



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

LRRK2 G2019S exacerba la neuroinflamación sin degeneración dopaminérgica en modelos murinos *in vivo*

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

Lic. Esteban Alberto Miglietta

Director de tesis: Dr. Fernando J. Pitossi

Directora Asistente: Dra. Carina C. Ferrari

Consejero de estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Laboratorio de Terapias Regenerativas y Protectoras del
Sistema Nervioso - IIBBA-CONICET, Fundación Instituto Leloir.

Buenos Aires, 2022

A mi familia, que me dio la vida y me bancó siempre en todo lo que emprendí.

A Lupe, por compartir tu vida conmigo y ser mi pilar en todos estos años de esfuerzos.

A mi abuelo, por ser mi ejemplo en esta vida.

AGRADECIMIENTOS

Si bien es mi nombre el que figura en la portada de esta tesis, es claro que todo este trabajo no puede ser fruto de una única persona aislada en el universo. A continuación, voy a intentar agradecer a todas aquellas personas y organizaciones que hicieron posible, de una u otra forma, que esta tesis exista tal como es. Digo "intentar" porque estoy seguro de que más de una va a faltarme. Gracias también a esas personas por saber disculpar mi mala memoria.

En primer lugar, quiero agradecer al CONICET y la ANPCyT por financiar tanto mi beca como los costos de mi trabajo en el laboratorio.

Agradezco mucho también a la UBA por haberme brindado una formación académica gratuita y de enorme calidad durante tantos años. Honestamente puedo decir que me enorgullece profundamente haberme formado en la Universidad Pública de mi país.

Agradezco, por supuesto, a la Fundación Instituto Leloir y el IIBBA-CONICET por haberme brindado (y seguir brindándome!) un espacio de trabajo realmente privilegiado tanto por la calidad de su equipamiento, como también de las personas que allí trabajan.

Gracias a Fernando por haberme dado la oportunidad de hacer un doctorado en su laboratorio y a Carina por haberme tomado bajo su ala y por su colaboración FUNDAMENTAL en todos los experimentos *in vivo* de este trabajo.

Gracias a todas las personas que integran el Laboratorio de Terapias Protectoras y Regenerativas del Sistema Nervioso Central (o "el 106" para abreviar), así como también a las personas que ya no están en el labo pero han pasado por allí en estos años. Gracias a Celeste, Shirley, Cori y JC por las incontables ayudas y salvadas antes algún pifio mío. Gracias por la buena predisposición cada vez que necesité ayuda con un protocolo o con un resultado difícil de descifrar. Gracias También a Bere por ser una fuerza imparable y por confiar en mí como colaborador en tantos trabajos. Muchas pero muchas gracias a la genia de Isa que me ayudó a procesar tantos cerebritos y tantas inmunos que

no podría ni contar. Gracias por ser la mejor compañera de laboratorio y por darme la bienvenida en tu rinconcito del 108.

Un agradecimiento muy especial a mis compañeras de experimentos y mesada pero también de mates y meriendas: la Brenda, la Dani y la Viki, quienes han sabido compartir conmigo los particulares desafíos que implica la vida de le becarie doctoral. A veces la salud mental es un esfuerzo colectivo. Son unas genias, gracias por todo, las quiero mucho!

Gracias a toda la comunidad de FIL. A toda la gente de mantenimiento y limpieza, administración, biblioteca, bioterio, soporte y a las técnicas y técnicos de todas las áreas cuyo trabajo diario y buena predisposición son fundamentales para todas las investigaciones que se desarrollan en el Instituto. A todos los laboratorios que compartieron tan generosamente reactivos, protocolos y consejos conmigo. A todas las becarias y becarios del Instituto que siempre están dispuestos a apoyarse mutuamente, haciendo de nuestro pequeño rincón de mundo un lugar mejor y más humano para trabajar.

Muchas gracias al Ruso, Pame, Carla y todo el equipo del lab SEVA por mostrarme nuevas formas de aportar a y desde la Ciencia y por apoyarme y tenerme paciencia en este último año de escritura y correcciones de la tesis. Gracias por confiar en mí como parte de su equipo y por hacer que sea realmente un gusto ir a trabajar a FIL todos los días.

A Agus, Juani, Fede, Tom y Emi, mis amigos con mayor trayectoria, que me bancan los trapos desde hace más de 25 años! Gracias por perdonarme todas las fantasmeadas y faltazos que tantas veces me tocó clavar por el laburo. Gracias por estar siempre ahí, aunque estemos a muchos kilómetros de distancia. Los quiero mucho muchachos.

A Mica, Vicky, Pato, Manu, Nacho y Fede, que siempre me han hecho sentir querido y valorado. Gracias por interesarse genuinamente en mí y en lo que hago y por ser un grupo tan lindo al cual pertenecer. Gracias por esa magia que hace que aunque no nos veamos por varios meses, cada juntada se sienta como si el tiempo no hubiera pasado en absoluto (aunque ahora tengamos achaques y hasta hijos que demuestran lo contrario, je). Les quiero mucho.

A Parker, Martín, Nico, Silvio, Samu, La Hernán y El Negro por compartir conmigo tantas birras, asados y aventuras. Gracias por estar siempre al pie del cañón cuando hace falta juntarse a apoyarse mutuamente. Gracias por enriquecer mi vida con diferentes perspectivas y vivencias. Pero más que nada gracias por estar en las buenas y en las malas. Los quiero mucho.

Gracias infinitas a mi familia por apoyarme siempre y, a pesar muchas veces de no entender del todo qué es lo que hago, siempre tener la paciencia de escucharme con una palabra de aliento lista para impulsarme a seguir.

Gracias también a mi familia política por haberme abierto las puertas de su casa y haberme recibido con los brazos abiertos, haciéndome parte de su familia desde el primer día.

Gracias en particular a mi vieja y mi viejo, que hicieron posible que pueda estudiar gracias a su esfuerzo constante. Gracias también por velar siempre por mi bienestar y por respetar mis propias decisiones, aunque a veces esas dos cosas puedan no ir de la mano. Gracias a mi hermano, Martín, por ser el adulto responsable y ocuparte de tantas cosas que a mí me cuestan porque soy un colgado. Gracias por bancarme siempre, sin importar lo diferentes que podamos ser o pensar en varios aspectos. Los amo a los tres.

Gracias especiales a mi abuelo Enrique (don Enrique Luis Antonio Miglietta, porque su nombre completo es demasiado bueno como para que no esté escrito entero al menos una vez acá). Gracias por ser mi ejemplo a seguir de cómo ser una mejor persona. Gracias por creer en mí y por enorgullecerte de lo que hago. Gracias por enseñarme a pensar distinto, a ser más tolerante, a perdonar y a enfocarme en lo que realmente es importante en esta vida. Estoy tan orgulloso de vos como sé que vos lo estás de mí. Esta tesis te la dedico a vos. Te quiero mucho Abu.

Por último, no exagero ni un poquito cuando digo que no habría podido llegar hasta acá si no fuera por vos Lupe. Vos me acompañaste en este viaje casi desde el principio. Fuiste la que más se bancó todos los momentos duros, las frustraciones, las largas horas en el laboratorio, el mal humor. También fuiste la que todas y cada una de las veces, con paciencia (sí, paciencia!, quién lo diría?) y cariño me ayudaste a levantarme y seguir adelante, un paso a la vez. Gracias por

darme el enorme privilegio de compartir tu vida conmigo. Gracias por empujarme a querer seguir creciendo y avanzando para poder seguirte el paso. Gracias también por intentar (aunque a veces con limitado éxito), que pare, que descanse, que recargue pilas. Gracias por complementarme y balancearme. Gracias, en fin, por brindarme tanto amor y por elegirme como tu compañero de vida. Me hacés muy feliz. Te amo.

ÍNDICE

ÍNDICE	9
RESUMEN	15
ABSTRACT	19
ABREVIATURAS	23
INTRODUCCIÓN	25
ENFERMEDAD DE PARKINSON	26
Epidemiología	28
Etiología.....	29
Factores ambientales.....	29
Factores genéticos	30
LRRK2	32
Un poco de historia	32
Filogenia de LRRK2.....	32
Estructura de LRRK2.....	33
Distribución anatómica de LRRK2	34
Funciones de LRRK2	35
Citoesqueleto y crecimiento de neuritas	36
Regulador de Rab GTPasas: Transporte vesicular, fagocitosis y endocitosis	36
Autofagia	37
Dinámica mitocondrial	37
Regulador positivo de la inflamación.....	38
Mutaciones de LRRK2 asociadas a EP	40
INFLAMACIÓN	43

Historia y generalidades de la inflamación	43
Componentes celulares de la inflamación	44
Mastocitos.....	44
Neutrófilos	44
Células mononucleares	45
Células endoteliales.....	46
Inflamación en el SNC	47
Microglía	48
Inflamación y Enfermedad de Parkinson	51
Inflamación central	51
Exacerbación del daño neuronal por inflamación	52
Inflamación periférica	53
Inflamación y envejecimiento	54
MODELOS ANIMALES de LRRK2.....	56
Modelos de animales transgénicos.....	56
Modelos mediados por vectores virales	61
HIPÓTESIS y OBJETIVOS	67
Hipótesis	68
Objetivos.....	69
Objetivo general	69
Objetivos Específicos	69
MATERIALES y MÉTODOS	71
Generación de adenovectores LRRK2 wt y G2019S	72
1.1 Amplificación de plásmidos por Maxiprep.....	73
1.2 Cultivo celular.....	74
1.3 Transfección de células Hek293.....	75
1.4 Inmuncitofluorescencia para LRRK2	75

1.5 Extracción de ADN viral	76
1.6 Purificación del Brazo Derecho del adenovirus	76
1.7 Armado del adenovector: co-transfección	77
1.8 Selección Clonal	79
1.9 Ensayo de X-gal	80
1.10 PCR para detectar fragmento de LRRK2 en los clones.....	80
1.11 Secuenciación de productos de PCR	81
1.12 Producción de Stock Adenoviral	82
1.13 Titulación de los adenovectores	83
1.14 Bando de restricción.....	84
Estimación del título de adenovectores high capacity	85
Procedimientos con Animales de Laboratorio.....	87
3.1 Animales	87
3.2 Mantenimiento	87
3.3 Procedimientos generales	88
3.4 Genotipificación de ratas transgénicas.....	89
3.4.1 Extracción de ADN genómico	89
3.4.2 Genotipificación de ratas por PCR.....	90
3.5 Inyecciones intracerebrales	91
3.6 Inyecciones intravenosas.....	92
3.7 Frotis de sangre periférica y recuento leucocitario	92
3.8 Ensayos motores y comportamentales	93
3.8.1 Test del cilindro	93
3.8.2 Test de pasos de ajuste	94
3.8.3 Test de campo abierto	94
3.9 Análisis histológicos	95
3.9.1 Perfusión y procesamiento del tejido para histología.....	95

3.9.2 Tinción de Nissl con Violeta de Cresilo.....	96
3.9.3 Inmunohistoquímica e inmunohistofluorescencia	96
3.9.3.1 Procedimientos generales	96
3.9.3.2 IHQ de TH	97
3.9.3.3 IHF de LRRK2.....	97
3.9.3.4 IHF de MHCII	98
Extracción de RNA de sangre periférica y RT-PCR en tiempo real.	98
Obtención y cuantificación de imágenes digitales.....	101
5.1 Obtención de imágenes.....	101
5.2 Análisis de imágenes.....	101
RESULTADOS.....	105
Capítulo 1: “Generación de adenovectores de 1ra generación para expresar LRRK2 G2019S”	106
Controles de calidad de los clones de adenovectores.....	110
Capítulo 2: “Impacto de la expresión de hLRRK2 G2019S en la SN en un contexto de inflamación periférica”.....	117
Control de la expresión de los transgenes en la SNpc.....	118
Verificación de la eficacia de la inflamación periférica.....	119
Análisis de la inflamación central.....	120
Ensayos comportamentales	122
Ensayos motores.....	123
Estudio de la sobrevida de nDA.....	126
Capítulo 3: “Efecto de la inflamación central y periférica en ratas transgénicas para hLRRK2 G2019S”	129
Genotipificación y secuenciación de los animales transgénicos	130
Efectividad de la inflamación periférica.....	132
Evaluación de citoquinas proinflamatorias periféricas	133
Ensayos motores y comportamiento ansioso.....	134

Inflamación central.....	137
Sobrevida de nDa.....	139
Capítulo 4: "Influencia de la edad sobre el efecto de LRRK2 G2019S"	142
Inducción de inflamación central y periférica.....	144
Activación microglial	145
Estudios comportamentales	147
Test de campo abierto	147
Síntomas motores.....	148
Sobrevida de nDA	148
DISCUSIÓN	151
Conclusiones sobre las dificultades para la generación de vectores adenovirales para expresar hLRRK2.....	154
La sobre-expresión de LRRK2 seguida de inflamación periférica induce neuroinflamación sin muerte neuronal	155
LRRK2 G2019S no exacerba la respuesta inflamatoria central o periférica a IL-1 β ni desencadena neurodegeneración en animales transgénicos.....	159
La edad avanzada exacerba la inflamación mediada por LRRK2 G2019S pero no favorece la muerte neuronal dopaminérgica	163
Conclusiones y perspectivas futuras.....	165
APÉNDICE	171
Script de ImageJ para conteo semi-automatizado de neuronas TH+	172
BIBLIOGRAFÍA.....	177

LRRK2 G2019S EXACERBA LA NEUROINFLAMACIÓN SIN DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA EN MODELOS MURINOS *IN VIVO*

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad progresiva del sistema nervioso central que se presenta con síntomas tanto motores como no motores, los primeros causados principalmente por la muerte de las neuronas dopaminérgicas (nDa) de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc). Es una de las enfermedades neurodegenerativas con mayor incidencia en mayores de 65 años y hasta el momento no existen tratamientos aprobados que detengan la neurodegeneración o reemplacen a las neuronas perdidas.

Las mutaciones en el gen de LRRK2 (*Leucine-Rich Repeat Kinase 2*) son el principal factor de riesgo genético para desarrollar la EP, tanto la forma familiar como la idiopática. La proteína LRRK2 posee funciones muy variadas dependiendo del tipo celular, entre ellas, se sabe que actúa como regulador positivo de la respuesta inmune. LRRK2 G2019S, la mutación más común, está asociado a manifestaciones muy similares a la EP idiopática y posee penetrancia incompleta.

Trabajos previos de nuestro laboratorio y otros han demostrado que la inflamación, tanto central como periférica, puede causar o exacerbar la muerte neuronal en la SNpc, sugiriendo a la modulación de la inflamación como un posible sitio de intervención terapéutica.

En esta tesis hipotetizamos que las mutaciones de LRRK2, particularmente G2019S, poseen efectos degenerativos sobre las nDA exacerbando la respuesta inflamatoria o aumentando la susceptibilidad de las mismas a los efectos de la inflamación.

Para estudiar el efecto de LRRK2 G2019S sobre la neuroinflamación y la sobrevida de nDa *in vivo* en un contexto pro-inflamatorio, se utilizaron 3 modelos. En el primero, se expresó hLRRK2 G2019S, hLRRK2 wt o bien eGFP (como control) en la SNpc de ratas Wistar adultas empleando adenovectores de tercera generación. Luego, los mismos animales se inyectaron periféricamente con otro adenovector expresando interleuquina-1 β (Ad IL-1 β) como estímulo inflamatorio, o bien β -galactosidasa (Ad β gal) como control. La expresión de hLRRK G2019S no indujo muerte neuronal dopaminérgica, síntomas motores o comportamiento ansioso en ningún caso, a pesar de que los animales del grupo G2019S/IL-1 β presentaron un mayor infiltrado inflamatorio central.

En el segundo modelo, se emplearon ratas Sprague-Dawley transgénicas expresando hLRRK2 G2019S o hLRRK2 wt de manera ubicua, a las cuales se les aplicó un modelo de neurodegeneración dopaminérgica basado en inflamación central y periférica inducida por Ad IL-1 β . Los resultados indican que en ambos grupos de animales, así como en los controles no transgénicos, con inflamación central y periférica no se observa muerte neuronal dopaminérgica, síntomas motores o ansiosos ni afectación de la memoria a corto plazo. Adicionalmente tampoco se hallaron diferencias en la expresión de citoquinas proinflamatorias periféricas entre los grupos en respuesta al estímulo con Ad IL-1 β . Notablemente, tampoco se observó variación en el volumen del infiltrado inflamatorio en la SNpc en animales con Ad IL-1 β central respecto a los controles con Ad β gal.

Finalmente, teniendo en cuenta que la edad avanzada es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la EP, hipotetizamos que la misma también es una variable importante para los efectos de las mutaciones de LRRK2 sobre la viabilidad neuronal y/o la inflamación. Por ello, en este tercer modelo se emplearon ratas Wistar envejecidas (más de 12 meses) y se realizó un procedimiento similar al del primer modelo. Los animales expresando hLRRK2 G2019S en conjunto con la inflamación periférica presentaron niveles aumentados de infiltrado inflamatorio y microglía reactiva pero no sufrieron cambios significativos en la actividad motora, el comportamiento ansioso y la sobrevivencia de las nDa.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que, bajo las condiciones experimentales empleadas, la expresión central de hLRRK2 G2019S no impacta negativamente en la sobrevivencia de las nDa de la SNpc, lo cual lleva a refutar la hipótesis original. Sin embargo, la misma expresión de LRRK2 G2019S que no produce toxicidad en la SNpc, aumenta la respuesta neuroinflamatoria a nivel de la activación microglial e infiltrado inflamatorio en respuesta a IL-1 β central y/o periférica. Esta observación es interesante ya que un aumento de la respuesta inflamatoria se ha visto asociado a un incremento de la neurodegeneración en variados modelos de EP. Por lo tanto, estos resultados abren la puerta al estudio de la identificación de componentes inflamatorios con y sin efectos neurodegenerativos a partir de los nuevos modelos animales generados con incremento de inflamación y sin neurodegeneración.

LRRK2 G2019S EXACERBATES NEUROINFLAMMATION WITHOUT DOPAMINERGIC NEURODEGENERATION IN *IN VIVO* MURINE MODELS

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive disease of the central nervous system, presenting with both motor and non-motor symptoms, the former of which are mainly caused by the death of the dopaminergic neurons (DAn) of the *substantia nigra pars compacta* (SNpc). Incidence of PD is one of the highest among neurodegenerative disorders and so far there are no approved treatments that can stop neurodegeneration or replace lost neurons.

Mutations in the LRRK2 (Leucine-Rich Repeat Kinase 2) gene are the main genetic risk factor for developing PD, for both the familiar and the idiopathic forms. The LRRK2 protein plays a variety of functions depending on the cell type, among which it is regarded as a positive regulator of the immune response. The most common mutation, LRRK2 G2019S, is associated with disease manifestation very similar to idiopathic PD and presents incomplete penetrance.

Previous work from our laboratory and others has demonstrated that both central and peripheral inflammatory events can cause or exacerbate neuronal cell death in the SNpc, suggesting the modulation of inflammation as a possible target for therapeutic intervention.

In this work, we hypothesize that mutations in the LRRK2 gene, particularly G2019S, have a neurodegenerative effect on DAn by exacerbating the inflammatory response or by increasing neuronal susceptibility to inflammation.

In order to study the effects of LRRK2 G2019S on neuroinflammation and the survival of DAn *in vivo* in a pro-inflammatory environment, we used 3 different animal models. In the first one, hLRRK2 G2019S, hLRR2 wt or eGFP (as control) were expressed in the SNpc of adult Wistar rats using third-generation gutless adenovectors. Afterwards, the same animals were intravenously injected with another adenovector expressing interleukin-1 β (Ad IL-1 β) as an inflammatory stimulus, or β -galactosidase (Ad β gal) as control. The expression of LRRK2 G2019S did not induce dopaminergic cell death, motor symptoms or anxiety-like behaviour in any group, even though the animals in the G2019S/IL-1 β group presented a higher central inflammatory infiltrate.

In the second model, a protocol for inducing dopaminergic neurodegeneration based on central and peripheral inflammation induced by Ad IL-1 β was applied to Sprague-Dawley transgenic rats expressing hLRRK2 G2019S

or hLRRK2 wt. Results from this model indicate that both animal groups, as well as the non-transgenic control group, with both central and peripheral inflammation do not present dopaminergic neurodegeneration, motor symptoms, anxiety-like behavior nor short-term memory impairment. Notably, no difference in the volume of inflammatory infiltrate was observed in the SNpc of animals with central Ad IL-1 β compared with Ad β gal control.

Finally, given that advanced age is the main risk factor for PD, we hypothesized that it is also a relevant variable for the effects of LRRK2 over neuronal viability and/or inflammation. Thus, for the third model, old (more than 12 months) Wistar rats were employed with a similar procedure to the one from the first model. Animals expressing hLRRK2 G2019 together with peripheral inflammation presented higher levels of inflammatory infiltrate and reactive microglia but did not suffer significant alterations in locomotor activity, anxiety-like behavior or survival or DAN.

The results obtained in this thesis seem to indicate that, at least within the experimental conditions assayed, central hLRRK2 G2019S expression does not have a negative impact on survival of the DAN of the SNpc, which leads to refuting the original hypothesis. Nevertheless, the same expression of LRRK2 G2019S that does not cause nigral toxicity, does increase the neuroinflammatory response at the level of microglial activation in response to central and/or peripheral IL-1 β . This observation is interesting because the increase in the inflammatory response has been associated with higher neurodegeneration in several models of PD. Thus, these results could open the door to the possibility of identifying inflammatory components with and without neurodegenerative effects from novel animal models with increased neuroinflammation but no neurodegeneration.

ABREVIATURAS

- **β-gal**: β-galactosidasa
- **BAC**: cromosoma artificial bacteriano (por *bacterial artificial chromosome*)
- **BD**: brazo derecho del genoma adenoviral
- **BHE**: barrera hematoencefálica
- **BrEt**: Bromuro de Etidio
- **BSA**: seroalbúmina bovina (por *bovine seroalbumin*)
- **dpi**: días post-inyección
- **FPM**: fascículo prosencefálico medial (*medial forebrain bundle*)
- **IFN-γ**: interferón gamma
- **IHF**: inmunohistofluorescencia
- **IHQ**: inmunohistoquímica
- **IL-**: interleuquina
- **LPS**: lipopolisacárido bacteriano
- **LRRK2**: quinasa con repeticiones ricas en leucina 2 (*leucine-rich repeat kinase 2*)
- **MHC**: complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*)
- **nDa**: neuronas dopaminérgicas
- **ON**: toda la noche (por *overnight*)
- **PB**: buffer fosfato (por *phosphate buffer*)
- **PBS**: solución salina con *buffer* fosfato (por *phosphate-buffered saline*)
- **PBST**: PBS con 0,1% Tritón X-100

- **PFA:** paraformaldehído
- **pi:** partículas infectivas
- **ROS:** especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)
- **SFB:** suero fetal bovino
- **SNC:** sistema nervioso central
- **SNCA:** α -sinucleína
- **SNpc:** sustancia nigra pars compacta
- **TA:** temperatura ambiente
- **TBS:** solución salina con *buffer* de tris (por *tris-buffered saline*)
- **TNF- α :** factor de necrosis tumoral α (por *tumour necrosis factor α*)

INTRODUCCIÓN

ENFERMEDAD DE PARKINSON

En su trabajo seminal de 1817 titulado "Essay on the Shaking Palsy" ("Ensayo sobre la Parálisis Temblorosa") (Parkinson, 1817), el doctor James Parkinson describió y agrupó por primera vez el conjunto de signos y síntomas clínicos que hoy en día conocemos como Enfermedad de Parkinson (EP). La EP es una enfermedad compleja, progresiva y neurodegenerativa caracterizada principalmente por la muerte de las neuronas dopaminérgicas (nDa) de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) en el mesencéfalo ventral, asociada a la presencia de inclusiones citoplasmáticas proteicas llamadas cuerpos de Lewy (Kouli et al., 2018). Durante mucho tiempo se ha considerado que al momento de inicio de los síntomas motores, entre el 50 y 70% de las nDa de la SNpc ya han muerto (DeMaagd & Philip, 2015; Fearnley & Lees, 1991). Sin embargo, estudios más recientes sugieren que la pérdida de terminales dopaminérgicas en el cuerpo estriado, y no la muerte neuronal en la SNpc, es el evento crucial que desencadena los síntomas motores (Marras et al., 2018).

El diagnóstico clínico de esta enfermedad se basa principalmente en la aparición de síntomas motores: temblores asimétricos y progresivos de los miembros en reposo, inestabilidad postural, rigidez y bradicinesia (lentitud en los movimientos). No obstante, algunos síntomas no motores como anosmia (pérdida del olfato), constipación, depresión y trastornos del sueño REM pueden aparecer varios años antes de los síntomas motores (Kouli et al., 2018; Simon et al., 2020). Durante las etapas más tardías de la enfermedad, es posible encontrar disfunciones del sistema nervioso autónomo, dolor y deterioro cognitivo. Esto refuerza la noción de que se trata de una patología progresiva y compleja, que puede afectar otras regiones del cerebro e involucrar distintos tipos neuronales (DeMaagd & Philip, 2015).

En su ensayo original, el Dr. Parkinson afirmó que "Parecen existir razones suficientes para esperar que se descubra dentro de poco algún proceso curativo, por medio del cual, al menos, se pueda evitar la progresión de la enfermedad". Más de 200 años después, dicha afirmación resulta excesivamente optimista, dado que, si bien existen diversos tratamientos que permiten mejorar la calidad de vida de los y las pacientes, no existe aún ninguna terapia neuroprotectora para la EP.

Epidemiología

Según un meta-análisis de estudios epidemiológicos, en 2016 había más de 6 millones de personas en el mundo diagnosticadas con EP, de las cuales más de 68.000 estaban en la Argentina (Dorsey, Elbaz, et al., 2018). En base a los datos del Estudio de Carga Global de Enfermedades Neurodegenerativas 2015 llevado adelante por la revista The Lancet (Feigin et al., 2017), el trabajo muestra que la EP es la enfermedad neurodegenerativa con mayor crecimiento global en prevalencia entre 1990 y 2016, habiendo aumentado 2,4 veces en ese periodo. La distribución de la enfermedad por sexo no es equitativa, siendo la prevalencia 1,4 veces más frecuente en hombres que en mujeres. La EP es poco frecuente antes de los 50 años y, a partir de allí, su prevalencia aumenta con la edad, particularmente a partir de los 65 años, hasta un pico de alrededor de 1,5% de prevalencia en la población entre 85 y 90 años. Sin embargo, el aumento de

prevalencia de la EP en las últimas décadas no puede ser explicado exclusivamente por el aumento de la esperanza de vida y el envejecimiento de la población. Otros factores relevantes para explicar este fenómeno son el aumento de la exposición a tóxicos ambientales como pesticidas y solventes como subproductos del avance de la industrialización y la disminución global en el consumo de tabaco (Dorsey, Sherer, et al., 2018). Algunas proyecciones prevén que, siguiendo con la tendencia al envejecimiento mundial, el número de personas con EP se duplique en los próximos 20 años (Dorsey & Bloem, 2018). Este aumento en la prevalencia de la enfermedad llevaría aparejada una escalada en el impacto social y económico de la misma, lo cual refuerza aún más la necesidad de hallar tratamientos efectivos que logren prevenir o reparar los daños causados por la EP (Simon et al., 2020).

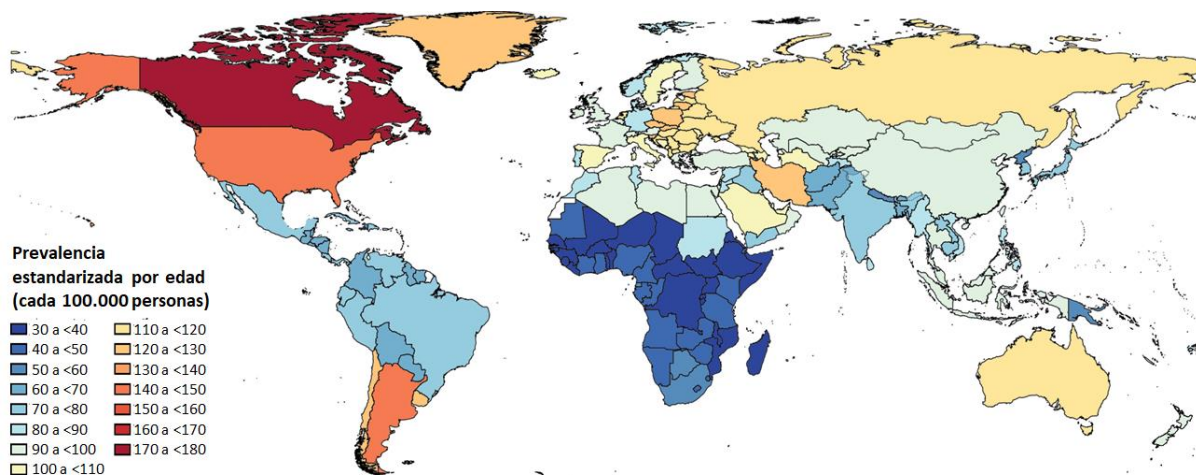


Figura 1.1. Distribución global de la prevalencia de EP en 2016. Existe una gran variabilidad en la incidencia de EP por país, siendo en general mayor en países industrializados ricos con mayor esperanza de vida. Adaptado de Dorsey, Elbaz, et al., 2018.

Etiología

Factores ambientales

La EP es una patología multifactorial y extremadamente heterogénea, con factores de riesgo tanto genéticos como ambientales, pero cuyas causas aún no están del todo esclarecidas. Si bien existe una cierta proporción de casos asociados a mutaciones genéticas, alrededor del 90% (Simon et al., 2020) caen dentro de la categoría de EP esporádica o idiopática. En estos pacientes no existe una historia familiar de la enfermedad y no es posible identificar el o los agentes causales de la misma. Entre los factores de riesgo ambientales para la EP se pueden mencionar la exposición crónica a pesticidas como la rotenona, el paraquat (Tanner et al., 2011) y compuestos organoclorados (Chhillar et al., 2013; Goldman, 2014). Si bien la mayoría de estos compuestos han sido prohibidos debido a su potencial tóxico, los organoclorados suelen ser lipofílicos y presentar bioacumulación, lo cual los hace muy persistentes en el ambiente (Goldman, 2014; Weisskopf et al., 2010). La exposición laboral crónica a metales pesados

como plomo o manganeso en la forma de vapores de soldadura o como polvo en suspensión también se ha descrito como un posible factor de riesgo para la EP (Gorell et al., 1999; X. Wang et al., 2006). Este tipo de exposición puede derivar en otras patologías similares a la EP pero con características únicas y distintivas denominadas parkinsonismos (Kwakye et al., 2015).

Además de los factores de riesgo, también se han descrito varios factores de protección contra la EP, aunque en muchos casos los mecanismos que median esta protección no están del todo esclarecidos. Por ejemplo, es bien conocida la relación inversa entre el consumo de tabaco y/o cafeína y el riesgo de desarrollar EP (Noyce et al., 2012; Wirdefeldt et al., 2011). En el caso de Argentina, es interesante mencionar que, si bien el consumo de té y café es bajo a moderado, el consumo total de bebidas cafeinadas es de los más altos del mundo, principalmente debido al consumo de mate. Al respecto, estudios recientes no sólo han asociado el consumo de mate con un menor riesgo de padecer EP (Gatto et al., 2015) sino que también se han observado un efecto neuroprotector de extractos de yerba mate tanto *in vitro* (Bernardi et al., 2019) como *in vivo* (Milioli et al., 2007).

Factores genéticos

Un estudio de concordancia de EP en 223 pares de gemelos (Goldman et al., 2019) ilustra la relevancia que tiene tanto la genética como el ambiente en esta patología. El estudio muestra que la proporción de pares de hermanos concordantes (en los cuales ambos fueron diagnosticados con EP, respecto de en los que sólo uno fue diagnosticado) es de 0,27 globalmente pero asciende a 0,83 si el primer diagnóstico fue antes de los 50 años. Estos números sugieren que el aporte de la genética en el desarrollo de la EP tiene más peso en las formas de inicio temprano de la enfermedad (antes de los 50 años) pero también que en todos los casos, es probablemente la combinación de la carga genética con factores externos lo que desencadena la patología.

A pesar de no superar el 10% de los casos totales (Elbaz et al., 1999), los casos familiares de EP resultan particularmente relevantes para entender la enfermedad ya que ofrecen la oportunidad de asociar alteraciones genéticas particulares con mecanismos moleculares subyacentes. La primera mutación causal de EP en ser descrita fue en el gen de α -sinucleína (*SNCA*) (Polymeropoulos et al., 1997), el cual codifica para una de las proteínas mayoritarias en los cuerpos de Lewy y en las inclusiones citoplasmáticas características de la patología. Más tarde, se describieron familias con EP autosómica-dominante de inicio tardío con duplicaciones o triplicaciones del gen de *SNCA*, lo cual apunta a que altos niveles de esta proteína contribuyen a la patogénesis de la enfermedad (Chiba-Falek et al., 2006; Singleton, 2003). Pocos años después, se observó que mutaciones en los genes de *PARKINA* (Kitada et al., 1998) y *PINK1* (Valente et al., 2004) resultan en una EP de inicio temprano (antes de los 50 años) y herencia autosómica-recesiva. Ambas proteínas están asociadas a la vía de degradación lisosomal de mitocondrias disfuncionales por el proceso de *mitofagia*. Brevemente, *PINK1* es una quinasa residente de la mitocondria, capaz de reclutar y activar a *PARKINA* ante la pérdida de potencial mitocondrial o la acumulación de proteínas mal plegadas (ambas señales de disfunción mitocondrial). A su vez, *PARKINA* es una ubiquitina E3 ligasa y, al ser activada por *PINK1*, decora la mitocondria dañada

con cadenas de poli-ubiquitina, marcándola así para su degradación (Bingol & Sheng, 2016; Sato & Furuya, 2018). La pérdida de función en alguno o ambos de estos genes lleva a la acumulación de mitocondrias disfuncionales, desbalance energético, aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) y acumulación tóxica del Ca^{2+} citosólico que favorecen la muerte neuronal (Barazzuol et al., 2020; Barodia et al., 2017; Heeman et al., 2011). La arquitectura morfológica extrema de las nDa de la SNpc, con axones amielínicos y terminales muy ramificados las hacen más dependientes de la correcta función del aparato mitocondrial y más susceptibles a la neurodegeneración (Ge et al., 2020). Otro gen cuyas mutaciones son causales de formas familiares tempranas, autosómicas-recesivas de EP es *DJ-1* (Bonifati et al., 2003). La proteína *DJ-1* está involucrada en las defensas antioxidantes de las células, aunque su mecanismo de acción y las consecuencias patológicas de sus mutaciones aún no están del todo esclarecidas (Repici & Giorgini, 2019). El estrés oxidativo y nitrosativo son considerados como dos de los factores principales en la neurodegeneración de la EP. Los cerebros *postmortem* de pacientes presentan un incremento de marcadores de daño oxidativo a proteínas (Alam, Daniel, et al., 1997), lípidos (Dexter et al., 1989) y ADN (Alam, Jenner, et al., 1997). Las nDa de la SNpc son inherentemente vulnerables a estas fuentes de estrés, en parte debido al gran potencial para la auto-oxidación de la dopamina citoplasmática (Olney et al., 1990) y a los niveles elevados de hierro (Zecca et al., 2004) en esa región del cerebro.

LRRK2

Un poco de historia

Las mutaciones en el gen PARK8, también conocida como dardarina o LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*), son las que se asocian con mayor frecuencia no solamente a las formas familiares sino también a las formas esporádicas de EP (Brice, 2005; Healy et al., 2008; Hulihan et al., 2008; Kumari & Tan, 2009). La relación de este gen con la EP se describió por primera vez en 2002, en una familia japonesa con EP familiar con una mutación en un locus en el cromosoma 12 que co-segregaba con la enfermedad y que los autores nombraron PARK8 (Funayama et al., 2002). Dos años más tarde, a partir de una familia vasca con EP familiar asociada a PARK8, se logró clonar el gen correspondiente. Los autores lo nombraron dardarina, del euskera *dardara*, que significa temblor (Paisán-Ruíz et al., 2004). Casi en simultáneo, otro grupo identificó a LRRK2, una proteína multidominio perteneciente a la familia ROCO y con un dominio quinasa del tipo MAPKKK, como el producto del locus en cuestión y la asociaron tanto a la EP como a otras enfermedades neurodegenerativas (Brice, 2005; Ren et al., 2019; Zimprich et al., 2004).

Filogenia de LRRK2

El LRRK2 humano es un gen de gran longitud (144Kb) ubicado en el cromosoma 12, con un marco de lectura abierto de 7581pb con 51 exones que codifica para una proteína inusualmente grande con 2527 aminoácidos y un peso aproximado de 280kDa (Kumari & Tan, 2009). Tanto LRRK2 como su parálogo LRRK1 (con 2052 aminoácidos), están conservados en todos los deuterostomados (incluyendo a todos los vertebrados) y derivarían de sendos genes ortólogos encontrados en un cnidario, *Nematostella vectensis*. Si bien LRRK1 tiene una estructura muy similar a la de su parálogo LRRK2, existen varias evidencias que indican que cumplen funciones distintas y no se trata de genes redundantes: perturbaciones en LRRK2 no afectan la expresión de LRRK1; las mutaciones en LRRK1 no imitan los efectos patológicos de las mutaciones equivalentes en LRRK2; y LRRK2 posee una toxicidad intrínseca no observada en LRRK1, probablemente debido a la mayor actividad quinasa basal de LRRK2. Por otro lado, el único gen LRRK tanto de *Caenorhabditis elegans* como de *Drosophila melanogaster* (y del resto de los protostomados), sería ortólogo de un tercer gen de *N. vectensis* y, por lo tanto, tendría una historia evolutiva independiente de los LRRK1 y LRRK2 humanos (Langston et al., 2016).

Estructura de LRRK2

LRRK2 es una proteína multidominio grande y compleja, que comprende varios dominios de interacción proteína-proteína: repeticiones tipo armadillo, repeticiones tipo anquirina, repeticiones ricas en leucina (LRR) y un dominio WD40 C terminal. Además, posee dos dominios catalíticos: un tándem Roc-COR (Roc:

ras of complex proteins, COR: *C-terminal of Roc*) con actividad GTPasa, característico de las proteínas de la familia ROCO, y un dominio quinasa de la subfamilia de las treonina/serina quinastas (Kumari & Tan, 2009; Mata et al., 2006). Dentro del proteoma humano, es una de las pocas proteínas que poseen actividad enzimática tanto quinasa como GTPasa (P. A. Lewis, 2019).

Al igual que muchas otras quinastas, las proteínas de LRRK2 poseen la capacidad de interactuar entre sí formando homodímeros (Sen et al., 2009), cuya actividad quinasa resulta mayor a la de los monómeros (Blanca Ramírez et al., 2017). A su vez, se cree que la dimerización de LRRK2 está regulada por su unión a GTP, con lo cual dependería de la actividad GTPasa del dominio Roc-COR. Por otro lado, LRRK2 posee numerosos sitios de autofosforilación. En particular, aquellos ubicados en el *loop* de activación del dominio quinasa y en el dominio Roc-COR están involucrados en la regulación de la actividad enzimática de la proteína (Harvey & Outeiro, 2019). Por lo tanto, las mutaciones en cualquiera de estas regiones pueden modular la actividad quinasa de LRRK2.

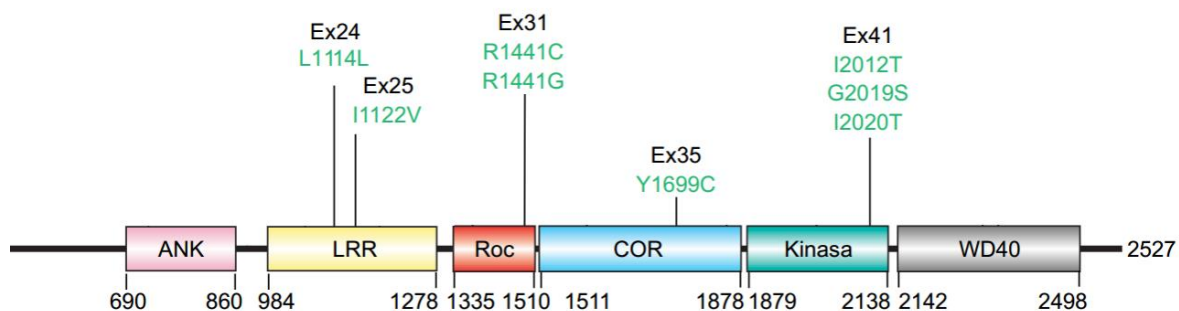


Figura 1.2. Esquema de la estructura de LRRK2. En verde se muestran las sustituciones aminoacídicas asociadas a patologías, incluyendo G2019S, con el exón donde se ubican en negro. Las cajas coloreadas representan los dominios funcionales de la proteína: región de repetición ankirina (ANK); repetición rica en leucina (LRR); el tándem *ras of complex* (Roc)-*C-terminal of Roc* (COR) con actividad GTPasa; el dominio quinasa y el dominio C-terminal WD40. Adaptado de Mata et al., 2006.

Distribución anatómica de LRRK2

En roedores, LRRK2 se expresa fisiológicamente en varios tejidos, detectándose la mayor expresión en cerebro, pulmón y riñón (Araki et al., 2018; R. L. Wallings & Tansey, 2019). En el cerebro, LRRK2 se expresa de manera casi ubicua tanto en ratas como en ratones, aunque existen algunas diferencias inter-específicas. Los ratones, por un lado, poseen niveles de expresión de la proteína LRRK2 similares tanto en la corteza, el cuerpo estriado y la SNpc. Por otro lado, las ratas presentan una expresión de LRRK2 más limitada a ciertas capas de la corteza, una expresión muy alta en el cuerpo estriado y muy baja en la SNpc. Notablemente, ratas transgénicas expresando LRRK2 bajo el promotor humano muestran una distribución más amplia de la proteína dentro de la corteza así como también una alta expresión en la SNpc, en particular en las neuronas dopaminérgicas TH+ (West et al., 2014). Notablemente, en el caso de la SN *pars reticulata*, tanto ratas como ratones presentaron una expresión mínima de LRRK2, mientras que en las ratas expresando LRRK2 bajo el promotor humano, la expresión en esa región fue nula. Estas diferencias indican que, si bien la

secuencia de la proteína está muy conservada en mamíferos, las regiones regulatorias no codificantes, así como la influencia del promotor de cada especie en la expresión, son variables.

Estudios en cerebros humanos señalan la expresión fisiológica del mensajero de LRRK2 en la corteza cerebral, el hipocampo y en los núcleos caudado y putamen (Westerlund et al., 2008). Además, se ha detectado por inmunohistoquímica la presencia de la proteína en células de Purkinje de la corteza cerebelosa (Giasson et al., 2006), en neuronas piramidales de la corteza cerebral, en neuronas espinosas medianas e interneuronas en el caudado y putamen y en nDA de la SNpc (Biskup et al. 2006). En todos los casos la proteína se encuentra en el citoplasma, pudiendo incluso también hallarse en los procesos axonales y dendríticos. A pesar de estas evidencias, la distribución exacta de la expresión de LRRK2 en el cerebro humano no está del todo aclarada (Araki et al., 2018).

Varias células pertenecientes al sistema inmune, como monocitos, células dendríticas y linfocitos B y T así como también la microglía (macrófagos residentes del SNC) también expresan el mensajero (Gardet et al., 2010) y la proteína (Hakimi et al., 2011) de LRRK2. De hecho, en leucocitos circulantes de humanos sanos, los mayores niveles de la proteína fueron encontrados en neutrófilos, seguidos por monocitos y células B (Shutinoski et al., 2019). Además, en estos tipos celulares, la expresión de LRRK2 aumenta significativamente en respuesta a citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IFN- γ) o agonistas de los receptores tipo Toll, como lipopolisacárido bacteriano (LPS) o partículas virales, lo cual apunta claramente a un rol de esta proteína en la respuesta inmune ante patógenos (Hakimi et al., 2011; R. L. Wallings & Tansey, 2019).

Funciones de LRRK2

Tanto las funciones intracelulares de LRRK2 como sus interactores específicos en las vías de señalización en las que participa han sido y aún son motivo de intenso estudio y debate. Varios trabajos recientes sugieren que el rol de esta proteína puede ser célula-específico, cumpliendo funciones muy distintas en el SNC y en la periferia (P. A. Lewis, 2019). Aún más, la complejidad estructural de LRRK2 permite que actúe tanto como quinasa, GTPasa o incluso como andamiaje molecular (a través de sus diversos sitios de interacción proteína-proteína) en diversas vías de señalización.

Diversos modelos animales y celulares implican a LRRK2 en funciones tan variadas como tráfico vesicular, autofagia, fisión mitocondrial, formación de microtúbulos y el citoesqueleto de actina, sinaptogénesis y síntesis proteica (Alegre-Abarrategui et al., 2009; Araki et al., 2018; Plowey et al., 2008; Seol et al., 2019).

Citoesqueleto y crecimiento de neuritas

Varios estudios en cultivos primarios de neuronas y cerebros intactos de ratón mostraron que LRRK2 es importante para el mantenimiento, crecimiento y ramificación de las neuritas. Este rol probablemente esté relacionado con la homeostasis del citoesqueleto de actina mediado por proteínas ERM

(ezrina/radixina/moesina) (Martin et al., 2014; Russo et al., 2014). Además, LRRK2 es capaz de interactuar directamente con ciertas tubulinas y con la proteína tau. Si bien LRRK2 está vinculada a la fosforilación de tau y la estabilización de los microtúbulos, aún se desconoce si esto se debe directamente a la actividad quinasa de LRRK2 o a un rol como andamiaje molecular involucrando a la quinasa de tau GSK3 β (Harvey & Outeiro, 2019).

Regulador de Rab GTPasas: Transporte vesicular, fagocitosis y endocitosis

Algunos de los sustratos fisiológicos más establecidos de LRRK2 como quinasa pertenecen a la familia de las Rab GTPasas. Estas proteínas, pertenecientes a la superfamilia Ras, están involucradas en la formación, transporte y fusión de vesículas, controlando el reconocimiento inicial o anclaje de las mismas a la membrana del compartimento celular al que deben incorporarse. La deficiencia en el transporte vesicular es uno de los posibles mecanismos patológicos de la EP y ha sido reportado en varios modelos celulares de EP con mutaciones de LRRK2 y SNCA (Seol et al., 2019). LRRK2 es capaz de fosforilar estas proteínas Rab y así modificar su asociación a membranas. De hecho, mutantes de LRRK2 con aumento de actividad quinasa llevan a la acumulación de formas inactivas de proteínas Rab en las membranas celulares (Harvey & Outeiro, 2019).

La función de LRRK2 a través de las proteínas Rab es particularmente relevante en células del sistema inmune, donde éstas últimas regulan procesos claves para la respuesta a antígenos como la fagocitosis y la maduración de los fagosomas, la autofagia y la presentación antigénica. Llamativamente, se ha reportado que LRRK2 G2019S (la cual tiene mayor actividad quinasa) aumenta la actividad fagocítica, mientras que en microglía, un *knock out* de LRRK2 logra un efecto similar. En ambos casos, el aumento de la actividad fagocítica está mediado por Rab5, lo cual indica que LRRK2 y sus proteínas asociadas actúan de manera diferente dependiendo del tipo celular (R. L. Wallings & Tansey, 2019).

LRRK2 está involucrada en endocitosis de vesículas sinápticas y mediada por clatrina, mediante fosforilación de Rab5b y Endofilina A. Al mismo tiempo, también se le ha adjudicado un rol en la exocitosis de vesículas sinápticas mediada por fosforilación del complejo SNARE (R. Wallings et al., 2015). Estos hechos indican que LRRK2 juega un papel importante en el control del conjunto de vesículas en la pre-sinapsis.

Autofagia

La asociación entre LRRK2 y la autofagia comenzó con la observación que la inhibición de la vía autofágica disminuye la toxicidad de LRRK2 G2019S en un modelo celular (Plowey et al., 2008). Más tarde se vio que LRRK2 se localiza en la membrana de las vesículas autofágicas y el *knockdown* del LRRK2 endógeno induce autofagia en células Hek (Alegre-Abarrategui et al., 2009). LRRK2 mismo parece ser un sustrato fisiológico de la autofagia mediada por chaperonas y se ha reportado que LRRK2 G2019S es resistente a esta degradación, llevando a un bloqueo de la vía autofágica-lisosomal y a la consecuente acumulación de SNCA (Obergasteiger et al., 2020; R. Wallings et al., 2015). Sin embargo, la abundancia de resultados aparentemente contradictorios según el modelo de estudio lleva a

que aún esté en debate si LRRK2 es un regulador positivo o negativo de la vía autofágica y si su control lo realiza a nivel de la iniciación o de la degradación (Seol et al., 2019; R. L. Wallings & Tansey, 2019).

Dinámica mitocondrial

Otro blanco intracelular de la actividad de LRRK2 son las mitocondrias, en las cuales actúa afectando la dinámica mitocondrial mediante la regulación de los procesos de fusión y fisión. En varios modelos *in vitro* e *in vivo*, la sobreexpresión de LRRK2, o la expresión de una mutante con mayor actividad quinasa como G2019S, llevan a aumento de la fisión mitocondrial, aparición de morfologías mitocondriales aberrantes, desacople de la cadena respiratoria, acumulación de mitocondrias defectuosas, mitofagia aumentada con niveles de calcio alterados o estrés oxidativo por aumento de ROS (R. Wallings et al., 2015). Está reportado que LRRK2 favorece la fisión mitocondrial tanto en neuronas como en microglía mediante la fosforilación de Dlp1/Drp1 (Seol et al., 2019).

Regulador positivo de la inflamación

Como se mencionó anteriormente, LRRK2 se expresa en diversos tipos celulares pertenecientes al sistema inmune y su expresión aumenta ante estímulos inflamatorios. De hecho, en condiciones basales, la presencia de LRRK2 en células microgliales de ratón es baja, pero se hace evidente luego de un estímulo inflamatorio con LPS intracraneal (Moehle et al., 2012). A su vez, el silenciamiento de LRRK2 o la inhibición farmacológica de su actividad quinasa en estas células atenúa significativamente la producción de citoquinas proinflamatorias y la inducción de estrés oxidativo inducidas por el tratamiento con LPS (Moehle et al., 2012; Russo et al., 2014, 2019). Por ejemplo, en un modelo de neurodegeneración inducida por inyección con LPS o transducción viral de α -sinucleína en la SNpc de ratas, los animales KO para LRRK2 presentaron resistencia al daño neuronal dopaminérgico, correlacionada con un menor reclutamiento de células mieloides en el cerebro (Daher et al., 2014). En otro modelo, el KO de LRRK2 previno la muerte de nDA y la aparición de síntomas motores en ratones tratados con LPS y paraquat (Dwyer et al., 2020). Estas observaciones sugieren que la presencia de LRRK2 funcional es necesaria para el desarrollo de los procesos inflamatorios, particularmente en la microglía.

Numerosos estudios apoyan la noción de que el rol de LRRK2 como activador de la respuesta inflamatoria podría estar mediado por la vía de PKA/NF- κ B (Gardet et al., 2010). NF- κ B es un factor de transcripción clave para los procesos inflamatorios induciendo la expresión de genes proinflamatorios, incluyendo citoquinas y quimioquinas, e incluso participa en la regulación del inflamósoma (T. Liu et al., 2017). Por su parte, PKA es un regulador negativo de la actividad de NF- κ B, ya que fosforila y activa a su subunidad inhibitoria, p50. Estudios en cultivos primarios de microglía murina muestran que tanto la delección génica de LRRK2 como la inhibición farmacológica de su actividad quinasa disminuyen la producción de IL-1 β o COX-2 en respuesta a LPS. En ambos casos, esta respuesta inflamatoria atenuada involucró la inhibición de la vía de NF- κ B por fosforilación de p50 mediada por PKA (Russo et al., 2015). Estos resultados perfilan a LRRK2 como un regulador positivo de la inflamación a través de la activación de NF- κ B, que a su vez es regulada negativamente por PKA. En línea

con estos resultados, cerebros de ratones *knock-in* (KI) para la mutación G2019S de LRRK2, la cual incrementa la actividad quinasa de esta proteína, presentan menores niveles de p50 fosforilado. Además, la microglía de estos ratones desarrolla una mayor respuesta inflamatoria ante un estímulo con fibras de α -sinucleína (Russo et al., 2018).

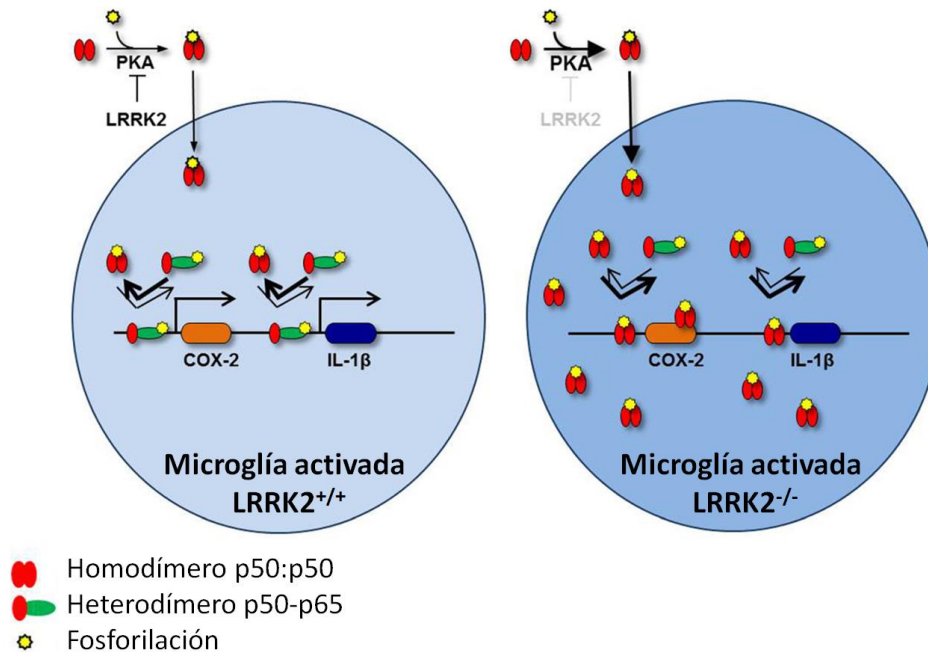


Figura 1.3. LRRK2 regularía la respuesta inflamatoria en microglía por la vía de NF- κ B. LRRK2 estaría actuando como inhibidor de PKA, favoreciendo la actividad de NF- κ B y la expresión de citoquinas proinflamatorias en la microglía activada como respuesta a estímulos inflamatorios. Adaptado de Russo et al., 2015.

