citoquinas pro-inflamatorias durante la fagocitosis de una célula apoptótica (Fadok, Bratton et al. 1998). La activación microglial sin la producción de citoquinas proinflamatorias

también se ha observado en un modelo de enfermedad de prion (Perry, Cunningham et al. 2002).

Los astrocitos no parecerían cumplir un rol funcional importante en los procesos descritos en este trabajo, ya que los mismos no se encuentran activados en este modelo.

## **1.2 El rol de las citoquinas**

### **1.2.1 La IL-1**

La función de la microglía varía de acuerdo a las moléculas que produce. La IL-1 es una citoquina clave en el inicio y propagación de la inflamación (Dinarello 1997). Se la ha encontrado en el líquido cefalorraquídeo y en muestras de cuerpo estriado de pacientes de EP post-mortem (Mogi, Harada et al. 1994; Mogi, Harada et al. 1996; Nagatsu, Mogi et al. 2000). Nuestro grupo ha demostrado que la expresión crónica de IL-1 en SN de rata produce la pérdida parcial y progresiva de neuronas dopaminérgicas con compromiso motor (Ferrari, Pott Godoy et al. 2006). A su vez, se verifica el efecto deletéreo de IL-1 en otro modelo animal de EP por expresión crónica de IL-1 en el cuerpo estriado. En este modelo se observa también la exacerbación de la neurodegeneración por expresión sistémica de IL-1 (Pott Godoy, Ferrari et al. 2010). Todas las evidencias apuntan a un efecto tóxico de IL-1 sobre las neuronas tanto *in vitro* como *in vivo* (Allan, Tyrrell et al. 2005). Sin embargo, la infusión de IL-1 5 días previo a la administración de 6OHDA en el cuerpo estriado disminuye la neurodegeneración en un modelo animal de EP (Saura, Pares et al. 2003).

Hemos descrito la presencia de microglía cebada a causa de la neurodegeneración en nuestro modelo. Éste es un estadio de activación microglial atípica en que las células son capaces de transcribir citoquinas pro-inflamatorias pero no de sintetizar la proteína en sí, la cual al interactuar junto con el efecto pro inflamatorio periférico crónico de IL-1 induce una exacerbación de la inflamación y el subsecuente aumento de la neurodegeneración. En este modelo, la presencia del segundo estímulo, desplaza el equilibrio hacia un ambiente neurodegenerativo.

Nuestro grupo ha demostrado que, en el modelo de exacerbación central de la neurodegeneración, ésta puede ser minimizada con la administración de dexametasona (Pott Godoy, Tarelli et al. 2008). Esta prueba de concepto hace especialmente atractivo al modelo como candidato para la evaluación de drogas nóveles para el tratamiento de la EP. Sin embargo, el modelo requiere que dos estímulos se encuentren tanto física como temporalmente, aumentando así su variabilidad. Esta variabilidad en el modelo es una desventaja para estudios mecanísticos. Hemos trabajado sobre la variabilidad en este modelo para disminuirla a niveles aceptables y poder estudiar los genes involucrados en la exacerbación de la neurodegeneración por inflamación.

El aporte del trabajo de esta tesis es haber logrado un modelo en el cual el efecto de la neurodegeneración de la inflamación y de la IL-1 en particular es unívoco. Tanto en éste, como en otro trabajo previo del grupo, la IL-1 administrada post neurodegeneración es unívocamente tóxica (Pott Godoy, Ferrari et al. 2010).

### **1.2.2 El TNF**

El TNF, considerado junto con IL-1 una de las citoquinas funcionalmente más relevantes, también ha demostrado estar involucrado en varias enfermedades neurodegenerativas. El TNF, (McCoy and Tansey 2008) presenta efectos paradójales en Esclerosis Múltiple (EM), una enfermedad neurodegenerativa crónica con claro componente inflamatorio. En modelos animales de EM se ha observado que el TNF por un lado, estimula la apoptosis de los oligodendrocitos y acelera el comienzo de la enfermedad pero por otro, es necesario para la regresión de la actividad de linfocitos T contra la mielina, induce la proliferación de precursores de oligodendrocitos y promueve la remielinización (Shohami, Ginis et al. 1999; Stoll, Jander et al. 2000; Arnett, Mason et al. 2001; Kassiotis and Kollias 2001). Ésto podría explicar el fracaso los ensayos clínicos anti-TNF en que la inhibición de TNF podría haber bloqueado un posible efecto neuroprotector (Wiendl and Hohlfeld 2002). En un estudio de fase 2 en que 168 pacientes que recibieron Lenercept, una proteína de fusión del receptor de TNF y la inmunoglobulina p55, el grupo tratado no solo evidencio exacerbación significativamente mayor de su sintomatología sino que la misma fue más temprana. A

su vez, se verificó que el déficit neurológico tendía a ser más severo en los pacientes que habían recibido la medicación (Listed 1999).

Se han reportado niveles elevados de TNF en el líquido cefalorraquídeo y en muestras post mortem de cerebro de pacientes con EP (Boka, Anglade et al. 1994; Mogi, Harada et al. 1994; Hunot, Dugas et al. 1999; Nagatsu, Mogi et al. 2000). Por otro lado, se ha visto que existe una asociación entre polimorfismos de nucleótido simple (del inglés *single nucleotide polymorphisms*) en el promotor del gen de TNF y la EP. Se ha reportado una mayor frecuencia de un alelo polimórfico, que tiene como consecuencia una mayor expresión de TNF, en pacientes con EP con comienzo temprano que en pacientes con un comienzo tardío o controles (Nishimura, Mizuta et al. 2001; Chen, Chen et al. 2007). También se ha visto que otro polimorfismo en el promotor de TNF, que regula los niveles basales de la citoquina, se encuentra diferencialmente representado en enfermos de EP y controles (Kruger, Hardt et al. 2000; Wahner, Sinsheimer et al. 2007).

Finalmente, existen resultados experimentales controversiales acerca del efecto de TNF sobre las neuronas dopaminérgicas de la SN. Diferentes autores han demostrado un efecto tóxico de TNF sobre las neuronas dopaminérgicas in vitro (McGuire, Ling et al. 2001; Clarke and Branton 2002; Gayle, Ling et al. 2002). Por otro lado, la neutralización in vivo de TNF soluble mediante la infusión crónica de un dominante negativo en la SN redujo en un 50% la muerte de neuronas dopaminérgicas inducida por 6-OHDA (McCoy, Martinez et al. 2006).

Por lo tanto, se ha descrito un rol dual de TNF en el SNC y en la EP en particular, existiendo evidencias tanto de efectos nocivos como benéficos. Si bien el rol de TNF se ha asociado generalmente a un efecto degenerativo en EP, las variables que llevan a un efecto definitivamente tóxico de esta citoquina no han sido definidas aún (Rothwell and Hopkins 1995; Stoll, Jander et al. 2000; Perry, Dewhurst et al. 2002; McCoy and Tansey 2008).

Aun no se sabe si el TNF expresado post neurodegeneración posee efectos unívocamente tóxicos en la EP.

### 1.3 Otras infecciones periféricas

Por otra parte, según mencionamos en la introducción, también se ha relacionado el aumento de la sintomatología de la EP con infecciones bacterianas periféricas por *Helicobacter pylori* (Bjarnason, Charlett et al. 2005; Dobbs, Dobbs et al. 2008). Según Bjarnason y colaboradores no solamente la sintomatología de la EP aumenta con la presencia de la bacteria, sino que la falla en la erradicación total de la misma con la consiguiente liberación de antígenos por parte de las bacterias muertas podría agravar el efecto de la infección en curso. Estos argumentos se hallan alineados a nuestras evidencias de que los estímulos pro-inflamatorios periféricos afectan al SNC y la neurodegeneración en curso.

Por el contrario, al estudiar las infecciones parasitarias en pacientes con EM, se ha demostrado que los pacientes con helmintiasis presentan un número de recaídas e índices de discapacidad significativamente menores al de pacientes no infectados (Correale and Farez 2007). Un estudio posterior del mismo grupo reporta que el efecto benéfico se pierde al tratar la helmintiasis con antiparasitarios, por lo tanto, la presencia de parásitos en los paciente de EM disminuye el número de recaídas (Correale and Farez 2011). Estos estudios demuestran que el sistema inmune del huésped, ante una infección, puede alterar el curso de la EM y que la presencia de dicha infección, en este caso parasitaria, no necesariamente es deletérea para una enfermedad neurodegenerativa crónica. La respuesta antiparasitaria es típicamente del tipo Th2. De lo dicho, emerge la idea de que la respuesta inmune **Th1** (Inmunidad celular – macrófagos y linfocitos T CD8+ citotóxicos. Interferón  $\gamma$ , TGF $\beta$  IL-12), como la que media IL-1, es tóxica, mientras que la **Th2** (Respuesta humoral – linfocitos B y anticuerpos neutralizantes e IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13) es neuroprotectora.