Dentro del sistema inmune periférico, LRRK2 se expresa en células B y en monocitos maduros (sobre todo en monocitos proinflamatorios CD14+/CD16+), pero no en células T. Sin embargo, consistentemente con su rol en la respuesta a patógenos, la expresión del mensajero y la proteína de LRRK2 aumenta en varios tipos celulares del sistema inmune en respuesta a IFN- γ (Cicco et al., 2020; Hakimi et al., 2011). En los monocitos, en particular, este aumento de expresión de LRRK2 está mediado por ERK5 (Kuss et al., 2014) y el tratamiento con el inhibidor farmacológico dual de la actividad quinasa de LRRK2 y ERK5, LRRK-IN-1, inhibe parcialmente la maduración de estas células inducida por IFN- γ (Thévenet et al., 2011).

Finalmente, en humanos, el rol de LRRK2 como activador de la respuesta inflamatoria está respaldado por el hecho de que los portadores de la mutación G2019S presentan mayores niveles de IL-1 β en plasma que los controles que portan LRRK2 wt (Dzamko, 2017). Además, las mutaciones en LRRK2 son factores de riesgo para ciertas enfermedades con fuerte componente inflamatorio como las enfermedades inflamatorias intestinales crónicas (como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa) y la lepra (Dzamko, 2017; Gardet et al., 2010; Hakimi et al., 2011; H. Lee et al., 2017; Moehle et al., 2012).

Algunos autores incluso postulan que las mutaciones de ganancia de función de LRRK2 (como G2019S) podrían tener un valor adaptativo positivo al proteger

contra ciertas infecciones, tanto periféricas como centrales, mediante el aumento de la respuesta inflamatoria (Cabezudo et al., 2020; Shutinoski et al., 2019). En efecto, ratones KO para LRRK2 mostraron una menor respuesta inmune y mayor mortalidad frente a la infección periférica con *Salmonella typhimurium* y a la encefalitis causada por reovirus (Shutinoski et al., 2019). Además, ratones *knock-in* para LRRK2 G2019S lograron controlar mejor ambas infecciones, reduciendo la mortalidad en el caso de la infección bacteriana. En el modelo de encefalitis, si bien los animales *knock-in* presentaron menores títulos virales, la mortalidad fue mayor en los ratones expresando LRRK2 G2019S. Los cerebros de estos animales presentaron mayores niveles de α -sinucleína que los controles. En ambos casos, el impacto de la mutación G2019S fue prevenido por la presencia de una mutación que impide la actividad quinasa de LRRK2.

Mutaciones de LRRK2 asociadas a EP

Las principales mutaciones en LRRK2 asociadas a EP se heredan en forma autosómica dominante e incluyen G2019S, R1441C/G/H, T1699C e I2020T. Todas ellas, junto con otras mutaciones patológicas menos frecuentes, se encuentran concentradas en 10 exones correspondientes a la región C-terminal de la proteína, particularmente en los dominios quinasa y ROC-GTPasa (ver Figura 1.2) (Klein & Westenberger, 2012). Los pacientes que poseen estas mutaciones presentan un fenotipo clínico muy similar a la EP idiopática (Trinh & Farrer, 2013; Zimprich et al., 2004).

Por lejos, la mutación más común es la G2019S, la cual consiste en un polimorfismo de nucleótido simple de G por A en la posición 6055 del mensajero que, a su vez, produce un cambio de aminoácido de glicina a serina en la posición 2019 de la proteína. Dicho cambio resulta en un aumento de la actividad catalítica del dominio quinasa de LRRK2 (Smith et al., 2006; West et al., 2005). A nivel mundial, se estima que alrededor del 4% de los casos de EP familiar y del 1% de los casos de EP espontánea están asociados a la mutación G2019S (Healy et al., 2008). No obstante, estos porcentajes pueden variar significativamente según el grupo étnico que se analice. Los mayores porcentajes de prevalencia de esta mutación se concentran en el sudoeste europeo (particularmente Portugal, España, Italia y Francia), el norte de África (Marruecos, Argelia, Túnez, Libia y Egipto) y América del Sur (Monfrini & Di Fonzo, 2017). Las poblaciones bereberes del norte de África, de ancestría árabe, presentan la mutación G2019S en el 39% de los casos de EP esporádica y 36% de EP familiar y los judíos ashkenazi en el 10% y el 28%, respectivamente (Healy et al., 2008; Lesage et al., 2006; Ozelius et al., 2006). En particular, en América del Sur, en Argentina, Chile y Uruguay (tres países con fuerte ancestría europea) la mutación G2019S está ligada al 3,5-5,5% de los casos de EP familiar y 2,9-4,2% de casos de EP esporádica (Monfrini & Di Fonzo, 2017).

Los casos de EP asociados a LRRK2 G2019S se caracterizan por ser prácticamente indistinguibles en cuanto a su sintomatología, respuesta a tratamientos y progresión a la EP idiopática. La edad de inicio de la enfermedad en pacientes portadores de la mutación se estimó en alrededor de 58 años (Healy et al., 2008). Las características principales de estas formas de EP son parkinsonismo asimétrico con predominancia de temblores, bradicinesia y rigidez,

que responden a terapia de reemplazo de dopamina y neurocirugía funcional (Healy et al., 2008). Si bien se ha reportado una mayor frecuencia de temblores junto con menor riesgo de hiposmia y deterioro cognitivo (Healy et al., 2008; Marras et al., 2016), ambas tendencias no han sido confirmadas en estudios posteriores y permanecen aún en debate (Kestenbaum & Alcalay, 2017).

A pesar de estar asociada a formas autosómicas dominantes de EP, la mutación G2019S de LRRK2 posee penetrancia incompleta. Uno de los estudios más exhaustivos llevado a cabo por un consorcio internacional de LRRK2 sobre un gran número de pacientes indican que la penetrancia de esta mutación es, en promedio, de 28% a los 59 años, de 51% a los 69 años y de 74% a los 79 años de edad (Healy et al., 2008). De hecho, los estudios indican que la penetrancia de G2019S sería menor a la de otras mutaciones de LRRK2. Además, si bien la prevalencia de la mutación varía según el origen étnico, su penetrancia no varió según la etnia ni el género (Healy et al., 2008). Si bien algunos trabajos han reportado una mayor penetrancia de G2019S en individuos homocigotas respecto de los heterocigotas (Ishihara et al., 2007), lo cual podría indicar un efecto del dosaje, estudios subsiguientes fallaron en encontrar esa misma tendencia (Brice, 2005; Ishihara et al., 2006). **De todo esto se desprende que deben existir otros factores genéticos o ambientales, aún no completamente caracterizados, que determinen la penetrancia de G2019S y el inicio de esta enfermedad** (DeMaagd & Philip, 2015; Monfrini & Di Fonzo, 2017). Es importante destacar que, aún hoy en día, no es posible predecir si un individuo portador de la mutación G2019S desarrollará EP en el futuro o no (Kestenbaum & Alcalay, 2017). Estas conclusiones son muy relevantes para enmarcar el trabajo de esta tesis.

INFLAMACIÓN

Historia y generalidades de la inflamación

La inflamación (del latín *inflammare*, prender fuego) es un proceso complejo y evolutivamente conservado en los vertebrados que involucra tanto al sistema inmune como al tejido conectivo vascularizado. Dicho proceso tiene como objetivo proteger al organismo de factores exógenos (bacterias, virus, toxinas, etc.) o endógenos, eliminando a los patógenos o restos celulares y promoviendo la reparación y la recuperación de los tejidos dañados (Furman et al., 2019). Una de las descripciones más antiguas conocidas en occidente de este proceso se le atribuye a Celso, quien hace más de 2000 años señalaba los signos cardinales de la inflamación: "rubor" (enrojecimiento, producto de la hiperemia), "tumor" (endurecimiento), "calor" y "dolor". Más tarde, en 1871, Virchow agregaría un quinto signo cardinal: la pérdida de función (Scott et al., 2004).

Además de los efectos locales en el foco inflamatorio, la respuesta inflamatoria puede producir efectos a nivel sistémico: fiebre y síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado (Roth & Blatteis, 2014). Al mismo tiempo, los procesos inflamatorios agudos pueden desencadenar una serie de modificaciones comportamentales tendientes al ahorro energético conocida como "comportamiento de la enfermedad" (*sickness behavior*), que incluyen fatiga, anhedonia, reducción de libido, tristeza y alteraciones del sueño (Furman et al., 2019).

Las respuestas inflamatorias agudas normalmente se caracterizan por ser espacial y temporalmente limitadas y suelen resolverse una vez que se ha eliminado el patógeno y/o se ha reparado el tejido. Sin embargo, si el estímulo persiste o si existe alguna desregulación del proceso inflamatorio, la inflamación puede tornarse crónica y nociva (Furman et al., 2019). Esta inflamación crónica se caracteriza por presentar un infiltrado compuesto principalmente por linfocitos T y macrófagos, junto con procesos de fibrosis (Braga et al., 2017).

Componentes celulares de la inflamación

El actor principal de la respuesta inflamatoria es el **sistema inmune innato**, el cual constituye la primera línea de respuesta ante patógenos, pero también cumple roles muy importantes en la reparación tisular, la remoción de células apoptóticas y *debris* celular y en la respuesta a tumores (Stephenson et al., 2018). Dicho sistema está constituido por leucocitos del linaje mieloide, circulantes o residentes en los tejidos, que expresan receptores en superficie capaces de reconocer patrones moleculares comunes en estructuras evolutivamente conservadas en los patógenos (patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs, por sus siglas en inglés). Las células del sistema inmune innato también pueden activarse mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés), vinculados a moléculas propias del organismo que son liberadas durante procesos de daño o

muerte celular (Furman et al., 2019). La activación de cualquiera de estos receptores puede desencadenar una respuesta inflamatoria aguda.

Mastocitos

En mamíferos, las primeras células del sistema inmune innato en actuar como parte de una respuesta inflamatoria son los **mastocitos**: células residentes en los tejidos, particularmente en aquellos más expuestos al exterior (mucosa intestinal, piel, tracto respiratorio) y caracterizadas por la presencia de gránulos basófilos en su citoplasma. Ante una injuria, estas células liberan dichos gránulos, que contienen sustancias vasoactivas y heparina, que estimulan la extravasación de otros leucocitos del torrente sanguíneo al sitio del daño. En realidad, los mastocitos pueden secretar gran variedad de mediadores capaces de amplificar o reprimir la respuesta inmune, según el contexto pueden tener funciones proinflamatorias, antiinflamatorias e incluso inmunosupresoras (Eming et al., 2007; Galli et al., 2011).

Neutrófilos

Los **neutrófilos** o leucocitos polimorfonucleares, a diferencia de mastocitos y macrófagos, poseen una vida media corta (entre unas pocas horas y unos pocos días), emergen totalmente maduros de la médula ósea y no poseen capacidad proliferativa. Estas células son de las primeras en ser reclutadas al foco de inflamación, donde se activan y participan principalmente en la formación de coágulos, la activación de macrófagos y en la amplificación de la respuesta inflamatoria mediante la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Además, poseen diversos mecanismos para eliminar patógenos directamente: la liberación de agentes bactericidas contenidos en sus gránulos citoplasmáticos; la fagocitosis y degradación intracelular de microbios; la producción de especies reactivas del oxígeno (Eming et al., 2007; Galli et al., 2011); y la liberación de trampas extracelulares neutrófilas (NETs, del inglés *neutrophil extracellular traps*) que contienen fibras de cromatina y proteínas antimicrobianas (Brinkmann et al., 2004).

Células mononucleares

Los fagocitos mononucleares, que incluyen a los **monocitos** circulantes y a los **macrófagos** y **células dendríticas** residentes en los tejidos, también forman parte de la inmunidad innata, cumpliendo el rol de fagocitar patógenos o restos celulares, presentar antígenos y activar al sistema inmune adaptativo. Los macrófagos residentes en los tejidos reciben distintos nombres según su localización, en particular aquellos que residen y cumplen su función en el parénquima del SNC se conocen como **microglía** y serán abordados en detalle más adelante. Además de la microglía, el SNC cuenta con otras poblaciones de células mieloides residentes como los macrófagos ubicados alrededor de los vasos sanguíneos del SNC, en el espacio coroideo, los órganos circunventriculares y el espacio subaracnoideo (Perry, 2012). Todas estas células poseen una vida media muy variable que puede incluso durar años. Los macrófagos son células que entran en acción aproximadamente 48 horas después del inicio de la respuesta inflamatoria aguda. La mayoría de los macrófagos ingresan al tejido desde el torrente sanguíneo como monocitos y, una vez extravasados, se activan como

consecuencia del contacto con mediadores del microambiente inflamatorio (Eming et al., 2007; Galli et al., 2011). Entre sus principales funciones se encuentra la de fagocitar microorganismos, tejido dañado e, incluso, a los propios neutrófilos (una vez que han cumplido su función), además de la presentación antigénica (Eming et al., 2007).

La compleja combinación de señales que llevan a la activación de los macrófagos pueden perfilarlos hacia distintos fenotipos funcionales bien diferenciados. La vía clásica de activación o M1 responde a estímulos asociados a la respuesta de linfocitos T helper 1 (IFN- γ y TNF- α). Estos macrófagos cumplen un rol proinflamatorio secretando citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-23) y liberando especies reactivas de oxígeno que colaboran en la defensa antitumoral y ante patógenos pero pueden llevar a daño tisular. Por otro lado, los macrófagos con fenotipo M2, cuya activación está asociada a las citoquinas típicas de la respuesta de linfocitos T helper 2 (IL-4 e IL-13), están involucrados en la regulación de la inflamación (secretan IL-10) y la reparación tisular (Galli et al., 2011; Varin & Gordon, 2009). No obstante, estos dos casos de diferenciación fenotípica no son los únicos y forman parte de un continuo de perfiles de activación funcional entre los extremos proinflamatorio y antiinflamatorio (Ransohoff, 2016).

Células endoteliales

Si bien no pertenecen directamente al sistema inmune, las **células endoteliales** que recubren o constituyen todos los vasos sanguíneos también juegan un papel importante en los procesos inflamatorios. Al igual que los mastocitos, macrófagos y neutrófilos, estas células también poseen distintos receptores de membrana capaces de reconocer PAMPs y DAMPs así como también situaciones patofisiológicas como hiperglucemia. Las células endoteliales responden a estos estímulos liberando citoquinas proinflamatorias (entre ellas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8) y factores protrombóticos. Además, en respuesta a la inflamación, aumentan la expresión de proteínas de unión a leucocitos y disminuyen la expresión de proteínas de adhesión con otras células endoteliales, facilitando así el reclutamiento y la extravasación de células del sistema inmune al sitio de inflamación (Sturtzel, 2017). De esta manera, las células endoteliales son responsables de al menos tres de los signos cardinales típicos de la inflamación: aumentan la circulación local (calor y rubor) y al aumentar la permeabilidad de los vasos, permiten la entrada de plasma al sitio en cuestión (tumor) (Pober & Sessa, 2007).

Inflamación en el SNC

Desde mediados del siglo XX, el SNC ha sido considerado como un sitio "inmunológicamente privilegiado". Esta noción nace de la observación inicial que trasplantes heterólogos de tejido en el cerebro presentaban menos rechazo que en el resto del cuerpo, debido a la dificultad del SNC de montar una respuesta eficiente en su contra (Forrester et al., 2018; Louveau, Harris, et al., 2015). Algunas características que explican este comportamiento son: la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE) que limita el pasaje de células de la sangre al

SNC, la falta de células dendríticas presentadoras de antígenos, la ausencia de un sistema linfático convencional, la baja expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y la expresión de moléculas inmunorreguladoras dentro del parénquima del SNC (Forrester et al., 2018; Louveau, Harris, et al., 2015; Roca et al., 2011).

Si bien la noción del estatus de privilegio del SNC respecto al sistema inmune sigue vigente, en los últimos años se ha refinado considerablemente el entendimiento de las respuestas inmunes que allí ocurren. Para empezar, recientemente se ha descrito la presencia de vasos linfáticos funcionales en las meninges de roedores (Louveau, Smirnov, et al., 2015) y primates, incluyendo humanos (Absinta et al., 2017), que drenan el contenido del líquido cerebroespinal hacia los nódulos linfáticos cervicales. Además, hoy en día se sabe que el SNC se encuentra constantemente bajo vigilancia inmune a cargo de la microglía (macrófagos residentes) y de macrófagos y linfocitos periféricos, los cuales son capaces de ingresar al tejido nervioso, atravesando la barrera hematoencefálica intacta, aunque en menor proporción que al resto de los tejidos (Ousman & Kubes, 2012). No obstante, no todas las áreas del SNC poseen el mismo acceso de estas células inmunes, siendo más frecuente hallarlas en las regiones más externas (plexos coroideos y líquido cerebro-espinal) y en las meninges que en el parénquima, donde predomina la vigilancia de la microglía (Croese et al., 2021). Esta compartimentalización inmune condiciona el tipo de respuestas que se desarrollan en cada región (A. Depino et al., 2005): en las meninges suele ser similar a la que se describe en la periferia, mientras que en el parénquima cerebral rigen reglas propias de la neuroinflamación que limitan esa respuesta inmune. También se ha observado que la barrera hematoencefálica es capaz de transportar en forma activa citoquinas desde la periferia, a través de transportadores específicos (Quan & Banks, 2007). Esta vigilancia permite desarrollar respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas regularmente en el SNC, las cuales son claves para eliminar agentes infecciosos y tumores, así como también para deshacerse de restos celulares y promover la reparación del tejido (Amor et al., 2014). Por lo tanto, la visión actual propone que el inmunoprivilegio del SNC mantiene la integridad y el funcionamiento normal del cerebro y la médula espinal, pero este privilegio está basado en una interacción activa entre el sistema inmune y el SNC. Esta comunicación activa entre el sistema inmune y el SNC indica que las infecciones periféricas o eventos inflamatorios podrían desencadenar o contribuir a procesos patogénicos en el cerebro (Cabezudo et al., 2020).

Microglía

Como se mencionó anteriormente, las células microgliales son los macrófagos residentes en el parénquima del SNC. Si bien se trata de células pertenecientes al linaje mieloide, a diferencia del resto de los macrófagos que se originan en la médula ósea, tienen su origen en precursores hematopoyéticos mesodérmicos del saco vitelino embrionario que migran al SNC durante el desarrollo (Perry, 2012; Stephenson et al., 2018). En condiciones de reposo, estas células presentan morfologías altamente ramificadas y una baja expresión de moléculas de membrana asociadas a la presentación antigénica, como el MHC. A pesar de su denominación, la microglía en reposo está lejos de encontrarse quiescente ya que, con sus ramificaciones altamente móviles, sensa

continuamente su microambiente en busca de potenciales señales de compromiso homeostático (daño celular, patógenos, etc). Además, estas células secretan factores neurotróficos como el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) o el Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos (bFGF); participan en el mantenimiento de los circuitos sinápticos y colaboran en la inducción de muerte celular programada y limpieza de los restos celulares por fagocitosis durante el desarrollo del SNC (Gomez-Nicola & Perry, 2015; Subhramanyam et al., 2019).

La microglía puede transicionar a un estado activado en respuesta a diversos estímulos patológicos como infección, trauma o embolia cerebral y neurodegeneración. Durante este proceso, las células de la microglia pierden sus ramificaciones e hipertrofian el cuerpo celular para pasar a tener una morfología ameboide y reactiva caracterizada por la producción de una gran variedad de citoquinas, quemoquinas y otros mediadores de la respuesta inmune (Subhramanyam et al., 2019). En particular, la microglía activada aumenta significativamente la expresión de MHC clase II, la cual es muy baja en condiciones de reposo y por lo tanto se lo considera un marcador de activación (Ferrari et al., 2006). Además, como consecuencia de la activación, se estimula la rápida proliferación de la población microglial a partir de precursores locales (Perry, 2016).

La vía clásica de activación de la microglía puede ser inducida por diversos estímulos, como por ejemplo LPS, IFN- γ , β -amiloide o α -sinucleína. Esta microglía activada es capaz de responder a la injuria secretando citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α y aumentando la producción de mediadores citotóxicos como óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS). Este perfil de activación ha sido tradicionalmente equiparado a un perfil M1 y constituye la primera línea de defensa del SNC contra posibles patógenos. No obstante, la acumulación de citoquinas proinflamatorias por activación crónica de la microglía puede llevar a efectos negativos sobre la función y la supervivencia neuronal, así como también de los procesos de neuro-regeneración mediados por células madre (Subhramanyam et al., 2019).

Vale mencionar que estudios previos del laboratorio han demostrado que los procesos neurodegenerativos crónicos pueden inducir una activación microglial atípica con activación morfológica pero que no genera un ambiente proinflamatorio (A. M. Depino et al., 2003). En este perfil de activación, la microglía presenta niveles elevados de RNA mensajero de citoquinas proinflamatorias como IL-1 α e IL-1 β , pero no aumenta la producción de las proteínas correspondientes. Este perfil de activación atípica o de microglía "cebada" ha sido descrito por otros autores en otros modelos de neurodegeneración (Perry, 2012; Perry et al., 2007) y sugiere que, en un contexto patológico de muerte neuronal, la microglía se encuentra preparada para entrar en un estado de activación neurotóxico aumentando los niveles de la proteína IL-1 β en respuesta a una nueva injuria (Fig. 1.4). Los procesos inflamatorios periféricos son un buen ejemplo de señales que pueden exacerbar una patología neurodegenerativa (Amor et al., 2014).

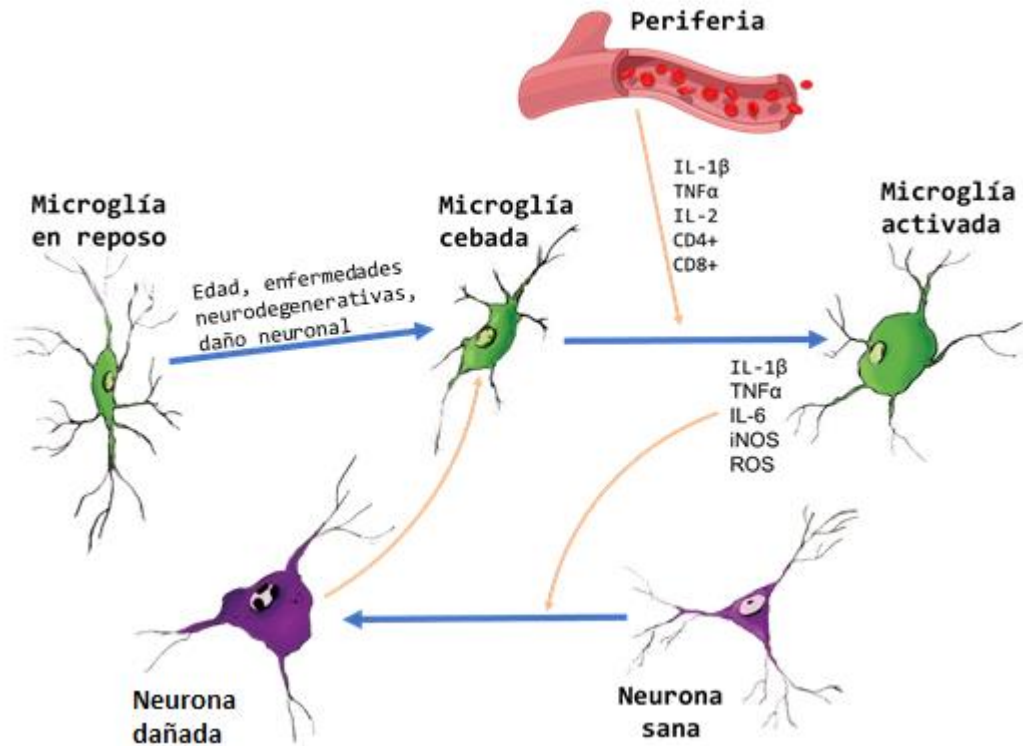


Figura 1.4. Esquema de la relación entre inflamación periférica, activación microglial y daño neuronal en la EP. La activación microglial es característica de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas. Algunos escenarios como la edad avanzada o el daño neuronal pueden llevar a la microglía a un estado “cebado”, que precede la activación neurotóxica mediada por un segundo estímulo proinflamatorio periférico. Adaptado de Ferrari & Tarelli, 2011.

La activación crónica del sistema inmune innato en el SNC y, en particular, de la microglía, es una característica compartida entre muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EP (Amor et al., 2010; Stephenson et al., 2018). En los últimos años, numerosos estudios apoyan la idea de que la activación microglial crónica contribuye, y no es una mera consecuencia, de estos procesos neurodegenerativos (Amor et al., 2010; Dwyer et al., 2020; Dzamko et al., 2015; Ferrari et al., 2006; Furman et al., 2019; Leal et al., 2013; Perry, 2012; Pott Godoy et al., 2008, 2010; Stephenson et al., 2018; Subhramanyam et al., 2019; Wendeln et al., 2018).

Inflamación y Enfermedad de Parkinson

Inflamación central

Numerosos estudios reportan, de manera consistente, la presencia de microglía activada en cerebros post-mortem de pacientes con EP (Doorn et al., 2014; Imamura et al., 2003; McGeer et al., 1988; Mogi et al., 1994), así como también el rol de la inflamación en diversos modelos animales (Chertoff et al., 2011; De Lella Ezcurra et al., 2010; Ferrari et al., 2006; Kozina et al., 2018; Pott

Godoy et al., 2008, 2010). Existe una sensibilidad particular que demuestran las nDA de la SNpc en la EP que se puede explicar en parte por el hecho de que esa región del cerebro presenta la mayor densidad de células microgliales tanto en ratones (Lawson et al., 1990) como en ratas (W. G. Kim et al., 2000), seguida por el estriado. No obstante, también se ha demostrado que la exposición de la microglía a agregados de α -sinucleína puede inducir la producción de IL-1 β por un mecanismo mediado por TLR (Zhang et al., 2005). De esta manera, se plantea el interrogante de si la activación microglial es en efecto causa o consecuencia de la patología neuronal en la EP (Subhramanyam et al., 2019). En cualquier caso, lo más probable es que la activación crónica y exacerbada de la microglía esté cumpliendo un rol de amplificación del daño neuronal. En línea con esta idea, la inhibición de la activación microglial resulta neuroprotectora en varios modelos animales de EP (He et al., 2001; Sánchez-Pernaute et al., 2004; Wu et al., 2002).

Además de la activación de la microglía, otro indicio del rol de la inflamación en la EP es la aparición de mayores niveles de citoquinas proinflamatorias (como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6) en el líquido cefalorraquídeo, el estriado y la SNpc de pacientes y modelos animales de la patología (Mogi et al., 1994; Russo et al., 2014). Adicionalmente, ciertos polimorfismos en los genes de IL-1 β , TNF- α y del MHC clase II, los cuales se expresan predominantemente en células gliales y están directamente relacionados a la respuesta inflamatoria, están asociados a un mayor riesgo de desarrollar EP (Russo et al., 2014).

Estudios previos de nuestro laboratorio en modelos animales de EP, evidencian el efecto neurodegenerativo de la inflamación sobre las neuronas dopaminérgicas de la SN. En uno de ellos, la expresión unilateral sostenida, mediada por adenovectores, de IL-1 β en la SNpc de ratas adultas indujo neurodegeneración dopaminérgica y compromiso motor asociados a activación microglial y presencia de infiltrado inflamatorio (Ferrari et al., 2006). Mientras tanto, los animales control que expresaban β -galactosidasa (β -gal), no presentaron ninguna de estas respuestas. Esto es consistente con observaciones previas que indican que, en los animales control, la inyección intracerebral del adenovector codificante para β -gal induce activación glial leve y transiente, que desaparece luego de alrededor de 7 días (Ferrari et al., 2004). Un modelo similar, pero basado en la expresión crónica de TNF- α en la SNpc de ratas, presentó pérdida de nDA, activación microglia, reclutamiento de macrófagos periféricos y acinesia contralateral al hemisferio inyectado a partir del día 14 y al menos hasta el día 28 luego de la operación (De Lella Ezcurra et al., 2010).

Exacerbación del daño neuronal por inflamación

Los procesos inflamatorios en el SNC no sólo pueden causar daño neuronal de forma directa bajo ciertas condiciones, sino que también pueden potenciar la severidad de patologías en esta área (Amor et al., 2014; Leal et al., 2013). Trabajos previos de nuestro laboratorio demuestran que la inflamación central inducida por una dosis sub-tóxica de LPS en la SNpc es capaz de exacerbar el daño neuronal producido por 6OHDA en la SNpc (Pott Godoy et al., 2008). Además, el tratamiento con dexametasona (un corticoide con potente efecto antiinflamatorio) o con inhibidores de IL-1 β , revirtieron los efectos del LPS. De manera similar, la expresión crónica de TNF- α en la SNpc de ratones también consiguió aumentar la neurodegeneración producida por 6OHDA (Chertoff et al., 2011). Llamativamente,

la expresión crónica de niveles bajos de esta misma citoquina resultó en un efecto neuroprotector, lo cual indica un posible rol dual de las citoquinas proinflamatorias que depende, entre otros factores, de su concentración.

Un trabajo reciente muestra que el pre-tratamiento con dosis sub-tóxicas de LPS aplicadas en la SNpc (que no alcanzan para inducir muerte neuronal) potencia el daño inducido por la inyección intraperitoneal del pesticida paraquat (Dwyer et al., 2020). En este mismo modelo, el silenciamiento de LRRK2 previno la activación microglial y el aumento de la transcripción de mediadores proinflamatorios por el LPS y, en consecuencia, la muerte neuronal dopaminérgica.

Inflamación periférica

Otros modelos de EP generados en nuestro laboratorio muestran que la inflamación periférica inducida por la transducción adenoviral de IL-1 β es capaz de exacerbar el daño a las nDA, los síntomas motores y la activación microglial inducidos por 6OHDA (Pott Godoy et al., 2008) o bien por la expresión de IL-1 β en la SNpc (Pott Godoy et al., 2010). En ambos casos, el estímulo inflamatorio periférico sostenido induce un aumento de los marcadores inflamatorios en el SNC, acompañado por neurodegeneración dopaminérgica (Fig. 1.5). Nuevamente, en estos animales, la muerte neuronal es prevenida por el tratamiento antiinflamatorio con dexametasona, lo cual apunta a un efecto potenciador de la inflamación periférica sobre la patología central.

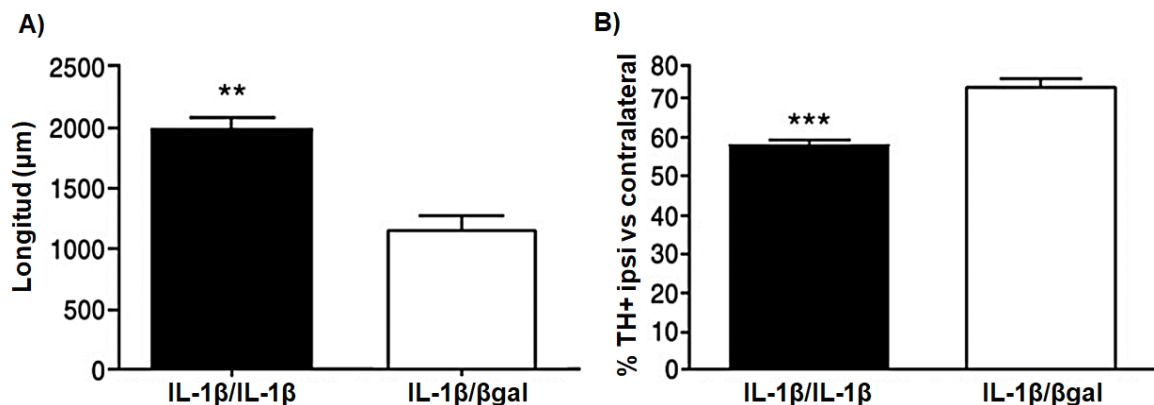


Figura 1.5. La expresión central y periférica de IL-1 β indujo inflamación central y muerte neuronal dopaminérgica en un modelo murino. Pott Godoy y colaboradores demostraron que el daño inducido por la expresión central, mediada por adenovectores, de IL-1 β es exacerbado por la expresión periférica de la misma citoquina (grupo IL-1 β /IL-1 β), en comparación con animales con el mismo estímulo central pero sin inflamación periférica (grupo IL-1 β / β gal). **A)** Los animales IL-1 β /IL-1 β presentaron más inflamación central, medida como la longitud de la lesión inflamatoria en μ m, acompañada de **B)** menor sobrevida de las neuronas dopaminérgicas TH+. Adaptado de Pott Godoy et al., 2010.

Adicionalmente, otro antecedente de nuestro laboratorio mostró que la inflamación periférica inducida por Ad IL-1 β intravenoso logra exacerbar el daño causado por 6OHDA en la SNpc no sólo en ratas adultas (2-3 meses) sino también en animales envejecidos (18 meses), lo cual aporta al modelo una mayor

relevancia clínica en el contexto de la EP. En este modelo, la inflamación periférica aumentó la muerte de neuronas TH+, así como también la activación microglial en la SNpc (Tarelli, 2013, no publicado).

Algunos datos epidemiológicos remarcan el potencial de los procesos inflamatorios como factores de riesgo para el desarrollo de la EP. Por ejemplo, luego de la pandemia de "gripe española" de 1918, causada por el virus de influenza H1N1, sobrevino la aparición de una epidemia de encefalitis letárgica, una patología inflamatoria del SNC asociada a dicho virus con características similares a la EP y que responde al tratamiento con levodopa (Jang et al., 2009; Ravenholt & Foege, 1982). Además, se estima que las personas nacidas alrededor de 1918 tuvieron el doble o el triple de probabilidad de desarrollar EP que las nacidas antes de 1988 o después de 1924 (Jang et al., 2009). Si bien esta asociación continúa siendo controversial, la observación que el virus de influenza H1N1 es capaz de actuar sinérgicamente con la toxina MPTP para aumentar la degeneración dopaminérgica en un modelo animal (Sadasivan et al., 2017) resalta el rol de las infecciones virales como factores de riesgo para la EP. De hecho, en la actualidad, existen numerosas voces de alerta acerca de las posibles consecuencias neurológicas asociadas a la pandemia de Covid-19 (Faber et al., 2020; Isacson, 2020; Pavel et al., 2020; Sulzer et al., 2020). Será interesante ver si futuros estudios epidemiológicos logran encontrar una correlación entre las infecciones con SARS-CoV-2 y el desarrollo de EP.

Inflamación y envejecimiento

Otro factor que puede exacerbar las respuestas inflamatorias en el SNC es la edad, la cual es, como ya se ha mencionado, el principal factor de riesgo para la EP. De hecho, el envejecimiento está asociado a un estado de inflamación sistémica crónica, el cual es causado en parte por procesos de senescencia celular debida a la edad, pero también está influenciado por factores genéticos, ambientales y otros, relacionados al estilo de vida. La senescencia en las células del sistema inmune induce un fenotipo de mayor producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y otros mediadores inflamatorios (Furman et al., 2019). La microglía de cerebros envejecidos presenta una activación exacerbada y prolongada en respuesta a insultos, además de disminución de su motilidad y de su capacidad fagocítica (Collier et al., 2017; Stephenson et al., 2018). Esta situación conduce a la producción sostenida de ROS, con el consecuente aumento de estrés oxidativo, así como también a la acumulación de proteínas tóxicas y el aumento del reclutamiento de leucocitos periféricos al SNC. La extravasación de células del sistema inmune periférico también está favorecida en cerebros envejecidos debido al debilitamiento de las barreras físicas que mantienen su privilegio inmunológico, como la barrera hematoencefálica y la hematocefalorraquídea (Gorlé et al., 2016).

MODELOS ANIMALES de LRRK2

En los últimos años, un enorme esfuerzo se ha puesto en el desarrollo de modelos biológicos tanto *in vitro* como *in vivo* que permitan ahondar en la relación de LRRK2 y sus mutaciones con el desarrollo de la EP. Los modelos celulares como levaduras o células madre reprogramadas derivadas de pacientes y modelos en invertebrados como *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans* son valiosos para elucidar las funciones celulares de LRRK2 y su interacción con otras moléculas y vías de señalización. A su vez, los modelos animales basados en mamíferos como la rata y el ratón resultan indispensables para estudiar el rol de la inflamación en la EP asociada a LRRK2, por su similitud a la fisiología humana y permitir el estudio de la interacción del sistema inmune periférico con el cerebro.

Modelos de animales transgénicos

Una de las estrategias más usadas para sobre-expresar genes exógenos en un modelo animal es la transgénesis. La Tabla 1.1 resume los modelos animales descritos a continuación. Debido a la gran longitud del gen de LRRK2, la mayor parte de estos modelos se generan por microinyección de cromosomas bacterianos artificiales (BAC) en cigotos de rata o ratón. Estos BAC, que toleran insertos de hasta 200kb, pueden contener la totalidad del *locus* de LRRK2 humano (hLRRK2) o alguna de sus variantes mutantes, incluyendo las regiones reguladoras en *cis*, lo cual permite una sobre-expresión del transgén independiente del sitio de inserción y con una distribución anatómica similar a la del humano (Yang, 2009).

No obstante, la mayoría de los modelos animales transgénicos que sobreexpresan hLRRK2 o sus mutantes no logran recapitular las principales características patofisiológicas de la EP. Un modelo de ratas transgénicas sobre-expresando hLRRK2 G2019S empleando un BAC no presentó neurodegeneración en la SNpc ni fallos en el sistema dopaminérgico medido por PET en animales de hasta 12 meses de edad. Sin embargo, comparadas con controles no transgénicos, estas ratas sí presentaron leves efectos motores que no respondieron al tratamiento con L-DOPA (Walker et al., 2014). En concordancia, otro grupo también reportó que ratas sobre-expresando hLRRK2 G2019S mostraron disminución en la memoria a corto plazo, defectos motores y alteraciones en la

señalización dopaminérgica en el estriado, comparadas con animales sobre-expresando hLRRK2 wt o controles no transgénicos (Sloan et al., 2016). En este caso, los síntomas motores fueron revertidos en su totalidad por tratamiento con L-DOPA. Notablemente, estas diferencias sólo fueron evidentes en animales envejecidos (entre 18 y 21 meses de edad), lo cual sugiere un efecto deletéreo crónico de la mutación G2019S. Interesantemente, estos animales no presentaron evidencias de muerte neuronal dopaminérgica ni activación microglial diferencial entre genotipos.

Lee y colaboradores reportaron que ratas portando un BAC con hLRRK2 G2019S no mostraron defectos motores ni neurodegeneración en la SNpc hasta los 12 meses de edad comparadas con controles no transgénicas, pero sí un aumento del estrés oxidativo en el estriado e indicios de alteraciones en la transmisión nigroestriatal (J. W. Lee et al., 2015). A su vez, otro grupo mostró que ratones envejecidos (de 14 meses) sobreexpresando LRRK2 G2019S bajo un promotor quimérico fuerte presentan mayor grado de fisión mitocondrial en células del estriado, así como también microglía con morfología activada y mayores niveles de mRNA de TNF- α y CD68 (marcador de microglía activada), en comparación a los controles no transgénicos (Ho et al., 2018). Nuevamente, los autores no reportaron defectos motores o neurodegeneración en estos animales.

Si bien la sobreexpresión crónica de LRRK2 G2019S puede generar defectos en la transmisión nigro-estriatal o aumento de marcadores de neuroinflamación, estos efectos no parecen ser suficientes, por sí solos, para inducir neurodegeneración, lo cual indica que es posible que se requiera un segundo estímulo para desencadenar el daño neuronal. Esta teoría de "múltiples hits" podría explicar que, como se ha mencionado antes, las mutaciones de LRRK2 tienen alta prevalencia y son la causa más común de EP familiar pero, sin embargo, posee una penetrancia de entre 25 y 40% (Cabezudo et al., 2020). Justamente, eventos inflamatorios periféricos podrían actuar de manera sinérgica con las mutaciones de LRRK2 para inducir efectos deletéreos en el SNC, como se ha observado en otros modelos animales (Pott Godoy et al., 2008).

Interesantemente, un trabajo de Kozina y colaboradores reporta que ratones transgénicos sobre-expresando mutantes de hLRRK2 mediante un BAC no

presentaron neurodegeneración dopaminérgica ni activación microglial aún en animales envejecidos de 2 años de edad. Sin embargo, al tratar estos animales con un estímulo inflamatorio periférico (LPS intraperitoneal), los autores observaron muerte neuronal de las nDA de la SNpc asociada a activación microglial temprana, 24hs después del estímulo y persistente hasta 7 meses después (Kozina et al., 2018). Bajo las mismas condiciones, los animales no transgénicos o sobre-expresando LRRK2 wt no mostraron daño dopaminérgico. Además, los animales con hLRRK2 mutante presentaron exacerbación en la expresión de citoquinas proinflamatorias tanto en el SNC como en la periferia ante el tratamiento con LPS. Debido a la ausencia de la proteína LRRK2 en la microglía de estos animales transgénicos y al hecho de que su expresión no se induce en presencia de LPS, los autores sugieren que esta microglía "mutante" no altera directamente la neuroinflamación sino que se trataría de un efecto desencadenado por el sistema inmune periférico (Kozina et al., 2018).

Apoyando esta idea, Moehle y colaboradores describieron un aumento en el reclutamiento de células mieloides circulantes debido al aumento, dependiente de la actividad quinasa de LRRK2, de su respuesta quimiotáctica en ratones transgénicos BAC hLRRK2 G2019S con respecto a controles BAC hLRRK2 wt o no transgénicos (Moehle et al., 2015). Si bien no se encontraron diferencias en la capacidad de producir citoquinas proinflamatorias en estas células, este aumento de movilidad podría conducir a un mayor reclutamiento de inflamación local. De hecho, en el mismo trabajo, los autores muestran que la inyección de LPS en la SNpc de ratas transgénicas BAC hLRRK2 G2019S induce neuroinflamación y neurodegeneración dopaminérgica significativamente mayores que en animales no transgénicos con el mismo tratamiento.

A pesar de lo expuesto, existen algunas discrepancias en los reportes de animales transgénicos para LRRK2 tratados con estímulos proinflamatorios. En este sentido, un trabajo reciente muestra que ratas sobre-expresando hLRRK2 G2019S que reciben LPS intraperitoneal, al igual que los controles no transgénicos, no presentan neurodegeneración ni síntomas motores hasta 12 meses después del tratamiento (Schildt et al., 2019). Sin embargo, el grupo G2019S tratado con LPS evidenció mayor neuroinflamación, medida por PET, en

la corteza y el mesencéfalo ventral (donde se halla la SNpc) pero no en el estriado hasta 10 meses después del tratamiento.

En base a todos los trabajos mencionados, resulta evidente que existe una gran variabilidad en la respuesta de los modelos animales a la sobreexpresión de hLRRK2 wt o G2019S. Dicha variabilidad podría deberse, en parte, a las diferencias en los niveles de sobreexpresión de hLRRK2 en los distintos modelos, las diferencias en los tiempos de experimentación, el uso de distintas especies o cepas de animales e incluso a las diferentes metodologías experimentales empleadas (por ejemplo para medir los síntomas motores) o a otras variables desconocidas.

En particular, la mayoría de los modelos animales transgénicos por sí solos no presentan muerte neuronal evidente en la SNpc (Kozina et al., 2018; J. W. Lee et al., 2015; Sloan et al., 2016; Walker et al., 2014). Sin embargo, el agregado de un segundo estímulo inflamatorio (como LPS) logra desencadenar la neurodegeneración, principalmente en aquellos animales con hLRRK2 G2019S (Kozina et al., 2018; Moehle et al., 2015; Subramaniam et al., 2017), aunque no en todos los casos (Schildt et al., 2019).

Es interesante destacar que en estos modelos, el estímulo inflamatorio empleado por sí sólo no produce ningún daño (Kozina et al., 2018; Subramaniam et al., 2017) o bien produce un daño menor (Moehle et al., 2015) en las nDA de la SNpc de los animales no transgénicos en comparación con aquellos que sobreexpresan hLRRK2 G2019S. Esto sugiere que las mutaciones de hLRRK2, particularmente G2019S poseen efectos deletéreos en el SNC pero no lo suficiente para generar daño neuronal y síntomas motores. No obstante, dichas mutaciones podrían exacerbar la respuesta a estímulos inflamatorios tanto centrales (Moehle et al., 2015) como periféricos (Kozina et al., 2018; Subramaniam et al., 2017) generando inflamación crónica en el SNC que puede desencadenar procesos neurodegenerativos.

Especie	Modelo (sobre-expresión vs noTg)	Tratamiento	Tiempo análisis post-tratamiento	Neurodegeneración (ND) en TH+	Inflamación	Microgliosis	Síntomas motores	Observaciones	Referencia
Rata	Tg-BAC-G2019S (2x) y control noTg	Genotipo + Edad	Hasta 12 meses	Sin diferencias	s.d.	s.d.	Menor performance en rotarod en tg-G2019S a 6 meses (no sensible a L-DOPA). Sin diferencias en Cilindro y Ledge Beam.	Sin diferencias en la señalización estriatal de DA hasta 12 meses.	Walker et al., 2014
Rata	Tg-BAC-Ypet-LRRK2-hWT(4x), G2019S (12x) o R1441C y control noTg	Genotipo + Edad	Hasta 21 meses	Sin diferencias	s.d.	Sin diferencias	Menor performance en rotarod acelerada en tg (27% hWT y 32% tg-G2019S). Revierte con L-DOPA	LRRK2 colocaliza con TH en los tg. Liberación estriatal de DA alterada en tg-G2019S y tg-R1441C.	Sloan et al., 2016
Rata	Tg-BAC-G2019S (4x) y control noTg.	Genotipo + Edad	Hasta 12 meses	Sin diferencias	Aumento de iNOS en neuronas TH+ en SNpc. Mayor stress oxidativo en tg-G2019S.	Sin diferencias	Sin diferencias	Neuronas TH+ en SNpc con morfología elongada a 12 meses.	J. W. Lee et al., 2015
Ratón	Tg-PDGFB-G2019S y control noTg	Genotipo + Edad	Hasta 14 meses	s.d.	s.d.	Mayor activación microglial en tg-G2019S jóvenes y envejecidos.	s.d.	Neuroinflamación inducida por LPS estaría mediada por LRRK2 y Drp1 (fisión mitocondrial) en microglía tg-G2019S	Ho et al., 2018
Ratón	Tg-BAC-hR1441G o hG2019S, tg-PDGFB-hG2019S(2,7x) y control noTg	Genotipo + Edad (hasta 2 años)	Hasta 24 meses	Sin diferencias	s.d.	Sin diferencias	s.d.		
Ratón	Tg-BAC-hLRRK2wt, tg-BAC-hR1441G, tg-PDGFB-hG2019S (2,7x) y control noTg	Genotipo + LPS i.p. 5mg/kg (2,5x10 ⁶ u/kg dosis única)	Hasta 7 meses	ND progresiva en tg-G2019S y tg-R1441G con LPS desde 24hs (6%) hasta 7 meses (16%).	Aumentan IFN- γ , IL-1 β y IL-10 en SN en tg-R1441G con LPS. Sin infiltrado de monocitos o linfocitos T.	En tg-R1441G con LPS, hasta 7 meses	s.d.	No hay expresión de LRRK2 en microglía. LPS aumenta la expresión de LRRK2 en linfocitos B y neuronas.	Kozina et al., 2018
Rata	Tg-BAC-G2019S LRRK2 y control noTg	Genotipo + LPS en SNpc (2x10 ⁴ u)		ND en tg-G2019S (50%) con LPS mayor que en noTg (35%)	s.d.	Mayor en tg-G2019S que en noTg con LPS.	s.d.		
Ratón	Tg-BAC-FLAG-G2019S y tg-BAC-FLAG-LRRK2wt	Genotipo		s.d.	Mayor quimiotaxis y reclutamiento de macrófagos y neutrófilos en tg-G2019S ante estímulos inflamatorios.	s.d.	s.d.		Moehle et al., 2015
Rata	Tg-BAC-G2019S (2x) y control noTg	Genotipo + LPS i.p. 3mg/kg (1,5x10 ⁶ u/kg dosis única)	Hasta 12 meses	Sin diferencias	Inflamación en corteza y región ventral (pero no en estriado) de tg-G2019S con LPS.	Sin diferencias	Sin diferencias entre genotipos		Schildt et al., 2019

Tabla 1.1. Resumen de modelos animales transgénicos de LRRK2. Abreviaturas: BAC= cromosoma artificial bacteriano; Tg= transgénico; - = sin datos.

Modelos mediados por vectores virales

Otra herramienta posible para lograr la expresión local y más acotada en el tiempo de genes de interés son los vectores virales. Esta estrategia, si bien se aleja más de una situación fisiológica donde la mutación se encuentra en la totalidad de las células del cuerpo, evita posibles efectos compensatorios debido a la sobreexpresión de los transgenes durante el desarrollo de los animales. Además, los vectores virales abren la posibilidad de estudiar el aporte de distintos grupos celulares a la patología según la zona donde se inyecten y permiten regular relativamente la dosis del transgén modificando el número de partículas virales empleadas (Xiong et al., 2017). La Tabla 1.2 resume los modelos animales empleando vectores virales que se mencionan a continuación.

Uno de los vectores virales más utilizados son aquellos derivados de adenovirus humanos de serotipo 5. Algunas ventajas de los adenovectores son su capacidad para transducir células post-mitóticas, incluyendo neuronas (Ali et al., 1994), el hecho de que no se integran en el genoma y su capacidad de ser transportados retrógradamente desde las terminales neuronales hacia el soma (Peltékian et al., 2002). Esto permite que sea posible inyectar los vectores en el cuerpo estriado y obtener expresión de los transgenes en la SN, gracias a que los mismos son transportados a través de los axones de las neuronas dopaminérgicas que conectan ambas regiones (Pott Godoy et al., 2008). De esta manera, se evita dañar la región de interés durante la operación ya que la inyección se realiza en una región alejada de la SN.

Los adenovectores de primera generación carecen del gen E1, responsable de regular la expresión de proteínas virales tempranas y, por lo tanto, son incapaces de replicar sin una complementación exógena de ese gen. Estos vectores carecen además de la región E3, involucrada en la respuesta al sistema inmune del hospedador. Estas deleciones le otorgan a los adenovectores de primera generación vector una capacidad de carga de 8,2Kpb para empaquetar transgenes de interés (Bett et al., 1993). Las sucesivas generaciones de adenovectores incluyen más deleciones además de E1 y E3 que aumentan su capacidad de empaquetamiento, llegando a los vectores *high capacity* o *gutless* que están completamente desprovistos de cualquier gen viral (necesitan de un

virus o plásmido *helper* que los exprese para replicar) y pueden cargar hasta 37Kpb.

Debido al gran tamaño del gen de LRRK2 y a las limitaciones en la capacidad de empaquetamiento de los distintos vectores virales, hasta la fecha solamente se han reportado y caracterizado 4 modelos animales basados en vectores virales de LRRK2.

El primer modelo publicado de expresión de hLRRK2 mediada por vectores virales utiliza amplicones del virus *Herpes simplex* para transducir los transgenes en la SNpc de ratones adultos C57BL. Para ello, el virus fue inyectado en el estriado de los animales, ya que al igual que los adenovectores, los vectores basados en el virus del herpes también tienen transporte retrógrado. El resultado fue la expresión de los transgenes en más del 70% de las nDA de la SNpc. Los autores reportaron que la expresión de hLRRK2 wt o GFP en la SNpc durante 21 días no produjo cambios en el número de nDA. Sin embargo, los animales inyectados con el vector expresando hLRRK2 G2019S sufrieron una pérdida del 50% de las nDA, además de un aumento significativo del número de células microgliales en el estriado y la SNpc (B. D. Lee et al., 2010). Notablemente este efecto no ocurrió en animales expresando una variante de hLRRK2 G2019S con una mutación adicional que inhibe la actividad quinasa de la proteína (D1994A). De la misma manera, los efectos deletéreos de hLRRK2 G2019S también fueron prevenidos por el tratamiento con inhibidores farmacológicos de la actividad quinasa hLRRK2.

Poco tiempo después, Dusonchet y colaboradores reportaron la generación de vectores adenovirales de segunda generación expresando LRRK2 wt o G2019S bajo el promotor de sinapsina, específico de neuronas. Los autores inyectaron estos vectores unilateralmente en seis puntos distintos del estriado de ratas Wistar hembra adultas, lo cual resultó en un 30% de transducción en nDA de la SNpc. En este modelo, sólo los animales con hLRRK2 G2019S presentaron neurodegeneración significativa (respecto del hemisferio no inyectado) a partir de 21dpi y llegando a un 20% de muerte a los 42dpi, junto con un aumento de la expresión de proteína tau fosforilada en la SNpc. Ningún grupo experimental

presentó signos de inflamación o activación microglial en la SNpc, ni tampoco aumento en la marcación para α -sinucleína o ubiquitina (Dusonchet et al., 2011).

No obstante, un trabajo posterior empleando los mismos vectores (incluyendo además uno con hLRRK2 G2019S/D1994N sin actividad quinasa) y el mismo diseño experimental obtuvo resultados muy diferentes. En este caso no se observó transporte retrógrado desde el estriado hacia la SNpc pero sí a la corteza. En consecuencia, este modelo no presentó neurodegeneración dopaminérgica ni déficits motores pero sí acumulación de inclusiones positivas para ubiquitina y degeneración de neuritas en el estriado (Tsika et al., 2015).