Esta evidencia nuevamente indica que no es posible generalizar un efecto dado de la reacción inmune o la respuesta inflamatoria sobre las enfermedades neurodegenerativas si no se poseen modelos adecuados para estudiar los efectores finales de los efectos observados.

En la presente tesis hemos desarrollado un modelo simple de EP, el cual nos permita diseccionar la respuesta de los diferentes componentes inflamatorios de manera

tal de encontrar blancos terapéuticos responsables de la progresión de la patología. Es en este marco de encontrar estrategias terapéuticas, que se hace indispensable identificar genes con funciones unívocas pasibles de ser empleados como blancos terapéuticos.

## **2 - Relevancia clínica del modelo de exacerbación periférica de la neurodegeneración en la SN**

Previamente a la terapia con levodopa, la mortalidad de pacientes con EP se reportó como 3 veces mayor a la de la población en general (Hoehn and Yahr 1967). Aun no es claro si la mortalidad post levodopa disminuyó (Kurtzke and Murphy 1990; Morgante, Salemi et al. 2000) o aumentó (Curtis, Lees et al. 1984; Ebmeier, Calder et al. 1990; Ben-Shlomo and Marmot 1995). Quedan dudas respecto a que este descenso reportado en la mortalidad se atribuya solamente a la introducción de levodopa (Fall, Saleh et al. 2003). Parte de este descenso en la mortalidad de pacientes tratados con levodopa se podría explicar por el progreso que con el tiempo ha ocurrido en el cuidado general de los pacientes que ha progresado a la par de las terapias farmacológicas.

Según un estudio de Fall y colaboradores (Fall, Saleh et al. 2003), de los pacientes con EP fallecidos durante el estudio, la edad promedio de muerte de los 121 pacientes para este estudio (71.12/ del total de pacientes con EP) fue de 81.9 años, significativamente diferente a los 82.9 años para los 229 controles fallecidos (44.9/ del total de controles). En el estudio de Morgante y colaboradores (Morgante, Salemi et al. 2000) se ven resultados similares. De los pacientes fallecidos en este estudio, 35 fueron pacientes con EP (59/ del total de pacientes con EP) y 30 los controles (25.4/ del total de controles). En promedio los pacientes con EP fallecieron 11.5 meses antes que los controles, diferencia estadísticamente significativa. Aunque esta diferencia no es abrumadora, afirma el hecho de que la EP afecta negativamente la sobrevivencia de los pacientes.

A pesar de no ser claro si la mortalidad post aparición de la terapia con levodopa disminuyó o aumento, lo que sí es un hecho es que los pacientes con EP

presentan un alto índice de mortalidad asociada con neumonía. Los pacientes con EP mueren por neumonía en mayor proporción que otros pacientes que no tienen EP, en los cuales la mayor causa de muerte es cardíaca (Beyer, Herlofson et al. 2001; Fall, Saleh et al. 2003; D'Amelio, Ragonese et al. 2006). Ya que la neumonía es una patología de los pulmones causada por una infección bacteriana o viral con gran componente inflamatorio, esta evidencia apuntaría a que la inflamación tiene un efecto deletéreo en pacientes EP. En esta tesis demostramos que un estímulo inflamatorio periférico logra exacerbar la neurodegeneración en curso en la SN de un modelo animal de EP. Este estímulo proinflamatorio periférico bien podría ser la neumonía pero aún faltan evidencias clínicas para poder realizar esta afirmación.

Nuestro laboratorio ha demostrado que, la inducción de inflamación central sobre el modelo de EP en rata, aumenta no solo la neurodegeneración, sino que causa la aparición más temprana de los síntomas motores que acompañan a la enfermedad (Pott Godoy, Tarelli et al. 2008). En ese estudio, los animales en los que se había exacerbado la neurodegeneración con un estímulo inflamatorio central, presentaron síntomas motores 5 días antes (al día 15) que los animales del grupo control. Al comparar estos efectos al día 20, los animales presentaban a su vez mayor severidad del déficit motor. Estos datos argumentan a favor de que la exacerbación de la inflamación en la SN en proceso de neurodegeneración induzca una aceleración en la progresión de la patología reflejada también en síntomas motores.

Es interesante destacar que la pandemia de influenza de 1918 se ha asociado a un aumento de casos con síntomas similares a la EP (Isgreen, Chutorian et al. 1976; Marttila and Rinne 1976; Ravenholt and Foege 1982; Takahashi and Yamada 1999). La EP es una enfermedad lenta y progresiva y los síntomas se manifiestan cuando gran parte de las neuronas dopaminérgicas ha desaparecido, por lo que se supone que existe un número de personas en la población donde se desarrolla neurodegeneración en la SN pero en grados menores a los necesarios para que se manifiesten síntomas de la EP. En base a los datos obtenidos en esta tesis, es interesante proponer que ese aumento en la incidencia de parkinsonismo post-pandemia de influenza en 1918 puede deberse a la exacerbación de la neurodegeneración y la aparición de síntomas

motores en forma más temprana en personas infectadas y que de otra forma hubieran permanecido asintomáticas por más tiempo.

### **3 - La inflamación crónica como factor de riesgo en EP.**

Las infecciones sistémicas pueden intensificar los síntomas de enfermedad en patologías como el asma y la artritis reumatoide (Perry, Cunningham et al. 2007). Estas evidencias apuntan a que la infección sistémica tiene una influencia especial sobre condiciones inflamatorias preexistentes en la periferia.

En la presente tesis hemos demostrado que la exacerbación de la neurodegeneración desde la periferia es posible. Nuestra evidencia sustenta la hipótesis de que un segundo estímulo inflamatorio sobre la neurodegeneración en proceso puede desembocar en una mayor neurodegeneración. En otras enfermedades como esclerosis múltiple, también se ha reportado que las recaídas a menudo están asociadas con infecciones de la vía aérea superior (Perry, Cunningham et al. 2007). Específicamente, la SN es particularmente susceptible ante estímulos inflamatorios debido a que representa el área con mayor densidad de microglía en el cerebro (Lawson, Perry et al. 1990).

#### **3.1 La edad como estímulo inflamatorio crónico**

En esta tesis hemos demostrado que las ratas ancianas presentan una exacerbación de la neurodegeneración similar al de las ratas adultas ante un estímulo pro-inflamatorio periférico. Sabemos que los cambios asociados al proceso de envejecimiento normal pueden inducir cebado de la microglía (Ver introducción – La microglía) (Perry 2004; Godbout, Chen et al. 2005; Chen, Buchanan et al. 2008; Dilger and Johnson 2008; Frank, Barrientos et al. 2010). Sobre este tema, como mencionamos anteriormente, la tesis aporta el resultado original que demuestra que en animales ancianos un estímulo periférico crónico de IL-1 exagera la neurodegeneración y lleva a la microglía a su estadio máximo de activación morfológica. Esta evidencia refuerza la teoría de que los pacientes ancianos son más susceptibles a la exacerbación de su patología debido a que los cambios presentes en

su microglía llevan a la misma a un estado atípico de activación. En esta situación, un segundo estímulo podría llevar el delicado equilibrio desde activación atípica a uno francamente pro-inflamatorio con consecuencias deletéreas. Esto es de suma importancia, ya la edad es el factor de riesgo más claramente asociado a EP.

#### **4 – Mecanismo de exacerbación de la neurodegeneración por inflamación**

Como complemento de los estudios fisiológicos y comportamentales expuestos anteriormente, hemos realizado un screening global de búsqueda de genes que pudieran estar involucrados en la exacerbación de la neurodegeneración sobre las neuronas de la SN. Para ello hemos trasladado el modelo de exacerbación periférica de la neurodegeneración a un modelo de exacerbación central para poder estudiar el mecanismo molecular en un paradigma experimental menos variable. El uso de la técnica de microarrays presenta la ventaja que, además de permitir el análisis simultáneo de miles de genes, posibilita el estudio de genes nóveles, cuya función no se conoce o no ha sido previamente relacionada con neuroinflamación o neurodegeneración. A partir del estudio de perfil de expresión génica de más de 22.000 genes realizado mediante microarrays de las muestras de SN proveniente del modelo animal se obtuvieron 472 genes con expresión diferencial entre los grupos de interés. Luego de refinar la lista mediante un estudio de enriquecimiento basado principalmente en Gene Ontology se obtuvo una lista de 20 genes de interés. Se validó mediante RT-PCR en tiempo real la diferencia de expresión de 4 de estos genes. Estos son los 4 candidatos a ser los responsables de la exacerbación de la neurodegeneración por inflamación: Bak1 (gen pro-apoptótico), Crhr1 (receptor para la hormona liberadora de corticotrofina), Enpp1 (gen de la familia ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa) y Gpr139 (con función desconocida). Aún resta validar funcionalmente estos genes para verificar si estas expresiones diferenciales son las responsables del efecto observado.

El gen **Bak 1** es un miembro pro-apoptótico de la familia de genes Bcl-2 involucrados en *iniciar la apoptosis*. La proteína codificada por este gen se localiza a nivel celular en la mitocondria e induce apoptosis mediante la interacción y

aceleración de la apertura de los canales aniónicos voltaje-dependientes mitocondriales con la consecuente pérdida del potencial de membrana y la liberación del citocromo c. Esta proteína a su vez interactúa con el factor de supresión tumoral P53 luego de la exposición a estrés celular (Rat Genome Database <http://rgd.mcw.edu/wg/home>; NCBI gene database). Se deduce de estas funciones descritas que este gen podría estar aumentando la apoptosis en nuestro modelo.

El gen **Crhr1** es el receptor para la hormona liberadora de corticotrofina. Este se une a la hormona liberadora de corticotrofina, un potente mediador de respuestas endócrinas, autonómicas, comportamentales e inmunes a estrés. Este gen codifica para un receptor acoplado a proteína G que une neuropéptidos de la familia de la hormona liberadora de corticotrofina, importantes reguladores del eje hipotálamo-pituitario-adrenal. La proteína codificada es esencial para la activación de la cascada de traducción de señales que regula diversos procesos fisiológicos incluyendo; estrés, reproducción, *respuesta inmune* y obesidad (Rat Genome Database <http://rgd.mcw.edu/wg/home>; NCBI gene database). Por lo tanto, este gen podría estar involucrado en traducir señales que aumenten la respuesta inflamatoria.

No es clara la función de **Enpp1** y **Gpr139** en procesos de exacerbación de la neurodegeneración y quizás por eso sean aun de mayor interés. Es precisamente con la intención de encontrar este tipo de genes con funciones nuevas que se empleó la técnica de microarrays.

Estos resultados abren las puertas a trabajos futuros, que puedan estudiar si estas moléculas cumplen un rol como mediadores del efecto observado. Estos genes podrían estar mediando efectos unívocamente tóxicos de la inflamación y por lo tanto ser potenciales blancos terapéuticos contra la EP. Además, se han desarrollado las bases para validar técnica y funcionalmente una gran cantidad de interesantes candidatos a participar en el efecto neurodegenerativo.

## 5- Conclusiones finales

La etiología de la enfermedad de Parkinson es desconocida en la mayoría de los pacientes. La visión más aceptada propone que la etiología de la enfermedad es multifactorial, con predisposiciones genéticas y factores ambientales jugando un rol en la iniciación y progresión de la enfermedad (Sawada, Imamura et al. 2006; Tansey, McCoy et al. 2007).

Nuestros resultados apoyan a la inflamación, como un factor fundamental en el progreso de la patología. Este trabajo describe por primera vez un modelo animal clínicamente relevante donde la inflamación actúa inequívocamente en detrimento de la SN. El mayor impacto clínico que proponemos es que la inflamación, central o sistémica, debe ser considerada como factor de riesgo para la enfermedad de Parkinson y que en pacientes con EP debería ser manejada eficientemente o prevenida para reducir la progresión de la enfermedad. Consideramos que aún falta información para poder trasladar los resultados de esta tesis a la clínica.

El modelo propuesto podría ser utilizado para estudiar los mediadores moleculares del efecto neurodegenerativo de los estímulos inflamatorios. Como se discutió anteriormente, la identificación de estos mediadores moleculares podría permitir en un futuro diseñar terapias contra la enfermedad de Parkinson, ya que se podrían usar como blancos terapéuticos moléculas con una acción claramente neurodegenerativa.

Nuestro modelo aporta significativamente al desarrollo del conocimiento de la patogénesis de la enfermedad de Parkinson, apoyando la visión de que la neuroinflamación juega un rol importante en el desarrollo de la enfermedad (Ver Figura d-1).



## Anexo

## Anexo

### Lista de Genes diferenciales provenientes del análisis de microarrays .

GeneID Name	Description
170912 A1cf	APOBEC1 complementation factor
307989 Ablim1	actin-binding LIM protein 1
25365 Actg2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric
29650 Adam10	ADAM metallopeptidase domain 10
315263Adamts20	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 20
361886 Adamts6	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 6
308787 Adamtsl3	ADAMTS-like 3
312670 Adipor2	adiponectin receptor 2
25690 Ahr	aryl hydrocarbon receptor
294328 Aire	autoimmune regulator
314416 Ak7	adenylate kinase 7
116463 Akr1b7	aldo-keto reductase family 1, member B7
266603 Aldh1a3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3
25375 Aldh3a1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1
25290 Alox5	arachidonate 5-lipoxygenase
29160 Amelx	amelogenin X chromosome
299639 Ankrd24	ankyrin repeat domain 24
362515 Anks6	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 6
299714 Ano4	anoctamin 4
29339 Apcs	amyloid P component, serum
312915 Arfgef1	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 1(brefeldin A-inhibited)
290912 Arglu1	arginine and glutamate rich 1
688429 Arhgap10	Rho GTPase activating protein 10
301709 Arhgap28	Rho GTPase activating protein 28
296758 Armc10	armadillo repeat containing 10
307156 Armc3	armadillo repeat containing 3
309887 Ascc3	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3
362531 Astn2	astrotactin 2
84396 Atp1b4	ATPase, (Na <sup>+</sup> )/K <sup>+</sup> transporting, beta 4 polypeptide
24215 Atp2b2	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, plasma membrane 2
246284 Atrx	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
360672 Azi1	5-azacytidine induced 1
64828 B4galnt1	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1
116502 Bak1	BCL2-antagonist/killer 1
65050 Barhl2	BarH-like homeobox 2
54400 Bet1l	blocked early in transport 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ) like
293938 Bloc1s2	biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 2
361239 Bphl	biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase)
246238 Bpifa1	BPI fold containing family A, member 1
497672 Brca1	breast cancer 1
360254 Brca2	breast cancer 2
360254 Brca2	breast cancer 2
300687 Bud13	BUD13 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )

65044C1galt1	core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase, 1
303701 C1qtnf1	C1q and tumor necrosis factor related protein 1
24237 C6	complement component 6
307585 Cables1	Cdk5 and Abl enzyme substrate 1
499298 Cabp2	calcium binding protein 2
365194 Cabp5	calcium binding protein 5
192226 Cand2	cullin-associated and neddylation-dissociated 2 (putative)
29153 Capn1	calpain 1
29324 Capza3	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 3
297720 Casc1	cancer susceptibility candidate 1
500985 Cbl	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence
499071 Ccdc106	coiled-coil domain containing 106
315438 Ccdc67	coiled-coil domain containing 67
291034 Ccdc90a	coiled-coil domain containing 90A
171103 Cdc25b	cell division cycle 25 homolog B (S. pombe)
307614 Cdh16	cadherin 16
306455 Cdkn2aip	CDKN2A interacting protein
499174 Cers3	ceramide synthase 3
307726 Chd9	chromodomain helicase DNA binding protein 9
114212 Chek2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)
500257 Chst13	carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 13
84360 Clcn3	chloride channel 3
65129 Cldn1	claudin 1
65132 Cldn7	claudin 7
363856 Clec4m	C-type lectin domain family 4, member M
308493 Clip3	CAP-GLY domain containing linker protein 3
60669 Cmlklr1	chemokine-like receptor 1
25411 Cnga2	cyclic nucleotide gated channel alpha 2
25278 Cox6a2	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2
54242 Cpa3	carboxypeptidase A3, mast cell
293566 Cpxm2	carboxypeptidase X (M14 family), member 2
58959 Crhr1	corticotropin releasing hormone receptor 1
25415 Crmp1	collapsin response mediator protein 1
25583 Cryba1	crystallin, beta A1
117505 Csrp3	cysteine and glycine-rich protein 3
288067 Csta	cystatin A (stefin A)
24962 Cth	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)
282587 Cttncp2	cortactin binding protein 2
64624 Cul5	cullin 5
24894 Cyp2a1	cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 1
25251 Cyp2g1	cytochrome P450, family 2, subfamily g, polypeptide 1
541457 Dbx2	developing brain homeobox 2
291130 Dcdc2	doublecortin domain containing 2
641630 Defb11	defensin beta 11
641655 Defb18	defensin beta 18
641640 Defb36	defensin beta 36
315055 Dennd3	DENN/MADD domain containing 3
361987 Dennd4b	DENN/MADD domain containing 4B
114214 Dffa	DNA fragmentation factor, alpha subunit
170635 Dhrs9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9
286923 Dlgap3	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 3