Recientemente, Nguyen y colaboradores lograron optimizar este mismo modelo usando mayores dosis (hasta $1,5 \times 10^{10}$ pi por sitio de inyección) de adenovectores similares en ratones KO para el gen endógeno de LRRK2. Los autores observaron que una única inyección directa de los vectores en la SNpc induce neurodegeneración dopaminérgica tanto con hLRRK2 wt como con G2019S y G2019S/K1906M (sin actividad quinasa y más estable que G2019S/D1994N) luego de 21 días. Al inyectar los virus en seis zonas del estriado, los autores obtuvieron más de un 40% de pérdida de nDA en la SNpc 42 días después de la inyección, con mínimo daño en los animales tratados con hLRRK2 wt y G2019S/K1906M (Nguyen et al., 2020). Independientemente del transgén expresado, se observó una activación microglial moderada en el estriado, sitio de inyección, y más pronunciada en la *substantia nigra*, por lo cual se trataría de una reacción al vector adenoviral más que a la expresión de LRRK2.

De manera independiente, Kritzinger y colaboradores desarrollaron adenovirus *high capacity* cargando con el cDNA hLRRK2 wt, G2019S o D1994A (sin actividad quinasa) bajo el control de un promotor ubicuo. Al inyectar estos adenovectores en dos puntos del estriado de ratones C57BL/6J jóvenes (9 meses) o envejecidos (19 meses), no observaron cambios en el estado general o la actividad motora de los animales hasta 6 meses (en el caso de los jóvenes) o hasta 3 meses (en el caso de los envejecidos) luego de la inyección (Kritzinger et al., 2018). El análisis histológico de los cerebros de estos animales, demostró que los adenovectores transdujeron oligodendrocitos, astrocitos y neuronas y, en menor medida, microglía en el estriado y que la eficiencia del transporte

retrógrado de los virus fue baja, observando expresión de los transgenes en no más del 10% de las nDA de la SNpc. En el estriado de estos animales hallaron vacuolización y desmielinización de fibras de la sustancia blanca junto con reclutamiento y activación de microglía y astrocitos cerca de la zona de inyección en animales con hLRRK2 G2019S y D1994A. En el caso de los animales envejecidos con hLRRK2 G2019S, esta respuesta inflamatoria fue significativamente mayor y más sostenida en el tiempo y estuvo asociada a muerte neuronal en el estriado.

Por último, existen dos ejemplos de modelos animales empleando adenovectores con hLRRK2 en primates no humanos. En el primero, los autores inyectaron vectores derivados de adenovirus caninos con hLRRK2 wt, G2019S o eGFP en el putamen de lémures ratón (*Microcebus murinus*) adultos. En este sistema, los vectores transdujeron preferencialmente células neuronales (hasta 70% en el putamen) y llegaron hasta la SN y otras regiones cerebrales mediante transporte retrógrado asociado al receptor CAR. Los animales expresando hLRRK2 presentaron defectos motores respecto del grupo eGFP en tres ensayos diferentes a lo largo de 6 meses, siendo más marcados en el grupo G2019S que en el grupo hLRRK2 wt (Mestre-Francés et al., 2018). Sin embargo, ni los animales con hLRRK2 wt ni G2019S presentaron neurodegeneración dopaminérgica significativa respecto del grupo control expresando eGFP.

Más recientemente, di Caudo y colaboradores emplearon los mismos adenovirus caninos en otro primate de mayor tamaño: el macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*). Los autores administraron los vectores alternativamente en el putamen o directamente en la SN. En ninguno de los dos casos observaron muerte neuronal dopaminérgica ni disminución de los niveles de dopamina medida por HPLC, pero sí encontraron neuronas con neuritas distróficas y axones hinchados en los animales inyectados con hLRRK2 G2019S en la SN, respecto del hemisferio no inyectado (di Caudo et al., 2020).

Al igual que ocurre con los modelos animales transgénicos de LRRK2, en los modelos con sobreexpresión de hLRRK2 G2019S mediada por vectores virales existe una gran variabilidad en los resultados obtenidos relacionadas a las diferencias respecto de tipo y dosis del vector, sitio y metodología de inyección,

especies o cepas de animales, edad y duración de los experimentos, entre otros. No obstante, en estos modelos es más frecuente observar muerte neuronal dopaminérgica y síntomas motores similares a los de la EP sin necesidad de un segundo estímulo que en los transgénicos (Dusonchet et al., 2011; B. D. Lee et al., 2010; Mestre-Francés et al., 2018; Nguyen et al., 2020). Este efecto puede deberse a un mayor nivel de expresión de hLRRK2 local, a la falta de adaptación de los animales a la sobreexpresión o bien a estímulos inflamatorios gatillados por la cápside viral.

Con todo, los modelos animales, tanto transgénicos como mediados por vectores virales, parecerían apuntar a un efecto conjunto de la inflamación y las mutaciones en LRRK2 como desencadenantes de la neurodegeneración. Asimismo, los modelos animales también ayudan a explicar por qué dichas mutaciones poseen penetrancia incompleta y, a su vez, cómo los procesos inflamatorios pueden constituir un factor de riesgo adicional para el desarrollo de la EP.

Modelo	Vectores	Sitio de Inyección	Tiempo análisis post tratamiento	Neurodegeneración (ND) en TH+	Síntomas motores	Inflamación	Microgliosis	Astrogliosis	Observaciones	Referencia
Ratón (C57BL adultos)	Herpes Simplex Virus LRRK2, G2019S y G2019S/D1994A	Estriado	Hasta 21dpi	ND en G2019S (50%)	s.d.	s.d.	En SNpc como en estriado con G2019S	s.d.	>70% de transducción de LRRK2 en SNpc	B. D. Lee et al., 2010
Rata (wistar HEMBRAS adultas)	Ad5 2da generación LRRK2 wt o G2019S	Estriado (6 puntos de inyección)	Hasta 42dpi	ND en G2019S (20%)	s.d.	Sólo en estriado, hasta 21dpi.	s.d.	s.d.	Aumenta de fosfo-Tau pero no aumento α -syn ni ubiquitina	Dusonchet et al., 2011
Rata (wistar HEMBRAS adultas)	Ad5 2da generación LRRK2 wt, G2019S o G2019S/D1994N	Estriado (6 puntos de inyección)	Hasta 42dpi	Sin diferencias	Sin diferencias	s.d.	Sin diferencias	No se observa hasta 42dpi	No hay transporte retrógrado a la SNpc, pero sí a corteza. Acumulación de ubiquitina en todas pero más fuerte en G2019S.	Tsika et al., 2015
Ratón (KO para LRRK2, ambos sexos)	Ad5 2da generación LRRK2wt, G2019S, G2019S/K1906M, G2019S/R1398L, G2019S/R1398L/T1343V y G2019S/T1348N	SNpc	Hasta 21dpi	ND con WT o G2019S (30%) y con G2019S/K1906M (20%).	s.d.	s.d.	Mayor en SNpc que en estriado. Sin diferencias entre vectores.	s.d.	Títulos virales muy altos: $1,5 \times 10^{10}$ pv/sitio.	Nguyen et al., 2020
		Estriado (6 puntos de inyección)	Hasta 42dpi	ND con WT o G2019S/K1906M (20%) y con G2019S (>40%)						
Ratón (C57BL/6J, adultos y envejecidos)	HC-Ad-LRRK2_wt/, 2019S, D1994A o eGFP	Estriado	Hasta 360dpi para jóvenes. Hasta 180dpi para envejecidos.	Sin diferencias	Sin diferencias	s.d.	En zona de inyección, en todos los grupos hasta 3 meses. Mayor en G2019S y envejecidos.	Hasta 90dpi, sólo en animales con G2019S.	Baja eficiencia en transporte a SNpc. Vacuolización y desmielinización en fibras de sust. Blanca en estriado.	Kritzinger et al., 2018
Microcebus murinus (primate pequeño, adultos jóvenes)	HD CAV (adenovirus canino, helper dependiente) LRRK2 wt, G2019S, eGFP o veh	Estriado	Hasta 180dpi	ND HD-LRRK2wt y HD-G2019S vs veh	En HD-LRRK2wt y HD-G2019S vs HD-GFP	s.d.	Con HD-G2019S a 15dpi.	s.d.	Estos vectores transducen neuronas preferencialmente.	Mestre-Francés et al., 2018
Macaca fascicularis (primate mediano, adultos)	HD CAV LRRK2 G2019S	Estriado	Hasta 180dpi	Sin diferencias	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	Células con neuritas distróficas y axones hinchados en SNpc con G2019S.	di Caudo et al., 2020
	HD CAV LRRK2 G2019S o GFP	SNpc	Hasta 180dpi	Sin diferencias	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.		

Tabla 1.2. Resumen de modelos animales mediados por vectores virales. Abreviaturas: dpi= días post inyección; p.v.= partículas virales; - = sin datos.

HIPÓTESIS y OBJETIVOS

Hipótesis

En base al conocimiento previo expuesto en la Introducción, trabajamos con la hipótesis que la neuroinflamación juega un papel activo en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson y que las mutaciones en LRRK2, particularmente la G2019S, pueden provocar efectos tóxicos sobre las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta*, especialmente si se combinan con un segundo estímulo. Ya que LRRK2 G2019S puede exacerbar la inflamación, postulamos que este segundo estímulo puede ser inflamatorio. Por este motivo, **hipotetizamos** que la expresión de LRRK2 G2019S en la región de la SNpc de ratas induce disfunción y/o muerte de las nDa y problemas motores junto a la presencia de inflamación inducida por expresión de IL-1 β en la periferia.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la capacidad de LRRK2 G2019S para exacerbar la neuroinflamación e inducir neurodegeneración y síntomas motores en la SNpc en modelos animales.

Objetivos Específicos

- Generar vectores virales como herramientas biológicas para expresar LRRK2 G2019S y LRRK2 salvaje (wt) en el cerebro de ratas.
- Estudiar los efectos de la expresión de LRRK2 G2019S sobre la viabilidad neuronal, el comportamiento motor y la inflamación en:
 - Un modelo de sobre-expresión de LRRK2 G2019S en la SNpc de ratas Wistar adultas y envejecidas junto a inflamación periférica sostenida.
 - Animales transgénicos que expresan hLRRK2 G2019S o hLRRK2 wt junto a inflamación periférica sostenida.

MATERIALES y MÉTODOS

1. Generación de adenovectores LRRK2 wt y G2019S

La estrategia general seguida para producir los adenovectores, implicó la recombinación de un plásmido transbordador conteniendo el inserto con el o los genes de interés con el "brazo derecho" (BD) del genoma viral. El plásmido contiene el terminal invertido repetitivo 3' (3'ITR), que tiene uno de los orígenes de replicación viral, la señal de encapsidación (Ψ) y algunos genes virales (como E1b-55k, pIX e iVa2) que permiten la recombinación homóloga. Por su parte, el BD contiene todos los genes virales, excepto E1 y E3, y el terminal invertido repetitivo 5' (5'ITR). La recombinación homóloga de estas dos fragmentas a través de sus regiones compartidas reconstituye todos los elementos en cis necesarios para la replicación del vector (a excepción de E1). Para lograr esto, se co-transfectaron ambas construcciones en células Hek293a, que trans complementan E1a y permiten la replicación y el empaquetamiento de los vectores. Por último, luego de los controles de calidad correspondientes, se procedió a la expansión y purificación de *stocks* adenovirales.

1.1 Amplificación de plásmidos por Maxiprep

Con el fin de obtener suficiente masa de los plásmidos pEF1-LRRK2_wt, pEF1-LRRK2_GS y pEF1-RedRed para llevar a cabo el armado de los adenovectores, los mismos fueron amplificados mediante la técnica de Maxiprep.

Para la transformación se emplearon alícuotas de 100 μ l de bacterias competentes (*E. coli* cepa DH5 α) conservadas a -80°C, las cuales fueron descongeladas durante 10min en hielo. A cada eppendorf con bacterias se le agregaron 10ng del plásmido correspondiente (en una concentración de al menos 1ng/ μ l para no superar los 10 μ l de volumen). Todas las manipulaciones fueron hechas en condiciones de esterilidad. Se procedió a realizar la transformación mediante shock térmico incubando los tubos 30min en hielo, seguido de 90seg en bloque térmico a 43°C y finalmente en hielo otra vez por 10min. Se agregó 1ml de medio LB sin antibióticos a cada tubo y se los incubó durante al menos 1h a 37°C agitando ocasionalmente, para permitir que las bacterias se recuperen. A continuación, se plaquearon 50 μ l de las bacterias transformadas en una placa de Petri con LB-agar con ampicilina 35 μ g/ml, rastrillando hasta que se hubiera absorbido todo el líquido. Las placas se incubaron boca abajo en estufa a 37°C hasta el día siguiente. De cada placa se picó una colonia bien aislada en un tubo con 3ml de LB con ampicilina y se lo incubó durante 8hs en estufa a 37°C con agitación (250-300rpm). Una vez crecidos los inóculos iniciales, se los amplificó volcando el contenido de los tubos en sendos erlenmeyers con 200ml de LB con ampicilina, los cuales fueron incubados a 37°C en agitación durante 16hs o hasta obtener una densidad de 3-4*10⁹ cel/ml. Por último, el cultivo bacteriano se trasvasó a mamaderas de 250ml y se precipitó centrifugando a 5000xg a 4°C durante 10min en una centrifuga Sorvall Lynx 4000 (Thermo Scientific). El sobrenadante obtenido fue descartado y el *pellet* bacteriano se guardó a -80°C hasta su uso.

La purificación del ADN plasmídico a partir del *pellet* de bacterias se llevó a cabo usando el kit GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit de Sigma-Aldrich,

siguiendo las indicaciones del fabricante. Los plásmidos fueron cuantificados en Nanodrop 2000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.), alicuotados y conservados a -20°C hasta su uso.

1.2 Cultivo celular

La línea celular Hek293 (ATCC® CRL-1573™) derivada de riñón embrionario fue empleada para la replicación de los adenovectores de primera generación ya que transcomplementa la proteína E1a, necesaria para la replicación viral, gracias a una inserción en el cromosoma 19 de alrededor de 4300pb correspondiente al brazo izquierdo del genoma del adenovirus de serotipo 5. Por otro lado, las células HeLa (ATCC® CCL-2™) derivadas de adenocarcinoma de cervix humano fueron usadas para ensayos de transducción viral ya que no permiten la replicación de los adenovectores. Ambos cultivos fueron mantenidos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% SFB, glutamina (2mM) y penicilina (100 unidades/ml). Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂ - 95% aire y el medio de cultivo fue renovado 3 veces por semana. Para llevar a cabo los experimentos, las células se tripsinizaron (tripsina 0,5mg/ml- EDTA 0,5mM), se diluyeron en DMEM con 10% SFB y se re-plaquearon en placas de de 10mm, 15mm o multi-pocillo, según corresponda.

1.3 Transfección de células Hek293

La transfección de las células Hek293 se realizó empleando el reactivo de transfección *TransIT®-293* (Mirus Bio #MIR 2700) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, para la transfección de muestras destinadas a ICF, las células fueron crecidas sobre cubreobjetos de vidrio de 10mm de diámetro previamente tratados con poli-lisina (Sigma-Aldrich P1399) para asegurar la adherencia al sustrato. Cuando el cultivo hubo alcanzado un 70-80% de confluencia, las células fueron transfectadas adicionándoles una solución con 0,5µg de ADN y 1,5µl de *TransIT®-293* en 50µl finales de opti-MEM (Gibco #31985062) sin suero. En el caso de la co-transfección para el ensamblado de nuevos adenovectores, las células Hek293 fueron crecidas en placas de 6 pocillos y transfectadas con 0,8µg de BD del adenovirus purificado, 1,6µg del plásmido correspondiente linealizado y 7,2µl de *TransIT®-293* (relación 1:2:9) en 250µl finales de medio opti-MEM sin suero.

1.4 Inmuncitofluorescencia para LRRK2

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio de 10mm de diámetro, previamente esterilizados en estufa y dispuestos en cajas de 24 pocillos. Para asegurar la adhesión de las células al sustrato, los vidrios se incubaron con una gota de 100ul de poli-lisina 10µg/ml en agua apirógena, en estufa a 37°C durante 30min y finalmente enjuagados 2 veces con PBS. Luego de los transfectar o transducir las células, éstas se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con PFA 4% en PB 0,1M (10min a TA) y se lavaron 3 veces con PBS (5min a TA). Las células se bloquearon con suero normal de burro (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) en PBST (2hs a TA). Luego, se incubaron con el anticuerpo primario anti-LRRK2 hecho en ratón (UC Davis/NIH Neuromab Facility, clon N241A/34) diluido 1:500 en la misma solución de bloqueo (ON a 4°C). Al día siguiente, las células se lavaron 2 veces con PBST (5min a TA), 2

veces más con PB 0,1M (5min a TA) y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón, acoplado a CyTM5 y hecho en burro, disuelto 1:1000 en PB 0,1M (2hs a TA en oscuridad). Terminada esta incubación, los vidrios se incubaron con 1µg/ml de Hoechst (Bisbenzimidaz H33258, Sigma) en PB 0,1M (5min a TA en oscuridad) y, finalmente, se lavaron 2 veces con PB 0,1M (5min a TA) y se montaron boca abajo en un portaobjetos con Mowiol® 4-88 (Calbiochem, San Diego, CA) como medio de montaje. La periferia de los vidrios se selló con esmalte para uñas para evitar que las muestras se sequen. En todos los casos se realizaron controles negativos, empleando el protocolo descrito, pero sin anticuerpo primario, para descartar unión inespecífica del anticuerpo secundario. Todos los preparados se almacenaron en oscuridad a TA hasta su análisis.

1.5 Extracción de ADN viral

El ADN viral se extrajo utilizando un protocolo basado en el método de HIRT (Hirt, 1967) a partir de un stock viral concentrado o bien a partir de un *pellet* de células Hek293 infectadas con el adenovector. En caso de partir de un stock viral, a una alícuota de 25µl del virus se llevó a 400µl finales con PBS y se le agregaron 30µl de SDS 20%, 20µl de EDTA 0.5M y 5µl de proteinasa K 20mg/ml. La solución resultante se invirtió suavemente y se incubó 1h a 55°C, con el objetivo de lisar los adenovectores. A continuación, se agregaron 100µl de NaCl 5M, se invirtió suavemente, y se colocaron 400µl de una mezcla en partes iguales de fenol/cloroformo. Luego de mezclar suavemente, se agregó 1ml de etanol 100% y se incubó 30 minutos a -20°C. Luego de centrifugar 30 minutos a 13000 rpm, se precipitó el ADN viral, el precipitado se lavó con etanol 70% y se dejó secar. Finalmente, se lo resuspendió en 50µl de agua apirógena estéril.

En el caso de extraer ADN viral a partir de un *pellet* de células, se siguió un protocolo similar, con algunas modificaciones. Las células fueron resuspendidas en 400µl finales de PBS y se las trató la misma solución de lisis con el agregado de 1µl de RNasa A (marca, concentración). La lisis celular se realizó a 55°C durante 2hs y luego del agregado de NaCl 5M, los tubos se incubaron a -20°C durante 30min y se centrifugaron 45min a 13000rpm a 4°C con el fin de precipitar el ADN celular, de mayor tamaño que el del virus. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo y se continuó con la extracción en fenol/cloroformo como ya se describió previamente.

1.6 Purificación del Brazo Derecho del adenovirus

El brazo derecho (BD) del adenovirus, que contiene los genes de replicación viral y el terminal invertido repetitivo 3', se obtuvo por digestión enzimática del genoma de Ad βgal purificado a partir de un stock viral (Fig. 2.1). Brevemente, 5µg de ADN viral fueron tratados con 1µl de ClaI 5U/µl y 5µl de buffer CutSmart® (New England Biolabs, Ipswich, MA) a 37°C durante 3hs para asegurar la digestión total del ADN. El ADN así cortado fue corrido en un gel de agarosa 0,8% con 0,5mg/ml de BrEt (Invitrogen #15585011) para separar la banda correspondiente a BD (26,8Kpb) y poder cortarla y purificarla.

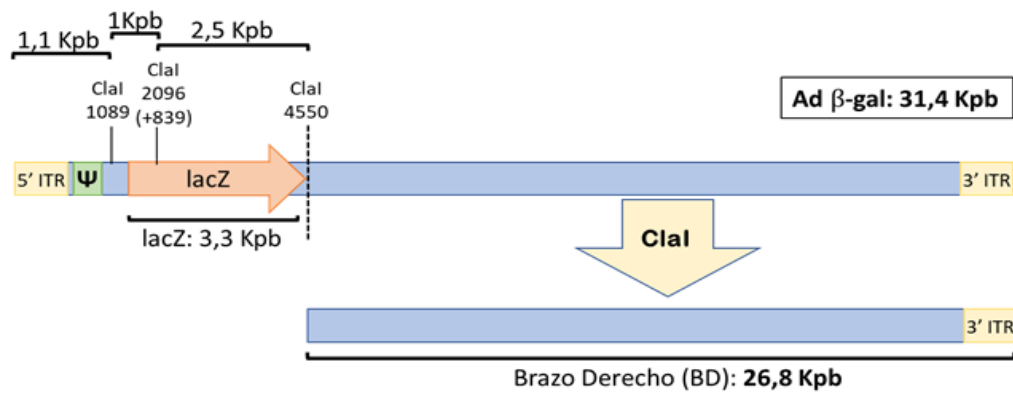


Figura 2.1. Esquema simplificado del genoma del adenovector que expresa la proteína β -galactosidasa (Ad β -gal). Se muestra la posición relativa de algunas regiones como los terminales invertidos repetitivos (5' y 3' ITR) que incluyen los orígenes de replicación viral, el dominio de empaquetamiento (Ψ) y el gen de β -galactosidasa (*lacZ*). Se señalan también los sitios de corte para la enzima *ClaI* junto a su posición en el genoma viral y la liberación de un fragmento de 26,8Kpb nombrada Brazo Derecho (BD).

1.7 Armado del adenovector: co-transfección

El método de obtención de vectores adenovirales elegido se basa en la recombinación de un vector plasmídico conteniendo el gen de interés con el BD del genoma viral, a través de regiones homólogas en células empaquetadoras Hek293. Los plásmidos pAdXP-pEF1-LRRK2_wt, pAdXP-pEF1-LRRK2_G2019S (abreviados pEF1-LRRK2_wt y pEF1-LRRK2_GS, respectivamente) llevan el cDNA codificante para la proteína LRRK2 humana wt o mutada en G2019S, respectivamente, bajo el promotor del factor de elongación de la traducción eucariota 1 α (EF-1 α). Por su parte, el plásmido pAdXP-pEF1-DsRed-IRES - dTomato (abreviado pEF1-RedRed) contiene los genes de dos proteínas rojas fluorescentes (DsRed y dTomato) bajo el mismo promotor separados por una región IRES y fue usado para generar el adenovector control. Los tres plásmidos poseen el terminal invertido repetitivo 5', el dominio de empaquetamiento (Ψ) y algunas regiones del genoma viral que permiten la recombinación homóloga con el BD. Todos ellos fueron previamente generados en nuestro laboratorio y amplificados mediante maxiprep para obtener masa suficiente para los ensayos de generación de adenovectores. Previo a la transfección, los plásmidos fueron linealizados por digestión con enzimas de restricción de corte único: *FspI* en el caso de pEF1-LRRK2_wt y pEF1-LRRK2_GS y *AseI* en el caso de pEF1-RedRed (Fig. 2.2).

Las células Hek293 se crecieron en una placa multipocillo de 6 y al llegar a una confluencia del 70%, se las transfeció con uno de los plásmidos lineales y el BD (en relación 2:1) usando TransIT-293® en medio con bajo SFB (5%). Las células fueron mantenidas en dicho medio y repicadas normalmente a medida que llegaron a confluencia y respetando el porcentaje bajo de suero a fin de retrasar el crecimiento del cultivo.

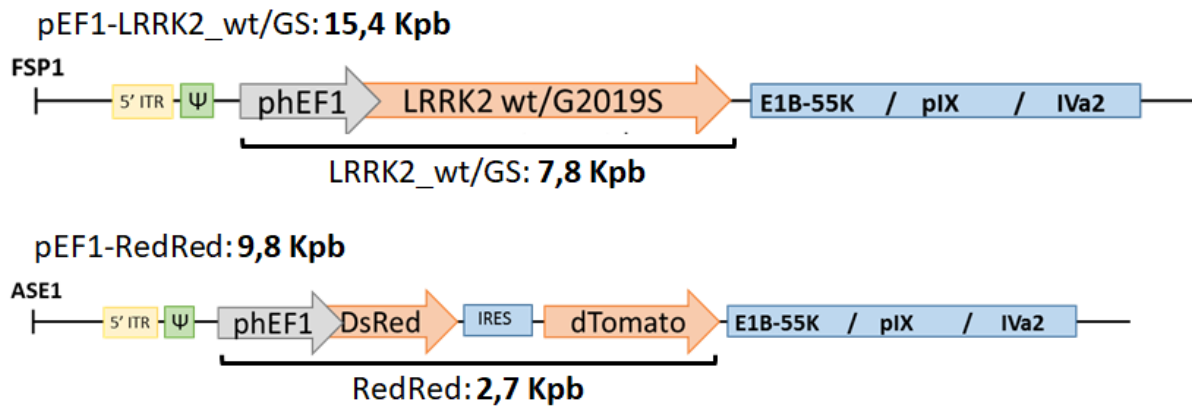


Figura 2.2. Esquemas simplificados de los plásmidos de expresión pAdXP-pEF1 - LRRK2_wt/G2019S (abreviados pEF1-LRRK2_wt/GS) y pAdXP-pEF1- DsRed-IRES-dTomato (abreviado pEF1-RedRed) linealizados con FspI y AseI, respectivamente. Se muestra la posición relativa de algunos elementos importantes: el terminal invertido repetitivo 5' (5' ITR); el dominio de empaquetamiento (Ψ); el ADNc de LRRK2 humano o bien la región codificante para el tándem de proteínas rojas fluorescentes DsRed y dTomato separadas por una región IRES; y las secuencias correspondientes a los genes virales E1B-55K, pIX y IVa2.

Luego de 9-11 días en cultivo, se comenzó a apreciar la aparición de morfologías celulares concordantes con efecto citopático (ver Resultados Fig. 3.1.3). A partir de ese momento, no se realizaron nuevos pasajes y se monitoreó de cerca la evolución del cultivo. Cuando presentó efecto citopático generalizado (pero antes de que se despreque la mayoría de las células), las células y el medio fueron cosechados mecánicamente con ayuda de un scrapper y almacenados a -80°C hasta su uso. Estas muestras representan una "semilla cruda no clonal" del adenovector ya que pueden contener versiones distintas del virus, provenientes de eventos de recombinación independientes e incluso estar contaminada con Ad β gal si la purificación del BD no hubiese sido correcta. Por este motivo el siguiente paso fue obtener poblaciones clonales aisladas de los vectores, para luego poder someter cada una a los controles de calidad adecuados (Fig. 2.3).

1.8 Selección Clonal

Para la selección clonal, los tubos con las cosechas de adenovirus fueron sometidos a tres ciclos rápidos de descongelación/congelación en baño térmico a 37°C y N_2 líquido. Este proceso lisa las células y permite liberar al medio a los viriones que allí se encontraban. Se infectaron células Hek293a con diluciones seriadas de este lisado celular conteniendo los vectores libres en DMEM 2% SFB durante una hora a 37°C , se extrajo el medio con virus y se lo reemplazó finalmente por DMEM 2% SFB y 1% agarosa de bajo punto de fusión (BPF). Este medio limita la difusión de las nuevas partículas virales liberadas permitiendo la aparición de parches aislados de efecto citopático, correspondientes a poblaciones clonales del vector. Estas colonias fueron picadas con ayuda de un tip de p1000 a modo de sacabocado y el taco de agar resultante se almacenó en un eppendorf con DMEM 2% SFB a -80°C hasta su uso. Estas nuevas semillas del vector fueron sometidas a una ronda más de clonado, siguiendo el mismo procedimiento, para asegurar su pureza.

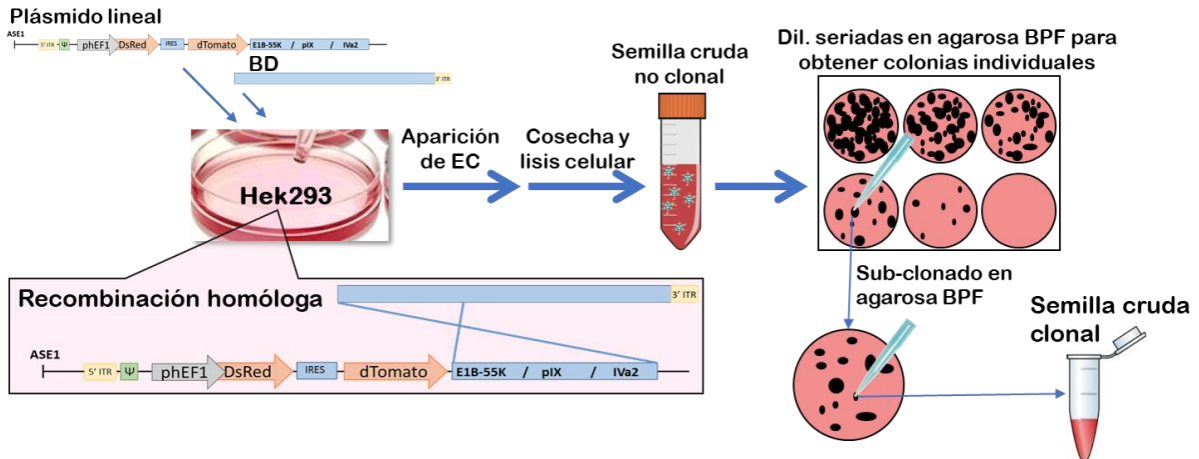


Figura 2.3. Diagrama de recombinación y selección clonal de adenovectores. Se co-transfectaron el BD del adenovirus y el plásmido linealizado con el gen de interés en células Hek293a. Cuando se observó la presencia de efecto citopático (EC), que indica que la recombinación fue exitosa y se están produciendo adenovirus, se cosecharon y lisaron las células con tres ciclos de congelado y descongelado para obtener una "semilla cruda no clonal". La selección clonal se realizó infectando células Hek293a con diluciones seriadas de dicha semilla en medio de cultivo con agarosa de bajo punto de fusión (BPF) y picando las colonias de EC resultantes. Este procedimiento se repitió una vez más para obtener semillas crudas de clones adenovirales.

1.9 Ensayo de X-gal

Para evaluar la presencia de contaminaciones con partículas remanentes de Ad β -gal en los adenovirales, se empleó la tinción con X-gal (Fig. 2.4). Brevemente, esta técnica colorimétrica se basa en la degradación del reactivo X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D- galactopiranosido) por parte de la enzima β -galactosidasa, codificada por el gen lacZ del Ad β gal, cuyo producto es oxidado, dando lugar a un compuesto azul insoluble. Esta prueba fue realizada sobre los mismos cultivos en los que se llevó a cabo la selección clonal, agregando 500 μ l de la solución de X-gal (1,3mM MgCl₂, 3mM K₃Fe[CN]₆, 3mM K₄Fe[CN]₆ y 1mg/ml X-Gal en PBS) directamente sobre el medio con agarosa y dejando incubar durante 24hs a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se observó el cultivo al microscopio invertido y se identificaron los eventos de colonias con coloración azul compatible con actividad de β -galactosidasa.

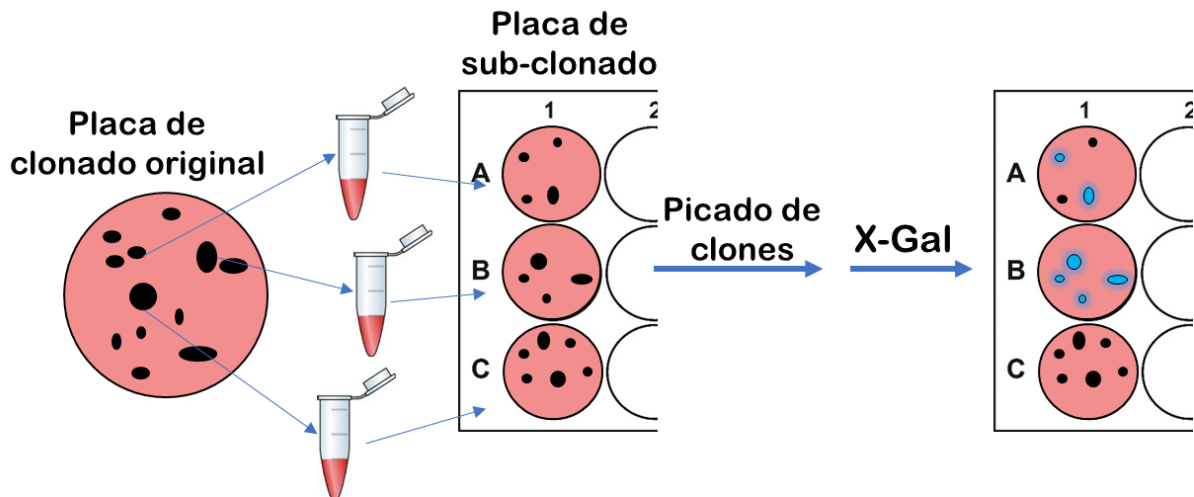


Figura 2.4. Esquema del ensayo de X-gal. Luego de picar los clones, se evaluó la presencia de contaminación con Ad β gal mediante el ensayo de X-Gal sobre las mismas placas con agar BPF. Los clones que resultaron positivos (azules), se descartaron *a posteriori*.

1.10 PCR para detectar fragmento de LRRK2 en los clones

La presencia de un fragmento del cDNA de LRRK2 conteniendo la región de la mutación G2019S en los clones se valua utilizando el ADN viral extraído por la técnica de Hirt como templado de una PCR a punto final con los primers LRRK_cDNA_F/R (ver Tabla 2.4). Para ello se usaron 2 μ l de ADN (aproximadamente 50ng) en 23 μ l de Master Mix (ver Tabla 2.1) y se amplificaron en un termociclador (MJ Research, modelo PCT-200) usando el programa que figura en la Tabla 2.1. Se incluyeron tubos con ADN de Ad β -gal de Ad RedRed como controles negativos y otros con 2ng de los plásmidos pEF1-LRRK2_wt/GS como controles positivos.

Master Mix	1X	[Final]	Programa		
			Temperatura	Duración	Repeticiones
Agua	16.75 μ l	-			
Buffer PCR 10X sin Mg ²⁺	2.5 μ l	1X	95°C	2 min	x1
MgCl ₂ (50mM)	1.5 μ l	3mM	95°C	30 seg	x31
dNTPS (10mM)	0.75 μ l	300 μ M	60°C	45 seg	
primer F 10 μ M	0.5 μ l	0.2 μ M	72°C	1 min	
primer R 10 μ M	0.5 μ l	0.2 μ M	72°C	10 min	x1
Taq (5U/ μ l)	0.5 μ l	0,025U/ μ l	8°C	-	-
Volúmen Final	23μl				

Tabla 2.1. Protocolo de PCR LRRK2. Detalle de composición de las Master Mix y el programa de amplificación usados para detectar la región de la mutación G2019S de LRRK2 en los clones de adenovectores.

Para revelar el resultado de la PCR, se sembraron 10 μ l de cada tubo con 2 μ l de buffer de siembra (30% glicerol en PBS con Orange G) en un gel de agarosa 1% con 0,5mg/ml de BrEt, se corrieron a 70V durante 1h y se revelaron bajo luz UV.

1.11 Secuenciación de productos de PCR

Se seleccionaron dos clones de Ad LRRK2_GS y dos de Ad LRRK2_wt que dieron positivos para la presencia del cDNA de hLRRK2 en su genoma y se secuenciaron para verificar la presencia y ausencia de la mutación G2019S, respectivamente. Para ello, el producto de PCR de la región de la mutación fue precipitado agregando 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M, 2 volúmenes de etanol puro y 50 μ g/ml de glicógeno. Luego de incubar ON a -20°C, se precipitó el

ADN centrifugando los tubos a 14000rpm a 4°C durante 30min. Se descartó el sobrenadante y, una vez seco, el pellet de ADN se resuspendió en 15µl de agua apirógena. La concentración de ADN se midió por nanodrop corriendo diluciones seriadas en gel de agarosa y usando como patrón el marker de peso molecular. Finalmente se envió 1µg de cada muestra para secuenciar en el Servicio de Secuenciación de la Fundación Instituto Leloir.

1.12 Producción de Stock Adenoviral

Con el objetivo de generar stocks homogéneos de adenovectores en cantidad suficiente para realizar los ensayos *in vivo*, se procedió a la amplificación y purificación de los adenovirus a partir de una alícuota existente de Ad LRRK2_G2019S, Ad RedRed, Ad βgal o Ad IL-1β.

En primer lugar, se infectó una placa de 10 cm de diámetro (p100) con una alícuota del virus, con el objetivo de generar una "semilla" para realizar luego la infección a gran escala. Esta "semilla" se obtuvo infectando las células Hek293 de la placa, en un 80% de confluencia aproximadamente, con una multiplicidad de infección (MOI, multiplicity of infection) de 1000. La alícuota del adenovector se diluyó en medio DMEM alta glucosa y 2% de SFB (Internegocios), se colocaron 2 ml en la placa y se la incubó a 37°C durante 2 hs con agitación cada 20 minutos. A continuación, se cambió el medio por 10ml de DMEM alta glucosa con 10% de SFB y se incubó hasta observar efecto citopático. El efecto citopático se manifiesta como células redondeadas y refringentes, que a medida que avanza van formando una red. En ese momento, se levantaron las células por pipeteo y se realizaron tres ciclos de congelado en nitrógeno líquido y descongelado en baño a 37°C, con el objetivo de lisar las células y liberar los virus. A continuación, se centrifugaron las células a 4000 rpm por 10 minutos, con el objetivo de eliminar los restos celulares, y obtener en el sobrenadante la "semilla" del virus.

Por otro lado, se expandieron células Hek293 hasta obtener 30 placas de 15 cm de diámetro (p150). El sobrenadante de la semilla se diluyó en 220 ml de DMEM alta glucosa con 2% de SFB. Luego, se agregaron 7 ml de la semilla diluida en el medio a cada una de las p150, donde las células se encontraban en un 80% de confluencia aproximadamente. De modo similar a lo descrito anteriormente para la "semilla", las células se incubaron a 37°C durante 2 hs con agitación cada 20 minutos y luego se cambió el medio por DMEM alta glucosa con 10% de SFB. Nuevamente se esperó a observar el efecto citopático, se recogieron las células y tras la lisis de las mismas, con tres ciclos de congelado/descongelado y precipitando el debris celular por centrifugación se obtuvo el virus.

A continuación, se realizó la purificación de los adenovectores mediante dos gradientes de cloruro de cesio y una cromatografía en columna de Sephadex. Se prepararon cuatro tubos de Polyallomer (para cada stock) con 2,5ml de cloruro de cesio con densidad 1,6g/ml en la parte inferior y 2,5ml de densidad 1,3g/ml en la parte superior. El virus (que se encontraba en el sobrenadante luego de lisar y precipitar las células) se colocó sobre el cloruro de cesio (un máximo de 6 ml), y se ultracentrifugó a 35000xg por 90 minutos a 20°C. Al terminar la centrifugación se observan dos bandas en el gradiente. La banda superior corresponde a las cápsidas vacías y la inferior al virus completo. La banda inferior se extrajo empleando una aguja hipodérmica y jeringa estéril. Esta banda se colocó en un tubo sobre 5ml de una solución de cloruro de cesio de densidad 1,34g/ml.

Nuevamente, se ultracentrifugó a 35000xg a 20°C, esta vez durante 18hs. La banda resultante, con el virus, se extrajo con aguja hipodérmica y jeringa estéril y se la pasó por una columna de Sephadex G25 PD-10, previamente estabilizada con 30ml de Tris 10mM (pH 7,8), MgCl₂ 1mM y glicerol 10%. El eluido de esta columna se recolectó en 12 fracciones de 500µl dentro de tubos con glicerol. Cada una de estas alícuotas fueron inactivadas incubándolas durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de SDS 0,5% y Tris-HCl 0,02M (pH 7,5). El número de partículas totales se cuantificó mediante densidad óptica a 260nm (ver Titulación de los adenovectores) y se seleccionó las fracciones con mayor valor de absorbancia para ser alicuotada y congelada a -80°C hasta su uso.

1.13 Titulación de los adenovectores

Se cuantificó el número de partículas totales midiendo densidad óptica a 260nm. Una OD₂₆₀=1 corresponde a un título de 1,1x10¹² partículas totales/ml. También se determinó la relación de la absorbancia a 260nm y 280nm, que permite evaluar la pureza de la preparación.

El título de partículas infectivas se determinó usando el método de dosis infectiva 50 (TCID₅₀, del inglés 50% tissue culture infective dose) en células Hek293. Se sembraron 10⁴ células por pocillo en placa multipocillo de 96, en medio DMEM alta glucosa con 2% de SFB y Hepes 50mM. Al día siguiente se llevó a cabo la infección. Se prepararon diluciones seriadas al décimo del virus en el medio de siembra. La infección con cada dilución se realizó por sextuplicado, correspondiendo una fila de seis pocillos a cada dilución, desde 1x10⁻⁸ hasta 1x10⁻¹⁴. Se retiró el medio de la placa y se colocaron 100ml de la dilución correspondiente por pocillo. A una fila de seis pocillos se le colocó medio DMEM alta glucosa con 4% de SFB, sin virus, como control de viabilidad. Este esquema se hizo por duplicado para cada virus, en dos multipocillos de 96 diferentes. Las células fueron incubadas a 37°C por 10 días. Luego de ese tiempo, se cuantificó bajo microscopio el número de pocillos con efecto citopático para cada dilución. El título, expresado en partículas infectivas/ml, se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\mathbf{TCID}_{50} = a \log(d + 0,5 + \frac{6+n}{6})$$

Donde "d" es el orden de la última dilución donde todos los pocillos tienen efecto citopático y "n" es el número de pocillos con efecto citopático en la siguiente dilución.

1.14 Bando de restricción

El ADN viral obtenido de los stocks de Ad LRRK2_GS y Ad RedRed fueron cortados con enzimas de restricción para comparar su patrón con el de Ad β-gal. Para ello, se incubó en sendos tubos 1µg de ADN con 4 unidades de las enzimas HindIII, BglII o EcoRV (New England Biolabs) en el buffer recomendado por el fabricante, en un volumen final de 15µl, durante 2hs a 37°C. En todos los casos se incluyeron tubos con ADN y el buffer correspondiente pero sin enzima como controles sin digerir. Los fragmentos de ADN resultantes de la digestión se separaron en un gel de agarosa 0,8% con 0,5mg/ml de BrEt corrido a 50V durante

2,5hs. La imagen del patrón de restricción se obtuvo en un transiluminador UV con cámara (UltraViolet Products).

2. Estimación del título de adenovectores *high capacity*

Los adenovectores de tercera generación o *high capacity* empleados en los Capítulos 2 y 4 de Resultados (Kritzinger et al., 2018) fueron obtenidos mediante colaboración con el grupo del Dr. Stefan Kochanek de la Universidad de Ulm en Alemania. Luego de la llegada de dichos vectores al laboratorio, se realizó una estimación del título de partículas virales infectivas para controlar que las condiciones del traslado no hubiesen afectado la calidad de las mismas. Para ello, se transdujeron células Hek293 con distintas diluciones de los stocks virales de HC-Ad-LRRK2_G2019S y HC-Ad-eGFP (los cuales son incapaces de replicar sin un virus *helper*). Luego de 48hs, se contabilizó el número de células expresando proteína verde fluorescente (acGFP en el caso de HC-Ad-LRRK2_G2019S y eGFP en el caso de HC-Ad-eGFP) al microscopio (Figura 2.5.A). En base a esos resultados, se graficó el porcentaje de células transducidas en función de la multiplicidad de infección teórica, calculada en base al título original de los vectores (Figura 2.5.B). A partir de la región lineal de la curva se estimó el título de los adenovectores suponiendo que en ese rango cada célula fue transducida por un único virión (Tabla 2.2).

Vector	Título original	Título estimado
HC-Ad-LRRK2_G2019S	2×10^7 pi/ μ l	$4,3 \times 10^6$ pi/ μ l
HC-Ad-eGFP	2×10^7 pi/ μ l	$2,0 \times 10^6$ pi/ μ l

Tabla 2.2. Título del stock viral de HC-Ads original y título real estimado luego del traslado a la Argentina.

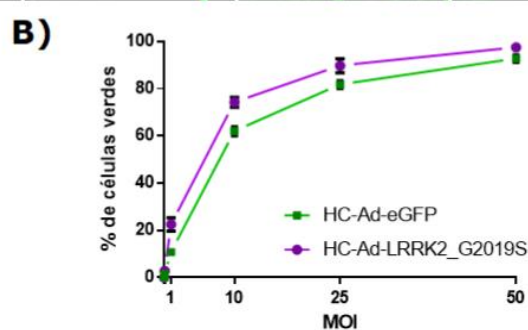
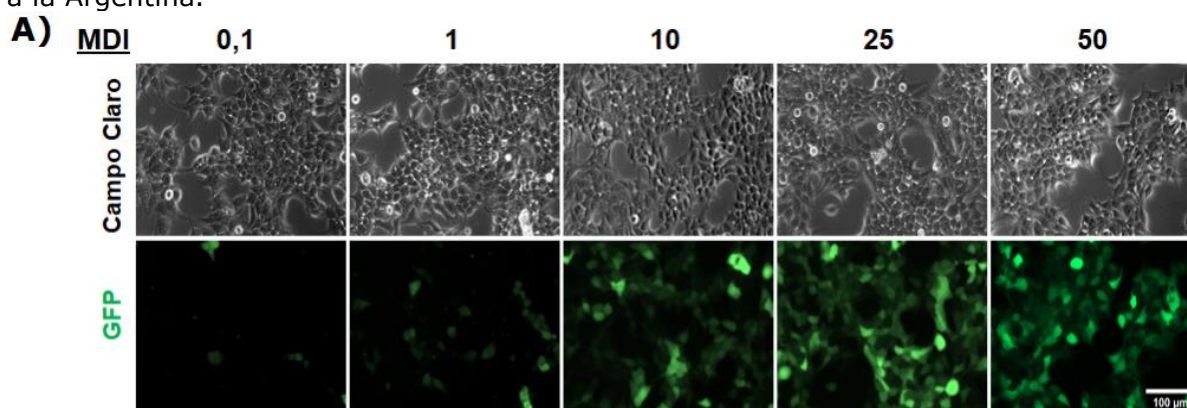


Figura 2.5. Titulación de los HC-Ads. A. Imágenes representativas de la titulación de HC-Ad-LRRK2_G2019S con multiplicidad de infección (MDI) de 0,1 a 50 pi por célula (en base al título original). Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio Zeiss Axio Observer 3. Barra de escala: 100µm. **B.** Cuantificación manual del porcentaje de células verdes respecto del total para HC-Ad-LRRK2_G2019S y HC-Ad-eGFP. Se observa un crecimiento inicial lineal del porcentaje de células transducidas con la concentración del cual se calculó el nuevo título.

3. Procedimientos con Animales de Laboratorio

3.1 Animales

Para los experimentos de los Capítulos 2 y 4 de Resultados se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar de 8-12 semanas (Capítulo 2) o 13-14 meses (Capítulo 4) de edad, respectivamente. La colonia original de estos animales fue obtenida de Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA y posteriormente mantenida durante varias generaciones en el Bioterio de la Fundación Instituto Leloir.

En el Capítulo 3 de Resultados se emplearon ratas macho adultas (8-12 semanas) con trasfondo Sprague Dawley portando un genoma artificial bacteriano con el locus completo de hLRRK2 wt o G2019S (Sloan et al. 2016). Estos animales transgénicos fueron obtenidos gracias a una colaboración con el laboratorio del Dr. Richard Wade-Martins del Departamento de Fisiología, Anatomía y Genética de la Universidad de Oxford en el Reino Unido. En el bioterio de la Fundación Instituto Leloir, ambas colonias se mantuvieron en hemicigosis cruzando machos transgénicos (ver Genotipificación de ratas transgénicas) con hembras Sprague Dawley no transgénicas adquiridas en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (noTg FVet).

3.2 Mantenimiento

Todos los animales se mantuvieron en el bioterio a una temperatura constante de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, bajo un ciclo de luz:oscuridad de 12:12hs, y con comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo el reglamento del *National Institute of Health* (NIH) de Estados Unidos y el reglamento interno de la Fundación Instituto Leloir, con la aprobación de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Leloir (CICUAL - FIL).

3.3 Procedimientos generales

Independientemente de los tratamientos y las cepas de ratas empleadas en las distintas partes de esta tesis, los distintos ensayos con animales siguieron un procedimiento similar (Fig. 2.6), salvo que se aclare lo contrario. En el día 0, los diferentes adenovectores fueron inyectados en distintas zonas del cerebro de los animales mediante cirugía estereotáxica. Tres semanas después de la inyección central, en el día 21, los mismos animales fueron inyectados en forma endovenosa, vía la vena de la cola, con Ad IL-1 α o Ad β -gal como estímulo inflamatorio periférico o control, respectivamente. Previo a dicha inyección, se realizó un frotis de sangre periférica basal, el cual fue comparado con un segundo frotis, realizado 5 días después de la inyección intravenosa, para verificar la inducción de inflamación

periférica. Durante la semana entre el día 28 y el 35 se realizaron todos los tests motores y comportamentales cuando correspondiera y, finalmente, en el día 35 se procedió al sacrificio de los animales. Los individuos destinados a análisis histológicos fueron sacrificados mediante perfusión intracardiaca con PFA 4% mientras que aquellos empleados para obtención de ARN y proteínas fueron sacrificados mediante decapitación, luego de realizar la punción cardíaca.

Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Fundación Instituto Leloir.

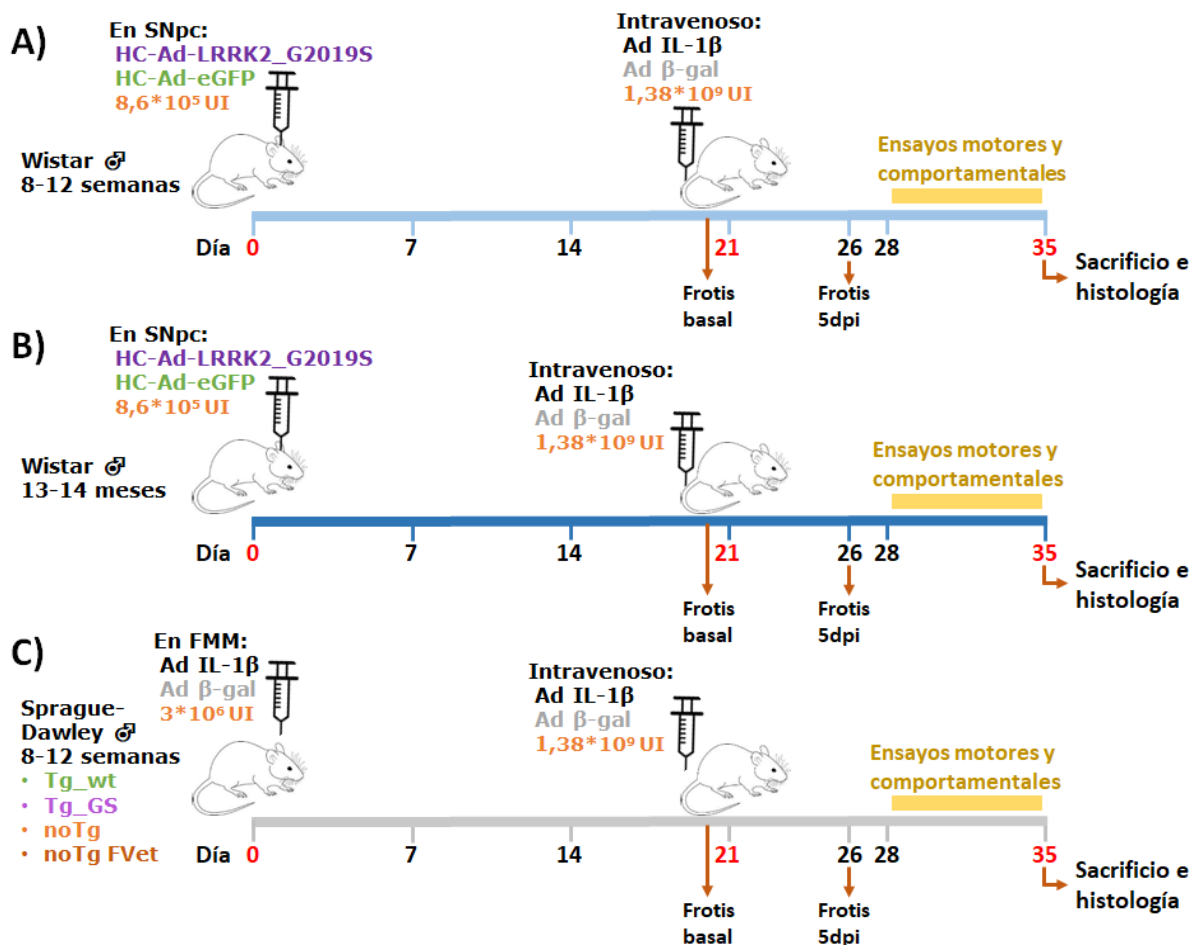


Figura 2.6. Procedimientos Generales con Animales. Día 0: cirugía estereotáxica e inyección central. Día 21: Frotis basal de sangre periférica e inyección intravenosa. Día 26: frotis de sangre periférica para constatar inducción de inflamación. Días 28-35: ensayos motores y comportamentales. Día 35: sacrificio. A) Ensayos con ratas Wistar adultas con HC-Ads. B) Ensayos con ratas Wistar envejecidas con HC-Ads. C) Ensayos con ratas Sprague-Dawley transgénicas expresando en hemicigosis hLRRK2 wt (Tg_wt) o hLRRK2 G2019S (Tg_GS), no transgénicas de los mismos apareos (noTg) o bien no transgénicas provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA (noTg FVet).

3.4 Genotipificación de ratas transgénicas

3.4.1 Extracción de ADN genómico

Debido a que los animales transgénicos se mantienen en hemicingosis, es necesario realizar un ensayo de genotipificación al destete para poder identificar si cada individuo es hemicingota para la mutación (tg_wt o tg_GS) o no transgénico (noTg). De aquí en adelante se nombrará como "L" a todos los animales cuyo padre fuese hemicingota para hLRRK2_wt (tg_wt) y como "G" a todos aquellos provenientes de un padre hemicingota para hLRRK2_G2019S (tg_GS). Para ello, se tomaron muestras de piel de la oreja de cada animal y se realizó una extracción de ADN genómico a partir de las mismas. Brevemente, las muestras se digieren en buffer de lisis (50mM KCl; MgCl₂ 1,5mM; Tris pH 8,5 10mM; Igepal 0,45%; Tween 20 0,45%; 60µg/ml proteinasa K) durante 2hs a 55°C, agitando periódicamente para facilitar el proceso. Luego de que el tejido estuviese completamente disgregado, se inhibió la proteinasa incubando a 95°C durante 20 minutos. Finalmente, las muestras se enfriaron en hielo y se centrifugaron durante 1min a 5000rpm para precipitar los restos de tejido y recuperar el sobrenadante.

3.4.2 Genotipificación de ratas por PCR

El gDNA extraído de los animales fue usado como templado en una PCR con dos pares de *primers* que reconocen regiones distintas del exón 39 y 41 del gDNA de hLRRK2 (LRRK2_ex39 y hLRRK_gDNA_seq2, respectivamente, ver Tabla 2.4) y otro par que reconoce el gen de ciclofilina como control de carga (cyclophilin, ver Tabla 2.4). Se usaron 5µl de ADN genómico como templado en 10µl de Master Mix (ver tabla 2.3) y se amplificaron en un termociclador (MJ Research, modelo PCT-200) usando el programa que figura en la Tabla 2.3. Finalmente, el resultado de la PCR se corrió en un gel de agarosa 2%, teñido con 0,5mg/ml de BrEt para su visualización y se reveló en un transiluminador bajo luz UV.

Cabe aclarar que esta metodología no permite distinguir entre animales tg_wt y tg_GS dado que la mutación G2019S es puntual. Por ese motivo, en todo momento se tomaron especiales cuidados en mantener separados y correctamente identificados a los animales L y G, al igual que a toda muestra proveniente de los mismos.

Master Mix	1X	[Final]	Programa		
			Temperatura	Duración	Repeticiones
Agua	2.29µl	-			
Buffer PCR 10X sin Mg	1.5µl	1X	95°C	10min	x1
MgCl ₂ (50mM)	0.9µl	3mM	95°C	30seg	x31
dNTPS (10mM)	0.75µl	500µM	*58°C / **55°C	30seg	
primer F 10µM	0.75µl	0.5µM	72°C	2min	
primer R 10µM	0.75µl	0.5µM	72°C	10min	x1
DMSO (50%)	3µl	1.1%	15°C	-	-
Taq (5U/µl)	0.06µl	0,02U/µl			
Volúmen Final	15µl				

Tabla 2.3. Protocolo PCR genotipificación. Detalle de composición de las Master Mix y el programa de amplificación usados para detectar la hLRRK2 en ADN genómico de animales posiblemente transgénicos. *Las reacciones con los *primers* LRRK2_ex39 se corrieron con una temperatura de annealing de 58°C. **Las reacciones con los *primers* hLRRK_gDNA_seq2 y ciclofilina se corrieron con una temperatura de annealing de 55°C.

3.5 Inyecciones intracerebrales

Las inyecciones estereotáxicas intracerebrales se realizaron por la mañana para evitar posibles efectos de las variaciones circadianas en la expresión de citoquinas sobre las respuestas inflamatorias. Los animales fueron anestesiados con clorhidrato de ketamina (80 mg/kg) y xilacina (8 mg/kg) e inyectados en la SNpc con HC-Ad-LRRK2 G2019S o HC-Ad-eGFP como control; o bien en el fascículo prosencefálico medial (FPM) con Ad IL-1β o Ad β-gal como control, siguiendo las coordenadas de Paxinos & Watson, 2013 (Figura 2.7). El FPM es una región que es atravesada por los haces de las neuronas cuyos cuerpos están en la substantia nigra y que extienden sus prolongaciones hacia el estriado. Las inyecciones se realizaron con un capilar de vidrio estirado (aproximadamente de 50 nm de diámetro) a fin de minimizar el daño en el tejido nervioso debido a la cirugía per se. Los vectores de primera generación (Ad IL-1α y Ad β-gal) se diluyeron en buffer Tris-HCl 10 mM (pH 7,8) estéril, a una concentración final de 3x10⁶pi/µl. En el caso de los vectores de high capacity (HC-Ad-LRRK2 G2019S y HC-Ad-eGFP), se diluyeron en buffer Hepes 0,5mM pH 7,8 con glicerol hasta una concentración final de 8,6x10⁵pi/µl (4,3% de glicerol final). En todos los casos, se inyectó un volumen final de 1 µl por un período de 6 minutos: en los primeros 4 se administró el vector

(0,25 ul/minuto) y luego se mantuvo el capilar en el lugar durante 2 minutos adicional a fin de evitar el reflujo de la solución. Finalmente, se procedió a limpiar y cerrar la herida, suturando la incisión y asegurándose de que toda la zona quedase embebida en iodopovidona (Pervinox®) para minimizar el riesgo de infecciones e inflamaciones locales. Los animales se mantuvieron bajo una lámpara que les proveía calor hasta recuperarse de la anestesia.

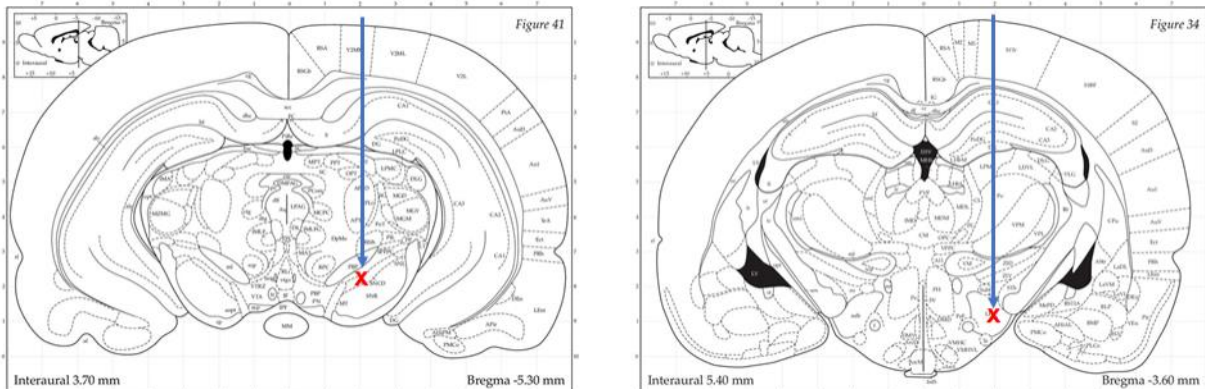


Figura 2.7. Esquema de los sitios de inyección. Los animales fueron inyectados unilateralmente en **A.** la SNpc (desde el bregma: -5,3mm anteroposterior, +2mm lateral y -7,2mm dorso-ventral) o en **B.** el fascículo prosencefálico medial (desde el bregma: -3,6mm anteroposterior, +2mm lateral y -8,4mm dorso-ventral) del hemisferio izquierdo. Se muestran los tractos (flechas azules) y los sitios de inyección (cruces rojas). Imágenes obtenidas de (Paxinos & Watson, 2013).

3.6 Inyecciones intravenosas

Para estudiar el efecto de inflamaciones sistémicas se utilizó como estímulo proinflamatorio el Ad IL-1 β , aplicado en forma endovenosa (ev), utilizando la vena de la cola del animal. Como control se utilizó el Ad β -gal. Los animales fueron anestesiados por un lapso corto de tiempo con ketamina (50mg/kg), se procedió a ubicar la vena lateral de la cola y con una aguja 27G se realizó la inyección empleando una cánula flexible. En primer lugar, se pasaron 300 μ l del adenovector en una concentración de $4,6 \times 10^6$ partículas infectivas/ μ l, diluidas en buffer Tris-Cl 10mM (pH 7,8) estéril; en segundo lugar, se pasaron 300 μ l de solución fisiológica estéril. Una vez que los animales se recuperaron de la anestesia fueron devueltos a sus respectivas jaulas.

3.7 Frotis de sangre periférica y recuento leucocitario

Con el objetivo de verificar la efectividad del estímulo inflamatorio periférico, se realizaron sendos recuentos leucocitarios de las ratas antes (basal) y 5 días después de recibir la inyección endovenosa de Ad IL-1 β o Ad β -gal. Trabajos previos del laboratorio han demostrado que el pico de acción del Ad IL-

1 β se observa a los 5 días posterior a su administración (Pott Godoy et al., 2010). Para ello, se pinchó la punta de la cola del animal con una aguja hipodérmica y se extrajo una gota de sangre, la cual fue inmediatamente extendida sobre un portaobjetos de vidrio. Las muestras se secan y se tiñeron con la técnica de May-Grünwald/Giemsa que permite diferenciar cualitativa y cuantitativamente los principales elementos formes de la sangre. Para cada muestra se contaron al menos 100 leucocitos, diferenciándolos según su morfología. En base a ese total se obtuvieron los porcentajes de linfocitos y neutrófilos antes y después del estímulo periférico para cada animal.

3.8 Ensayos motores y comportamentales

3.8.1 Test del cilindro

Para evaluar la aparición de aquinesia en los miembros delanteros, se realizó el test del cilindro (Schallert et al., 2000). Los animales se colocaron individualmente en un cilindro de acrílico de 20 cm de diámetro y 50 cm de altura (Fig. 2.8). Se cuantificó el número de veces que el animal, al levantarse, toca la pared del cilindro, con la pata ipsilateral (izquierda) y contralateral (derecha) a la inyección central, por un lapso de 5 minutos. Este test motor se realizó siempre por la tarde que es cuando los animales muestran mayor actividad exploratoria.



Figura 2.8. Ensayo de cilindro. Esquema del dispositivo experimental.

3.8.2 Test de pasos de ajuste

Otra metodología alternativa para evaluar la aparición de aquinesia en los miembros delanteros es el test de pasos de ajuste (Chang et al., 1999). Los animales fueron sostenidos por el operador de manera tal que todos sus miembros queden inmovilizados excepto uno de los delanteros. Se acercó el animal a la mesa de trabajo de tal forma que sólo apoyara el miembro libre (Fig. 2.9). Luego, el operador trasladó al animal a velocidad constante y de forma paralela a la superficie de la mesa a lo largo de un recorrido de 60cm en ambos sentidos. De esta manera, con este movimiento, el animal naturalmente tiende a dar pasos con su miembro libre. Se contaron el número de pasos que cada animal da con cada miembro en su recorrido en ambos sentidos. Cada medición se realizó en 3 instancias separadas por un descanso de 1-1,5hs y en cada instancia por triplicado. Si bien se cuantificaron todos los movimientos, salvo que se aclare lo contrario, sólo se informa el movimiento de aducción (de izquierda a derecha para

la pata izquierda y de derecha a izquierda para la pata derecha) ya que es el más afectado por el daño dopaminérgico.

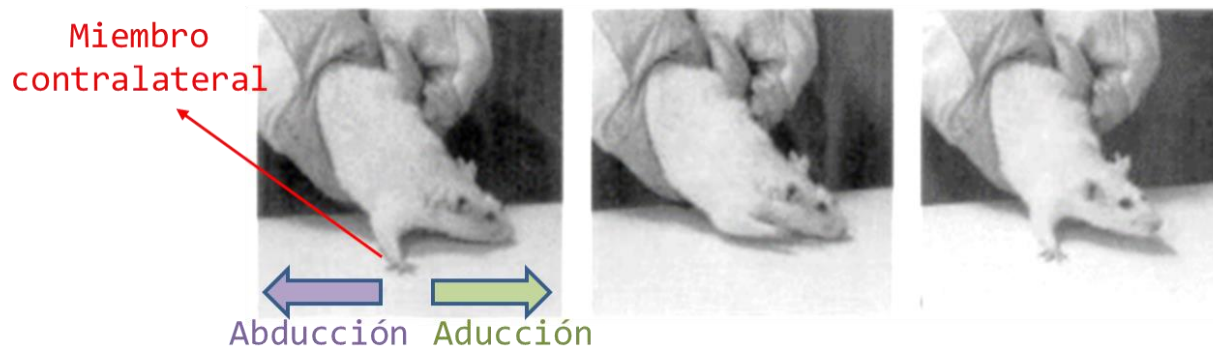


Figura 2.9. Test de pasos de ajuste. El animal se sujeta de tal manera que sólo uno de sus miembros delanteros quede libre y apoyado sobre la superficie de trabajo. Se cuantifican el número de pasos de ajuste de aducción o abducción que el animal realiza al ser desplazado horizontalmente sobre la superficie. Imagen extraída y modificada de Olsson et al., 1995.

3.8.3 Test de campo abierto

Para cuantificar la actividad locomotora espontánea y el comportamiento del tipo ansioso se utilizó el test de campo abierto. Este test se realiza en una caja de madera de 1 x 1 mts con un piso dividido en 16 cuadrados, donde se colocó al animal. Desde un cuarto aparte, el operador evaluó durante 5 minutos la locomoción horizontal (número de veces que los animales cruzan las líneas marcadas en el suelo), el número de alzamientos sobre los miembros traseros, el tiempo durante el cual animal permanece en los cuadrantes centrales del campo abierto y el número de deposiciones fecales (*faecal boli*). Una menor actividad exploratoria (menor locomoción horizontal, menos alzamientos), un menor tiempo en el centro y un mayor número de deposiciones se consideran síntomas del espectro ansioso.

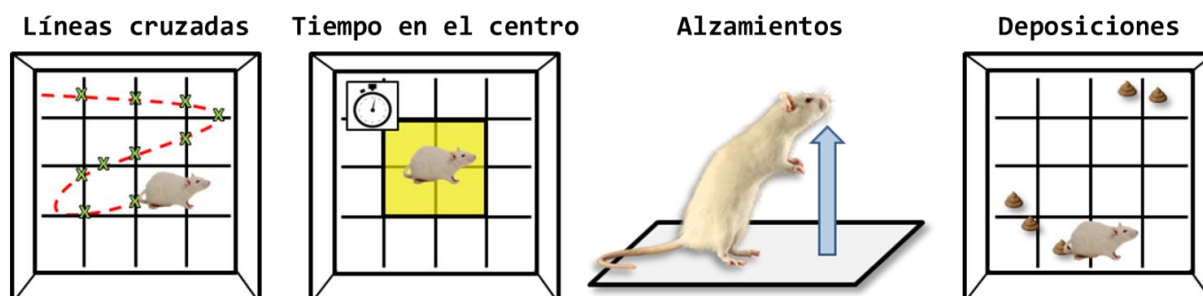


Figura 2.10. Test de campo abierto. Esquema de las mediciones realizadas en el test de campo abierto.

3.9 Análisis histológicos

3.9.1 Perfusión y procesamiento del tejido para histología

. Para los estudios histológicos los animales se perfundieron por vía intracardíaca. Para ello, las ratas fueron anestesiadas con ketamina (80mg/kg) y xilacina (8mg/kg). Luego fueron perfundidas transcardíacamente con 50ml de solución salina heparinizada (2,5U/ml), seguida de 300 ml de paraformaldehído (PFA) 4% en buffer fosfato (PB) 0.1M (pH 7.2). Los cerebros extraídos fueron post-fijados en 50ml de la misma solución de PFA 4% a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se los pasó a una solución crioprotectora de sacarosa 30% en PB 0.1M y se los mantiene en esa solución a 4°C hasta que los cerebros bajen al fondo del tubo, lo cual indica que la solución ya penetró en el tejido. Los cerebros fueron congelados en isopentano por 3 minutos en isopentano (J.T. Baker, NJ, USA) enfriado en un baño de etanol y hielo seco, y luego se almacenaron a -20°C hasta ser cortados.

Los cerebros se cortaron en un criostato (Leica) en secciones coronales seriadas de 40µm de espesor, a lo largo de toda la SN. Los cortes de cerebro se mantuvieron a -20°C en una solución criopreservadora (3 vol. glicerol, 3 vol. etilenglicol y 4 vol. de PB) hasta ser utilizados.

3.9.2 Tinción de Nissl con Violeta de Cresilo

Para estudiar el infiltrado inflamatorio y la integridad del tejido, se realizó una tinción de Nissl. La misma utiliza Violeta de Cresilo, un colorante básico que se une a los componentes ácidos de la célula, tiñendo fundamentalmente el núcleo celular, así como determinados elementos del citoplasma como el retículo endoplasmático rugoso (que en neuronas es muy abundante y se denomina sustancia de Nissl) (Bancroft and Gamble, 2002). Los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y luego se secaron durante 2 hs a 37°C o toda la noche a temperatura ambiente. Una vez secos, y adheridos a los portaobjetos, los cortes se re-hidrataron pasándolos por etanol 96% y 70%, en forma secuencial durante 2 minutos en cada solución. A continuación, se realizó la tinción colocándolos durante 3-5 minutos en una solución de Violeta de Cresilo al 1% (Merck). La solución de Violeta de Cresilo está compuesta por 0.5g del colorante en 100ml de acetato de sodio (AcNa) 0.1M (pH3.8).

Luego los cortes fueron deshidratados pasándolos nuevamente en forma secuencial por alcoholes de graduación creciente, dos etanol 96% (donde se da la diferenciación de la tinción) y dos etanol 100%, y finalmente tres pasajes por xilol. Luego se les colocaron los cubreobjetos utilizando bálsamo de Canadá sintético (BioPack).

3.9.3 Inmunohistoquímica e inmunohistofluorescencia

3.9.3.1 Procedimientos generales

Las inmunohistoquímicas (IHQ) e inmunohistofluorescencias (IHF) se hicieron utilizando la técnica de *free-floating*. Para ellos, se utilizaron uno de cada

seis cortes seriados de 40µm sin montar en portaobjetos. En todos los casos se utilizaron los hemisferios contralaterales a la inyección como control negativo de la IHQ o la IHF. Para las IHQ se realizaron dos lavados con PBS-Tritón 0,1% (PBS-T) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para los cortes destinados a IHQ que se revelan con DAB, se realizó un bloqueo de peroxidasas internas, sumergiendo los cortes en una solución de Metanol: H₂O₂ (60:1) durante 15 minutos. Luego de dos lavados de 10 minutos con PBS-T, se procedió a bloquear las secciones con solución de bloqueo (suero de burro 1% en PBS-T) durante 45 minutos. Una vez terminado el bloqueo, se incubaron los cortes con el anticuerpo primario al menos 8 horas a 4°C. Pasado ese tiempo, se lavaron los cortes dos veces con PBS-T durante 5 minutos y se procedió a la incubación con el o los anticuerpos secundarios correspondientes diluïdos en la misma solución de lavado seguidos, o no, de incubaciones adicionales, según el caso. Una vez terminada la IHQ, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar, se deshidrataron, se aclararon y se montaron en bálsamo sintético. Por su parte los cortes de IHF fueron montados en Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA) y almacenados en oscuridad hasta su uso para preservar su fluorescencia.

3.9.3.2 IHQ de TH

Para la IHQ de tirosina hidroxilasa (TH), previo a la incubación con el anticuerpo primario, se realizó una recuperación antigénica se realizan dos incubaciones con buffer citrato a 80-90°C durante 20 minutos (calentando 1 minuto en microondas y luego incubando en un recipiente térmico). Inmediatamente después, se enfriaron los cortes con un lavado en PBS-T. Luego de la incubación con el anticuerpo primario (1:1500, Neuromics #ch23006) y el lavado, se realizaron dos lavados de 10 minutos con PB 0,1M a temperatura ambiente, seguidos de una incubación de 2 horas con el anticuerpo secundario biotinilado (1:200, Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc.) en PB 0,1M. A continuación, y luego de 2 lavados de 10 minutos con PB 0,1M, se procedió a incubar las secciones 2 horas con el Complejo Avidina-Biotina (ABC, Vector). Finalmente, se realizaron dos lavados más con PB 0,1M, y se reveló con 3.3´diaminobenzidina (DAB) (Sigma). Los cortes se lavaron con dos pasajes por PB 0,1M.

3.9.3.3 IHF de LRRK2

Para la IHF de LRRK2, se partió de tejido recién cortado. Se realizó una recuperación antigénica en dos pasos. Primero, los cortes se incubaron en SDS al 1% en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizó el mismo tratamiento con buffer citrato caliente descrito para TH. Luego de la incubación con el anticuerpo primario hecho en ratón (1:500, Neuromab N241/34) durante al menos 48hs a 4°C, los cortes se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón hecho en burro (1:250, Jackson Immunoresearch #715-065-150) en PBS-T durante 2hs a TA y luego con estreptavidina conjugada a cianina Cy2 (1:250, Jackson Immunoresearch #016-220-084) en PB 0,1M durante otras 2hs a TA. Finalmente, antes de montar los cortes, se realizó una contratinción con 1µg/ml de bisbenzimidina Hoechst (Sigma H33258) en PB 0,1M durante 5 minutos a TA para visualizarlos núcleos celulares.

3.9.3.4 IHF de MHCII

Para la IHF para el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHCII), que marca la microglia activada, se usó un anticuerpo primario específico hecho en ratón (Serotec #MCA46G) diluído 1:200 en solución de bloqueo. Se usó un anticuerpo anti-ratón hecho en burro conjugado a Alexa 594 (Jackson Immunoresearch, #715-588-150) diluido 1:200 en PBS-T como anticuerpo secundario.

4. Extracción de RNA de sangre periférica y RT-PCR en tiempo real.

Con el fin de evaluar la respuesta inflamatoria periférica de los animales transgénicos, se evaluó la expresión de mensajeros de citoquinas proinflamatorias en sangre periférica luego de estimularlos con Ad IL-1 β . Los animales fueron sacrificados 5 días después de la inyección periférica con Ad IL-1 β y se extrajeron alrededor de 5ml de sangre mediante punción cardíaca. Los glóbulos rojos fueron lisados incubando la sangre en 10 volúmenes de buffer de lisis (KHCO₃ 10mM, NH₄Cl 150mM, EDTA 0.1mM, pH 8) durante 15 min a TA. Los leucocitos se precipitaron centrifugando a 300xg durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y se repitió la operación al menos 3 veces o hasta que el *pellet* de leucocitos apareciera blanco y sin restos de glóbulos rojos.

La extracción de ARN de leucocitos se realizó por el método de TRIzol[®], siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se resuspendió el *pellet* en 1ml de TRIzol[®] (Invitrogen) y se incubó 15 min a TA. Luego, se agregaron 200 μ l de cloroformo, se agitó por inversión para homogeneizar y se incubó a TA durante 3 min. A continuación, se separaron las fases centrifugando a 12000rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó la fase superior (fase acuosa) en un tubo nuevo, cuidando de levantar nada de la fase orgánica inferior ni de la interfase. Para insolubilizar el ARN, se agregaron a cada tubo 500 μ l de isopropanol, se homogeneizó por inversión y se incubaron 10 min a TA. El ARN se precipitó centrifugando nuevamente a 12000rpm durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* de ARN se lavó con 1ml de etanol 70%. Luego de dejar secar los tubos abiertos durante 10 min a TA, se resuspendió el ARN en 20 μ l de H₂O libre de RNAsas incubando a 60°C durante 15 min. El ARN fue cuantificado con un Nanodrop 2000.

Para realizar la retrotranscripción, se utilizaron 200ng de ARN total, según el protocolo del fabricante (Superscript II, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) utilizando oligo-dT como *primers*. Como control de contaminación genómica, una muestra sin transcriptasa inversa se incluyó en cada análisis de PCR. La cuantificación relativa fue realizada por PCR en tiempo real utilizando el método de fluorescencia SYBR-green I y ROX como referencia pasiva. Se usaron el programa Stratagene MxPro TM QPCR y el equipo Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Como *housekeeping* (gen de expresión constitutiva) se utilizó GAPDH, dado que su expresión es homogénea en todos los genotipos de ratas estudiados.

Todas las muestras se evaluaron por triplicado. La especificidad fue controlada por curvas de fusión y geles de agarosa. Para calcular la eficiencia se utilizó el programa LinReg PCR (Čikoš et al., 2007). Los resultados de las PCR en tiempo real se expresan como la cantidad de ADNc del gen de interés sobre la cantidad de ADNc del gen *housekeeping*.

En la Tabla 2.4 se muestran las secuencias de los *primers* y el tamaño esperado del producto de amplificación de DNA para cada gen estudiado.

Gen	Primer	Secuencia	Amplicón	Uso
hLRRK2 (cDNA)	LRRK2_cDNA_F	TTT GGC TGA CCT GCC TAG AAA TAT T	841pb	Chequeo de clones de adenovectores
	LRRK2_cDNA_R	AAT GTC AAA GAC CTG GGC AGA AG		
hLRRK2 (exón 39)	LRRK2_ex39_F	TGA TGG CAG TTT TGG ATC AG	262pb	Genotipificación
	LRRK2_ex39_R	CAA AAC TTT CTA CTC CAC AAC GAA		
hLRRK2 (exón 41)	hLRRK2_gDNA_seq2_F	AGG GAC AAA GTG AGC ACA GAA T	414pb	Genotipificación
	hLRRK2_gDNA_seq2_R	TCA CAA AAT AAA CCT CTG TTC ACA A		
Ciclofilina	cyclophilin_F	GAA GAG TGC GAT CAA GAA CCC ATG AC	160pb	Genotipificación
	cyclophilin_R	GTC TCT CCT CCT TCT CCT CCT ATC TTT ACT T		
IL-1β	IL1b_F	TCC ATG AGC TTT GTA CAA GG	245pb	RT-qPCR
	IL1b_R	GGT GCT GAT GTA CCA GTT GG		
TNFα	TNFa_F	GTA GCC CAC GTC GTA GCA AA	280pb	RT-qPCR
	TNFa_R	AAA TGG CAA ATC GGC TGA CG		
GAPDH (de rata)	R-GAPDH_F	GTA GCC CAC GTC GTA GCA AA	136pb	RT-qPCR
	R-GAPDH_R	AAA TGG CAA ATC GGC TGA CG		

Tabla 2.4. Detalle de los primers utilizados a lo largo del trabajo.

5. Obtención y cuantificación de imágenes digitales

5.1 Obtención de imágenes

Las muestras de tejidos o células marcadas con fluorescencia fueron fotografiadas en un microscopio invertido de fluorescencia Zeiss Axio Observer 3. Alternativamente, para obtener imágenes con mayor definición según fuera necesario, se utilizó un microscopio confocal Zeiss LSM 710 NLO o LSM 510 META. Las imágenes de IHQ y de tinciones histológicas no fluorescentes se obtuvieron con un microscopio Olympus BX60. Las imágenes de células en cultivo fueron obtenidas en un microscopio de contraste de fase Nikon Eclipse TS100. Los detalles de todos los microscopios, así como de sus componentes se encuentran resumidos en la Tabla 2.5.

5.2 Análisis de imágenes

Todas las imágenes fueron analizadas usando el software ImageJ (NIH) y los conteos de células y determinaciones manuales fueron realizados a doble ciego. El conteo manual de células o núcleos celulares en cultivo se llevó a cabo con la ayuda de la herramienta Cell Counter del ImageJ.

Para la determinación del volumen inflamatorio se tomaron fotos de todos los cortes teñidos con violeta de cresilo que presentasen infiltrado inflamatorio con el objetivo de 4x del microscopio Nikon Eclipse E600. En el software de análisis se delimitó manualmente el área inflamada de cada imagen. El volumen inflamatorio se obtuvo como:

$$\frac{A}{n} * 0,04mm * (n * 6 - 5)$$

Donde **A** es la suma de las áreas inflamadas en mm² y **n** es el número de cortes que presentarían alguna inflamación.

Para llevar a cabo el recuento del número de nDa en la SNpc izquierda y derecha de los animales, se procesaron las imágenes de IHQ contra TH usando un *script* de ImageJ escrito para ese fin (ver Apéndice). Brevemente, este macro permite procesar simultáneamente todos los archivos de un directorio y realizar una serie de procesamientos automáticos y manuales para estimar el número de células marcadas en la imagen y, finalmente, almacenar todos esos datos para el procesamiento futuro. El procesamiento de cada imagen cruda (Fig. 2.11.A) comienza convirtiéndola a un formato de escala de grises de 8 bits y realizando el contraste de las células marcadas (más oscuras) respecto del fondo (más claro) usando las herramientas *Sharpen* y *Enhance Contrast*, con saturación de píxeles de 0,3% y normalización (Fig. 2.11.B). A continuación, se selecciona manualmente una región de interés correspondiente a la SNpc usando la herramienta de selección poligonal de la región y se elimina todo el resto de la imagen (Fig. 2.11.C). Luego, se establece manualmente un umbral de intensidad de píxel para la binarización de la imagen tal que permita individualizar todas las células marcadas posibles (Fig. 2.11.D). Una vez obtenida la imagen binaria, ésta se "limpia" con el comando *Despeckle*, que elimina píxeles aislados o grupos pequeños de píxeles, y se le aplica el comando *Watershed* que permite separar grupos de píxeles que pudieran corresponder a células que no hubieran llegado a separarse bien (Fig. 2.11.E). Finalmente, el número de nDa en la imagen se calcula con el comando *Analyze Particles*, que cuenta y mide las "partículas" (grupos de píxeles blancos) independientes dentro de un cierto rango de tamaño y morfología (Fig. 2.11.F). Los parámetros usados en este caso fueron: 50-1500µm² de tamaño y 0,1-1 de circularidad.

La validez de los resultados obtenidos con esta técnica de conteo se probó comparándolos con el conteo manual de las mismas imágenes. Tanto en un modelo de animales sin neurodegeneración en la SNpc (Fig. 2.11.G) como en otro con daño unilateral con 6-OHDA (Fig. 2.11.H), el promedio de los porcentajes del número de nDa en el hemisferio ipsilateral a la inyección respecto al contralateral resultaron muy similares entre ambos métodos de conteo (108±11% con ImageJ, 102±7% a mano y 69±8% con ImageJ, 67±6% a mano, respectivamente).

Además, se verificó que los resultados obtenidos para cada animal con ambos métodos correlacionan fuertemente entre sí (r de Pearson = 0,94, $p < 0,0001$) de manera lineal ($R^2 = 0,87$) (Fig. 2.11.I).

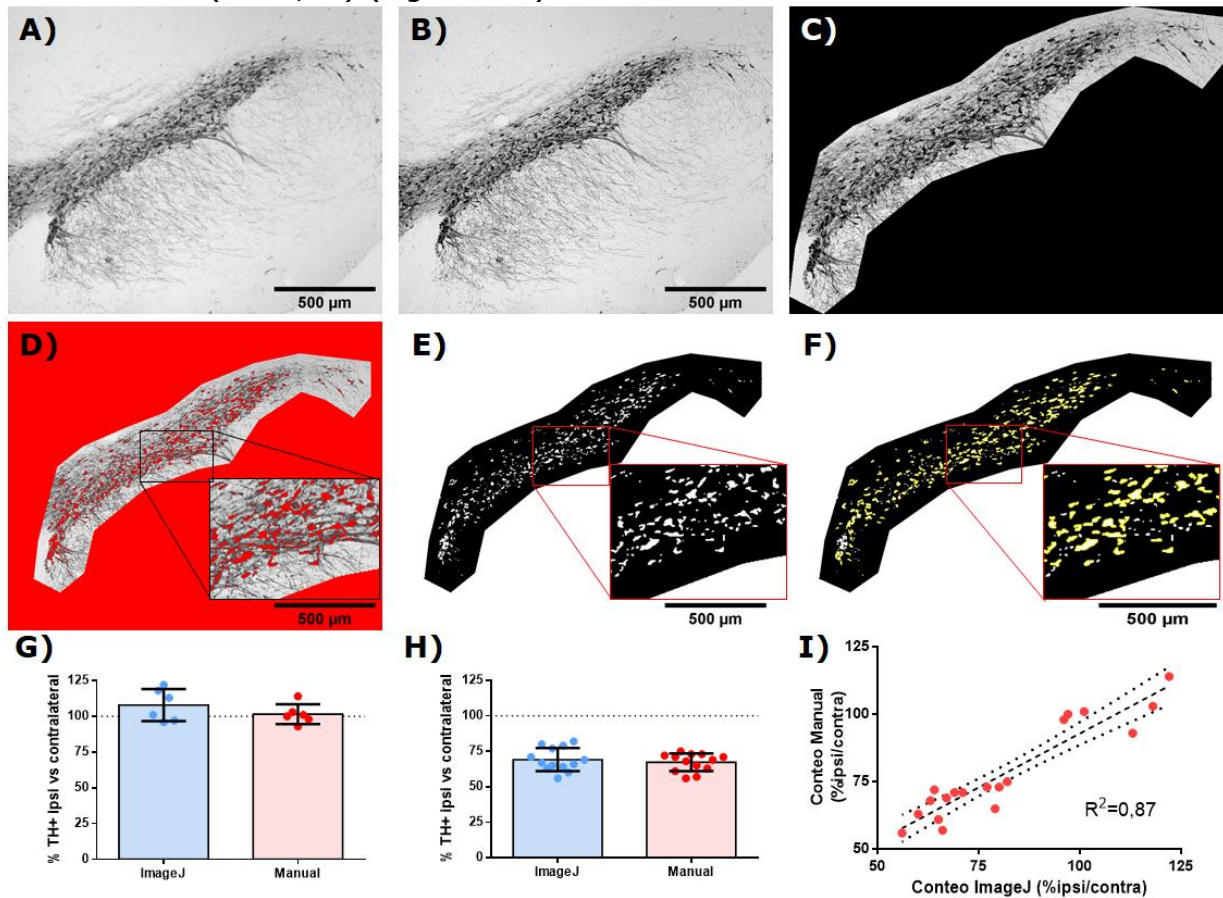


Figura 2.11. Procesamiento de imágenes en ImageJ para recuento de nDa y validación de la técnica. A. Imagen representativa de IHQ para TH de la SNpc. **B.** La imagen original se convierte a 8bits y se utilizan los comandos Sharpen y Enhance Contrast (píxeles saturados 0,3% y con normalización) para aumentar el contraste de las células marcadas. **C.** Se selecciona manualmente el área correspondiente a la SNpc y se elimina el resto de la imagen. **D.** Se establece manualmente un umbral para binarizar la imagen que permita separar lo mejor posible todas las células. **E.** La imagen binarizada resultante se limpia usando el comando Despeckle y las células que no pudieron ser diferenciadas se separan con el comando Watershed. **F.** El número de nDa (delineadas en amarillo) es finalmente contado usando el comando Analyze Particles (tamaño: $50-1500\mu\text{m}^2$, circularidad: 0,1-1). Barra de escala: $500\mu\text{m}$. **G.** Comparación del recuento de células marcadas con IHQ para TH de los mismos preparados realizado con el script de ImageJ y de manera manual, en un modelo de ratas sin neurodegeneración. **H.** La misma comparación que en A pero realizada sobre un modelo de neurodegeneración de nDa con 6OHDA. **I.** El porcentaje de nDa en el lado ipsi- vs. contralateral obtenido por conteo en ImageJ correlaciona con el obtenido manualmente para el mismo animal (r de Pearson = 0,94, $p < 0,0001$, $R^2 = 0,87$).

Microscopio	Tipo	Iluminación	Cámara/Detector	Objetivos usados
Olympus BX60	Epifluorescencia	Lámpara de Hg	Olympus DP71 policromática	UPlan FI 4x/0,13
				UPlan FI 10x/0,3
				UPlan FI 20x/0,5
Zeiss Axio Observer 3	Fluorescencia, invertido	Colibrí 7, con LED para 5 colores (385 - 475 - 555/590 - 630nm)	Zeiss AxioCam ICm1 monocromática	LD A-Plan 5x/0,15
				LD A-Plan 10x/0,25
				LD Plan-Neofluar 20x/0,4
				LD A-Plan 40x/0,55
Zeiss LSM 710 NLO	Confocal	Lámpara de Hg	3-Channel QUASAR Detection Unit	Ec Plan Neofluar 10x/0,3
		Laser He/Ne 543nm		W Plan Aplanachromat 20x/1,0
		Laser He/Ne 633nm		Plan Neofluar 40x/1,3
		Laser Argon 488nm		Plan Aplanachromat 63x/1,4
Zeiss LSM 510 META	Confocal	Fuente de Hg	Fotomultiplicador	Plan Aplanachromat 20X/0,8
		Laser He/Ne 543nm		Plan Aplanachromat 63X/1,4
		Laser He/Ne 633nm		C Aplanachromat 10x/0,45
		Laser Argon 488nm		EC Plan Neofluar 40x/1,3
		Laser Diodo 405nm		
Nikon Eclipse TS100	Contraste de fase, invertido	Lámpara halógena blanca	Nikon DS-Fi2, policromática	Ph1 4x/0,1
				Ph1 ADL 10x/0,25
				LWD Ph1 ADL 20x/0,4

Tabla 2.5. Detalle de los microscopios usados y sus componentes.

RESULTADOS

Capítulo 1: “Generación de adenovectores de 1ra generación para expresar LRRK2 G2019S”

Como se mencionó anteriormente, uno de los objetivos del presente trabajo es evaluar el impacto de la sobreexpresión de la proteína LRRK2 cargando con la mutación G2019S en la *sustantia nigra* (SN) de ratas en un contexto de inflamación periférica. Debido a la naturaleza crónica de la Enfermedad de Parkinson (EP) y a que los pacientes portan esta mutación de por vida, consideramos que una expresión sostenida de esta proteína podría representar más fielmente la patofisiología de la enfermedad. Una de las estrategias elegidas para lograr la expresión prolongada de LRRK2 fue utilizar vectores adenovirales recombinantes inyectados en el cuerpo estriado. La administración de los vectores en esta zona permite la expresión del gen exógeno en la SN gracias al transporte retrógrado de los adenovirus por los axones neuronales (Pott Godoy et al., 2010). Para este fin, se procedió a generar tres vectores capaces de transducir el gen de hLRRK2 G2019S (Ad LRRK2_GS) o bien su versión silvestre (wt) (Ad LRRK2_wt) y un tercero que transdujera proteínas rojas fluorescentes inocuas como genes reporteros y control negativo (Ad RedRed).

Obtención y clonado de vectores adenovirales

Los plásmidos transbordadores pAdXP-pEF1-LRRK2_wt (abreviado pEF1-LRRK2_wt), pAdXP-pEF1-LRRK2_G2019S (abreviado pEF1-LRRK2_GS) y pAdXP-pEF1-DsRed-IRES-dTomato (abreviado pEF1-RedRed) ya habían sido obtenidos previamente en nuestro laboratorio (ver Materiales y Métodos por detalles de la estrategia de generación de adenovectores). El primer paso para el armado de los adenovectores fue expandir estos plásmidos mediante una maxiprep y verificar que fueran capaces de expresar las proteínas de interés al transfectar células con ellos. Para ello, se transfectaron células Hek293 con cada uno de los plásmidos. La inmunomarcación fluorescente para la proteína LRRK2 de estos preparados mostró la presencia de células marcadas tanto en los vidrios correspondientes a pEF1-LRRK2_wt y pEF1-LRRK2_GS, pero no en el control negativo sin anticuerpo primario (Fig. 3.1.1). De manera similar se verificó también la presencia de células fluorescentes rojas, sin necesidad de realizar una inmunomarcación, en los vidrios

con pEF1-RedRed. Una vez corroborada la capacidad de los plásmidos de expresar las proteínas de interés, se procedió a linealizarlos con Fsp1 o Ase1 según correspondiera, a fin de facilitar la co-transfección y la recombinación.

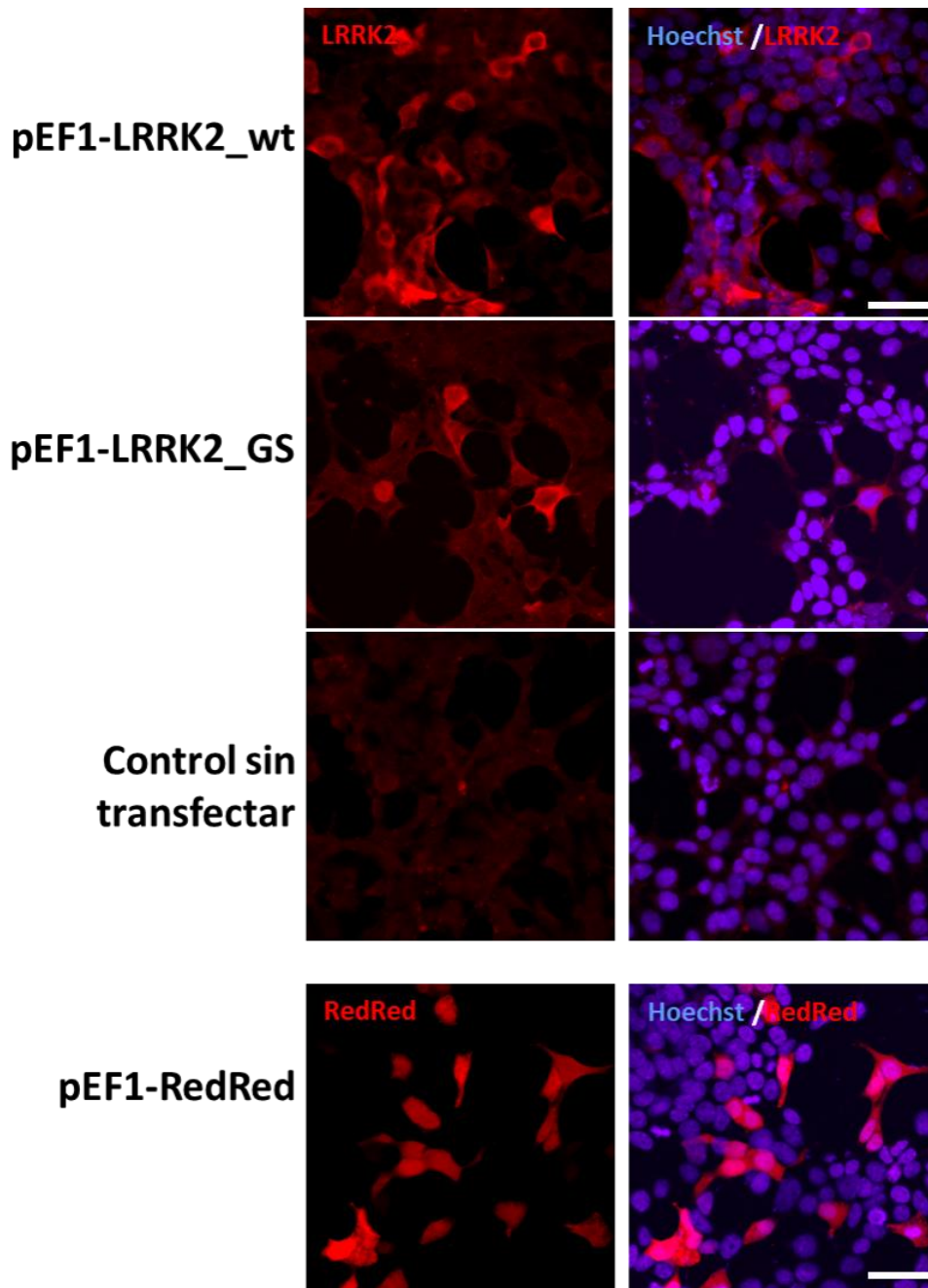


Figura 3.1.1. Expresión de transgenes en células HeK293T transfectadas con los plásmidos transbordadores. Inmunocitofluorescencia específica contra LRRK2 (rojo) y tinción nuclear con Hoechst (azul) en células HeK293a transfectadas con los plásmidos pEF1-LRRK2_wt, pEF1-LRRK2_GS o un control sin transfectar. Las mismas células transfectadas con el plásmido pEF1-RedRed presentan fluorescencia roja sin necesidad del uso de anticuerpos específicos. Barra de escala: 50µm.

Para obtener el brazo derecho (BD) (Fig. 2.1) del virus se extrajo el ADN viral de un stock previamente preparado en el laboratorio de un adenovector de primera generación capaz de transducir el gen de β -galactosidasa (Ad β -gal) mediante la técnica de Hirt. Este ADN se digirió con la enzima de restricción ClaI a fin de escindir el fragmento correspondiente al gen lacZ y liberar el BD. El ADN así cortado fue corrido en un gel de agarosa 0,8% para separar la banda correspondiente a BD y poder cortarla y purificarla. Debido a la dificultad de separar la banda correspondiente al BD del genoma completo del adenovector (26,8Kpb y 31,4Kpb, respectivamente) se procedió a repetir la digestión con ClaI y la corrida en gel de agarosa para verificar que la digestión fuese total y no quedaran genomas virales enteros en la muestra (Fig. 3.1.2).

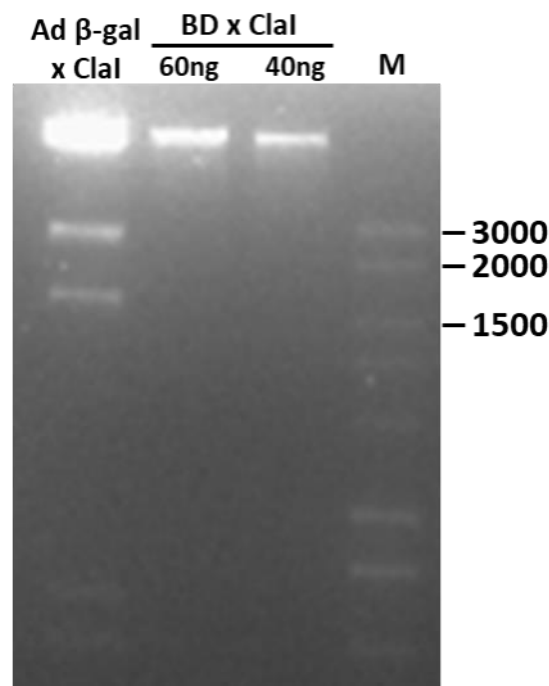


Figura 3.1.2. Purificación del BD del Ad β -gal. Patrón de restricción del ADN de Ad β -gal cortado con ClaI y de BD purificado y vuelto a cortar con ClaI para verificar que la digestión fuese total. M: marcador de peso molecular (se muestran las bandas correspondientes a 3000, 2000 y 1000pb).

Luego, se realizó la co-transfección del BD purificado con los plásmidos linealizados en Hek293a, como se describe en la sección 1.7 de Materiales y Métodos. Alrededor de los días 9 a 11, se observaron parches de efecto citopático en la monocapa celular, lo cual indica una recombinación exitosa y la replicación celular dentro de la célula. Estos parches se caracterizan por una interrupción localizada de la monocapa en forma de "cola de cometa" (Fig. 3.1.3.A), con

presencia de células con morfología característica de una infección viral (hinchadas y redondeadas), agregación y pérdida de adhesión al sustrato (Fig. 3.1.3.B). Eventualmente es posible encontrar en estas regiones del cultivo estructuras de tipo "collar de perlas": células redondeadas unidas linealmente entre sí con un sólo punto de adhesión al sustrato (Fig. 3.1.3.C).

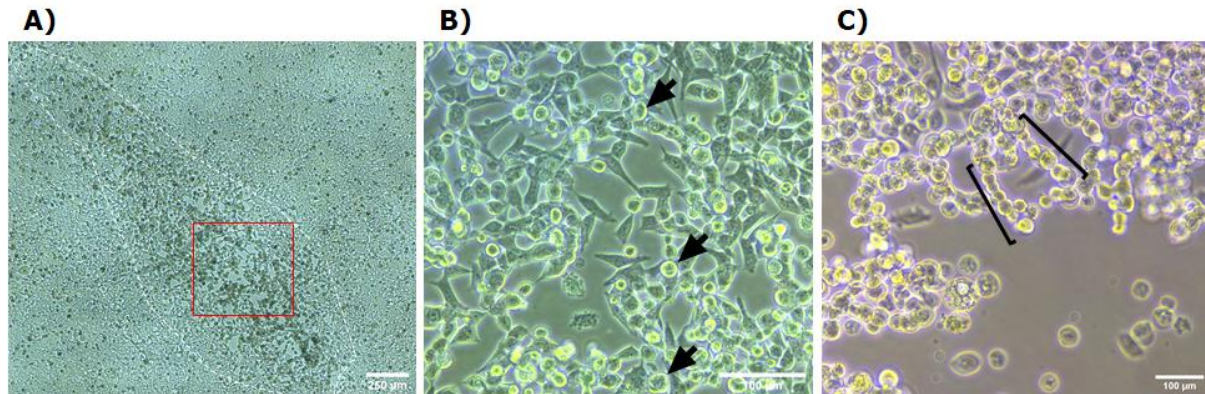


Figura 3.1.3. Obtención de partículas virales por co-transfección de BD de Ad β -gal y plásmido de expresión linealizado. **A.** Imagen de contraste de fase de un cultivo de Hek293a luego de 10 días de la co-transfección con el BD y uno de los plásmidos de expresión linealizado. Se observa la perturbación de la monocapa celular debido al efecto citopático en forma de cometa causado por la replicación viral (línea punteada). Barra de escala: 250 μ m. **B.** Detalle del área marcada con el cuadro rojo en A. Se observan cambios en la morfología celular: redondeadas, hinchadas y agregadas (flechas negras) consistentes con EC. Barra de escala: 100 μ m. **C.** Detalle de células formando estructuras tipo "collar de perlas" (corchetes negros). Barra de escala: 100 μ m.

Cuando el cultivo presentaba efecto citopático generalizado (pero antes de que se despegue la mayoría de las células), las células y el medio fueron cosechados mecánicamente y almacenados a -80°C hasta su uso. Estas muestras representan una "semilla cruda no clonal" del adenovector ya que pueden contener versiones distintas del virus, provenientes de eventos de recombinación independientes e incluso estar contaminada con Ad β -gal si la purificación del BD no hubiese sido correcta. Por este motivo el siguiente paso fue obtener poblaciones clonales aisladas de los vectores (ver sección 1.8 de Materiales y Métodos), para luego poder someter cada una a los controles de calidad adecuados.

Controles de calidad de los clones de adenovectores

Una vez obtenidos los clones de cada uno de los adenovectores, el siguiente paso fue realizarles pruebas de calidad para verificar su identidad y seguridad para

ser usados en el modelo animal. La identidad de los clones de Ad RedRed fue controlada mediante su capacidad de transducir las proteínas rojas fluorescentes en cultivos de células Hek293a (Fig. 3.1.4.A). En cuanto a los clones de Ad LRRK2_wt y Ad LRRK2_GS, en primer lugar, se evaluó la presencia de posibles contaminaciones con Ad β -gal empleando la reacción colorimétrica de X-gal durante los pasos de clonado. Luego de picar los clones en las placas con medio con agar, se cubrió el pocillo con la solución de X-gal y, habiendo identificado cada clon picado en la placa, se procedió a descartar aquellos que presentaran células teñidas de azul (Fig. 3.1.4.D). Luego, se amplificaron los clones a evaluar y se extrajo el ADN viral por el método de Hirt. El mismo se empleó como templado para una PCR con primers específicos para reconocer la región de la mutación G2019S del cDNA de hLRRK2 para verificar la presencia de este fragmento en los clones (Fig. 3.1.4.B). Estos primers no amplifican el gDNA de LRRK2 endógeno de las células. Se seleccionaron dos clones positivos de cada vector LRRK2, cuyos productos de PCR (conteniendo la región de la mutación) fueron purificados y enviados a secuenciar. Ambos clones analizados del Ad LRRK2_GS conservan el cambio de base G \rightarrow A esperado (Fig. 3.1.4.C). En cuanto a los clones del Ad LRRK2_wt, no fue posible obtener lecturas consistentes en la secuenciación. Esto puede haberse debido a la falta de pureza de las muestras de ADN analizadas, aunque subsiguientes extracciones de ADN y purificaciones no dieron mejores resultados. Esta constituyó una primera evidencia indirecta de un posible problema en la generación de este adenovector.