117252 Dnah10	dynein, axonemal, heavy polypeptide 10
444985 Dnmt3b	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta
691014 Dppa3l1	developmental pluripotency associated 3-like 1
29564 Dync1i1	dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 1
317470 Egfl6	EGF-like-domain, multiple 6
300514 Ei24	etoposide induced 2.4 mRNA
29702 Eif2ak3	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3
362271 Elmo2	engulfment and cell motility 2
362262 Emilin3	elastin microfibril interfacier 3
680317 Endou	endonuclease, poly(U)-specific
292138 Eno4	enolase family member 4
85496 Enpp1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
24336 Epor	erythropoietin receptor
287177 Ergic1	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment (ERGIC) 1
25149 Esr2	estrogen receptor 2 (ER beta)
64632 Exoc7	exocyst complex component 7
306761 F12	coagulation factor XII (Hageman factor)
29347 Faah	fatty acid amide hydrolase
500638 Fam110c	family with sequence similarity 110, member C
498604 Fam129c	family with sequence similarity 129, member C
362378 Fam13a	family with sequence similarity 13, member A
310244 Fam164a	family with sequence similarity 164, member A
690188 Fam168b	family with sequence similarity 168, member B
289468 Fam175a	family with sequence similarity 175, member A
302931 Fam86a	family with sequence similarity 86, member A
282583 Fbln2	fibulin 2
362332 Flnc	filamin C, gamma
171302 Foxe3	forkhead box E3
60670 Fut4	fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific)
309611 G7c	G7c protein
498174 Gbas	glioblastoma amplified sequence
286976 Gcnt3	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type
301525 Glb1l	galactosidase, beta 1-like
503194 Glb1l2	galactosidase, beta 1-like 2
81668 Gnhr	gonadotropin releasing hormone receptor
306439 Gpm6a	glycoprotein m6a
360810 Gpn3	GPN-loop GTPase 3
293545 Gpr139	G protein-coupled receptor 139
302619 Gpr143	G protein-coupled receptor 143
767613 Gpr17	G protein-coupled receptor 17
309212 Gpr44	G protein-coupled receptor 44
298376 Gpx7	glutathione peroxidase 7
50566 Grem1	gremlin 1
24419 Grm6	glutamate receptor, metabotropic 6
25206 Gucy1b2	guanylate cyclase 1, soluble, beta 2
79222 Gucy2e	guanylate cyclase 2E
314543 Gulp1	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1
361129 Hapln4	hyaluronan and proteoglycan link protein 4
282821 Has1	hyaluronan synthase 1
94164 Hbg1	hemoglobin, gamma A
497972 Heatr6	HEAT repeat containing 6
24446 Hgf	hepatocyte growth factor

305968 Hmbox1	homeobox containing 1
293537 Hmx3	H6 family homeobox 3
306548 Hook3	hook homolog 3 (Drosophila)
315337 Hoxc13	homeobox C13
29581 Htr2b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B
691516 Il17c	interleukin 17C
362417 Il17re	interleukin 17 receptor E
117022 Il1r2	interleukin 1 receptor, type II
362843 Ilvbl	ilvB (bacterial acetolactate synthase)-like
362329 Impdh1	IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 1
296084 Ino80	INO80 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
80849 Inpp4a	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type 1
59268 Ip6k2	inositol hexakisphosphate kinase 2
362394 Isy1	ISY1 splicing factor homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
298908 Kcnf1	potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1
171146 Kcnh5	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 5
259243 Kcnip4	Kv channel interacting protein 4
29682 Kcnq3	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 3
298496 Kcnq4	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 4
680912 Kcnu1	potassium channel, subfamily U, member 1
308173 Kif13a	kinesin family member 13A
353302 Kif15	kinesin family member 15
313170 Kif24	kinesin family member 24
314473 Kif26a	kinesin family member 26A
299255 Kif4b	kinesin family member 4B
408210 Klk4	kallikrein-related peptidase 4
689817 Klrb1	killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1
315323 Krt4	keratin 4
300248 Krt73	keratin 73
315320 Krt84	keratin 84
81511 Lat	linker for activation of T cells
89789 Lbr	lamin B receptor
681375 Lcn4	lipocalin 4
116569 Lct	lactase
680066 Lemd3	LEM domain containing 3
300286 Lhfp11	lipoma HMGIC fusion partner-like 1
85327 Lin7a	lin-7 homolog a ( <i>C. elegans</i> )
245979 Lmo1	LIM domain only 1
289334 LOC289334	similar to hypothetical protein FLJ35728
311134 LOC311134	hypothetical LOC311134
500827 LOC500827	similar to hypothetical protein FLJ35821
501046 LOC501046	similar to Phakinin (Beaded filament structural protein 2) (Lens fiber cell beaded filament protein CP 49) (CP49) (49 kDa cytoskeletal protein)
501110 LOC501110	similar to Glutathione S-transferase A1 (GTH1) (HA subunit 1) (GST-pi) (GSTA1-1) (GST class-alpha)
502859 LOC502859	similar to T-cell activation kelch repeat protein
679610 LOC679610	hypothetical protein LOC679610
681149 LOC681149	hypothetical protein LOC681149
681159	LOC681159 similar to Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase (Phosphoglucosamine transacetylase) (Phosphoglucosamine acetylase) (EMeg32 protein)

681242 LOC681242	hypothetical protein LOC681242
681392 LOC681392	hypothetical protein LOC681392
681453 LOC681453	hypothetical protein LOC681453
685109 LOC685109	hypothetical protein LOC685109
687620 LOC687620	similar to mirror-image polydactyly 1
688219 LOC688219	similar to X-linked lymphocyte-regulated protein 3A
688608 LOC688608	similar to PRAME family member DJ1198H6.2
688708 LOC688708	similar to ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1
689103 LOC689103	similar to vitelliform macular dystrophy 2-like 2
689618 LOC689618	similar to Protein C20orf85 homolog
690695 LOC690695	hypothetical protein LOC690695
691170 LOC691170	similar to zinc finger protein 84 (HPF2)
295401 Lppr4	lipid phosphate phosphatase-related protein type 4
364427 Lrrc63	leucine rich repeat containing 63
289587 Lrrc66	leucine rich repeat containing 66
308868Lrtomt	leucine rich transmembrane and O-methyltransferase containing domain
501688 Lsm11	LSM11, U7 small nuclear RNA associated
294241 Ly6g6c	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C
29568 Map2k5	mitogen activated protein kinase kinase 5
25331 Mat1a	methionine adenosyltransferase I, alpha
297894 Matn1	matrilin 1, cartilage matrix protein
299996 Matn2	matrilin 2
282839 Mc2r	melanocortin 2 receptor
25635 Mc4r	melanocortin 4 receptor
29470 Mecn	mitochondrial trans-2-enoyl-CoA reductase
25684 Mep1a	mepripin 1 alpha
306508 Mfhas1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1
500899 Mfsd3	major facilitator superfamily domain containing 3
500925 MGC114464	similar to expressed sequence AI836003
81510 Mia	melanoma inhibitory activity
288515 Micall2	MICAL-like 2
303211 Mmgt2	membrane magnesium transporter 2
117033 Mmp12	matrix metalloproteinase 12
500152 Mmrn1	multimerin 1
306288 Mmrn2	multimerin 2
315914 Morc4	MORC family CW-type zinc finger 4
24561 Mpg	N-methylpurine-DNA glycosylase
307035 Mpp7	membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7)
360463 Mpv17l	MPV17 mitochondrial membrane protein-like
404644 Mrgprb5	MAS-related G protein-coupled receptor, member B5
293666 mrpl11	mitochondrial ribosomal protein L11
312897 Msc	musculin
192646 Mtnr1b	melatonin receptor 1B
306487 Mtus1	microtubule associated tumor suppressor 1
25745 Myh9	myosin, heavy chain 9, non-muscle
24584 Mylpf	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle
289785 Myo1g	myosin IG
171296 Myo9a	myosin IXA
360681 Narf	nuclear prelamin A recognition factor
288108 Nat13	N-acetyltransferase 13
314814 Nav3	neuron navigator 3

500904 Ncf4	neutrophil cytosolic factor 4
296372 Ncoa5	nuclear receptor coactivator 5
170928 Necab2	N-terminal EF-hand calcium binding protein 2
289595 Nfxl1	nuclear transcription factor, X-box binding-like 1
24596 Ngfr	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
353250 Niacr1	niacin receptor 1
65193 Nkx6-1	NK6 homeobox 1
291318 Nmt2	N-myristoyltransferase 2
688885 Nol11	nucleolar protein 11
497815 Nrcam	neuronal cell adhesion molecule
59295 Nucb2	nucleobindin 2
360577 Nxn	nucleoredoxin
286933 Obp2b	odorant binding protein 2B
405966 Olr1064	olfactory receptor 1064
299586 Olr1087	olfactory receptor 1087
405181 Olr1122	olfactory receptor 1122
300568 Olr1243	olfactory receptor 1243
405004 Olr125	olfactory receptor 125
405086 Olr1274	olfactory receptor 1274
293263 Olr128	olfactory receptor 128
287262 Olr1407	olfactory receptor 1407
293280 Olr141	olfactory receptor 141
405060 Olr1414	olfactory receptor 1414
287502 Olr1499	olfactory receptor 1499
405039 Olr310	olfactory receptor 310
293808 Olr375	olfactory receptor 375
405120 Olr396	olfactory receptor 396
404890 Olr480	olfactory receptor 480
404811 Olr727	olfactory receptor 727
405213 Olr826	olfactory receptor 826
405207 Olr837	olfactory receptor 837
89810 Opn1mw	opsin 1 (cone pigments), medium-wave-sensitive
287821 Otop3	otopetrin 3
117264 P2ry6	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6
301455 Pard3b	par-3 partitioning defective 3 homolog B (C. elegans)
303903 Parp14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14
306254 Pbrm1	polybromo 1
360942 Pcdh7	protocadherin 7
361752 Pde6c	phosphodiesterase 6C, cGMP specific, cone, alpha prime
309962 Pde8b	phosphodiesterase 8B
313609 Pdik1l	PDLIM1 interacting kinase 1 like
64353 Pdlim5	PDZ and LIM domain 5
309157 Peli3	pellino 3
294754 Pelo	pelota homolog (Drosophila)
288369 Pex11g	peroxisomal biogenesis factor 11 gamma
308718 Pex7	peroxisomal biogenesis factor 7
361051 Phf11	PHD finger protein 11
500030 Phf14	PHD finger protein 14
64561 Phka1	phosphorylase kinase, alpha 1
678739 Phka2	phosphorylase kinase, alpha 2
252962 Phtf1	putative homeodomain transcription factor 1
292898 Pih1d1	PIH1 domain containing 1

89812	Pip4k2b	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, beta
309419	Pip5k1b	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta
498328	Pkd2	polycystic kidney disease 2 homolog (human)
287925	Pkp2	plakophilin 2
360914	Plac8	placenta-specific 8
312213	Plxna4a	plexin A4, A
362972	Pnpla3	patatin-like phospholipase domain containing 3
85241	Pola1	polymerase (DNA directed), alpha 1
362858	Polr3b	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide B
301432	Ppil3	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 3
295341	Ppm1j	protein phosphatase 1J
362642	Pqlc2	PQ loop repeat containing 2
691157	Pramef12	PRAME family member 12
312912	Prex2	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 2
170538	Prkcd	protein kinase C, delta
360748	Prkdc	protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide
192224	Prl2b1	Prolactin family 2, subfamily b, member 1
287750	Prp211	proline rich protein 2-like 1
497873	Prss33	protease, serine, 33
311785	Psd4	pleckstrin and Sec7 domain containing 4
24256	Psg19	pregnancy specific glycoprotein 19
307821	Psmd7	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7
304278	Ptcd1	pentatricopeptide repeat domain 1
24929	Ptger3	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)
117552	Ptpn23	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 23
246116	Ptpn4	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 4
246116	Ptpn4	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 4
313278	Ptprd	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D
362681	Pusl1	pseudouridylate synthase-like 1
360820	Pxn	paxillin
171452	Rab3il1	RAB3A interacting protein (rabin3)-like 1
296301	Raly	RNA binding protein, autoantigenic (hnRNP-associated with lethal yellow homolog (mouse))
296301	Raly	RNA binding protein, autoantigenic (hnRNP-associated with lethal yellow homolog (mouse))
29434	Rasgrp1	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)
308968	Rbbp6	retinoblastoma binding protein 6
302855	Rbmx	RNA binding motif protein, X-linked
24711	Rbp3	retinol binding protein 3, interstitial
498642	Rbpms	RNA binding protein with multiple splicing
313488	Reck	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
24714	Reg1a	regenerating islet-derived 1 alpha
64626	Rem2	RAS (RAD and GEM) like GTP binding 2
24715	Ren	renin
81759	Renbp	renin binding protein
361871	Rfesd	Rieske (Fe-S) domain containing
293059	RGD1305713	similar to RIKEN cDNA 3110040N11
307950	RGD1306091	similar to Mixed lineage kinase 4
365493	RGD1308127	similar to 2700078E11Rik protein
364798	RGD1308454	similar to RIKEN cDNA 4921537P18
363016	RGD1309534	similar to RIKEN cDNA 4931406C07

361424 RGD1309651	similar to 1190005I06Rik protein
302913 RGD1309748	similar to CG4768-PA
301004 RGD1311095	similar to hypothetical protein FLJ20259
289568 RGD1311575	hypothetical LOC289568
361744 RGD1359349	similar to hypothetical protein MGC34760
296118 RGD1359452	similar to hypothetical protein FLJ32800
498270 RGD1560672	similar to novel protein
500536 RGD1561416	similar to novel protein (HT036)
361606 RGD1561459	similar to RIKEN cDNA 1810020D17
691515 RGD1561483	similar to ankyrin repeat domain 26
502300 RGD1561909	similar to chromosome 6 open reading frame 148
361948 RGD1562629	similar to neurobeachin
499895 RGD1563120	similar to RIKEN cDNA 2210009G21
497935 RGD1563441	similar to RIKEN cDNA A030009H04
501904 RGD1563483	similar to CDNA sequence BC061212
363274 RGD1563955	similar to transmembrane serine protease 9
315843 RGD1564964	similar to WD repeat domain 11 protein
500453 RGD1565236	similar to transcription factor
498394 RGD1565796	similar to RIKEN cDNA A930005I04 gene
289001 RGD1566400	similar to hypothetical protein FLJ23074
289080 Rgl1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 1
317431 Ribc1	RIB43A domain with coiled-coils 1
690043 Rnf168	ring finger protein 168
83840 Rps6kb1	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1
299976 Rrm2b	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)
360921 Rufy3	RUN and FYVE domain containing 3
307740 Sall1	sal-like 1 (Drosophila)
288622 Scand3	SCAN domain containing 3
499358 Scd4	stearoyl-coenzyme A desaturase 4
680945 Sdf2l1	stromal cell-derived factor 2-like 1
140927 Selenbp1	selenium binding protein 1
313057 Serinc2	serine incorporator 2
117092 Serpinb7	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7
501502 Sh2d1a	SH2 domain containing 1A
287285 Shroom1	shroom family member 1
29502 Slc20a2	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 2
314441 Slc25a29	solute carrier family 25, member 29
298280 Slc35d1	solute carrier family 35 (UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine dual transporter), member D1
294255 Slc44a4	solute carrier family 44, member 4
64554 Slc7a2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2
116726 Slc7a9	solute carrier family 7 (glycoprotein-associated amino acid transporter light chain, bo,+ system), member 9
310519 Slitrk3	SLIT and NTRK-like family, member 3
85435 Smad9	SMAD family member 9
691501 Snapc5	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 5
298936 Sntg2	syntrophin, gamma 2
300954 Sox14	SRY (sex determining region Y)-box 14
293165 Sox6	SRY (sex determining region Y)-box 6
296510 Sp5	Sp5 transcription factor
305938 Spata13	spermatogenesis associated 13

297592 Spsb2	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 2
171044 Sstr3	somatostatin receptor 3
500120 Stk31	serine threonine kinase 31
500120 Stk31	serine threonine kinase 31
364858 Stk32a	serine/threonine kinase 32A
252853 Stx17	syntaxin 17
360953 Stx18	syntaxin 18
303281 Supt6h	suppressor of Ty 6 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
25561 Sycp3	synaptonemal complex protein 3
362573 Szt2	seizure threshold 2 homolog (mouse)
363072 Tbc1d21	TBC1 domain family, member 21
315880 Tbc1d2b	TBC1 domain family, member 2B
360737 Tbx1	T-box 1
688822 Tbx10-ps1	T-box 10, pseudogene 1
315870 Tbx18	T-box18
688600 Tcf23	transcription factor 23
171046 Tcfe2a	transcription factor 3
310588 Tchh	trichohyalin
499401 Tcte4	t-complex-associated testis expressed 4
64206 Tdo2	tryptophan 2,3-dioxygenase
303611 Tex2	testis expressed 2
316214 Tfeb	transcription factor EB
305244 Thap6	THAP domain containing 6
299889 Tm7sf4	transmembrane 7 superfamily member 4
499865 Tmco5a	transmembrane and coiled-coil domains 5A
304581 Tmem119	transmembrane protein 119
364137 Tmem165	transmembrane protein 165
362722 Tmem18	transmembrane protein 18
300516 Tmem218	transmembrane protein 218
362490 Tmem55a	transmembrane protein 55A
266681 Tmprss5	transmembrane protease, serine 5
314785 Tmtc3	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 3
296182 Tmx4	thioredoxin-related transmembrane protein 4
303247 Tnk1	tyrosine kinase, non-receptor, 1
301509 Tns1	tensin 1
298443 Toe1	target of EGR1, member 1 (nuclear)
362112 Tor2a	torsin family 2, member A
83684 Tpbg	trophoblast glycoprotein
498497 Tppp2	tubulin polymerization-promoting protein family member 2
311373 Trim69	tripartite motif-containing 69
155812 Trim9	tripartite motif-containing 9
312649 Tsen2	tRNA splicing endonuclease 2 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
310314 Ttc14	tetratricopeptide repeat domain 14
291944 Ttc29	tetratricopeptide repeat domain 29
311123 Ttc30a1	tetratricopeptide repeat domain 30A1
362415 Ttl3	tubulin tyrosine ligase-like family, member 3
84015 Ttn	titin
360576 Tusc5	tumor suppressor candidate 5
85489 Twist1	twist homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )
58819 Txnrd1	thioredoxin reductase 1
304423 Tyw1	tRNA-yW synthesizing protein 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
24862 Ugt2b	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B