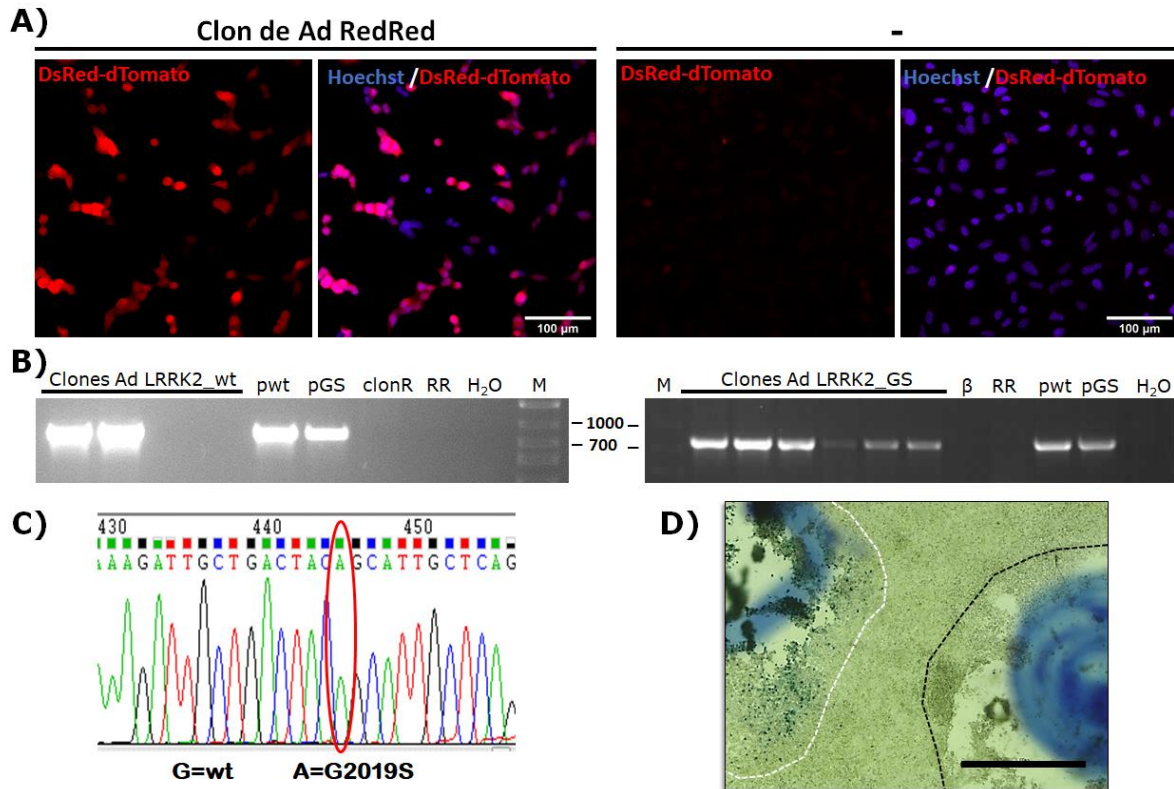


Figura 3.1.4. Controles de calidad de los clones de adenovirus. **A.** Células Hek293a fueron infectadas o no con distintos clones de Ad R, fijadas y contra-teñidas con Hoechst. Barra de escala: 100µm. **B.** A partir del ADN extraído de los clones de adenovirus, se realizaron PCR a punto final con primers específicos para el inserto de LRRK2 (reconocen tanto el wt como G2019S pero no el LRRK2 endógeno de las Hek293a), cuyos productos se corrieron en geles de agarosa 1%. Se incluyeron además controles positivos: pEF1-LRRK2_wt (pwt) y pEF1-LRRK2_GS (pGS); así como también controles negativos: ADN de un clon caracterizado de Ad RedRed (clonR), ADN proveniente del stock de Ad RR puro (RR) o del stock de Ad β-gal (β) y agua (H₂O). M: marcador de peso molecular (se muestran las bandas correspondientes a 1000 y 700pb). **C.** Se seleccionaron 2 clones de Ad LRRK2_wt y Ad LRRK2_GS que hubiesen pasado todos los controles de calidad ensayados y se secuenció el producto de amplificación de PCR correspondiente a la región del inserto de LRRK2 que contiene el sitio de mutación. Ambos clones de Ad LRRK2_GS mostraron la presencia del cambio de base correspondiente a la mutación G2019S (G→A); mientras que en el caso del Ad LRRK2_wt, no fue posible obtener una buena lectura. **D.** Se realizó una tinción con X-gal en cultivos de Hek293 infectados con los clones de adenovirus para evaluar la contaminación con Ad β-gal luego de picar para el clonado. En la imagen representativa se observa una colonia positiva que presenta células azules (línea punteada blanca) y otra negativa (línea punteada negra). En ambos casos se puede ver la marca azul del rotulador utilizado para marcar las colonias a picar. Barra de escala: 1mm.

A continuación, se seleccionaron un clon de Ad RedRed y otro de Ad LRRK2_GS que hayan pasado todos los controles y se los amplificó y purificó, obteniendo así un stock viral concentrado de cada uno. Como se describe en detalle en la sección 1.12 de Materiales y Métodos, se hicieron preparaciones a gran escala de dichos adenovirus en células Hek293a. Se cuantificó el número de partículas totales mediante densidad óptica a 260nm, y se determinó la relación

de la absorbancia (A) a 260nm y 280nm (Tabla 3.1.1). La relación A_{260}/A_{280} evalúa la pureza del ADN en la muestra y su valor óptimo es de 1.4. Los valores obtenidos se acercaron a los óptimos. Por otro lado, la cuantificación de partículas infectivas se realizó mediante dosis infectiva 50 (TCID₅₀) en células Hek293a (Tabla 3.1.1). Es recomendable que el porcentaje de partículas infectivas respecto del de las partículas totales no sea menor al 10%, ya que las partículas no infectivas pueden tener un efecto tóxico inespecífico. En nuestro caso, dicho porcentaje fue de 74% y 39% para Ad RedRed y Ad LRRK2_GS, respectivamente (Tabla 3.1.1).

Adenovector	A_{260}/A_{280}	Pt (partículas/ml)	Pi (TCID ₅₀ /ml)	%Pi/Pt
Ad RedRed	1.38	5.40×10^{12}	4.0×10^{12}	74%
Ad LRRK2_GS	1.38	3.05×10^{12}	1.2×10^{12}	39%

Tabla 3.1.1. Cuantificación de partículas totales y partículas infectivas de los stocks de adenovectores que expresan las partículas rojas fluorescentes DsRed y dTomato (Ad RedRed) y hLRRK2 G2019S (Ad LRRK2_GS). Las partículas totales (Pt) fueron cuantificadas por absorbancia a 260 nm y las partículas infectivas (Pi) por TCID₅₀. La relación A_{260}/A_{280} y el porcentaje de partículas infectivas / totales (%Pi/Pt) se determinó como parte de los controles de calidad de los vectores.

Durante la purificación de los stocks de adenovectores se separaron muestras de los mismos para extraer su material genético. Este ADN, junto con el proveniente del Ad β -gal como control, fue digerido con las enzimas de restricción Hind III, Bgl II y EcoR V, como se explica en la sección 1.14 de Materiales y Métodos. El gen lacZ, presente en el Ad β -gal pero no en el Ad G2019S y el Ad RedRed, posee dos sitios de corte para Hind III que liberan un fragmento de 3,4Kpb (Fig. 3.1.5.A, flechas rojas). Como se esperaba, dicho fragmento estuvo presente en el patrón de restricción del Ad β -gal pero no en los otros dos adenovectores. Por su parte, el gen lacZ también posee otros dos sitios de corte para la enzima Bgl II, que liberan un fragmento de 11Kpb (Fig. 3.1.5.A, flechas amarillas), que se vio en el patrón de Ad β -gal pero no en el del Ad G2019S. Llamativamente, este mismo fragmento apareció también en el patrón de restricción del Ad RedRed, a pesar de que el bandeo teórico no predice ningún fragmento de tamaño similar. Sin embargo, las células Hek293 infectadas con el Ad RedRed resultaron negativas para la tinción con Xgal y positivas para la expresión de las proteínas fluorescentes rojas (Fig. 3.1.4.A y D). Por lo tanto, de existir una contaminación de este stock viral con Ad β -gal, se trataría de un Ad β -

gal no funcional y no afectaría la funcionalidad del Ad RedRed. En conclusión, los 2 stocks generados estarían libres de contaminación con Ad β -gal.

Por otro lado, la enzima EcoR V posee dos sitios de corte dentro del cDNA de hLRRK2, los cuales liberan un fragmento de aproximadamente 3,2Kpb (Fig. 3.1.5.A, flecha verde). Sin embargo, este fragmento no apareció en el patrón del Ad LRRK2_GS, a pesar de que el clon a partir del cual se obtuvo había dado positivo en la secuenciación de la mutación (Fig. 3.1.4.C). Esta discordancia podría explicarse si el Ad LRRK2_GS no contiene el gen completo de LRRK2. Para corroborar esta hipótesis, se evaluó la capacidad del Ad LRRK2_GS de transducir el gen de hLRRK2 *in vitro*. Para ello se eligieron células HeLa, dado que estos vectores no pueden replicar en ellas y por lo tanto generan menor toxicidad que en las Hek293. Las células se transdujeron con una multiplicidad de infección (MOI) de 100 y se les realizó una inmunomarcación con un anticuerpo específico contra LRRK2. Para verificar la especificidad de la marca se usaron células idénticamente transducidas con el Ad RedRed (como control negativo) y con un adenovirus *high capacity* capaz de transducir LRRK2 G2019S (HC-Ad-LRRK_G2019S), cuya eficacia ya había sido corroborada (ver sección 2 de Materiales y Métodos) como control positivo. El Ad G2019S no fue capaz de expresar la proteína hLRRK2 en estas células (Fig. 3.1.5.B).

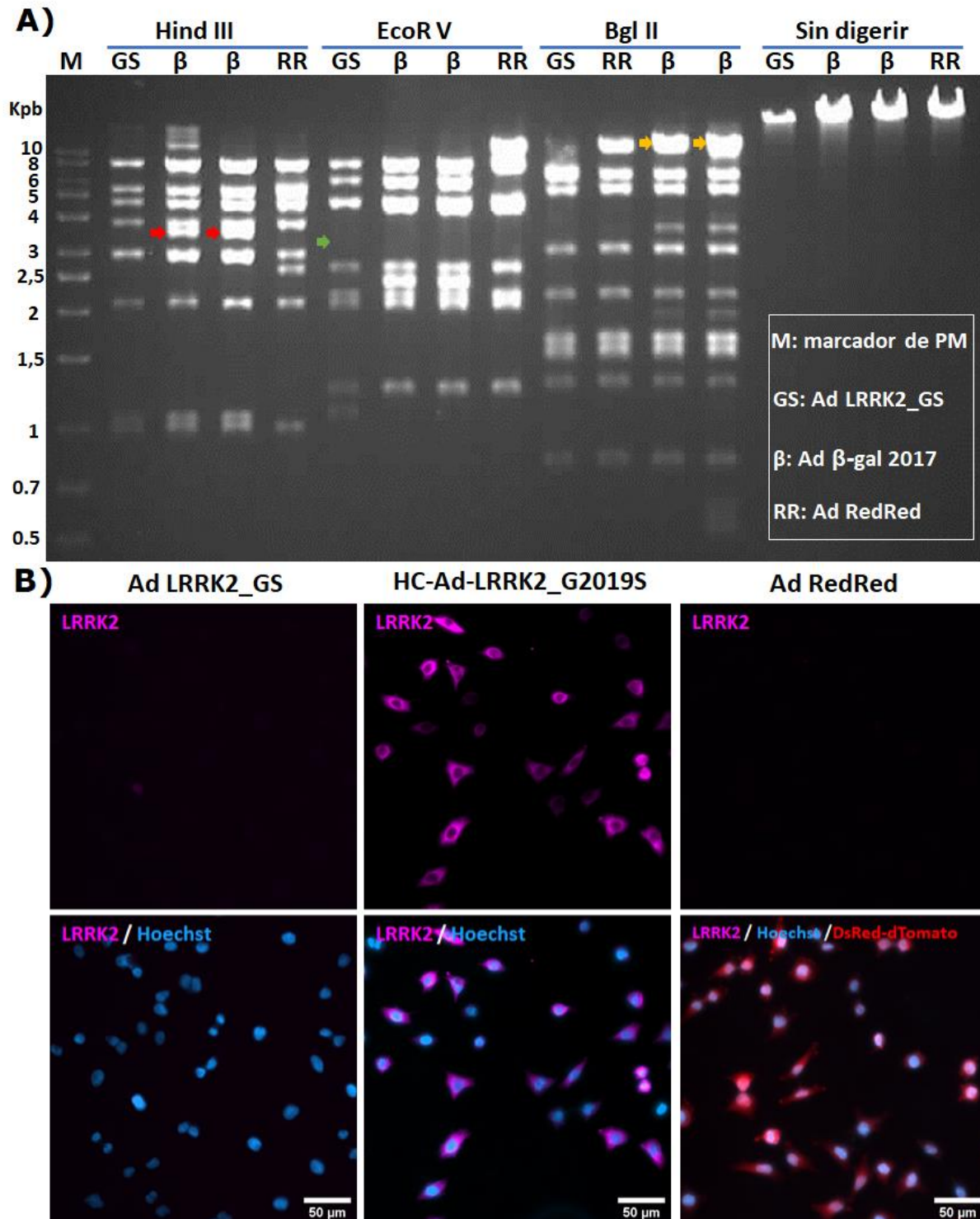


Figura 3.1.5. Controles de calidad de los stocks adenovirales. A. Se extrajo el ADN viral a partir de muestras de los stocks adenovirales de Ad LRRK2_GS (GS) y Ad RedRed (RR), el cual fue digerido exhaustivamente con las enzimas de restricción Hind III, EcoR V y Bgl II. El ADN digerido fue corrido en un gel de agarosa 0,8% y comparado con el del Ad β-gal (β). También se incluyen sendos controles sin digerir. Se marcan en la imagen el fragmento específico del gen lacZ liberado por Hind III (flechas rojas, 3,4Kpb) ausente en GS y RR; el fragmento específico de LacZ liberado por Bgl II (flechas amarillas, 11Kpb), ausente en GS pero presente en RR; y la ausencia del fragmento específico de hLRRK2

liberado por EcoR V (flecha verde, 3,2Kpb). M: marcador de peso molecular. **B.** Las células HeLa fueron incubadas con Ad LRRK2_GS, HC-Ad-LRRK2_G2019S o Ad RedRed con una MOI de 100 durante 48hs, luego se fijaron en PFA 4% y se les realizó una inmunomarcación con anticuerpo anti-LRRK2. No se observa marca específica para LRRK2 en las células transducidas con Ad LRRK2_GS pero sí con HC-Ad-LRRK2_G2019S. El control negativo con Ad RedRed tampoco presenta marca para LRRK2 pero sí se observa la expresión de las proteínas fluorescentes rojas DsRed y dTomato.

Por lo tanto, se logró obtener un stock puro de Ad RedRed que es capaz de expresar la proteína deseada (en este caso, las proteínas rojas fluorescentes), pero no se pudieron obtener resultados similares para los Ad LRRK2_wt y Ad LRRK2_GS. La hipótesis es que la razón principal de estas dificultades sea que el tamaño del inserto de LRRK2 se halla en el límite de la capacidad de carga de los adenovectores de primera generación para empaquetar ADN (Danthinne & Imperiale, 2000). La estabilidad de los adenovectores y su eficiencia de replicación dependen en gran medida de que no se supere su capacidad de carga, pudiendo sufrir rearrreglos genéticos si se supera el 105% del tamaño de su genoma wt (Bett et al., 1993). Las deleciones en la región de los genes E1 y E3 en estos vectores permiten empaquetar hasta 8,2Kpb sin superar este límite de empaquetamiento. Este es el caso del Ad RedRed, el cual contiene un inserto de aproximadamente 2,7Kpb, lo que permitió llegar a obtener un vector funcional de alto título. Sin embargo, el gen de LRRK2 es mucho más grande y el inserto conteniendo su cDNA pesa al menos 7,8Kpb. Esto generaría un genoma viral muy cercano al límite de empaquetamiento para esta clase de vectores. Es posible, entonces, que el gran tamaño del genoma viral limite la eficiencia de producción de los virus y sea la razón que impidió obtener los vectores deseados.

En vista de las dificultades técnicas para obtener los vectores adenovirales de primera generación que expresasen LRRK2 G2019S, se decidió no proseguir tampoco con la producción del Ad LRRK2_wt y se decidió optar por formas alternativas de lograr la expresión de esta proteína en el cerebro de las ratas. En las siguientes secciones se explorarán dichas estrategias y los resultados obtenidos gracias a ellas.

Capítulo 2: "Impacto de la expresión de hLRRK2 G2019S en la SN en un contexto de inflamación periférica"

En el Capítulo 1 de Resultados de esta tesis se detallaron los esfuerzos realizados para lograr obtener un vector adenoviral que permitiese transducir la proteína hLRRK2 *wt* o G2019S en el cerebro de ratas. Como se explicó anteriormente, dicho objetivo no pudo concretarse y, por ese motivo, fue necesario recurrir a estrategias alternativas para evaluar el impacto de LRRK2 G2019S y la inflamación periférica sobre la sobrevivencia de las nDa y las alteraciones motoras y cognitivas *in vivo*.

En este capítulo, la estrategia elegida consistió en utilizar adenovectores *high capacity* (HC-Ads), *gutless* o de tercera generación (Alba et al., 2005) conteniendo el ADNc de hLRRK2 G2019S (HC-Ad hLRRK2 G2019S) o eGFP (HC-Ad eGFP) como control. Estos vectores fueron generados y cedidos gentilmente por el laboratorio del Dr. Stefan Kochanek de la Universidad de Ulm en Alemania. Estos vectores, a diferencia de los de primera generación, poseen delecciones más amplias del genoma viral, permitiendo incorporar hasta 30kb de material exógeno. En el artículo donde los describen por primera vez, los autores indican que la inyección estereotáxica de los HC-Ads en el estriado de ratones indujo la sobreexpresión de las proteínas de interés en la zona de la inyección pero poca transducción en la SNpc (<10%) (Kritzinger et al., 2018). Los autores sugieren que esto se debió a un transporte retrógrado ineficiente desde el estriado hacia la SNpc. Basados en ese antecedente, para este trabajo decidimos inyectar los HC-Ads directamente en la SNpc de ratas, empleando capilares de vidrio estirados a fin de poder obtener la mayor expresión posible de los transgenes en la zona y, a la vez, causar el menor daño posible al tejido.

El procedimiento experimental para el trabajo con animales para este capítulo de la tesis se detalla en la sección 3.3 de Materiales y Métodos. Brevemente, ratas macho adultas (8-12 semanas) de la cepa Wistar fueron inyectados con HC-Ad LRRK2 G2019S o HC-Ad eGFP en la SNpc y, tres semanas después, todas fueron inyectadas en la vena de la cola con Ad IL-1 β o con Ad β -gal. De esta manera, quedaron conformados cuatro grupos experimentales: hLRRK2 G2019S/IL-1 β (n=9), hLRRK2 G2019S/ β -gal (n=9), eGFP/IL-1 β (n=6) y eGFP/ β -gal (n=6). La hipótesis de trabajo indica que la expresión de hLRRK2 G2019S en la SNpc (como ocurre en el grupo hLRRK2 G2019S/ β -gal) producirá daño neuronal sutil o incluso indetectable en la nDA. Por el contrario, en un contexto de inflamación periférica (grupo hLRRK2 G2019S/IL-1 β), se espera que la presencia de hLRRK2 G2019S exacerbe el daño neuronal causado por la inflamación y desencadene la muerte neuronal dopaminérgica y la aparición de síntomas motores. Los ensayos comportamentales fueron llevados a cabo durante la semana previa al sacrificio de los animales, en el día 35 luego de la operación central.

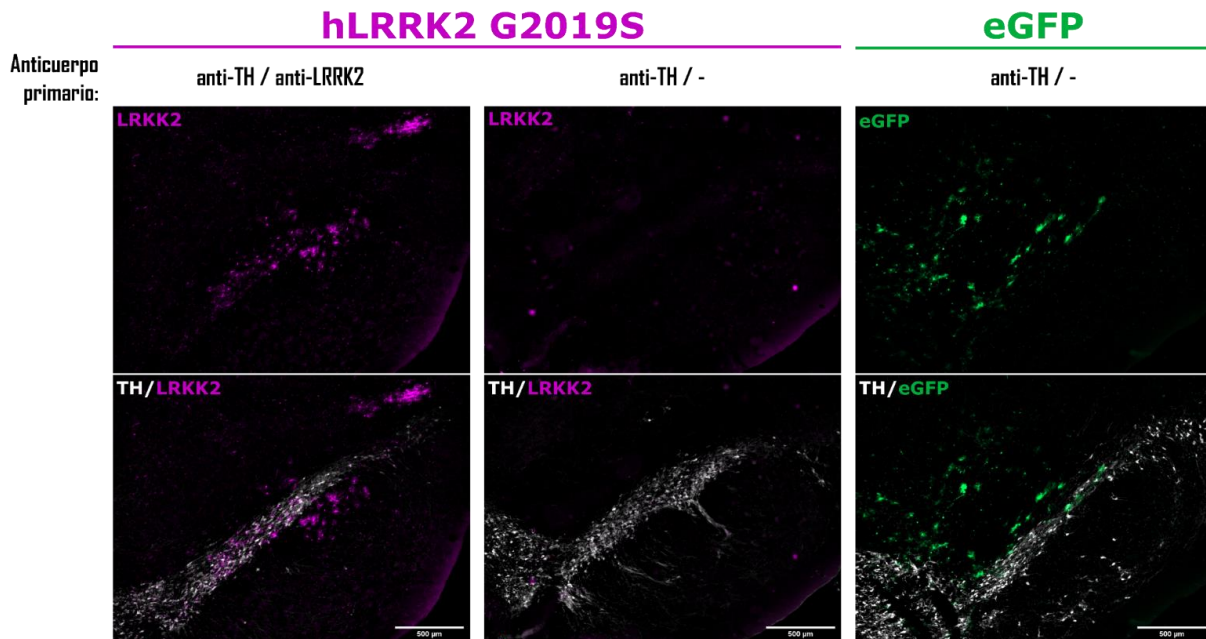


Figura 3.2.1. Expresión central de transgenes inducida por inyección de HC-Ads en la SNpc de ratas adultas. Imágenes representativas de cortes coronales de IHF dobles para LRRK2 (izquierda) y su control negativo (centro), y TH en el hemisferio ipsilateral de animales inyectados con HC-Ad hLRRK2 G2019S en la SNpc. En los cerebros inyectados con HC Ad eGFP (derecha) se marcó TH por IHF y se observó la fluorescencia propia de eGFP en verde sin realizar ninguna inmunomarcación. Se observa expresión de los transgenes en la SNpc, aunque no estrictamente confinada a ella. Considerando que las señales de LRRK2 y GFP no colocalizan con TH, las células transducidas no parecen ser nDA. Barra de escala: 500µm.

Control de la expresión de los transgenes en la SNpc

En primera instancia, se evaluó la efectividad de los HC-Ads al transducir los transgenes en el cerebro de los animales inyectados. Para ello, se realizaron inmunomarcaciones con anticuerpos específicos contra LRRK2 y/o TH sobre cortes coronales de cerebro, a la altura de la SNpc. Si bien el HC-Ad hLRRK2 G2019S también transduce la proteína verde fluorescente acGFP, la inmunomarcación específica para LRRK2 fue necesaria debido a que la fluorescencia verde de este reportero resultaba muy tenue. Por el contrario, los animales inyectados con HC-Ad eGFP, presentaban una buena señal fluorescente en las células transducidas.

El análisis de imágenes de microscopía de fluorescencia mostró, que en la mayoría de los casos la transducción viral fue exitosa, pudiéndose observar marca fluorescente esperada en la región de la SNpc (Fig. 3.2.1). Por otro lado, las imágenes mostraron que la región transducida por los HC-Ads no se limita a la SNpc, sino que también alcanza regiones adyacentes. Esto se puede explicar, por un lado, por la difusión de los adenovectores dentro del parénquima cerebral a partir del punto de inyección o desde la punta del capilar durante su trayecto hasta la SNpc. Debido a la variabilidad inherente a esta metodología, en los análisis subsiguientes, sólo fueron considerados aquellos animales que evidenciaron transducción de los adenovectores en la SNpc, salvo que se indique lo contrario.

Verificación de la eficacia de la inflamación periférica

Como se mencionó anteriormente, resultados previos de nuestro laboratorio y otros indican que los procesos inflamatorios periféricos son capaces de exacerbar la inflamación central, desencadenando o aumentando la muerte neuronal inducida por IL-1 β (Pott Godoy et al., 2010) o 6OHDA (Pott Godoy et al., 2008) en la SNpc de ratas adultas y envejecidas (Tarelli, 2013, no publicado). En base a estos antecedentes y al rol reportado de LRRK2 como regulador positivo de la inflamación (Moehle et al., 2012; Russo et al., 2014, 2019), se buscó estudiar el efecto combinado de la expresión de hLRRK2 G2019S en la SNpc y la inflamación periférica sobre la sobrevivencia de las nDAs y la aparición de síntomas motores.

Trabajos previos del laboratorio mostraron que la inyección intravenosa de Ad IL-1 β es efectiva para inducir una respuesta inflamatoria, cuyo pico ocurre a los 5 días luego de la inyección (5dpi) (Murta et al., 2015; Pott Godoy et al., 2008, 2010; Silva et al., 2018). La eficacia de la inyección periférica de Ad IL-1 β para inducir inflamación sistémica se evaluó mediante el recuento del porcentaje de neutrófilos respecto del total de leucocitos en un frotis de sangre de la cola de los animales obtenida 5 días después de la inyección (Fig. 3.2.2). Como era esperado, los animales inyectados con Ad IL-1 β presentaron un porcentaje mayor de neutrófilos en sangre periférica ($27,1 \pm 2,3\%$) luego de 5dpi, en comparación con aquellos que recibieron Ad β -gal ($18,1 \pm 1,5\%$).

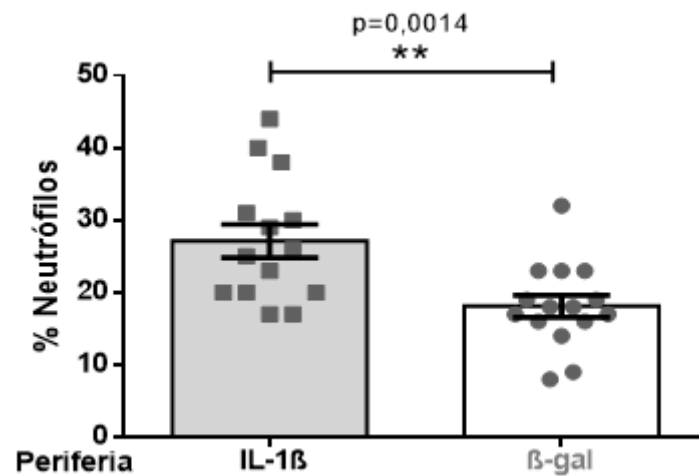


Figura 3.2.2. Inducción de inflamación periférica. El recuento leucocitario en frotis de sangre periférica de ratas adultas, cinco días después de la inyección intravenosa, mostró un porcentaje significativamente mayor (prueba de T; $p=0,0014$; $n=14-15$ por grupo) de neutrófilos respecto de los leucocitos totales en los animales inyectados periféricamente con Ad IL-1 β (IL-1 β) ($27,1 \pm 2,3\%$, $n=14$) comparados con los animales inyectados con Ad β -gal (β -gal) ($18,1 \pm 1,5\%$, $n=15$).

Análisis de la inflamación central

Como se mencionó anteriormente, una de las principales hipótesis del presente trabajo es que la expresión de LRRK2 G2019S en la SNpc de ratas que reciben un estímulo proinflamatorio periférico inducirá una inflamación central

exacerbada, acompañada de neurodegeneración dopaminérgica. En efecto, los animales expresando hLRRK2 G2019S en el cerebro que recibieron la inyección de Ad IL-1 β intravenosa presentaron en promedio una mayor inflamación central, medida como el volumen del infiltrado inflamatorio en cortes teñidos con Violeta de Cresyl, que el resto de los grupos experimentales (Fig. 3.2.3.A y B). Dicho infiltrado estaba formado principalmente por linfocitos y macrófagos, sin presencia de neutrófilos en todos los grupos. Si bien el volumen inflamatorio promedio en el grupo G2019S/IL-1 β ($172,4 \pm 71,9 \text{ mm}^3$) fue entre 6 y 17 veces mayor, a los demás grupos (G2019S/ β -gal: $27,3 \pm 9,4 \text{ mm}^3$; eGFP/IL-1 β : $9,8,2 \pm 3,6 \text{ mm}^3$; eGFP/ β -gal: $14,0 \pm 6,5 \text{ mm}^3$), debido a la gran variabilidad de la respuesta inflamatoria, no existió una diferencia estadísticamente significativa entre estos grupos experimentales. De la misma manera, los efectos de ambos factores (central y periférico) no resultaron estadísticamente significativos. Sin embargo, viendo tanto las imágenes representativas de los cerebros de la Fig. 3.2.3.A como los valores individuales calculados de volumen inflamatorio de la Fig. 3.2.3.B, concluimos que existe un efecto biológico relevante de la combinación de hLRRK2 G2019S central que tiende a exacerbar el impacto de la inflamación periférica en el SNC.

La gran variabilidad observada en el volumen inflamatorio central en el grupo G2019S/IL-1 β no pudo ser explicada por variaciones en la inducción de inflamación periférica entre los animales (Fig. 3.2.2) ya que no existió correlación entre el porcentaje de neutrófilos en sangre periférica y el volumen inflamatorio central (Fig. 3.2.3.C). Por lo tanto, dicha variabilidad podría deberse a variabilidad en la transducción de hLRRK2 G2019S central, o bien a la propia variabilidad biológica entre los animales.

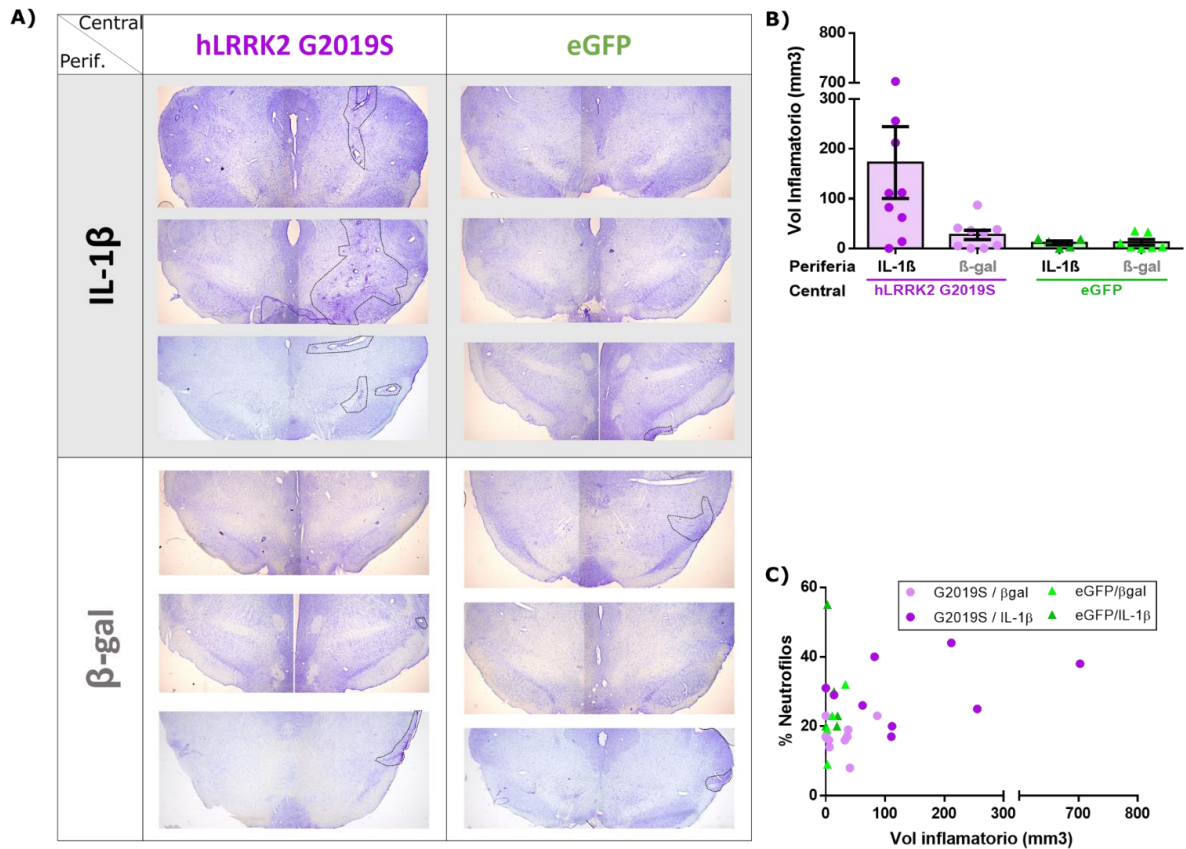


Figura 3.2.3. La expresión de hLRRK2 G2019S central tendió a inducir una mayor respuesta inflamatoria en el SNC ante un estímulo periférico.

A. Imágenes representativas de tres cortes coronales a la altura de la SNpc teñidos con violeta de Cresyl de cada grupo experimental. La línea punteada demarca el área con infiltrado inflamatorio que se midió para calcular el volumen inflamatorio.

B. Los animales inyectados con HC-Ad hLRRK2 G2019S presentaron una clara tendencia a desarrollar un mayor volumen inflamatorio central (G2019S/IL-1β: $172,4 \pm 71,9 \text{ mm}^3$, $n=9$; G2019S/β-gal: $27,3 \pm 9,4 \text{ mm}^3$, $n=9$) que los controles inyectados con HC-Ad eGFP (eGFP/IL-1β: $9,8,2 \pm 3,6 \text{ mm}^3$, $n=6$; eGFP/β-gal: $14,0 \pm 6,5 \text{ mm}^3$, $n=6$) aunque esta tendencia no resulta significativa (factor "Central", $p=0,06$; factor "Periférico", $p=0,13$; interacción, $p=0,11$).

C. Porcentaje de neutrófilos en el frotis a 5dpi de la inyección periférica en función del volumen inflamatorio central. En el caso de los animales del grupo G2019S/IL-1β, la variabilidad en el volumen inflamatorio central no correlaciona con la inducción de inflamación periférica (correlación de Pearson: $R^2= 0,11$; $p=0,38$).

Ensayos comportamentales

Se empleó el test de campo abierto como primer ensayo de comportamiento para evaluar el estado general de los animales, la actividad locomotora espontánea y el comportamiento exploratorio. Una disminución en la exploración total y más tiempo de permanencia cerca de las paredes de la arena pueden indicar problemas motores y/o de comportamiento ansioso. La ansiedad y la depresión son síntomas no motores comunes en la EP y en varios modelos animales de esta enfermedad. La actividad exploratoria, medida por el número de líneas cruzadas por el animal en su camino por la arena (Fig. 3.2.4.A) y el número de alzamientos sobre los miembros traseros (Fig. 3.2.4.B) no mostraron diferencias significativas entre los grupos. Si bien se observa una tendencia en

ambas variables que podría indicar una menor actividad exploratoria en el grupo G2019S/IL- β , el análisis estadístico arroja que en ninguno de los dos casos hubo un efecto significativo de la inyección central o periférica de adenovectores. De manera similar, el tiempo que el animal permanece en los cuadrantes centrales de la arena (Fig. 3.2.4.C) así como el número de deposiciones (Fig. 3.2.4.D) que informan acerca del comportamiento ansioso de los animales, tampoco tuvieron diferencias significativas entre los grupos.

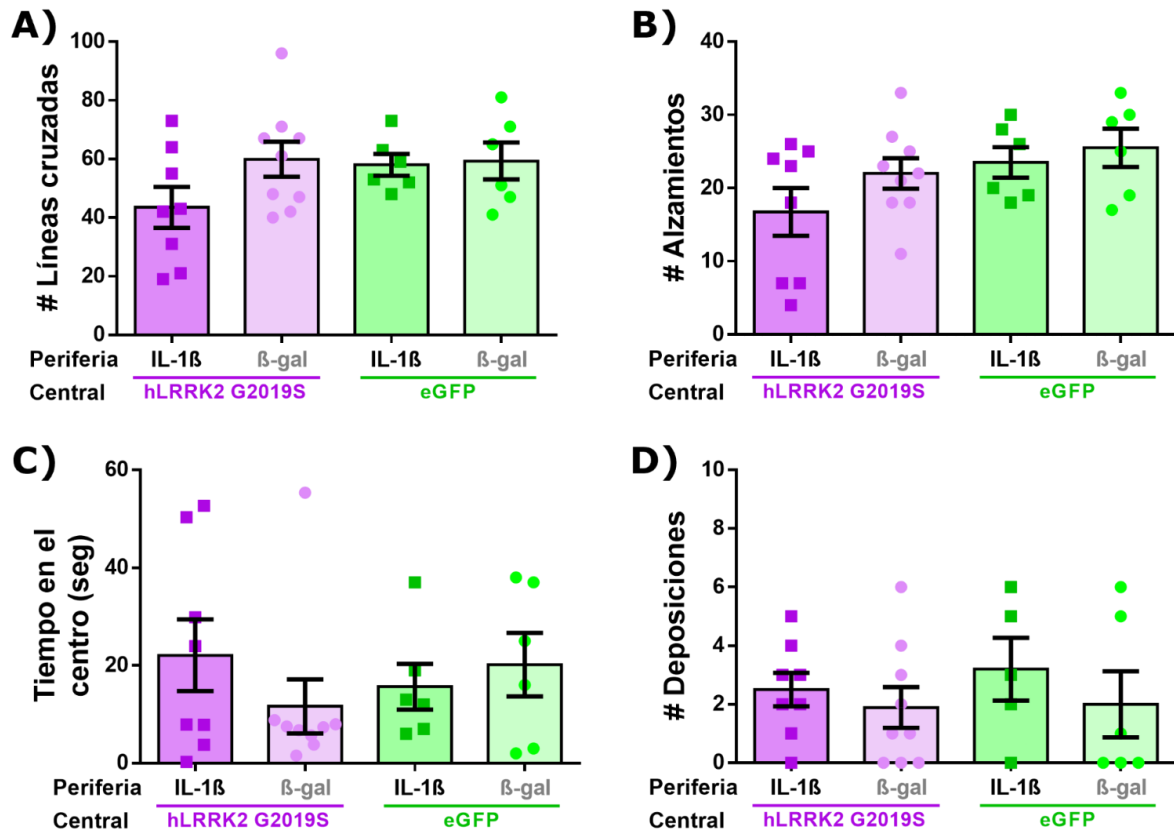


Figura 3.2.4. La expresión de LRRK2 G2019S en la SNpc y la inflamación periférica no generan síntomas relacionados a depresión o ansiedad en ratas adultas. A-D. La expresión central de LRRK2 G2019S y la inflamación periférica inducida por Ad IL-1 β no influyeron significativamente en los parámetros relacionados con la actividad y los síntomas de ansiedad medidos mediante el test de campo abierto (n=6-9). El número de líneas cruzadas durante la exploración de la arena (**A**; factor "Central", p=0,2748; factor "Periférico", p=0,1683; interacción, p=0,2393) así como el número de alzamientos sobre los miembros traseros (**B**); factor "Central", p=0,0657; factor "Periférico", p=0,1854; interacción, p=0,5471) no fueron diferentes entre el grupo G2019S/IL-1 β y los controles. A su vez, el tiempo que los animales permanecieron en los cuadrantes centrales de la arena (**C**; factor "Central", p=0,8714; factor "Periférico", p=0,6453; interacción, p=0,2521) y el número de deposiciones (**D**; factor "Central", p=0,6356; factor "Periférico", p=0,2945; interacción, p=0,7305) tampoco resultaron significativamente diferentes entre los grupos. En todos los casos se graficaron la media (columnas) \pm error estándar junto con los valores individuales. En todos los casos, el estadístico usado fue una prueba de ANOVA de dos vías.

Ensayos motores

A continuación, se evaluaron los posibles efectos de la expresión central de hLRRK2 G2019S, en combinación con inflamación periférica, sobre la aparición de síntomas motores reflejados como un menor movimiento en el miembro delantero contralateral al sitio de inyección central del adenovector. Según la hipótesis de trabajo, se esperaba que los animales del grupo G2019S/IL-1 β presenten menor movilidad en el miembro contralateral a la inyección a causa de la disfunción y/o degeneración dopaminérgica inducida por la neuroinflamación exacerbada por hLRRK2 G2019S. Para esto, se realizó el test de cilindro, que analiza la asimetría en el uso de las patas delanteras como la proporción de contactos con cada una de ellas que el animal hace con las paredes de un contenedor cilíndrico transparente durante los alzamientos exploratorios.

El test de cilindro no evidenció un efecto significativo de la inyección central o bien de la periférica sobre el porcentaje de contactos de la pata contralateral a las paredes del aparato (Fig. 3.2.5.A). En efecto, ninguno de los grupos experimentales presentó un promedio de contactos estadísticamente menor al 50% ni ninguno resultó significativamente diferente entre sí. Una desventaja que presenta este ensayo es que depende de la predisposición del animal de explorar el espacio para que realice los alzamientos y contacte con las patas en las paredes del cilindro. Debido a que no se puede confiar en que la proporción de contactos sea representativa si el número total de contactos es bajo, se tomó como criterio incluir en el análisis sólo aquellos animales que hagan más de cierta cantidad de contactos totales. Si bien en ocasiones se puede considerar un mínimo de 10 ó 15 contactos (Lekic et al., 2012; Schallert & Tillerson, 2000), para este análisis decidimos usar 10 ó 20 contactos mínimos sugerido en bibliografía (Schallert et al., 2000). La figura Fig. 3.2.5.A muestra los resultados obtenidos con el criterio más estricto pero resultados similares se obtuvieron usando un mínimo de 10 contactos como criterio de exclusión (datos no mostrados).

Por otro lado, para complementar los resultados del test de cilindro se utilizó el test de pasos de ajuste. El mismo analiza la capacidad del animal de iniciar y terminar movimientos con uno de sus miembros delanteros, mientras el experimentador lo desplaza sobre una superficie horizontal con el otro miembro delantero inmovilizado. Nuevamente, se espera que los animales que presenten pérdida unilateral de nDa en la SNpc presenten akinesia en el miembro contralateral a la lesión y, por lo tanto, logren ejecutar menos movimientos (pasos) a lo largo del trayecto con ese miembro, en comparación con los animales sin daño, o bien con su propio miembro ipsilateral.

Como se muestra en la Fig. 3.2.5.B, contrario al resultado obtenido en el test de cilindro, sí existió un efecto significativo de la inyección central sobre la movilidad del miembro delantero contralateral. Sin embargo, la dirección de dicho efecto no resulta clara debido a la existencia de un efecto muy significativo de interacción entre el factor central y el periférico. En otras palabras, en los animales expresando eGFP central, aquellos que recibieron Ad IL-1 β intravenoso tendieron a tener menos movilidad en el miembro contralateral a la inyección central (11,7 \pm 0,3 pasos) que aquellos que recibieron Ad β -gal (14,2 \pm 1,2 pasos), aunque la diferencia entre ambos no resultó significativa. Llamativamente, la situación opuesta se dio para los animales que expresaban hLRRK2 G2019S en el SNC. De hecho, las ratas del grupo G2019S/ β -gal dieron menos pasos de ajuste con la pata

derecha ($9,0 \pm 0,7$) que las del grupo G2019S/IL-1 β ($12,0 \pm 0,7$). Este resultado no sólo no era esperado sino que, además, no puede ser explicado por los resultados anteriores.

El resultado del test de pasos de ajuste puede depender mucho de la pericia del operador. Sin embargo, estos tests se realizaron luego de un entrenamiento exhaustivo que da confianza en los resultados. No obstante, para descartar en forma experimental esta variable, se decidió repetir el ensayo con el mismo operador en un modelo de neurodegeneración dopaminérgica unilateral ya establecido usando 6OHDA. En esta ocasión, el resultado fue el esperado, dado que los animales que recibieron la neurotoxina en el fascículo prosencefálico medial (FPM) dieron significativamente menos pasos con la pata contralateral a la lesión ($1,8 \pm 0,8$) luego de 30dpi que los aquellos inyectados con vehículo ($14,7 \pm 1,2$) (Fig. 3.2.5.C). En este ensayo, los animales con 6OHDA presentaron alrededor de un 50% de nDa en la SNpc en el lado inyectado respecto del contralateral, mientras que los controles con vehículo tuvieron el 100% (datos no mostrados). Este resultado valida la ejecución del test de pasos de ajuste y sugiere que el resultado inesperado en el grupo de animales expresando hLRRK2 G2019S central se debe a la variabilidad biológica entre los animales o bien a alguna otra variable no controlada en el experimento.

En resumen, es evidente que, contrario a la predicción de la hipótesis de este trabajo de que la expresión de hLRRK2 G2019S en la SNpc junto con un estímulo inflamatorio periférico induce neurodegeneración dopaminérgica y síntomas motores, no se pudo observar ninguna disfunción de los miembros delanteros de los animales G2019S/IL-1 β en comparación con sus controles.

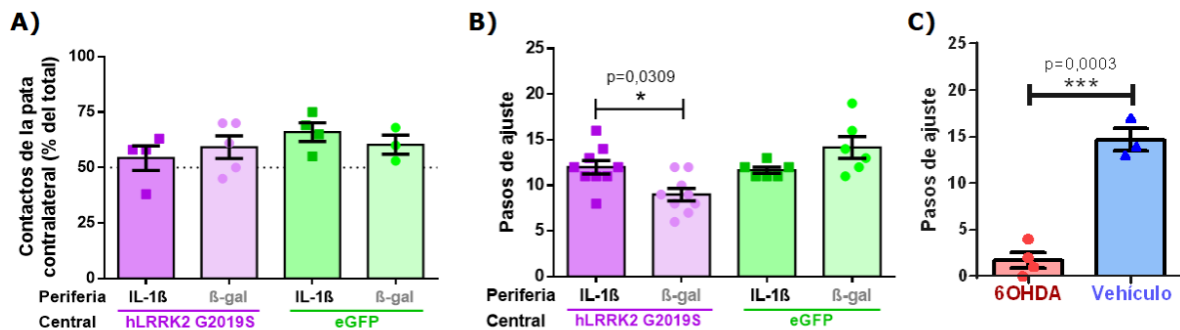


Figura 3.2.5. No se hallaron disfunciones motoras en los animales expresando hLRRK2 G2019S central y Ad IL-1 β periférico.

A. El porcentaje de contactos de la pata contralateral al sitio de inyección central de los HC-Ads (pata derecha) contra la pared del dispositivo en el test de cilindro (G2019S/IL-1 β : $54,2 \pm 5,5\%$, $n=4$; G2019S/ β -gal: $99,2 \pm 5,1\%$ $n=5$; eGFP/IL-1 β : $66,0 \pm 4,2\%$, $n=4$; eGFP/ β -gal: $60,3 \pm 4,3\%$ $n=3$) no resultó diferente entre los tratamientos (factor "Central", $p=0,232$; factor "Periférico", $p=0,945$; interacción, $p=0,320$). La línea punteada indica un 50% de toque con la pata derecha, es decir, igual cantidad de toques con ambas patas. Sólo se incluyeron en el análisis a aquellos animales que realizaran al menos 20 contactos totales con la pared del dispositivo.

B. En el test de pasos de ajuste, existió un efecto significativo de la inyección central sobre la movilidad en aducción (acercamiento al cuerpo) de la pata contralateral (G2019S/IL-1 β : $12,0 \pm 0,7$, $n=9$; G2019S/ β -gal: $9,0 \pm 0,7$ $n=9$; eGFP/IL-1 β : $11,7 \pm 0,3$, $n=6$; eGFP/ β -gal: $14,2 \pm 1,2$ $n=6$) cuya dirección varió entre los grupos experimentales debido a que existió un efecto significativo de interacción con el efecto del tratamiento periférico (factor

“Central”, $p=0,006$; factor “Periférico”, $p=0,758$; interacción, $p=0,002$). En particular, el grupo G2019S/ β -gal tuvo menor movilidad que el grupo G2019S/IL-1 β (comparación múltiple de Tukey, $p=0,031$).

C. Como control de la técnica, el mismo operador realizó el test de pasos de ajuste en animales inyectados unilateralmente con la neurotoxina 6OHDA en el FPM, que presentaron alrededor de un 50% de nDa en el lado inyectado respecto del contralateral. Las ratas con 6OHDA presentaron menor movilidad de aducción en el miembro contralateral a la inyección ($1,8\pm 0,8$, $n=4$) luego de 30dpi respecto a los animales inyectados con vehículo ($14,7\pm 1,2$, $n=3$) (prueba t de dos colas, $p=0,0003$).

En todos los casos se graficaron la media (columnas) \pm error estándar junto con los valores individuales. En todos los casos, salvo que se explicita lo contrario, el estadístico usado fue una prueba de ANOVA de dos vías. Comparaciones múltiples: * $p<0,05$.

Estudio de la sobrevida de nDA

Dado que trabajos anteriores de nuestro laboratorio (Pott Godoy et al., 2008, 2010) y otros (Cabezudo et al., 2020; Dzamko et al., 2015; J. Kim et al., 2017; Y. Liu et al., 2017; Perry et al., 2007) han asociado la neuroinflamación con la neurodegeneración dopaminérgica en modelos de EP, se buscó estudiar si el aumento de inflamación central de los animales con G2019S/IL-1 β tuvo algún impacto en la sobrevida de sus nDa. Para ello, se realizó una IHQ contra TH para marcar las nDa en cortes de SNpc de estos animales y la proporción de neuronas marcadas en el hemisferio inyectado respecto del contralateral fue obtenido según se describe en la Sección 5 de Materiales y Métodos.

A pesar de que las ratas G2019S/IL-1 β tenían mayor volumen inflamatorio, no se presentaron diferencias significativas en el porcentaje de nDa entre ambos hemisferios ($90,7\pm 3,6\%$) con respecto a las G2019S/ β -gal ($95,3\pm 7,7\%$) o a los animales expresando eGFP central ($100,3\pm 6,5\%$ y $98,8\pm 3,9\%$ para IL-1 β y β -gal periférico, respectivamente) (Fig. 3.2.6.A). Haciendo un análisis individual de los animales para intentar correlacionar el grado de inflamación con el porcentaje de neuronas existentes en la SN, vimos que el porcentaje de nDa en el hemisferio ipsilateral no correlaciona con el volumen inflamatorio obtenido en cada animal (Fig. 3.2.6.B). Para ilustrar este punto, el animal que sufrió la mayor inflamación central de todo el grupo G2019S/IL-1 β mostró el mismo número de nDa en el lado inflamado que en el contralateral (Fig. 3.2.6.D). De manera similar, la movilidad del miembro delantero contralateral a la inyección central (medido por el ensayo de pasos de ajuste, ver Fig. 3.2.5.B) tampoco mostró correlación con la inflamación central (Fig. 3.2.6.E).

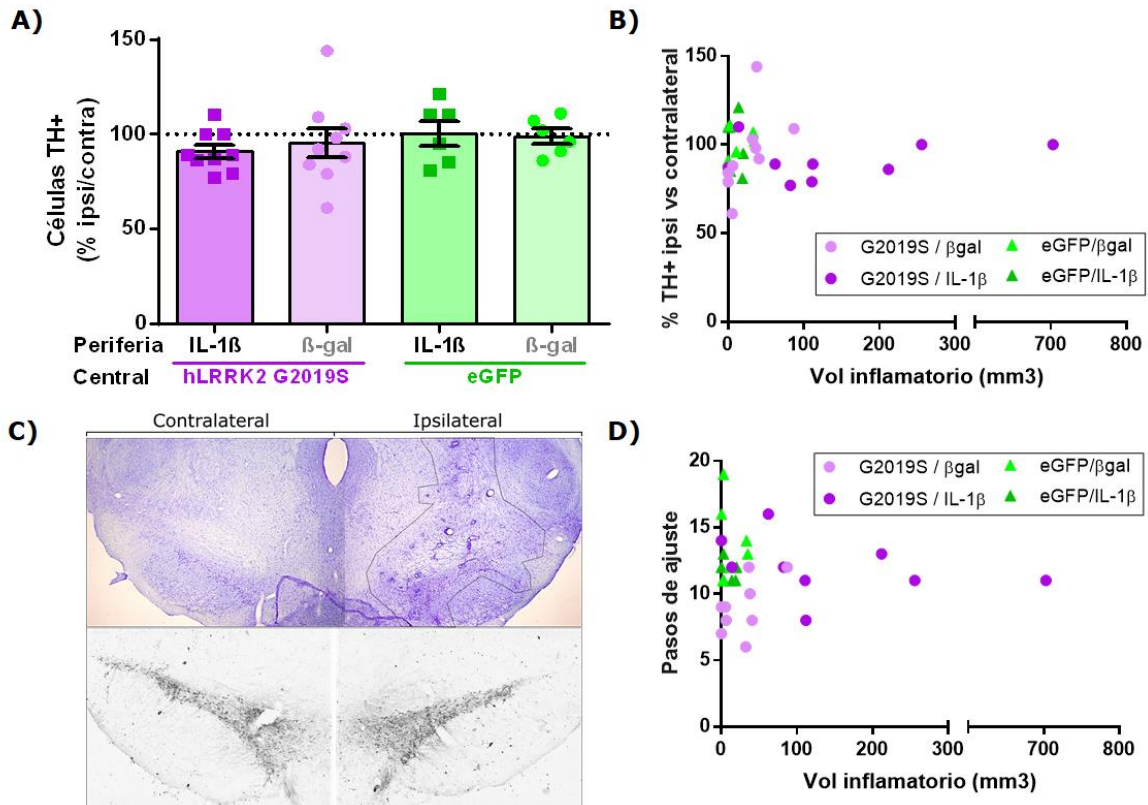


Fig. 3.2.6. La inflamación central en animales G2019S/IL-1β no se correlacionó con neurodegeneración dopaminérgica ni con síntomas motores.

A. El recuento del número de nDa TH+ (G2019S/IL-1β: $90,7 \pm 3,6\%$, $n=9$; G2019S/β-gal: $95,3 \pm 7,7\%$, $n=9$; eGFP/IL-1β: $100,3 \pm 6,5\%$, $n=6$; eGFP/β-gal: $98,8 \pm 3,9\%$, $n=6$) muestra que ninguno de los tratamientos tuvo un efecto significativo en el porcentaje de neuronas en el lado ipsilateral respecto al contralateral al sitio de inyección central (factor "Central", $p=0,901$; factor "Periférico", $p=0,260$; interacción, $p=0,186$). Se graficaron la media (columnas) \pm error estándar junto con los valores individuales y el estadístico usado fue una prueba de ANOVA de dos vías. La línea punteada indica 100% de neuronas en el lado inyectado respecto del contralateral, es decir, mismo número de neuronas en ambos hemisferios.