308596 Ush1c	Usher syndrome 1C homolog (human)
288447 Uspl1	ubiquitin specific peptidase like 1
57305 Uts2r	urotensin 2 receptor
289229 Vangl2	vang-like 2 (van gogh, Drosophila)
494279 Vom1r48	vomeronasal 1 receptor 48
494239 Vom1r70	vomeronasal 1 receptor 70
494235 Vom1r82	vomeronasal 1 receptor 82
266771 Vom1r90	vomeronasal 1 receptor 90
690691 Vom2r16	vomeronasal 2 receptor, 16
690758 Vom2r22	vomeronasal 2 receptor, 22
309243 Vps13a	vacuolar protein sorting 13 homolog A (S. cerevisiae)
360991 Vrk2	vaccinia related kinase 2
286888 Wfdc2	WAP four-disulfide core domain 2
293057 Whamm	WAS protein homolog associated with actin, golgi membranes and microtubules
291678 Wnt8a	wingless-type MMTV integration site family, member 8A
308126 Zbtb2	zinc finger and BTB domain containing 2
315936 Zbtb38	zinc finger and BTB domain containing 38
499000 Zdhhc11	zinc finger, DHHC-type containing 11
316524 Zfp142	zinc finger protein 142
502968 Zfp352	zinc finger protein 352
305972 Zfp395	zinc finger protein 395
266773 Zfp709	zinc finger protein 709
306647 Zfp828	zinc finger protein 828
292160 Znhit6	zinc finger, HIT-type containing 6
361784 Znr1	zinc ribbon domain containing, 1
498425 Zrsr1	zinc finger (CCCH type), RNA binding motif and serine/arginine rich 1

## Bibliografía

## 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**(2): 165-179.
- Allan, S. M., P. J. Tyrrell, et al. (2005). "Interleukin-1 and neuronal injury." *Nat Rev Immunol* **5**(8): 629-640.
- Andersson, P. B., V. H. Perry, et al. (1992). "The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues." *Neuroscience* **48**(1): 169-186.
- Arnett, H. A., J. Mason, et al. (2001). "TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination." *Nat Neurosci* **4**(11): 1116-1122.
- Ashburner, M., C. A. Ball, et al. (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." *Nat Genet* **25**(1): 25-29.
- Banati, R. B., J. Gehrmann, et al. (1993). "Cytotoxicity of microglia." *Glia* **7**(1): 111-118.
- Barcia, C., V. Bautista, et al. (2005). "Changes in vascularization in substantia nigra pars compacta of monkeys rendered parkinsonian." *J Neural Transm* **112**(9): 1237-1248.
- Barrientos, R. M., E. A. Higgins, et al. (2006). "Peripheral infection and aging interact to impair hippocampal memory consolidation." *Neurobiol Aging* **27**(5): 723-732.
- Barron, K. D. (2003). "Microglia: history, cytology, and reactions." *J Neurol Sci* **207**(1-2): 98.
- Beal, M. F. (2001). "Experimental models of Parkinson's disease." *Nat Rev Neurosci* **2**(5): 325-334.
- Bekris, L. M., I. F. Mata, et al. (2010). "The genetics of Parkinson disease." *J Geriatr Psychiatry Neurol* **23**(4): 228-242.
- Ben-Shlomo, Y. and M. G. Marmot (1995). "Survival and cause of death in a cohort of patients with parkinsonism: possible clues to aetiology?" *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **58**(3): 293-299.
- Berry, C., C. La Vecchia, et al. (2010). "Paraquat and Parkinson's disease." *Cell Death Differ* **17**(7): 1115-1125.
- Besedovsky, H. O. and A. del Rey (1996). "Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses." *Endocr Rev* **17**(1): 64-102.
- Betarbet, R., T. B. Sherer, et al. (2000). "Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease." *Nat Neurosci* **3**(12): 1301-1306.
- Bett, A. J., W. Haddara, et al. (1994). "An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19): 8802-8806.
- Beyer, M. K., K. Herlofson, et al. (2001). "Causes of death in a community-based study of Parkinson's disease." *Acta Neurol Scand* **103**(1): 7-11.
- Bjarnason, I. T., A. Charlett, et al. (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**(4): 276-287.
- Blesa, J., S. Phani, et al. (2012). "Classic and new animal models of Parkinson's disease." *J Biomed Biotechnol* **2012**: 845618.
- Block, M. L. and J. S. Hong (2005). "Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism." *Prog Neurobiol* **76**(2): 77-98.
- Blum, D., S. Torch, et al. (2001). "Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease." *Prog Neurobiol* **65**(2): 135-172.

- Bohatschek, M., A. Werner, et al. (2001). "Systemic LPS injection leads to granulocyte influx into normal and injured brain: effects of ICAM-1 deficiency." *Exp Neurol* **172**(1): 137-152.
- Boka, G., P. Anglade, et al. (1994). "Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease." *Neurosci Lett* **172**(1-2): 151-154.
- Bourdiol, F., S. Toulmond, et al. (1991). "Increase in omega 3 (peripheral type benzodiazepine) binding sites in the rat cortex and striatum after local injection of interleukin-1, tumour necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide." *Brain Res* **543**(2): 194-200.
- Bronstein, D. M., I. Perez-Otano, et al. (1995). "Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures." *Brain Res* **704**(1): 112-116.
- Burrell, R. (1990). "Immunomodulation by bacterial endotoxin." *Crit Rev Microbiol* **17**(3): 189-208.
- Carswell, E. A., L. J. Old, et al. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(9): 3666-3670.
- Carvey, P. M., C. H. Zhao, et al. (2005). "6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood-brain barrier permeability." *Eur J Neurosci* **22**(5): 1158-1168.
- Castano, A., A. J. Herrera, et al. (1998). "Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system." *J Neurochem* **70**(4): 1584-1592.
- Clarke, D. J. and R. L. Branton (2002). "A role for tumor necrosis factor alpha in death of dopaminergic neurons following neural transplantation." *Exp Neurol* **176**(1): 154-162.
- Correale, J. and M. Farez (2007). "Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis." *Ann Neurol* **61**(2): 97-108.
- Correale, J. and M. F. Farez (2011). "The impact of environmental infections (parasites) on MS activity." *Mult Scler* **17**(10): 1162-1169.
- Cotzias, G. C., P. S. Papavasiliou, et al. (1969). "Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa." *N Engl J Med* **280**(7): 337-345.
- Cunningham, C., S. Champion, et al. (2009). "Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease." *Biol Psychiatry* **65**(4): 304-312.
- Cunningham, C., S. Champion, et al. (2007). "The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C)." *Brain Behav Immun* **21**(4): 490-502.
- Cunningham, C., J. P. Konsman, et al. (2002). "Cytokines and the ageing brain." *Trends Neurosci* **25**(11): 546-547.
- Cunningham, C., D. C. Wilcockson, et al. (2005). "Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration." *J Neurosci* **25**(40): 9275-9284.
- Curtis, L., A. J. Lees, et al. (1984). "Effect of L-dopa on course of Parkinson's disease." *Lancet* **2**(8396): 211-212.
- Chen, C. M., I. C. Chen, et al. (2007). "Nuclear receptor NR4A2 IVS6 +18insG and brain derived neurotrophic factor (BDNF) V66M polymorphisms and risk of Taiwanese Parkinson's disease." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **144B**(4): 458-462.
- Chen, H., E. J. O'Reilly, et al. (2008). "Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease." *Am J Epidemiol* **167**(1): 90-95.
- Chen, J., J. B. Buchanan, et al. (2008). "Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system." *Brain Behav Immun* **22**(3): 301-311.
- Chiueh, C. C., S. P. Markey, et al. (1984). "Neurochemical and behavioral effects of systemic and intranigral administration of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the rat." *Eur J Pharmacol* **100**(2): 189-194.

- D'Amelio, M., P. Ragonese, et al. (2006). "Long-term survival of Parkinson's disease: a population-based study." *J Neurol* **253**(1): 33-37.
- Dantzer, R., J. C. O'Connor, et al. (2008). "From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain." *Nat Rev Neurosci* **9**(1): 46-56.
- Datla, K. P., V. Zbarsky, et al. (2006). "Effects of anaesthetics on the loss of nigrostriatal dopaminergic neurons by 6-hydroxydopamine in rats." *J Neural Transm* **113**(5): 583-591.
- Davie, C. A. (2008). "A review of Parkinson's disease." *Br Med Bull* **86**: 109-127.
- Davson, H. (1976). "Review lecture. The blood-brain barrier." *J Physiol* **255**(1): 1-28.
- Dawson, T. M. and V. L. Dawson (2003). "Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease." *J Clin Invest* **111**(2): 145-151.
- Depino, A. M., C. Earl, et al. (2003). "Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease." *Eur J Neurosci* **18**(10): 2731-2742.
- Deumens, R., A. Blokland, et al. (2002). "Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway." *Exp Neurol* **175**(2): 303-317.
- Dilger, R. N. and R. W. Johnson (2008). "Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system." *J Leukoc Biol* **84**(4): 932-939.
- Dinarello, C. A. (1991). "Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism." *Blood* **77**(8): 1627-1652.
- Dinarello, C. A. (1996). "Biologic basis for interleukin-1 in disease." *Blood* **87**(6): 2095-2147.
- Dinarello, C. A. (1997). "Interleukin-1." *Cytokine Growth Factor Rev* **8**(4): 253-265.
- Dinarello, C. A. (2002). "The IL-1 family and inflammatory diseases." *Clin Exp Rheumatol* **20**(5 Suppl 27): S1-13.
- Dobbs, R. J., S. M. Dobbs, et al. (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**(4): 267-275.
- Dobbs, R. J., S. M. Dobbs, et al. (2008). "Helicobacter hypothesis for idiopathic parkinsonism: before and beyond." *Helicobacter* **13**(5): 309-322.
- Dvorkin, M. and D. Cardinali (2003). *Best & Taylor: bases fisiológicas de la práctica médica* Buenos Aires, Argentina, Editorial médica Panamericana.
- Ebmeier, K. P., S. A. Calder, et al. (1990). "Parkinson's disease in Aberdeen: survival after 3.5 years." *Acta Neurol Scand* **81**(4): 294-299.
- Ek, M., D. Engblom, et al. (2001). "Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier." *Nature* **410**(6827): 430-431.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." *J Clin Invest* **101**(4): 890-898.
- Fall, P. A., A. Saleh, et al. (2003). "Survival time, mortality, and cause of death in elderly patients with Parkinson's disease: a 9-year follow-up." *Mov Disord* **18**(11): 1312-1316.
- Farreras, V. and C. Rozman (1995). "Medicina Interna - Decimotercera edición." **Volúmen 1 y 2**.
- Ferrari, C. C., M. C. Pott Godoy, et al. (2006). "Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra." *Neurobiol Dis* **24**(1): 183-193.
- Ferro, M. M., M. E. Angelucci, et al. (2007). "Neuroprotective effect of ketamine/xylazine on two rat models of Parkinson's disease." *Braz J Med Biol Res* **40**(1): 89-96.
- Field, R., S. Champion, et al. (2010). "Systemic challenge with the TLR3 agonist poly I:C induces amplified IFNalpha/beta and IL-1beta responses in the diseased brain and exacerbates chronic neurodegeneration." *Brain Behav Immun* **24**(6): 996-1007.

- Frank, M. G., R. M. Barrientos, et al. (2010). "Aging sensitizes rapidly isolated hippocampal microglia to LPS ex vivo." *J Neuroimmunol* **226**(1-2): 181-184.
- Fresno, C., A. S. Llera, et al. (2012). "The multi-reference contrast method: facilitating set enrichment analysis." *Comput Biol Med* **42**(2): 188-194.
- Gayle, D. A., Z. Ling, et al. (2002). "Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide." *Brain Res Dev Brain Res* **133**(1): 27-35.
- Gentleman, R. C., V. J. Carey, et al. (2004). "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics." *Genome Biol* **5**(10): R80.
- GO-Consortium (2000). "The GO Consortium 2000."  
<http://www.geneontology.org/GO.consortiumlist.shtml>.
- Godbout, J. P., J. Chen, et al. (2005). "Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system." *FASEB J* **19**(10): 1329-1331.
- Godbout, J. P., M. Moreau, et al. (2008). "Aging exacerbates depressive-like behavior in mice in response to activation of the peripheral innate immune system." *Neuropsychopharmacology* **33**(10): 2341-2351.
- Greenfield, J. G. and F. D. Bosanquet (1953). "The brain-stem lesions in Parkinsonism." *J Neuro Neurosurg Psychiatry* **16**(4): 213-226.
- Hald, A. and J. Lotharius (2005). "Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link?" *Exp Neurol* **193**(2): 279-290.
- He, Y., T. Lee, et al. (2000). "6-Hydroxydopamine induced apoptosis of dopaminergic cells in the rat substantia nigra." *Brain Res* **858**(1): 163-166.
- Henry, C. J., Y. Huang, et al. (2009). "Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines." *Brain Behav Immun* **23**(3): 309-317.
- Hirsch, E. C., T. Breidert, et al. (2003). "The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease." *Ann N Y Acad Sci* **991**: 214-228.
- Hirsch, E. C., S. Hunot, et al. (2005). "Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease." *Parkinsonism Relat Disord* **11 Suppl 1**: S9-S15.
- Hoehn, M. M. and M. D. Yahr (1967). "Parkinsonism: onset, progression and mortality." *Neurology* **17**(5): 427-442.
- Holmes, C., M. El-Okli, et al. (2003). "Systemic infection, interleukin 1beta, and cognitive decline in Alzheimer's disease." *J Neuro Neurosurg Psychiatry* **74**(6): 788-789.
- Huang, Y., C. J. Henry, et al. (2008). "Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide." *Neurobiol Aging* **29**(11): 1744-1753.
- Hunot, S., N. Dugas, et al. (1999). "FcepsilonRII/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**(9): 3440-3447.
- Isgreen, W. P., A. M. Chutorian, et al. (1976). "Sequential parkinsonism and chorea following "mild" influenza." *Trans Am Neurol Assoc* **101**: 56-60.
- Kassiotis, G. and G. Kollias (2001). "Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination." *J Exp Med* **193**(4): 427-434.
- Kern, D. S. and R. Kumar (2007). "Deep brain stimulation." *Neurologist* **13**(5): 237-252.
- Kim, S. U. and J. de Vellis (2005). "Microglia in health and disease." *J Neurosci Res* **81**(3): 302-313.

- Kolb, M., P. J. Margetts, et al. (2001). "Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis." J Clin Invest **107**(12): 1529-1536.
- Konsman, J. P., P. Parnet, et al. (2002). "Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications." Trends Neurosci **25**(3): 154-159.
- Kortekaas, R., K. L. Leenders, et al. (2005). "Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo." Ann Neurol **57**(2): 176-179.
- Kreutzberg, G. W. (1996). "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS." Trends Neurosci **19**(8): 312-318.
- Kruger, R., C. Hardt, et al. (2000). "Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic Parkinson's disease." J Neural Transm **107**(5): 553-562.
- Kurtzke, J. F. and F. M. Murphy (1990). "The changing patterns of death rates in parkinsonism." Neurology **40**(1): 42-49.
- Lacroix, S., D. Feinstein, et al. (1998). "The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations." Brain Pathol **8**(4): 625-640.
- Langston, J. W., P. Ballard, et al. (1983). "Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis." Science **219**(4587): 979-980.
- Lawson, L. J., V. H. Perry, et al. (1990). "Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain." Neuroscience **39**(1): 151-170.
- Lim, K. L., V. L. Dawson, et al. (2002). "The genetics of Parkinson's disease." Curr Neurol Neurosci Rep **2**(5): 439-446.
- Ling, E. A. and W. C. Wong (1993). "The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts." Glia **7**(1): 9-18.
- Listed, N. (1999). "TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group." Neurology **53**(3): 457-465.
- Liu, B., H. M. Gao, et al. (2003). "Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation." Environ Health Perspect **111**(8): 1065-1073.
- Manning-Bog, A. B., A. L. McCormack, et al. (2002). "The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein." J Biol Chem **277**(3): 1641-1644.
- Margetts, P. J., M. Kolb, et al. (2002). "Inflammatory cytokines, angiogenesis, and fibrosis in the rat peritoneum." Am J Pathol **160**(6): 2285-2294.
- Marttila, R. J. and U. K. Rinne (1976). "Arteriosclerosis, heredity, and some previous infections in the etiology of Parkinson's disease. A case-control study." Clin Neurol Neurosurg **79**(1): 46-56.
- McCoy, M. K., T. N. Martinez, et al. (2006). "Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease." J Neurosci **26**(37): 9365-9375.
- McCoy, M. K. and M. G. Tansey (2008). "TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease." J Neuroinflammation **5**: 45.
- McGeer, E. G. and P. L. McGeer (2007). "The role of anti-inflammatory agents in Parkinson's disease." CNS Drugs **21**(10): 789-797.
- McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2004). "Inflammation and the degenerative diseases of aging." Ann N Y Acad Sci **1035**: 104-116.
- McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2007). "NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies." Neurobiol Aging **28**(5): 639-647.
- McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2008). "Glial reactions in Parkinson's disease." Mov Disord **23**(4): 474-483.