B. Porcentaje de neuronas TH+ en el hemisferio ipsilateral (respecto del contralateral) en función del volumen inflamatorio central. No se observó correlación entre estas dos variables a nivel global (correlación de Pearson: $p=0,91$) ni dentro de cada grupo (G2019S/IL-1β: $p=0,45$; G2019S/β-gal: $p=0,1$; eGFP/IL-1β: $p=0,58$; eGFP/β-gal: $p=0,35$).

C. Comparación de cortes coronales de la misma región de la SNpc con tinción de Cresyl (arriba) y con IHQ para TH (abajo) de un animal del grupo G2019S/IL-1β con un volumen inflamatorio de 703mm³ en el hemisferio inyectado pero un 100% de neuronas TH+ respecto del hemisferio contralateral.

D. Número de pasos de ajuste del miembro delantero contralateral a la inyección central en función del volumen inflamatorio central. No se observó correlación entre estas dos variables a nivel global (correlación de Pearson: $p=0,84$) ni dentro de cada grupo (G2019S/IL-1β: $p=0,48$; G2019S/β-gal: $p=0,11$; eGFP/IL-1β: $p=0,47$; eGFP/β-gal: $p=0,6$).

En conclusión, a diferencia de lo observado en otros modelos animales con inducción de inflamación central y periférica, los animales expresando hLRR2 G2019S en la SNpc que fueron estimulados periféricamente con Ad IL-1β

presentaron una mayor inflamación en el SNC pero sin disminución significativa de la sobrevivencia de las nDa.

Capítulo 3: “Efecto de la inflamación central y periférica en ratas transgénicas para hLRRK2 G2019S”

En el capítulo anterior se mostró que la expresión de hLRRK2 G2019S mediada por adenovectores en el SNC, particularmente en la SNpc, de ratas adultas no indujo neurodegeneración, pero sí neuroinflamación en respuesta a un estímulo inflamatorio periférico. Como se explicó en la Introducción de esta tesis, LRRK2 se expresa naturalmente no sólo en el SNC sino también en la periferia y en particular en las células del sistema inmune, donde actúa como regulador positivo de la inflamación. De hecho, algunos autores sugieren que los efectos patológicos de las mutaciones de LRRK2 pueden estar asociados a su rol periférico más que a su actividad en el SNC (Kozina et al., 2018). Por estos motivos, en este capítulo se estudió el impacto de estímulos proinflamatorios centrales y periféricos en un modelo animal transgénico expresando hLRRK2 G2019S constitutivamente en todos los tejidos.

Para ello se utilizaron ratas transgénicas con trasfondo Sprague Dawley portando un cromosoma artificial bacteriano (BAC) con el locus completo de hLRRK2 wt o G2019S. Sloan et al., 2016 describieron estos animales y observaron que tanto aquellos que sobreexpresan hLRRK2 wt (Tg_wt) como hLRRK2 G2019S (Tg_GS) no mostraban diferencia fenotípica alguna con los controles no transgénicos (noTg) entre 3 y 6 meses de edad. Sin embargo, los animales Tg_GS envejecidos (18 meses) presentaron deficiencias motoras y cognitivas significativas respecto a sus pares Tg_wt y noTg. Los efectos motores revirtieron con el tratamiento con L-DOPA. Esto sugiere que la mutación G2019S poseería efectos deletéreos progresivos, similar a lo que se observa en pacientes con EP idiopática. Estos defectos estuvieron, además, asociados a alteraciones funcionales de los circuitos dopaminérgicos nigro-estriatales pero sin presencia de muerte neuronal.

Siguiendo con la hipótesis que la inflamación puede exacerbar posibles efectos deletéreos de LRRK2 G2019S, se evaluó si la expresión de IL-1 β central y/o periférica mediada por adenovectores en ratas tg_GS adultas adelanta la

aparición de síntomas motores mediante un aumento de la neuroinflamación y la muerte neuronal dopaminérgica.

El procedimiento experimental para el trabajo con animales para este capítulo de la tesis se detalla en la sección 3.3 de Materiales y Métodos. En todos los casos se emplearon, además de los animales Tg_{GS}, ratas Tg_{wt} para controlar si los efectos observados se deben a la mutación G2019S o a la sobreexpresión de hLRRK2 y también controles noTg de las mismas camadas. En algunos experimentos se incluyó además un cuarto grupo con ratas Sprague Dawley provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA (noTg FVet). Estos animales sirven de control del grupo noTg ya que provienen de una colonia distinta y no poseen relación de parentesco con las ratas transgénicas. Independientemente de su genotipo, los animales fueron inyectados unilateralmente con Ad IL-1 β o Ad β -gal en el fascículo prosencefálico medial (FPM) y 21 días después, todos recibieron Ad IL-1 β intravenoso. De esta manera, quedaron conformados ocho grupos experimentales: Tg_{wt} IL-1/IL-1, Tg_{wt} IL-1/ β -gal, Tg_{GS} IL-1/IL-1, Tg_{GS} IL-1/ β -gal, noTg IL-1/IL-1, noTg IL-1/ β -gal, noTg FVet IL-1/IL-1 β y noTg FVet IL-1/ β -gal.

Genotipificación y secuenciación de los animales transgénicos

Como se mencionó anteriormente, las colonias de animales Tg_{wt} y Tg_{GS} se mantuvieron en hemicigosis, con lo cual fue necesario realizar un estudio de genotipificación utilizando 2 pares de primers diferentes para cada individuo, previo a su utilización en los ensayos. Este ensayo diferencia el hLRRK-2 del endógeno de rata. En la Fig.3.3.1 se muestra un resultado representativo de dicho ensayo con muestras de animales tanto L (con padre Tg_{wt}) como G (con padre Tg_{GS}). Los individuos que presentan las tres bandas se consideran transgénicos (como L73, L74, L75, L77 y L78), mientras que los que no presentan bandas para hLRRK2 pero sí para ciclofilina son considerados noTg (L76, L79 y L80). Aquellos individuos cuyo patrón de bandas no correspondiese a los antes descritos, son re-analizados y, si se mantiene el mismo resultado, son excluidos de los experimentos (como ocurre con G46).

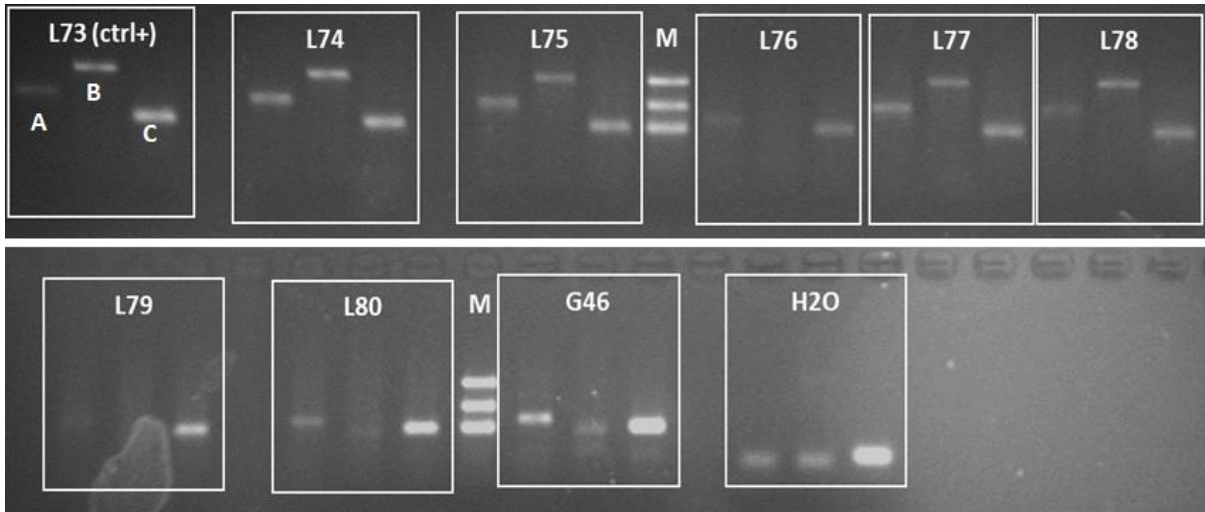


Fig. 3.3.1. Genotipificación representativa de animales L y G. Gel de agarosa con los amplicones de la PCR de genotipificación. Cada cuadro representa un animal. A: LRRK2_ex20, 262pb. B: hLRRK_gDNA_seq2, 414pb. C: cyclophilin, 160pb. H2O: control negativo de la PCR sin templado. M: marcador de peso molecular (160pb, 262pb y 414pb).

A fin de verificar la portación del gen de interés, los animales reproductores tg_wt y tg_GS, junto con dos crías de cada uno, fueron secuenciados en la región de la mutación G2019S (exón 41) usando el amplicón obtenido con los primers hLRRK_gDNA_seq2. Dicha secuenciación fue encargada a la empresa Macrogen. En todos los casos, se verificó el genotipo esperado (Fig. 3.3.2).

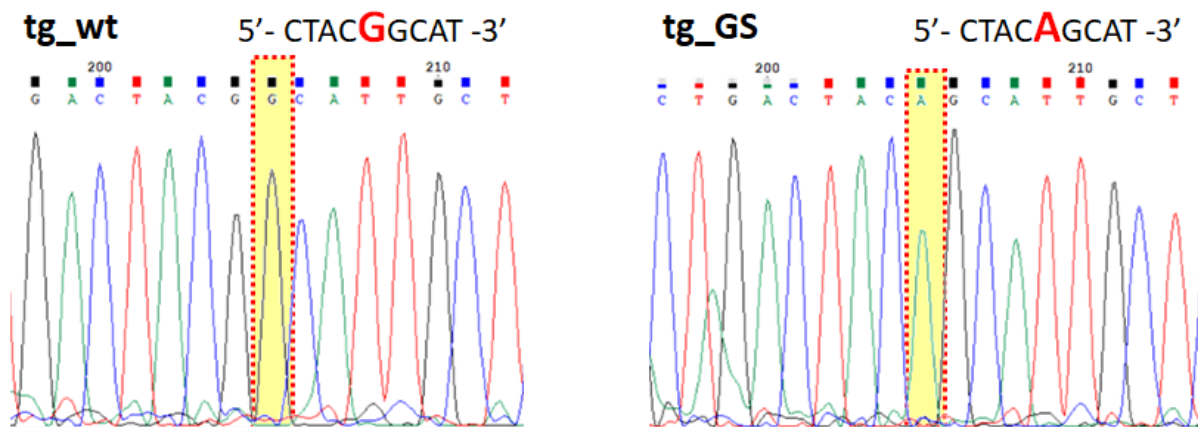


Fig. 3.3.2. Secuenciación de ratas tg_wt y tg_GS. Secuencia obtenida para la región de la del cambio de base G6055A que origina la mutación G2019S para un animal Tg_wt y otro Tg_GS. Arriba se muestra la secuencia esperada para cada genotipo, con la posición 6055 resaltada en rojo. En las figuras, la barra amarilla marca la posición 6055 en el fragmento secuenciado.

Efectividad de la inflamación periférica

La eficacia de la inducción de inflamación periférica en los animales inyectados con Ad IL-1 β intravenoso (tres semanas después de la inyección central con Ad IL-1 β o Ad β -gal) se evaluó mediante recuento leucocitario en frotis de sangre periférica. Dado que en este caso no hubo un grupo control inyectado con Ad β -gal, se comparó el porcentaje de neutrófilos en una muestra basal y 5 dpi de la inyección con Ad IL-1 β de cada animal (Fig. 3.3.3). Efectivamente, el tratamiento con Ad IL-1 β indujo un aumento significativo de la proporción de neutrófilos en todos los grupos de animales estudiados. Asimismo, es interesante ver que no existieron diferencias significativas entre los valores de inflamación basales entre los grupos Tg_wt, Tg_GS y sus controles noTg (Fig. 3.3.3.A). De la misma manera, tampoco se observó un aumento diferencial del porcentaje de neutrófilos en ninguno de los grupos (Fig. 3.3.3.B).

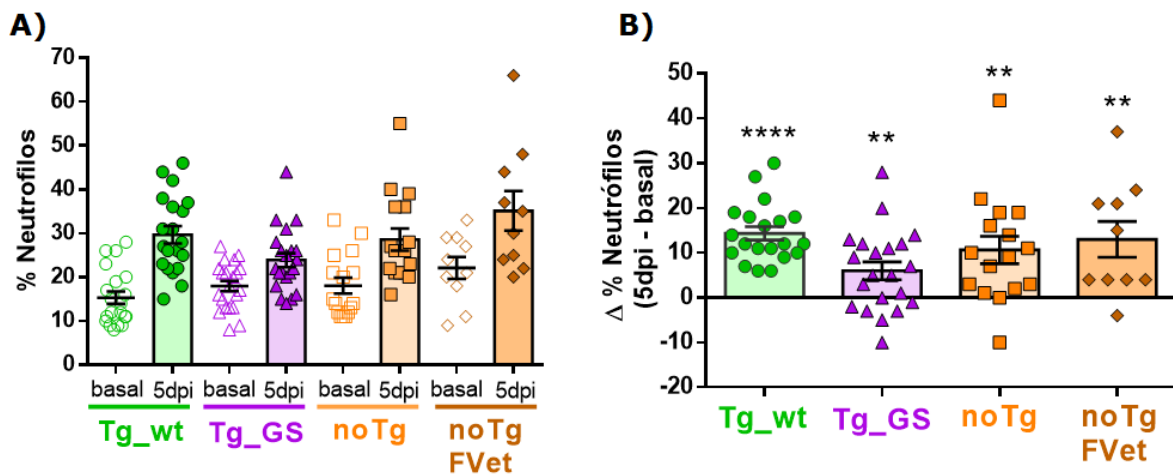


Figura 3.3.3. Estado inflamatorio basal e inducción de inflamación periférica en animales transgénicos para hLRRK2.

A. El recuento leucocitario en frotis de sangre periférica basal y cinco días después de la inyección intravenosa de Ad IL-1 β mostró un efecto significativo del adenovector periférico, que se demuestra como un aumento del porcentaje de neutrófilos en todos los grupos, independientemente del genotipo (ANOVA de dos factores pareado: factor "Ad IL-1 β ", $p < 0,0001$; factor "genotipo", $p = 0,032$; interacción, $p = 0,0511$). No se observaron diferencias significativas en los valores basales ni luego de la inducción de inflamación periférica entre los animales Tg_wt (basal: $15,3 \pm 1,4\%$; 5dpi: $29,7 \pm 2,0\%$, $n = 20$), Tg_GS (basal: $18,0 \pm 1,2\%$; 5dpi: $23,9 \pm 1,6\%$, $n = 21$) y noTg (basal: $18,1 \pm 1,8\%$; 5dpi: $28,6 \pm 2,5\%$, $n = 16$).

B. Las diferencias entre el porcentaje de neutrófilos basal y luego de 5dpi de la inyección intravenosa de Ad IL-1 β confirma la inducción de inflamación periférica en todos los grupos ya que el promedio de las diferencias en cada uno de ellos es significativamente distinto del valor teórico 0% (Prueba t de una muestra: Tg_wt, $p < 0,0001$; Tg_GS, $p = 0,0065$; noTg, $p = 0,0035$; noTgFVet, $p = 0,0100$). Además, la diferencia en el porcentaje de neutrófilos no presentó diferencias entre los genotipos (ANOVA, $p = 0,06$).

En todos los casos, se graficaron la media junto con los valores individuales \pm el error estándar.

Evaluación de citoquinas proinflamatorias periféricas

Adicionalmente, se buscó evaluar si las ratas transgénicas para hLRRK2 presentaban un aumento diferencial de citoquinas proinflamatorias luego de la estimulación periférica con Ad IL-1 β . Para ello se midieron los niveles de ARN mensajero de dos citoquinas pro-inflamatorias, IL-1 β y TNF α , en leucocitos de sangre periférica, 5 días después de la inyección intravenosa con Ad IL-1 β mediante RT-PCR en tiempo real. Vale aclarar que los *primers* empleados para detectar IL-1 β son específicos para el mensajero de rata y no cruzan con homólogo humano, que es transducido por el adenovector.

Tanto los ARN mensajeros de IL-1 β (Fig. 3.3.4.A) como de TNF α (Fig. 3.3.4.B) no presentaron variaciones significativas en los animales transgénicos Tg_wt y Tg_GS respecto de los controles noTg. Este resultado es consistente con el hecho de que tampoco se encontraron diferencias entre estos grupos en el porcentaje de neutrófilos de la fórmula leucocitaria antes ni después del tratamiento con Ad-IL β intravenoso (Fig. 3.3.3). En todos los casos, el nivel de expresión del gen de interés se relativizó al de GAPDH, un mensajero cuya expresión no varía entre los genotipos estudiados (Fig. 3.3.4.C) y que sirvió de control de carga del ensayo. Con este número de animales ensayados, no podemos concluir que el genotipo de los animales influya en la respuesta al Ad IL-1 β .

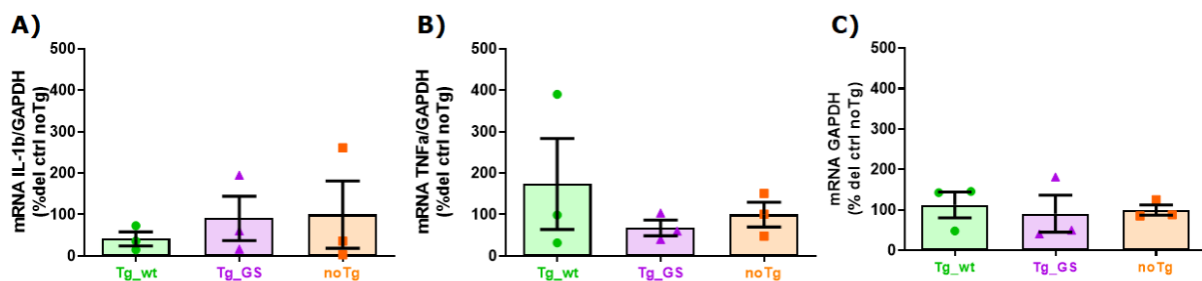


Figura 3.3.4. No se hallaron diferencias en la expresión de citoquinas proinflamatorias en la sangre de las ratas transgénicas para hLRRK2 5 días después de la administración de AdIL-1 β . Niveles de mRNA de citoquinas proinflamatorias en la sangre de animales inyectados con Ad IL-1 β 5 dpi por RT-PCR en tiempo real: IL-1 β (**A.** Tg_wt: 41 \pm 17%, n=3; Tg_GS: 91 \pm 53%, n=3; noTg: 100 \pm 81%, n=3). TNF α (**B.** Tg_wt: 174 \pm 110%, n=3; Tg_GS: 68 \pm 19%, n=3; noTg: 100 \pm 30%, n=3). No se observaron variaciones significativas entre los genotipos (**A.** p=0,776; **B.** p=0,879).

Los datos se analizaron usando el método de $\Delta\Delta\text{Ct}$, corregido por las eficiencias de las PCR. Se utilizó como gen de referencia (housekeeping) GAPDH, cuyos niveles de mRNA no presentaron variación entre los grupos estudiados (**C.** Tg_wt: $113\pm 32\%$, $n=3$; Tg_GS: $91\pm 45\%$, $n=3$; noTg: $100\pm 13\%$, $n=3$; $p=0,877$). Todos los valores se expresan como cantidad relativa o "nivel de cambio" respecto del grupo noTg. En todos los casos se graficaron la media (columnas) \pm error estándar junto con los valores individuales. En todos los casos, salvo que se explicita lo contrario, el estadístico usado fue una prueba de ANOVA de una vía.

Ensayos motores y comportamiento ansioso

Habiendo comprobado la efectividad del tratamiento con Ad IL-1 β intravenoso para inducir inflamación periférica, se procedió a evaluar la aparición de síntomas motores o de comportamiento exploratorio y ansioso en los animales transgénicos.

Ninguno de los grupos de animales mostró defectos en la movilidad de los miembros anteriores en el test de cilindro (Fig. 3.3.5.A). En este caso, tanto el tratamiento con adenovectores en el cerebro, como el genotipo de los animales, no tuvieron efecto evidente alguno sobre el número de toques hechos con la pata contralateral a la inyección central en el cilindro. De hecho, todos los grupos experimentales tocaron aproximadamente la misma cantidad de veces con la pata contralateral a la inyección central que con la ipsilateral (miembro control). En línea con este resultado, tampoco se observaron diferencias significativas en el número de pasos de aducción (acercamiento al cuerpo) en el test de pasos de ajuste entre los tratamientos, ni entre los genotipos (Fig. 3.3.5.B). Si bien tanto en los grupos de animales noTg y noTg FVet, el grupo IL-1 β /IL-1 β tendió a dar menos pasos que el grupo β -gal/IL-1 β , estas diferencias no resultaron significativas en el análisis global. Por otro lado, el número de pasos de abducción (alejamiento del cuerpo) resultó constante entre todos los grupos experimentales (Fig. 3.3.5.C). Dado que no se esperaba que este tipo de movimiento varíe con los tratamientos, este resultado sirve como control de la uniformidad en la manipulación de los animales.

Por otro lado, el test de campo abierto tampoco evidenció diferencias significativas entre los diferentes genotipos de ratas en cuanto a comportamiento exploratorio o ansioso (factor "Genotipo" no significativo) (Fig. 3.3.5.D-G). De manera similar, la inducción de inflamación central y periférica tampoco indujo diferencias significativas en el comportamiento exploratorio, medido por el desplazamiento horizontal, el tiempo que el animal permaneció en el centro y el número de alzamientos (Factor "Tratamiento" no significativo) (Fig. 3.3.5.D, E y F, respectivamente). La única

excepción es el número de alzamientos en el grupo Tg_GS, los cuales fueron significativamente mayores en los animales expresando IL1 β central que en aquellos expresando β -gal. De hecho, una tendencia similar también existió en el número de líneas cruzadas y en el tiempo que el animal permaneció en el centro de la arena. Contrariamente a este resultado y tendencias, los animales inyectados con Ad IL-1 β en el cerebro presentaron un número significativamente mayor de deposiciones que los tratados con Ad- β -gal independientemente de su genotipo (Fig. 3.3.5.G), lo cual es un indicio de comportamiento de tipo ansioso. En resumen, los datos obtenidos no son concluyentes con respecto a adscribir un efecto pro- o anti-ansiógeno a la expresión de IL-1 β central.

Con todo, resulta evidente que la expresión central y periférica de la citoquina proinflamatoria IL-1 β no indujo fenotipos motores o alteraciones claras en el comportamiento de las ratas transgénicas expresando hLRRK2 G2019S o wt ni tampoco en los controles noTg.

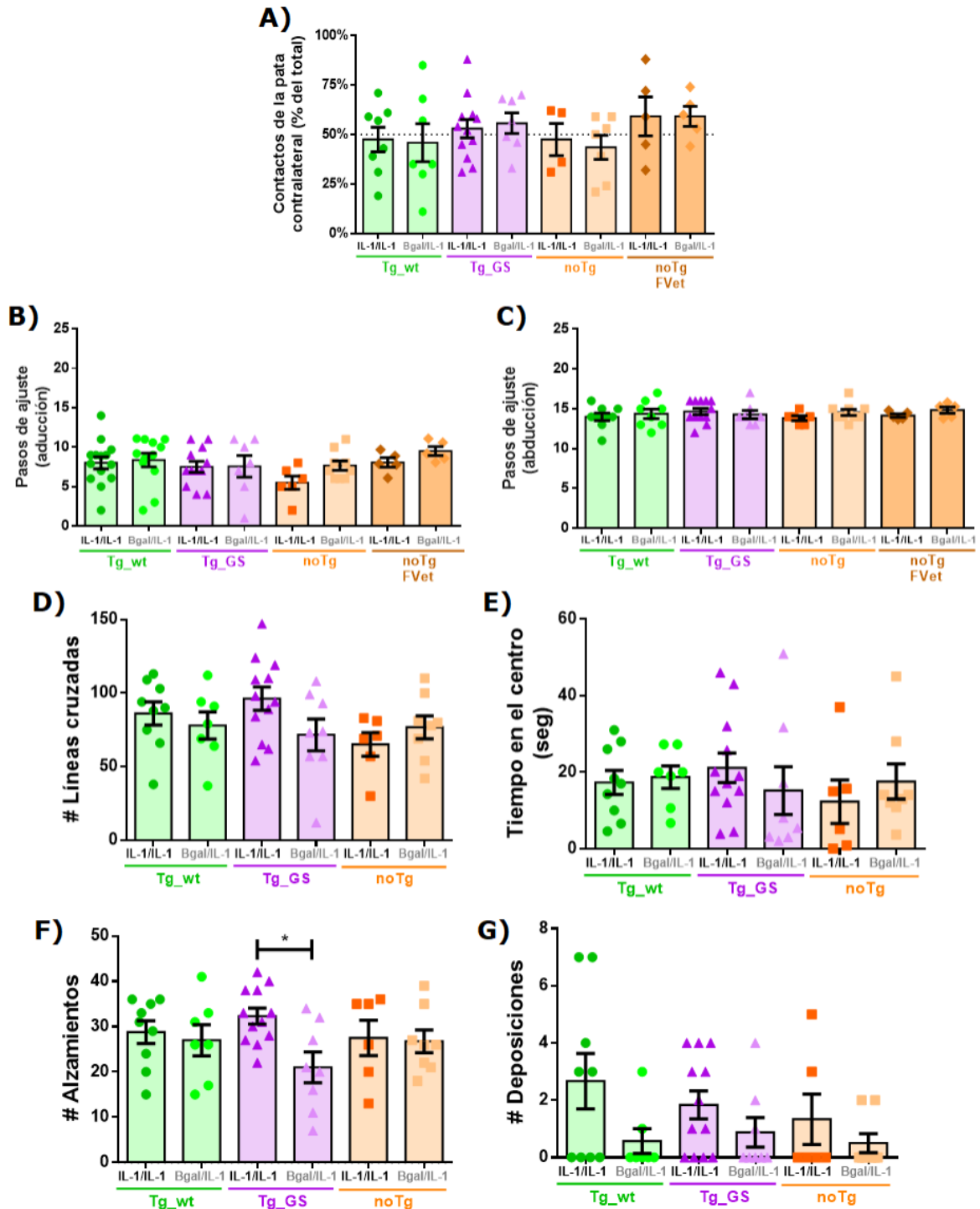


Figura 3.3.5. La expresión central y periférica de Ad IL-1 β no indujo efectos motores o comportamentales consistentes en ninguno de los grupos estudiados.

A. Test de cilindro: El porcentaje de contactos de la pata contralateral al sitio de inyección del adenovector central (pata derecha) contra la pared del cilindro no resultó diferente entre los grupos experimentales (Tg_wt: IL-1 β /IL-1 β , 48 \pm 6%, n=8 y β -gal/IL-1 β , 46 \pm 10%, n=7; Tg_GS: IL-1 β /IL-1 β , 53 \pm 5%, n=12 y β -gal/IL-1 β , 56 \pm 5%, n=7; noTg: IL-1 β /IL-1 β , 48 \pm 8%, n=4 y β -gal/IL-1 β , 44 \pm 6%, n=7; noTg FVet: IL-1 β /IL-1 β , 59 \pm 10%, n=5 y β -gal/IL-1 β , 59 \pm 5%, n=5) (factor "Tratamiento", p=0,865; factor "Genotipo", p=0,342; interacción, p=0,881). La línea punteada indica un 50% de toque con la pata derecha, es decir, igual cantidad de toques con ambas patas. Sólo se incluyeron en el análisis a aquellos animales que realizaran al menos 20 contactos totales con la pared del dispositivo.

B-C. Test de pasos de ajuste: No se encontró un efecto significativo sobre la movilidad en aducción (**B**) de la pata contralateral en ninguno de los grupos experimentales (Tg_wt: IL-1 β /IL-1 β , 8 \pm 0,8, n=14 y β -gal/IL-1 β , 8,4 \pm 0,9, n=12; Tg_GS: IL-1 β /IL-1 β , 7,5 \pm 0,7, n=12 y β -gal/IL-1 β , 7,5 \pm 1,4, n=7; noTg: IL-1 β /IL-1 β , 5,5 \pm 0,8, n=6 y β -gal/IL-1 β , 7,7 \pm 0,6, n=9; noTg FVet: IL-1 β /IL-1 β , 8,1 \pm 0,6, n=5 y β -gal/IL-1 β , 9,5 \pm 0,6, n=5) analizados en su conjunto (factor "Tratamiento", p=0,274; factor "Genotipo", p=0,273; interacción, p=0,551). En el movimiento opuesto (abducción) (**C**) de la pata contralateral a la inyección central, los grupos experimentales mostraron aún más constancia en su movilidad (factor "Tratamiento", p=0,413; factor "Genotipo", p=0,787; interacción, p=0,645).

D-G. Test de campo abierto: la sobreexpresión de hLRRK2 G2019S o wt y los tratamientos con adenovectores central y periférico no tuvieron efectos consistentes sobre el comportamiento exploratorio y los parámetros relacionados con ansiedad. El número de líneas cruzadas durante la exploración de la arena (**D**. factor "Tratamiento", p=0,339; factor "Genotipo", p=0,324; interacción, p=0,142) así como el número de alzamientos sobre los miembros traseros (**E**. factor "Tratamiento", p=0,949; factor "Genotipo", p=0,746; interacción, p=0,453) no fueron diferentes entre los grupos. De manera similar, el tiempo que los animales permanecieron en los cuadrantes centrales de la arena tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos (**F**. factor "Tratamiento", p=0,949; factor "Genotipo", p=0,746; interacción, p=0,453). Por otro lado, la expresión central de IL-1 β indujo un aumento significativo del número de deposiciones (**G**. factor "Tratamiento", p=0,020; factor "Genotipo", p=0,592; interacción, p=0,580), lo cual podría indicar un aumento del comportamiento ansioso en este tratamiento, independientemente del genotipo.

En todos los casos se graficaron la media (columnas) \pm error estándar junto con los valores individuales. En todos los casos, el estadístico usado fue una prueba de ANOVA de dos vías.

Inflamación central

La ausencia de deficiencias motoras en todos los grupos de animales estudiados podría indicar que, o bien el tratamiento con Ad IL-1 β central y periférico no logró generar neuroinflamación (IL-1 β /IL-1 β = β -gal/IL-1 β), o bien sí lo hizo (IL-1 β /IL-1 β > β -gal/IL-1 β), pero ésta no fue suficiente para desencadenar fallas en el circuito dopaminérgico, aún en presencia de hLRRK2 G2019S, como se esperaba. Para verificar esto, se estudió la presencia de infiltrado inflamatorio en cortes de la SNpc de los animales usando la tinción de Nissl con violeta de Cresyl. No se observaron diferencias entre los animales expresando IL-1 β o β -gal central en los grupos Tg_wt, Tg_GS y noTg, ni entre

dichos grupos entre sí (Fig. 3.3.6.A). Todos los grupos, aún los inyectados con Ad β -gal, presentaron un volumen inflamatorio de entre aproximadamente 100 y 280mm³ en promedio. Llamativamente, los animales con Ad β -gal central tuvieron más infiltrado inflamatorio del esperado, incluso llegando a volúmenes similares a los del grupo con Ad IL-1 β central.

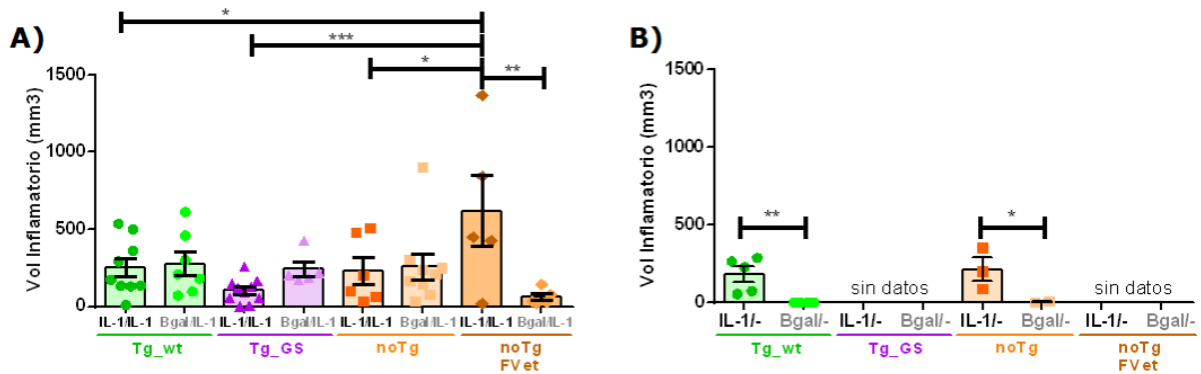


Figura 3.3.6. Los animales transgénicos para hLRRK2 no muestran susceptibilidad diferencial a la neuroinflamación.

A. Análisis de la inflamación central de animales con estimulación periférica.

Ninguno de los tres grupos de animales provenientes de padres transgénicos (tg_wt, tg_GS y noTg) mostró un mayor volumen inflamatorio central que los otros (factor "Tratamiento", $p=0,142$; factor "Genotipo", $p=0,357$; Interacción, $p=0,003$). Llamativamente, la expresión central de IL-1 β indujo un aumento del volumen de infiltrado inflamatorio central respecto aquellos expresando β -gal en el grupo noTg Fvet (IL-1 β /IL-1 β : $619\pm 228\text{mm}^3$, $n=5$; β -gal/IL-1 β : $61\pm 23\text{mm}^3$, $n=5$), pero no en las noTg (IL-1 β /IL-1 β : $231\pm 86\text{mm}^3$, $n=6$; β -gal/IL-1 β : $257\pm 85\text{mm}^3$, $n=9$) ni en los animales transgénicos Tg_wt (IL-1 β /IL-1 β : $253\pm 60\text{mm}^3$, $n=9$; β -gal/IL-1 β : $277\pm 75\text{mm}^3$, $n=7$) o Tg_GS (IL-1 β /IL-1 β : $104\pm 25\text{mm}^3$, $n=10$; β -gal/IL-1 β : $241\pm 47\text{mm}^3$, $n=5$).

B. Análisis de la inflamación central de animales sin estimulación periférica. Los animales analizados 21 días después de la inyección central de los adenovectores y sin haber recibido estimulación periférica, mostraron un claro aumento del volumen inflamatorio central en aquellos cerebros que expresaban IL-1 β respecto de los que expresaban β -gal (factor "Tratamiento", $p=0,001$; factor "Genotipo", $p=0,472$; Interacción, $p=0,771$), al menos en los grupos Tg_wt (IL-1 β /IL-1 β : $183\pm 49\text{mm}^3$, $n=5$; β -gal/IL-1 β : $0\pm 0\text{mm}^3$, $n=6$) y noTg (IL-1 β /IL-1 β : $214\pm 76\text{mm}^3$, $n=3$; β -gal/IL-1 β : $5\pm 5\text{mm}^3$, $n=2$), ya que no se disponen de datos para el resto.

En todos los casos se graficaron la media (columnas) \pm error estándar junto con los valores individuales. En todos los casos, salvo que se explicita lo contrario, el estadístico usado fue una prueba de ANOVA de dos vías. Comparaciones múltiples: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Para investigar este efecto inesperado de la inyección central del Ad β -gal, se realizó un ensayo en el cual se inyectaron animales con Ad IL-1 β o Ad β -gal en el FPM, sin estímulo periférico. Los mismos fueron sacrificados 3 semanas después de la inyección central. El análisis de los cortes de cerebro teñidos con Violeta de Cresyl en estos animales evidenció que la expresión de β -gal mediada por

adenovector en el cerebro no induce neuroinflamación *per se* o al menos la misma no se sostiene hasta ese tiempo (Fig. 3.3.6.B). Por el contrario, y como se esperaba, los cerebros expresando IL-1 β mostraron volúmenes inflamatorios significativamente mayores. Este escenario resulta cierto tanto para animales Tg_wt como noTg. De los otros dos grupos no se poseen datos. Es evidente, entonces, que el infiltrado inflamatorio observado en los animales β -gal/IL-1 β es consecuencia de la inflamación periférica y no del tratamiento central con Ad β -gal. Sin embargo, llama la atención el hecho que, en los animales que ya presentaban cierta inflamación central a causa de la expresión de IL-1 β , la inflamación periférica no haya inducido un aumento comparable del infiltrado inflamatorio central (Tg_wt: 183 \pm 49mm³ y 253 \pm 60mm³; noTg: 214 \pm 76mm³ y 231 \pm 86mm³ para β -gal/- y β -gal/IL-1 β , respectivamente).

Por otro lado, en los animales noTg FVet, que no guardan relación de parentesco con el resto de los grupos, el tratamiento IL-1 β /IL-1 β tuvo un volumen de infiltrado inflamatorio significativamente mayor tanto respecto a su grupo control β -gal/IL-1 β como también con respecto a los otros genotipos con IL-1 β /IL-1 β (Fig. 3.3.6.A).

Estos resultados sugieren que podría existir un factor común entre las ratas cuyos padres son transgénicos independientemente de la expresión de LRRK-2 que hace que éstas respondan como se esperaba al tratamiento central con adenovectores pero no cuando se agrega el tratamiento periférico. Identificar dicho factor no resulta posible con los datos disponibles y requerirá de más experimentos que exceden este trabajo. Sin embargo, algo resulta claro y es el hecho que, independientemente de por qué el grupo noTg se comporta de manera diferente al noTg FVet en cuanto a la respuesta neuroinflamatoria, la expresión de hLRRK2 G2019S no afectó la respuesta inflamatoria central (medida como volumen de infiltrado inflamatorio) en este modelo de ratas transgénicas.

Sobrevida de nDa

A continuación, se evaluó la sobrevida de las nDa de la SNpc mediante inmunomarcación de TH en secciones de cerebro y posterior conteo semi-automático de neuronas TH+ con ayuda de un macro de FIJI desarrollado para tal fin. En concordancia con la ausencia de fenotipos motores, ninguno de los grupos

evaluados mostró una disminución significativa en el número de nDa en el hemisferio inyectado respecto del contralateral (Fig. 3.3.7.A). De manera similar a lo que ocurrió con el infiltrado inflamatorio, los animales que recibieron Ad IL-1 β central, no presentaron diferencias respecto de aquellos inyectados con Ad β -gal. Notablemente, esta situación también se repite en los animales noTg FVet, en los cuales la expresión de IL-1 β central sí indujo una inflamación mayor respecto de β -gal.

Para convalidar este resultado, el recuento de neuronas TH+ se realizó asimismo de manera manual (Fig. 3.3.7.B). Este chequeo se realizó en los animales noTg IL-1 β /IL-1 β y noTg FVet IL-1 β /IL-1 β , donde se esperaba que hubiera una menor nDa en el hemisferio inyectado, y en las noTgFVet β -gal/IL-1 β como control. En los tres grupos los resultados obtenidos mediante el macro de FIJI fueron prácticamente iguales al conteo manual, lo cual refuerza la validez de los resultados obtenidos anteriormente.

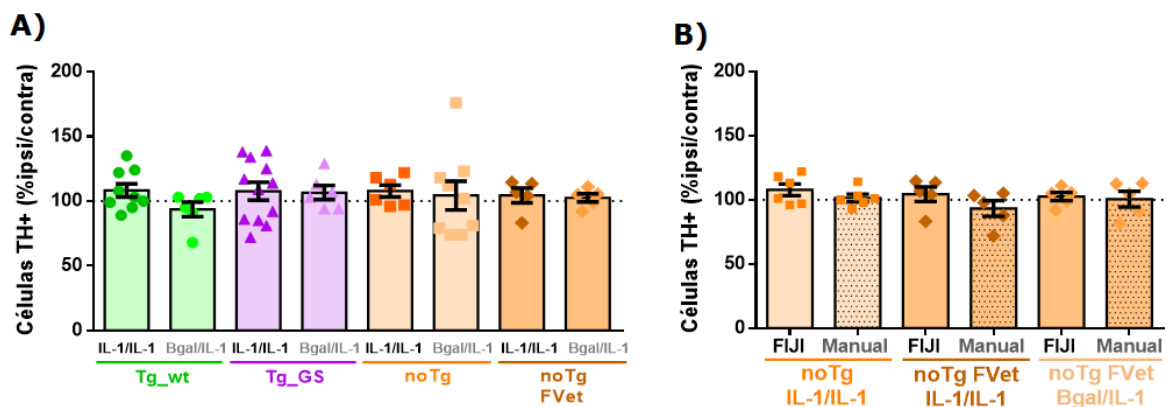


Figura 3.3.7. La expresión central y periférica de Ad IL-1 β no indujo neurodegeneración dopaminérgica en ninguno de los genotipos de animales.

A. La expresión central y periférica de IL-1 β no tuvo un efecto significativo en el porcentaje de neuronas dopaminérgicas en el lado ipsilateral respecto al contralateral al sitio de inyección central en ninguno de los genotipos analizados (factor "Tratamiento", $p=0,223$; factor "Genotipo", $p=0,501$; Interacción, $p=0,451$). Recuento semi-automático del número de células TH+ en la SNpc usando el software FIJI

B. Comparación del % de células TH+ para algunos de los grupos experimentales. En ninguno de los casos analizados se vio una diferencia significativa entre ambos métodos (Prueba de t pareada: noTg IL-1 β /IL-1 β , $p=0,167$; noTg Fvet IL-1 β /IL-1 β , $p=0,058$; noTg Fvet β -gal/IL-1 β , $p=0,654$). Método de conteo semi-automático usando FIJI y por conteo manual.

En todos los casos se graficaron la media (columnas) \pm error estándar junto con los valores individuales. En todos los casos, salvo que se explicita lo contrario, el estadístico usado fue una prueba de ANOVA de dos vías.

Estos resultados apuntan a que la combinación de Ad IL1- β central y periférico, en las dosis y tiempos empleados en este trabajo, resulta subóptima para inducir neurodegeneración en este modelo animal. No obstante, es interesante notar que aún si el modelo de neurodegeneración no funcionó como se esperaba, estos datos siguen rechazando la hipótesis que la presencia de hLRRK2 G2019S genere una exacerbación de la respuesta inflamatoria que desemboque en muerte neuronal y/o alteraciones motoras.

Capítulo 4: “Influencia de la edad sobre el efecto de LRRK2 G2019S”

La edad es el mayor factor de riesgo conocido no sólo para la enfermedad de Parkinson sino también para muchas otras enfermedades neurodegenerativas (Costantini et al., 2018; Rea et al., 2018; Spittau, 2017). Además, se ha reportado que la edad avanzada empeora los síntomas motores y el daño neuronal inducido por hLRRK2 G2019S (Sloan 2016, Lee 2015, Ho 2018, Kritsinger 2018). Un posible factor para explicar este fenómeno es el hecho que la microglía en los cerebros envejecidos se encuentra en un estado diferente asociado a la inflamación asociada a la edad (“inflammaging”, en inglés) (Luo et al., 2010; Norden & Godbout, 2013; Spittau, 2017). Los datos de los capítulos anteriores demostraron que la expresión de LRRK2 G2019S en ratas jóvenes adultas con inflamación periférica no induce neurodegeneración en las nDA ni problemas motores. Sin embargo, es posible hipotetizar que los efectos pro-inflamatorios de LRRK2 G2019S central y de IL-1 β periférico se ven exacerbados en los cerebros envejecidos, más reactivos a la inflamación periférica. Por ejemplo, en ratones envejecidos inyectados con HC-Ad-LRRK_G2019S en el cuerpo estriado se observó muerte neuronal, astrogliosis y reclutamiento microglial, lo cual no ocurrió en animales jóvenes bajo el mismo tratamiento (Kritsinger et al., 2018). Trabajos previos de nuestro laboratorio también han demostrado que la SNpc de ratas envejecidas presenta neurodegeneración clara de nDa en un modelo de inyección central de 6OHDA con Ad IL-1 β periférico que, de otra forma, resulta un daño marginal en individuos adultos (Fig. 3.4.1) (Tarelli 2013, no publicado).

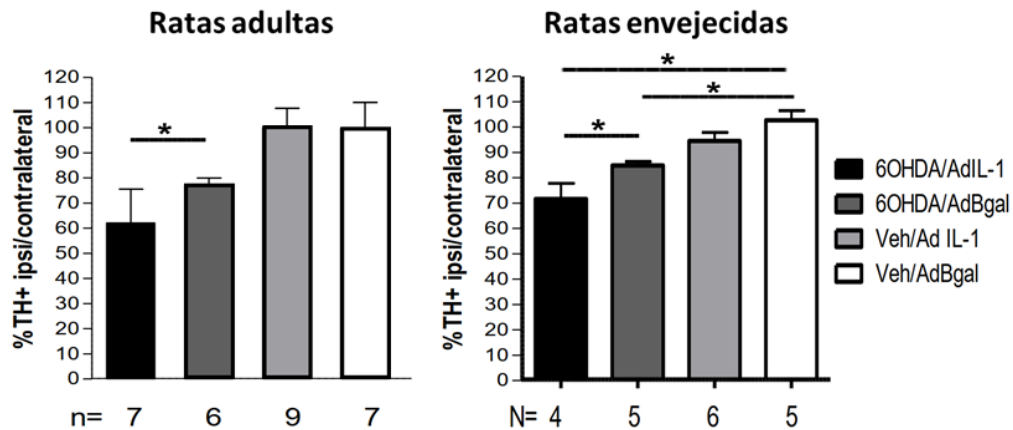


Figura 3.4.1. La edad avanzada aumenta la susceptibilidad de las nDa al tratamiento con 6OHDA central y Ad IL-1 β periférico. La toxina 6OHDA *per se* genera muerte neuronal dopaminérgica marginal en individuos adultos pero significativa en animales envejecidos (6OHDA/Veh). En ambos grupos, la inflamación periférica inducida por Ad IL-1 β exacerba el daño central. Adaptado de Tarelli, 2013 (no publicado).

Por lo tanto, en esta sección de la tesis, nuestro objetivo fue evaluar el impacto de la expresión de LRRK2 G2019S en la SNpc de ratas añosas con inflamación periférica inducida por Ad IL-1 β sobre la neuroinflamación y la sobrevivencia de las nDa. Para llevarlo a cabo, se utilizaron ratas Wistar macho de 13 meses de edad, las cuales fueron tratadas con un protocolo similar al usado para las ratas adultas del Capítulo 2. Brevemente, los animales fueron inyectados con HC-Ad-hLRRK2_G2019S (n=7) o HC-Ad-eGFP (n=9) en la SNpc y tres semanas después, todos ellos fueron inyectados en la vena de la cola con Ad IL-1 β . Los ensayos comportamentales fueron llevados a cabo durante la semana previa al sacrificio de los animales, en el día 35 luego de la operación central.

Inducción de inflamación central y periférica.

Primeramente, se verificó la eficacia de la inducción de inflamación sistémica por la expresión de IL-1 β , mediante el recuento de leucocitos de sangre periférica de las ratas envejecidas 5 días después de la inyección periférica. El porcentaje de neutrófilos en estos animales aumentó de 22 \pm 6%, antes de la inyección de Ad IL-1 β , a 31 \pm 5%, (Fig. 3.4.2.A). Este aumento da cuenta de que se logró la expresión de la proteína IL-1 β en sangre, con el consiguiente reclutamiento de neutrófilos.

Por otro lado, se analizó el volumen del infiltrado inflamatorio en los cerebros de estas ratas envejecidas. La medición del área de inflamación en

secciones de cerebro a la altura de la SNpc teñidas con Violeta de Cresilo evidenció un mayor volumen inflamatorio en los animales expresando hLRRK2 G2019S central ($137,4 \pm 43,0 \text{mm}^3$) que en los controles con eGFP ($0,78 \pm 0,53 \text{mm}^3$) (Fig. 3.4.2.B). A diferencia con lo observado en las ratas adultas, en este caso, la exacerbación de la inflamación mediada por hLRRK2 G2019S sí resultó significativa, probablemente debido a una mayor sensibilidad de los cerebros envejecidos a desarrollar una respuesta inflamatoria. Este mayor volumen inflamatorio fue claramente consecuencia de la expresión de hLRRK2 G2019S, y no simplemente un efecto de la expresión periférica de IL-1 β ya que, en todos los casos, el hemisferio contralateral a la inyección central no mostró evidencia alguna de infiltrado inflamatorio.

Activación microglial

Dado que se espera que los cerebros de animales envejecidos presenten una respuesta microglial exacerbada ante la inflamación, el paso siguiente fue investigar el estado de activación de la microglía en los animales inyectados centralmente con HC-Ad-LRRK_G20192 con Ad IL-1 β periférico. La inmunomarcación de los cortes de cerebro correspondientes a la región de la SNpc mostraron un mayor número de células positivas para MHC-II (Fig. 3.4.2.C). Debido a la dificultad técnica de contar el número de células marcadas y al gran tamaño del área inmunoreactiva, se procedió a hacer un ranking doble ciego ordenando los cerebros en orden ascendente de área positiva para MHC-II (Fig. 3.4.2.D). El análisis estadístico del ranking mediante la prueba U de Mann-Whitney confirmó que la diferencia entre los grupos experimentales resultaba significativa ($p=0,035$), siendo los cerebros del grupo G2019S/IL-1 β los que presentaron mayor activación microglial.

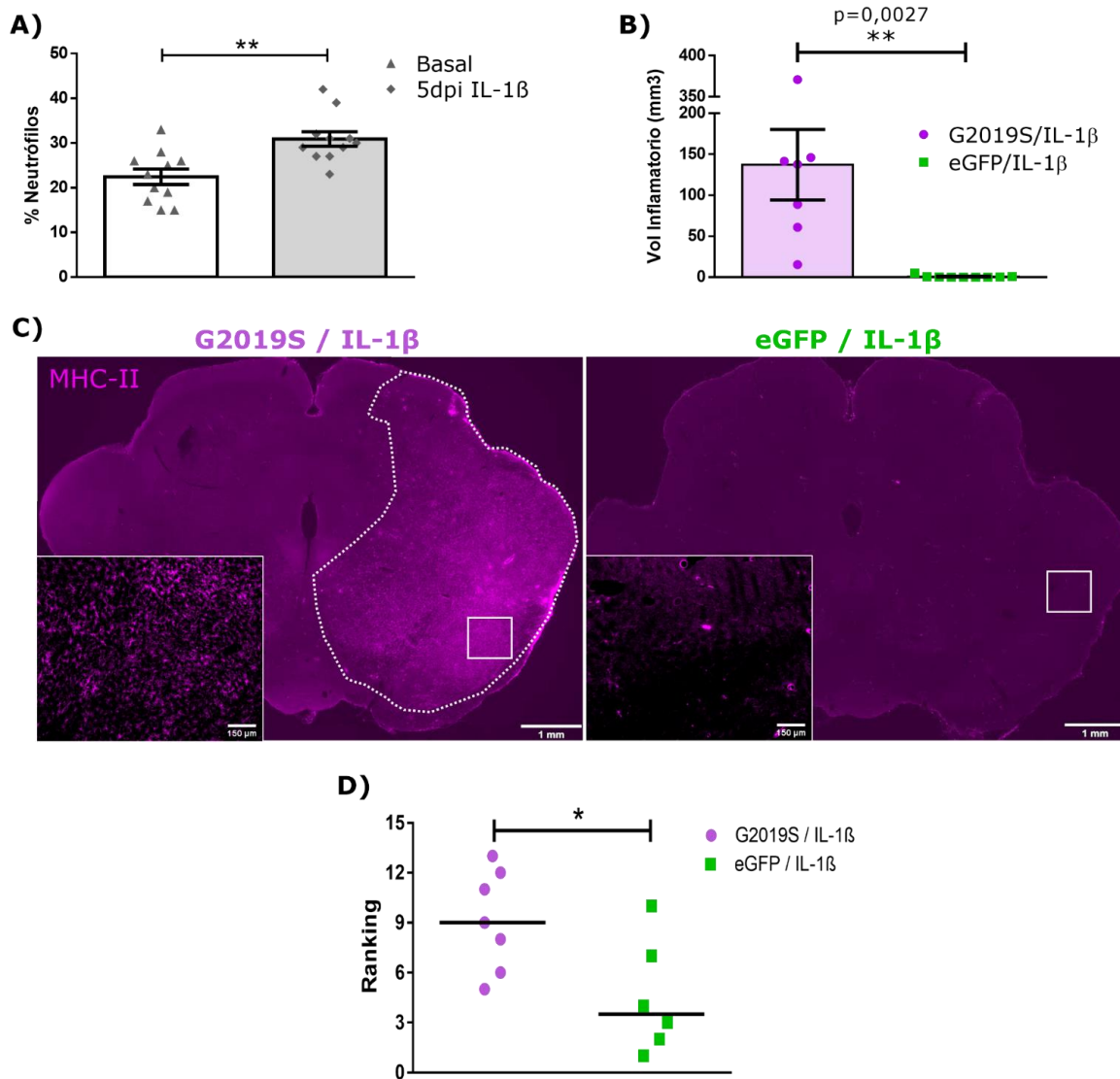


Figura 3.4.2. LRRK2 G2019S indujo inflamación y activación microglial en ratas envejecidas con inflamación periférica.

A. El recuento leucocitario en frotis de sangre periférica de ratas antes (Basal) o cinco días después de la inyección intravenosa de Ad IL-1 β (5dpi IL-1 β) muestra que dicha inyección indujo un aumento significativo del porcentaje de neutrófilos respecto de los leucocitos totales (prueba de T pareada; $p=0,0044$; $n=11$ por grupo).

B. Volumen de la región presentando infiltrado inflamatorio, medido en secciones de cerebro a la altura de la SNpc teñidas con Violeta de Cresilo, en el hemisferio inyectado (en todos los casos el hemisferio contralateral no presentó evidencia de inflamación). Se observa que los animales expresando hLRRK2 G2019S presentan un volumen inflamatorio significativamente mayor ($137,4 \pm 43,0 \text{ mm}^3$, $n=7$) que los animales control expresando eGFP ($0,78 \pm 0,53 \text{ mm}^3$, $n=9$) (prueba t con dos colas no pareada, $p=0,0027$). Tanto en **A** como en **B** se grafica la media \pm error estándar junto con los valores individuales.