- McGuire, S. O., Z. D. Ling, et al. (2001). "Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons." *Exp Neurol* **169**(2): 219-230.
- Mogi, M., M. Harada, et al. (1994). "Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients." *Neurosci Lett* **180**(2): 147-150.
- Mogi, M., M. Harada, et al. (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**(1): 13-16.
- Mogi, M., M. Harada, et al. (1994). "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients." *Neurosci Lett* **165**(1-2): 208-210.
- Montero-Menei, C. N., L. Sindji, et al. (1996). "Early events of the inflammatory reaction induced in rat brain by lipopolysaccharide intracerebral injection: relative contribution of peripheral monocytes and activated microglia." *Brain Res* **724**(1): 55-66.
- Montero-Menei, C. N., L. Sindji, et al. (1994). "Lipopolysaccharide intracerebral administration induces minimal inflammatory reaction in rat brain." *Brain Res* **653**(1-2): 101-111.
- Morgante, L., G. Salemi, et al. (2000). "Parkinson disease survival: a population-based study." *Arch Neurol* **57**(4): 507-512.
- Mrass, P. and W. Weninger (2006). "Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors." *Immunol Rev* **213**: 195-212.
- Murray, C., D. J. Sanderson, et al. (2012). "Systemic inflammation induces acute working memory deficits in the primed brain: relevance for delirium." *Neurobiol Aging* **33**(3): 603-616 e603.
- Nagatsu, T. (2002). "Parkinson's disease: changes in apoptosis-related factors suggesting possible gene therapy." *J Neural Transm* **109**(5-6): 731-745.
- Nagatsu, T., M. Mogi, et al. (2000). "Cytokines in Parkinson's disease." *J Neural Transm Suppl*(58): 143-151.
- Nagatsu, T. and M. Sawada (2005). "Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines." *Curr Pharm Des* **11**(8): 999-1016.
- Nakamura, Y. (2002). "Regulating factors for microglial activation." *Biol Pharm Bull* **25**(8): 945-953.
- Nakashima, K., M. Maeda, et al. (1997). "Prognosis of Parkinson's disease in Japan. Tottori University Parkinson's Disease Epidemiology (TUPDE) Study Group." *Eur Neurol* **38 Suppl 2**: 60-63.
- Nishimura, M., I. Mizuta, et al. (2001). "Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with sporadic Parkinson's disease." *Neurosci Lett* **311**(1): 1-4.
- O'Keefe, G. M., V. T. Nguyen, et al. (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**(6): 496-512.
- Orr, C. F., D. B. Rowe, et al. (2002). "An inflammatory review of Parkinson's disease." *Prog Neurobiol* **68**(5): 325-340.
- Parkinson, J. (1817). "An essay on the shaking palsy. 1817." *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **14**(2): 223-236; discussion 222.
- Pavlov, V. A. and K. J. Tracey (2005). "The cholinergic anti-inflammatory pathway." *Brain Behav Immun* **19**(6): 493-499.
- Paxinos, G. and C. Watson (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Orlando, FL, Academic Press.
- Perry, S. W., S. Dewhurst, et al. (2002). "Tumor necrosis factor-alpha in normal and diseased brain: Conflicting effects via intraneuronal receptor crosstalk?" *J Neurovirol* **8**(6): 611-624.
- Perry, V., C. Cunningham, et al. (2002). "Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease." *Current opinion in neurology* **15**: 349-354.

- Perry, V. H. (2004). "The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease." Brain Behav Immun **18**(5): 407-413.
- Perry, V. H. (2010). "Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration." Acta Neuropathol **120**(3): 277-286.
- Perry, V. H., C. Cunningham, et al. (2007). "Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration." Nat Rev Immunol **7**(2): 161-167.
- Perry, V. H., M. K. Matyszak, et al. (1993). "Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS." Glia **7**(1): 60-67.
- Perry, V. H., J. A. Nicoll, et al. (2010). "Microglia in neurodegenerative disease." Nat Rev Neurol **6**(4): 193-201.
- Piehl, F. and O. Lidman (2001). "Neuroinflammation in the rat--CNS cells and their role in the regulation of immune reactions." Immunol Rev **184**: 212-225.
- Pitossi, F., A. del Rey, et al. (1997). "Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice." J Neurosci Res **48**(4): 287-298.
- Poewe, W. (2006). "The natural history of Parkinson's disease." J Neurol **253** Suppl 7: VII2-6.
- Pott Godoy, M. C., C. C. Ferrari, et al. (2010). "Nigral neurodegeneration triggered by striatal AdIL-1 administration can be exacerbated by systemic IL-1 expression." J Neuroimmunol **222**(1-2): 29-39.
- Pott Godoy, M. C., R. Tarelli, et al. (2008). "Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease." Brain **131**(Pt 7): 1880-1894.
- Raivich, G., M. Bohatschek, et al. (1999). "Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function." Brain Res Brain Res Rev **30**(1): 77-105.
- Rappold, P. M., M. Cui, et al. (2011). "Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(51): 20766-20771.
- Ravenholt, R. T. and W. H. Foege (1982). "1918 influenza, encephalitis lethargica, parkinsonism." Lancet **2**(8303): 860-864.
- Rio-Hortega, P. D. (1919). "El tercer elemento de los centros nerviosos. Poder fagocitario y movilidad de la microglía. ." Bol Soc Esp Biol **9**: 154 -166.
- Ritchie, M. E., J. Silver, et al. (2007). "A comparison of background correction methods for two-colour microarrays." Bioinformatics **23**(20): 2700-2707.
- Rothwell, N. (2003). "Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential." Brain Behav Immun **17**(3): 152-157.
- Rothwell, N. J. and S. J. Hopkins (1995). "Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action." Trends Neurosci **18**(3): 130-136.
- Sauer, H. and W. H. Oertel (1994). "Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat." Neuroscience **59**(2): 401-415.
- Saura, J., M. Pares, et al. (2003). "Intranigral infusion of interleukin-1beta activates astrocytes and protects from subsequent 6-hydroxydopamine neurotoxicity." J Neurochem **85**(3): 651-661.
- Sawada, M., K. Imamura, et al. (2006). "Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease." J Neural Transm Suppl(70): 373-381.
- Scott, A., K. M. Khan, et al. (2004). "What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus?" Br J Sports Med **38**(3): 248-249.

- Schallert, T. and T. A. Jones (1993). "'Exuberant' neuronal growth after brain damage in adult rats: the essential role of behavioral experience." J Neural Transplant Plast **4**(3): 193-198.
- Schrag, A. and N. Quinn (2000). "Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study." Brain **123 ( Pt 11)**: 2297-2305.
- Schulz, J. B. (2008). "Update on the pathogenesis of Parkinson's disease." J Neurol **255 Suppl 5**: 3-7.
- Shohami, E., I. Ginis, et al. (1999). "Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury." Cytokine Growth Factor Rev **10**(2): 119-130.
- Siegel, G. J. and N. B. Chauhan (2000). "Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain." Brain Res Brain Res Rev **33**(2-3): 199-227.
- Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." Stat Appl Genet Mol Biol **3**: Article3.
- Smyth, G. K. (2005). "Limma: Linear Models for Microarray Data." 397-420.
- Smyth, G. K. and T. Speed (2003). "Normalization of cDNA microarray data." Methods **31**(4): 265-273.
- Stoll, G., S. Jander, et al. (2000). "Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection." J Neural Transm Suppl **59**: 81-89.
- Streit, W. J. (2002). "Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS." Glia **40**(2): 133-139.
- Szczepanik, A. M., R. J. Fishkin, et al. (1996). "Effects of chronic intrahippocampal infusion of lipopolysaccharide in the rat." Neuroscience **70**(1): 57-65.
- Takahashi, M. and T. Yamada (1999). "Viral etiology for Parkinson's disease--a possible role of influenza A virus infection." Jpn J Infect Dis **52**(3): 89-98.
- Tansey, M. G., M. K. McCoy, et al. (2007). "Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention." Exp Neurol **208**(1): 1-25.
- Ungerstedt, U. (1968). "6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons." Eur J Pharmacol **5**(1): 107-110.
- Vila, M., V. Jackson-Lewis, et al. (2001). "The role of glial cells in Parkinson's disease." Curr Opin Neurol **14**(4): 483-489.
- Vrancken Peeters, M. J., A. L. Perkins, et al. (1996). "Method for multiple portal vein infusions in mice: quantitation of adenovirus-mediated hepatic gene transfer." Biotechniques **20**(2): 278-285.
- Wahner, A. D., J. S. Sinsheimer, et al. (2007). "Inflammatory cytokine gene polymorphisms and increased risk of Parkinson disease." Arch Neurol **64**(6): 836-840.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.
- Webster, J. I., L. Tonelli, et al. (2002). "Neuroendocrine regulation of immunity." Annu Rev Immunol **20**: 125-163.
- Wiendl, H. and R. Hohlfeld (2002). "Therapeutic approaches in multiple sclerosis: lessons from failed and interrupted treatment trials." BioDrugs **16**(3): 183-200.
- Yan, E., M. Castillo-Melendez, et al. (2004). "Cerebrovascular responses in the fetal sheep brain to low-dose endotoxin." Pediatr Res **55**(5): 855-863.
- Yang, M. S., K. J. Min, et al. (2007). "Multiple mechanisms that prevent excessive brain inflammation." J Neurosci Res **85**(11): 2298-2305.
- Yazdani, U., D. C. German, et al. (2006). "Rat model of Parkinson's disease: chronic central delivery of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)." Exp Neurol **200**(1): 172-183.
- Zlokovic, B. V. (2008). "The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders." Neuron **57**(2): 178-201.