C. Las imágenes representativas de IHF contra MHC-II muestran una mayor área de activación microglial (línea punteada) en los animales G2019S/IL-1 β que en los eGFP/IL-1 β . Barra de escala: 1mm. Recuadro: detalle de la morfología microglial. Barra de escala: 150 μ m.

D. El ranking en doble ciego del área inmunoreactiva para MHC-II en las regiones adyacentes a la SNpc de los animales indican que aquellos que sobreexpresan hLRRK2 G2019S presentan una mayor activación microglial (prueba U de Mann Whiney de dos colas, $p=0,035$). La barra horizontal indica la mediana.

Estudios comportamentales

Test de campo abierto

La actividad locomotora espontánea, así como también el comportamiento ansioso, se cuantificaron mediante el test de campo abierto. La actividad exploratoria, medida por el número de líneas cruzadas por el animal en su camino por la arena (Fig. 3.4.3.A) y el número de alzamientos sobre los miembros traseros (Fig. 3.4.3.B) no variaron entre las ratas con HC-Ad-LRRK2_G2019S central (33 ± 8 líneas y 13 ± 3 alzamientos) o con HC-Ad-eGFP (37 ± 9 líneas y 14 ± 4 alzamientos). De la misma manera, el tiempo que el animal permanece en los cuadrantes centrales de la arena (Fig 3.4.3.C) así como el número de deposiciones (Fig 3.4.3.D), ambos parámetros del estado ansioso de los animales, no tuvieron diferencia significativa entre ambos grupos.

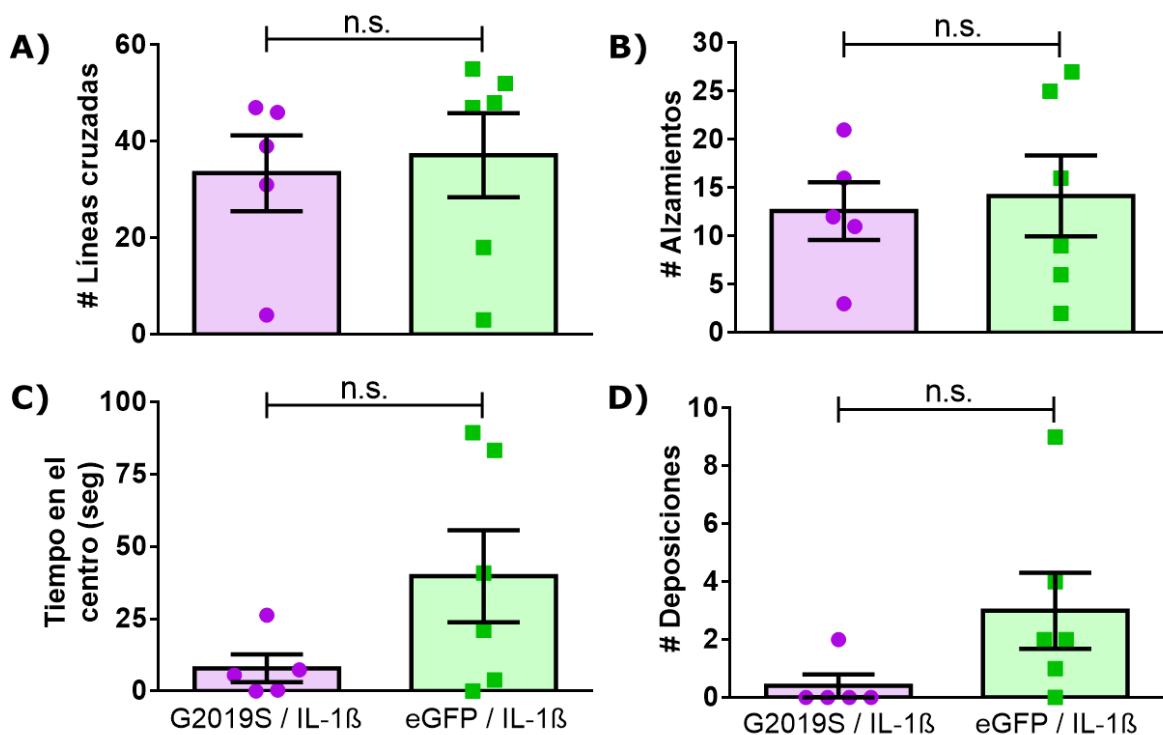


Figura 3.4.3. Las ratas envejecidas expresando LRRK2 G2019S en la SNpc con inflamación periférica no presentan deficiencias en el comportamiento exploratorio o signos de ansiedad. El test de campo abierto no evidenció diferencias en el comportamiento ansioso entre ambos grupos. El número de líneas cruzadas durante la exploración de la arena (C, $p=0,8876$) así como el número de alzamientos sobre los miembros traseros (D, $p=0,9348$) no fueron diferentes entre el grupo G2019S/IL-1 β y el grupo control. A su vez, el tiempo que los animales permanecieron en los cuadrantes centrales de la arena (E, $p=0,1292$) y el número de deposiciones (F, $p=0,0967$) tampoco resultaron significativamente diferentes entre ambos grupos.

Síntomas motores

A continuación, y con el fin de evaluar la aparición de síntomas motores en estos animales, se evaluó la movilidad del miembro delantero contralateral al sitio de inyección central (pata derecha) mediante dos ensayos independientes. En el test del cilindro (Fig. 3.4.4.A), los animales G2019S/IL-1 β emplearon la pata derecha para contactar con la pared del cilindro un $44\pm 9\%$ de las veces, de manera similar a los del grupo eGFP/IL-1 β , que lo hicieron un $50\pm 4\%$. El hecho de que aproximadamente el 50% de los contactos hayan sido efectuados con la pata derecha indica que los animales no presentan problemas motores unilaterales y, en consecuencia, emplean indistintamente una pata o la otra. A su vez, el ensayo de pasos de ajuste (Fig. 3.4.4.B) tampoco mostró diferencias entre los grupos en el movimiento de aducción de la pata delantera derecha ($15,8\pm 1,5$ y $13,0\pm 1,5$ pasos para G2019S/IL-1 β y eGFP/IL-1 β , respectivamente).

Sobrevida de nDA

Finalmente, el análisis histológico de la SNpc mediante inmunomarcación para TH (Fig. 3.4.4.C y D) mostró que la sobrevida de las nDA en el hemisferio inyectado resultó prácticamente idéntica al del hemisferio contralateral (no inyectado), para ambos grupos ($102\pm 4\%$ de nDa en el lado ipsi- respecto del contralateral para G2019S/IL-1 β y $97\pm 6\%$ para eGFP/IL-1 β).

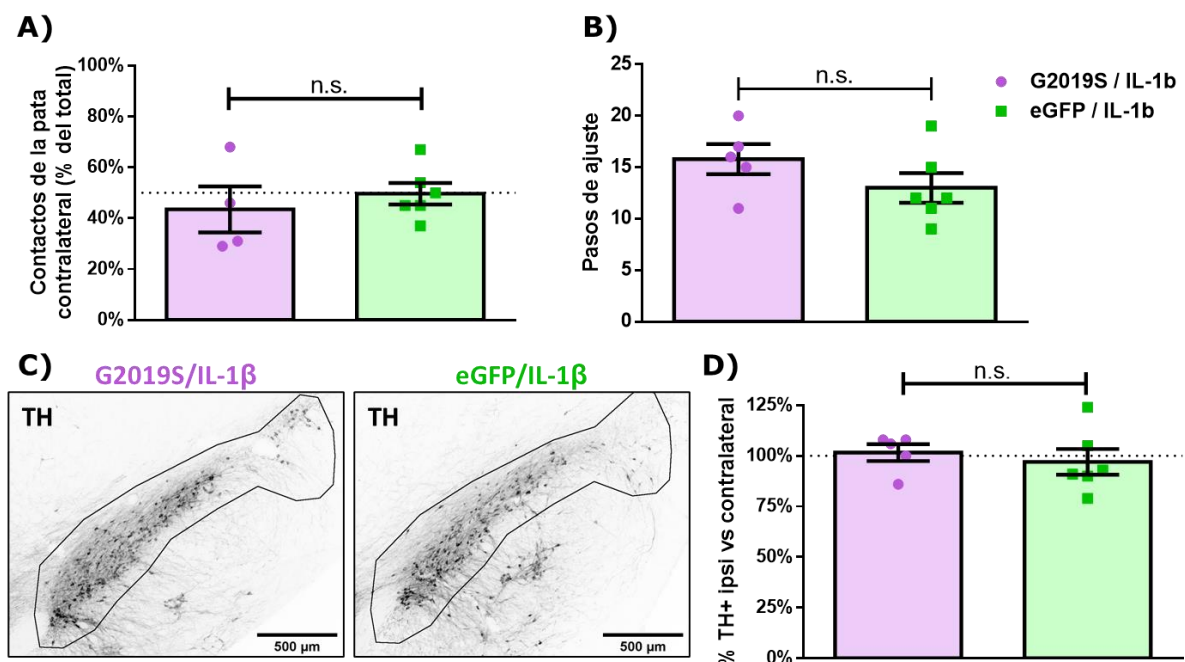


Figura 3.4.4. Las ratas envejecidas expresando G2019S/IL-1 β no presentan síntomas motores ni neurodegeneración dopaminérgica.

A. El porcentaje de contactos de la pata contralateral al sitio de inyección central de los HC-Ads contra la pared del dispositivo en test de cilindro no resultaron diferentes entre los grupos ($p=0,5046$). La media de ambos grupos no fue significativamente diferente al valor teórico de 50% graficado con línea punteada (prueba t con 2 colas, $p=0,5266$ para G2019S/IL-1 β y $p=0,6462$ para eGFP/IL-1 β).

B. El número de pasos de ajuste de la pata contralateral en aducción no resultó diferente entre los grupos ($p=0,1042$).

C. Imágenes representativas de cortes de la SNpc (línea negra) ipsilateral al sitio de inyección con las nDa marcadas con TH (negro). Barra de escala: 500 μ m.

D. La cuantificación del porcentaje total de nDa en el lado ipsilateral respecto al contralateral al sitio de inyección muestra que no existen diferencias significativas entre los grupos ($p=0,5787$). En todos los casos se graficaron la media (columnas) \pm error estándar junto con los valores individuales. En los casos donde no está aclarado, el estadístico utilizado fue una prueba t con dos colas no pareada. $n=4-6$.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se puede concluir que la expresión de LRRK2 G2019S en la SNpc de ratas envejecidas con inflamación periférica induce una mayor respuesta neuroinflamatoria, acompañada por un aumento de la activación microglial, evidenciado por una mayor inmunomarcación para MHC-II, respecto del grupo control con eGFP. Sin embargo, esta inflamación no estuvo acompañada por muerte o disfunción de las nDa, como se puede observar en el recuento de células positivas para TH en el lado inyectado o en la falta de síntomas motores.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se buscó estudiar el rol de la mutación G2019S de la proteína LRRK2 como estímulo que exacerbe la inflamación en el SNC y sus implicancias sobre la neurodegeneración dopaminérgica y los síntomas motores en tres modelos animales de la enfermedad de Parkinson (EP).

El primer modelo ensayado fueron ratas macho adultas (de 3 meses) con expresión de hLRRK2 G2019S en la SNpc, mediada por vectores adenovirales *high capacity*, y con un estímulo inflamatorio periférico dado por la expresión de IL-1 β , mediada por una adenovector de primera generación. El segundo modelo fueron ratas transgénicas expresando hLRRK2 G2019S o wt, a las cuales se les inyectó el vector Ad IL-1 β en el fascículo proencefálico medio (FPM) y de manera intravenosa, con el fin de inducir inflamación central y periférica, respectivamente. Finalmente, el último modelo utilizado fue similar al primero, pero esta vez empleando ratas envejecidas de más de 12 meses de edad.

En todos los modelos, no se observaron deficiencias motoras en los animales ni muerte neuronal dopaminérgica en la SNpc a los tiempos evaluados en los animales control pero tampoco en aquellos que sobre expresaban hLRRK2 G2019S. Ambos modelos con expresión de transgenes mediada por adenovectores evidenciaron un mayor infiltrado inflamatorio en el SNC en respuesta a la expresión periférica de IL-1 β dependiente de la expresión de hLRRK2 G2019S. En las ratas envejecidas también se demostró un mayor nivel de activación microglial en el grupo G2019S/IL-1 β . Sin embargo, aún ese escenario de alta reactividad microglial y alto grado de infiltrado inflamatorio, no se hallaron evidencias de disfunción neuronal en la SNpc desde el punto de vista comportamental. Por otro lado, en los animales transgénicos, no se encontraron diferencias en la inducción de inflamación central o periférica por IL-1 β en animales expresando hLRRK2 G2019S respecto de aquellos con hLRRK2 wt o incluso con los controles no transgénicos.

En conjunto, estos resultados apuntan a que LRRK2 G2019S en efecto podría exacerbar la respuesta inflamatoria en el SNC. No obstante, no fue posible corroborar que esta inflamación central exacerbada estuviera acompañada por muerte neuronal ni defectos comportamentales bajo las condiciones ensayadas.

Conclusiones sobre las dificultades para la generación de vectores adenovirales para expresar hLRRK2

En el primer capítulo se describe el trabajo realizado para obtener vectores adenovirales de primera generación, con el fin de emplearlos para expresar LRRK2 salvaje (Ad LRRK2_wt), LRRK2 G2019S (Ad LRRK2_GS) o una proteína fluorescente (Ad RedRed) como control en la SNpc de ratas. Si bien los controles de calidad de los constructos genéticos de partida fueron buenos (Fig. 3.1.1 y 3.1.4.A) y hasta se logró satisfactoriamente producir el adenovector control, no fue posible obtener adenovectores Ad LRRK2_wt o Ad LRRK2_GS (Fig. 3.1.5.B). Llamativamente, en ambos casos sí se lograron obtener virus ensamblados capaces de replicar en células Hek293, evidenciado por la inducción de efecto

citopático (Fig. 3.1.1). Esto indica que efectivamente se produjo la recombinación de brazo derecho (BD) del virus con los constructos cargados con el cDNA de LRRK2 para producir un genoma viral completo y capaz de replicar en células que transcomplementen E1a. Tanto para Ad LRRK_wt como para Ad LRRK2GS, se verificó la presencia del cDNA de LRRK2 (Fig. 3.1.4.B) y, para este último, incluso se verificó la presencia de la mutación puntual G2019S por secuenciación (Fig. 3.1.4.C), lo cual no fue posible para el Ad LRRK2_wt. Finalmente, no fue posible probar que células transducidas con estos vectores expresasen la proteína hLRRK2. Debido a lo dicho anteriormente, se buscó una alternativa para expresar hLRRK2 G2019S en animales y se obtuvo, mediante una colaboración, un adenovector *gutless* de tercera generación que sí era capaz de expresar LRRK2 G2019S (HC-Ad_LRRK2_G2019S, Fig. 3.1.5.B). Por lo tanto, se decidió no continuar con los esfuerzos para obtener los adenovectores de primera generación.

Una posible explicación para la incapacidad de Ad LRRK2_wt y GS de expresar la proteína LRRK2 en células podría ser la contaminación con Ad β -gal, del cual se obtiene el BD necesario para el ensamblado de los virus. Esta contaminación, generaría una competencia entre el Ad β -gal y el Ad LRRK2 para ingresar a las células, lo cual disminuiría la eficiencia en la expresión de LRRK2 (Danthinne & Imperiale, 2000). Sin embargo, no es probable que este sea el caso dado que no sólo no se evidenciaron restos del genoma completo del virus Ad β -gal en la preparación del BD (Fig. 3.1.2) sino que además tampoco se observó reactividad en el ensayo de X-gal en ninguno de los clones seleccionados (Fig. 3.1.4.D). El análisis de bandeo de restricción también confirmó que el Ad LRRK2_GS no presentaba ninguna de las bandas características del gen de LacZ presentes en el Ad β -gal (Fig. 3.1.5).

En el mismo bandeo de restricción, llamó la atención la ausencia de una banda de 3,2Kpb predicha para el cDNA de LRRK2 al ser cortado con EcoR V. Entonces, existe la posibilidad que durante la recombinación del BD con el ADN lineal conteniendo la secuencia de LRRK2 G2019S haya ocurrido un rearrreglo genético que deletionara un fragmento del gen de interés. Una posible causa de este rearrreglo podría ser el gran tamaño del inserto de LRRK2, que lleva a un tamaño del genoma viral (7,8Kpb) muy cercano al límite de empaquetamiento del adenovector (8,2Kpb), lo cual favorece la probabilidad de rearrreglos genéticos (Bett et al., 1993). Esta hipótesis explicaría el hecho de haber podido obtener partículas virales completas que contienen la región de la mutación (ya que fue posible detectarla por PCR y hasta secuenciarla) pero no pueden expresar la proteína y cuyo genoma no libera el fragmento predicho al ser digerido con EcoR V. Para corroborar esta hipótesis, se podría secuenciar el genoma completo de ambos adenovectores. Sin embargo, al disponer del HC-Ad-LRRK2_G2019S se optó por no continuar por ese camino y, en su lugar emplear el adenovector de tercera generación para expresar la proteína de interés en ratas.

La sobre-expresión de LRRK2 seguida de inflamación periférica induce neuroinflamación sin muerte neuronal

En el segundo capítulo, se trabajó con un modelo de sobre-expresión de hLRRK2 G2019S mediada por adenovectores high capacity (HC-Ads) en la SNpc de ratas adultas (Fig. 3.2.1) y con inflamación periférica inducida por Ad IL-1 β intravenoso (Fig. 3.2.2). Cabe destacar que con la estrategia empleada se logró la expresión de los transgenes de interés en la región de la SNpc, pero no en las neuronas dopaminérgicas TH+. Esta observación podría explicarse en parte por el tropismo impredecible de los vectores basados en adenovirus serotipo 5. Se ha reportado que estos vectores transducen preferencialmente células gliales y en general resultan poco eficientes para transducir neuronas (Kügler et al., 2003; T. B. Lewis et al., 2010), sin embargo, trabajos previos reportaron tropismo neuronal (Le Gal La Salle et al., 1993). No obstante, dado el rol extensamente reportado de LRRK2 en la respuesta inflamatoria de las células microgliales (Moehle et al., 2012; Russo et al., 2014, 2018, 2019), consideramos que la falta de expresión neuronal de LRRK2 no impide el estudio del impacto de la expresión de LRRK2 G2019S y la inflamación periférica sobre las nDa de la SNpc.

Un trabajo empleando adenovectores para expresar LRRK2 bajo el control de un promotor neuronal en la SNpc logró una transducción del 30% de las neuronas TH+ inyectando el adenovector en seis puntos diferentes del cuerpo estriado en ratas (Dusonchet et al., 2011). De manera similar, Lee et al., 2010 lograron expresar LRRK2 en un 50% de las neuronas TH+ de la SNpc inyectando un vector viral basado en el virus del herpes en el estriado de ratones. No obstante, la estrategia de inyectar los vectores en el estriado para lograr expresión de LRRK2 específicamente en las nDa de la SNpc mediante transporte retrógrado no siempre ha resultado efectiva. Usando los mismos vectores y la misma estrategia de *delivery* que Dusonchet et al., 2011, un estudio posterior no logró expresión de LRRK2 en la SNpc (Tsika et al., 2015). De manera similar, en el trabajo de Kritzinger et al., 2018, donde describen los adenovectores *high-capacity* empleados en esta tesis, la inyección de los HC-Ads en el estriado de ratones no fue efectiva para expresar LRRK2 en la SNpc. Por ese motivo es que en este trabajo decidimos optar por una vía más directa e inyectar los vectores directamente en la SNpc de los animales.

En el presente trabajo, los animales del grupo G2019S/IL-1 β presentaron mayor infiltrado inflamatorio central, compuesto principalmente por macrófagos y linfocitos, que el resto de los grupos experimentales (Fig. 3.2.3). Este resultado está en línea con la hipótesis experimental y con otros trabajos publicados que reportan mayor inflamación en cerebros con LRRK2 G2019S en respuesta a estímulos pro-inflamatorios (Kozina et al., 2018; Moehle et al., 2015; Russo et al., 2018; Schildt et al., 2019). No obstante, a pesar de presentar mayor infiltrado inflamatorio, los animales G2019S/IL-1 β no mostraron diferencias en la actividad motora del miembro delantero contralateral a la inyección respecto del resto de los grupos experimentales, según los tests de cilindro de ajuste de paso (Fig. 3.2.5). Además, ninguno de los grupos de animales evaluados presentó disminución del comportamiento exploratorio o signos de ansiedad (Fig 3.2.4). Consistentemente con estos resultados, no se encontró una disminución del

número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc del hemisferio inyectado en ningún grupo (Fig. 3.2.6). Hasta el momento, este sería el primer reporte de un modelo murino de sobre-expresión de LRRK2 G2019S en la SNpc inducido por vectores virales que no presenta neurodegeneración. Cabe aclarar que, a diferencia de lo reportado previamente (Dusonchet et al., 2011; Kritzinger et al., 2018; Nguyen et al., 2020), en el presente trabajo, la inyección central de adenovectores *per se* no indujo inflamación del tejido cerebral circundante (Fig. 3.2.3 y 3.4.1). Esta diferencia podría deberse al empleo, en dichos trabajos, de metodologías más invasivas que las empleadas aquí (una única inyección con capilar de vidrio) lo cual podría contribuir al daño neuronal observado en aquellos modelos. De esta manera, el aumento de la inflamación central en el grupo G2019S/IL-1 β no estuvo acompañado por un proceso de neurodegeneración dopaminérgica. Esta observación no sólo es contraria a la hipótesis de este trabajo, sino que también es llamativa dado el gran número de publicaciones que relacionan la neuroinflamación con la neurodegeneración en general.

En este sentido, resultados previos de nuestro laboratorio muestran que la inflamación inducida por expresión de TNF α (De Lella Ezcurra et al., 2010) o IL-1 β (Ferrari et al., 2006; Pott Godoy et al., 2010) mediada por adenovectores en la SNpc está asociada a activación microglial y a la pérdida de nDa en el hemisferio inyectado. En el caso de IL-1 β , además, se comprobó que el tratamiento antiinflamatorio con dexametasona logra prevenir neuroinflamación, la muerte neuronal y los síntomas motores (Pott Godoy et al., 2010). De manera similar, otro trabajo de nuestro laboratorio también vinculó a la inflamación en la SNpc con la exacerbación de la muerte neuronal dopaminérgica en un modelo de toxicidad por 6OHDA agudizado por inyección de dosis subtóxicas de LPS en la SNpc (Pott Godoy et al., 2008). Nuevamente en este caso, tanto el tratamiento antiinflamatorio con dexametasona como la inhibición de la actividad de IL-1 β previnieron parcialmente la pérdida neuronal.

Como ya se mencionó anteriormente, muchos autores apuntan a la inflamación como la responsable de la neurotoxicidad mediada por LRRK2 G2019S. En este sentido, Moehle y colaboradores mostraron que la inflamación inducida por LPS en la SNpc induce mayor activación microglial, reclutamiento de células inmunes periféricas y muerte neuronal dopaminérgica en ratas transgénicas expresando LRRK2 G2019S que en sus contrapartes no transgénicas (Moehle et al., 2015). Los autores, además señalan el hecho que las células mieloides circulantes de las ratas LRRK2 G2019S poseían una mayor respuesta quimiotáctica y capacidad de migración al SNC como evidencia a favor del rol de la inflamación en la neurotoxicidad inducida por esta proteína mutante.

Sin embargo, no es la primera vez que se reporta inflamación central en un modelo animal en ausencia de neurodegeneración. En un trabajo previo de tesis doctoral en nuestro laboratorio, De Lella Ezcurra (2010) observó que la inyección de Ad TNF α en el fascículo prosencefálico medial (FPM) inducía la expresión de esta citoquina en la SNpc acompañada de infiltrado inflamatorio periférico pero sin muerte de neuronas TH+ hasta 21 dpi (resultados no publicados). Sin embargo, en el mismo trabajo, la autora hipotetiza que este escenario se debe a que la expresión de la citoquina en la SNpc no fue suficiente, por lo que procedió a inyectar el Ad TNF α directamente en dicha región, lo cual sí indujo neuroinflamación acompañada de neurodegeneración.

Una posible explicación de los resultados obtenidos es, entonces, que los niveles de neuroinflamación observados en los animales del grupo G2019S/IL-1 β no hayan sido suficientes para desencadenar neurotoxicidad en el tiempo ensayado. Algo similar plantean Schildt y colaboradores en un trabajo reciente en el cual emplean una única dosis de LPS i.p. como estímulo inflamatorio periférico en ratas transgénicas sobre-expresando LRRK2 G0291S (Schildt et al., 2019). En este modelo, los autores observaron neuroinflamación exacerbada en la corteza y la región ventral del cerebro (medido por PET scan) pero no en el estriado. Consecuentemente, estos animales no sufrieron pérdida de neuronas TH+ en la SNpc hasta 10 meses después del estímulo inflamatorio. Esta neuroinflamación recién se hizo evidente a los 6 meses de la inyección de LPS y continuó aumentando hacia el final del experimento. En consecuencia, los autores sugirieron la hipótesis de que múltiples exposiciones a LPS y/o la edad avanzada de los animales podrían resultar efectivamente en una vulnerabilidad diferencial de los portadores de la mutación a la neuroinflamación y la muerte de nDa.

LRRK2 G2019S no exacerba la respuesta inflamatoria central o periférica a IL-1 β ni desencadena neurodegeneración en animales transgénicos

En el tercer capítulo de esta tesis, se emplearon ratas transgénicas sobre-expresando hLRRK2 wt (tg_wt) o bien G2019S (tg_GS) con un modelo de neurodegeneración inducido por expresión central y periférica de la citoquina proinflamatoria IL-1 β , bien establecido en nuestro laboratorio (Pott Godoy et al., 2010; Silva et al., 2018). Dado que estos animales expresan hLRRK2 constitutivamente con una distribución similar a la del humano (Sloan et al., 2016), este modelo permite incluir la contribución del impacto de la proteína mutada en el sistema inmune a la respuesta inflamatoria central. Como controles del modelo, se emplearon animales no transgénicos tanto con (noTg) o sin (noTg FVet) parentesco con los animales transgénicos y también animales de todos los genotipos inyectados con Ad β gal central.

La inyección intravenosa de Ad IL-1 β logró inducir inflamación periférica (medida como aumento en el porcentaje de neutrófilos circulantes) en todos los animales, pero ninguno de los grupos transgénicos mostró un mayor aumento diferencial respecto de los controles (Fig. 3.3.3). Adicionalmente, análisis de los niveles de mensajeros de citoquinas proinflamatorias endógenas IL-1 β y TNF α no mostraron diferencias significativas entre los mismos grupos (Fig. 3.3.4). Además, tampoco se hallaron diferencias entre los niveles basales de neutrófilos circulantes en las ratas transgénicas o sus controles noTg. Con todo, resulta claro que la sobre expresión de hLRRK2 G2019S o wt no afectó la inflamación periférica de los animales ni tampoco la respuesta inflamatoria inducida por IL-1 β .

Estos resultados son llamativos ya que, en humanos, los portadores asintomáticos de esta mutación presentan un mayor tono inflamatorio, evidenciado por mayores niveles de IL-1 β circulante (Dzamko et al., 2016). No obstante, los reportes del rol de las mutaciones de LRRK2 sobre la inflamación periférica en modelos animales no resultan consistentes. Un trabajo reciente no halló diferencias entre ratones mutantes G2019S y sus controles salvajes respecto de la inducción aguda de citoquinas periféricas en respuesta a LPS i.p. (Litteljohn et al., 2018). Kozina y colaboradores tampoco hallaron diferencias en los niveles basales de varias citoquinas incluyendo IL-1 β , TNF α , IL-6 e IFN γ , entre otras, en ratones transgénicos LRRK2 R1441G respecto de sus controles no transgénicos. Vale aclarar que R1441G, es una mutación del dominio ROC GTPasa de LRRK2 que, al igual que G2019S, aumenta la actividad quinasa de la proteína (West et al., 2005). Sin embargo, estos ratones que expresan LRRK2 R1441G mostraron una mayor inducción de citoquinas tanto periféricas como en la SNpc, en respuesta a la inyección de LPS i.p. Si bien estas diferencias en la periferia parecen desaparecer luego de 24hs, en la SNpc perduran por hasta 2 meses luego del desafío inflamatorio (Kozina et al., 2018). Por otro lado, los macrófagos de ratones transgénicos sobre-expresando LRRK2 salvaje o G2019S estimulados con LPS *in vitro* no presentaron diferencias en la expresión de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas o en la capacidad fagocítica entre sí o respecto de controles no transgénicos (Moehle et al., 2015).

En cuanto a la inflamación central, llamativamente no hubo diferencia entre los animales inyectados con Ad IL-1 β o con Ad β gal central y Ad IL-1 β periférico entre los grupos tg_wt, tg_GS y noTg (Fig. 3.3.6). Sin embargo, en ausencia del estímulo periférico, los animales tg_wt y noTg con Ad IL-1 β central efectivamente mostraron mayor infiltrado inflamatorio que los animales de los mismos grupos con Ad β gal central. Esto sugiere que, en las ratas de los grupos β gal/IL-1 β , la inflamación central observada sería consecuencia de la inflamación periférica y no del tratamiento central con el adenovector. Esta presencia de infiltrado inflamatorio en el cerebro de animales que no presentaban inflamación central previo al estímulo periférico resulta llamativa ya que no se observó algo similar en el grupo eGFP/IL-1 β del Capítulo 1 o bien en otros modelos previos del laboratorio (Murta et al., 2015; Pott Godoy et al., 2010; Silva et al., 2018). Un posible factor para explicar esta discrepancia podría ser el trasfondo genético Sprague-Dawley de estos animales que, independiente de la expresión de hLRRK2, es diferente al de las ratas Wistar empleadas en los otros modelos. Un trabajo reciente muestra la importancia del trasfondo genético sobre la actividad de LRRK2 (Kelly et al., 2021). En él, se muestra que los niveles de expresión de LRRK2, así como la relación entre la proteína total y la forma fosforilada pS935-LRRK2 (una medida de la actividad de LRRK2) son equiparables en los cerebros de ratas Sprague-Dawley y Long-Evans. Sin embargo, los niveles de las proteínas Rab10 y Rab12 (dos de los principales blancos de la actividad quinasa de LRRK2) fosforilados de las ratas Long-Evans son mucho mayores, siendo similares a los de ratas con sobre-expresión de LRRK2 G2019S con trasfondo Sprague Dawley. De la misma manera, los niveles de Rabs fosforiladas de las ratas Sprague Dawley son muy bajos y similares a los de animales KO para LRRK2 con trasfondo Long Evans. Estos datos sugieren que existen factores aún desconocidos que modulan el efecto final de la sobre-expresión de LRRK2 G2019S en los diferentes modelos murinos y probablemente también en la población humana.

No obstante, los animales con el mismo trasfondo Sprague-Dawley que las ratas transgénicas pero en las cuales ninguno de sus progenitores era transgénico (noTg FVet) sí presentaron mayores volúmenes de infiltrado inflamatorio en el grupo IL-1 β /IL-1 β respecto del β gal/IL-1 β . Entonces, si existiera alguna influencia del trasfondo genético sobre la sensibilidad de los animales a la inflamación central, estaría asociada a la presencia de un padre transgénico más que a la cepa de rata empleada. En ese sentido, tratándose de cepas exocriadas de ratas, es posible que el trasfondo Sprague-Dawley de los animales transgénicos provenientes del bioterio de la Universidad de Oxford sea divergente respecto de los animales de la misma cepa provenientes del bioterio de la Facultad de Veterinarias de la UBA (Brower et al., 2015). Adicionalmente, cabe destacar que la técnica de genotipificación empleada resultó sumamente robusta, por lo que se descarta que estos resultados estén asociados a un artefacto de la técnica. En resumen, queda claro que, contrario a lo esperado según nuestra hipótesis de trabajo y a lo que indican los resultados del Capítulo 1, la expresión de hLRRK2 G2019S no estuvo asociada a un aumento diferencial de la inflamación central en estos animales.

En línea con estos resultados, ninguno de los grupos experimentales presentó alteraciones motoras ni del comportamiento exploratorio o signos de ansiedad (Fig. 3.3.5) y tampoco pérdida de nDa en la SNpc (Fig. 3.3.7).

Especulando sobre las variables que podrían estar afectando estos resultados y con la intención de optimizar el modelo, se podría proponer que el tiempo de aplicación del estímulo inflamatorio periférico respecto del proceso inflamatorio central no haya sido el adecuado. Ya se ha reportado que el precondicionamiento de cerebros de ratones con dosis sub-tóxicas de LPS puede tener efectos sinérgicos o bien protectores frente a la toxicidad neuronal y la inflamación central inducidas por paraquat, según la separación temporal de ambos estímulos (Mangano & Hayley, 2009). En efecto, si el tratamiento con paraquat se inicia dos días después de la inyección con LPS en la SNpc (coincidente con el pico de inflamación inducido por el LPS), aumenta la pérdida de neuronas TH+ respecto de los animales tratados con paraquat y sin LPS central. Sin embargo, cuando la separación entre los tratamientos es de 7 días (coincidente con una desaparición casi completa de la microglía activada inducida por el LPS y un aumento de linfocitos T y macrófagos en las meninges cercanas), no solo no ocurre el aumento de la muerte neuronal, sino que se ve una protección en la pérdida de terminales dopaminérgicas en el estriado (Mangano & Hayley, 2009). No obstante, probablemente este no sea el caso en nuestros modelos, dado que trabajos anteriores del laboratorio han demostrado que la inyección de Ad IL-1 β induce neuroinflamación y activación microglial hasta 21 días después de la operación y expresión de IL-1 β detectable hasta 60 días después (Ferrari et al., 2006).

Queda claro entonces que, contrario a la hipótesis de esta tesis, la expresión de hLRRK2 G2019S no logró exacerbar la respuesta inflamatoria central y periférica a IL-1 β ni tampoco desencadenar neurodegeneración en ese contexto.

La edad avanzada exacerba la inflamación mediada por LRRK2 G2019S pero no favorece la muerte neuronal dopaminérgica

Finalmente, en el cuarto capítulo de los resultados se evaluó el efecto de la edad como factor de riesgo adicional para la neurodegeneración en el modelo de sobre expresión local de hLRRK2 G2019S mediada por adenovectores en la SNpc e inflamación periférica inducida por IL-1 β . La edad avanzada es el principal factor de riesgo para la EP, además está asociada a un mayor tono inflamatorio tanto periférico (Furman et al., 2019) como central (Collier et al., 2017; Stephenson et al., 2018). En varios trabajos se reportaron efectos deletéreos de LRRK2 G2019S en animales envejecidos pero no en jóvenes, aún en ausencia de un estímulo inflamatorio periférico (Kritzinger et al., 2018; G. Liu et al., 2015; Sloan et al., 2016; Walker et al., 2014). De hecho, en la EP asociada a mutaciones en LRRK2, al igual que en la EP esporádica, la aparición de los síntomas motores comienza a edades avanzadas (Healy et al., 2008), a diferencia de la EP asociada a otras mutaciones como Parkina y PINK-1 (Kitada et al., 1998; Valente et al., 2004). Por lo tanto, incorporar la edad avanzada como un factor extra de sensibilización ante el daño neuronal, gatillaría la aparición de la toxicidad asociada a LRRK2 G2019S e inflamación (Cabezudo et al., 2020; Lobbestael et al., 2020). Debido a lo dicho anteriormente, hipotetizamos que las ratas envejecidas (de más de 12 meses de edad) fueran más sensibles que los animales adultos jóvenes empleados en el Capítulo 1 a sufrir neurodegeneración a causa de la neuroinflamación inducida por el tratamiento con Ad IL-1 β periférico y exacerbada por la expresión de hLRRK2 G2019S central.

En efecto, de manera similar a lo observado en las ratas adultas jóvenes en el Capítulo 1, la expresión de hLRRK2 G2019S en la SNpc indujo mayor neuroinflamación en respuesta al Ad IL-1 β periférico, evidenciada por un mayor volumen de infiltrado inflamatorio y activación microglial, respecto de los animales control expresando eGFP (Fig. 3.4.1). Sin embargo, también de manera similar a los resultados del Capítulo 1 pero contrario a lo esperado para las ratas envejecidas, la neuroinflamación del grupo G2019S/IL-1 β no estuvo asociada a síntomas motores o muerte neuronal dopaminérgica (Fig. 3.4.3).

Conclusiones y perspectivas futuras

En conjunto, los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis no permiten validar la hipótesis que la mutación G2019S de LRRK2 promueve la neurodegeneración en la SNpc exacerbando la respuesta inflamatoria o sensibilizando a las nDa a los efectos deletéreos de la misma. No obstante, la expresión local de hLRRK2 G2019S en las SNpc mediada por adenovectores sí estuvo asociada a mayores niveles de inflamación en los cerebros de las ratas, tanto jóvenes como ancianas, en respuesta a la inflamación periférica. Es posible entonces que en todos los modelos ensayados, los niveles de expresión de LRRK2, o bien la respuesta inflamatoria inducida por expresión de IL-1 β hayan resultado subóptimos para inducir la neurodegeneración. En ese caso, futuros ensayos empleando dosis mayores de adenovectores, o bien tratamientos más

prolongados, podrían inclinar la balanza hacia el lado de la muerte celular dopaminérgica. El empleo de sucesivos estímulos inflamatorios periféricos también podría ser una opción, aunque se ha reportado que esta estrategia puede inducir tolerancia y hasta protección ante una subsecuente inflamación central (Y. Liu et al., 2017). No obstante, no puede descartarse la posibilidad de que la influencia de LRRK2 G2019S sobre la inflamación no tenga una consecuencia directa sobre la neurodegeneración, sino que esté mediada por algún otro factor aún no descrito. Es decir, nuestros resultados muestran una ausencia de correlación muy interesante y sorprendente entre el nivel de inflamación y la neurodegeneración. Esta ausencia de correlación puede deberse a varios factores. Las hipótesis favorecidas son:

- El tipo de inflamación gatillado por LRRK2 G2019S no es tóxica *per se*, sino que necesita otros factores para impactar negativamente en la viabilidad neuronal.
- La inflamación gatillada por LRRK2 G2019S necesita persistir por un tiempo más prolongado y/o a un nivel diferente al observado en los modelos para ser tóxica.

Estas hipótesis no son mutuamente excluyentes ya que la duración prolongada o niveles de inflamación diferentes a los observados podrían no sólo vencer la resistencia de las neuronas a los efectos de la inflamación, sino también inducir la expresión de nuevas moléculas que sean las encargadas de mediar la toxicidad.

Para poner a prueba la primera hipótesis, se podría ensayar un modelo de neuroinflamación inducida por inflamación periférica y exacerbada por la expresión de LRRK2 G2019S, al cual se le suma un estímulo adicional con una dosis sub-tóxica de una toxina como 6OHDA o paraquat. En este modelo, se esperaría que los animales con inflamación mediada por LRRK2 G2019S y la toxina presenten neurodegeneración dopaminérgica, a diferencia de los animales con inflamación y sin toxina, o bien con toxina y sin inflamación. Adicionalmente, en el caso de hallar diferencias entre dichos grupos, se podrían realizar ensayos de genómica funcional o proteómica para hallar moléculas con expresión diferencial que caractericen al tipo de inflamación tóxica. Los resultados de ese análisis se podrían contrastar con estudios previos para identificar posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de la EP.

Por ejemplo, sería de particular interés evaluar el estado de expresión de TNF α . Si bien, a diferencia de lo que ocurre en la periferia, esta citoquina proinflamatoria no es inducida por IL-1 β en el SNC (De Lella Ezcurra et al., 2010), su expresión crónica aún a niveles relativamente bajos, ha sido extensamente asociada a la neurodegeneración dopaminérgica en modelos de PD (Chertoff et al., 2011; De Lella Ezcurra et al., 2010; McCoy et al., 2006). La expresión de TNF α aún en un modelo sin muerte neuronal sería interesante de evaluar ya que también se lo ha asociado con un rol neuroprotector temprano mediante la inducción de factores tróficos como BDNF ante una injuria (Gemma et al., 2007).

El análisis del estado transcripcional de las células de la glía también sería un dato interesante para entender el vínculo entre inflamación y toxicidad en este modelo. Por un lado, se podría buscar verificar y reforzar la observación de que la expresión de LRRK2 G2019S está asociada a un estado de activación microglial.

Por otro lado, se podría evaluar si estas células aumentan la expresión de moléculas asociadas a activación (CD44, IL-1 β , glicoproteína NMB o HSP90AA1) y proliferación, como en la EP idiopática (Smajić et al., 2021). Adicionalmente, la expresión de otras moléculas como los micro-ARNs (miRNA) pueden condicionar la respuesta inflamatoria de la microglía (Li et al., 2021). Diferencias en el perfil de expresión de miRNAs en el modelo de inflamación tóxica respecto de aquel con inflamación no tóxica asociado a LRRK2 G2019S podrían indicar un rol de estas moléculas en la neurodegeneración en ese modelo. En este sentido, un candidato interesante podría ser miR-124, el cual ha sido señalado como posible regulador negativo de la neuroinflamación (Yao et al., 2018) en modelos de EP.

En los últimos años, varios consorcios de investigación han combinado esfuerzos para analizar grandes cohortes de pacientes con EP y mutaciones en LRRK2 en busca de genes que ayuden a explicar la variabilidad en la penetrancia de las mismas y/o que condicionen la edad de inicio de la enfermedad (Chittoor-Vinod et al., 2021). De estos trabajos han surgido posibles interacciones entre LRRK2 y α -sinucleína (SNCA) o tau (MAPT) pero también DNMT3 (Trinh & Farrer, 2013), VAMP1 (Brown et al., 2021) y CORO1C (Lai et al., 2021). Si bien estos resultados son muy recientes y relativamente heterogéneos dependiendo del grupo de estudio (Brown et al., 2021) sería valioso explorar si alguno de estos genes candidatos aparecen modificados en el contexto de una inflamación tóxica asociada a LRRK2 G2019S en el modelo planteado.

Por último, otro regulador de la respuesta inflamatoria que podría mostrar diferencias interesantes en ambos grupos experimentales son los receptores colinérgicos, como el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR). En la periferia, y en particular en los macrófagos, este tipo de receptores responden a la liberación de acetilcolina desde la rama motora del nervio vago inhibiendo la translocación de NF κ B (vía Jak2/STAT3 y Nrf2) y por ende la producción de citoquinas proinflamatorias, en particular TNF α (Leal et al., 2013; Piovesana et al., 2021; H. Wang et al., 2003). Esta vía colinérgica anti-inflamatoria también existe en el SNC, donde astrocitos y microglía expresan $\alpha 7$ nAChR y su activación inhibe la activación microglial y la liberación de citoquinas proinflamatorias (Shytle et al., 2004).

En cuanto a la segunda hipótesis, una posibilidad sería replicar el modelo de ratas adultas con HC-Ad-LRRK2_G2019S en la SNpc y Ad-IL1 β periférico del Capítulo 2, pero aumentando la dosis de HC-Ad y/o prolongando el tiempo entre el tratamiento y el análisis. De esta manera, es posible que se logre una mayor expresión del LRRK2 G2019S y/o se evidencie un efecto crónico que no se observa a 35dpi. Otra opción, podría ser ensayar el modelo de ratas transgénicas con Ad IL-1 β central y periférico del Capítulo 3, pero con animales envejecidos (12 a 18 meses). En este caso, se espera que el efecto crónico de LRRK2 G2019S a lo largo de la vida del animal no sólo induzca neuroinflamación en respuesta al tratamiento, sino también, muerte de las neuronas TH+ de la SNpc.

Trabajos recientes refuerzan la idea de que la neuroinflamación asociada a LRRK2 y la neurodegeneración podrían estar disociadas. En efecto, en varios modelos de sobre-expresión de α -sinucleína mediados por virus adeno-asociados, el KO de LRRK2 disminuyó significativamente la activación microglial y el reclutamiento de linfocitos T pero no previno la muerte de las neuronas TH+ de la SNpc (Van der Perren et al., 2021). A su vez, los ratones KO para LRRK2 con

expresión exclusivamente neuronal de la mutante G2019S en la SNpc mediada por adenovectores presentaron muerte de neuronas TH+ en ausencia de indicios de activación microglial (Nguyen et al., 2020). En el mismo modelo, la expresión de LRRK2 wt o bien una versión sin actividad quinasa de G2019S no tuvieron efectos neurodegenerativos. De manera muy similar, en otro trabajo en ratas Wistar hembra adultas, la expresión neuronal de LRRK2 G2019S, pero no wt, en la SNpc mediada por inyecciones de adenovectores en el estriado, indujo muerte progresiva de nDa en ausencia de inflamación o activación microglial (Dusonchet et al., 2011).

En conclusión, pueden existir variables aún desconocidas para explicar la disociación entre aumento de la neuroinflamación y la muerte neuronal dopaminérgica en nuestro estudio. Por otro lado, cabe destacar que ninguna de las variables descritas anteriormente para explicar los resultados de esta tesis, han sido relevantes en los resultados obtenidos durante 20 años de trabajo de nuestro laboratorio (Chertoff et al., 2011; De Lella Ezcurra et al., 2010; A. Depino et al., 2005; Ferrari et al., 2004, 2006; Leal et al., 2013; Murta et al., 2015; Pott Godoy et al., 2008, 2010). De hecho, en esta tesis, se han utilizado condiciones experimentales similares a las publicadas anteriormente (ver Leal et al., 2013). Es decir, el efecto del aumento de la neuroinflamación provocado por la presencia de LRRK2 no correlaciona con neurodegeneración y síntomas motores bajo condiciones experimentales similares donde, previamente, estímulos pro-inflamatorios sí evidenciaron esa correlación. A partir de esto, sugerimos que la neuroinflamación inducida por LRRK2 es funcionalmente diferente a la gatillada por estímulos pro-inflamatorios previamente estudiados y que sería muy relevante un estudio comparativo a nivel molecular para entender qué moléculas presentes o ausentes en cada condición son relevantes para que se observe neurodegeneración o no. Esta información podría ayudar a entender la penetrancia variable de LRRK2 en los pacientes y quizás sugerir nuevos blancos terapéuticos para pacientes con EP y mutaciones en LRRK2. Algunas de estas moléculas podrían encontrarse entre las candidatas mencionadas anteriormente.

También creemos que la información generada a lo largo de este trabajo es valiosa para el campo de estudio ya que aporta una nueva visión de disociación entre neuroinflamación y neurodegeneración. Hasta los años '90, se asumía que la microglía activada era pro-inflamatoria. Trabajos de H. Perry y de nuestro laboratorio permitieron discriminar entre actividad microglial e inflamación, abriendo una nueva visión al estudio de la actividad microglial en relación a enfermedades neurodegenerativas (Ferrari & Tarelli, 2011; Leal et al., 2013; Perry, 2012; Perry et al., 2007). De forma similar, disociar la neuroinflamación en presencia de LRRK2 de la neurodegeneración podría ser útil para definir estados pro-inflamatorios que sean neurodegenerativos o no, como se propuso en el párrafo anterior y asimismo, para enfocar los estudios sobre LRRK2 en otros aspectos de esta molécula como su relación con la autofagia o su actividad quinasa.

Como conclusión final, este trabajo revela una alta complejidad en el rol funcional de LRRK2 en los modelos de EP y señala un largo camino de investigación para entender su fisiología y, desde allí, permitir hallar estrategias que sean de utilidad para los pacientes con EP.

APÉNDICE

Script de ImageJ para conteo semi-automatizado de neuronas TH+

```
//MACRO para abrir todas las imágenes de un directorio, procesarlas restándole
el background y medir el
//área marcada (yo lo hice originalmente para MHCII en cerebro de rata) y la
intensidad de la señal dentro de esa área.

//V2.4 --> Para fotos de TH de fluorescencia!
//      --> el input es una carpeta entera y el treshold es manual.
//      --> guarda el ROI de la SN con el mismo nombre de la imagen en una
subcarpeta
//      --> guarda el Summary final que arma el Analyze Particles
//V2.4.2 --> agrego Sharpen y Enhance Contrast para separar mejor los cuerpos
celulares entre sí
//V2.4.4 --> adapto para fotos de DAB con fondo blanco .czi sacadas en el
Observer 3
macro_name = "Conteo TH V2.4.4";

//=====
// Use this function to strip any number of extensions off images.
//Returns the title without the extension.
//=====
function getTitleStripExtension() {
    t = getTitle();
    t = replace(t, ".tif", "");
    t = replace(t, ".tiff", "");
    t = replace(t, ".lif", "");
    t = replace(t, ".lsm", "");
    t = replace(t, ".czi", "");
    t = replace(t, ".nd2", "");
    return t;
}

//Primero seteo las condiciones de colores en las imágenes y las mediciones que
me interesa hacer
run("Colors...", "foreground=black background=black selection=yellow");

//Me aseguro de arrancar con el ROI Manager y la tabla de Results vacíos
close("Results");
roiManager("reset");

//Macro GetDate para poner sello temporal a la salida
```

```
MonthNames =
newArray("Jan","Feb","Mar","Apr","May","Jun","Jul","Aug","Sep","Oct","Nov","Dec
");
DayNames = newArray("Sun", "Mon","Tue","Wed","Thu","Fri","Sat");
getDateAndTime(year, month, dayOfWeek, dayOfMonth, hour, minute, second,
msec);
DateString = "";
if (dayOfMonth<10) {DateString = DateString+"0";}
DateString = DateString + dayOfMonth + "-" + MonthNames[month] + "-" +
year;

//Elijo el directorio del cual tomar los archivos a analizar y listo su
contenido
//NOTA: este MACRO está armado para procesar sólo archivos ".czi",
//si hay otros archivos en la misma carpeta va a fallar

input_dir = getDirectory("Directorio de ENTRADA");
output_dir = input_dir + macro_name + ", " + DateString + "\\";
File.makeDirectory(output_dir);
list = getFileList(input_dir);

//Abro uno a uno todas las imágenes del directorio, las duplico para hacer
la máscara y
//aumento el contraste para poder elegir un ROI de background luego

for (i = 0; i < list.length; i++){
if(endsWith(list[i],".czi")){ //sólo abro imágenes .czi

open(input_dir + list[i]);
oldname= getTitleStripExtension();
newname= oldname + "_SN";
run("8-bit");
run("8-bit");
run("Invert");

//Este módulo pide al usuario que seleccione un área que se considere
de
//Background y le resta ese valor a toda la imagen

//waitForUser("Ahora te toca laburar a vos", "Elegí un ROI de Background");
//run("Measure");
//background= getResult("Mean", nResults-1); //la fila -1 de Results es
siempre la última!!

//se deshace del ROI manual que hicimos
```

```
roiManager("Show All");
roiManager("Show None");

    //se deshace del valor provisorio de background para la imagen activa
Table.deleteRows(nResults-1, nResults-1);
//print(background); //chequeo del valor del background
//run("Subtract...", "value=" + background);
run("Invert");

run("Sharpen");          //OPCIONAL: separa mejor los cuerpos celulares
entre sí aumentando el contraste
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.3 normalize");

waitForUser("Ahora te toca laburar a vos", "Seleccioná la Sustancia Nigra
con un ROI");
roiManager("Reset");
roiManager("Add");
ROI_dir = output_dir + "ROIs de SN\\";
File.makeDirectory(ROI_dir);
roiManager("Save", ROI_dir + oldname + ".roi");
run("Clear Outside");
saveAs("Tiff", output_dir + newname);

run("Threshold...");
waitForUser("Ahora te toca laburar a vos", "Determiná un Threshold que
separe bien las\neuronas TH+ y dale Apply");
//run("adaptiveThr ", "using=[Weighted mean] from=27 then=50"); //Controlar
bien los parámetros para cada tanda de fotos!
run("Watershed");
run("Despeckle");
run("Analyze Particles...", "size=50-1500 circularity=0.10-1.00 exclude
clear summarize add");

dir_roi= output_dir + newname + "_ROI.zip";
roiManager("Deselect");
roiManager("Show All without labels");
roiManager("Save", dir_roi);
selectWindow(newname+".tif");
//close();

    }
}

selectWindow("Summary");
saveAs("Text", output_dir + "Summary.csv" );
close("*"); //Cierra todas las ventanas abiertas
```


BIBLIOGRAFÍA

- Absinta, M., Ha, S.-K., Nair, G., Sati, P., Luciano, N. J., Palisoc, M., Louveau, A., Zghloul, K. A., Pittaluga, S., Kipnis, J., & Reich, D. S. (2017). Human and nonhuman primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.29738>
- Alam, Z. I., Daniel, S. E., Lees, A. J., Marsden, D. C., Jenner, P., & Halliwell, B. (1997). A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *Journal of Neurochemistry*, 69(3), 1326–1329. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69031326.x>
- Alam, Z. I., Jenner, A., Daniel, S. E., Lees, A. J., Cairns, N., Marsden, C. D., Jenner, P., & Halliwell, B. (1997). Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: An apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *Journal of Neurochemistry*, 69(3), 1196–1203. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69031196.x>
- Alba, R., Bosch, A., & Chillon, M. (2005). Gutless adenovirus: Last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Therapy*, 12(1), S18–S27. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302612>
- Alegre-Abarrategui, J., Christian, H., Lufino, M. M. P., Mutihac, R., Venda, L. L., Ansoorge, O., & Wade-Martins, R. (2009). LRRK2 regulates autophagic activity and localizes to specific membrane microdomains in a novel human genomic reporter cellular model. *Human Molecular Genetics*, 18(21), 4022–4034. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp346>
- Ali, M., Lemoine, N. R., & Ring, C. J. (1994). The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Therapy*, 1(6), 367–384.
- Amor, S., Peferoen, L. A. N., Vogel, D. Y. S., Breur, M., Valk, P., Baker, D., & Noort, J. M. (2014). Inflammation in neurodegenerative diseases – an update. *Immunology*, 142(2), 151–166. <https://doi.org/10.1111/imm.12233>
- Amor, S., Puentes, F., Baker, D., & van der Valk, P. (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, 129(2), 154–169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x>
- Araki, M., Ito, G., & Tomita, T. (2018). Physiological and pathological functions of LRRK2: Implications from substrate proteins. *Neuronal Signaling*, 2(4), NS20180005. <https://doi.org/10.1042/NS20180005>
- Barazzuol, L., Giamogante, F., Brini, M., & Calì, T. (2020). PINK1/Parkin Mediated Mitophagy, Ca²⁺ Signalling, and ER–Mitochondria Contacts in Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051772>
- Barodia, S. K., Creed, R. B., & Goldberg, M. S. (2017). Parkin and PINK1 functions in oxidative stress and neurodegeneration. *Brain research bulletin*, 133, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.12.004>
- Bernardi, A., Ballester, P., Schenk, M., Ferrario, M., Gómez, G., Rivero, R., Avale, E., Taravini, I., Gershanik, O., Guerrero, S., & Ferrario, J. E. (2019). Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) favors survival and growth of dopaminergic neurons in culture. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 34(6), 920–922. <https://doi.org/10.1002/mds.27667>
- Bett, A. J., Prevec, L., & Graham, F. L. (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *Journal of Virology*, 67(10), 5911–5921.

- Bingol, B., & Sheng, M. (2016). Mechanisms of mitophagy: PINK1, Parkin, USP30 and beyond. *Free Radical Biology and Medicine*, *100*, 210–222. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.015>
- Blanca Ramírez, M., Madero-Perez, J., Rivero-Rios, P., Martinez-Salvador, M., Lara Ordonez, A. J., Fernandez, B., Fdez, E., & Hilfiker, S. (2017). LRRK2 and Parkinson's Disease: From Lack of Structure to Gain of Function. *Current Protein & Peptide Science*, *18*(7), 677–686. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160311121748>
- Braga, T. T., Moura, I. C., Lepique, A. P., & Camara, N. O. S. (2017). Editorial: Macrophages Role in Integrating Tissue Signals and Biological Processes in Chronic Inflammation and Fibrosis. *Frontiers in Immunology*, *8*, 845. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00845>
- Brice, A. (2005). Genetics of Parkinson's disease: LRRK2 on the rise. *Brain*, *128*(12), 2760–2762. <https://doi.org/10.1093/brain/awh676>
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5663), 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
- Brower, M., Grace, M., Kotz, C. M., & Koya, V. (2015). Comparative analysis of growth characteristics of Sprague Dawley rats obtained from different sources. *Laboratory Animal Research*, *31*(4), 166–173. <https://doi.org/10.5625/lar.2015.31.4.166>
- Brown, E. E., Blauwendraat, C., Trinh, J., Rizig, M., Nalls, M. A., Leveille, E., Ruskey, J. A., Jonvik, H., Tan, M. M. X., Bandres-Ciga, S., Hassin-Baer, S., Brockmann, K., Infante, J., Tolosa, E., Ezquerra, M., Ben Romdhan, S., Benmahdjoub, M., Arezki, M., Mhiri, C., ... Morris, H. R. (2021). Analysis of DNMT3 and VAMP4 as genetic modifiers of LRRK2 Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *97*, 148.e17-148.e24. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.07.002>
- Cabezudo, D., Baekelandt, V., & Lobbstaël, E. (2020). Multiple-Hit Hypothesis in Parkinson's Disease: LRRK2 and Inflammation. *Frontiers in Neuroscience*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00376>
- Chang, J.-W., Wachtel, S. R., Young, D., & Kang, U.-J. (1999). Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: Studies on medial forebrain bundle and striatal lesions. *Neuroscience*, *88*(2), 617–628. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00217-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00217-6)
- Chertoff, M., Di Paolo, N., Schoeneberg, A., Depino, A., Ferrari, C., Wurst, W., Pfizenmaier, K., Eisel, U., & Pitossi, F. (2011). Neuroprotective and neurodegenerative effects of the chronic expression of tumor necrosis factor α in the nigrostriatal dopaminergic circuit of adult mice. *Experimental Neurology*, *227*(2), 237–251. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.11.010>
- Chhillar, N., Singh, N. K., Banerjee, B. D., Bala, K., Mustafa, M., Sharma, D., & Chhillar, M. (2013). Organochlorine pesticide levels and risk of Parkinson's disease in north Indian population. *ISRN Neurology*, *2013*, 371034. <https://doi.org/10.1155/2013/371034>
- Chiba-Falek, O., Lopez, G. J., & Nussbaum, R. L. (2006). Levels of alpha-synuclein mRNA in sporadic Parkinson disease patients. *Movement Disorders*, *21*(10), 1703–1708. <https://doi.org/10.1002/mds.21007>
- Chittoor-Vinod, V. G., Nichols, R. J., & Schüle, B. (2021). Genetic and

- Environmental Factors Influence the Pleomorphy of LRRK2 Parkinsonism. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1045. <https://doi.org/10.3390/ijms22031045>
- Cicco, S. D., Ivanyuk, D., Haq, W., Panagiotakopoulou, V., Arsić, A., Schöndorf, D., Yu, C., Perez, M.-J., Cassatella, R. P., Jakobi, M., Schneiderhan-Marra, N., Nikić-Spiegel, I., Gasser, T., & Deleidi, M. (2020). Interferon- γ signaling synergizes with LRRK2 in human neurons and microglia. *BioRxiv*, 2020.01.30.925222. <https://doi.org/10.1101/2020.01.30.925222>
- Čikoš, Š., Bukovská, A., & Koppel, J. (2007). Relative quantification of mRNA: Comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology*, 8, 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-113>
- Collier, T. J., Kanaan, N. M., & Kordower, J. H. (2017). Aging and Parkinson's disease: Different sides of the same coin? *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 32(7), 983–990. <https://doi.org/10.1002/mds.27037>
- Costantini, E., D'Angelo, C., & Reale, M. (2018). The Role of Immunosenescence in Neurodegenerative Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6039171>
- Croese, T., Castellani, G., & Schwartz, M. (2021). Immune cell compartmentalization for brain surveillance and protection. *Nature Immunology*, 22(9), 1083–1092. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00994-2>
- Daher, J. P. L., Volpicelli-Daley, L. A., Blackburn, J. P., Moehle, M. S., & West, A. B. (2014). Abrogation of α -synuclein-mediated dopaminergic neurodegeneration in LRRK2-deficient rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(25), 9289–9294. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403215111>
- Danthinne, X., & Imperiale, M. J. (2000). Production of first generation adenovirus vectors: A review. *Gene Therapy*, 7(20), 1707–1714. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301301>
- De Lella Ezcurra, A. L., Chertoff, M., Ferrari, C., Graciarena, M., & Pitossi, F. (2010). Chronic expression of low levels of tumor necrosis factor- α in the substantia nigra elicits progressive neurodegeneration, delayed motor symptoms and microglia/macrophage activation. *Neurobiology of Disease*, 37(3), 630–640. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.11.018>
- DeMaagd, G., & Philip, A. (2015). Parkinson's Disease and Its Management. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(8), 504–532.
- Depino, A., Ferrari, C., Pott Godoy, M. C., Tarelli, R., & Pitossi, F. J. (2005). Differential effects of interleukin-1 β on neurotoxicity, cytokine induction and glial reaction in specific brain regions. *Journal of Neuroimmunology*, 168(1–2), 96–110. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.07.009>
- Depino, A. M., Earl, C., Kaczmarczyk, E., Ferrari, C., Besedovsky, H., del Rey, A., Pitossi, F. J., & Oertel, W. H. (2003). Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *The European Journal of Neuroscience*, 18(10), 2731–2742. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2003.03014.x>
- Dexter, D. T., Carter, C. J., Wells, F. R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1989). Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 52(2), 381–389. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb09133.x>
- di Caudo, C., Martínez-Valbuena, I., Mundiñano, I.-C., Gennetier, A., Hernandez,

- M., Carmona-Abellan, M., Marcilla Garcia, I., Kremer, E. J., & Luquin, R. (2020). CAV-2-Mediated GFP and LRRK2G2019S Expression in the Macaca fascicularis Brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *13*, 49. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00049>
- Doorn, K. J., Moors, T., Drukarch, B., van de Berg, W. D., Lucassen, P. J., & van Dam, A.-M. (2014). Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental Lewy body disease cases and Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathologica Communications*, *2*, 90. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0090-1>
- Dorsey, E. R., & Bloem, B. R. (2018). The Parkinson Pandemic—A Call to Action. *JAMA Neurology*, *75*(1), 9. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3299>
- Dorsey, E. R., Elbaz, A., Nichols, E., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Adsuar, J. C., Ansha, M. G., Brayne, C., Choi, J.-Y. J., Collado-Mateo, D., Dahodwala, N., Do, H. P., Edessa, D., Endres, M., Fereshtehnejad, S.-M., Foreman, K. J., Gankpe, F. G., Gupta, R., Hankey, G. J., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, *17*(11), 939–953. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30295-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30295-3)
- Dorsey, E. R., Sherer, T., Okun, M. S., & Bloem, B. R. (2018). The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *Journal of Parkinson's Disease*, *8*(s1), S3–S8. <https://doi.org/10.3233/JPD-181474>
- Dusonchet, J., Kochubey, O., Stafa, K., Young, S. M., Zufferey, R., Moore, D. J., Schneider, B. L., & Aebischer, P. (2011). A rat model of progressive nigral neurodegeneration induced by the Parkinson's disease-associated G2019S mutation in LRRK2. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(3), 907–912. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5092-10.2011>
- Dwyer, Z., Rudyk, C., Thompson, A., Farmer, K., Fenner, B., Fortin, T., Derksen, A., Sun, H., & Hayley, S. (2020). Leucine-rich repeat kinase-2 (LRRK2) modulates microglial phenotype and dopaminergic neurodegeneration. *Neurobiology of Aging*. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.02.017>
- Dzamko, N. (2017). LRRK2 and the Immune System. *Advances in Neurobiology*, *14*, 123–143. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49969-7_7
- Dzamko, N., Geczy, C. L., & Halliday, G. M. (2015). Inflammation is genetically implicated in Parkinson's disease. *Neuroscience*, *302*, 89–102. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.10.028>
- Dzamko, N., Rowe, D. B., & Halliday, G. M. (2016). Increased peripheral inflammation in asymptomatic leucine-rich repeat kinase 2 mutation carriers. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *31*(6), 889–897. <https://doi.org/10.1002/mds.26529>
- Elbaz, A., Grigoletto, F., Baldereschi, M., Breteler, M. M., Manubens-Bertran, J. M., Lopez-Pousa, S., Dartigues, J. F., Alperovitch, A., Tzourio, C., & Rocca, W. A. (1999). Familial aggregation of Parkinson's disease: A population-based case-control study in Europe. EUROPARKINSON Study Group. *Neurology*, *52*(9), 1876–1882. <https://doi.org/10.1212/wnl.52.9.1876>
- Eming, S. A., Krieg, T., & Davidson, J. M. (2007). Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative*

- Dermatology*, 127(3), 514–525. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>
- Faber, I., Brandão, P. R. P., Menegatti, F., Bispo, D. D. de C., Maluf, F. B., & Cardoso, F. (2020). Covid-19 and Parkinsonism: A non-post-encephalitic case. *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.28277>
- Fearnley, J. M., & Lees, A. J. (1991). AGEING AND PARKINSON'S DISEASE: SUBSTANTIA NIGRA REGIONAL SELECTIVITY. *Brain*, 114(5), 2283–2301. <https://doi.org/10.1093/brain/114.5.2283>
- Feigin et al. (2017). Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet. Neurology*, 16(11), 877–897. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30299-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30299-5)
- Ferrari, C. C., Depino, A. M., Prada, F., Muraro, N., Campbell, S., Podhajcer, O., Perry, V. H., Anthony, D. C., & Pitossi, F. J. (2004). Reversible demyelination, blood-brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic IL-1 expression in the brain. *The American Journal of Pathology*, 165(5), 1827–1837. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63438-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63438-4)
- Ferrari, C. C., Pott Godoy, M. C., Tarelli, R., Chertoff, M., Depino, A. M., & Pitossi, F. J. (2006). Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1 β in the substantia nigra. *Neurobiology of Disease*, 24(1), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.06.013>
- Ferrari, C. C., & Tarelli, R. (2011). Parkinson's disease and systemic inflammation. *Parkinson's Disease*, 2011, 436813. <https://doi.org/10.4061/2011/436813>
- Forrester, J. V., McMenamin, P. G., & Dando, S. J. (2018). CNS infection and immune privilege. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(11), 655–671. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0070-8>
- Funayama, M., Hasegawa, K., Kowa, H., Saito, M., Tsuji, S., & Obata, F. (2002). A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Annals of Neurology*, 51(3), 296–301. <https://doi.org/10.1002/ana.10113>
- Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D. W., Fasano, A., Miller, G. W., Miller, A. H., Mantovani, A., Weyand, C. M., Barzilai, N., Goronzy, J. J., Rando, T. A., Effros, R. B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., & Slavich, G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature medicine*, 25(12), 1822–1832. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>
- Galli, S. J., Borregaard, N., & Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature immunology*, 12(11), 1035–1044. <https://doi.org/10.1038/ni.2109>
- Gardet, A., Benita, Y., Li, C., Sands, B. E., Ballester, I., Stevens, C., Korzenik, J. R., Rioux, J. D., Daly, M. J., Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2010). LRRK2 Is Involved in the IFN- γ Response and Host Response to Pathogens. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(9), 5577–5585. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000548>
- Gatto, E. M., Melcon, C., Parisi, V. L., Bartoloni, L., & Gonzalez, C. D. (2015). Inverse association between yerba mate consumption and idiopathic Parkinson's disease. A case-control study. *Journal of the Neurological*

- Sciences*, 356(1-2), 163-167. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.06.043>
- Ge, P., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2020). PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: A source of regional vulnerability in Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00367-7>
- Gemma, C., Catlow, B., Cole, M., Hudson, C., Samec, A., Shah, N., Vila, J., Bachstetter, A., & Bickford, P. C. (2007). Early inhibition of TNFalpha increases 6-hydroxydopamine-induced striatal degeneration. *Brain Research*, 1147, 240-247. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.003>
- Giasson, B. I., Covy, J. P., Bonini, N. M., Hurtig, H. I., Farrer, M. J., Trojanowski, J. Q., & Van Deerlin, V. M. (2006). Biochemical and pathological characterization of Lrrk2. *Annals of Neurology*, 59(2), 315-322. <https://doi.org/10.1002/ana.20791>
- Goldman, S. M. (2014). Environmental Toxins and Parkinson's Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54(1), 141-164. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135937>
- Goldman, S. M., Marek, K., Ottman, R., Meng, C., Comyns, K., Chan, P., Ma, J., Marras, C., Langston, J. W., Ross, G. W., & Tanner, C. M. (2019). Concordance for Parkinson's disease in twins: A 20-year update. *Annals of Neurology*, 85(4), 600-605. <https://doi.org/10.1002/ana.25441>
- Gomez-Nicola, D., & Perry, V. H. (2015). Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: A paradigm of functional plasticity. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 21(2), 169-184. <https://doi.org/10.1177/1073858414530512>
- Gorell, J. M., Rybicki, B. A., Cole Johnson, C., & Peterson, E. L. (1999). Occupational Metal Exposures and the Risk of Parkinson's Disease. *Neuroepidemiology*, 18(6), 303-308. <https://doi.org/10.1159/000026225>
- Gorlé, N., Van Cauwenberghe, C., Libert, C., & Vandenbroucke, R. E. (2016). The effect of aging on brain barriers and the consequences for Alzheimer's disease development. *Mammalian Genome*, 27(7-8), 407-420. <https://doi.org/10.1007/s00335-016-9637-8>
- Hakimi, M., Selvanantham, T., Swinton, E., Padmore, R. F., Tong, Y., Kabbach, G., Venderova, K., Girardin, S. E., Bulman, D. E., Scherzer, C. R., LaVoie, M. J., Gris, D., Park, D. S., Angel, J. B., Shen, J., Philpott, D. J., & Schlossmacher, M. G. (2011). Parkinson's disease-linked LRRK2 is expressed in circulating and tissue immune cells and upregulated following recognition of microbial structures. *Journal of Neural Transmission*, 118(5), 795-808. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0653-2>
- Harvey, K., & Outeiro, T. F. (2019). The role of LRRK2 in cell signalling. *Biochemical Society Transactions*, 47(1), 197-207. <https://doi.org/10.1042/BST20180464>
- He, Y., Appel, S., & Le, W. (2001). Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Research*, 909(1-2), 187-193. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02681-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02681-6)
- Healy, D. G., Falchi, M., O'Sullivan, S. S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S., Brice, A., Aasly, J., Zabetian, C. P., Goldwurm, S., Ferreira, J. J., Tolosa, E., Kay, D. M., Klein, C., Williams, D. R., Marras, C., Lang, A. E., Wszolek, Z. K., Berciano, J., ... Wood, N. W. (2008). Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: A

- case-control study. *The Lancet Neurology*, 7(7), 583–590.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70117-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70117-0)
- Heeman, B., Haute, C. V. den, Aelvoet, S.-A., Valsecchi, F., Rodenburg, R. J., Reumers, V., Debyser, Z., Callewaert, G., Koopman, W. J. H., Willems, P. H. G. M., & Baekelandt, V. (2011). Depletion of PINK1 affects mitochondrial metabolism, calcium homeostasis and energy maintenance. *Journal of Cell Science*, 124(7), 1115–1125.
<https://doi.org/10.1242/jcs.078303>
- Ho, D. H., Je, A. R., Lee, H., Son, I., Kweon, H.-S., Kim, H.-G., & Seol, W. (2018). LRRK2 Kinase Activity Induces Mitochondrial Fission in Microglia via Drp1 and Modulates Neuroinflammation. *Experimental Neurobiology*, 27(3), 171–180. <https://doi.org/10.5607/en.2018.27.3.171>
- Hulihan, M. M., Ishihara-Paul, L., Kachergus, J., Warren, L., Amouri, R., Elango, R., Prinjha, R. K., Upmanyu, R., Kefi, M., Zouari, M., Sassi, S. B., Yahmed, S. B., El Euch-Fayeche, G., Matthews, P. M., Middleton, L. T., Gibson, R. A., Hentati, F., & Farrer, M. J. (2008). LRRK2 Gly2019Ser penetrance in Arab–Berber patients from Tunisia: A case-control genetic study. *The Lancet Neurology*, 7(7), 591–594.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70116-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70116-9)
- Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., & Hashizume, Y. (2003). Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson’s disease brains. *Acta Neuropathologica*, 106(6), 518–526.
<https://doi.org/10.1007/s00401-003-0766-2>
- Isacson, O. (2020). The Consequences of Coronavirus-Induced Cytokine Storm Are Associated With Neurological Diseases, Which May Be Preventable. *Frontiers in Neurology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00745>
- Ishihara, L., Gibson, R. A., Warren, L., Amouri, R., Lyons, K., Wielinski, C., Hunter, C., Swartz, J. E., Elango, R., Akkari, P. A., Leppert, D., Surh, L., Reeves, K. H., Thomas, S., Ragone, L., Hattori, N., Pahwa, R., Jankovic, J., Nance, M., ... Hentati, F. (2007). Screening for Lrrk2 G2019S and clinical comparison of Tunisian and North American Caucasian Parkinson’s disease families. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 22(1), 55–61. <https://doi.org/10.1002/mds.21180>
- Ishihara, L., Warren, L., Gibson, R., Amouri, R., Lesage, S., Dürr, A., Tazir, M., Wszolek, Z. K., Uitti, R. J., Nichols, W. C., Griffith, A., Hattori, N., Leppert, D., Watts, R., Zabetian, C. P., Foroud, T. M., Farrer, M. J., Brice, A., Middleton, L., & Hentati, F. (2006). Clinical Features of Parkinson Disease Patients With Homozygous Leucine-Rich Repeat Kinase 2 G2019S Mutations. *Archives of Neurology*, 63(9), 1250–1254.
<https://doi.org/10.1001/archneur.63.9.1250>
- Jang, H., Boltz, D. A., Webster, R. G., & Smeyne, R. J. (2009). Viral Parkinsonism. *Biochimica et biophysica acta*, 1792(7), 714–721.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.08.001>
- Kelly, K., Chang, A., Hastings, L., Abdelmotilib, H., & West, A. B. (2021). Genetic background influences LRRK2-mediated Rab phosphorylation in the rat brain. *Brain Research*, 1759, 147372.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147372>
- Kestenbaum, M., & Alcalay, R. N. (2017). Clinical Features of LRRK2 Carriers with Parkinson’s Disease. *Advances in Neurobiology*, 14, 31–48.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-49969-7_2

- Kim, J., Jeong, Y.-H., Lee, E.-J., Park, J.-S., Seo, H., & Kim, H.-S. (2017). Suppression of neuroinflammation by matrix metalloproteinase-8 inhibitor in aged normal and LRRK2 G2019S Parkinson's disease model mice challenged with lipopolysaccharide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(2), 879–886. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.129>
- Kim, W. G., Mohny, R. P., Wilson, B., Jeohn, G. H., Liu, B., & Hong, J. S. (2000). Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: Role of microglia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(16), 6309–6316.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., & Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605–608. <https://doi.org/10.1038/33416>
- Klein, C., & Westenberger, A. (2012). Genetics of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008888>
- Kouli, A., Torsney, K. M., & Kuan, W.-L. (2018). Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. *Exon Publications*, 3–26. <https://doi.org/10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch1>
- Kozina, E., Sadasivan, S., Jiao, Y., Dou, Y., Ma, Z., Tan, H., Kodali, K., Shaw, T., Peng, J., & Smeyne, R. J. (2018). Mutant LRRK2 mediates peripheral and central immune responses leading to neurodegeneration in vivo. *Brain*, 141(6), 1753–1769. <https://doi.org/10.1093/brain/awy077>
- Kritzinger, A., Ferger, B., Gillardon, F., Stierstorfer, B., Birk, G., Kochanek, S., & Ciossek, T. (2018). Age-related pathology after adenoviral overexpression of the leucine-rich repeat kinase 2 in the mouse striatum. *Neurobiology of Aging*, 66, 97–111. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.02.008>
- Kügler, S., Kilic, E., & Bähr, M. (2003). Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. *Gene Therapy*, 10(4), 337–347. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301905>
- Kumari, U., & Tan, E. K. (2009). LRRK2 in Parkinson's disease: Genetic and clinical studies from patients: Genetic and clinical studies of LRRK2. *FEBS Journal*, 276(22), 6455–6463. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07344.x>
- Kuss, M., Adamopoulou, E., & Kahle, P. J. (2014). Interferon- γ induces leucine-rich repeat kinase LRRK2 via extracellular signal-regulated kinase ERK5 in macrophages. *Journal of Neurochemistry*, 129(6), 980–987. <https://doi.org/10.1111/jnc.12668>
- Kwakye, G. F., Paoliello, M. M. B., Mukhopadhyay, S., Bowman, A. B., & Aschner, M. (2015). Manganese-Induced Parkinsonism and Parkinson's Disease: Shared and Distinguishable Features. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(7), 7519–7540. <https://doi.org/10.3390/ijerph120707519>
- Lai, D., Alipanahi, B., Fontanillas, P., Schwantes-An, T.-H., Aasly, J., Alcalay, R. N., Beecham, G. W., Berg, D., Bressman, S., Brice, A., Brockman, K., Clark, L., Cookson, M., Das, S., Van Deerlin, V., Follett, J., Farrer, M. J., Trinh, J., Gasser, T., ... Foroud, T. (2021). Genomewide Association Studies of LRRK2 Modifiers of Parkinson's Disease. *Annals of Neurology*,

- 90(1), 76–88. <https://doi.org/10.1002/ana.26094>
- Langston, R. G., Rudenko, I. N., & Cookson, M. R. (2016). The function of orthologues of the human Parkinson's disease gene LRRK2 across species: Implications for disease modelling in preclinical research. *The Biochemical Journal*, 473(3), 221–232. <https://doi.org/10.1042/BJ20150985>
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39(1), 151–170. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-w](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-w)
- Le Gal La Salle, G., Robert, J. J., Berrard, S., Ridoux, V., Stratford-Perricaudet, L. D., Perricaudet, M., & Mallet, J. (1993). An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5097), 988–990. <https://doi.org/10.1126/science.8382374>
- Leal, M. C., Casabona, J. C., Puntel, M., & Pitossi, F. J. (2013). Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α : Reliable targets for protective therapies in Parkinson's Disease? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00053>
- Lee, B. D., Shin, J.-H., VanKampen, J., Petrucelli, L., West, A. B., Ko, H. S., Lee, Y.-I., Maguire-Zeiss, K. A., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2010). Inhibitors of leucine-rich repeat kinase-2 protect against models of Parkinson's disease. *Nature Medicine*, 16(9), 998–1000. <https://doi.org/10.1038/nm.2199>
- Lee, H., James, W. S., & Cowley, S. A. (2017). LRRK2 in peripheral and central nervous system innate immunity: Its link to Parkinson's disease. *Biochemical Society Transactions*, 45(1), 131–139. <https://doi.org/10.1042/BST20160262>
- Lee, J. W., Tapias, V., Di Maio, R., Greenamyre, J. T., & Cannon, J. R. (2015). Behavioral, neurochemical, and pathological alterations in BAC transgenic G2019S LRRK2 rats. *Neurobiology of aging*, 36(1), 505–518. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.011>
- Lekic, T., Manaenko, A., Rolland, W., & Zhang, J. H. (2012). Forelimb Use Asymmetry Analysis of Vertical Exploratory Activity After Intracerebral Hemorrhage in Rats and Mice. En J. Chen, X.-M. Xu, Z. C. Xu, & J. H. Zhang (Eds.), *Animal Models of Acute Neurological Injuries II: Injury and Mechanistic Assessments, Volume 1* (pp. 685–689). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-576-3_54
- Lesage, S., Dürr, A., Tazir, M., Lohmann, E., Leutenegger, A.-L., Janin, S., Pollak, P., & Brice, A. (2006). LRRK2 G2019S as a Cause of Parkinson's Disease in North African Arabs. *New England Journal of Medicine*, 354(4), 422–423. <https://doi.org/10.1056/NEJMc055540>
- Lewis, P. A. (2019). Leucine rich repeat kinase 2: A paradigm for pleiotropy. *The Journal of Physiology*, 597(14), 3511–3521. <https://doi.org/10.1113/JP276163>
- Lewis, T. B., Glasgow, J. N., Glandon, A. M., Curiel, D. T., & Standaert, D. G. (2010). Transduction of Brain Dopamine Neurons by Adenoviral Vectors Is Modulated by CAR Expression: Rationale for Tropism Modified Vectors in PD Gene Therapy. *PLOS ONE*, 5(9), e12672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012672>
- Li, S., Bi, G., Han, S., & Huang, R. (2021). MicroRNAs Play a Role in Parkinson's Disease by Regulating Microglia Function: From Pathogenetic Involvement to Therapeutic Potential. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, 744942.

- <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.744942>
- Litteljohn, D., Rudyk, C., Dwyer, Z., Farmer, K., Fortin, T., Hayley, S., & Canadian Lrrk2 in Inflammation Team (CLINT). (2018). The impact of murine LRRK2 G2019S transgene overexpression on acute responses to inflammatory challenge. *Brain, Behavior, and Immunity*, *67*, 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.09.002>
- Liu, G., Sgobio, C., Gu, X., Sun, L., Lin, X., Yu, J., Parisiadou, L., Xie, C., Sastry, N., Ding, J., Lohr, K. M., Miller, G. W., Mateo, Y., Lovinger, D. M., & Cai, H. (2015). Selective expression of Parkinson's disease-related Leucine-rich repeat kinase 2 G2019S missense mutation in midbrain dopaminergic neurons impairs dopamine release and dopaminergic gene expression. *Human Molecular Genetics*, *24*(18), 5299–5312. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv249>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *2*, 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu, Y., Xie, X., Xia, L.-P., Lv, H., Lou, F., Ren, Y., He, Z.-Y., & Luo, X.-G. (2017). Peripheral immune tolerance alleviates the intracranial lipopolysaccharide injection-induced neuroinflammation and protects the dopaminergic neurons from neuroinflammation-related neurotoxicity. *Journal of Neuroinflammation*, *14*(1), 223. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0994-3>
- Lobbestael, E., Van den Haute, C., Macchi, F., Taymans, J.-M., & Baekelandt, V. (2020). Pathogenic LRRK2 requires secondary factors to induce cellular toxicity. *Bioscience Reports*, *40*(10). <https://doi.org/10.1042/BSR20202225>
- Louveau, A., Harris, T. H., & Kipnis, J. (2015). Revisiting the concept of CNS immune privilege. *Trends in immunology*, *36*(10), 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.006>
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., Derecki, N. C., Castle, D., Mandell, J. W., Lee, K. S., Harris, T. H., & Kipnis, J. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, *523*(7560), 337–341. <https://doi.org/10.1038/nature14432>
- Luo, X.-G., Ding, J.-Q., & Chen, S.-D. (2010). Microglia in the aging brain: Relevance to neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*, *5*, 12. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-12>
- Mangano, E. N., & Hayley, S. (2009). Inflammatory priming of the substantia nigra influences the impact of later paraquat exposure: Neuroimmune sensitization of neurodegeneration. *Neurobiology of Aging*, *30*(9), 1361–1378. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.11.020>
- Marras, C., Alcalay, R. N., Caspell-Garcia, C., Coffey, C., Chan, P., Duda, J. E., Facheris, M. F., Fernández-Santiago, R., Ruíz-Martínez, J., Mestre, T., Saunders-Pullman, R., Pont-Sunyer, C., Tolosa, E., Waro, B., & the LRRK2 Cohort Consortium. (2016). Motor and nonmotor heterogeneity of LRRK2-related and idiopathic Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *31*(8), 1192–1202. <https://doi.org/10.1002/mds.26614>
- Marras, C., Beck, J. C., Bower, J. H., Roberts, E., Ritz, B., Ross, G. W., Abbott, R. D., Savica, R., Van Den Eeden, S. K., Willis, A. W., & Tanner, C. M. (2018). Prevalence of Parkinson's disease across North America. *Npj Parkinson's Disease*, *4*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41531-018->

0058-0

- Martin, I., Kim, J. W., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2014). LRRK2 Pathobiology in Parkinson's Disease. *Journal of neurochemistry*, 131(5), 554–565. <https://doi.org/10.1111/jnc.12949>
- Mata, I. F., Wedemeyer, W. J., Farrer, M. J., Taylor, J. P., & Gallo, K. A. (2006). LRRK2 in Parkinson's disease: Protein domains and functional insights. *Trends in Neurosciences*, 29(5), 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.03.006>
- McCoy, M. K., Martinez, T. N., Ruhn, K. A., Szymkowski, D. E., Smith, C. G., Botterman, B. R., Tansey, K. E., & Tansey, M. G. (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. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(37), 9365–9375. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1504-06.2006>
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., & McGeer, E. G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38(8), 1285–1291. <https://doi.org/10.1212/wnl.38.8.1285>
- Mestre-Francés, N., Serratrice, N., Gennetier, A., Devau, G., Cobo, S., Trouche, S. G., Fontès, P., Zussy, C., De Deurwaerdere, P., Salinas, S., Mennechet, F. J., Dusonchet, J., Schneider, B. L., Saggio, I., Kalatzis, V., Luquin-Piudo, M. R., Verdier, J.-M., & Kremer, E. J. (2018). Exogenous LRRK2G2019S induces parkinsonian-like pathology in a nonhuman primate. *JCI Insight*, 3(14). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98202>
- Milioli, E. M., Cologni, P., Santos, C. C., Marcos, T. D., Yunes, V. M., Fernandes, M. S., Schoenfelder, T., & Costa-Campos, L. (2007). Effect of acute administration of hydroalcohol extract of *Ilex paraguariensis* St Hilaire (Aquifoliaceae) in animal models of Parkinson's disease. *Phytotherapy Research*, 21(8), 771–776. <https://doi.org/10.1002/ptr.2166>
- Moehle, M. S., Daher, J. P. L., Hull, T. D., Boddu, R., Abdelmotilib, H. A., Mobley, J., Kannarkat, G. T., Tansey, M. G., & West, A. B. (2015). The G2019S LRRK2 mutation increases myeloid cell chemotactic responses and enhances LRRK2 binding to actin-regulatory proteins. *Human Molecular Genetics*, 24(15), 4250–4267. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv157>
- Moehle, M. S., Webber, P. J., Tse, T., Sukar, N., Standaert, D. G., DeSilva, T. M., Cowell, R. M., & West, A. B. (2012). LRRK2 inhibition attenuates microglial inflammatory responses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(5), 1602–1611. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5601-11.2012>
- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., & Nagatsu, T. (1994). Interleukin-1 β , interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor- α are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neuroscience Letters*, 180(2), 147–150. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90508-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90508-8)
- Monfrini, E., & Di Fonzo, A. (2017). Leucine-Rich Repeat Kinase (LRRK2) Genetics and Parkinson's Disease. *Advances in Neurobiology*, 14, 3–30. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49969-7_1
- Murta, V., Farías, M. I., Pitossi, F. J., & Ferrari, C. C. (2015). Chronic systemic IL-1 β exacerbates central neuroinflammation independently of the blood-brain barrier integrity. *Journal of Neuroimmunology*, 278, 30–43.

- <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.11.023>
- Nguyen, A. P. T., Tsika, E., Kelly, K., Levine, N., Chen, X., West, A. B., Boularand, S., Barneoud, P., & Moore, D. J. (2020). Dopaminergic neurodegeneration induced by Parkinson's disease-linked G2019S LRRK2 is dependent on kinase and GTPase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(29), 17296–17307. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922184117>
- Norden, D. M., & Godbout, J. P. (2013). Microglia of the Aged Brain: Primed to be Activated and Resistant to Regulation. *Neuropathology and applied neurobiology*, 39(1), 19–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01306.x>
- Noyce, A. J., Bestwick, J. P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C. H., Giovannoni, G., Lees, A. J., & Schrag, A. (2012). Meta-Analysis of Early Nonmotor Features and Risk Factors for Parkinson Disease. *Annals of Neurology*, 72(6), 893–901. <https://doi.org/10.1002/ana.23687>
- Obergasteiger, J., Frapporti, G., Lamonaca, G., Pizzi, S., Picard, A., Lavdas, A. A., Pischedda, F., Piccoli, G., Hilfiker, S., Lobbestael, E., Baekelandt, V., Hicks, A. A., Corti, C., Pramstaller, P. P., & Volta, M. (2020). Kinase inhibition of G2019S-LRRK2 enhances autolysosome formation and function to reduce endogenous alpha-synuclein intracellular inclusions. *Cell Death Discovery*, 6, 45. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0279-y>
- Olney, J. W., Zorumski, C. F., Stewart, G. R., Price, M. T., Wang, G. J., & Labruyere, J. (1990). Excitotoxicity of L-dopa and 6-OH-dopa: Implications for Parkinson's and Huntington's diseases. *Experimental Neurology*, 108(3), 269–272. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(90\)90134-e](https://doi.org/10.1016/0014-4886(90)90134-e)
- Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C., & Bjorklund, A. (1995). Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: Differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *The Journal of Neuroscience*, 15(5), 3863–3875. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-03863.1995>
- Ousman, S. S., & Kubes, P. (2012). Immune surveillance in the central nervous system. *Nature Neuroscience*, 15(8), 1096–1101. <https://doi.org/10.1038/nn.3161>
- Ozelius, L. J., Senthil, G., Saunders-Pullman, R., Ohmann, E., Deligtisch, A., Tagliati, M., Hunt, A. L., Klein, C., Henick, B., Hailpern, S. M., Lipton, R. B., Soto-Valencia, J., Risch, N., & Bressman, S. B. (2006). LRRK2 G2019S as a Cause of Parkinson's Disease in Ashkenazi Jews. *New England Journal of Medicine*, 354(4), 424–425. <https://doi.org/10.1056/NEJMc055509>
- Paisán-Ruíz, C., Jain, S., Evans, E. W., Gilks, W. P., Simón, J., van der Brug, M., López de Munain, A., Aparicio, S., Gil, A. M., Khan, N., Johnson, J., Martinez, J. R., Nicholl, D., Martí Carrera, I., Pena, A. S., de Silva, R., Lees, A., Martí-Massó, J. F., Pérez-Tur, J., ... Singleton, A. B. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, 44(4), 595–600. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.10.023>
- Parkinson, J. (1817). An Essay on the Shaking Palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14.
- Pavel, A., Murray, D. K., & Stoessl, A. J. (2020). COVID-19 and selective vulnerability to Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, 19(9), 719. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30269-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30269-6)

- Paxinos, G., & Watson, C. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates—7th Edition*. <https://www.elsevier.com/books/the-rat-brain-in-stereotaxic-coordinates/paxinos/978-0-12-391949-6>
- Peltékian, E., Garcia, L., & Danos, O. (2002). Neurotropism and Retrograde Axonal Transport of a Canine Adenoviral Vector: A Tool for Targeting Key Structures Undergoing Neurodegenerative Processes. *Molecular Therapy*, 5(1), 25–32. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0517>
- Perry, V. H. (2012). Innate inflammation in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(9), a009373. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009373>
- Perry, V. H. (2016). Microglia. *Microbiology Spectrum*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0003-2015>
- Perry, V. H., Cunningham, C., & Holmes, C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nature Reviews Immunology*, 7(2), 161–167. <https://doi.org/10.1038/nri2015>
- Piovesana, R., Salazar Intriago, M. S., Dini, L., & Tata, A. M. (2021). Cholinergic Modulation of Neuroinflammation: Focus on $\alpha 7$ Nicotinic Receptor. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4912. <https://doi.org/10.3390/ijms22094912>
- Plowey, E. D., Cherra, S. J., Liu, Y.-J., & Chu, C. T. (2008). Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *Journal of Neurochemistry*, 105(3), 1048–1056. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05217.x>
- Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 7(10), 803–815. <https://doi.org/10.1038/nri2171>
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5321), 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
- Pott Godoy, M. C., Ferrari, C. C., & Pitossi, F. J. (2010). Nigral neurodegeneration triggered by striatal AdIL-1 administration can be exacerbated by systemic IL-1 expression. *Journal of Neuroimmunology*, 222(1–2), 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.02.018>
- Pott Godoy, M. C., Tarelli, R., Ferrari, C. C., Sarchi, M. I., & Pitossi, F. J. (2008). Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 131(Pt 7), 1880–1894. <https://doi.org/10.1093/brain/awn101>
- Quan, N., & Banks, W. A. (2007). Brain-immune communication pathways. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(6), 727–735. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.05.005>
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, 19(8), 987–991. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>
- Ravenholt, R. T., & Foege, W. (1982). 1918 INFLUENZA, ENCEPHALITIS LETHARGICA, PARKINSONISM. *The Lancet*, 320(8303), 860–864. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(82\)90820-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)90820-0)
- Rea, I. M., Gibson, D. S., McGilligan, V., McNerlan, S. E., Alexander, H. D., & Ross, O. A. (2018). Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation

- Triggers and Cytokines. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00586>
- Ren, C., Ding, Y., Wei, S., Guan, L., Zhang, C., Ji, Y., Wang, F., Yin, S., & Yin, P. (2019). G2019S Variation in LRRK2: An Ideal Model for the Study of Parkinson's Disease? *Frontiers in Human Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2019.00306>
- Repici, M., & Giorgini, F. (2019). DJ-1 in Parkinson's Disease: Clinical Insights and Therapeutic Perspectives. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/jcm8091377>
- Roca, V., Casabona, J. C., Radice, P., Murta, V., & Pitossi, F. J. (2011). The degenerating substantia nigra as a susceptible region for gene transfer-mediated inflammation. *Parkinson's Disease*, 2011, 931572. <https://doi.org/10.4061/2011/931572>
- Roth, J., & Blatteis, C. M. (2014). Mechanisms of fever production and lysis: Lessons from experimental LPS fever. *Comprehensive Physiology*, 4(4), 1563–1604. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130033>
- Russo, I., Berti, G., Plotegher, N., Bernardo, G., Filograna, R., Bubacco, L., & Greggio, E. (2015). Leucine-rich repeat kinase 2 positively regulates inflammation and down-regulates NF-κB p50 signaling in cultured microglia cells. *Journal of Neuroinflammation*, 12. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0449-7>
- Russo, I., Bubacco, L., & Greggio, E. (2014). LRRK2 and neuroinflammation: Partners in crime in Parkinson's disease? *Journal of Neuroinflammation*, 11, 52. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-52>
- Russo, I., Di Benedetto, G., Kaganovich, A., Ding, J., Mercatelli, D., Morari, M., Cookson, M. R., Bubacco, L., & Greggio, E. (2018). Leucine-rich repeat kinase 2 controls protein kinase A activation state through phosphodiesterase 4. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 297. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1337-8>
- Russo, I., Kaganovich, A., Ding, J., Landeck, N., Mamais, A., Varanita, T., Biosa, A., Tessari, I., Bubacco, L., Greggio, E., & Cookson, M. R. (2019). Transcriptome analysis of LRRK2 knock-out microglia cells reveals alterations of inflammatory- and oxidative stress-related pathways upon treatment with α-synuclein fibrils. *Neurobiology of Disease*, 129, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.05.012>
- Sadasivan, S., Sharp, B., Schultz-Cherry, S., & Smeyne, R. J. (2017). Synergistic effects of influenza and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) can be eliminated by the use of influenza therapeutics: Experimental evidence for the multi-hit hypothesis. *NPJ Parkinson's Disease*, 3, 18. <https://doi.org/10.1038/s41531-017-0019-z>
- Sánchez-Pernaute, R., Ferree, A., Cooper, O., Yu, M., Brownell, A.-L., & Isacson, O. (2004). Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 1(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-1-6>
- Sato, S., & Furuya, N. (2018). Induction of PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1759, 9–17. https://doi.org/10.1007/7651_2017_7
- Schallert, T., Fleming, S. M., Leasure, J. L., Tillerson, J. L., & Bland, S. T. (2000). CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*, 39(5), 777–787.

- [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(00\)00005-8](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(00)00005-8)
- Schallert, T., & Tillerson, J. L. (2000). Intervention Strategies for Degeneration of Dopamine Neurons in Parkinsonism. En D. F. Emerich, R. L. Dean, & P. R. Sanberg (Eds.), *Central Nervous System Diseases: Innovative Animal Models from Lab to Clinic* (pp. 131–151). Humana Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-59259-691-1_8
- Schildt, A., Walker, M. D., Dinelle, K., Miao, Q., Schulzer, M., O’Kusky, J., Farrer, M. J., Doudet, D. J., & Sossi, V. (2019). Single Inflammatory Trigger Leads to Neuroinflammation in LRRK2 Rodent Model without Degeneration of Dopaminergic Neurons. *Journal of Parkinson’s Disease*, 9(1), 121–139.
<https://doi.org/10.3233/JPD-181446>
- Scott, A., Khan, K., Cook, J., & Duronio, V. (2004). What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus? *British Journal of Sports Medicine*, 38(3), 248–249. <https://doi.org/10.1136/bjism.2003.011221>
- Sen, S., Webber, P. J., & West, A. B. (2009). Dependence of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) kinase activity on dimerization. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(52), 36346–36356.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.025437>
- Seol, W., Nam, D., & Son, I. (2019). Rab GTPases as Physiological Substrates of LRRK2 Kinase. *Experimental Neurobiology*, 28(2), 134–145.
<https://doi.org/10.5607/en.2019.28.2.134>
- Shutinoski, B., Hakimi, M., Harmsen, I. E., Lunn, M., Rocha, J., Lengacher, N., Zhou, Y. Y., Khan, J., Nguyen, A., Hake-Volling, Q., El-Kodsi, D., Li, J., Alikashani, A., Beauchamp, C., Majithia, J., Coombs, K., Shimshek, D., Marcogliese, P. C., Park, D. S., ... Schlossmacher, M. G. (2019). Lrrk2 alleles modulate inflammation during microbial infection of mice in a sex-dependent manner. *Science Translational Medicine*, 11(511).
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aas9292>
- Shytle, R. D., Mori, T., Townsend, K., Vendrame, M., Sun, N., Zeng, J., Ehrhart, J., Silver, A. A., Sanberg, P. R., & Tan, J. (2004). Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *Journal of Neurochemistry*, 89(2), 337–343. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2004.02347.x>
- Silva, B. A., Leal, M. C., Farías, M. I., Avalos, J. C., Besada, C. H., Pitossi, F. J., & Ferrari, C. C. (2018). A new focal model resembling features of cortical pathology of the progressive forms of multiple sclerosis: Influence of innate immunity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 69, 515–531.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.01.010>
- Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*, 36(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>
- Singleton, A. B. (2003). Alpha-Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson’s Disease. *Science*, 302(5646), 841–841.
<https://doi.org/10.1126/science.1090278>
- Sloan, M., Alegre-Abarrategui, J., Potgieter, D., Kaufmann, A.-K., Exley, R., Deltheil, T., Threlfell, S., Connor-Robson, N., Brimblecombe, K., Wallings, R., Cioroch, M., Bannerman, D. M., Bolam, J. P., Magill, P. J., Cragg, S. J., Dodson, P. D., & Wade-Martins, R. (2016). LRRK2 BAC transgenic rats develop progressive, L-DOPA-responsive motor impairment, and deficits in dopamine circuit function. *Human Molecular Genetics*, 25(5), 951–963.

- <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv628>
- Smajić, S., Prada-Medina, C. A., Landoulsi, Z., Ghelfi, J., Delcambre, S., Dietrich, C., Jarazo, J., Henck, J., Balachandran, S., Pachcek, S., Morris, C. M., Antony, P., Timmermann, B., Sauer, S., Pereira, S. L., Schwamborn, J. C., May, P., Grünewald, A., & Spielmann, M. (2021). Single-cell sequencing of human midbrain reveals glial activation and a Parkinson-specific neuronal state. *Brain: A Journal of Neurology*, awab446. <https://doi.org/10.1093/brain/awab446>
- Smith, W. W., Pei, Z., Jiang, H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Ross, C. A. (2006). Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nature Neuroscience*, 9(10), 1231–1233. <https://doi.org/10.1038/nn1776>
- Spittau, B. (2017). Aging Microglia—Phenotypes, Functions and Implications for Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00194>
- Stephenson, J., Nutma, E., van der Valk, P., & Amor, S. (2018). Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*, 154(2), 204–219. <https://doi.org/10.1111/imm.12922>
- Sturtzel, C. (2017). Endothelial Cells. En S. Sattler & T. Kennedy-Lydon (Eds.), *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology* (Vol. 1003, pp. 71–91). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8_4
- Subhramanyam, C. S., Wang, C., Hu, Q., & Dheen, S. T. (2019). Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 94, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.004>
- Subramaniam, S. R., Hingo, E., Neckel, N., Wang, J., Malhas, R., Miramontes, R., Su, X., Fiandaca, M., & Federoff, H. (2017). *Rats carrying human LRRK2 G2019S mutation show dopaminergic vulnerability and gait abnormalities after peripheral LPS induced inflammation*.
- Sulzer, D., Antonini, A., Leta, V., Nordvig, A., Smeyne, R. J., Goldman, J. E., Al-Dalahmah, O., Zecca, L., Sette, A., Bubacco, L., Meucci, O., Moro, E., Harms, A. S., Xu, Y., Fahn, S., & Ray Chaudhuri, K. (2020). COVID-19 and possible links with Parkinson's disease and parkinsonism: From bench to bedside. *NPJ Parkinson's Disease*, 6, 18. <https://doi.org/10.1038/s41531-020-00123-0>
- Tanner, C. M., Kamel, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G. S., Kasten, M., Chade, A. R., Comyns, K., Richards, M. B., Meng, C., Priestley, B., Fernandez, H. H., Cambi, F., Umbach, D. M., Blair, A., Sandler, D. P., & Langston, J. W. (2011). Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. *Environmental Health Perspectives*, 119(6), 866–872. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002839>
- Thévenet, J., Gobert, R. P., Huijsduijnen, R. H. van, Wiessner, C., & Sagot, Y. J. (2011). Regulation of LRRK2 Expression Points to a Functional Role in Human Monocyte Maturation. *PLOS ONE*, 6(6), e21519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021519>
- Trinh, J., & Farrer, M. (2013). Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, 9(8), 445–454. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.132>
- Tsika, E., Nguyen, A. P. T., Dusonchet, J., Colin, P., Schneider, B. L., & Moore, D. J. (2015). Adenoviral-mediated expression of G2019S LRRK2 induces striatal pathology in a kinase-dependent manner in a rat model of

- Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 77, 49–61.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.02.019>
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M. K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Turco, D. D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., González-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., ... Wood, N. W. (2004). Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1. *Science*, 304(5674), 1158–1160.
<https://doi.org/10.1126/science.1096284>
- Van der Perren, A., Cabezudo, D., Gelders, G., Peralta Ramos, J. M., Van den Haute, C., Baekelandt, V., & Lobbestael, E. (2021). LRRK2 Ablation Attenuates Alpha-Synuclein-Induced Neuroinflammation Without Affecting Neurodegeneration or Neuropathology In Vivo. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 18(2), 949–961. <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01007-8>
- Varin, A., & Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. *Immunobiology*, 214(7), 630–641.
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.009>
- Walker, M. D., Volta, M., Cataldi, S., Dinelle, K., Beccano-Kelly, D., Munsie, L., Kornelsen, R., Mah, C., Chou, P., Co, K., Khinda, J., Mroczek, M., Bergeron, S., Yu, K., Cao, L. P., Funk, N., Ott, T., Galter, D., Riess, O., ... Sossi, V. (2014). Behavioral Deficits and Striatal DA Signaling in LRRK2 p.G2019S Transgenic Rats: A Multimodal Investigation Including PET Neuroimaging. *Journal of Parkinson's Disease*, 4(3), 483–498.
<https://doi.org/10.3233/JPD-140344>
- Wallings, R. L., & Tansey, M. G. (2019). LRRK2 regulation of immune-pathways and inflammatory disease. *Biochemical Society Transactions*, 47(6), 1581.
<https://doi.org/10.1042/BST20180463>
- Wallings, R., Manzoni, C., & Bandopadhyay, R. (2015). Cellular processes associated with LRRK2 function and dysfunction. *The Febs Journal*, 282(15), 2806–2826. <https://doi.org/10.1111/febs.13305>
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J. H., Wang, H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C. J., & Tracey, K. J. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 421(6921), 384–388.
<https://doi.org/10.1038/nature01339>
- Wang, X., Yang, Y., Wang, X., & Xu, S. (2006). The effect of occupational exposure to metals on the nervous system function in welders. *Journal of Occupational Health*, 48(2), 100–106. <https://doi.org/10.1539/joh.48.100>
- Weisskopf, M. G., Knekt, P., O'Reilly, E. J., Lyytinen, J., Reunanen, A., Laden, F., Altshul, L., & Ascherio, A. (2010). Persistent organochlorine pesticides in serum and risk of Parkinson disease. *Neurology*, 74(13), 1055–1061.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181d76a93>
- Wendeln, A.-C., Degenhardt, K., Kaurani, L., Gertig, M., Ulas, T., Jain, G., Wagner, J., Häslér, L. M., Wild, K., Skodras, A., Blank, T., Staszewski, O., Datta, M., Centeno, T. P., Capece, V., Islam, M. R., Kerimoglu, C., Staufenbiel, M., Schultze, J. L., ... Neher, J. J. (2018). Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature*, 556(7701), 332–338. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0023-4>
- West, A. B., Cowell, R. M., Daher, J. P. L., Moehle, M. S., Hinkle, K. M., Melrose, H. L., Standaert, D. G., & Volpicelli-Daley, L. A. (2014). Differential LRRK2

- Expression in the Cortex, Striatum, and Substantia Nigra in Transgenic and Nontransgenic Rodents. *The Journal of comparative neurology*, 522(11), 2465–2480. <https://doi.org/10.1002/cne.23583>
- West, A. B., Moore, D. J., Biskup, S., Bugayenko, A., Smith, W. W., Ross, C. A., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2005). Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46), 16842–16847. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507360102>
- Westerlund, M., Belin, A. C., Anvret, A., Bickford, P., Olson, L., & Galter, D. (2008). Developmental regulation of leucine-rich repeat kinase 1 and 2 expression in the brain and other rodent and human organs: Implications for Parkinson's disease. *Neuroscience*, 152(2), 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.062>
- Wirdefeldt, K., Adami, H.-O., Cole, P., Trichopoulos, D., & Mandel, J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: A review of the evidence. *European Journal of Epidemiology*, 26(S1), 1–58. <https://doi.org/10.1007/s10654-011-9581-6>
- Wu, D. C., Jackson-Lewis, V., Vila, M., Tieu, K., Teismann, P., Vadseth, C., Choi, D.-K., Ischiropoulos, H., & Przedborski, S. (2002). Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(5), 1763–1771.
- Xiong, Y., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2017). Models of LRRK2-Associated Parkinson's Disease. *Advances in Neurobiology*, 14, 163–191. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49969-7_9
- Yang, X. W. (2009). BAC Use in the Study of the CNS. En *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 13–20). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.02008-8>
- Yao, L., Ye, Y., Mao, H., Lu, F., He, X., Lu, G., & Zhang, S. (2018). MicroRNA-124 regulates the expression of MEKK3 in the inflammatory pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1053-4>
- Zecca, L., Stroppolo, A., Gatti, A., Tampellini, D., Toscani, M., Gallorini, M., Giaveri, G., Arosio, P., Santambrogio, P., Fariello, R. G., Karatekin, E., Kleinman, M. H., Turro, N., Hornykiewicz, O., & Zucca, F. A. (2004). The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9843–9848. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403495101>
- Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D. S., Wu, X., Block, M. L., Wilson, B., Zhang, W., Zhou, Y., Hong, J.-S., & Zhang, J. (2005). Aggregated alpha-synuclein activates microglia: A process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(6), 533–542. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2751com>
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R. J., Calne, D. B., Stoessl, A. J., Pfeiffer, R. F., Patenge, N., Carbajal, I. C., Vieregge, P., Asmus, F., Müller-Myhsok, B., Dickson, D. W., Meitinger, T., ... Gasser, T. (2004). Mutations in LRRK2

Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology.
Neuron, 44(4), 601–607. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.005>